

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

CAROLINA FERNANDES RIBAS MARTINS

**EFEITO DO EXTRATO ETANÓLICO DE FOLHAS DE *Passiflora edulis* SOBRE A
ATIVAÇÃO DE MACRÓFAGOS E FORMAÇÃO DE PRODUTOS FINAIS DE
GLICAÇÃO AVANÇADA (AGEs) EM RATOS DIABÉTICOS**

Alfenas/MG

2012

Martins, Carolina Fernandes Ribas.

Efeito do extrato etanólico de folhas de *Passiflora edulis* sobre a ativação de macrófagos e formação de produtos finais de glicação avançada (AGE) em ratos diabéticos. / Carolina Fernandes Ribas Martins. - 2013.
73 f. -

Orientadora: Fernanda Borges de Araújo Paula.

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2013.

Bibliografia.

1. Passiflora. 2. Diabetes Mellitus. 3. Candida albicans. 4. Macrófagos. 5. Espécies Reativas de Oxigênio. I. Paula, Fernanda Borges de Araújo. II. Título.

CDD: 572

CAROLINA FERNANDES RIBAS MARTINS

**EFEITO DO EXTRATO ETANÓLICO DE FOLHAS DE *Passiflora edulis* SOBRE A
ATIVACÃO EM MACRÓFAGOS E FORMAÇÃO DE PRODUTOS FINAIS DE
GLICAÇÃO AVANÇADA (AGE_s) EM RATOS DIABÉTICOS**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Ciências Farmacêuticas. Área de Concentração: Obtenção e avaliação da atividade biológica de insumos farmacêuticos.

Orientadora: Profa. Dra. Fernanda Borges de Araújo Paula.

Co-Orientadora: Prof. Dra. Maísa Ribeiro Pereira Lima Brigagão.

Alfenas/MG

2012

CAROLINA FERNANDES RIBAS MARTINS

**EFEITO DO EXTRATO ETANÓLICO DE FOLHAS DE *Passiflora edulis* SOBRE A
ATIVACÃO EM MACRÓFAGOS E FORMAÇÃO DE PRODUTOS FINAIS DE
GLICAÇÃO AVANÇADA (AGEs) EM RATOS DIABÉTICOS**

A Banca examinadora abaixo-assinada,
aprova a Dissertação apresentada como
parte dos requisitos para a obtenção do
título de Mestre em Ciências
Farmacêuticas pela Universidade Federal
de Alfenas.

Aprovada em:

Prof.:

Instituição:

Assinatura:

Prof.:

Instituição:

Assinatura:

Prof.:

Instituição:

Assinatura:

Dedico a meu esposo, meus pais e minha irmã, que são minha base e minha vida, em todo os momentos, sempre juntos. Agradeço a Deus, por atender minhas preces e estar sempre ao meu lado, iluminando meus caminhos.

Ao meu esposo Marcos, minha eterna paixão, minha alma gêmea, por todo o apoio e paciência, por todos os conselhos e por estar sempre ao meu lado, me ensinando a ser mais forte, mais madura e persistente. Por acreditar em mim e me fazer reconhecer todo meu potencial. Agradeço a Deus por ter me enviado um anjo em minha vida!

Aos meus pais, Antonio e Lúcia, razão da minha vida, minha base, meu alicerce, meu porto seguro, sempre. Por todo apoio e por acreditar em mim, em meu potencial, me dando forças para seguir em frente sem temer os obstáculos. A minha querida irmã Priscila, por todos os conselhos, carinho e amor, por acreditar que tudo é possível. A meu cunhado Bruno, pelo apoio e alegria, tornando tudo mais simples.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Universidade Federal de Alfenas por me acolher e oferecer esta grande oportunidade em minha carreira.

A todos os professores que participaram direta e indiretamente do meu trabalho, contribuindo para minha formação. Especialmente aos professores Dr. Selmo, profa. Dra. Stella e profa. Dra. Maria Rita pelos ensinamentos, contribuindo na realização deste trabalho.

A todos os alunos de iniciação científica que ajudaram na realização deste estudo, especialmente a Lara, Juliane e Mayara, a contribuição de vocês foi fundamental.

A todos os técnicos do laboratório, especialmente a Eliana, pelo apoio e paciência, quando o laboratório estava uma bagunça, ajudando em todos os momentos.

À amiga Claudia, pelo imenso apoio e ensinamento, por ter ajudado nos experimentos e em todos os momentos que precisei.

Ao amigo Bruno, por ter me ensinado tudo, me ajudado em todos os momentos, desde minha entrada no laboratório até minha defesa. Sua ajuda foi fundamental, nunca vou esquecer de tudo que fez por mim. Minha eterna gratidão.

Aos membros da banca avaliadora, pela disponibilidade em participar e contribuir para finalização da minha dissertação.

À minha co-orientadora, Profa. Dra. Máisa Ribeiro Pereira Lima Brigagão, por ter tido sabedoria quando me encaminhou para o departamento de Análises Clínicas e ter me apresentado a minha orientadora. Agradeço também todo o apoio e ensinamento.

Finalmente agradeço a minha orientadora, profa, Dra. Fernanda Borges de Araújo Paula, por ter me acolhido em seu laboratório no momento que mais precisei, por ter acreditado em mim e me ajudado de todas as formas, fazendo possível a realização deste trabalho, em tão pouco tempo. Todos os momentos que passamos juntas, aprendi como tudo é possível quando trabalhamos com bastante dedicação e, vou levar comigo todos os ensinamentos que aprendi aqui, para a vida toda. Muito obrigada por ter me orientado nesta dissertação.

RESUMO

O aumento na formação de produtos finais de glicação avançada (AGEs) têm sido apontado como via responsável pelo comprometimento da função imunológica levando ao aumento da suscetibilidade à infecções em indivíduos diabéticos. Estes mecanismos podem envolver ativação do sistema NADPH oxidase, redução da capacidade fagocítica, interação entre os AGE formados e macromoléculas importantes para a função imune ou com receptores específicos para AGE (RAGEs) com aumento na produção de citocinas inflamatórias. O uso terapêutico das folhas de diversas espécies do gênero *Passiflora* é comum na medicina popular em diversos países, inclusive no Brasil. Porém, as informações científicas a respeito do uso de extratos de folhas de *Passiflora edulis* no tratamento do diabetes e de suas complicações, ainda não estão totalmente esclarecidas. Sendo assim, este trabalho tem como objetivo avaliar os efeitos destes extratos sobre a capacidade fagocítica e a produção de espécies reativas de oxigênio em macrófagos de ratos diabéticos. Ratos machos Wistar (300 ± 25 g) foram tratados com aloxano (120mg/kg de peso corporal dissolvido em salina 0,9%, via intraperitoneal). O extrato etanólico foi obtido por maceração em solução hidroalcolica 70%(V/V), seguida de evaporação sob pressão reduzida e liofilização. Este foi diluídos em água e administrado por gavagem (200mg do extrato etanólico seco/kg de peso do animal), durante 8 semanas após a indução do diabetes. Os animais foram anestesiados e o sangue colhido por punção cardíaca para obtenção de soro e determinação da glicemia por método enzimático colorimétrico e dos níveis de AGEs por fluorescência. A concentração de frutosaminas foi determinada no soro por método colorimétrico. A ativação celular foi avaliada através da produção de ERO bem como da capacidade fagocítica de macrófagos peritoneais ativados com *C albicans* (ATCC69548) opsonizada. A produção de ERO foi determinada por quimioluminescência amplificada com luminol. Os ensaios para avaliação da capacidade fagocítica e microbicida foram realizados através da incubação dos fagócitos frente à *Candida albicans* (ATCC 69548) em diferentes intervalos de tempo. Foram consideradas como tendo atividade fagocítica as células que apresentaram uma ou mais *C. albicans* internalizadas. A atividade microbicida foi determinada através da avaliação da viabilidade das leveduras fagocitadas.

Palavras-Chave: *Passiflora*; Diabetes Mellitus; Espécies Reativas de Oxigênio; Macrófagos; *Candida albicans*.

ABSTRACT

The high production of advanced glycation end-products (AGEs) have been identified as responsible for the impairment of immunological function, leading to an increase on susceptibility of infections on diabetic patients. This mechanisms can involve the NADPH oxidase activation, decrease of phagocytic capacity, interactions between the AGEs produced and important macromolecules to the immune function or with the receptor for advanced glycation end-products (RAGEs), increasing the production of inflammatory cytokines. The therapeutic use of leaves of several species of *Passiflora* is common in folk medicine in several countries, including Brazil. Nevertheless, some scientific information regarding the use of leaf extracts of *Passiflora edulis* in the treatment of diabetes and its complications, remains still unclear. Thus, the objective of this present work is to evaluate the effects of this extract on phagocytic capacity on macrophages in diabetic rats. Wistar male rats ($300 \pm 25\text{g}$) were treated with alloxan (120 mg/kg body weight dissolved in saline 0,9% intraperitoneal). The ethanolic extract was obtained by maceration in water-alcohol solution 70% (v/v) followed by evaporation under reduced pressure and lyophilization. After this process, the extract was diluted in water and administered by gavage (200 mg of dry ethanolic extract/kg body weight), during 8 weeks after the diabetes induction. The rats were anesthetized and blood sample was collected by cardiac puncture to obtain the sérum for the determination of glucose by enzymatic colorimetric method and determination of AGEs levels by fluorescence. The concentration of fructosamine was determined by colorimetric method in serum. The cell activation was determined through the production of ROS and phagocytic capacity of peritoneal macrophages, activated with opsonized *Candida albicans* (ATCC69548). The production of ROS was determined by chemiluminescence activated with luminol. The evaluation of phagocytic capacity was performed through the incubation of the phagocytes with *Candida albicans* internalized. The microbicide activity was determined by evaluating the viability of phagocytosed yeast.

Keywords: *Passiflora*; Diabetes Mellitus; Reactive Oxygen Species; Macrophages; *Candida albicans*.

LISTA DE ABREVIATURAS

ERO – espécies reativas de oxigênio

ERN – espécies reativas de nitrogênio

AGE – produtos finais de glicação avançada

NADPH oxidase – nicotinamida adenosina dinucleotideo fosfato oxidase

MDA – dialdeído malônico

RAGE – receptores para AGE

DM – Diabetes Mellitus

PMA – forbol miristato

nFMLP - formil-metionil-leucilfenilalanina

LPS – lipopolissacarídeo

MPO – enzima mieloperoxidase

R-NHCl - cloraminas

DPPH – 1,1-difenil-2-picrilhidrazil

BHT – butil hidróxi tolueno

FRAP – poder redutor de ferro

EDTA – ácido etilendiamino tetra-acético

TBA – ácido tiobarbitúrico

PBS – tampão fosfato

EH – extrato hidroalcoólico

PT – polifenóis totais

ABTS – 2,2 – azino – bis (3-etil benzotiazolina – 6 – ac. sulfônico)

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FLUXOGRAMA 1 - Preparo dos extratos aquoso e etanólico.....	32
TABELA 1 - Conteúdo de PT dos extratos aquoso e etanólico.....	41
TABELA 2 - Determinação da atividade antioxidante do extrato aquoso de folhas de <i>Passiflora edulis</i>	43
TABELA 3 – Determinação da atividade antioxidante do extrato etanólico de folhas de <i>Passiflora edulis</i>	43
TABELA 4 – Propriedades antioxidantes dos extratos aquoso e etanólico.....	48
TABELA 5 – Efeito do extrato etanólico de folhas de <i>P. edulis</i> sobre a glicemia e concentração de frutosaminas em ratos diabéticos e não diabéticos.....	50
FIGURA 1 – Detalhe das folhas e flores de <i>Passiflora edulis</i> SIMS.....	28
FIGURA 2 – Detalhe do fruto de <i>Passiflora edulis</i> SIMS.....	29
FIGURA 3 – Atividade sequestrante do radical DPPH apresentado pelo extrato aquoso de folhas de <i>P. edulis</i> comparada a atividade do BHT.....	44
FIGURA 4 – Atividade sequestrante do radical DPPH apresentado pelo extrato etanólico de folhas de <i>P. edulis</i> comparada a atividade do BHT.....	44
FIGURA 5 – Poder redutor apresentado pelo extrato aquoso.....	46
FIGURA 6 – Poder redutor de ferro apresentado pelo extrato etanólico.....	47
FIGURA 7 – Efeito do extrato etanólico de <i>P. edulis</i> sobre a produção de espécies reativas de oxigênio em ratos diabéticos e não diabéticos.....	53
FIGURA 8 – Efeito do extrato etanólico de <i>P. edulis</i> sobre a capacidade fagocítica em ratos diabéticos e não diabéticos.....	53

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	13
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	16
2.1 DIABETES MELLITUS	16
2.2 ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (ERO).....	19
2.3 PRODUTOS FINAIS DE GLICAÇÃO AVANÇADA (AGE)	24
2.4 USO DE EXTRATOS DE <i>PASSIFLORA EDULIS</i>	27
3 OBJETIVOS.....	31
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	32
4.1 OBTENÇÃO DA AMOSTRA E PREPARO DOS EXTRATOS.....	32
4.2 TRIAGEM FITOQUÍMICA PRELIMINAR E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE <i>IN VITRO</i>	33
4.2.1 DETERMINAÇÃO DE POLIFENÓIS TOTAIS	33
4.2.2 DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE SEQUESTRANTE DO RADICAL DPPH.....	33
4.2.3 DETERMINAÇÃO DO POTENCIAL DE REDUÇÃO DO FERRO	33
4.2.4 DETERMINAÇÃO DA IC ₅₀	34
4.3 ANÁLISES <i>IN VIVO</i>	34
4.3.1 ANIMAIS	34
4.3.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS	34
4.3.3 INDUÇÃO DO DIABETES.....	35
4.3.4 ADMINISTRAÇÃO DO EXTRATO.....	35
4.3.5 COLETA DE SANGUE E OBTENÇÃO DE SORO	35
4.3.6 DETERMINAÇÃO DA GLICEMIA	36
4.3.7 AVALIAÇÃO DA GLICAÇÃO PROTÉICA.....	36
4.3.9 OBTENÇÃO DOS MACRÓFAGOS DA CAVIDADE INTRAPERITONEAL.....	36
4.3.10 AVALIAÇÃO DA ATIVAÇÃO CELULAR	37
4.3.11 DETERMINAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR	37
4.3.12 PREPARO E OPSONIZAÇÃO DA SUSPENSÃO DE <i>CANDIDA ALBICANS</i>	38
4.3.13 DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE FAGOCÍTICA.....	38
4.3.14 DETERMINAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO.....	39
4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	39
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	40
5.1 TRIAGEM FITOQUÍMICA E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE <i>IN VITRO</i>	40
5.1.1 TEOR DE FENÓIS TOTAIS (FT) E CAPACIDADE REDUTORA TOTAL.....	40
5.1.2 CAPACIDADE SEQUESTRANTE DOS RADICAIS LIVRES	42
5.1.3 PODER REDUTOR DE FERRO.....	46
5.2 AVALIAÇÃO DA GLICEMIA E GLICAÇÃO DE PROTEÍNAS.....	48
5.3 AVALIAÇÃO DA ERO E CAPACIDADE FAGOCÍTICA DE MACRÓFAGOS.....	52
6 CONCLUSÃO.....	56
7 REFERENCIAS.....	57

1 INTRODUÇÃO

O diabetes mellitus constitui um sério problema de saúde pública devido aos altos índices de morbidade e mortalidade decorrentes principalmente das complicações crônicas induzidas pela doença. É caracterizado por níveis elevados de glicose sanguínea, resultantes de insuficiência e/ou resistência à ação da insulina, o que leva à anormalidades no metabolismo de carboidratos, lipídios e proteínas, conduzindo à complicações agudas e crônicas. Entre as complicações crônicas mais comuns destacam-se a aterosclerose, a nefropatia, a neuropatia e a retinopatia diabética, além da alta suscetibilidade à infecções de etiologia variada. Embora as complicações cardiovasculares causadas pela aterosclerose sejam uma das principais causas de morte entre os pacientes diabéticos, a alta frequência de infecções pode muitas vezes agravar uma condição clínica pré-existente (BARBOSA et al., 2008; DEVANGELIO et al., 2007).

