

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS – UNIFAL-MG

**CLEIBER LUCAN ALVES ARAÚJO**

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTI-INFLAMATÓRIO DAS FOLHAS DE  
*Passiflora edulis* Sims E DE SEUS EFEITOS SOBRE O METABOLISMO  
OXIDATIVO DE NEUTRÓFILOS PERITONEAIS DE RATOS**

Alfenas/MG

2015

**CLEIBER LUCAN ALVES ARAÚJO**

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTI-INFLAMATÓRIO DAS FOLHAS DE  
*Passiflora edulis* Sims E DE SEUS EFEITOS SOBRE O METABOLISMO  
OXIDATIVO DE NEUTRÓFILOS PERITONEAIS DE RATOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG) como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Profa. Dra. Fernanda Borges de Araújo Paula

Alfenas/MG

2015

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)  
Biblioteca Central da Universidade Federal de Alfenas

Araújo, Cleiber Lucan Alves.

Avaliação do potencial anti-inflamatório das folhas de *Passiflora edulis* Sims e de seus efeitos sobre o metabolismo oxidativo de neutrófilos peritoneais de ratos. / Cleiber Lucan Alves Araújo. -- Alfenas/MG, 2015.

72 f.

Orientadora: Fernanda Borges de Araújo Paula.

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Alfenas, 2015.

Bibliografia.

1. *Passiflora*. 2. Inflamação. 3. Neutrófilos. 4. Espécies reativas de oxigênio. 5. Enzimas – Antioxidantes. I. Paula, Fernanda Borges de Araújo. II. Título.

CDD-615.1

CLEIBER LUCAN ALVES ARAÚJO

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTI-INFLAMATÓRIO DAS FOLHAS DE  
*Passiflora edulis* SIMS E DE SEUS EFEITOS SOBRE O METABOLISMO  
OXIDATIVO DE NEUTRÓFILOS PERITONEAIS DE RATOS**

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

Aprovado em: 26/02/2015


Profa. Dra. Fernanda Borges de Araújo Paula

Instituição: Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG)

Assinatura:  \_\_\_\_\_

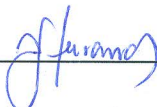
Profa. Dra. Maria Rita Rodrigues

Instituição: Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG)

Assinatura:  \_\_\_\_\_

Profa. Dra. Maurette dos Reis Vieira Fernandes

Instituição: Fundação de Ensino Superior do Vale Sapucaí

Assinatura:  \_\_\_\_\_

A todos aqueles que contribuíram de alguma forma,  
com minha formação e com a realização deste trabalho.

## AGRADECIMENTOS

“Agradecer é admitir que houve um momento em que se precisou de alguém; é reconhecer que o homem jamais poderá lograr para si o dom de ser autossuficiente. Ninguém e nada cresce sozinho; sempre é preciso um olhar de apoio, uma palavra de incentivo, um gesto de compreensão, uma atitude de amor.”

*(Autor desconhecido)*

Aos meus pais e à minha amada irmã, pelo apoio, confiança e admiração.

À minha enorme família pelo apoio incondicional em todos os momentos da minha vida e ao incentivo constante dado aos meus ideais.

Ao Daniel, pelo amor, carinho, atenção, apoio e paciência nas horas difíceis. E principalmente pela companhia em todos os momentos.

À Professora Doutora Fernanda Borges de Araújo Paula, pela confiança, paciência, orientação, sugestões e ensinamentos durante esse período de aprendizagem.

Aos amigos de laboratório: Bruno, Cláudia, Tayra, Isabella, Eliana, Carla; pela amizade, ajuda com os experimentos, troca de experiências e por todos os momentos de alegrias que passamos juntos. A companhia de vocês foi fundamental para a realização deste trabalho.

Aos amigos “alfenenses”: Elias, Marcela e Vanessa; pelos momentos de alegria, amizade, descontração e longas conversas.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida para realização deste trabalho.

Por fim, agradecer certamente não é uma tarefa justa nem fácil, mas a todos que, de alguma forma, me ajudaram a concretizar este trabalho, e que por qualquer razão não foram aqui citados, o meu muito obrigado!

## RESUMO

Os neutrófilos são as primeiras células recrutadas em um processo inflamatório, desempenhando um papel importante na defesa do hospedeiro pela ativação do sistema NADPH oxidase e através da ação da enzima mieloperoxidase (MPO). As espécies oxidantes (EO) produzidas durante a ativação dos neutrófilos são altamente reativas e tóxicas para o patógeno, mas podem comprometer a homeostase celular do hospedeiro. A espécie *Passiflora edulis* Sims (Passifloraceae) é rica em compostos fenólicos, conhecidos por suas atividades antioxidantes. A maior parte dos estudos farmacológicos dessa espécie vegetal é direcionada a suas ações sobre o sistema nervoso central e poucos estudos têm sido realizados na tentativa de avaliar o efeito anti-inflamatório desse gênero. Dessa forma, no presente trabalho, foi avaliada a atividade anti-inflamatória do extrato seco obtido das folhas de *P. edulis* Sims, assim como sua atividade sobre o metabolismo oxidativo de neutrófilos peritoneais de ratos em um modelo de inflamação aguda induzida pela administração intraperitoneal de carragenina. A análise por espectro de massas sugeriu a presença de isoorientina e isovitexina, principais constituintes relatados na espécie *P. edulis*. A administração do extrato diminuiu o número de neutrófilos recrutados para o foco inflamatório, entretanto, não alterou a atividade do sistema NADPH oxidase dessas células. Por outro lado, o extrato interferiu na formação de EO geradas a partir da ativação desse complexo, como, por exemplo, o ácido hipocloroso, sugerindo uma diminuição na atividade de MPO. Além disso, o extrato diminuiu a atividade de catalase, aumentou a atividade de glutathione peroxidase e não interferiu na atividade de superóxido dismutase. Dessa forma, nossos resultados sugerem que o potencial anti-inflamatório do extrato seco das folhas de *P. edulis* Sims poderia estar relacionado não somente à inibição do recrutamento de neutrófilos como também à modulação do metabolismo oxidativo de neutrófilos no foco inflamatório.

**Palavras-chave:** *Passiflora edulis* Sims. Inflamação. Neutrófilos. Espécies oxidantes. Enzimas antioxidantes.

## ABSTRACT

Neutrophils are the first cells recruited in an inflammatory process and play an important role in host defense by the NADPH oxidase activation and by the action of the enzyme myeloperoxidase (MPO). The oxidizing species (OS) produced during activation of neutrophils are highly reactive and toxic to the pathogen, but they can compromise the cellular homeostasis of the host. The species *Passiflora edulis* Sims (Passifloraceae) is rich in phenolic compounds, which are known for their antioxidant activity. Most of the pharmacological studies on this species have been carried out on the Central Nervous System and few studies have been conducted to evaluate the anti-inflammatory effect of this genus. Thus, in this study, we evaluated the anti-inflammatory activity of dry extract obtained from *P. edulis* Sims leaves, and its activity on oxidative metabolism of rat peritoneal neutrophils in a model of acute inflammation induced by the intraperitoneal administration of carrageenan. The mass spectral analysis suggested the presence of isoorientin and isovitexin, major constituents reported by *P. edulis*. The extract administration reduced the number of neutrophils recruited to the inflammatory site; however, it did not alter the activity of the NADPH oxidase of these cells. On the other hand, the extract interferes with OS formation generated by the activation of this system, for instance, hypochlorous acid, which suggests a decrease in MPO activity. Furthermore, the extract decreased the catalase activity and enhanced the glutathione peroxidase activity, but it did not affect the superoxide dismutase activity. Thus, our results suggest that the anti-inflammatory potential of the dry extract from *P. edulis* Sims leaves could be related to the inhibition of neutrophils recruitment and to the modulation of the neutrophils oxidative metabolism at the inflammatory focus.

**Key words:** *Passiflora edulis* Sims. Inflammation. Neutrophils. Oxidizing species. Antioxidant enzymes.



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1 –</b>	Esquema dos mecanismos independente e dependente de oxigênio durante a fagocitose de um microrganismo pelo neutrófilo .....	17
<b>Figura 2 –</b>	Mecanismo catalítico da seleno-enzima GPx sobre a glutatona em sua forma reduzida .....	24
<b>Figura 3 –</b>	Flor e fruto de <i>Passiflora edulis</i> Sims .....	26
<b>Figura 4 –</b>	Espectro de massas <i>full-scan</i> do extrato seco das folhas de <i>P. edulis</i> analisado em modo negativo. Faixa de aquisição de dados <i>m/z</i> 100-700 Da .....	44
<b>Figura 5 –</b>	Estrutura dos possíveis compostos presentes no extrato seco das folhas de <i>P. edulis</i> .....	45
<b>Figura 6 –</b>	Espectro de segunda-ordem do íon precursor <i>m/z</i> 447 utilizando 20 eV de energia de colisão .....	46
<b>Figura 7 –</b>	Espectro de segunda-ordem do íon precursor <i>m/z</i> 431 utilizando 20 eV de energia de colisão .....	46
<b>Figura 8 –</b>	Espectro de segunda-ordem do íon precursor <i>m/z</i> 325 utilizando 20 eV de energia de colisão .....	47
<b>Figura 9 –</b>	Espectro de segunda-ordem do íon precursor <i>m/z</i> 311 utilizando 20 eV de energia de colisão .....	48
<b>Figura 10 –</b>	Espectro de segunda-ordem do íon precursor <i>m/z</i> 195 utilizando 20 eV de energia de colisão .....	48
<b>Figura 11 –</b>	Espectro de segunda-ordem do íon precursor <i>m/z</i> 133 utilizando 20 eV de energia de colisão .....	49
<b>Figura 12 –</b>	Modelo esquemático do efeito do extrato sobre o metabolismo oxidativo de neutrófilos .....	60

## LISTA DE GRÁFICOS

<b>Gráfico 1 –</b>	Histograma de distribuição granulométrica das folhas de <i>Passiflora edulis</i> Sims .....	41
<b>Gráfico 2 –</b>	Curva analítica do ácido gálico .....	42
<b>Gráfico 3 –</b>	Efeito dos diferentes tratamentos sobre o recrutamento de neutrófilos peritoneais .....	50
<b>Gráfico 4 –</b>	Viabilidade de neutrófilos peritoneais de ratos submetidos aos diferentes tratamentos .....	52
<b>Gráfico 5 –</b>	Efeito dos diferentes tratamentos sobre a produção de EO em neutrófilos .....	53
<b>Gráfico 6 –</b>	Efeito dos diferentes tratamentos sobre a produção de $O_2^{\cdot-}$ pelo sistema NADPH oxidase .....	54
<b>Gráfico 7 –</b>	Efeito dos diferentes tratamentos sobre a produção de HOCl ....	55
<b>Gráfico 8 –</b>	Efeito dos diferentes tratamentos sobre a atividade de SOD .....	57
<b>Gráfico 9 –</b>	Efeito dos diferentes tratamentos sobre a atividade de CAT .....	58
<b>Gráfico 10 –</b>	Efeito dos diferentes tratamentos sobre a atividade de GPx .....	59

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Estrutura química dos flavonoides C-glicosídeos relatados na espécie <i>P. edulis</i> .....	27
<b>Tabela 2</b> – Relação de massa fresca e seca das folhas de <i>P. edulis</i> Sims .....	40
<b>Tabela 3</b> – Frequências percentuais e tamanho médio das partículas na análise granulométrica das folhas de <i>P. edulis</i> Sims .....	41
<b>Tabela 4</b> – Conteúdo de polifenóis totais (PT) do extrato seco das folhas de <i>P. edulis</i> Sims .....	43
<b>Tabela 5</b> – Caracterização por FIA-ESI-MS/MS do extrato seco das folhas de <i>P. edulis</i> .....	44

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b><math>\cdot\text{OH}</math></b>	radical hidroxila
<b><math>^1\text{O}_2</math></b>	oxigênio singlete
<b>ANVISA</b>	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
<b>CAT</b>	catalase
<b>DTNB</b>	5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico
<b>EAG</b>	equivalente de ácido gálico
<b>EO</b>	espécies oxidantes
<b>FIA-ESI-MS</b>	espectrometria de massas com inserção direta da amostra utilizando o modo de ionização por <i>electrospray</i> ( <i>Flow Injection Analysis – Electro spray Ionization – Mass Spectrometry</i> )
<b>GPx</b>	glutathiona peroxidase
<b>GSH</b>	glutathiona reduzida
<b>GSSG</b>	glutathiona oxidada
<b><math>\text{H}_2\text{O}_2</math></b>	peróxido de hidrogênio
<b>HOCl</b>	ácido hipocloroso
<b>IBGE</b>	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
<b>MPO</b>	mieloperoxidase
<b>MTT</b>	brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2)-2,5-difeniltetrazólio
<b>NO</b>	óxido nítrico
<b><math>\text{O}_2^{\cdot-}</math></b>	ânion superóxido
<b>ONOO<math>^-</math></b>	peroxinitrito
<b>PBS</b>	tampão fosfato salino
<b>PMA</b>	acetato de forbol miristato
<b>PT</b>	polifenóis totais
<b>RENISUS</b>	Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS
<b>ROOH</b>	hidroperóxido orgânico
<b>SOD</b>	superóxido dismutase
<b>TNB</b>	ácido 5-tio-2-nitrobenzoico

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>13</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	<b>15</b>
2.1	Os neutrófilos no processo inflamatório .....	15
2.1.1	<i>Mieloperoxidase</i> .....	17
2.1.2	<i>Burst respiratório e produção de espécies oxidantes</i> .....	19
2.2	Enzimas antioxidantes .....	21
2.2.1	<i>Superóxido dismutase (SOD)</i> .....	21
2.2.2	<i>Catalase (CAT)</i> .....	22
2.2.3	<i>Glutathione peroxidase (GPx)</i> .....	23
2.3	A humanidade e a cura pelas plantas .....	24
2.4	Uso de extratos de <i>Passiflora edulis</i> .....	25
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>30</b>
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>31</b>
4.1	Obtenção do material vegetal .....	31
4.2	Granulometria do material vegetal .....	31
4.3	Preparo do extrato seco das folhas de <i>Passiflora edulis</i> Sims .....	32
4.4	Análise quantitativa do teor de polifenóis totais .....	32
4.5	Análise por FIA-ESI-MS .....	32
4.6	Análises <i>in vivo</i> .....	33
4.6.1	<i>Recrutamento de neutrófilos da cavidade intraperitoneal</i> .....	34
4.6.2	<i>Avaliação da viabilidade celular</i> .....	34
4.6.3	<i>Quimioluminescência dependente de luminol</i> .....	35
4.6.4	<i>Atividade de NADPH oxidase (redução do citocromo C)</i> .....	35
4.6.5	<i>Atividade de MPO (produção de HOCl)</i> .....	36
4.7	Preparo do homogeneizado celular .....	36
4.7.1	<i>Determinação de proteínas totais</i> .....	37
4.7.2	<i>Determinação da atividade de SOD</i> .....	37
4.7.3	<i>Determinação da atividade de CAT</i> .....	38

4.7.4	<i>Determinação da atividade de GPx</i> .....	38
4.8	Análises estatísticas .....	39
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>40</b>
5.1	Matéria-prima vegetal .....	40
5.2	Análise granulométrica dos pós .....	40
5.3	Análise quantitativa do teor de polifenóis totais .....	42
5.4	Análise por FIA-ESI-MS .....	43
5.5	Recrutamento e viabilidade de neutrófilos peritoneais .....	50
5.6	Produção de EO e atividade do sistema NADPH oxidase .....	52
5.7	Produção de HOCl .....	55
5.8	Atividade das enzimas antioxidantes SOD, CAT e GPx .....	56
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>62</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>63</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A resposta inflamatória é a primeira defesa do organismo a um dano tecidual. Com a finalidade de remover o estímulo lesivo e iniciar a recuperação tecidual, a inflamação é um processo biológico complexo que envolve componentes vasculares, celulares e uma diversidade de substâncias solúveis (FAVACHO, 2009).

Por se tratar de um processo extremamente intrincado, a inflamação vem sendo intensamente investigada desde o primeiro século d.C., quando Cornelius Celsius definiu os quatro sinais cardinais da inflamação: calor<sup>1</sup>, rubor (hiperemia), tumor (edema) e dor. Em 1858, Rudolf Virchow acrescentou um quinto sinal: a perda da função da parte afetada (ROCK; KONO, 2008).

Como observado por Virchow, apesar de ter funções de defesa e reparo no organismo, a inflamação possui um potencial lesivo que pode ser bastante prejudicial ao paciente. De acordo com Medzhitof (2008), muitas doenças têm a fisiopatologia fundamentada no processo inflamatório crônico, seja contra seu próprio organismo ou contra agentes invasores que induzem uma resposta cruzada, fazendo com que o organismo comece a agir contra si, prejudicando a homeostase.

Além disso, o recrutamento de células fagocíticas ao sítio de infecção induz uma ativação no metabolismo oxidativo dessas células, resultando na produção de espécies oxidantes (EO<sup>2</sup>). Essas espécies produzidas são altamente reativas e tóxicas, podendo comprometer a função biológica de proteínas, inativação de enzimas e rompimento da homeostase celular (SIQUEIRA JÚNIOR, 2000a).

Apesar do avanço do conhecimento da anatomia, fisiopatologia e farmacologia da inflamação, o tratamento com as opções terapêuticas disponíveis ainda geram riscos, custos e/ou efeitos adversos. Dessa forma, é de extrema importância a busca por novas substâncias com potencial atividade anti-inflamatória que possam amenizar esses agravantes (NEWMAN et al., 2003).

Desde os primórdios da civilização humana, plantas e produtos naturais de origens diversas vêm sendo utilizados com finalidades medicinais. Ao

---

<sup>1</sup> A palavra inflamação vem do grego *phlogosis*, calor, e do latim *flamma*, fogo, descrevendo, portanto, a elevação da temperatura local devido à vasodilatação observada no processo inflamatório agudo.

<sup>2</sup> Embora o termo espécies reativas de oxigênio (ERO) seja bastante utilizado, optamos por utilizar neste trabalho o termo espécies oxidantes (EO) que se refere tanto às espécies radicalares derivadas de O<sub>2</sub> quanto às derivadas de nitrogênio.

conhecimento tradicional agregou-se, posteriormente, uma base científica sólida, resultando no desenvolvimento de novos fármacos destinados ao tratamento de diferentes doenças humanas. Como exemplos de fármacos de origem natural, introduzidos na terapêutica nos últimos anos, podemos citar os antitumorais paclitaxel, vincristina, vimblastina e etoposídeo, dentre outros, bem como o antimalárico atermisinina e derivados (NEWMAN et al., 2003).

De acordo com Newman e Cragg (2007), as principais patologias pesquisadas pela indústria farmacêutica são as doenças infecciosas, câncer, hipertensão e processos inflamatórios, com mais de 50 fármacos aprovados para cada uma dessas patologias nos últimos 25 anos.

Muito se tem falado sobre os potenciais de produtos oriundos de plantas em gerar recursos financeiros para os países tropicais, detentores de grande diversidade biológica, mas carentes de tecnologia. Nesse cenário, o Brasil possui papel de destaque, já que é o país com a maior diversidade genética vegetal do mundo, com um total de espécies de plantas superiores estimado em 55 mil. A relevância de Minas Gerais, neste contexto, é inegável, já que aproximadamente dez mil espécies vegetais ocorrem no estado, correspondendo a 3,5% do total existente no mundo (FERNANDES, 2006).

O uso terapêutico das diversas espécies do gênero *Passiflora* é comum em diversos países, sendo utilizadas desde a antiguidade, na medicina popular, para tratamento de diversas enfermidades (JAMIR; SHARMA; DOLUI, 1999). Atualmente, alguns autores têm sugerido também uma atividade anti-inflamatória e antioxidante para extratos etanólicos das folhas de *Passiflora edulis* (DOYAMA et al., 2005). Entretanto, como afirma Rudnicki et al. (2007), existem poucos dados na literatura sobre seus efeitos *in vivo* sobre o estresse oxidativo.

Considerando a grande biodiversidade brasileira e a reconhecida bioatividade de produtos naturais vegetais, nota-se o potencial de utilização da flora no desenvolvimento de novos medicamentos. Neste contexto, propõe-se, no presente trabalho, avaliar a atividade anti-inflamatória do extrato seco das folhas de *Passiflora edulis* e de seus efeitos sobre o metabolismo oxidativo de neutrófilos.



## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Os neutrófilos no processo inflamatório

A inflamação é definida como uma resposta biológica complexa de tecidos vascularizados a estímulos nocivos tais como patógenos, células danificadas ou agentes irritantes. Em resposta a essa lesão tecidual, uma rede de sinalização química multifatorial é iniciada e mantida como mecanismo de proteção do organismo, visando a remoção do estímulo nocivo e a regeneração do tecido danificado (COUSSENS; WERB, 2002; HANADA; YOSHIMURA, 2002).

A resposta inflamatória é comum a vários tipos de tecidos, sendo mediada por diversas substâncias produzidas pelas células danificadas e células do sistema imune que se encontram eventualmente nas proximidades da lesão. O processo inflamatório é parte do sistema imune inato, assim denominado por sua capacidade de iniciar uma resposta inespecífica contra um agente agressor, e consiste na liberação sequencial de mediadores e no recrutamento de leucócitos circulantes, os quais se tornam ativados no sítio de injúria (HANADA; YOSHIMURA, 2002). Quando essas células fagocíticas são ativadas, elas iniciam um processo de sinalização de vias intracelulares que culmina na síntese de citocinas, EO e outros mediadores da inflamação (KAPLAN et al., 2007).

No entanto, se a destruição do agente agressor e o processo de reparo não ocorrerem de maneira eficiente e sincronizada, a reação inflamatória crônica se desenvolve<sup>3</sup>. Enquanto o processo inflamatório agudo envolve reações exsudativas, a inflamação crônica se caracteriza por respostas proliferativas, na qual há proliferação de fibroblastos e de células endoteliais, assim como afluência de células inflamatórias crônicas (SIQUEIRA JÚNIOR, 2000b).

A secreção de mediadores inflamatórios pelos macrófagos mantém um ciclo de lesão e reparo tecidual que causa a destruição irreversível do parênquima normal. O tecido destruído é preenchido por tecido conjuntivo fibroso, podendo

---

<sup>3</sup> Não há uma linha divisória clara entre inflamação aguda e crônica. Se a causa do dano inicial não for completamente eliminada, a inflamação aguda gradualmente dará lugar à crônica, mas não existe uma sequência temporal.

acarretar sérias sequelas aos tecidos, como a perda da função da parte afetada (WANNMACHER; FERREIRA, 2004).

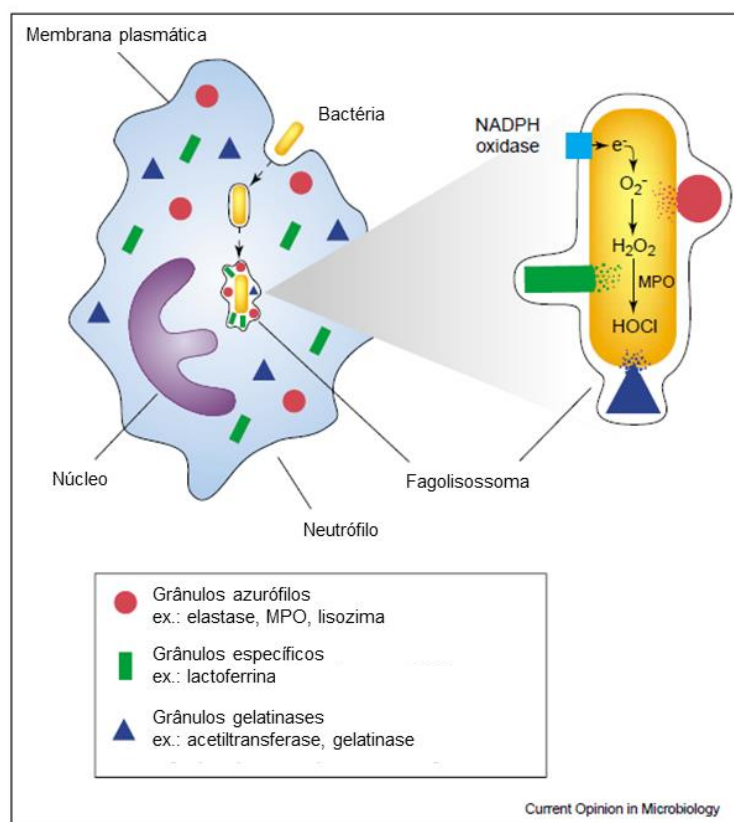
Os neutrófilos, ou leucócitos polimorfonucleares, são as células brancas mais abundantes do sangue caracterizadas por possuírem um núcleo multilobulado e grânulos em abundância no citoplasma. Produzidos e armazenados na medula óssea, os neutrófilos são liberados na sua forma madura para o sangue periférico, onde têm uma meia-vida curta (6-8 horas) caso não sejam recrutados para sítios de inflamação por quimiocinas e fatores quimiotáticos específicos (PRUCHNIAK; ARAZNA; DEMKOW, 2013).

Dentre os leucócitos, os neutrófilos são as primeiras células do sistema imune que chegam aos sítios inflamatórios, sendo, por esta razão, considerados a primeira linha de defesa do organismo. Quando recrutadas para o local da lesão, essas células apresentam a capacidade de englobar os microrganismos e/ou fragmentos de tecido danificado, por um processo chamado fagocitose (MAYER-SCHOL; AVERHOFF; ZYCHLINSKY, 2004).

Durante o processo de fagocitose o neutrófilo engloba o patógeno em um fagossoma, em seguida, ocorre a fusão com grânulos citoplasmáticos, seguida pela degranulação, formando o fagolisossoma. Dentro desse, o microrganismo é degradado por enzimas, peptídeos antimicrobianos e EO, que compõem o arsenal microbicida dos neutrófilos (LEE; HARRISON; GRINSTEIN, 2003).

De uma forma geral, esse arsenal microbicida dos neutrófilos é dividido em duas categorias: mecanismos independentes e dependentes de oxigênio (não oxidativo e oxidativo, respectivamente) (Figura 1). O primeiro envolve o conteúdo dos grânulos dos neutrófilos, enquanto o segundo, a ativação do complexo NADPH oxidase e produção de EO (MAYER-SCHOLL; AVEHOFF; ZYCHLINSKY, 2004).

**Figura 1** – Esquema dos mecanismos independente e dependente de oxigênio durante a fagocitose de um microrganismo pelo neutrófilo



**Fonte:** Adaptado de MAYER-SCHOLL, AVEHOFF, ZYCHLINSKY (2004, p. 63)

### 2.1.1 Mieloperoxidase

O mecanismo independente de oxigênio (ou mecanismo não oxidativo) abrange o conteúdo dos grânulos dos neutrófilos, que podem ser classificados em: (1) azurófilos ou primários, que contêm a enzima mieloperoxidase (MPO), proteinases, como a elastase, defensina e lisozima; (2) específico ou secundários, que possuem lactoferrina, lisozima, proteínas presentes na membrana plasmática; e (3) gelatinase ou terciário, que se diferenciam dos grânulos específicos por não possuírem lactoferrina (FLANNAGAN; JAUMOILLÉ; GRINSTEIN, 2012).

A MPO é o maior constituinte dos grânulos azurófilos citoplasmáticos dos neutrófilos, representando cerca de 5% das proteínas totais dessas células. Os monócitos também contêm MPO, porém em menor concentração, cerca de um terço quando comparados aos neutrófilos, e a perdem durante a diferenciação em

macrófago (MALLE et al., 2007). Entretanto, em algumas situações, MPO também pode estar presente em macrófagos teciduais (RODRIGUES et al., 2002).

Essa enzima é uma heme peroxidase clássica liberada após ativação celular no interior do fagolisossoma ou no espaço extracelular, sendo utilizada como marcador de neutrofilia em condições de inflamação e sepse. Ao contrário da maioria de outras proteínas heme, como a hemoglobina, a MPO é verde e não vermelha, sendo essa substância que confere cor esverdeada ao pus (BABIOR, 2000).

A partir de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e íons  $Cl^-$ , a enzima MPO gera ácido hipocloroso (HOCl) (Reação 1), o principal e um dos mais potentes oxidantes microbicidas produzidos pelos neutrófilos (FLANNAGAN; JAUMOILLÉ; GRINSTEIN, 2012):



A reação do HOCl com grupos aminos produz cloraminas, substâncias citotóxicas por quebrarem ligações peptídicas. A atividade de MPO também é responsável pela perda de ferro microbiano e pela destruição de enzimas da cadeia transportadora de elétrons de bactérias, levando à perda da respiração aeróbica e uma queda na viabilidade desses microrganismos. Além disso, a interação do HOCl com fosfolipídios de membrana modifica a permeabilidade da membrana, permitindo o extravasamento de componentes celulares essenciais (DEBY-DUPONT; DEBY; LAMY, 1999).

Entretanto, sob condições patológicas, a ativação constante da enzima MPO pode afetar de forma negativa os tecidos do hospedeiro desencadeando dano oxidativo local, já que, como mencionado anteriormente, o HOCl pode iniciar reações de modificações de lipídios, DNA, proteínas e lipoproteínas (MALLE et al., 2007).

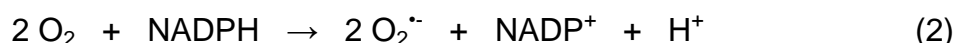
A presença de proteínas cloradas nas placas ateromatosas evidencia a contribuição que a MPO tem de iniciar e promover várias doenças cardiovasculares (KLEBANOFF et al., 2013). No escarro e no lavado bronco-alveolar de pacientes asmáticos observa-se uma alta concentração de MPO, o que evidencia que o aumento do influxo de neutrófilos ativados pode promover importante lesão tecidual e vascular (EKMEKCI et al., 2004). Além disso, em algumas doenças inflamatórias,

como artrite reumatoide, os neutrófilos são ativados por complexos imunes nos tecidos do hospedeiro, onde iniciam um processo de fagocitose frustrada, ocorrendo a liberação direta de HOCl no tecido (KETTLE et al., 2014).

### **2.1.2 Burst respiratório e produção de espécies oxidantes**

O segundo mecanismo, dependente de oxigênio (ou mecanismo oxidativo), é diretamente proporcional ao *burst* respiratório e envolve a ativação do complexo NADPH oxidase, composto por proteínas citosólicas (p40<sup>phox</sup>, p47<sup>phox</sup> e p67<sup>phox</sup>) e de membrana (p22<sup>phox</sup> e gp91<sup>phox</sup>), também conhecido como flavocitocromo b<sub>558</sub>. Outra proteína de baixo peso molecular, Rac, também participa deste complexo. A ativação desse sistema ocorre através da fosforilação mediada pela proteína quinase C sobre o componente citosólico p47<sup>phox</sup>, o que resulta na migração do complexo citosólico para a membrana plasmática das células ou das vesículas secretórias e grânulos citoplasmáticos (BYLUND et al., 2010).

O complexo NADPH oxidase produz grandes quantidades de ânion superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) através da redução unieletrônica do oxigênio molecular, utilizando NADPH como doador de elétrons (Reação 2):



A conversão de oxigênio a O<sub>2</sub><sup>•-</sup> aumenta em mais de cem vezes o consumo de oxigênio pela célula, por isso a utilização do termo “*burst* respiratório” (MAYER-SCHOLL; AVERHOFF; ZYCHLINSKY, 2004).