A hiperglicemia, principal manifestação clínica do diabetes, está diretamente associada ao desenvolvimento destas complicações (DEVANGELIO et al, 2007). Alterações na produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) tem sido demonstrado como uma característica comum entre os principais mecanismos bioquímicos propostos para explicar as anormalidades estruturais e funcionais associadas à hiperglicemia e às complicações crônicas induzidas pelo diabetes mellitus (MOORADIAN; HAAS, 2011).

O aumento na suscetibilidade a infecções geralmente observados no diabetes mellitus tem sido atribuído a uma redução na defesa imune inata sendo demonstrada uma menor capacidade fagocítica associada a alterações na produção de ERO em fagócitos de indivíduos diabéticos quando comparados aos não diabéticos (HUANG et al 2011; LLORENTE et al, 2000). Existem teorias de que a hiperglicemia ou a presença de produtos finais da glicação avançada (AGEs) levariam as células fagocíticas a um estado de persistente ativação, o que induziria a ativação espontânea da cadeia oxidativa podendo tornar estas células menos responsivas quando estimuladas por patógenos e podendo ainda, iniciar um processo patológico, levando à injúria vascular (DING et al, 2007; WILSON; REEVES, 1986). Entretanto, ainda existem divergências em relação aos efeitos do diabetes mellitus sobre a produção de ERO mediada pelo

sistema NADPH oxidase em células fagocíticas, principalmente nas células mononucleares (ALBA-LOUREIRO et al 2006; SERLENGA et al, 1993).

Sabe-se também que no diabetes mellitus descontrolado ocorre um aumento na formação de produtos finais de glicação avançada (AGEs) que podem ser provenientes, por exemplo, de interações entre açúcares redutores e grupamentos amina de proteínas, havendo produção de ERO durante este processo. Tanto as ERO quanto os AGEs formados podem interagir com macromoléculas levando ao comprometimento estrutural e funcional das mesmas (LAPOLA; TRALDI; FEDELE, 2005).

A interação das ERO com lipídios e proteínas pode levar ao aumento da oxidação destas moléculas, formando produtos como dialdeído malônico (MDA) e grupamentos carbonila, respectivamente. O aumento na formação destes compostos pode contribuir para o comprometimento da função biológica de proteínas, inativação de enzimas e rompimento da homeostase celular. Os AGEs formados também podem interagir com macromoléculas, como colágeno, lipoproteínas e imunoglobulinas ou ainda com receptores específicos para AGEs, denominados RAGEs. A interação dos AGEs com moléculas de imunoglobulinas pode levar a alteração estrutural destas proteínas e comprometer a função imune. Em monócitos e macrófagos, a interação de AGEs com RAGEs leva ao aumento na produção de citocinas inflamatórias, fatores de crescimento e de ERO (BARBOSA et al, 2008).

Apesar dos avanços alcançados no controle da hiperglicemia através de dietas, medicamentos hipoglicemiantes, insulina e até mesmo transplante de ilhotas de Langerhans, as complicações crônicas induzidas pelo diabetes ainda constituem a principal causa de morte em todo o mundo (DEVANGELIO et al, 2007). Assim várias linhas de pesquisa têm concentrado esforços na busca de compostos com atividades antioxidante e ou antiglicante (anti-AGEs) que possam ter potencial terapêutico na prevenção das complicações crônicas induzidas pelo diabetes mellitus (AHMAD; PISCHETSRIEDER; AHMED, 2007; PASHIKANTI et al, 2010).

O uso terapêutico das diversas espécies do gênero *Passiflora* é comum em diversos países. Estas espécies são utilizadas desde a antiguidade na medicina popular para tratamento de diversas enfermidades (JAMIR et al, 1999). Atualmente, alguns autores têm sugerido também uma atividade hipoglicemiante e antioxidante para

extratos etanólicos de folhas *Passiflora edulis* (DOYAMA et al, 2005). Além disso, os estudos sobre avaliação das propriedades antiglicantes de extratos de folhas de algumas espécies do gênero *Passiflora* tem sido conduzidos *in vitro* e *ex vivo*. Entretanto, existem poucos dados na literatura sobre seus efeitos *in vivo* no estresse oxidativo e na formação de produtos finais de glicação avançada (AGEs) (RUDNICKI et al, 2007).

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Diabetes Mellitus

O termo Diabetes Mellitus (DM) compreende um grupo heterogêneo de transtornos hiperglicêmicos, que afetam o metabolismo de carboidratos, lipídeos e proteínas e estão associados com uma deficiência absoluta ou relativa na secreção e /ou ação da insulina. Pode ser classificado em: diabetes mellitus tipo 1, diabetes mellitus Tipo 2; diabetes gestacional e diabetes mellitus associado a outras causas específicas (Associação Americana de Diabetes, 2012).

O DM tipo 1, comumente observado em crianças e adolescentes, resulta primariamente da destruição das células beta pancreáticas e tem tendência a cetoacidose. Inclui casos relacionados à auto-imunidade e aqueles nos quais a causa da destruição das células beta não é conhecida e representa cerca de 5 a 10% dos casos de diabetes mellitus diagnosticados.

O DM tipo 2 ocorre em 90 a 95% dos pacientes com diabetes e é mais comum em indivíduos com mais de 40 anos de idade. Em geral, observam-se graus variáveis de resistência à insulina e deficiência relativa de secreção de insulina. A maioria dos pacientes tem excesso de peso e a cetoacidose ocorre apenas em situações especiais, como durante infecções graves.

O DM gestacional é a diminuição da tolerância à glicose, de magnitude variável, diagnosticada pela primeira vez na gestação, podendo ou não persistir após o parto. Abrange os casos de DM e de tolerância à glicose diminuída detectados durante a gravidez.

O diabetes associado a outras causas específicas abrange variadas formas de DM, decorrentes de pré-disposição genética associada com outras doenças ou com uso de fármacos diabetogênicos (Associação Americana de Diabetes, 2012). A toxicidade das drogas diabetogênicas como, por exemplo, o aloxano, decorre de sua ação degenerativa sobre as células β -pancreáticas (SZKUDELSKI, 2001)

O DM é considerado hoje uma epidemia mundial e um dos principais problemas de saúde pública (Organização Mundial de Saúde - WHO, 2011; Sociedade Brasileira

de Diabetes, 2009; WILD et al, 2004). Juntamente com outras doenças não transmissíveis, como câncer, doenças respiratórias crônicas, infarto e cardiopatias, o diabetes está entre as principais causas de morbidade e mortalidade no mundo (WHO, 2011). Além disso, os custos econômicos e populacionais dessa epidemia são imensos (WILD et al, 2004). Um paciente com diabetes chega a consumir 2 a 3 vezes mais recursos financeiros do sistema de saúde do que pacientes não diabéticos.

Além das alterações metabólicas, o aparecimento de complicações crônicas como macroangiopatia, microangiopatia, neuropatia e infecções bacterianas, fúngicas ou virais em indivíduos diabéticos pode levar a danos e disfunções em diversos tecidos ou órgãos, tais como, rins, olhos, nervos periféricos, coração e sistema vascular. Essas complicações são as principais causas de morbidade e mortalidade em pacientes diabéticos e estão diretamente associadas ao descontrole glicêmico (DEVANGELIO et al, 2007).

Estudos epidemiológicos têm demonstrado maior incidência de infecções em indivíduos portadores de DM em comparação com indivíduos não diabéticos.

Carton et al (1992) demonstraram através de um estudo prospectivo realizado com 1000 indivíduos hospitalizados, que 2/3 das bacteremias detectadas foram observadas em pacientes diabéticos. Em 2003, um estudo retrospectivo realizado no Canadá, envolvendo 513.749 indivíduos portadores de DM tipo 2 e o mesmo número de indivíduos não diabéticos observou que os riscos de desenvolver doenças infecciosas relacionadas à hospitalização e de morte por infecções foram iguais a 2,17 e 1,92, respectivamente (SHAH; HUX, 2003). Em outro estudo retrospectivo realizado em 164 unidades de cuidado intensivo de 11 países, Stengenga et al (2010) analisaram dados obtidos em 830 pacientes com sepse e observaram que entre estes 22,7% dos indivíduos eram diabéticos. Foi relatado recentemente que entre 717 pacientes submetidos a cirurgia de revascularização miocárdica em um serviço de referência no Estado do Rio Grande do Sul, os indivíduos portadores de DM desenvolveram mais infecções e permaneceram mais tempo internados do que aqueles sem diabetes (LEDUR et al, 2011).

Além do risco aumentado de desenvolvimento de infecções mais raras entre indivíduos não diabéticos, como a otite externa maligna, mucormicose rinocerebral,

colecistite gangrenosa, no DM observa-se também uma maior incidência de infecções mais comuns como aquelas que acometem a pele, o trato respiratório, trato gastrointestinal e vias urinárias (RODRIGUES et al, 2010).

A presença de infecções cutâneas tem sido observada em até 80% dos diabéticos. Dentre estas, a infecção causada por fungos tem sido frequentemente relatada em pacientes diabéticos, seja na forma de *Tinea pedis* ou de candidíase. No pé, sob a forma de *Tinea pedis*, representa a infecção fúngica de pele mais comum de ser observada no DM (BRISTOW, 2008). Entretanto, infecções de pele por *Candida albicans* são bastante comuns em pacientes diabéticos, com manifestações clínicas variadas, podendo muitas vezes acometer também a cavidade oral, unhas assim como áreas flexurais, vagina e pênis (WEBER; SILVA, 2005).

Existem teorias de que a hiperglicemia ou a presença de AGEs poderiam levar à ativação espontânea da cadeia oxidativa e liberação de enzimas e outros componentes presentes nos fagócitos, tornando-os menos responsivos quando estimulados por patógenos. Além disso, tem sido demonstrado também que no diabetes há um aumento na formação de produtos finais de glicação avançada (AGEs) que podem se ligar a macromoléculas como por exemplo, imunoglobulinas, alterando sua estrutura e função (BARBOSA et al, 2008).

Alguns estudos têm sugerido que a alta suscetibilidade a infecções e a frequência aumentada de processos inflamatórios em pacientes diabéticos poderiam estar relacionadas a alterações na produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) por células fagocíticas como neutrófilos, monócitos e macrófagos bem como à modificação da sua capacidade funcional levando a alterações na quimiotaxia e fagocitose destas células (ALBA-LOUREIRO et al, 2006; DING et al, 2007; HUANG et al 2011; LLORENTE et al, 2000; SERLENGA et al, 1993; WILSON; REEVES, 1986).

Uma queda na resposta de polimorfonucleares de indivíduos diabéticos frente a estímulos diversos foi observada por Grykiel et al (2000). Os autores associaram estes resultados à elevada incidência de infecção bacteriana em indivíduos diabéticos. Kempf et al (2007) relataram que indivíduos diabéticos podem apresentar uma diminuição da ativação espontânea e da resposta neutrofilica quando comparados aos indivíduos não diabéticos.

Apesar dos diversos estudos que demonstram a importância do controle glicêmico na patogênese dessas alterações, o mecanismo exato que torna o indivíduo diabético mais susceptível ao desenvolvimento de infecções ainda não está totalmente elucidado.

2.2 Espécies reativas de oxigênio (ERO)

In vivo, o oxigênio é reduzido à água, via quatro elétrons, na cadeia respiratória. Porém, o oxigênio pode sofrer uma redução parcial com formação de produtos intermediários altamente reativos, sendo sua toxicidade decorrente da formação de seus derivados parcialmente reduzidos (ânion radical superóxido, peróxido de hidrogênio, radical hidroxila), denominados espécies reativas de oxigênio (ERO) (HALLIWELL; GUTERIDGE, 2008).

Na maioria das células que utilizam o oxigênio, este é reduzido pela citocromo c oxidase que, em virtude de seus dois grupamentos heme e dois grupos prostéticos Cu(II), controla a redução do oxigênio à água, via quatro elétrons, evitando a formação de tais produtos intermediários. No entanto, existem nas células, outras enzimas capazes de reduzir o oxigênio a peróxido de hidrogênio (H_2O_2), assim como processos enzimáticos e espontâneos que produzem ânion radical superóxido (O_2^-) (BROWN; BORUTAITE, 2012). Estima-se que em situações normais, apenas uma pequena fração do oxigênio total seja reduzida à O_2^- , no entanto, nas células em que a velocidade de utilização do oxigênio é alta, esta fração poderia corresponder a uma produção O_2^- intracelular de $5\mu\text{mol.L}^{-1}/\text{S}$ (GARDNER & BOVERIS, 1990; IMLAY & FRIDOVICH, 1991).

O ânion radical superóxido pode se difundir a uma distância considerável e atingir alvos críticos. Em solução aquosa o ânion superóxido e sua base conjugada, o radical hidroperoxil ($HO_2\cdot$), sofrem dismutação espontânea, resultando na formação de H_2O_2 . Embora o O_2^- seja instável em meio aquoso, o aumento de pH favorece sua estabilidade, de maneira que em pH neutro este radical é capaz de oxidar compostos tais como polifenóis, tióis, ascorbato, catecolaminas, leucoflavinas, tetraidropteridinas e

sulfito. Além disso, pode inativar a aconitase e desidratases contendo grupos [4Fe 4S] (HALLIWELL; GUTERIDGE, 2008).

O peróxido de hidrogênio é uma substância não-radicalar sendo sua reatividade em meio aquoso limitada, no entanto, pode atravessar membranas biológicas e por interação com o ânion superóxido, na presença e íon metálico (ferro ou cobre), gerar ERO mais oxidantes e citotóxicas como o radical hidroxila ($\text{OH}\cdot$), altamente reativo. Devido à sua extrema reatividade acredita-se que o $\text{OH}\cdot$ seja a principal ERO responsável por modificações de macromoléculas e dano celular (HALLIWELL; GUTERIDGE, 2008; FRANSEN et al 2012). Outras espécies oxidantes que podem ser formadas são o ácido hipocloroso (HOCl) e o oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$). Além de ser um potente agente microbicida, o ácido hipocloroso está envolvido na sinalização da apoptose de células do sistema imune (RESCH et al, 2011) e o $^1\text{O}_2$ pode exercer um importante papel como molécula sinalizadora na expressão gênica em eucariotos, participando da ativação do fator de transcrição NF- κ B, assim como ativação de quinases e outras enzimas (KLOTZ et al., 2003; TANG et al, 2009).

Formação ERO em sistemas biológicos

O radical superóxido pode ser formado por reações de auto-oxidação e oxidações enzimáticas em organelas subcelulares através de diferentes vias. Dentre as substâncias de interesse biológico que podem se autooxidar gerando superóxido incluem-se: hemoglobina, mioglobina, flavinas, catecolaminas e quinonas (FANG et al, 2000; HASKOVÁ et al, 2011; POLI, MOREIRA, IMASATO, 2011; WATANABE, FORMAN, 2003). Estas reações são geralmente em cadeia, nas quais o superóxido pode atuar como iniciador e propagador. Várias enzimas tais como xantina oxidase, aldeído oxidase, NADPH oxidase e uma série de flavinas desidrogenases geram superóxido. Outras fontes geradoras de superóxido incluem a oxidação de compostos reduzidos (nicotinamida e flavina dinucleotídeos) via transporte de elétrons mitocondrial e redução unieletrônica do oxigênio pela citocromo P-450 ou pela óxido nítrico sintase

(NOS) quando a arginina ou a tetraidropteridina estão deficientes (FANG et al, 2002; HALLIWELL, GUTERIDGE, 2008).

A enzima superóxido dismutase converte o O_2^- em peróxido de hidrogênio que é formado, portanto, nos processos que geram superóxido. O H_2O_2 pode também ser formado através da redução bieletrônica do oxigênio catalisada por enzimas tais como, citocromo P-450, d-aminoácido oxidase, acetil coenzima A oxidase ou ácido úrico oxidase (FANG et al, 2002; FORMAN, MAIORINO, URSINI, 2010; HALLIWELL, GUTERIDGE, 2008).

O radical hidroxila é altamente reativo para aminoácidos e outras moléculas, como, por exemplo, metalotioneínas, hemoglobina, deoxirribose, ribose e bases nitrogenadas purínicas e pirimídicas encontradas no DNA e RNA. Esta alta reatividade implica que esta espécie, quando gerada *in vivo*, reagirá *in situ*. Na maioria dos sistemas envolvendo ERO, o radical hidroxila parece ser o agente oxidante iniciador das lesões (CADET, 2010; HALLIWELL, GUTERIDGE, 2008).