O O<sub>2</sub><sup>•-</sup> gerado é rapidamente convertido a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por dismutação espontânea ou através da enzima superóxido dismutase (SOD). Por sua vez, o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> formado pode ser convertido em água e oxigênio por ação de peroxidases ou catalases presente no citoplasma. Entretanto, a maior parte de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produzido pelos neutrófilos é convertido em HOCl pela ação da enzima MPO (KLEBANOFF et al., 2013).

Embora seja uma substância não-radicalar com reatividade limitada em meio aquoso, o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pode atravessar membranas biológicas e produzir o radical hidroxila (•OH), altamente reativo e considerado a principal EO responsável por

modificações de macromoléculas e dano celular. A produção de  $\cdot\text{OH}$  pode ocorrer por dois mecanismos: a reação de Fenton, onde  $\text{H}_2\text{O}_2$  reage com íons metálicos (íons ferro, por exemplo), ou através da reação do HOCl com  $\text{O}_2^{\cdot-}$  (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

Além destes, pode ocorrer também a produção de oxigênio singlete ( $^1\text{O}_2$ ) pela reação de  $\text{H}_2\text{O}_2$  com HOCl. A formação intracelular deste composto tem sido demonstrada durante processos inflamatórios e em alguns processos como a peroxidação lipídica e transições redox de quinonas (AGNEZ-LIMA et al., 2012). Além disso, a interação do  $\text{O}_2^{\cdot-}$  com óxido nítrico (NO) produzido através de uma reação catalisada pela enzima óxido nítrico sintase indutiva pode levar à formação do peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ), uma espécie com alta capacidade microbicida (FLANNAGAN; JAUMOILLÉ; GRINSTEIN, 2012).

A importância clínica do complexo NADPH oxidase e de seus subprodutos é exemplificada pela doença granulomatosa crônica. Os pacientes dessa imunodeficiência possuem defeitos no funcionamento desse complexo, sendo susceptíveis a infecções bacterianas e fúngicas recorrentes. Além disso, os pacientes também sofrem de uma variedade de desordens inflamatórias, indicando uma propensão a reações inflamatórias exageradas (BYLUND et al., 2010; LEE; HARRISON; GRINSTEIN, 2003).

Entretanto, essas EO, ao reagirem com moléculas que possuem elétrons não pareados, podem formar outras espécies secundárias, que também podem ser reativas, gerando assim uma reação em cadeia com grande variedade de substâncias reativas. Essas substâncias são importantes para degradar o patógeno fagocitado, mas também podem reagir com moléculas do hospedeiro, levando ao desenvolvimento de diversas doenças, como as inflamatórias crônicas (artrite reumatoide, vasculite), cardiovasculares (aterosclerose, isquemia miocárdica), neurodegenerativas (esclerose múltipla, Doença de Parkinson, Alzheimer), lesão hepática e câncer (CAROCHO; FERREIRA, 2013).

## 2.2 Enzimas antioxidantes

Halliwell e Gutteridge (2007) definiram o termo antioxidante como qualquer substância que, quando presente em baixas concentrações em relação a um substrato oxidável, retarda ou impede a oxidação desse substrato. No mesmo

ano, Khlebnikov et al. (2007) definiram os antioxidantes como qualquer substância que diretamente neutraliza ou inibe a produção de EO ou indiretamente aumenta as defesas antioxidantes. Outra propriedade que um composto deve ter para ser considerado antioxidante é a habilidade de, depois de neutralizar um radical, formar um novo radical estável, incapaz de reagir novamente (CAROCHO; FERREIRA, 2013).

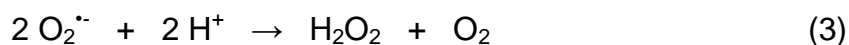
Em condições normais, a produção de EO é essencial para o desempenho de funções fisiológicas, como expressão gênica, crescimento celular e defesa contra infecções. Entretanto, essas espécies podem ser deletérias ao organismo dependendo do tipo de radical e quantidade formada, além do seu local de produção. O sistema redox de uma célula é altamente regulado e sua perturbação provoca o estresse oxidativo (LÓPEZ-ALARCÓN; DENICOLA, 2013).

Dessa forma, a função principal dos antioxidantes, além de reduzir a formação de EO ou reagir promovendo sua inativação, é restaurar o estado redox da célula. Para isso, o organismo humano possui sistemas antioxidantes altamente complexos que trabalham sinergicamente para proteger as células e sistemas contra os danos causados pelas espécies reativas (RAHMAN, 2007).

Esses sistemas antioxidantes são classificados em não enzimáticos e enzimáticos. O sistema não enzimático compreende compostos endógenos, como bilirrubina, melatonina, ácido úrico e glutathione, além de compostos obtidos através da dieta, como as vitaminas A, C e E, e polifenóis. Os antioxidantes enzimáticos também são importantes na proteção das células a essas espécies reativas, destacando-se as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx) (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

### **2.2.1 Superóxido dismutase (SOD)**

A função da enzima superóxido dismutase (SOD) é acelerar a dismutação<sup>4</sup> do  $O_2^{\cdot-}$ , convertendo-o a  $H_2O_2$  (Equação 3):




---

<sup>4</sup> A definição de dismutação é uma reação química na qual uma mesma espécie é tanto oxidada quanto reduzida (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

Essa conversão ocorre através de dois passos reacionais. Primeiramente, uma molécula de  $O_2^{\cdot-}$  reage com o grupo prostético da SOD, em sua forma oxidada, liberando oxigênio molecular. No segundo passo, a forma reduzida do grupo prostético da enzima se liga a um segundo  $O_2^{\cdot-}$  e dois prótons, liberando  $H_2O_2$  e retornando à sua forma oxidada (JOHNSON; GIULIVI, 2005).

As isoformas da SOD são classificadas de acordo com o cofator inorgânico presente no grupo prostético. Atualmente, quatro isoformas são descritas: cobre e zinco (CuZnSOD), manganês (MnSOD), ferro (FeSOD) e níquel (NiSOD). Em animais, são relatadas a presença de CuZnSOD, principalmente no citosol celular, e MnSOD, nas mitocôndrias (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

A dismutação não enzimática do  $O_2^{\cdot-}$  requer a colisão de duas moléculas, o que é difícil devido à baixa concentração intracelular desse íon ( $10^{-9}$ - $10^{-10}$  M). Dessa forma, o  $O_2^{\cdot-}$  é metabolizado mais facilmente pela SOD, presente em praticamente todos os compartimentos intracelulares na concentração de aproximadamente  $10^{-5}$  M (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

Além disso, a taxa de reação entre  $O_2^{\cdot-}$  e NO é de  $2 \times 10^{10} M^{-1} s^{-1}$ , sendo considerada uma das mais rápidas em um sistema biológico. Isso explica a necessidade de uma enzima que teria que competir pelo  $O_2^{\cdot-}$  na presença de NO, o que preveniria a formação de  $ONOO^-$  e os danos causados por essa espécie (JOHNSON; GIULIVI, 2005).

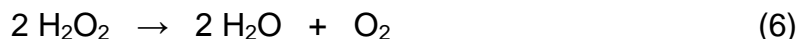
### **2.2.2 Catalase (CAT)**

A dismutação do  $O_2^{\cdot-}$ , assim como a ação de muitas enzimas oxidases, leva à produção de  $H_2O_2$ , que pode ser removido por dois tipos de enzimas: catalases e peroxidases.

A enzima catalase (CAT), presente nos peroxissomos celulares, possui um grupamento heme e é responsável por converter  $H_2O_2$  em água e oxigênio molecular (Equação 6):







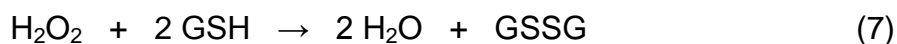
A enzima CAT, assim como a SOD, catalisa uma reação de dismutação através de dois passos reacionais. No primeiro passo (Equação 4), uma molécula de  $\text{H}_2\text{O}_2$  oxida o íon  $\text{Fe(III)}$  do grupamento heme, formando a espécie  $\text{Fe(IV)=O}$  e liberando uma molécula de água. No segundo passo (Equação 5), a espécie  $\text{Fe(IV)=O}$ , por possuir um alto poder oxidante, reage com uma segunda molécula de  $\text{H}_2\text{O}_2$  formando oxigênio molecular e uma segunda molécula de água. O íon ferro retorna ao seu estado de oxidação +3, estando pronto para mais uma catálise (CHELIKANI; FITA; LOEWEN, 2004).

A CAT possui uma alta taxa de atividade. Uma molécula dessa enzima é capaz de converter cerca de seis milhões de moléculas de  $\text{H}_2\text{O}_2$  por minuto (RAHMAN, 2007).

### 2.2.3 *Glutathione peroxidase (GPx)*

Outro grupo de enzimas responsáveis pela remoção de  $\text{H}_2\text{O}_2$  são as peroxidases, enzimas que utilizam doadores de elétrons para reduzir peróxidos orgânicos à água.

A GPx é uma seleno-enzima localizada no citosol que utiliza o tripeptídeo tiólico glutathione, em sua forma reduzida (GSH), como substrato para a decomposição de peróxidos orgânicos, gerando glutathione oxidada (GSSG) (Equação 7):



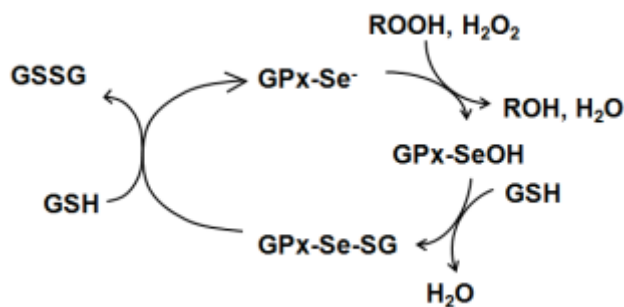
A Figura 2 ilustra o mecanismo catalítico da GPx. A forma reduzida da enzima GPx (esquematizada como  $\text{GPx-Se}^-$ , na qual o selenol está como selenolato<sup>5</sup>) reage com  $\text{H}_2\text{O}_2$  ou hidroperóxidos orgânicos (ROOH), reduzindo-os ao seu álcool correspondente. Após uma reação de duas etapas com duas moléculas

---

<sup>5</sup> O  $\text{pK}_a$  da selenocisteína, presente no sítio ativo da GPx, é de 5,2, o que favorece a ionização do grupo selenol em pH neutro (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

de GSH, a forma reduzida da enzima é regenerada através da oxidação dessas duas moléculas, formando-se uma ponte dissulfeto entre si (SALINAS, 2010).

**Figura 2** – Mecanismo catalítico da seleno-enzima GPx sobre a glutatona em sua forma reduzida



**Fonte:** SALINAS (2010, p. 127)

Atualmente, cinco tipos de GPx são descritos na literatura: GPx1, a enzima “clássica”, presente no citosol; GPx2, presente principalmente nas células do trato gastrointestinal; GPx3, uma glicoproteína presente no plasma e em fluidos extracelulares de mamíferos; GPx4, que promove a redução de hidroperóxidos a partir de complexos lipídicos como colesterol, mesmo quando os peróxidos estão presentes na membrana celular; e GPx5, descrita como presente apenas em epidídimos de roedores e contendo cisteína em seu sítio ativo, sendo independente de selênio (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

### 2.3 A humanidade e a cura pelas plantas

A utilização de plantas medicinais deu início há milhões de anos por povos de diversos países com o objetivo de tratar variadas patologias, atingindo, assim, um papel importante na saúde mundial. De acordo com Scorzoni et al. (2007), vinte mil espécies de plantas são usadas com fins medicinais. Além disso, Yogisha e Raveesha (2009) afirmam que cerca de três quartos da população mundial recorre às plantas e seus extratos para o tratamento de problemas de saúde.

Atualmente, cerca de 30% de todos os medicamentos utilizados na terapêutica são de origem natural, sejam derivados de plantas, microrganismos e

animais ou precursores de alguns compostos. Além disso, o Brasil tem uma das maiores biodiversidades do mundo, possuindo cerca de 20% de todas as plantas e microrganismos existentes no planeta (CALIXTO, 2005).

Um bom exemplo da produção nacional de medicamentos provenientes de plantas é o desenvolvimento do anti-inflamatório tópico Acheflan<sup>®</sup> (Aché Laboratórios), que utiliza como matéria-prima o óleo essencial da planta *Cordia verbenacea*. Esse medicamento foi totalmente desenvolvido no Brasil e registrado na Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) em 2004 e lançado no mercado em 2005 (CALIXTO; SIQUEIRA JÚNIOR, 2008).

Nos últimos anos, produtos naturais, incluindo os derivados de plantas superiores, têm dado grande contribuição para o desenvolvimento de terapias farmacológicas modernas. A maioria dos metabólitos secundários derivados de plantas é conhecida por interferir, direta ou indiretamente, com moléculas ou mecanismos, incluindo mediadores inflamatórios, como os metabólitos do ácido araquidônico e as citocinas, além de interferir na expressão de moléculas pró-inflamatórias como ciclo-oxigenase-2 (COX-2), interleucina-1 (IL-1), fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ), neuropeptídios e proteases (CALIXTO; OTUKI; SANTOS, 2003).

#### **2.4 Uso de extratos de *Passiflora edulis***

A família Passifloraceae compreende cerca de dezenove gêneros, sendo o gênero *Passiflora*<sup>6</sup> o maior dessa família, com cerca de quatrocentas espécies distribuídas principalmente em regiões tropicais e subtropicais (BERALDO; KATO, 2008).

Várias espécies são cultivadas nos trópicos devido aos seus frutos comestíveis. No Brasil, o maior foco de distribuição geográfica é o Centro-Norte, onde se encontram pelo menos 79 espécies. Dessas, a espécie *Passiflora edulis*

---

<sup>6</sup> A denominação *Passiflora* (do latim *passio*, “paixão” e *flos*, “flor”) surgiu a partir da interpretação religiosa de colonizadores europeus, no século XVI, da flor do maracujá, cuja morfologia sugere uma correlação com os símbolos da Paixão de Cristo (ZERAİK et al., 2010).

Sims, conhecida popularmente como maracujá-azedo<sup>7</sup> (Figura 3), é a mais cultivada (ZERAİK et al., 2010).

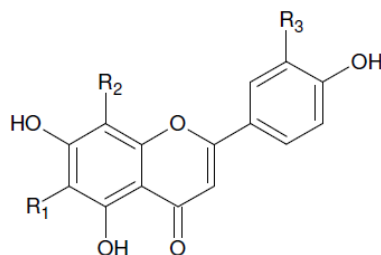
O Brasil é o maior produtor mundial de maracujá. Segundo o IBGE (2013), a produção brasileira de maracujá em 2012 foi de 776.097 toneladas, com 59.246 hectares de área plantada ou destinada à colheita, sendo os maiores produtores os estados da Bahia (41,4%), Ceará (23,1%), Minas Gerais (5,1%) e Sergipe (4,8%). Em 2013, a quantidade de fruto produzida cresceu 8%.

**Figura 3** – Flor e fruto de *Passiflora edulis* Sims



Fonte: ZERAİK, 2010

Dentre os fito-constituintes de *P. edulis*, os flavonoides são os compostos majoritários, destacando-se os flavonoides C-glicosídeos derivados da apigenina e luteolina, apresentados na Tabela 1 (DHAWAN; DHAWAN; SHARMA, 2004; FERRERES et al., 2007).



<sup>7</sup> Maracujá é o nome popular dado a várias espécies do gênero *Passiflora*, e vem de *marajú-ya*, que para os indígenas significa “fruto de sorver” ou “polpa que se toma de sorvo”, uma alusão aos frutos édulcos dessas espécies (ZERAİK et al., 2010).

**Tabela 1** – Estrutura química dos flavonoides C-glicosídeos relacionados na espécie *P. edulis*

Flavonoide C-glicosídeo	Aglicona	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
isovitexina	apigenina	gli	H	H
vitexina	apigenina	H	gli	H
isoorientina	luteolina	gli	H	OH
orientina	luteolina	H	gli	OH
luteolina-6-C-quinovosídeo	luteolina	qui	H	OH
luteolina-6-C-fucosídeo	luteolina	fuc	H	OH

**Fonte:** ZUCOLOTTO, 2009

**Legenda:** fuc = fucose; gli = glicose; qui = quinose

A presença de luteolina-6-C-chinosídeo e luteolina-6-C-fucosídeo nas folhas de *P. edulis* foi relatada por Mareck et al. (1991). A presença dos compostos vitexina, isovitexina, orientina e isoorientina é relatada tanto no extrato hidrotetanólico, quanto no extrato aquoso. Além disso, estudos demonstram que o teor de flavonoides C-glicosídeos nas folhas de espécies de *Passiflora* estão na faixa de 1,9 a 4,6% (DE-PARIS et al., 2002; PETRY et al., 2001).

Além dos flavonoides, também foram identificadas nessa espécie a presença de alcaloides do tipo indólico, que compreendem o segundo grande grupo de alcaloides atualmente conhecido. Muitos têm valor na medicina como tranquilizantes e no tratamento da hipertensão (PEREIRA; VILEGAS, 2000).

A passiflorina, um de seus componentes mais conhecidos, é um ciclopropano triterpeno glicosídeo, que tem sido identificado em extratos metanólicos das folhas de *P. edulis*. Outros compostos relatados são glicosídeos cianogênicos, terpenoides e saponinas (DHAWAN; DHAWAN; SHARMA, 2004).

Como alimento funcional, as espécies comerciais mostraram-se ricas em vitaminas, principalmente A e C, alcaloides e flavonoides, que são compostos funcionais importantes em outros alimentos. Além disso, as fibras presentes nas sementes e cascas do maracujá apresentam potencial no controle da obesidade, diabetes e controle de taxas de colesterol (CHAU; HUANG, 2005; DOYAMA et al., 2005; KRAHN et al., 2008).

Os extratos de *P. edulis* são amplamente utilizados com função sedativa, diurética, anti-helmíntica, antidiarreica, estimulante da função digestiva, no tratamento dos sintomas da menopausa, da hipertensão, de cólicas infantis e de alguns carcinomas gástricos (DHAWAN; DHAWAN; SHARMA, 2004; MORAIS et al., 2005).

A maior parte dos estudos sobre essa espécie foca em sua atividade sobre o sistema nervoso central, como agente ansiolítico, anticonvulsivante e sedativo. Entretanto, alguns autores descrevem o uso de espécies do gênero *Passiflora* na medicina popular no tratamento de doenças inflamatórias (VARGAS et al., 2007).

Zucolotto (2005) investigou o extrato aquoso liofilizado do pericarpo dos frutos e das raízes de *P. edulis* forma *flavicarpa*, que apresentou atividade anti-inflamatória moderada utilizando o modelo da pleurisia induzida pela carragenina em camundongos.

Souza et al. (2012) demonstraram que o suco da polpa de *P. edulis* na concentração de 1 g/kg administrado a ratos duas vezes por dia durante 28 dias é capaz de aumentar os níveis de HDL e diminuir os níveis de LDL, além de reduzir os níveis de marcadores de peroxidação lipídica no sangue.

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 filtragem e evaporação do solvente.

Recentemente, Martins (2013) demonstrou que o extrato hidroetanólico seco das folhas de *P. edulis* apresentou atividade antioxidante *in vitro*, avaliada pela capacidade sequestrante de radicais DPPH, capacidade redutora total e poder redutor de ferro. Por outro lado, o mesmo extrato foi capaz de impedir a redução da produção de EO por macrófagos de ratos diabéticos, mantendo-a em valores similares aos observados em animais não diabéticos.

Em 2009, o Ministério da Saúde criou a Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (RENISUS) com base nas espécies vegetais já utilizadas nos serviços de saúde estaduais e municipais, no conhecimento tradicional e popular e em estudos químicos e farmacológicos. Com uma listagem de 71 plantas medicinais, a RENISUS tem a finalidade de orientar estudos e pesquisas

que possam subsidiar a elaboração de fitoterápicos para uso da população, com segurança e eficácia para o tratamento de determinada doença (BRASIL, 2009).

O gênero *Passiflora* faz parte da RENISUS, sendo as espécies *P. alata*, *P. edulis* e *P. incarnata* citadas nessa lista com a indicação de seus usos como calmante, sedativo e ansiolítico. Dessa forma, é de grande interesse a comprovação de uma suposta atividade anti-inflamatória de *P. edulis*, contribuindo, assim, para o potencial farmacológico dessa espécie vegetal.

### 3 OBJETIVOS

O presente trabalho tem como objetivo geral avaliar os possíveis efeitos do extrato hidroetanólico seco das folhas de *Passiflora edulis* Sims sobre a modulação da resposta inflamatória em neutrófilos obtidos do exsudato peritoneal de ratos, utilizando o modelo de inflamação aguda induzida por carragenina.

Para atingir tais objetivos, as seguintes metas são propostas:

- a) Preparar o extrato hidroetanólico seco das folhas de *P. edulis* Sims e realizar uma triagem fitoquímica no mesmo;
- b) Verificar os efeitos da ingestão do extrato sobre o recrutamento de neutrófilos na cavidade peritoneal de ratos;
- c) Avaliar os efeitos da ingestão do extrato sobre a produção de EO, atividade de NADPH oxidase e MPO em neutrófilos;
- d) Avaliar os efeitos da ingestão do extrato sobre a atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx) em neutrófilos.



## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Obtenção do material vegetal

As folhas de *Passiflora edulis* Sims foram coletadas no bairro Mandassaia, município de Alfenas-MG (latitude 21°27'33''S e longitude 46°01'59''W, a 789 m do nível do mar). A exsicata foi depositada e registrada no Herbário ESAL do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras, pelo Prof. Dr. Douglas Carvalho, sob o registro de nº 22 356.

As folhas coletadas (205,24 g) foram separadas e dispostas em camadas finas e submetidas à secagem em estufa de ar circulante a 39,6 ± 0,7 °C. A determinação da perda por secagem foi realizada mensurando o peso da matéria-prima vegetal fresca em turnos de 5 h até peso constante.

Após secagem, o material vegetal foi triturado em moinho de faca Marconi®.

### 4.2 Granulometria do material vegetal

A determinação granulométrica dos pós de *Passiflora edulis* Sims foi realizada segundo a Farmacopeia Brasileira (2010). Pesaram-se 150 g do material vegetal seco que, em seguida, foi submetido à passagem por tamises em tamizador Belter®, previamente tarados, com as aberturas de malha previamente padrozinadas de 125, 150, 180, 280, 355 e 710 µm, durante 15 minutos.

Para a análise dos dados, foram calculados o tamanho médio das partículas pelo método aritmético, conforme Equação 8 (BARNI; CECHINEL FILHO; COUTO, 2009) e construído o histograma de frequência para a análise da distribuição granulométrica.

$$d_{\text{médio}} = \frac{\sum (AM.Fr\%)}{100\%} \quad (8)$$

Onde:  $d_{\text{méd}} =$  diâmetro médio de partícula; AM = abertura da malha (mm) e Fr% = fração retida em cada tamis.

#### 4.3 Preparo do extrato seco das folhas de *Passiflora edulis* Sims

O extrato seco foi obtido por maceração dinâmica das folhas secas e pulverizadas na proporção de 1 parte de pó para 10 partes de solução hidroetanólica 70% (etanol:água, 7:3, v/v). A mistura (pó das folhas secas + líquido extrator) foi filtrada através de um filtro de papel e a solução extrativa (líquido extrator + metabólitos secundários) foi evaporada sob pressão reduzida a  $45,7 \pm 2,0$  °C, eliminando-se o solvente orgânico. A água foi retirada pelo processo de liofilização a  $-53$  °C, 429  $\mu$ Hg por 78 horas e 55 minutos (MARTINS, 2013).

#### 4.4 Análise quantitativa do teor de polifenóis totais

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

#### 4.5 Análise por FIA-ESI-MS

Foi preparada uma solução a 1 mg/mL em água, filtrado em filtro 0,45  $\mu$ m e analisada por espectrometria de massas com inserção direta da amostra utilizando o modo de ionização por *electrospray* (*Flow Injection Analysis - Electrospray Ionization - Mass Spectrometry* – FIA-ESI-MS).

Como fase móvel foi utilizada água ultrapura obtida no equipamento Milli-Q Plus da marca Merck Millipore (0,055  $\mu$ S/cm a 27,2 °C). Os espectros (FIA-ESI-MS/MS) de massa foram obtidos no equipamento Shimadzu's LCMS-8030 LC/MS/MS Triple Quadrupole operando em modo negativo. O modo *full-scan* foi

empregado na faixa de massa de  $m/z$  100-1000. A amostra foi mantida a 25 °C durante a análise.

#### **4.6 Análises *in vivo***

Utilizaram-se ratos machos da linhagem Wistar, pesando em média  $350 \pm 50$  g, obtidos no Biotério da Universidade Federal de Alfnas (UNIFAL-MG). Os animais foram mantidos em caixas de polietileno, à temperatura de 23 °C, com período claro-escuro de 12 horas, recebendo água e ração comercial *ad libium* e foram divididos em seis grupos experimentais, contendo quatorze ratos em cada:

- a) Grupo S (Salina): animais não submetidos ao tratamento com extratos, recebendo 10 mL/kg de solução salina, via intraperitoneal;
- b) Grupo C (Carragenina): animais não submetidos ao tratamento com extratos, recebendo 8 mg/kg de carragenina, via intraperitoneal;
- c) Grupo D (Dexametasona): animais tratados com dexametasona na dose de 5 mg/kg de massa corpórea, via oral, recebendo 8 mg/kg de carragenina, via intraperitoneal;
- d) Grupos E5, E50 e E300 (Extratos): animais tratados com extrato nas doses de 5, 50 e 300 mg/kg de massa corpórea, via oral, respectivamente, recebendo 8 mg/kg de carragenina, via intraperitoneal.

Decorridos 60 minutos do tratamento, os animais dos grupos C, D, E5, E50 e E300 receberam uma injeção de carragenina solubilizada em solução salina, na dose de 8 mg/kg (em um volume de 10 mL/kg), administrada por via intraperitoneal. Os animais do grupo S receberam um volume de 10 mL/kg de solução salina.

Todos os experimentos *in vivo* foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UNIFAL-MG sob o número de registro 523/2013.

##### **4.6.1 Recrutamento de neutrófilos da cavidade intraperitoneal**

Os animais foram submetidos à eutanásia 5 horas após a indução da inflamação com carragenina (LOPES, 2010). Os neutrófilos foram obtidos por lavagem intraperitoneal com 15 mL de tampão fosfato salino (PBS) pH 7,4 a 4 °C. O exsudato obtido foi centrifugado a 1.500 rpm por 5 minutos a 4 °C, sendo o sedimento de células ressuspenso em PBS glicosado (PBS contendo MgCl<sub>2</sub> 0,5 mM, CaCl<sub>2</sub> 1 mM e glicose 1 mg/mL).

O número de células obtido da cavidade peritoneal foi determinado em câmara de Neubauer e a viabilidade celular foi avaliada pelo teste de exclusão por azul de Tripán a 0,1% a fim de se utilizar, para cada determinação, 100% de células viáveis.

#### **4.6.2 Avaliação da viabilidade celular**

Foi empregada para a determinação da viabilidade celular a técnica colorimétrica utilizando uma solução de brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2)-2,5-difeniltetrazólio (MTT), que se baseia na verificação da atividade e integridade mitocondrial, interpretada como uma medida da viabilidade celular (MOSMANN, 1983).

Foram utilizadas suspensões de neutrófilos peritoneais dos ratos submetidos aos diferentes tratamentos. O volume correspondente a  $1 \times 10^6$  células/mL foi centrifugado a 1.500 rpm por 5 minutos a 10 °C, sendo o sedimento de células ressuspenso em meio RPMI-1640. Em placa de 96 cavidades, 200 µL dessas suspensões foram adicionadas, em triplicata. Sobre essas suspensões foi adicionado 20 µL de uma solução de MTT 5 mg/mL em RPMI-1640. A placa foi então incubada por 2 horas em estufa a 37 °C com tensão constante de 5% de CO<sub>2</sub>. Após esse período, o conteúdo de cada cavidade foi centrifugado a 1.500 rpm por 10 minutos, descartando-se o sobrenadante. O sedimento de células foi ressuspendido em 100 µL de álcool isopropílico para solubilização dos cristais de formazana formados. A leitura foi feita em leitor de ELISA a 540 nm com filtro de referência a 620 nm.

Uma segunda placa foi preparada nas mesmas condições descritas acima, porém com tempo de incubação de 18 horas.

A redução do sal de MTT por enzimas microssomais e também pela enzima succinato desidrogenase mitocondrial das células viáveis gera como produto

final cristais de formazana, insolúveis e de cor púrpura, que se acumulam nas células devido a sua incapacidade de atravessar a membrana celular. O álcool isopropílico por sua vez, é utilizado para a solubilização da formazana, produzindo uma solução homogênea que possibilita a medição da densidade óptica em espectrofotômetro UV/Visível (MATOS, 2008).

#### **4.6.3 Quimioluminescência dependente de luminol**

A produção de EO foi determinada por quimioluminescência dependente de luminol, um agente amplificador da quimioluminescência comumente utilizado para o estudo da atividade oxidativa de fagócitos.

Para a avaliação da produção das EO, a suspensão de neutrófilos ( $1 \times 10^6$  células viáveis/mL) foi incubada com PBS e luminol 1 mM, utilizando-se acetato de forbol miristato (PMA) (53 ng por teste) como estímulo, em um volume final de 300  $\mu$ L (SOUZA FERREIRA et al., 2012). A intensidade da quimioluminescência foi monitorada em luminômetro Geomax<sup>®</sup> 20/20 durante 30 minutos.

#### **4.6.4 Atividade de NADPH oxidase (redução do citocromo C)**

A produção de  $O_2^{\cdot-}$  pelo sistema NADPH oxidase nos neutrófilos dos ratos submetidos aos diferentes tratamentos foi monitorada pela redução do citocromo C, segundo Jones e Hancock (1994).

A reação foi montada em cubeta de plástico contendo  $2 \times 10^6$  células viáveis/mL, citocromo C 100  $\mu$ M e catalase 20  $\mu$ g/mL em PBS glicosado. As cubetas foram incubadas em banho-maria a 37 °C por 5 minutos e, após esse período, a produção de  $O_2^{\cdot-}$  foi iniciada pela adição de PMA 100 ng/mL. A reação foi monitorada em espectrofotômetro a 550 nm durante 3 minutos.

Os resultados foram expressos em  $\mu$ M de  $O_2^{\cdot-}$  produzido por minuto utilizando-se o coeficiente de extinção molar do citocromo C ( $\epsilon_{550}$  21.100  $M^{-1} cm^{-1}$ ).

#### **4.6.5 Atividade de MPO (produção de HOCl)**

A formação de HOCl reflete a atividade de MPO e foi acompanhada por espectrofotometria baseada na formação de taurina-cloramina resultante da reação de HOCl com taurina (KETTLE; WINTERBOURN, 1994).

As reações foram montadas em microtubos contendo neutrófilos peritoneais ( $3 \times 10^6$  células viáveis/mL), taurina 12 mM, utilizando-se 100 ng/mL de PMA como estímulo, em um volume final de 1 mL. A reação foi incubada em banho-maria a 37 °C por 30 minutos e, após incubação, foi interrompida pela adição de 20 µg/mL de catalase e colocando-se os microtubos em gelo por 5 minutos. Em seguida, os microtubos foram centrifugados a 12.000 g por 10 minutos a 4 °C. A concentração de taurina-cloramina presente no sobrenadante foi quantificada pela oxidação do ácido 5-tio-2-nitrobenzoico (TNB) a 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB) em espectrofotômetro a 412 nm por 3 minutos.