A interação entre peróxido de hidrogênio e ânions cloreto, pode levar à formação do ácido hipocloroso (HOCl), através de uma reação catalisada pela enzima mieloperoxidase, principalmente em células fagocíticas imunologicamente ativadas (FLANNAGAN; JAUMOUILLÉ; GRINSTEIN, 2012; KLEBANOFF et al, 2013).

O 1O_2 pode ser formado pela reação do HOCl com H_2O_2 , sendo que a formação intracelular deste composto tem sido demonstrada durante processos inflamatórios. Outros processos capazes de gerar oxigênio singlete são a peroxidação lipídica e transições redox de quinonas, ou ainda a partir da dismutação do superóxido em meio aquoso (AGNEZ-LIMA, 2012; KHAN, 1981, MONTHILAL et al, 2004).

Em condições fisiológicas, aproximadamente 1 a 3% do oxigênio consumido pelo organismo é convertido em superóxido e outras ERO, onde tais espécies podem atuar na regulação de uma variedade de mecanismos moleculares relacionados a importantes processos, tais como resposta imune, adesão e proliferação celular, inflamação, metabolismo e morte celular. Várias moléculas que são criticamente importantes na sinalização celular e na regulação da expressão gênica são sensíveis às

ERO quando produzidas em concentrações ideais (FORMAN, MAIORINO, URSINI, 2010).

Entre os sistemas enzimáticos, a ativação do complexo NADPH oxidase constitui um importante processo que contribui para a geração destas espécies. Embora esteja presente em diversos tipos de células, a NADPH oxidase localizada nos fagócitos (Nox2) é a que mais contribui para a produção de ânion superóxido em comparação com as demais isoformas (FLANNAGAN, JAUMOUILLE, GRINSTEIN, 2012).

Fagocitose e *burst* oxidativo

As células fagocíticas desempenham um importante papel na defesa do organismo contra infecções. Durante o processo inflamatório, fatores quimiotáticos promovem o recrutamento destas células aos sítios de infecção, estimulando sua capacidade de interagir e destruir agentes infecciosos. A resposta é iniciada pela interação de estímulos ativadores com receptores específicos na superfície celular (SEGAL et al, 2012; HURST, 2012).

Concomitantemente com a fagocitose, ocorrem dois processos importantes através dos quais a partícula invasora é eliminada. O primeiro, conhecido como *burst* oxidativo, consiste em uma rápida e marcante ativação do metabolismo oxidativo dessas células, resultando na produção de ERO. O segundo processo, chamado degranulação, corresponde à liberação do conteúdo dos grânulos citoplasmáticos no vacúolo endossomal. A combinação destes processos resulta na destruição de microrganismos e no desenvolvimento de uma resposta inflamatória (FLANNAGAN, JAUMOUILLE, GRINSTEIN, 2012)

O *burst* oxidativo é um dos eventos centrais da fagocitose. Antes da estimulação as células fagocíticas consomem pequenas quantidades de oxigênio; porém, alguns segundos após a estimulação, ativam uma via especializada que resulta em um aumento de cem vezes no consumo de oxigênio. Este processo ocorre às custas da ativação do complexo enzimático NADPH oxidase, localizada na membrana dos fagócitos (HURST, 2012).

A ativação do sistema NADPH oxidase pode ser induzida por estímulos opsonizados (produzidos a partir de bactérias ou leveduras) e por mitógenos como o acetato de forbol miristato (PMA) e formil-metionil-leucilfenilalanina (fMLP). Em macrófagos esta ativação pode ser mediada, também, por interferon gama e lipopolissacarídeo (LPS) (FLANNAGAN; JAUMOUILLÉ; GRINSTEIN, 2012; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). Uma vez ativo, este sistema multienzimático é responsável pela transferência de elétrons do NADPH para o oxigênio molecular, formando o ânion superóxido (O_2^-) (HOTAMISLIGIL, 2006). Nesta situação, o consumo de oxigênio pode ser de duas a vinte vezes maior que o consumo basal, dependendo da célula e da natureza do estímulo. O ânion superóxido (O_2^-) tem pouca atividade microbicida, entretanto origina ERO mais potentes como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) que é formado a partir da dismutação do ânion superóxido, espontânea e/ou catalisada pela enzima superóxido dismutase (SOD). A formação de ácido hipocloroso (HOCl) pode ocorrer por meio de uma reação dependente de H_2O_2 , íons cloreto (Cl^-) e da enzima mieloperoxidase (MPO). Neste processo, cloraminas (R-NHCl) podem ser geradas pela reação de HOCl com compostos contendo nitrogênio. A produção de radical hidroxila ($\cdot OH$) por fagócitos pode envolver dois mecanismos possíveis: a reação de Fenton, onde H_2O_2 reage com íons metálicos, como por exemplo, íons ferro ou através da reação do HOCl com ânion superóxido (O_2^-). Além destes, pode ocorrer também a produção de oxigênio singlete (1O_2) pela reação de H_2O_2 com o HOCl. Ainda, a interação do ânion superóxido com óxido nítrico produzido através de uma reação catalisada pela enzima nítrico sintase indutiva, pode levar a formação do peroxinitrito, uma espécie com alta capacidade microbicida (FLANNAGAN; JAUMOUILLÉ; GRINSTEIN, 2012; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2008).

Embora seja evidenciado na literatura um maior número de estudos sobre *burst* oxidativo utilizando neutrófilos, sabe-se que a atividade fagocítica de células mononucleares também é essencial para a proteção do hospedeiro contra doenças infecciosas (FLANNAGAN; JAUMOUILLÉ; GRINSTEIN, 2012; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2008). Diversos estudos têm demonstrado que no diabetes mellitus há um comprometimento da atividade fagocítica destas células, o que poderia justificar o aumento da suscetibilidade a infecções comumente observadas em indivíduos

diabéticos (HUANG et al 2011; LLORENTE et al, 2000). Entretanto, os resultados obtidos em diferentes estudos em relação aos efeitos do diabetes mellitus sobre a produção de ERO por células mononucleares ainda não estão bem esclarecidos. Alguns autores têm observado um aumento na produção de ânion superóxido em monócitos de animais ou de humanos diabéticos (HUANG et al 2011; WILLIANS et al, 2011), porém há relatos na literatura de estudos em que houve uma redução na produção de ERO por monócitos e macrófagos em resposta ao diabetes mellitus (CHANG; SHAIQ, 1995; SOUZA et al, 2007).

2.3 Produtos finais de glicação avançada (AGES)

Estes compostos constituem uma variedade de produtos formados a partir de interações entre açúcares redutores e lipídeos oxidados, proteínas, aminofosfolipídeos ou ácidos nucleicos. Neste processo, a molécula de glicose pode ligar-se a estrutura de proteínas, através de uma reação não enzimática denominada reação de Maillard ou glicação. Através desta interação formam-se inicialmente uma cetoamina estável, conhecida como produto de Amadori. Estes produtos possuem grupos carbonilas reativos e através de ligações irreversíveis, podem acumular-se em proteínas de meia vida curta e longa. A hemoglobina glicada e as frutossaminas são conhecidos exemplos de produtos de Amadori (HALLIWELL; GUTTERRIDGE, 2008; LAPOLLA, TRALDI, FEDELE, 2005).

Os produtos de Amadori passam por reações de oxidação e desidratação levando à formação de compostos mais reativos que seus precursores e atuam propagando reações com grupos amina livres de proteínas que podem resultar na formação de compostos fluorescentes, insolúveis e irreversíveis, denominados produtos finais de glicação avançada (AGEs). Estes se acumulam nas proteínas e levam a lesões tissulares (HALLIWELL; GUTTERRIDGE, 2008; LAPOLLA, TRALDI, FEDELE, 2005).

Outro mecanismo pelo qual os AGEs podem ser formados, envolve auto-oxidação de açúcares livres na presença de oxigênio e metais livres, levando à

formação de compostos carbonila mais reativos, que interagem com proteínas e formam cetoaminas altamente reativas (BARBOSA, et al, 2008).

Deve-se ressaltar que, durante algumas das reações que levam à formação de AGEs, espécies reativas de oxigênio são geradas, contribuindo paralelamente com os danos estruturais e funcionais às macromoléculas (BARBOSA et al, 2008; LAPOLLA, TRALDI, FEDELE, 2005).

Os AGEs mais representativos são: N^ε-carboximetil-lisina (CML), de maior concentração no soro, N^ε-carboxietil-lisina (CEL), pirralina, dímero de lisina derivado do glioxal (GOLD), dímero de lisina derivado do metil glioxal (MOLD), dímero de lisina derivado da 3-deoxiglicose (DOLD), 1-alkil-2-formil-3,4-diglicosil pirrol (AFGP) e FFI (2-(2-fluoril)-4,5-furanil-1-H-imidazol) e os fluorófos pentosidina e arg-piridina (AHMED et al, 2002; IKEDA et al 1998; KIKUCHI et al, 2003; SCHLEICHER et al 2001; YONEKURA, 2003).

Diversos estudos têm utilizado a mensuração de produtos de glicação no soro ou nos tecidos de diabéticos para avaliar o risco de progressão da doença. Os dois parâmetros mais utilizados são a avaliação da hemoglobina glicada (HbA1c) e das proteínas do soro glicadas ou frutossaminas. A avaliação do controle metabólico no diabetes mellitus pode ser realizada estimando-se a extensão da exposição do organismo à glicose, através da determinação dos produtos iniciais de glicação. Os produtos intermediários de glicação que podem ser estimados no laboratório são glioxal, metil glioxal e deoxiglicosanos. Estudos demonstraram um aumento na concentração de metil glioxal nos rins, olhos e plasma de animais diabéticos quando comparados aos animais saudáveis. Este aumento ocorre de forma proporcional aos níveis glicêmicos (LAPOLLA et al, 2005).

Estudos indicam que os AGEs têm um papel essencial no desenvolvimento das complicações induzidas pelo diabetes mellitus (GROSSIN, WAUTIER, MEAS, 2008; MOHEIMANI, MORGAN, REYK, 2010; YAMAGISHI, 2011).

A caracterização estrutural dos produtos finais de glicação avançada é particularmente difícil devido a sua complexidade química, no entanto, a pentosidina e carboximetilisina (CML), já foram caracterizadas estruturalmente. Altos níveis de

pentosidina têm sido observados no plasma, hemácias e urina de pacientes diabéticos. Este aumento tem sido correlacionado com a idade e duração do diabetes. Além disso, existe uma relação linear entre e os níveis de pentosidina e a gravidade das complicações micro e macro angiopáticas. Altos níveis de CML têm sido observados em pacientes diabéticos e associados à retinopatia e nefropatia. Além disso, estudos recentes também indicam que a peroxidação lipídica, juntamente com a glicação, pode ser uma importante fonte de CML no diabetes e na aterosclerose (LAPOLLA, TRALDI, FEDELE, 2005).

Os AGEs formados podem lesar as células por diferentes mecanismos, tais como formação de ligações cruzadas com macromoléculas, interação com receptores celulares específicos e glicação intracelular. A formação de ligações cruzadas com o colágeno tem sido demonstrada em pacientes diabéticos e justifica a ocorrência de varias complicações crônicas observadas no diabetes mellitus, uma vez que pode alterar a estrutura e função biológica de macromoléculas tais como lipoproteínas, imunoglobulinas, entre outras (ALVES et al, 2007; GROSSIN, WAUTIER, MEAS, 2008).

Imunoglobulinas ligadas ao colágeno glicado têm uma capacidade diminuída para formar complexos antígeno-anticorpo. Além disso, sabe-se que a atividade dos fagócitos está modificada em diabéticos, devido à diminuição da quimiotaxia, aderência, fagocitose e destruição intracelular, o que diminui a capacidade imunológica e a resposta inflamatória desses pacientes (ALVES et al, 2007).

Dados da literatura têm demonstrado a existência de receptores celulares específicos para AGEs. Estes receptores foram identificados em diferentes células, tais como, linfócitos T, monócitos/ macrófagos, fibroblastos, células da musculatura lisa, neurônios, células vermelhas e mesangiais. Entre os diferentes receptores de AGEs, o receptor denominado RAGEs é provavelmente a molécula mais bem caracterizada até o momento (YONEKURA, 2003).

Nas células mononucleares, a interação dos AGEs com RAGEs ativa uma série de respostas celulares como a quimiotoxia, a expressão de citocinas pró-inflamatórias e fatores de crescimento (YAMAGISHI, 2011). Além disso, foi demonstrado por Ding et al (2007) que a incubação de células mononucleares com AGEs foi capaz de induzir

aumento significativo na produção de ânion superóxido em relação ao sistema controle.

Quanto à glicação intracelular, sabe-se que os AGEs formados podem interagir com nucleotídeos, histonas ou proteínas envolvidas na transcrição do DNA celular e alterar propriedades importantes para a homeostase celular (BARBOSA et al, 2008).

Sendo assim, os efeitos patológicos dos AGEs estão relacionados à capacidade destes compostos de modificar as propriedades químicas e funcionais das mais diversas estruturas biológicas (BARBOSA et al, 2008).

Dados da literatura têm demonstrado uma busca por compostos com propriedades antioxidantes e ou antiglicantes (anti-AGEs), capazes de impedir o acúmulo de AGEs no organismo. O primeiro composto a ser extensivamente estudado *in vitro* e *in vivo* como sendo um potente inibidor da formação de AGEs foi a aminoguanidina (AG) (BROWNLEE et al, 1986). AG tem sido amplamente testada em modelos animais. Estudos de vários investigadores demonstraram que ela retarda o desenvolvimento de complicações diabéticas, incluindo nefropatia, neuropatia e vasculopatia (BROWNLEE, 1995; LUO, 2012; SERBAN, COSTACHE, DINISCHIOTU, 2011; VADLA, VELLAICHAMY, 2012).

Atualmente, uma série de compostos, inclusive produtos naturais têm sido avaliados em relação ao potencial de inibir a formação destes produtos apresentando resultados promissores, porém estudos ainda necessários para a elucidação das estratégias capazes de estabelecer intervenções seguras que possam contribuir para a melhoria da qualidade de vida dos milhões de portadores dessa enfermidade.

2.4 *Passiflora edulis*

O gênero *Passiflora* compreende mais de 500 espécies, sendo a maioria da família Passifloraceae (DHAWAN, DHAWAN, SHARMA, 2004). Muitas das espécies de *Passiflora* são cultivadas pelas suas propriedades alimentícias, ornamentais ou medicinais (PEÑA, SHARP, WYSOKI, 2002).

A espécie *Passiflora edulis* é conhecida popularmente como maracujá, maracujá-de-comer, maracujá-comum, maracujá-de-doce, maracujá do mato, maracujá-mirim, maracujá-peroba, maracujá-roxo, maracujá-de-ponche (ALMEIDA, 1993; PEÑA, SHARP, WYSOKI, 2002; REITZ, 1980). É uma planta trepadeira glabra, com folhas simples, trilobadas com lobos elípticos ou ovado-elípticos, agudos ou acuminados, dentadas quando adultas, com base arredondada, subtruncada ou cuneada; lâmina foliar subcoriácea, lustrosa na face adaxial, trinervada. Apresenta flores brancas solitárias nas axilas das folhas, com franja roxa, medindo cerca de 5,0 cm de diâmetro; pedúnculo firme com até 6,0 cm de comprimento; sépalas alongadas, externamente verdes e internamente brancas; pétalas obtusas e brancas; coroa com 4 a 5 séries filamentosas sendo, duas séries externas com até 2,5 cm de comprimento, encrespadas no ápice, brancos e arroxeados na base; ovário globóide ou volumoso, tomentoso, raramente glabro (Figura 1).



Figura 1: Detalhes das folhas e flores de *Passiflora edulis* Sims. Fonte: Lorenzi (2002).

O fruto é globóide com 5,0 a 7,0 cm de diâmetro, amarelo ou amarelo-esverdeado ou salpicado arroxeadado quando maduro (Figura 2). Floresce desde setembro até março, quando ocorre a frutificação (ALMEIDA, 1993; REITZ, 1980).