Os resultados foram expressos em µM de HOCl utilizando-se o coeficiente de extinção molar do TNB ( $\epsilon_{412}$  14.100 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>) e considerando que, nesta reação, um mol de taurina-cloramina oxida dois moles de TNB a DTNB.

#### **4.7 Preparo do homogeneizado celular**

A suspensão de neutrófilos peritoneais foi submetida à sonicação em Desruptor de Células Unique (Unique Indústria e Comércio de Produtos Eletrônicos, Ltda.). A suspensão foi mantida em banho de gelo utilizando-se a frequência de 30 kHz em dois ciclos de sonicação por um período de 30 segundos, com intervalo de descanso de 15 segundos entre cada ciclo.

Após esse processo, a suspensão de células foi centrifugada a 3.000 rpm por 5 minutos a 4 °C, sendo o sobrenadante utilizado para a determinação da atividade das enzimas antioxidantes.

##### **4.7.1 Determinação de proteínas totais**

A determinação de proteínas totais no homogeneizado dos neutrófilos obtidos da cavidade intraperitoneal dos animais foi realizada utilizando-se a metodologia de Bradford (1976).

Esse método é baseado na interação entre o corante Coomassie Brilliant Blue G-250 e os resíduos de aminoácidos carregados positivamente nas proteínas, decorrentes da adição de ácido fosfórico 85%. Durante a reação, a interação provoca o deslocamento do equilíbrio do corante para a forma aniônica, que absorve em 595 nm.

O reagente de Bradford foi preparado solubilizando-se 100 mg do corante Coomassie Brilliant Blue G-250 em 50 mL de uma mistura equimolar de metanol 99,8% e etanol 95%. Em seguida, a solução foi aquecida sob agitação a 50 °C até total solubilização. Foram adicionados 100 mL de ácido fosfórico 85% e o volume completado para 1000 mL com água destilada. A solução foi estocada a 4 °C por 24 horas em frasco âmbar e posteriormente foi filtrada em papel Whatman nº 1, protegido da luz. A leitura da absorbância foi realizada em um espectrofotômetro a 595 nm. Como padrão, foi utilizada albumina sérica bovina.

A determinação de proteínas totais teve com objetivo a utilização de alíquotas do homogeneizado correspondentes a 35 µg de proteínas para determinação das atividades das enzimas antioxidantes.

#### **4.7.2 Determinação da atividade de SOD**

A atividade da enzima SOD foi determinada segundo Oyanagui (1984). Alíquotas do homogeneizado de neutrófilos (correspondendo a 35 µg de proteínas) foram incubadas com hidroxilamina 3 mM, hipoxantina 0,07 mM e xantina oxidase  $3,4 \times 10^{-3}$  U/mL a 37 °C, durante trinta minutos, na ausência de luz. Após incubação, foi adicionado ácido sulfanílico,  $\alpha$ -naftilenodiamino e ácido acético glacial, sendo mantidos à temperatura ambiente por vinte minutos. A absorbância foi determinada em espectrofotômetro, em comprimento de onda de 550 nm.

Os resultados foram expressos em U/mg de proteína, onde U é compreendida como a atividade da enzima capaz de inibir 50% da reação nas condições citadas.

#### **4.7.3 Determinação da atividade de CAT**

A atividade da enzima CAT foi determinada segundo Aebi (1984), que acompanha a decomposição de  $\text{H}_2\text{O}_2$  por minuto a 240 nm. Alíquotas do homogeneizado de neutrófilos (correspondendo a 35  $\mu\text{g}$  de proteínas) foram incubadas em PBS pH 7,4. A reação foi iniciada com a adição de  $\text{H}_2\text{O}_2$  10 mM, sendo a absorbância monitorada durante um minuto. A cinética de decomposição de  $\text{H}_2\text{O}_2$  foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar do mesmo a 240 nm ( $43,6 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ).

Os resultados foram expressos em U/mg de proteína, onde U corresponde à atividade da enzima que promove a hidrólise de 1  $\mu\text{mol}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  por minuto.

#### **4.7.4 Determinação da atividade de GPx**

A atividade da enzima GPx foi determinada segundo Sinet et al. (1975) e se baseia na oxidação do NADPH acompanhada a 340 nm a 37 °C. Alíquotas do homogeneizado de neutrófilos (correspondendo a 35  $\mu\text{g}$  de proteínas) foram incubadas em PBS pH 7,4 com glutathiona reduzida 1 mM, NADPH 0,2 mM e glutathiona redutase 1,8 U/mL durante três minutos a 37 °C, monitorando-se a absorbância em espectrofotômetro a 340 nm. Após três minutos de incubação, foi adicionado *t*-butil-hidroperóxido 0,9 mM para que a reação fosse iniciada. A absorbância foi monitorada a 340 nm por mais cinco minutos. A cinética de oxidação do NADPH foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar do mesmo a 340 nm ( $6,22 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ).

Os resultados foram expressos em U/mg de proteína, onde U se refere à atividade da enzima que oxida 1  $\mu\text{mol}$  de NADPH por minuto nas condições definidas.

#### **4.8 Análises estatísticas**

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 de Scott-Knott a 5% de probabilidade. As



análises foram realizadas utilizando-se o programa estatístico SISVAR (Sistema para Análise de Variância).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Matéria-prima vegetal

A determinação da perda por secagem das folhas de *Passiflora edulis* Sims ocorreu em estufa a  $39,6 \pm 0,7$  °C com 205,24 g da matéria-prima vegetal fresca, no qual a estabilização no processo de secagem do material vegetal se deu após 72 h de secagem em estufa, conforme demonstram os resultados da Tabela 2.

**Tabela 2** – Relação de massa fresca e seca das folhas de *P. edulis* Sims

Massa fresca (g)	Massa seca (g)	Perda (g / %)	Temperatura (°C)	Tempo (h)
205,24	51,92	153,32 / 74,2	$39,6 \pm 0,7$	72

**Fonte:** Do Autor

A presença de água na matéria-prima vegetal favorece a ação enzimática, além de propiciar o crescimento de fungos e bactérias. Existem diferentes métodos analíticos oficiais para a determinação de água em matéria-prima vegetal, sendo o método de secagem em estufa de simples execução. Entretanto, esse método determina não somente a perda de água, mas também a perda de constituintes voláteis (BORGES et al., 2005).

Além disso, o extrato seco obtido após o processo de maceração teve um rendimento total de 18,6 g em 100 g da matéria-prima vegetal seca e pulverizada.

### 5.2 Análise granulométrica dos pós

A distribuição granulométrica das partículas de matérias-primas vegetais pulverizadas constitui um fator determinante na homogeneidade e na reprodutibilidade dos processos extrativos. A homogeneidade do pulverizado pode interferir diretamente na qualidade e eficiência do processo extrativo, uma vez que interfere na superfície de contato da matéria-prima vegetal e o líquido extrator (ROLIM et al., 2012).

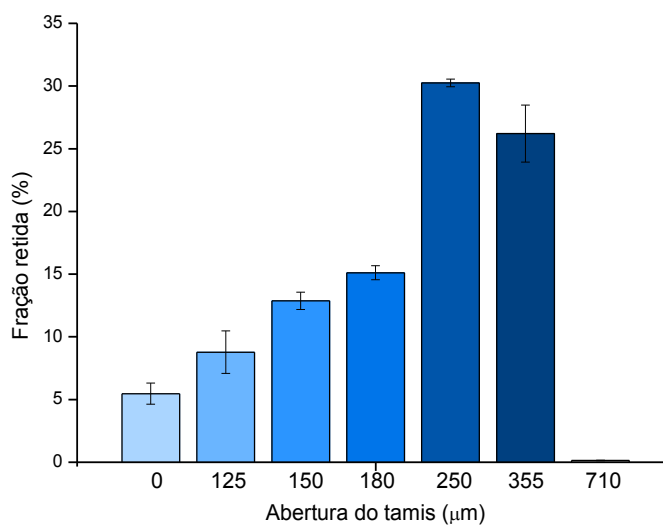
Os resultados do teste da determinação granulométrica dos pós de *Passiflora edulis* Sims e o histograma de distribuição granulométrica estão apresentados na Tabela 3 e no Gráfico 1.

**Tabela 3** – Frequências percentuais e tamanho médio das partículas na análise granulométrica das folhas de *P. edulis* Sims

Nº do tamis (ABNT/ASTM)	Abertura de malha ( $\mu\text{m}$ )	Massa de pós retidos (g)	Fração retida (%)
0	0	9,91 $\pm$ 3,09	5,47 $\pm$ 0,84
120	125	13,18 $\pm$ 2,55	8,78 $\pm$ 1,70
100	150	19,31 $\pm$ 1,05	12,87 $\pm$ 0,69
80	180	22,68 $\pm$ 0,84	15,11 $\pm$ 0,56
60	250	45,38 $\pm$ 0,45	30,25 $\pm$ 0,30
45	355	39,33 $\pm$ 3,42	26,21 $\pm$ 2,28
25	710	0,23 $\pm$ 0,03	0,15 $\pm$ 0,02
<b>d<sub>médio</sub> (<math>\mu\text{m}</math>)</b>			<b>226 <math>\pm</math> 7,81</b>

Fonte: Do Autor

**Gráfico 1** – Histograma de distribuição granulométrica das folhas de *Passiflora edulis* Sims



Fonte: Do Autor

Os resultados mostram que as partículas do material vegetal encontram-se predominantemente distribuídas no tamis com abertura de malha de 250  $\mu\text{m}$ , representando cerca de 30% de todo material. Dessa forma, segundo a Farmacopeia Brasileira (2010), classificamos o pó das folhas de *Passiflora edulis* Sims como sendo pó moderadamente grosso.

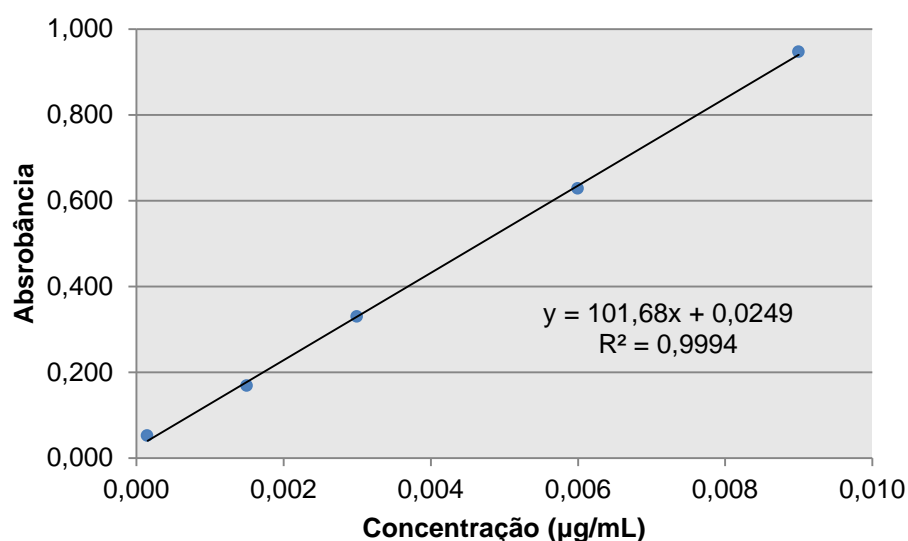
Além disso, o diâmetro médio de partícula do pó das folhas, calculado conforme Equação 8, foi de  $226 \pm 7,81 \mu\text{m}$ .

### 5.3 Análise quantitativa do teor de polifenóis totais

A composição química de extratos secos de folhas de *Passiflora edulis* Sims tem sido extensamente estudada, relatando-se a presença de alcaloides, saponinas e principalmente compostos fenólicos (MULLER et al., 2005; PEREIRA et al., 2004).

Dessa forma, determinou-se, no presente estudo, a concentração de fenóis totais presentes no extrato seco através do método de Folin-Ciocalteu utilizando ácido gálico como padrão (Gráfico 2), cujo resultado encontra-se na Tabela 4.

**Gráfico 2 – Curva analítica do ácido gálico**



Fonte: Do Autor

**Tabela 4** – Conteúdo de polifenóis totais (PT) do extrato seco das folhas de *P. edulis* Sims

Extrato	PT (g EAG/100 g de extrato)
Extrato seco	4,67 (0,115)

**Fonte:** Do Autor

**Legenda:** Resultados expressos em média e desvio padrão, realizados em triplicata. PT = polifenóis totais; EAG = equivalente de ácido gálico.

O princípio do método de Folin-Ciocalteu se baseia na ação redutora dos compostos fenólicos que ao interagirem com o ácido fosfotúngstico-molíbídico levam à formação do complexo azul de molibdênio (IKAWA et al., 2003).

Os compostos fenólicos são substâncias que possuem um anel aromático com um ou mais grupos hidroxilas como substituinte. Nos vegetais, esses compostos constituem um grupo quimicamente heterogêneo, com aproximadamente dez mil compostos. Dentre esses, alguns são solúveis apenas em solventes orgânicos, enquanto outros, como ácidos carboxílicos e glicosídeos, são solúveis em água (ROCKENBACH et al., 2008; SU et al., 2007).

Os polifenóis podem agir como antioxidantes através de sua ação como sequestrante de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio e quelantes de íons de metais de transição *in vitro* (RUDNICKI et al., 2007).

Entre os compostos com ação redutora que poderiam estar presentes nas amostras de extrato seco de *Passiflora edulis* Sims analisadas neste estudo podemos destacar alguns flavonoides tais como, orientina, isoorientina, vitexina, isovitexina, quercetina e rutina (MEDEIROS; KANIS, 2010).

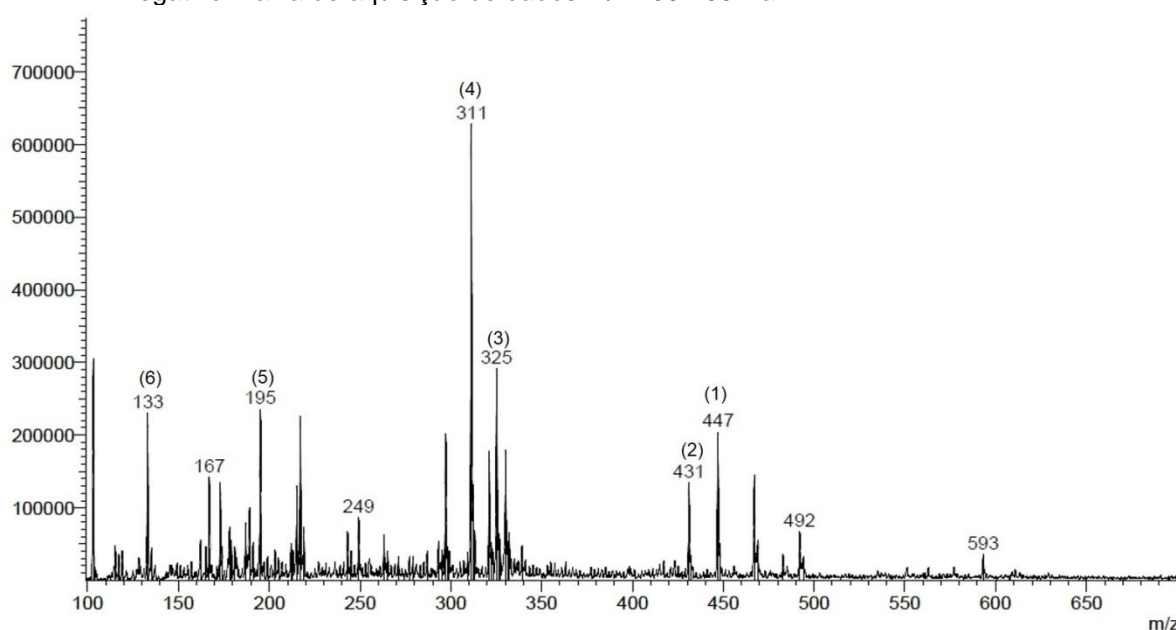
#### 5.4 Análise por FIA-ESI-MS

Além da quantificação do teor de polifenóis do extrato seco das folhas de *P. edulis*, também foi realizada análise da composição química do extrato empregando a técnica de espectrometria de massas com inserção direta da amostra tendo como modo de ionização o *electrospray* (FIA-ESI-MS). O principal objetivo

dessa análise foi obter informações de forma rápida e direta sobre a constituição química do extrato, sem a necessidade de etapas de separações cromatográficas.