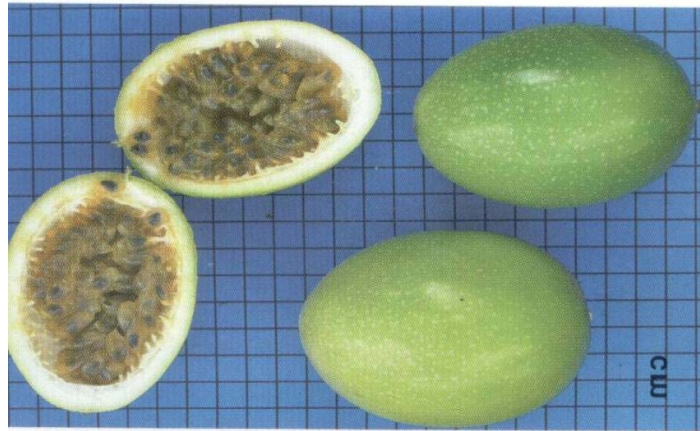


Figura 2: Detalhe do fruto de *Passiflora edulis* Sims. Fonte: Lorenzi (2002).

O Brasil é um grande produtor da espécie *Passiflora edulis*, que é utilizado tanto pelo valor nutricional de seus frutos, quanto na medicina popular (CAVALCANTE, 1976; DHAWAN, DHAWAN, SHARMA, 2004).

Dentre os constituintes químicos da *P. edulis* estão os glicosídeos (MARECK et al, 1991), os alcalóides (LUTOMSKI, MALEK, 1975) e os compostos fenólicos (CHALLIER et al, 1990; CHASSAGNE, BOULANGER, CROUZET, 1999; WINTERHALTER, 1990), entre os quais, destacam-se os flavonóides tais como isoorientina, orientina, vitexina, apigenina, entre outros (DHAWAN, DHAWAN, SHARMA, 2004; XU et al, 2013).

A passiflorina, um de seus componentes mais conhecidos é um ciclopropano triterpeno glicosídeo, que tem sido identificado em extratos metanólicos de folhas *P. edulis*.

Além destes constituintes, outros compostos também podem ser encontrados nas folhas de *P. edulis* como algumas γ -lactonas (BERNEREUTHER, CHRISTOPH, SCHRIER, 1989), saponinas (DOYAMA et al, 2005), carotenoides e alguns óleos voláteis e aminoácidos (ARRIAZA et al, 1997; DAWES, PAUL, 1961).

Dados da literatura demonstram que os extratos de folhas de *P. edulis* têm sido utilizados na medicina popular com diferentes funções tais como, sedativa, ansiolítica, anti-helmíntica, anti-diarréica, anti-hipertensiva, anti-inflamatória, hipoglicemiante e antibacteriana (BARBOSA et al 2008; DHAWAN, DHAWAN, SHARMA, 2004; FARID et al, 2010, KANNAN, 2011; LI et al, 2011). Além disso, componentes ativos obtidos das

folhas *P. edulis* estão incluídos em diversas preparações fitoquímicas citadas pela Farmacopéia Brasileira (1977)

Garros et al (2006) relataram que as folhas de *Passiflora edulis* também têm propriedades cicatrizantes. Os autores observaram que após o 14º dia de abertura de feridas em ratos Wistar, houve aumento significativo na produção de colágeno e fibroblastos. O extrato das folhas foi obtido por maceração hidroalcoólica a 70%. A aplicação tópica foi realizada com a pasta obtida na maceração, após filtração e evaporação do solvente.

Estudos experimentais têm demonstrado uma ação hipoglicemiante para os extratos alcoólicos de folhas de *P. edulis*, *P. mollissima* e *P. quadrangularis*, quando administrados por via oral em ratos diabéticos, durante um período de 8 dias. No entanto a administração do chá de folhas de *P. alata* por via oral, durante um período de 15 dias não foi capaz de reduzir a glicemia em ratos normoglicêmicos (DOYAMA et al, 2005).

Rudnicki et al (2007) observaram uma atividade antioxidante *in vitro* e *ex vivo* em extratos etanólicos de folhas de *P. edulis* e *P. alata*. Ainda neste estudo, os autores demonstraram que estes extratos foram capazes de inibir a formação de produtos finais de glicação (AGEs), sugerindo que possam exercer um efeito benéfico sobre o controle do diabetes. Contudo o mecanismo de inibição da formação de AGEs por extratos de plantas de gênero *Passiflora* ainda não está totalmente estabelecido.

3 OBJETIVOS

O presente trabalho tem como objetivo geral avaliar os possíveis efeitos do extrato etanólico de folhas de maracujá (*Passiflora edulis*) sobre a atividade antioxidante, glicação protéica e ativação de macrófagos em ratos diabéticos. Para atingir tais objetivos as seguintes metas foram propostas:

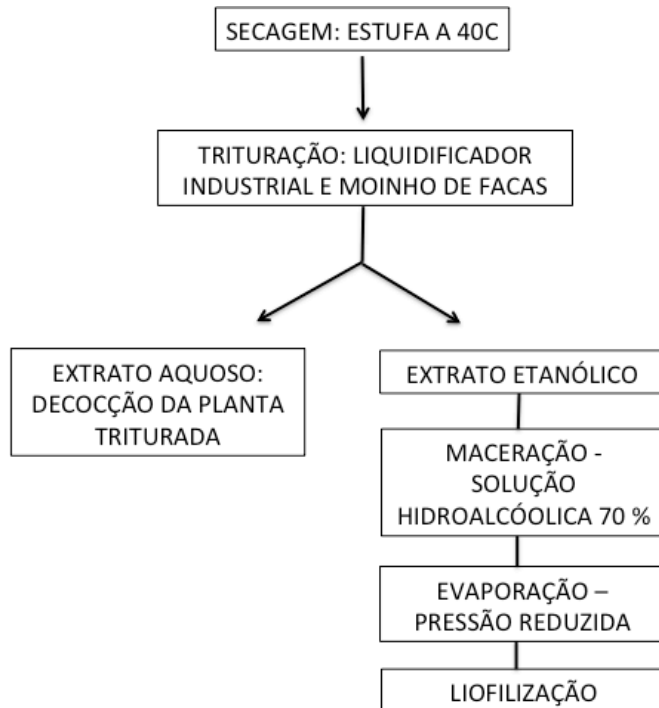
- Realizar uma avaliação preliminar da capacidade antioxidante *in vitro* do extrato etanólico de folhas de *Passiflora edulis*;
- Analisar o efeito da ingestão do extrato sobre a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) em macrófagos de ratos normais e diabéticos;
- Verificar o efeito da ingestão dos extratos sobre a capacidade fagocítica de macrófagos em normais e diabéticos frente à *Candida albicans*;
- Analisar o efeito do extrato sobre a formação de produtos de Amadori no sangue de animais normais e diabéticos;
- Verificar o efeito da ingestão do extrato sobre a formação de produtos de glicação avançada no soro de ratos normais e diabéticos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Obtenção da amostra e preparo dos extratos

As folhas do maracujazeiro em estudo foram coletadas no mês de fevereiro, no município de Alfenas-MG, com exicata de número 4446. A localização geográfica compreende latitude $21^{\circ}27'33''S$ e longitude $46^{\circ}01'59''W$, a 789 m do nível do mar.

Para a obtenção dos extratos, as folhas coletadas foram secas em estufa a $40^{\circ}C$ e trituradas em liquidificador industrial. O extrato aquoso foi obtido através da decocção da planta triturada (20%, p/v) (DOYAMA et al, 2005). O extrato etanólico foi preparado por maceração em solução hidroalcoólica 70% e, posteriormente, a solução extrativa foi submetida a evaporação sob pressão reduzida e liofilização, conforme resumido no Fluxograma 1 (RUDINICKI et al, 2007).



Fluxograma 1 – Preparo dos extratos aquoso e etanólico. Fonte: Do autor.

4.2 Triagem Fitoquímica Preliminar e Avaliação da Atividade Antioxidante *in vitro*

4.2.1 Determinação de Polifenóis Totais

O teor de polifenóis foi determinado em alíquotas do extrato pelo método de Folin & Ciocalteu, utilizando como padrão o ácido gálico. (SINGLETON, ORTHOFER, LAMUNELA, 1999). Os resultados foram expressos em gramas equivalentes de ácido gálico (g GAE/100g extrato). Todas as determinações foram realizadas em triplicata.

4.2.2. Determinação da Capacidade Sequestrante do Radical DPPH

A habilidade de doar hidrogênio ou elétrons em solução metanólica de 2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) 0,02% foi determinada em amostras do EH de *P. edulis* em diferentes concentrações, em 517nm (DUDONNÉ et al, 2009). A capacidade sequestrante de radicais DPPH foi expressa em porcentagem em relação ao controle contendo apenas a solução de DPPH 0,02% e comparada a uma curva padrão realizada com solução etanólica BHT nas mesmas concentrações do extrato hidroetanólico de *P. edulis*. Todas as determinações foram realizadas em triplicata.

4.2.3. Determinação do potencial de redução do ferro

Para a avaliação do poder redutor de ferro alíquotas do extrato em diferentes concentrações foram adicionadas ao tampão fosfato e ferricianeto de potássio 1%. Após 30 minutos de incubação das amostras a 50°C, foi acrescentado ácido tricloroacético a 10% e as amostras foram centrifugadas a 3.000 rpm. Em seguida, foi adicionado cloreto férrico a 0,1% e a leitura realizada em 700 nm, em espectrofotômetro (Biospectro SP – 220). Foi utilizado como padrão comparativo o reagente BHT, na concentração dos extratos testados. O controle da reação foi feito adicionando o reagente sem acrescentar a amostra. Todas as amostras foram feitas em triplicata. Os

resultados foram expressos em porcentagem comparando com o padrão BHT a 1% (YILDIRIM et al, 2001).

4.2.4 Determinação da IC₅₀

A partir dos dados e curvas obtidas nos ensaios realizados para determinação da capacidade sequestrante de radicais DPPH e para avaliação do poder redutor de ferro foram calculados os valores de IC₅₀ que indicam a concentração de EH de *P. edulis* capaz de induzir 50% do efeito avaliado. As curvas de regressão linear foram calculadas através do programa Origin 8.0.

4.3 Análises *in vivo*

4.3.1 Animais

Foram utilizados ratos machos Wistar, com peso de 350 ± 25 g, obtidos no Biotério da Universidade Federal de Alfenas. Os procedimentos foram realizados de acordo com os princípios éticos na experimentação animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal e aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa em Animais da UNIFAL-MG, protocolo número 405/2012. Os animais foram mantidos em caixas de polietileno, recebendo água e ração comercial *ad libitum* e divididos em 4 grupos experimentais contendo 8 animais.

4.3.2 Grupos experimentais

- Controle: animais não diabéticos e não submetidos ao tratamento com os extratos.
- Diabéticos: animais diabéticos submetidos ao tratamento com aloxano.

- Controle Extrato Etanólico: animais tratados com extrato etanólico de folhas de *Passiflora edulis*.
- Diabéticos Extrato Etanólico: animais tratados com extrato etanólico de folhas de *Passiflora edulis* e com aloxano.

4.3.3 Indução do Diabetes

Para induzir o diabetes foi administrado, por via intraperitoneal (FERREIRA et al, 2012), aloxano na dose de 120 mg/Kg de peso corporal, dissolvido em salina 0,9% (p/v) e a glicemia verificada no sangue colhido da porção distal da cauda do animal através do uso de tiras reativas e aparelho portátil (glicosímetro). Foram considerados como ratos diabéticos aqueles que apresentaram glicemia de jejum acima de 200 mg/dL (JAOUHARI, LAZREK, JANA, 2000; TANG et al, 2006).

4.3.4 Administração do extrato

O extrato etanólico foi diluído em água e administrado por gavagem durante 8 semanas após a indução do diabetes. A quantidade de extrato fornecida aos animais foi de 200 mg do extrato etanólico (seco) por quilo de peso do animal. O volume final administrado em cada animal foi de no máximo 0,5 mL. Para o grupo controle foram administrados 0,5 mL de água (DHANABAL et al, 2004).

4.3.5 Coleta de sangue e obtenção de soro

Os animais foram anestesiados e o sangue colhido por punção cardíaca para obtenção do soro. O sangue foi colhido e distribuído em tubos de vidros siliconizados (sem aditivo) e mantida em repouso até completar a coagulação sanguínea.

Em seguida as amostras foram centrifugadas a 1500g por 10 minutos e armazenadas a -80°C. As amostras de soro foram utilizadas para a determinação da

glicemia e da concentração de frutosaminas (BURTIS, ASHWOOD, 1999; PUNCHARD, KELLY, 1996).

4.3.6 Determinação da glicemia

A glicemia foi determinada no soro por método enzimático colorimétrico (glicose oxidase) baseado na reação de Trinder, utilizando um kit para determinação de glicose da marca Labtest (BURTIS, ASHWOOD, 1999).

4.3.7 Avaliação da glicação protéica

A glicação protéica foi avaliada através da determinação da concentração de frutosaminas e de AGEs no soro.

A concentração de frutosaminas foi determinada por método cinético colorimétrico de 2 pontos, utilizado um kit comercial da marca Analisa Gold. As absorbâncias foram determinadas em 530nm em aparelho semi-automático BioPlus (BURTIS, ASHWOOD, 1999).

Os AGEs foram quantificados pela medida da fluorescência como descrito por Zilin et al (2001). Foi determinada a quantidade de proteínas no soro, pelo método de Biureto. Alíquotas contendo 70 μ L de soro foram adicionadas a 330 μ L de clorofórmio. Em seguida as proteínas foram precipitadas pela adição de 1,6 mL de ácido tricloracético 0,15 M, seguidas de agitação em vórtex e centrifugação a 12000g por 15min. O espectrofluorímetro foi ajustado nos comprimentos de onda de 350 nm (excitação) e 440 nm (emissão) com abertura de fenda de 5 nm. As medidas foram realizadas a temperatura ambiente em cubeta de 1 cm de caminho ótico. Os resultados foram expressos em unidade arbitrária específica dividida pela concentração de proteínas no soro (UA/g proteína) (ZILIN et al, 2001).

4.3.9 Obtenção dos macrófagos da cavidade intraperitoneal

Os macrófagos foram elicitados por meio da administração intraperitoneal de caseinato de sódio 3%. Depois de 72 horas após a injeção, foi colhido o sangue dos animais conforme descrito no item 5.3.5. e, em seguida, os animais foram submetidos à eutanásia e os macrófagos recolhidos por lavagem peritoneal com solução salina tamponada (PBS) estéril, pH 7.4 a 4° C. A suspensão resultante foi centrifugada a 2000g por 15 minutos.

O sobrenadante contendo as células foi ressuspensão em PBS glicosado e mantido em gelo até o momento do ensaio. Estas amostras foram utilizadas para a avaliação da ativação celular.

4.3.10 Avaliação da produção de ERO

Na produção de espécies reativas de oxigênio foi avaliada a capacidade fagocítica de macrófagos peritoneais quando expostos à *Candida albicans* opsonizada com soros homólogos em ratos diabéticos e não diabéticos.

4.3.11 Determinação da viabilidade celular

A viabilidade celular foi avaliada pelo teste de exclusão de corante (azul de tripan a 0,1%). O número de células obtido da cavidade peritoneal foi determinado em câmara de Neubauer e os diferentes tipos celulares presentes, avaliados pela análise morfológica realizada em lâminas obtidas de alíquotas do lavado peritoneal, submetidas à citocentrifugação e coradas pelo método de May-Grunwald-Giemsa (DANIEL et al, 1971).

4.3.12 Preparo e Opsonização da Suspensão de *Candida albicans*

As leveduras de *C. albicans* (ATCC 69548) foram obtidas após cultura de 24 hs em meio ágar Sabouraud. Foi preparada uma suspensão de *C. albicans* em 4 mL de PBS estéril, pH 7.4 e dividida em 2 alíquotas. As células foram contadas em câmara de Neubauer. A seguir foi adicionado 1 mL de soro de ratos diabéticos ou não diabéticos em cada uma destas suspensões de *C. albicans* que foram incubadas a 37° C por 30 minutos, sob agitação. Todo o processamento foi realizado em condições assépticas, sendo o material utilizado previamente esterilizado.

4.3.13 Determinação da capacidade fagocítica

Em tubos plásticos estéreis, foram adicionados a suspensão de macrófagos obtidos conforme descrito previamente no item 4.3.9 (3×10^6 células/mL) e a suspensão opsonizada de *C. albicans* (3×10^7 células/mL), mantendo-se uma proporção de 1 macrófago/10 fungos. Os tubos foram incubados a 37° C, em sistema rotatório, à velocidade de 10 rpm, durante 30, 60 e 90 minutos para avaliação da fagocitose. O controle da reação foi feito com tubos contendo a suspensão de macrófagos e tubos contendo a suspensão de *C. albicans* opsonizada.

Após esse período foram preparadas lâminas por citocentrifugação em alíquotas de 100µL das suspensões contendo *C. albicans* e macrófagos e os controles. Estas foram centrifugadas por 5 minutos a 500 rpm e imediatamente fixadas e coradas com May-Grunwald-Giemsa modificado por ROSENFELD (1947). Para avaliação da fagocitose foram contados, no mínimo, 100 macrófagos, sendo considerados como tendo atividade fagocítica os macrófagos que apresentaram uma ou mais *Candida albicans* internalizadas. Os valores foram expressos em percentagem (FERREIRA et al, 2012).

4.3.14 Determinação da produção de espécies reativas de oxigênio

A produção de ERO foi determinada por quimioluminescência dependente de luminol, um agente amplificador de quimioluminescência, utilizado para o estudo da atividade oxidativa de fagócitos. Durante o ensaio, o luminol interage com espécies reativas de oxigênio formadas durante o *burst* respiratório tais como, radical hidroxila, oxigênio singlete e ácido hipocloroso formando o ânion aminoftalato (eletronicamente excitado) que ao retornar ao seu estado basal emite luz. Para a avaliação da produção destas espécies, a suspensão de macrófagos (2×10^6 céls/mL) foi incubada com PBS e 30 μ L de luminol 10^{-3} M. Em seguida foi adicionada a suspensão de *C. albicans* (2×10^7 céls/mL) e a reação foi monitorada durante 60 minutos.

4.4 Análise estatística

Os valores observados de cada variável foram submetidos à análise de variância. As comparações múltiplas entre as médias dos diferentes tratamentos foram realizadas utilizando-se o teste Turkey a 5% de probabilidade.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Triagem Fitoquímica e avaliação da atividade antioxidante *in vitro*

Sabe-se que diversas metodologias comumente adotadas para a determinação da capacidade antioxidante podem estar sujeitas a interferências, além de se basearem em diferentes fundamentos. Desta forma, a utilização de duas ou mais técnicas diferentes tem sido recomendada para tal avaliação (ALVES et al, 2010).

Considerando os resultados observados em diferentes estudos que têm associado a atividade antioxidante de extratos vegetais à presença de compostos redutores tais como compostos fenólicos, ácido ascórbico, carotenoides, tocoferol (CERQUEIRA, GENNARI, AUGUSTO, 2007; HAZEWINDEUS et al, 2012; RODRIGO, MIRANDA, VERGARA, 2011), para a avaliação preliminar das propriedades antioxidantes etanólico das folhas de *Passiflora edulis* foram adotados neste estudo diferentes ensaios visando avaliar o seu potencial redutor e sequestrante de radicais livres e compará-lo com o extrato aquoso.

5.1.1 Teor de fenóis totais (FT) e capacidade redutora total

Os compostos fenólicos são definidos como substâncias que possuem um anel aromático com um ou mais grupo hidroxila como substituinte. Nos vegetais estes compostos constituem um grupo quimicamente heterogêneo, com aproximadamente 10.000 compostos. Dentre estes, alguns são solúveis apenas em solventes orgânicos, enquanto outros como, por exemplo, ácidos carboxílicos e glicosídeos são solúveis em água, além dos grandes polímeros insolúveis (ROCKENBACH et al, 2008; SU et al, 2007).

No presente trabalho foi analisado o conteúdo de fenóis totais em amostras de extratos aquoso e etanólico de folhas de *Passiflora edulis* pelo método de Folin-Ciocauteau, sendo observado que os valores obtidos para o extrato etanólico foram

significativamente superiores aos observados para as amostras de extrato aquoso. (TABELA 1).

Tabela 1 – Conteúdo de fenóis totais (PT) dos extratos aquoso e etanólico. Os resultados representam a média \pm desvio padrão, realizadas em triplicata. Letras diferentes na mesma coluna indicam significância estatística, $P < 0,05$. PT¹ = Polifenóis Totais.

Concentração Extrato	PT¹ (g EAG/100 g de Extrato)
Extrato Etanólico	4,67 \pm 0,115 ^a
Extrato Aquoso	2,03 \pm 0,076 ^b

Fonte: Do Autor

O princípio desta metodologia se baseia na ação redutora dos compostos fenólicos que, ao interagirem com o ácido fosfotúngstico-molibdico levam à formação do complexo azul de molibdênio.

Apesar do reagente Folin-Ciocalteu ser um método muito utilizado para estimar conteúdo destes compostos em extratos vegetais, este é capaz de interagir também com compostos não fenólicos, como açúcares e metais, podendo resultar em valores superestimados de fenóis totais (IKAWA et al, 2003). Sendo assim, alguns autores têm sugerido que os resultados obtidos através desta metodologia deveriam ser interpretados como uma estimativa da capacidade redutora total das amostras analisadas (HUANG et al, 2005).

Portanto, os resultados obtidos nos permitem sugerir que o extrato etanólico de folhas de *P. edulis* possui maior capacidade redutora total que o extrato aquoso. Entre os compostos com ação redutora que poderiam estar presentes nas amostras analisadas, a presença de compostos fenólicos com polaridades distintas poderia contribuir com a diferença na capacidade redutora observada entre os dois extratos.

Razali et al (2008) demonstraram que o extrato metanólico de brotos de *Anacardium occidentale* apresentou conteúdo de fenóis totais cerca de 7 vezes maior que o extrato preparado com acetato de etila. Pilarsk et al. (2006) verificaram que o teor de compostos fenólicos no extrato etanólico da casca de *Uncaria tomentosae* foi superior ao observado no extrato aquoso. Nsimba et al (2008), avaliaram o conteúdo de fenóis totais em extratos de sementes de *Chenopodium quinoa* e *Amaranthus spp.* obtidos com solventes de diferentes polaridades e relataram que o conteúdo de compostos fenólicos foi superior nos extratos etanólicos das duas espécies analisadas.

Sendo assim, nossos resultados corroboram os dados da literatura, que têm demonstrado que soluções aquosas de etanol ou de metanol são mais eficientes para a extração de compostos fenólicos (NSIMBA et al, 2008; PILARSK et al, 2006; RAZALI et al., 2008).

Desta forma, nossos resultados demonstraram que o extrato etanólico de folhas de *P. edulis* apresentou maior capacidade redutora total quando comparado ao extrato aquoso, sugerindo assim um maior potencial antioxidante para o extrato etanólico.

5.1.2 Capacidade sequestrante dos radicais livres

Nos últimos anos, o método sequestrante de radicais livres se tornou bastante popular no estudo de compostos com atividades antioxidantes oriundos de produtos naturais, sendo adotado em numerosos estudos sobre avaliação da atividade antioxidante em vegetais (ALVES et al, 2010; NIKI, 2010). Assim como o método de Folin-Ciocalteu, o ensaio do DPPH também é baseado em reação de transferência de prótons. A redução do radical DPPH ocorre através da abstração de um átomo de hidrogênio do antioxidante em estudo. Assim, a capacidade sequestrante de radical livre é estimada através da avaliação da capacidade de doação de átomos de hidrogênio do composto presente no extrato para o radical DPPH, estabilizando-o (NIKI, 2010).

A capacidade de sequestrar o radical DPPH apresentada pelos compostos presentes no extratos aquoso e etanólico de folhas de *P. edulis*, expressa em porcentagem em relação ao padrão BHT está representada nas tabelas 2 e 3, respectivamente.

Tabela 2 – Determinação da atividade antioxidante do extrato aquoso de folhas de *P. edulis*. Os resultados representam a média \pm desvio padrão, realizadas em triplicata. Letras diferentes na mesma coluna indicam significância estatística, $P < 0,05$.

Concentração (mg/mL)	Capacidade Sequestrante (%)
0,06	33,93 \pm 1,56 (a)
0,12	41,165 \pm 1,09 (b)
0,6	49,19 \pm 0,18 (c)
1,2	61,94 \pm 4,28 (d)
1,8	70,15 \pm 1,71 (e)
2,4	66,66 \pm 1,85 (f)

Fonte: Do autor.

Tabela 3 – Determinação da atividade antioxidante do extrato etanólico de folhas de *P. edulis*. Os resultados representam a média \pm desvio padrão, realizadas em triplicata. Letras diferentes na mesma coluna indicam significância estatística, $P < 0,05$.

Concentração (mg/mL)	Capacidade Sequestrante (%)
0,125	46,65 \pm 2,90 (a)
0,5	56,62 \pm 3,55 (b)
1,0	60,31 \pm 1,08 (b)
5,0	66,37 \pm 0,51 (c)
10,0	81,53 \pm 3,75 (d)
15,0	88,54 \pm 3,64 (e)
20,0	94,64 \pm 0,63 (f)

Fonte: Do autor.

A atividade máxima apresentada pelos extratos aquoso e etanólico foi significativamente diferente, demonstrando que o extrato etanólico apresentou maior atividade antioxidante que o extrato aquoso. Na concentração de 20 mg/mL a atividade antioxidante apresentada pelo extrato etanólico foi estatisticamente semelhante à atividade do padrão BHT nesta mesma concentração (FIGURA 4).

As figuras 3 e 4 demonstram a cinética da atividade sequestrante de radical DPPH \cdot , apresentada pelos extratos aquoso e etanólico, respectivamente. Através destes gráficos pode-se observar que a atividade sequestrante aumentou proporcionalmente à medida que a concentração de extrato aumentou.

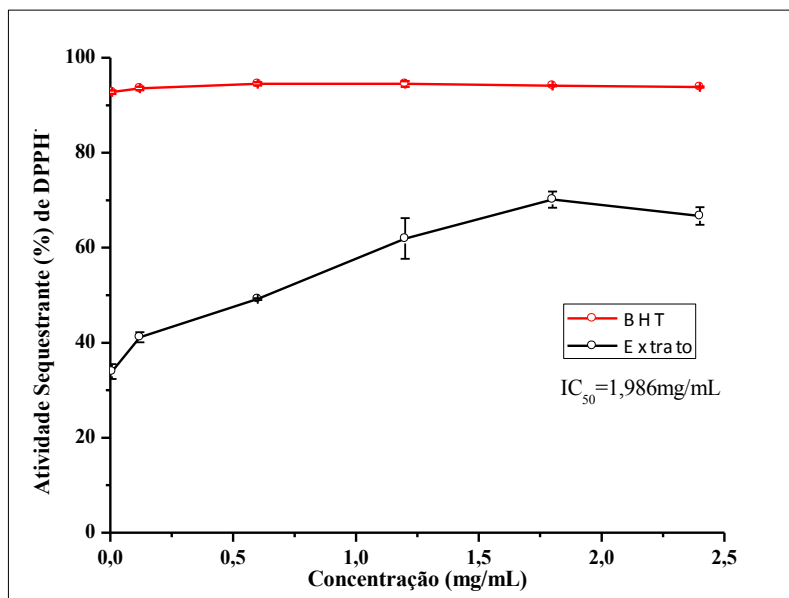


Figura 3: Atividade sequestrante do radical DPPH[•] apresentada pelo extrato aquoso de folhas de *P. edulis* comparada à atividade do BHT. Os resultados representam a média ± desvio padrão, realizadas em triplicata. Fonte: Do Autor.

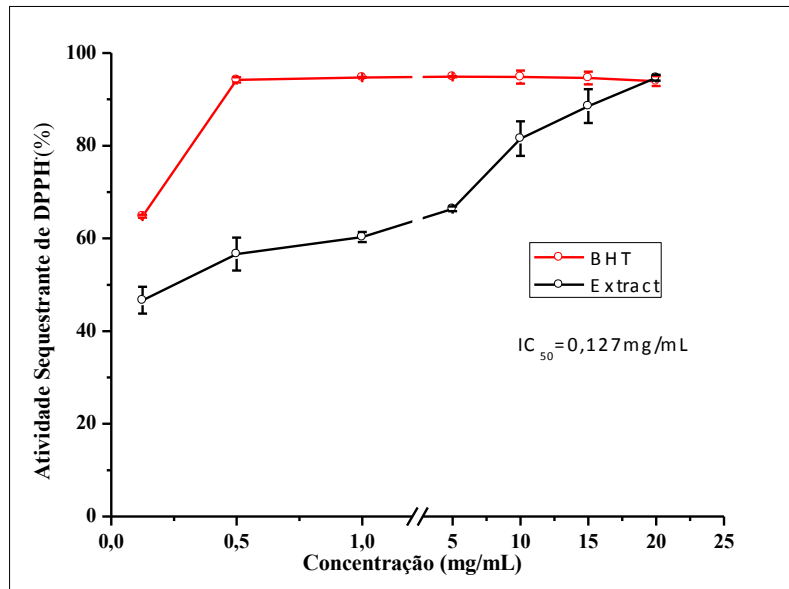


Figura 4 – Atividade sequestrante do radical DPPH[•] apresentada pelo extrato etanólico de folhas de *P. edulis* comparada à atividade do BHT. Os resultados representam a média ± desvio padrão, realizadas em triplicata. Fonte: Do Autor.

De acordo com estes resultados podemos sugerir a presença de compostos capazes de atuar como doadores de hidrogênio (H⁺) ao radical DPPH[•] nos extratos

analisados. Entretanto, esta ação foi diferente para cada um deles, uma vez que o extrato etanólico de folhas de *P. edulis* apresentou melhor capacidade sequestrante do radical DPPH' quando comparado ao extrato aquoso.

A composição e estrutura química do(s) componente(s) ativo(s) presente(s) em um extrato são importantes, e podem influenciar a sua atividade antioxidante (ROCKENBACH et al, 2008). No presente trabalho foi observado que o extrato etanólico apresentou maior teor de fenóis totais e maior capacidade sequestrante de radicais DPPH' quando comparado ao extrato aquoso de folhas de *P. edulis*. Estes resultados são apoiados por dados da literatura que têm demonstrado uma relação positiva entre concentração de fenóis totais presentes em diferentes vegetais e atividade antioxidante (WOOTTON-BEARD et al, 2011).

A avaliação das propriedades antioxidantes de extratos aquoso e etanólico de cascas de *Uncaria tomentosa*, demonstrou uma correlação positiva entre concentração de fenóis totais e atividade antioxidante, sendo que o extrato etanólico apresentou maiores concentrações de fenóis e maior atividade antioxidante (PILARSK et al, 2006). Vrcek et al, (2011) também observaram uma correlação positiva entre conteúdo de polifenol e a capacidade antioxidante avaliada por dois métodos, o ABTS e o DPPH. Uma correlação positiva entre potencial antioxidante, avaliado por três métodos diferentes, DPPH, β -caroteno e poder redutor e concentração de flavonoides em extratos de *Merremia borneensis* foi relatada por Houssain e Sahah (2011). Estes autores analisaram extratos obtidos em hexano, clorofórmio, etanol, acetato de etila e butanólico. Em todos os métodos, o extrato etanólico exibiu maior conteúdo de fenóis e potencial antioxidante em relação aos extratos preparados com outros solventes.

Por outro lado, alguns autores têm mencionado não observar correlação positiva entre o conteúdo de fenóis totais e a atividade antioxidante (ISMAIL, MARJAN, FOONG, 2004; SOUSA et al, 2007). Vale ressaltar que além da concentração de fenóis, a posição e número de hidroxilas presentes nestas moléculas são fatores relevantes para esta atividade como, por exemplo, a presença de orto-dihidroxilação que contribui marcadamente para atividade antioxidante de um composto. Além disso, outros fatores como o tipo e a polaridade do solvente utilizado para a extração dos fenóis também podem afetar a capacidade antioxidante.

5.1.3 Poder redutor de ferro

Os resultados obtidos para os extratos aquoso e etanólico estão representados nas figuras 5 e 6, respectivamente. Analisando essas figuras, podemos verificar que houve um aumento no poder redutor de ferro à medida que concentração dos extratos aumentou. Além disso, o extrato etanólico apresentou maior poder redutor de ferro que o extrato aquoso (FIGURA 6).