A Figura 4 mostra o espectro *full-scan*, no modo negativo, evidenciando os íons precursores das moléculas desprotonadas  $[M-H]^-$  do extrato seco das folhas de *P. edulis*. Os íons MS 447, 431, 325, 311, 195 e 133 foram obtidos e analisados por MS/MS para obtenção dos fragmentos correspondentes aos seus íons precursores (Tabela 5).

**Figura 4** – Espectro de massas *full-scan* do extrato seco das folhas de *P. edulis* analisado em modo negativo. Faixa de aquisição de dados  $m/z$  100-700 Da.



Fonte: Do Autor

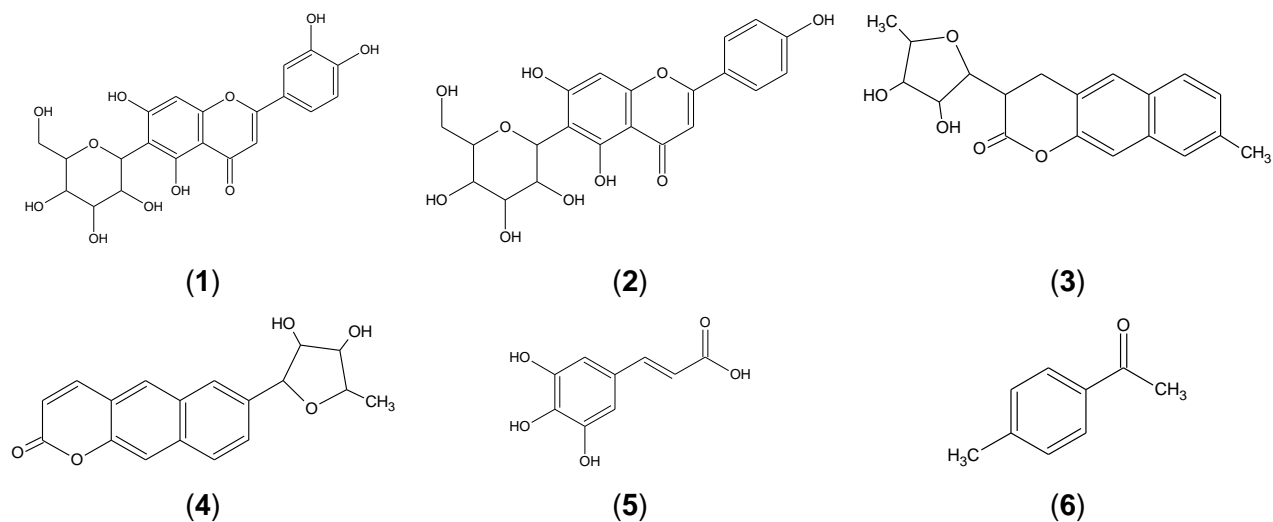
**Tabela 5** – Caracterização por FIA-ESI-MS/MS do extrato seco das folhas de *P. edulis*

Composto	MS ( $m/z$ )	MS/MS ( $m/z$ )
1	447	327; 357; 381
2	431	341; 325; 311
3	325	183
4	311	183
5	195	–
6	133	–

Fonte: Do Autor

Desta forma, a análise do extrato seco das folhas de *P. edulis* por FIA-ESI-MS/MS sugere a presença de seis compostos (Figura 5) de acordo com o conjunto de dados fornecidos pelo espectro de massas e por estudos anteriores segundo Cuyckens e Claeys (2004).

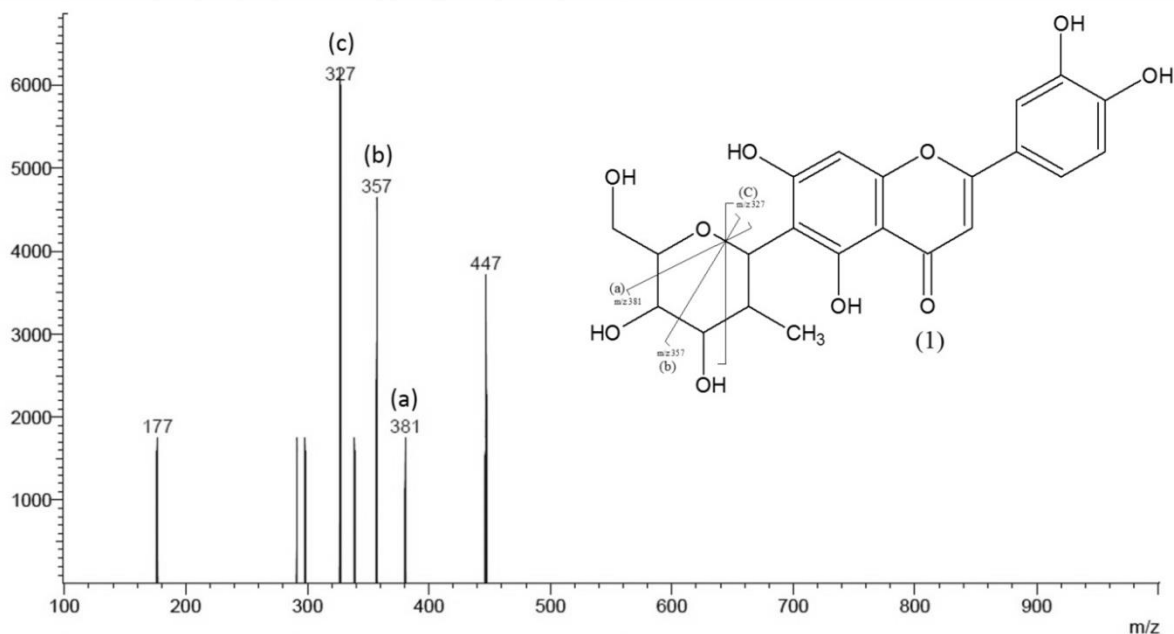
**Figura 5** – Estrutura dos possíveis compostos presentes no extrato seco das folhas de *P. edulis*.



**Fonte:** Do Autor

A análise do espectro de segunda-ordem do íon precursor  $m/z$  447 apresentou os fragmentos  $m/z$  327, 357 e 381 (Figura 6). Após a análise dos dados e comparação com a literatura, sugerimos a presença da molécula correspondente à  $[M-H]^-$  da isoorientina (1).

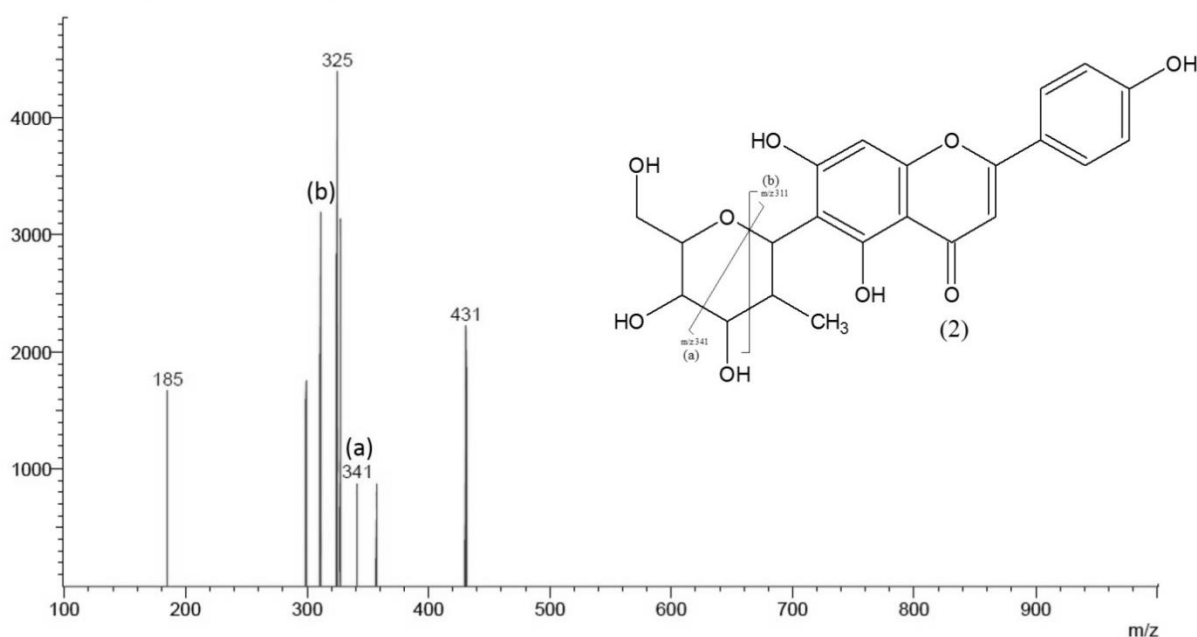
**Figura 6** – Espectro de segunda-ordem do íon precursor  $m/z$  447 utilizando 20 eV de energia de colisão



Fonte: Do Autor

A análise do espectro de segunda-ordem do íon precursor  $m/z$  431 apresentou os fragmentos  $m/z$  341, 325 e 311 (Figura 7). Após a análise dos dados e comparação com a literatura, sugerimos a presença da molécula correspondente à  $[M-H]^-$  da isovitexina (2).

**Figura 7** – Espectro de segunda-ordem do íon precursor  $m/z$  431 utilizando 20 eV de energia de colisão

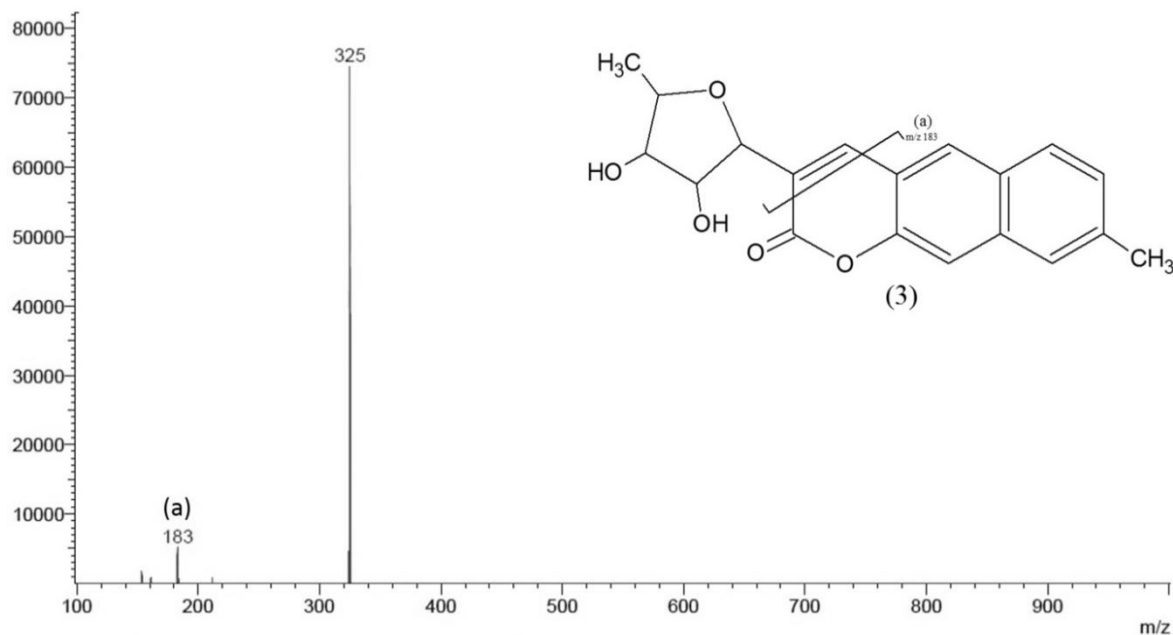


Fonte: Do Autor



A análise do espectro de segunda-ordem do íon precursor  $m/z$  325 apresentou o fragmento  $m/z$  183 (Figura 8). Após a análise dos dados e comparação com a literatura, sugerimos a presença da molécula correspondente à  $[M-H]^-$  de uma cumarina C-glicosilada (**3**).

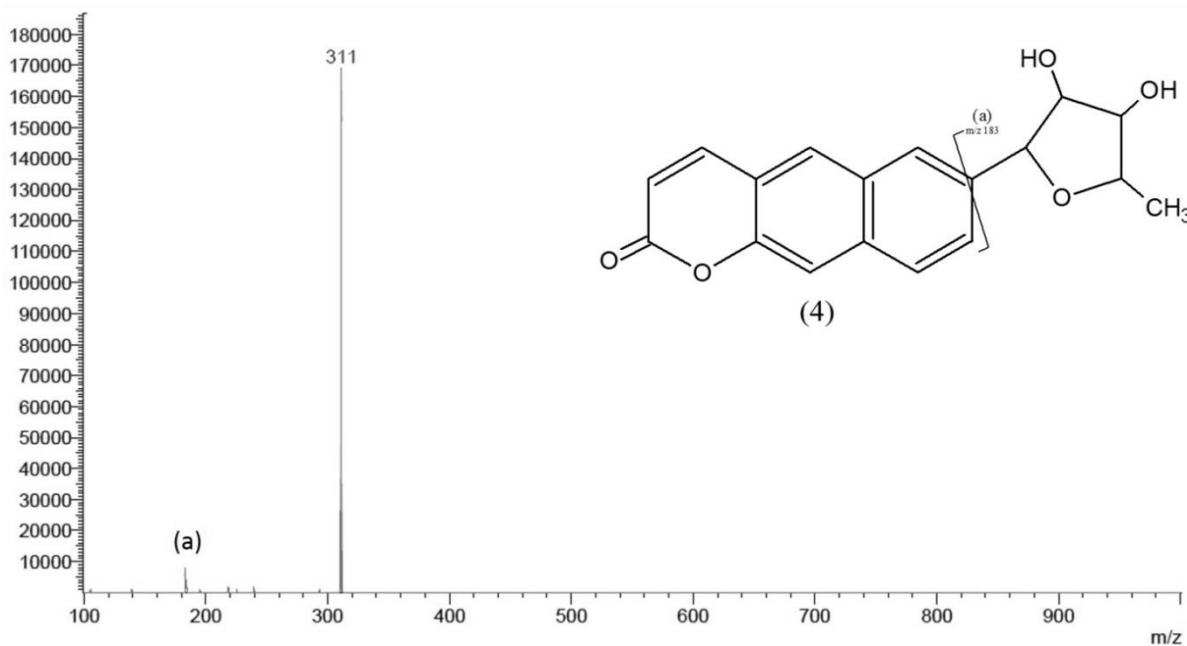
**Figura 8** – Espectro de segunda-ordem do íon precursor  $m/z$  325 utilizando 20 eV de energia de colisão



**Fonte:** Do Autor

A análise do espectro de segunda-ordem do íon precursor  $m/z$  311 apresentou o fragmento  $m/z$  183 (Figura 9). Após a análise dos dados e comparação com a literatura, sugerimos a presença da molécula correspondente à  $[M-H]^-$  de uma cumarina C-glicosilada (**4**).