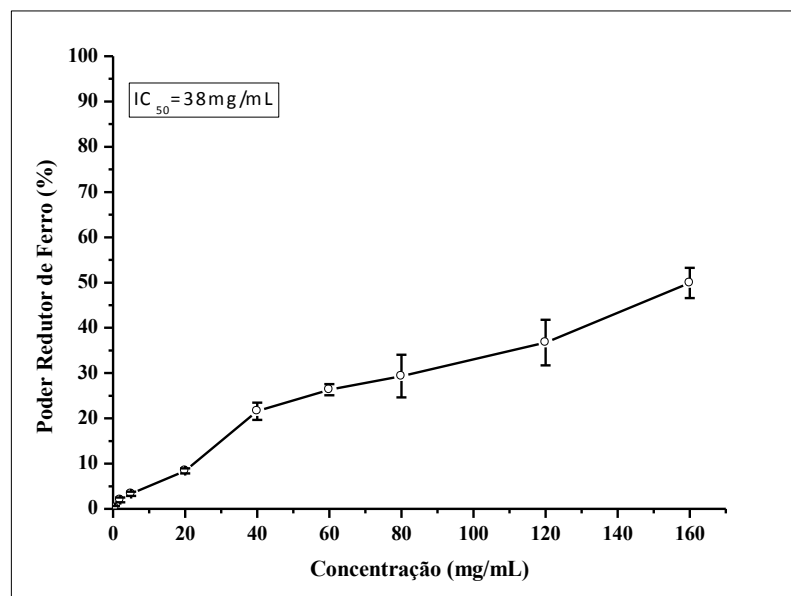


Figura 5: Poder redutor de ferro apresentado pelo extrato aquoso. Os resultados representam a média \pm erro padrão de 3-4 determinações realizadas em triplicata. Fonte: Do Autor.

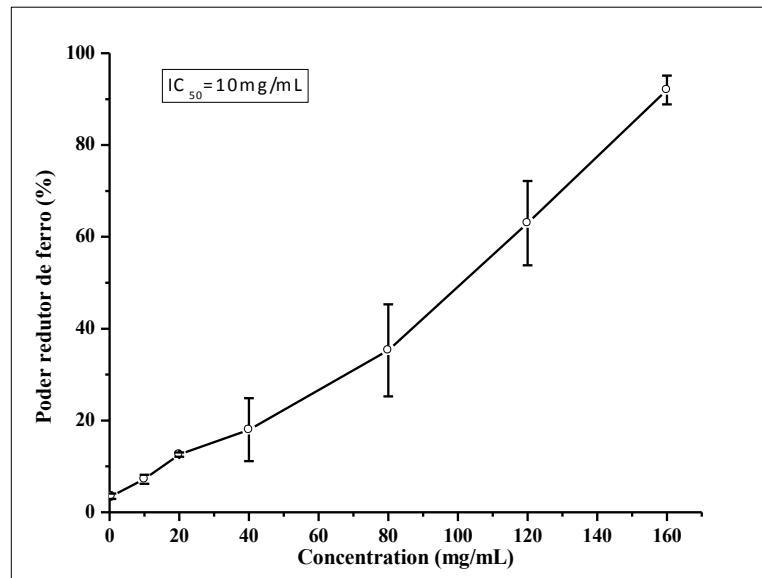


Figura 6: Poder redutor de ferro apresentado pelo extrato etanólico. Os resultados representam a média \pm erro padrão de 3-4 determinações realizadas em triplicata. Fonte: Do Autor.

Este método também se baseia na transferência de elétrons, porém avalia mais precisamente a capacidade de redução do ferro. A presença do antioxidante leva à redução do complexo Fe^{3+} /ferricianeto a uma forma ferrosa (Fe^{2+}) (PULIDO et al, 2000).

Associações entre concentrações de fenóis e poder redutor de ferro também têm sido relatadas na literatura (SILVA et al, 2009). Entretanto, é importante ressaltar que este método também pode ser influenciado pelo tipo de solvente e por outros agentes redutores além dos compostos fenólicos (PULIDO et al, 2000).

Os resultados obtidos demonstraram que os extratos aquoso e etanólico de folhas de *P. edulis* apresentam capacidade de redução do ferro, sendo este efeito dose-dependente. O maior poder redutor de ferro apresentado pelo extrato etanólico nos permite sugerir que este extrato apresenta uma maior capacidade de reduzir o ferro quando comparado ao extrato aquoso (OLIVEIRA, 2007).

Sendo assim, os resultados da avaliação preliminar das propriedades antioxidantes demonstraram que os extratos analisados possuem atividade antioxidante *in vitro*.

Em todos os ensaios realizados o extrato etanólico demonstrou maior potencial antioxidante do que o extrato aquoso (TABELA 4).

Tabela 4 – Propriedades antioxidantes dos extratos aquoso e etanólico. Os resultados representam a média \pm desvio padrão de 3-4 determinações. Letras diferentes na mesma coluna indicam significância estatística, $P < 0,05$.

Extrato	Fenóis totais (g EAG/100g de extrato)	Poder Redutor (%)		Capacidade Sequestrante(%)	
		Atividade máxima	IC ₅₀ (mg/mL)	Atividade Máxima	IC ₅₀ (mg/mL)
Etanólico	4,67 \pm 0,115 ^a	12,58 ^a \pm 0,46	10,0	94,64 ^a \pm 0,63	0,127
Aquoso	2,03 \pm 0,076 ^b	6,41 ^b \pm 0,55	38,0	70,15 ^b \pm 1,71	1,986

Fonte: Do Autor.

Poucos estudos sobre a composição química da *Passiflora edulis* e suas propriedades antioxidantes tem sido relatados na literatura, mas nossos resultados corroboram o estudo de Rudinicki et al. 2007. Os autores demonstraram que os extratos etanólicos de folhas de *Passiflora alata* e de *Passiflora edulis* apresentaram a capacidade antioxidante total proporcional à quantidade de extrato utilizada com resposta linear, ou seja, dose dependente, semelhante aos resultados encontrados neste trabalho.

5.2 Avaliação da glicemia e glicação de proteínas

O mecanismo de ação dos antioxidantes presentes nos extratos vegetais possui um importante papel na redução de processos oxidativos e também do risco de desenvolvimento de diversas patologias entre as quais destaca-se o diabetes mellitus (LAPOLA, TRALDI, FEDELE, 2005).

Tendo em vista os resultados obtidos na triagem fitoquímica e na avaliação da atividade antioxidante *in vitro* dos extratos aquoso e etanólico de *P. edulis* assim como diversos estudos demonstrando que plantas medicinais ricas em polifenóis e com propriedades antioxidantes podem apresentar atividade hipoglicemiante ou antiglicante (CHIS, 2009; LUCENFORD, GUGLIUCCI, 2005; RUDINICKI et al, 2007), foram avaliados neste estudo os efeitos do extrato etanólico de *P. edulis* sobre a glicemia e glicação protéica em ratos diabéticos.

Diversos estudos têm utilizado a mensuração de produtos de glicação no soro de diabéticos para avaliar o risco de progressão da doença, demonstrando uma correlação positiva entre níveis de proteínas glicadas em amostras sanguíneas e a prevalência de complicações crônicas induzidas pelo diabetes mellitus (BROWLEE, 1995; COHEN, 2003; RONDEAU, BOUDON, 2011). Assim, a determinação de produtos de glicação como as frutosaminas, a hemoglobina glicada e os AGEs pode ser utilizada para avaliar o controle metabólico de pacientes diabéticos (LAPOLLA, TRALDI, FEDELE, 2005).

Entre as estratégias adotadas para a redução ou manutenção dos níveis de proteínas sanguíneas glicadas dentro dos limites desejáveis, o controle glicêmico é sem dúvida a principal. Entretanto, tem sido demonstrado que uma variedade de agentes com propriedades anti-glicantes podem contribuir para a inibição da formação destes produtos de glicação, sendo sugerido que a redução destes poderia contribuir para a redução da progressão das complicações decorrentes do diabetes mellitus. Entre esses agentes estão medicamentos, suplementos e terapias dietéticas (BARBOSA et al, 2008).

Sendo assim, para a avaliação do controle glicêmico e da glicação protéica no soro dos animais dos diferentes grupos experimentais, foram determinadas as concentrações séricas de glicose, frutosaminas e de AGEs. Os resultados obtidos demonstraram que a administração do extrato não foi capaz de induzir alterações significativas na glicemia de jejum dos animais, porém a concentração de frutosaminas foi significativamente menor no soro dos animais diabéticos tratados com o extrato etanólico quando comparados com os animais diabéticos não tratados (Tabela 5), sugerindo que o extrato etanólico de *P. edulis* foi capaz de prevenir o aumento da glicação de proteínas séricas induzido pelo diabetes.

Tabela 5 –Efeito do extrato etanólico de folhas de *P. edulis* sobre a glicemia e concentração de frutosaminas em ratos diabéticos e não diabéticos. Os resultados representam a média \pm desvio padrão de 6-8 determinações por tratamento. Letras diferentes na mesma coluna indicam significância estatística, $P < 0,05$.

Grupos Experimentais	Glicemia (mg/dl)	Frutosaminas (mmol/L)	AGEs (unidades arbitrárias)
Controle	111,18 \pm 21,50 ^a	1,63 \pm 0,18 ^a	0,11 \pm 0,02 ^a
Diabético	473,66 \pm 13,37 ^b	2,38 \pm 0,41 ^b	0,17 \pm 0,06 ^b
Extrato	126,14 \pm 9,99 ^a	1,61 \pm 0,07 ^a	0,10 \pm 0,02 ^a
Diabético extrato	470,44 \pm 7,98 ^b	1,85 \pm 0,49 ^a	0,13 \pm 0,04 ^b

Fonte: Do Autor

Sabe-se que a formação das frutosaminas, envolve a interação entre o grupo nucleofílico de moléculas de glicose e o grupamento amina de proteínas séricas, principalmente da albumina. Desta forma, seus níveis séricos refletem o controle glicêmico nas duas a três semanas anteriores à coleta do sangue. Por outro lado, a determinação da glicemia de jejum reflete o controle glicêmico momentâneo (BURTIS; ASHWOOD, 1999; KOGA; KASAYAMA, 2012). Sendo assim, apesar do EH não ter influenciado os níveis glicêmicos, as concentrações de frutosaminas observadas neste estudo sugerem que a administração do EH poderia ter contribuído para a redução da glicemia média durante o período de tratamento, sendo, portanto benéfico no controle glicêmico.

A ação hipoglicemiante de extratos alcoólicos de folhas de *P. edulis*, *P. mollissima* e *P. quadrangulares* foi observada quando estes foram administrados por via oral em ratos diabéticos, durante um período de 8 dias. No entanto a administração do chá de folhas de *P. alata* por via oral, durante um período de 15 dias não foi capaz de reduzir a glicemia em ratos normoglicêmicos (DOYAMA et al, 2005).

Arya et al (2012) demonstraram que a fração metanólica de sementes de *Centratherum anthelminticum* apresentou potencial anti-diabéticos em cultura de células beta pancreáticas e em ratos com diabetes induzido por estreptozotocina. Estes efeitos foram associados aos polifenóis identificados na fração metanólica do extrato. Além disso, diversos estudos têm associado os efeitos anti-diabéticos apresentados por

algumas plantas medicinais á presença de polifenóis nos mesmos (RODRIGO; MIRANDA; VERGARA, 2011).

Além disso, a via de glicação protéica envolve auto-oxidação de açúcares livres na presença de oxigênio e metais livres, formação de compostos carbonila mais reativos e de cetoaminas altamente reativas. Portanto, compostos que sejam capazes de interromper uma destas reações podem levar à inibição da glicação protéica (BARBOSA et al, 2008).

Jain et al. (2005) demonstraram que o tratamento de eritrócitos com vitamina E antes da incubação de com glicose e peróxido de hidrogênio foi capaz de reduzir a velocidade de glicação da hemoglobina e os níveis de peróxidos lipídicos. Além disso, a ação inibidora da glicação de albumina sérica bovina e humana por compostos fenólicos extraídos de diversos produtos vegetais tem sido demonstrada por diferentes autores (LV et al 2010; WANG et al, 2011) .

Estudos *in vitro* demonstraram que extratos hidroetanólicos de folhas de *P. alata* inibiram a formação de AGEs a partir da interação entre albumina e glicose. Os autores atribuíram estes efeitos à atividade antioxidante apresentada pelos extratos analisados (RUDNICKI et al, 2007).

Embora outros mecanismos possam estar envolvidos na atividade antiglicante apresentada por compostos naturais e sintéticos, a ação da maioria destes compostos tem sido associada às suas propriedades antioxidantes, principalmente a capacidade de quelar metais e ou de sequestrar radicais carbonil (EDEAS et al, 2010; RABBAR, FIGAROLA, 2003; REDDY, BEYAZ, 2006). Ainda, muitos estudos têm atribuído estes efeitos aos compostos fenólicos como por exemplo, flavonóides presentes nos extratos analisados, (EDEAS et al, 2010; WANG et al, 2011).

No presente estudo, a concentração sérica de AGEs foi determinada por fluorescência, sendo observado um aumento nos níveis destes produtos no soro de animais diabéticos quando comparados aos animais não diabéticos. Contudo, não houve diferença estatística nos níveis séricos de AGEs fluorescentes entre os animais diabéticos tratados e não tratados com o extrato.

Vale ressaltar que o EH de *P.edulis* apresentou atividade sequestrante de radicais livres assim como potencial poder redutor de ferro, entretanto, não foi

evidenciada atividade inibidora da formação de AGEs fluorescentes. Por outro lado, foi observada uma redução na concentração de frutossaminas no soro dos animais diabéticos tratados como extrato. Tendo em vista que nem todos os AGEs presentes no soro possuem a capacidade de apresentar fluorescência entre 370 e 440nm (SCHLEICHER et al, 2001), a possibilidade de que o tratamento com o EH poderia exercer efeitos apenas sobre os AGEs não fluorescentes como por exemplo a carboximetilisina (CML), pode ser considerada.

Portanto, os resultados observados neste estudo poderiam ser atribuídos à presença de compostos fenólicos no EH de *P. edulis*. Estes compostos poderiam ter contribuído não somente para uma melhora no controle glicêmico, uma vez que podem aumentar a sensibilidade à insulina ou diminuir a absorção intestinal de carboidratos, como também por inibir reações oxidativas envolvidas na via de glicação protéica.

5.3 Avaliação da ERO e capacidade fagocítica de macrófagos

É conhecido que a hiperglicemia poderia modular negativamente a resposta de células fagocíticas frente a agentes infecciosos, o que justificaria a suscetibilidade aumentada às infecções, normalmente observada em indivíduos diabéticos (BANERJEE, SHARMA, 2012; SOUZA et al, 2007). Por outro lado, sabe-se que os macrófagos são componentes centrais da resposta imune inata à *C. albicans* e que a produção de ERO por estas células tem sido relatada como um importante mecanismo para a sua ativação e destruição de patógenos (SLAUCH, 2011).

Nossos resultados demonstraram que o diabetes mellitus assim como o tratamento com o EH de *P. edulis* não foram capazes de induzir alterações na capacidade fagocítica dos macrófagos, mas a produção de ERO foi significativamente menor em macrófagos peritoneais de ratos diabéticos quando comparada aos animais não diabéticos (Figuras 7 e 8, respectivamente). Além disso, o tratamento com o EH foi capaz de restabelecer a produção de ERO pelos macrófagos dos animais diabéticos.

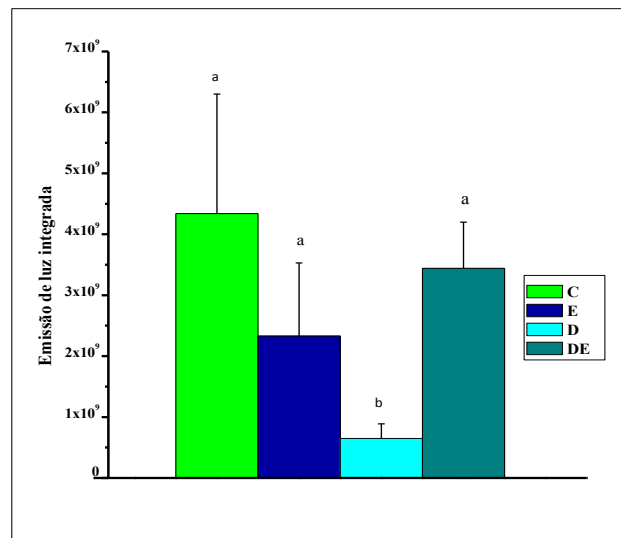


Figura 7 - Efeito do extrato etanólico de folhas de *P. edulis* sobre a produção de espécies reativas de oxigênio em ratos diabéticos e não diabéticos. Os resultados representam a média ± desvio padrão de 4-5 determinações por emissão de luz integrada obtida pela oxidação do luminol (1 mmol.l^{-1}) pelos macrófagos (1×10^6 células por teste) obtidos da cavidade peritoneal de ratos estimulados com *Candida albicans* (1×10^7 células por teste). C=grupo controle; D= animais diabéticos; E=animais não diabéticos tratados com o extrato hidroetanólico de *P. edulis*; DE=animais diabéticos tratados com o extrato hidroetanólico de *P. edulis*.

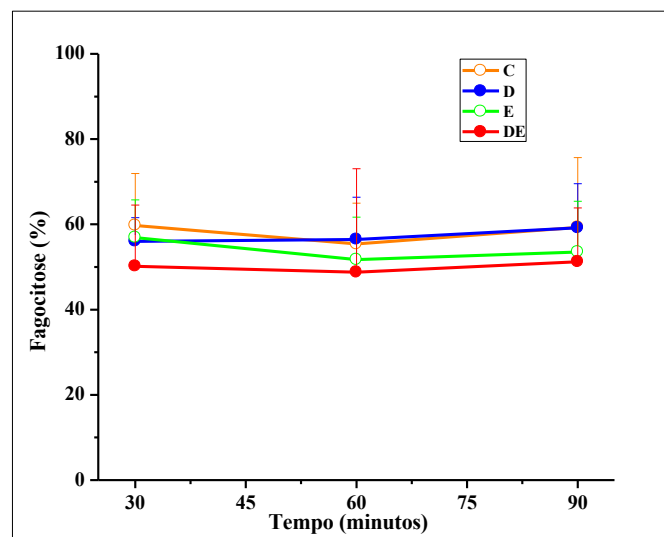


Figura 8 – Efeito do extrato etanólico de folhas de *P. edulis* sobre a fagocitose em macrófagos obtidos de cavidade peritoneal de ratos diabéticos e não diabéticos frente à *Candida albicans*. Os macrófagos foram incubados com *Candida albicans* opsonizada e incubadas por 0, 30, 60 e 90 minutos e a porcentagem de macrófagos que fagocitaram uma ou mais *C. albicans* foi determinada. C=grupo controle; D= animais diabéticos; E=animais não diabéticos tratados com o extrato etanólico de *P. edulis*; DE=animais diabéticos tratados com o extrato hidroetanólico de *P. edulis*. Os resultados representam a média ± desvio padrão de 4-5 determinações por tratamento.

A fagocitose ocorre após o reconhecimento do patógeno pelos macrófagos através de receptores específicos presentes na membrana celular. Durante a fagocitose, ERO são geradas através do sistema NADPH oxidase em um processo chamado *burst* oxidativo. Neste processo, o anion superóxido é produzido e, embora essa molécula apresente baixa atividade microbicida, é necessária para a produção de moléculas mais potentes, como o ácido hipocloroso (HOCl^\cdot) (BARBIOR, 2002; SLAUCH, 2011). Quando os macrófagos são ativados, as ERO produzidas são capazes de oxidar moléculas como o luminol para o estado excitado e desestabilizar intermediários, que podem ser mensurados pela quimioluminescência. (VILIM; WILHEM, 1989).

Diversos estudos têm demonstrado um comprometimento da atividade de células fagocíticas no diabetes mellitus (ALBA-LOUREIRO et al, 2009; HUANG et al 2011; LLORENTE et al, 2000). Entretanto, os resultados obtidos em relação aos efeitos do diabetes mellitus sobre a produção de ERO destas células ainda são divergentes. Alguns autores têm observado uma produção aumentada de ERO em células fagocíticas de animais ou de humanos diabéticos (HUANG et al 2011; WILLIANS et al, 2011), porém Souza et al (2007) observaram que a produção de ERO por macrófagos RAW 264.7 estimulados com lipopolissacarídeo (LPS) foi menor na presença de concentrações elevadas de glicose (500mg/dL) quando comparada às células incubadas com concentrações normais de glicose (200mg/dL). Banerjee e Sharma (2012) relataram que a atividade da NADPH oxidase de macrófagos mantidos em diferentes concentrações de glicose foi reduzida à medida que as concentrações de glicose aumentaram. Ainda neste estudo, os autores observaram uma associação entre o aumento da glicação na membrana celular e a redução da atividade da NADPH oxidase de macrófagos.

Assim, nossos resultados sugerem que a inibição do *burst* oxidativo em macrófagos de ratos diabéticos poderia ser um dos mecanismos responsáveis pela alta suscetibilidade a infecções pacientes diabéticos e que a administração do EH de *P. edulis* poderia contribuir para a prevenção desta disfunção.

Sabe-se que a hiperglicemia pode levar à glicação de proteínas presentes na membrana dos macrófagos, inclusive de subunidades da NADPH oxidase, comprometendo assim a sua atividade. Portanto, o efeito do tratamento com EH de *P. edulis* sobre a produção de ERO por macrófagos de ratos diabéticos poderia estar associado à sua ação sobre a glicação protéica, evidenciada através dos resultados de frutosaminas.

6 CONCLUSÕES

- Os extratos aquoso e etanólico de *Passiflora edulis* apresentaram atividade antioxidante *in vitro*, demonstrada pela capacidade sequestrante de radicais DPPH, capacidade redutora total e poder redutor de ferro;
- A atividade antioxidante dos extratos analisados foi dose dependente;
- O extrato etanólico de *Passiflora edulis* possui maior capacidade antioxidante *in vitro* quando comparado ao extrato aquoso;
- A glicação protéica foi maior no soro de ratos diabéticos quando comparados aos não diabéticos;
- A administração do EH aos animais foi capaz de prevenir o aumento da glicação protéica no soro dos animais diabéticos, mantendo os níveis séricos próximos aos valores observados nos animais não diabéticos;
- A produção de ERO foi menor em macrófagos de ratos diabéticos quando comparados aos não diabéticos;
- O extrato etanólico de *Passiflora edulis* foi capaz de impedir a redução na produção de ERO por macrófagos de ratos diabéticos, mantendo-a em valores similares aos observados nos animais não diabéticos;
- A indução do diabetes e o tratamento com o EH de *Passiflora edulis*, conforme os protocolos adotados neste estudo, não alteraram a capacidade fagocítica de macrófagos dos animais pertencentes aos diferentes grupos analisados.

7 REFERENCIAS

AGNEZ-LIMA, L.F. et al. DNA damage by singlet oxygen and cellular protective mechanisms. **Mutation Research**, v. 751, pg.15–28, 2012.

AHMAD, M. S.; PISCHETSRIEDER, M.; AHMED, N. Aged garlic extract and S-allyl cysteine prevent formation of advanced glycation end products. **European Journal of Pharmacology**, n. 561, p. 32–38, 2007.

AHMED, N. et al. Assay of advanced glycation end products (AGEs): surveying AGEs chromatographic assay with derivatization by 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl-carbamate and application to N-carboxymethyl-lysine and Nε-(1-carboxyethyl) lysine-modified albumin. **Biochem. Journal**, v. 364, pg. 1-14, 2002.

ALBA-LOUREIRO, T.C. et al. Diabetes causes marked changes in function and metabolism of rat neutrophils. **J. Endocrinol**, v.188, n. 2, p. 295-303, 2006.

ALMEIDA, E.R. **Plantas medicinais brasileiras: conhecimentos populares e científicos**. São Paulo: Hemus, 341p.,1993.

ALVES, C.A. et al. Mecanismos patogênicos da doença periodontal associada ao diabetes melito. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v.51, n.7, p. 1050-1057, 2007.

ALVES, C.A. et al. Métodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos. **Química Nova**, v.33, n.10, p.2202-2210, 2010.

ARRIAZA, A.M.C. et al. Volatile constituents from fruit shells of *P. edulis* Sims. **Journal of Essential Oil Research**. v.9, p.235–236. 1997.

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

ASSOCIAÇÃO AMERICANA DE DIABETES. Standards of Medical Care in Diabetes - 2012. **Diabetes Care**, vol. 35 (S1), p S11-S63, 2012.

BANERJEE, D., SHARMA, P. Dual effect of glucose on macrophage NADPH oxidase activity: a possible link between diabetes and tuberculosis. **Oxidants and Antioxidants in Medical Science**, vol. 1(2), p. 91-96, 2012.

BARBIOR, B.M. The leukocyte NADPH oxidase. **Israel Medical Association Journal**, n. 4, pg. 1023–1024, 2002.

BARBOSA, J. H. et al. O papel dos produtos finais da Glicação Avançada (AGEs) no desencadeamento das complicações vasculares do Diabetes. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v. 52, n. 6, p. 940-950, 2008.

BERNEREUTHER, A.; CHRISTOPH, N; SCHRIER, P. Determination of the enantiomeric composition of gamma-lactones in complex natural matrices using multidimensional capillary gas chromatography. **Journal of Chromatography**, v. 481, p. 363-367, 1989.

BRASIL. **Sociedade Brasileira de Diabetes**. Disponível em: www.diabetes.org.br. Acesso em: 29 nov 2011.

BRISTOW, I. Non ulcerative skin pathologies of the diabetics foot, **Diabetes Metab. Res. Rev.**, v. 24, Suppl.1, p. 584-589, 2008.

BROWN, G.C. ; BORUTAITE, V. There is no evidence that mitochondria are the main source of reactive oxygen species in mammalian cells. **Mitochondrion**, n.12, pg. 1-4, 2012.

BROWNLEE, M. et al. Aminoguanidine prevents diabetes-induced arterial wall protein cross-linking. **Science**, v. 232, pg. 1629-1632, 1986.

BROWNLEE, M. The pathological implications of protein glycation, **Clin. Invest. Med**, v. 18, p. 275-281, 1995.

BURTIS, C. A.; ASHWOOD, E. R. **Tietz Textbook of Clinical Chemistry**. 3^a ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1999.

CADET, J. et al. Oxidatively generated base damage to cellular DNA. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 49, pg. 9–21, 2010.

CARTON, J.A. et al. Diabetes mellitus and bacteraemia: A comparative study between diabetic and non-diabetic patients. **Eur. J. Med.**n 1, pg. 281-287, 1992.

CAVALCANTE, P.B. **Frutos comestíveis da Amazônia**. Belém. 1976.

CERQUEIRA, F.M.; GENNARI, M.H.M.; AUGUSTO, O. Antioxidantes dietéticos: controvérsias e perspectivas. **Química Nova**, v.30, n.2, p.441-449, 2007.

CHALLIER, P. et al. Fruit glycosides as aroma precursors. **Wissenschafts-Technikhistoriker Kommunikations**, v. 21, p.349–354. 1990.

CHANG, F.Y.; SHAIQ, M. F. Respiratory burst activity of monocytes from patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. **Diabetes Research and Clinical Practice**, n. 29, p. 121-127, 1995.

CHASSAGNE, D., BOULANGER, R., CROUZET, J. Enzymatic hydrolysis of edible *Passiflora* fruit glycosides. **Food Chemistry**. v.66, p.281–288, 1999.

CHIS, I.C. Antioxidant effects of a grape seed extract in a rat model of diabetes mellitus. **Diabetes and Vascular Disease Research**, v.6, n.3, p. 200-204, 2009.

COHEN, M.P. Intervention strategies to prevent pathogenetic effects of glycated albumin, **Arch. Biochem. Biophys**, v.419, p. 25-30, 2003.

DANIEL, M. T. et al. Les estérases spécifiques monocytaires: utilisation dans la classification de leucémies aiguës. **Nov. Rev. Franc. Hemat.** Paris, v.11, p. 233-240. 1971.

DAWES, N.H., PAUL, J.S. Volatile constituents of passion fruit juice. **Journal of Food Science**, v.26, p.557–563. 1961.

DEVANGELIO, E. et al. Solubel RAGE in type 2 diabetes: Association with oxidative stress. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 43, p. 511-518, 2007.

DHANABAL, S. P. et al. Hypoglycemic Effect Of Alcoholic Extract Of Various Species Of *Passiflora* On Alloxan Induced Diabetes Mellitus In Albino Rats. **Nigerian Journal Natural Products and Medicine**, v.8, p.19-21, 2004.

DHAWAN, K; DHAWAN, S; SHARMA, A. Passiflora: a review update. **Journal of Ethnopharmacology**, v.94, n.1, p.1-23, 2004.

DING, Y. et al. Activation of RAGE induces elevated O_2^- generation by mononuclear phagocytes in diabetes. **J Leukoc Biol**, n.81, p. 520-527, 2007.

DOYAMA, J. T. et al. Chemical investigation and effects of the tea of *Passiflora alata* on biochemical parameters in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 96, p. 371-374, 2005.

DUDONNÉ, S. et al. Comparative Study of Antioxidant Properties and Total Phenolic Content of 30 Plant Extracts of Industrial Interest Using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC Assays. **J. Agric. Food Chem.**, n. 57, pg. 1768–1774, 2009.

EDEAS, M. et al. Maillard Reaction, mitochondria and oxidative stress: Potential role of antioxidants. **Pathologie Biologie**, vol. 58, pg. 220–225, 2010.

FANG, Y. Z.; YANG, S.; WU, G. Free radicals, antioxidants, and nutrition. **Nutrition**, v. 18, p. 872-879, 2002.

FARID, R. et al. Oral intake of purple passion fruit peel extract reduces pain and stiffness and improves physical function in adult patients with knee osteoarthritis. **Nutrition Research**, n. 30, pg. 601–606, 2010.

Farmácia Magistral. **Farmacopéia Brasileira**, 3 edição, 1977.

FERREIRA, C.S., et al. Neutrophil dysfunction induced by hyperglycemia: modulation of myeloperoxidase activity. **Cell Biochemistry and Function**, n. 30, pg. 604-610, 2012.

FLANNAGAN, R.S.; JAUMOILLÉ, V.; GRINSTEIN, S. The cell biology of phagocytosis. **Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis**, v. 7, p. 49-86, 2012.

FORMAN, H.J.; MAIORINO, M.; URSINI, F. Signaling Functions of Reactive Oxygen Species. **Biochemistry**, v. 49, pg. 835–842, 2010.

FRANSEN, M. et al. Role of peroxisomes in ROS/RNS-metabolism: Implications for human disease. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease**, v. 1822 (9), pg. 1363–1373, 2012.

GARDNER, J.F.; BOVERIS, A. Generation of superoxide anion by the NADPH dehydrogenase of bovine heart mitochondria. **Biochem. Journal**, v. 191, pg. 421-427, 1990.

GARROS, I.C. et al. Extrato de *Passiflora edulis* na cicatrização de feridas cutâneas abertas em ratos: estudo morfológico e histológico. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 21 (3), p. 55-65, 2006.

GROSSIN, N.; WAUTIER, M.P.; MEAS, T. Severity of diabetic microvascular complications is associated with a low soluble RAGE level. **Diabetes & Metabolism**, n. 34, p. 392–395, 2008.

GRYKIEL, K.D. et al. Increased expression of polymorphonuclear neutrophil surface receptors and serum L-selectin concentration in type 1 diabetic patients. **Diabetes Research and Clinical Practice**. V. 50 (1), pg. 348-349, 2000.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 4a ed. Oxford: Oxford University Press. 2008.

HAŠKOVÁ, P. et al. Iron chelation with salicylaldehyde isonicotinoyl hydrazone protects against catecholamine autoxidation and cardiotoxicity. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 50, pg. 537–549, 2011.

HAZEWINDUS, M. et al. The anti-inflammatory effect of lycopene complements the antioxidant action of ascorbic acid and α -tocopherol. **Food Chemistry**, v. 132, p.954–958, 2012.