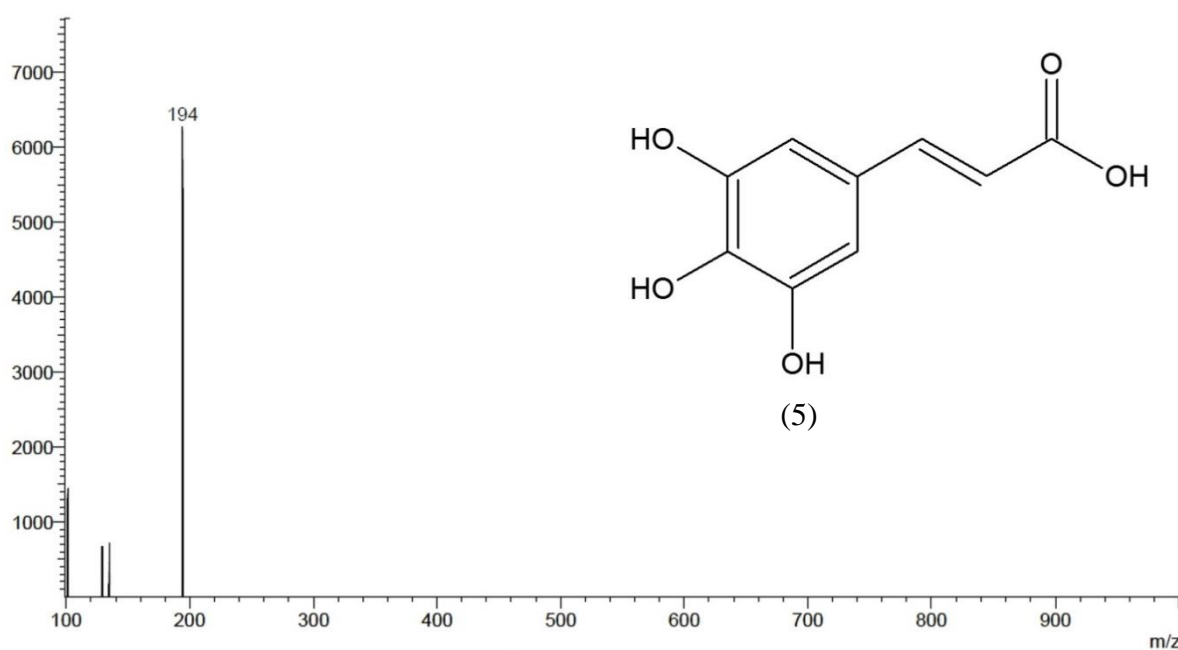
**Figura 9** – Espectro de segunda-ordem do íon precursor  $m/z$  311 utilizando 20 eV de energia de colisão



Fonte: Do Autor

Através da análise dos dados fornecidos pelo espectro de massas do íon precursor  $m/z$  195 e de comparação com a literatura, sugerimos a presença da molécula correspondente à da  $[M-H]^-$  de uma aglicona (5) (Figura 10).

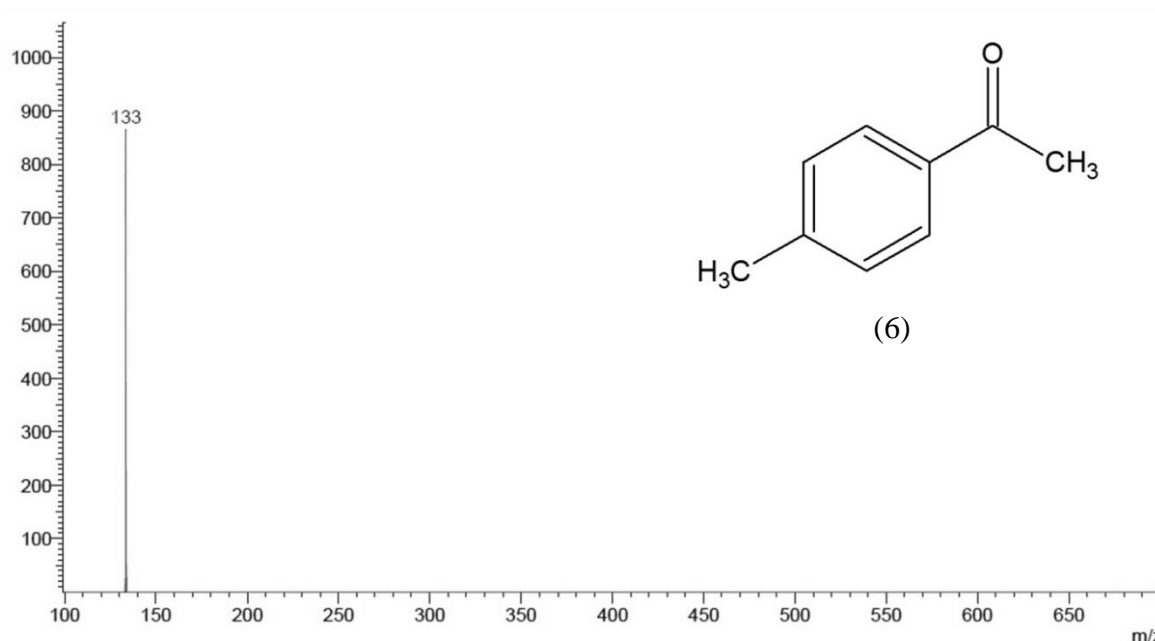
**Figura 10** – Espectro de segunda-ordem do íon precursor  $m/z$  195 utilizando 25 eV de energia de colisão



Fonte: Do Autor

Através da análise dos dados fornecidos pelo espectro de massas do íon precursor  $m/z$  133 e de comparação com a literatura, sugerimos a presença da molécula correspondente à da  $[M-H]^-$  de uma aglicona (**6**) (Figura 11).

**Figura 11** – Espectro de segunda-ordem do íon precursor  $m/z$  133 utilizando 25 eV de energia de colisão



**Fonte:** Do Autor

Com os resultados obtidos neste trabalho, foi possível sugerir, sem necessidade de isolamento, a presença de seis compostos no extrato seco das folhas de *P. edulis*, considerando seus padrões de fragmentações e comparando-os com os dados existentes na literatura.

Dentre esses compostos, isoorientina e isovitexina (Figuras 5.1 e 5.2, respectivamente) são os principais relatados na espécie *P. edulis*, apresentando diversas atividades biológicas (PETRY et al., 2001; ZUCOLOTTO et al., 2012).

Estudos *in vitro* mostram que a isoorientina, assim como luteolina e outros C-glicosídeos derivados da luteolina, são capazes de inibir a síntese de tromboxanos e leucotrienos (ODONTUYA; HOULT; HOUGHTON, 2005). Há também estudos *in vivo* que demonstram atividade da isoorientina sobre o edema de pata de camundongos induzido por carragenina (KUEPELI et al., 2004).

Em relação à isovitexina, estudos mostram que essa substância causa a inibição da expressão de mRNA da óxido nítrico sintase indutiva de macrófagos (RAW 264.7) ativados por LPS (LIN et al., 2005).

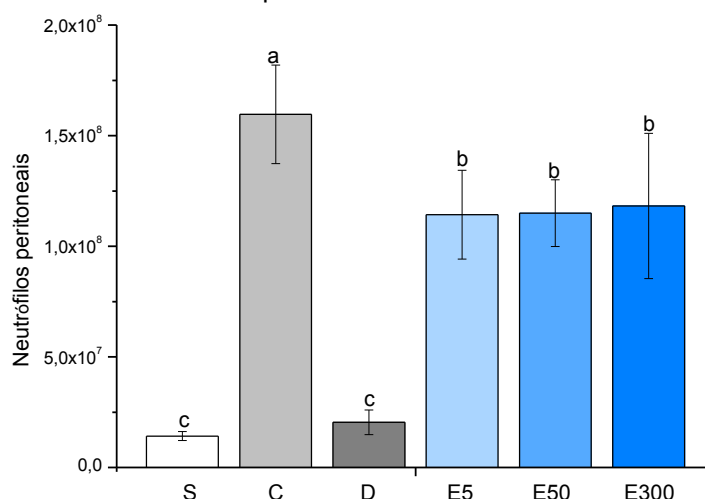
Em relação às cumarinas (Figuras 5.3 e 5.4), estudos mostram que esses compostos possuem potentes propriedades antioxidantes por inibirem a peroxidação lipídica e a geração de  $O_2^{\cdot-}$ , além de interagirem com EO e serem capazes de inibir a síntese de tromboxanos e leucotrienos (KANEKO et al., 2003).

Além disso, as agliconas derivadas de ácidos fenólicos (Figuras 5.5 e 5.6) também possuem potentes propriedades antioxidantes. Muitos desses compostos são largamente utilizados na conservação de alimentos lipídicos, substituindo antioxidantes sintéticos, por aumentarem a vida útil de muitos produtos entre 15 e 200% (SOARES, 2002).

### 5.5 Recrutamento e viabilidade de neutrófilos peritoneais

Após indução da inflamação com injeção de carragenina via intraperitoneal, os neutrófilos foram obtidos por lavagem e o número de células recrutadas está representado no Gráfico 3.

**Gráfico 3** – Efeito dos diferentes tratamentos sobre o recrutamento de neutrófilos peritoneais



**Fonte:** Do Autor

**Légenda:** Os resultados representam a média e o desvio padrão de 10 determinações. S = salina; C = carragenina; D = dexametasona 5 mg/kg; E5, E50 e E300 = extrato nas doses de 5, 50 e 300 mg/kg, respectivamente. Letras diferentes indicam diferença estatística ( $p < 0,05$ ).

A viabilidade celular, avaliada pelo teste de exclusão por azul de Tripán para obtenção de 100% de células viáveis em todas as análises, foi maior/igual que 95% em todos os grupos.

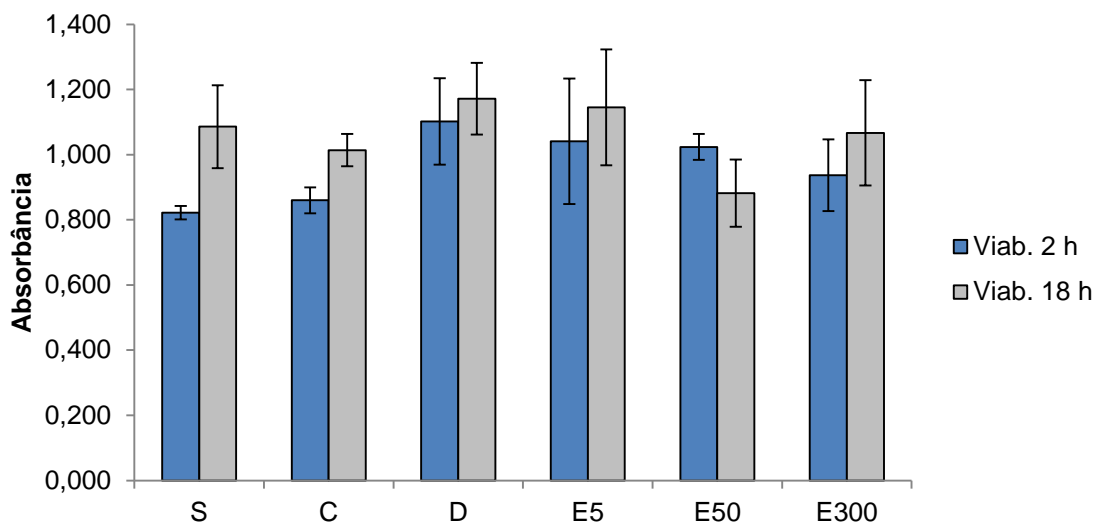
Conforme esperado, o tratamento com dexametasona foi capaz de reduzir significativamente o número de neutrófilos recrutados para o local da inflamação, obtendo-se resultados similares aos do grupo salina. Isso acontece porque esse medicamento pertence à classe dos glicocorticoides, conhecidos por seus efeitos anti-inflamatórios e imunossupressores. Dentre as ações da dexametasona destaca-se a repressão, caracterizada pela diminuição da saída de neutrófilos dos vasos sanguíneos para os sítios inflamatórios devido à transcrição diminuída de fatores de adesão celular e de citocinas pró-inflamatórias (RANG et al., 2003).

Em relação às diferentes doses testadas do extrato de *P. edulis*, podemos considerar que o extrato é antiquimiotático, já que sua administração diminuiu significativamente o número de neutrófilos recrutados para o foco inflamatório.

Diversos estudos demonstram que, embora o líquido extrator utilizado seja diferente, o extrato aquoso das folhas de *P. edulis* também é capaz de diminuir o recrutamento de neutrófilos em modelo de pleurisia induzida por carragenina em camundongos (BENINCÁ et al., 2005; MONTANHER et al., 2007; VARGAS et al., 2007). Dessa forma, podemos sugerir que os compostos presentes tanto no extrato hidroetanólico quanto no extrato aquoso são capazes de diminuir o recrutamento de neutrófilos para o foco inflamatório.

Os resultados da avaliação da viabilidade celular pela redução do sal de MTT estão apresentados no Gráfico 4 e mostram que o tratamento com o extrato seco das folhas de *P. edulis* não foi capaz de alterar a viabilidade de neutrófilos peritoneais de ratos nos tempos avaliados.

**Gráfico 4** – Viabilidade de neutrófilos peritoneais de ratos submetidos aos diferentes tratamentos



**Fonte:** Do Autor

**Legenda:** Os resultados representam a média e o desvio padrão de uma análise realizada em triplicata. S = salina; C = carragenina; D = dexametasona; 5 mg/kg; E5, E50 e E300 = extrato nas doses de 5, 50 e 300 mg/kg, respectivamente.

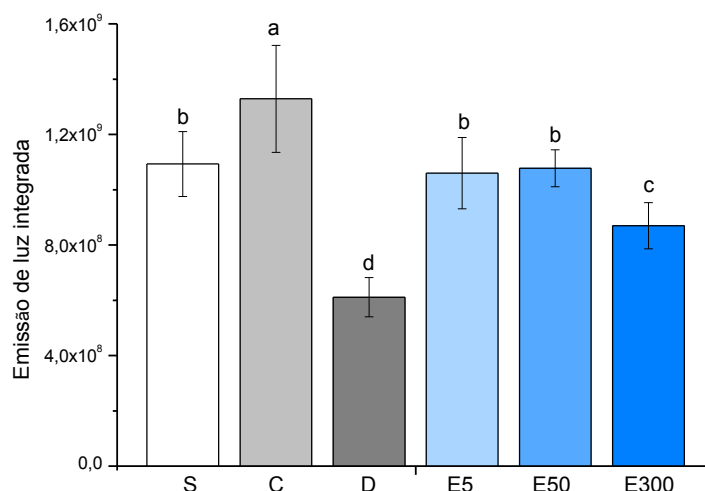
## 5.6 Produção de EO e atividade do sistema NADPH oxidase

A influência do extrato seco das folhas de *P. edulis* sobre a produção de EO pelos neutrófilos foi analisada por meio da técnica de quimioluminescência dependente de luminol. Durante o ensaio, o luminol interage com as EO formadas durante o *burst* respiratório formando o ânion aminoftalato (eletronicamente excitado) que, ao retornar ao seu estado basal, emite luz (MARTINS, 2013).

Como ativador dos neutrófilos, foi utilizado o PMA, uma substância sintética conhecida por sua ação promotora de tumores. Ele ativa o *burst* respiratório nos neutrófilos sem se ligar a um receptor de membrana, mimetizando o diacilglicerol, um ativador fisiológico da proteína quinase C que está diretamente relacionada com os mecanismos de degranulação e produção de EO (DECOURSEY; LIGETI, 2005).

Os resultados obtidos (Gráfico 5) mostram que o tratamento com o extrato seco das folhas de *P. edulis* diminuiu significativamente a produção de EO pelos neutrófilos, principalmente na dose de 300 mg/kg.

**Gráfico 5** – Efeito dos diferentes tratamentos sobre a produção de EO em neutrófilos



**Fonte:** Do Autor

**Legenda:** Os resultados representam a média e o desvio padrão de 6-8 determinações obtidas pela oxidação do luminol 1 mM por neutrófilos peritoneais de ratos ( $1 \times 10^6$  células viáveis por teste). S = salina; C = carragenina; D = dexametasona 5 mg/kg; E5, E50 e E300 = extrato nas doses de 5, 50 e 300 mg/kg, respectivamente. Letras diferentes indicam diferença estatística ( $p < 0,05$ ).