HOSSAIN, M. A.; SHAH, M.D. A study on the total phenols content and antioxidant activity of essential oil and different solvent extracts of endemic plant *Merremia borneensis*. **Arabian Journal of Chemistry**, p. 1-6, 2011.

HOTAMISLIGIL, G. S. Inflammation and metabolic disorders. **Nature**, v. 7121, n. 444, p. 860-867, 2006.

HUANG, D. et al. The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. **J. Agric. Food Chem.**, v. 53 (6), p. 1841–1856, 2005.

HUANG, X. et al. Augmented NADPH oxidase activity and p22phox expression in monocytes underlie oxidative stress of patients with type 2 diabetes mellitus. **Diabetes Research and Clinical Practice**, n. 91, p. 371– 380, 2011.

HURST, J. K. What really happens in the neutrophil phagosome? **Free Radical Biology and Medicine**, v. 53, pg.508–520, 2012.

IKAWA, M. et al. Utilization of Folin–Ciocalteu Phenol Reagent for the Detection of Certain Nitrogen Compounds. **J. Agric. Food Chem**, v. 51 (7), p. 1811–1815, 2003.

IKEDA, K. et al. Immunochemical approaches to AGE-structures: characterization of anti-AGE antibodies. **J. Immunol. Methods**, v. 215, p.95-104, 1998.

IMLAY, J.A.; FRIDOVICH, I. Assay of metabolic superoxide production in *Escherichia coli*. **J Biol Chem**, v. 266 (11), pg. 6957-6965, 1991.

ISMAIL, A; MARJAN, Z.M; FOONG, C.W. Total antioxidant activity and phenolic content in selected vegetables. **Food Chemistry**, v.87, p. 581-586, 2004.

JAIN, S.K. et al. Effect of curcumin on protein glycosylation, lipid peroxidation, and oxygen radical generation in human red blood cells exposed to high glucose levels. **Free Radical Biology and Medicine**, v.41(1), pg. 92–96, 2006.

JAMIR, T.T., SHARMA, H.K., DOLUI, A.K. Folklore medicinal plants of Nagaland. **Fitoterapia**, v.70, p.395–401. 1999.

JAOUHARI, J.T.; LAZREK, H.B.; JANA, M. The hyperglycemic activity of *Zygophyllum guetulum* extracts in alloxan induced hyperglycemic rats. **Journal of ethnopharmacology**, v. 69, p. 17-20, 2000.

KANNAN, S.; PARIMALA, D. B.; JAYAKAR, B. Antibacterial evaluation of the methanolic extract of *Passiflora edulis*. **Journal of Drugs and Medicines**, n. 3, pg. 46–49, 2011.
KEMPF, K. et al. The metabolic syndrome sensitizes leukocytes for glucose-induced immune gene expression. **J Mol Med**, n. 85(4), 389-396, 2007.

KHAN, A.U. Direct spectral evidence of the generation of singlet molecular oxygen in the reaction of potassium superoxide with water. **Journal of the American Chemical Society**, v. 103, pg. 6516-6517, 1981.

KIKUCHI, S. et al. Glycation a sweet tempter for neuronal death. **Brain Res. Rev.**, v. 41, pg. 306-323, 2003.

KLEBANOFF, S. J. et al. Myeloperoxidase: a front-line defender against phagocytosed microorganisms. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 93, 2013.

KLOTZI, L.O.; KRONCKE, K.D.; SIES, H. Singlet oxygen-induced signalling effects in mammalian cells. **Photochem Photobiol Sci**, v. 2, pg. 88–94, 2003.

KOGA, M., KASAYAMA, S. Clinical impact of glycated albumin as another glycemic control marker. **Endocrine Journal**, vol. 57 (9), pg. 751-762, 2012.

LAPOLLA, A., TRALDI, P., FEDELE, D. Importance of measuring products of non-enzymatic glycation of proteins. **Clinical Biochemistry**, v. 38, p. 103-115, 2005.

LEDUR, P. et al. Perfil e evolução dos pacientes com diabetes mellitus submetidos à cirurgia de revascularização miocárdica em serviço de referência no sul do Brasil. **Rev Assoc Med Bras**, vol. 57, n.2, p. 200-204, 2011.

LI, H. W. et al. Comparative studies on anxiolytic activities and flavonoid compositions of *Passiflora edulis* 'edulis' and *Passiflora edulis* 'flavicarpa'. **Journal of Ethnopharmacology**, n. 133, pg. 1085–1090, 2011.

LLORENTE, L. et al. Innate immune response mechanisms in non-insulin dependent diabetes mellitus patients assessed by flow cytometry. **Immunology Letters**, n.74, p. 239–244, 2000.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas no Brasil**. Nova Odessa: Plantarum.

LUCENFORD, N.; GUGLIUCCI, A. *Illex paraquaiensis* extracts inhibit AGE formation more efficiently than green tea. **Fitoterapia**, 76, p.419-427, 2005.

LUO, D; FAN, Y.; XU, X. The effects of aminoguanidine on retinopathy in STZ-induced diabetic rats. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 22, pg. 4386–4390, 2012.

LUTOMSKI, J., MALEK, B. Pharmacological investigations on raw materials of the genus *Passiflora*. **Planta Medica**, v.27, p. 381–384. 1975.

LV, L. et al. Stilbene Glucoside from *Polygonum multiflorum* Thunb.: A Novel Natural Inhibitor of Advanced Glycation End Product Formation by Trapping of Methylglyoxal. **J. Agric. Food Chem.**, v. 58, pg. 2239–2245, 2010.

MOHEIMANI, F.; MORGAN, P.E.; REYK, D.M.V. Deleterious effects of reactive aldehydes and glycated proteins on macrophage proteasomal function: Possible links between diabetes and atherosclerosis. **Biochimica et Biophysica Acta**, n. 1802, p. 561–571, 2010.

MONTHILAL et al. Photosensitisation with naphthoquinones and binaphthoquinones: EPR spin trapping and optical studies-formation of semiquinone radical and reactive oxygen species on photoillumination. **Journal of Phytochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v. 163, p. 141-148, 2004.

MOORADIAN, A. D., HAAS, M. J. Glucose-induced endoplasmic reticulum stress is independent of oxidative stress: A mechanistic explanation for the failure of antioxidant therapy in diabetes. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 50, p.1140–1143, 2011.

NIKI, E. Assessment of Antioxidant Capacity *in vitro* and *in vivo*. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 49, p. 503-515, 2010.

NSIMBA, R.Y. et al. Antioxidant Activity of Various Extracts and Fractions of *Chenopodium quinoa* and *Amaranthus* spp seeds. **Food Chemistry**, v. 106, p. 760-766, 2008.

OLIVEIRA, I.V. **Avaliação nutricional, composição química e atividade biológica de folhas e frutos de noqueira e aveleira**. Trabalho de fim de curso (Lic.Eng. Biotecnol., Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Bragança) Bragança, 2007.

PASHIKANTI, S. et al. Rutin metabolites: Novel inhibitors of non-oxidative advanced glycation end products. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 48 (5), p. 656–663, 2010.

PENÃ, J. E.; SHARP, J. L.; WYSOKI, M. **Tropical fruits pests and pollinators**. London: CAB International, 2002.

PILARSKI et al. Antioxidant activity of ethanolic and aqueous extracts of *Uncaria tomentosa* (wild) DC. **Journal of Ethnopharmacology**, n. 104, pg. 18-23, 2006.

POLI, A.L.; MOREIRAB, L.M.; IMASATOA, H. Autoxidation of giant extracellular hemoglobin of *Glossoscolex paulistus*: Molecular mechanism and oligomeric implications. **Spectrochimica Acta Part A**, v. 82, pg. 306– 315, 2011.

PULIDO, R. et al. Antioxidant Activity of Dietary Polyphenols As Determined by a Modified Ferric Reducing/Antioxidant Power Assay. **J. Agric. Food Chem.**, v.48 (8), p. 3396–3402, 2000.

PUNCHARD, N.A.;KELLY, F.J. **Free Radicals - A Practical Approach**. New York: Oxford University Press, 309 p, 1996.

RAZALI, N. et al. Radical scavenging and reducing properties of extracts of cashew shoots (*Anacardium occidentale*). **Food Chemistry** , v. 111, p. 38–44, 2008.

RAHBAR, S., FIGAROLA, J.L. Novel inhibitors of advanced glycation endproducts. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, vol. 419, pg. 63–79, 2003.

REDDY, V.P., BEYYAZ, A. Inhibitors of the Maillard reaction and AGE breakers as therapeutics for multiple diseases. **Drug Discovery Today**, vol. 11(13/14), pg.646-654, 2006.

REITZ, R. **Flora Ilustrada Catarinense: Passifloráceas**. Itajaí: HBR, 1980.

RESCH, U. et al. Hypochlorite-modified low-density lipoprotein induces the apoptotic machinery in Jurkat T-cell lines. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 410, pg. 895–900, 2011.

ROCKENBACH, G.L.S. et al. Influência do solvente no conteúdo total de polifenóis, antocianinas e atividade antioxidante de extratos de bagaço de uva (*Vitis vinifera*) variedades Tannat e Ancelota. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas: v. 28, p. 238-244, 2008.

RODRIGO, R.; MIRANDA A.; VERGARA, L. Modulation of endogenous antioxidant system by wine polyphenols in human disease. **Clinica Chimica Acta**, v.412, p.410–424, 2011.

RODRIGUES, T.C. et al. Infecções no paciente com Diabetes Melito. **Rev HCPA** , vol. 30(4), pg. 391-399, 2010.

RONDEAU, P.; BOUDON, E. The glycation of albumin: Structural and functional impacts. **Biochimie**, v. 93, n. 645-658, 2011.

ROSENFELD, G. Método rápido de coloração de esfregaços de sangue: Noções práticas sobre corantes pancrômicos e estudos de diversos fatores. **Mem. Inst. Butantan**, v. 20, p. 315–328, 1947.

RUDNICKI, M. et al. Antioxidant and antiglycation properties of *Passiflora alata* and *Passiflora edulis* extracts. **Food Chemistry**, v. 100, p. 719-724, 2007.

SCHLEICHER, E.D. et al. Chemistry and pathobiology of advanced glycation end products. **Contrib. Nephrol.**, vol. 131, pg. 1-9, 2001.

SEGAL, B.H. et al. Regulation of innate immunity by NADPH oxidase. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 53, pg. 72–80, 2012.

SERBAN, A.I.; COSTACHE, M.; DINISCHIOTU, A. Controversial behavior of aminoguanidine in the presence of either reducing sugars or soluble glycated bovine serum albumin. **Carbohydrate Research**, v. 346, pg. 2872–2880, 2011.

SHAH, B.R; HUX, J.E. Quantifying the risk of infectious diseases for people with diabetes. **Diabetes Care**, v.26, n.2, p.510-3, 2003.

SERLENGA, E. et al. Polymorphonuclear cell mediated phagocytosis and superoxide anion release in insulin dependent diabetes mellitus. **Cytobios**, n. 74, p. 189-195, 1993.

SILVA, G.D.F. et al. Antioxidant activity of *Maytenus imbricata* Mart., Celastraceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.19, p. 530-536, 2009.

SINGLETON, V.L.; ORTHOFER, R.; LAMUNELA, R.M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates by means of Folin-Ciocalteu reagent. **Methods in Enzymology**, v. 299, p.152- 178, 1999.

SLAUCH, J.M. How does the oxidative burst of macrophages kill bacteria? **Molecular Microbiology**, n. 80 (3), pg. 580-583, 2011.

SOUZA, L.F. et al. Regulation of LPS stimulated ROS production in peritoneal macrophages from alloxan-induced diabetic rats: Involvement of high glucose and PPAR γ . **Life Sciences**, n. 81, p.153–159, 2007.

SOUZA, C.M.M. et al. Fenóis Totais e Atividade Antioxidante de cinco Plantas Medicinais. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 351-355, 2007.

STEGENGA, M. E. et al. Diabetes does not alter mortality or hemostatic and inflammatory responses in patients with severe sepsis. **Critical Care Medicine**, vol. 38 (2) – pg. 539-545, 2010.

SU, L. et al. Total Phenolic contents, chelating capacities and radical-scavenging properties of black peppercorn, nutmeg, rosehip, cinnamon and oregano leaf. **Food Chemistry**, v. 100, n. 3, p. 990-997, 2007.

SZKUDELSKI, T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. **Physiol Res**, n. 50(6), pg. 537-546, 2001.

TANG, L. et al. 2006. Effects of berberine on diabetes induced by alloxan and a high-fat/high-cholesterol diet in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 108, n. 1, p. 109-115, 2006.

TANG, W. et al. Potential mechanism in sonodynamic therapy and focused ultrasound induced apoptosis in sarcoma 180 cells in vitro. **Ultrasonics**, v. 49, pg. 786–793, 2009.

VADLA, G.P.; VELLAICHAMY, E. Anti-fibrotic cardio protective efficacy of aminoguanidine against streptozotocin induced cardiac fibrosis and high glucose induced collagen up regulation in cardiac fibroblasts. **Chemico-Biological Interactions**, v. 197, pg. 119-128, 2012.

VILIM, V.; WILHELM, J. What do we measure by a luminol-dependent chemiluminescence of phagocytes? **Free Radicals, Biology and Medicine**, pg. 623-629, 1989.

VRCEK, V.I. et al. Phenol Content, Antioxidant Activity and Metal Composition of Croatian Wines Deriving from Organically and Conventionally Grown Grapes. **Food Chemistry**, v. 124, p. 354-361, 2011.

WANG, W., et al. Phytochemicals from berries and grapes inhibited the formation of advanced glycation end-products by scavenging reactive carbonyls. **Food Research International**, vol. 44, pg. 2666–2673, 2011.

WATANABE, N.; FORMAN, H.J. Autoxidation of extracellular hydroquinones is a causative event for the cytotoxicity of menadione and DMNQ in A549-S cells. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 411, pg. 145–157, 2003.

WEBER, M.B.; SILVA, M. C. A. Manifestações cutâneas em pacientes com diabetes melito. **Arquivos Médicos Canoas**, v. 8 (2), p.31-45, 2005.

WILD, S. et al. Global Prevalence of Diabetes. **Diabetes Care**, v. 27, n. 5, p. 1047-1053, 2004.

WILLIAMS, N. L. et al. Impact of streptozotocin-induced diabetes on functional responses of dendritic cells and macrophages towards *Burkholderia pseudomallei*. **FEMS Immunol Med Microbiol**, vol. 61, pg. 218–227, 2011.

WILSON, R. M.; REEVES, W. G. Neutrophil phagocytosis and killing in insulin-dependent diabetes. **Clin. Exp. Immunol**, n.63, p. 478-484,1986.

WINTERHALTER, P. Bound terpenoids in the juice of the purple passion fruit (*P. edulis* Sims). **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.38, p.452–455. 1990.

WOOTTON-BEARD, P.C. et al. Stability of the total antioxidant capacity and total polyphenol content of 23 commercially available vegetable juices before and after in vitro digestion measured by FRAP, DPPH, ABTS and Folin–Ciocalteu methods. **Food Research International**, v. 44, p. 217-224, 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Organização Mundial de Saúde** (OMS). Disponível em: www.who.int/en/. Acesso em: 29 nov 2011.

YAMAGISHI, S.I. Role of advanced glycation end products (AGEs) and receptor for AGEs (RAGE) in vascular damage in diabetes. **Experimental Gerontology**, n. 46, p. 217–224, 2011.

YILDIRIM, A.; OKTAY, M.; BULALOULU, V. The antioxidant activity of leaves of *Cydonia vulgaris*. **Turkish Journal of Medical Science**, n. 31, pg. 23-27, 2001.

YONEKURA, H. Novel Splice variants of the receptor for advanced glycation end-products expressed in human vascular endothelial cells and pericytes, and putative roles in diabetes-induced vascular injury. **Biochem Journal**, v. 370, pg. 1097-1109, 2003.

XU, F. et al. C-dideoxyhexosyl flavones from the stems and leaves of *Passiflora edulis* Sims. **Food Chemistry**, n. 136, pg. 94–99, 2013.

ZILIN, S. et al. The determination of AGE peptides by flow injection assay, a practical marker of diabetic nephropathy. **Clin. Chim. Acta**, n. 313, pg. 69-75, 2001.