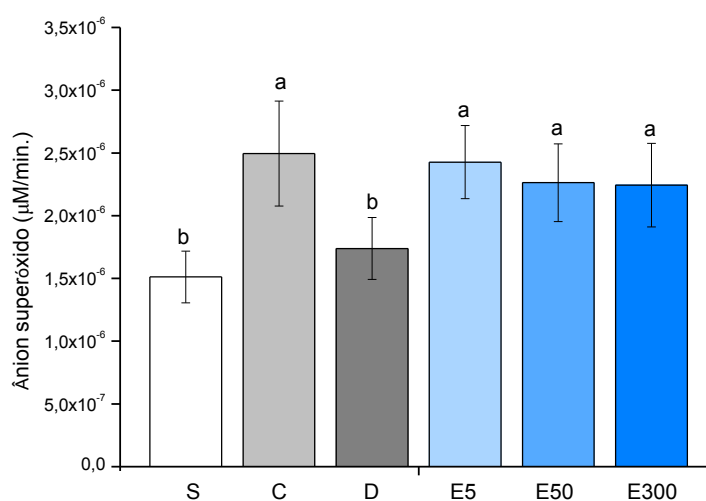
As EO atuam como mediadores fisiológicos de respostas celulares e reguladores de expressão gênica, exercendo importante papel no controle da resposta imune. No entanto, o desequilíbrio entre a produção de EO e as defesas antioxidantes pode levar ao estresse oxidativo, que por sua vez tem sido considerado um importante fator patológico em doenças neurodegenerativas e autoimunes, bem como em doenças metabólicas, câncer e envelhecimento (SÉFORA-SOUSA; DE ANGELIS-PEREIRA, 2013).

Tendo em vista os resultados obtidos na análise dos fito-constituintes do extrato em estudo, bem como dados de estudos anteriores que demonstraram que o extrato hidroetanólico seco das folhas de *P. edulis* apresentou uma significativa atividade sequestrante de radicais DPPH (MARTINS, 2013), os resultados observados no presente estudo poderiam ser atribuídos à presença de compostos fenólicos neste extrato. Nesse sentido, diversos mecanismos têm sido propostos para justificar a ação de antioxidantes sobre o processo inflamatório, entre os quais destacam-se a modulação da atividade de determinados fatores de transcrição, levando à redução da expressão de citocinas inflamatórias e de moléculas de adesão, bem como ao

aumento da atividade de enzimas antioxidantes (SÉFORA-SOUSA; DE ANGELIS-PEREIRA, 2013).

Como o teste de quimioluminescência quantifica a produção de diferentes oxidantes, realizou-se o ensaio de redução do citocromo C, o qual quantifica especificamente a produção de  $O_2^{\cdot-}$  pelo sistema NADPH oxidase. Como mostram os resultados apresentados no Gráfico 6, o tratamento com o extrato seco das folhas de *P. edulis* não foi capaz de alterar a produção de  $O_2^{\cdot-}$ .

**Gráfico 6** – Efeito dos diferentes tratamentos sobre a produção de  $O_2^{\cdot-}$  pelo sistema NADPH oxidase



**Fonte:** Do Autor

**Legenda:** Os resultados representam a média e o desvio padrão de 6-8 determinações obtidas pela redução do citocromo C 100 µM por neutrófilos peritoneais de ratos ( $2 \times 10^6$  células viáveis por teste). S = salina; C = carragenina; D = dexametasona 5 mg/kg; E5, E50 e E300 = extrato nas doses de 5, 50 e 300 mg/kg, respectivamente. Letras diferentes indicam diferença estatística ( $p < 0,05$ ).

A discrepância entre os resultados obtidos por meio da técnica de quimioluminescência e da técnica que utiliza como princípio a redução do citocromo C pode ser justificada pelo fato de que a quimioluminescência dependente de luminol não detecta somente  $O_2^{\cdot-}$ . Tem sido relatado que  $ONOO^{\cdot-}$  e  $\cdot OH$ , assim como  $HOCl$ , também podem oxidar o luminol, contribuindo para a emissão de luz em sistema celular (MYHRE et al., 2003).

Dessa forma, os dados apresentados mostram que o extrato seco das folhas de *P. edulis* não alterou a ativação do sistema NADPH oxidase, mas interferiu na formação de subprodutos gerados a partir da ativação desse complexo.

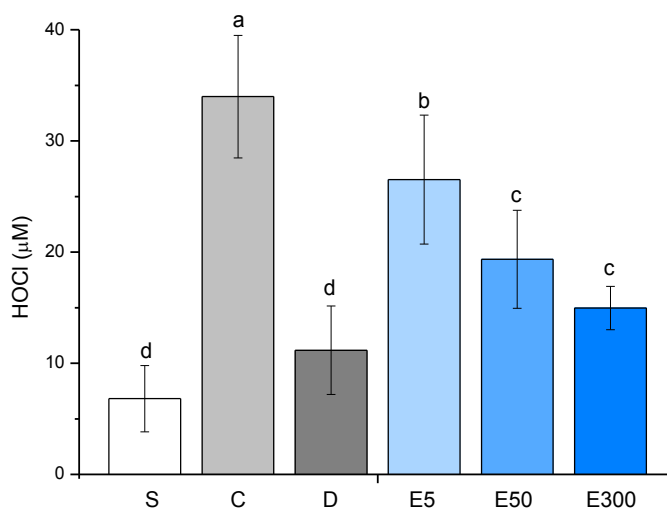


## 5.7 Produção de HOCl

Durante o processo inflamatório, além da produção de EO pelos neutrófilos, ocorre também a degranulação enzimática, que juntos completam a bateria microbicida para a atividade de defesa desempenhada por essas células. Dentre as enzimas liberadas está a MPO.

Com o intuito de verificar o efeito do extrato seco das folhas de *P. edulis* sobre a produção efetora dos neutrófilos independente de oxigênio, a produção de HOCl avaliada através do ensaio de oxidação do TNB está apresentada no Gráfico 7 e os resultados obtidos mostram que houve diminuição da produção de HOCl nos grupos de animais tratados com extrato quando comparado ao grupo carragenina, sendo este efeito dose dependente.

**Gráfico 7** – Efeito dos diferentes tratamentos sobre a produção de HOCl



**Fonte:** Do Autor

**Legenda:** Os resultados representam a média e o desvio padrão de 5-6 determinações obtidas pela oxidação do TNB 200 µM por neutrófilos peritoneais de ratos ( $3 \times 10^6$  células viáveis por teste). S = salina; C = carragenina; D = dexametasona 5 mg/kg; E5, E50 e E300 = extrato nas doses de 5, 50 e 300 mg/kg, respectivamente. Letras diferentes indicam diferença estatística ( $p < 0,05$ ).

Tem sido demonstrado que, em neutrófilos, a emissão de luz na presença de luminol pode ser altamente influenciada pelo sistema MPO-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-HOCl (DAHLGREN; KARLSSON, 1999). De acordo com Bylund et al. (2010), neutrófilos deficientes em MPO apresentam uma resposta reduzida nessa técnica, sendo esta,

portanto, dependente da enzima MPO. Além disso, a resposta do neutrófilo a um estímulo solúvel, como o PMA, converte uma alta taxa do oxigênio consumido no *burst* respiratório (valores entre 28-72%) para produção de HOCl (KLEBANOFF et al., 2013). Assim, os resultados da produção de HOCl condizem com os resultados obtidos no teste de quimioluminescência dependente de luminol (Gráfico 5) e sugerem que a ação do extrato em estudo poderia estar relacionada a uma possível modulação da atividade de MPO em neutrófilos de animais tratados com carragenina.

Estudos demonstram que o extrato aquoso das folhas de *P. edulis* é capaz de diminuir a atividade da enzima MPO (BENINCÁ et al., 2007; MONTANHER et al., 2007; VARGAS et al., 2007). Entretanto, nesses estudos, a atividade dessa enzima é utilizada como um marcador da migração de neutrófilos. Como os mesmos autores obtiveram um decréscimo no número de células recrutadas, era de se esperar que a atividade de MPO também estivesse diminuída.

Por outro lado, Zeraik et al. (2011) demonstraram que o extrato das cascas do fruto de *P. edulis* são mais eficazes em inibir a atividade de MPO que o extrato da polpa do fruto. Além disso, nesse estudo, os autores também demonstraram que o composto isoorientina, presente em maior concentração na casca do que na polpa do fruto do maracujá, também é capaz de inibir a atividade de MPO, seja por fixação ao sítio ativo da enzima ou de um aminoácido da estrutura proteica, ou ainda, por alteração da estrutura da enzima.

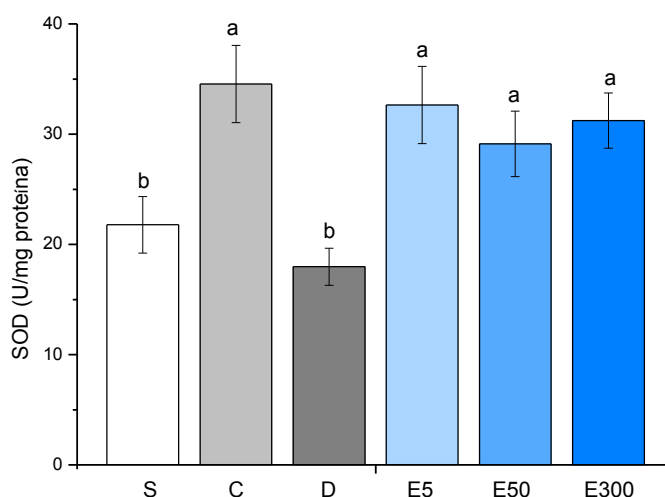
A análise por espectro de massas do extrato seco das folhas de *P. edulis* também demonstrou a presença do composto isoorientina (Figura 6). Desta forma, como observamos uma diminuição na produção de HOCl de uma maneira dose dependente, podemos sugerir que essa atividade estaria relacionada com a presença de isoorientina no extrato em estudo.

## **5.8 Atividade das enzimas antioxidantes SOD, CAT e GPx**

No presente trabalho, analisamos as atividades das enzimas SOD, CAT e GPx em neutrófilos, consideradas as principais enzimas do sistema de defesa antioxidante enzimático.

Os resultados apresentados no Gráfico 8 mostram que houve um aumento da atividade de SOD em neutrófilos de animais tratados com carragenina, porém o tratamento com o extrato seco das folhas de *P. edulis* não foi capaz de alterar a atividade dessa enzima, nas células analisadas. Considerando que a SOD atua na primeira linha de defesa contra a produção de  $O_2^{\cdot-}$  pelo sistema NADPH oxidase, estes resultados corroboram com os dados apresentados no Gráfico 6, no qual observamos que o tratamento com o extrato não alterou a produção de  $O_2^{\cdot-}$ .

**Gráfico 8** – Efeito dos diferentes tratamentos sobre a atividade de SOD



**Fonte:** Do Autor

**Legenda:** Os resultados representam a média e o desvio padrão de 5-6 determinações. S = salina; C = carragenina; D = dexametasona 5 mg/kg; E5, E50 e E300 = extrato nas doses de 5, 50 e 300 mg/kg, respectivamente. Letras diferentes indicam diferença estatística ( $p < 0,05$ ).

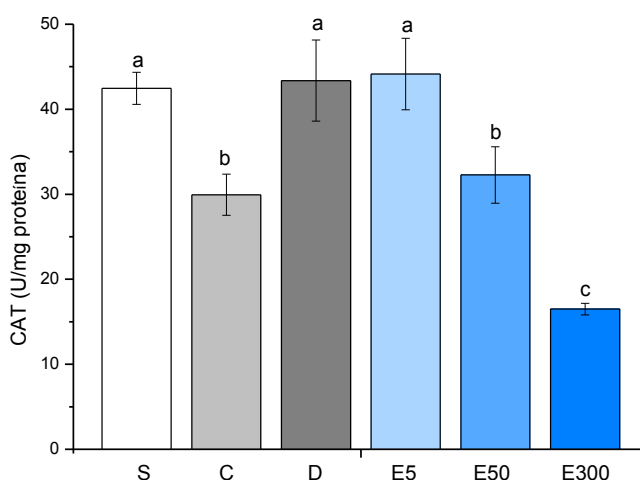
As enzimas CAT e GPx atuam em conjunto com SOD para manter os níveis de  $H_2O_2$  resultante da dismutação do  $O_2^{\cdot-}$ . Essa dismutação facilita a distribuição de  $H_2O_2$  através da difusão celular (já que o  $O_2^{\cdot-}$ , por possuir uma carga negativa, é impermeável à membrana), reduzindo seus efeitos pela ação das enzimas catalisadoras de  $H_2O_2$ , como CAT e GPx. Por outro lado, se as ações dessas enzimas antioxidantes não estão orquestradas, há uma produção exacerbada de  $H_2O_2$  pela atividade da SOD, o que facilitaria a produção de  $\cdot OH$  e seus consequentes danos (JOHNSON; GIULIVI, 2005).

Para remoção dos níveis de  $H_2O_2$ , a enzima CAT desempenha um papel importante nos peroxissomos, organelas em que está localizada, enquanto GPx

possui uma atividade importante no citosol (ANTUNES; HAN; CADENAS, 2002). Contudo, conforme apresentado por Halliwell e Gutteridge (2007, p. 123), “o  $H_2O_2$  produzido em qualquer lugar da célula poderia se difundir para os peroxissomos para ser removido (...). Entretanto, humanos e animais podem sobreviver sem CAT e camundongos sem GPx”. Isso demonstra a importante interação entre essas duas enzimas para o controle dos níveis de  $H_2O_2$ .

Os resultados apresentados nos Gráficos 9 e 10 mostram, respectivamente, uma redução na atividade de CAT e GPx em neutrófilos de animais tratados com carragenina em comparação aos animais do grupo tratado com solução salina. Porém, o tratamento com o extrato seco das folhas de *P. edulis* levou à redução da atividade de CAT e ao aumento da atividade de GPx em neutrófilos de ratos quando comparados ao grupo de animais tratados apenas com carragenina.

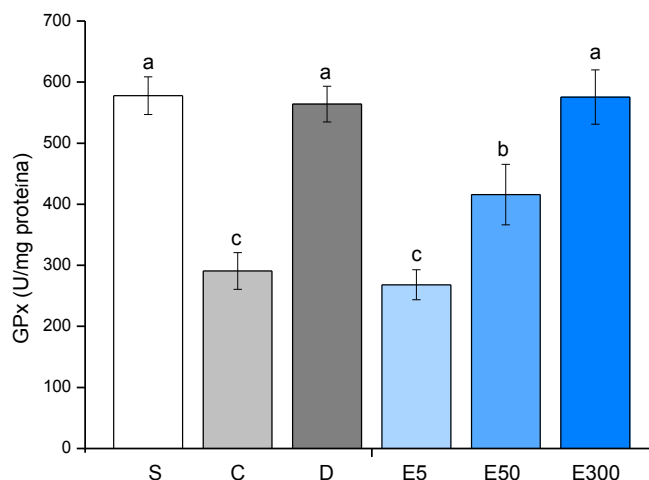
**Gráfico 9** – Efeito dos diferentes tratamentos sobre a atividade de CAT



**Fonte:** Do Autor

**Legenda:** Os resultados representam a média e o desvio padrão de 5-6 determinações. S= salina; C = carragenina; D = dexametasona 5 mg/kg; E5, E50 e E300 = extrato nas doses de 5, 50 e 300 mg/kg, respectivamente. Letras diferentes indicam diferença estatística ( $p < 0,05$ ).

**Gráfico 10** – Efeito dos diferentes tratamentos sobre a atividade de GPx



**Fonte:** Do Autor

**Legenda:** Os resultados representam a média e o desvio padrão de 5-6 determinações. S= salina; C = carragenina; D = dexametasona 5 mg/kg; E5, E50 e E300 = extrato nas doses de 5, 50 e 300 mg/kg, respectivamente. Letras diferentes indicam diferença estatística ( $p < 0,05$ ).

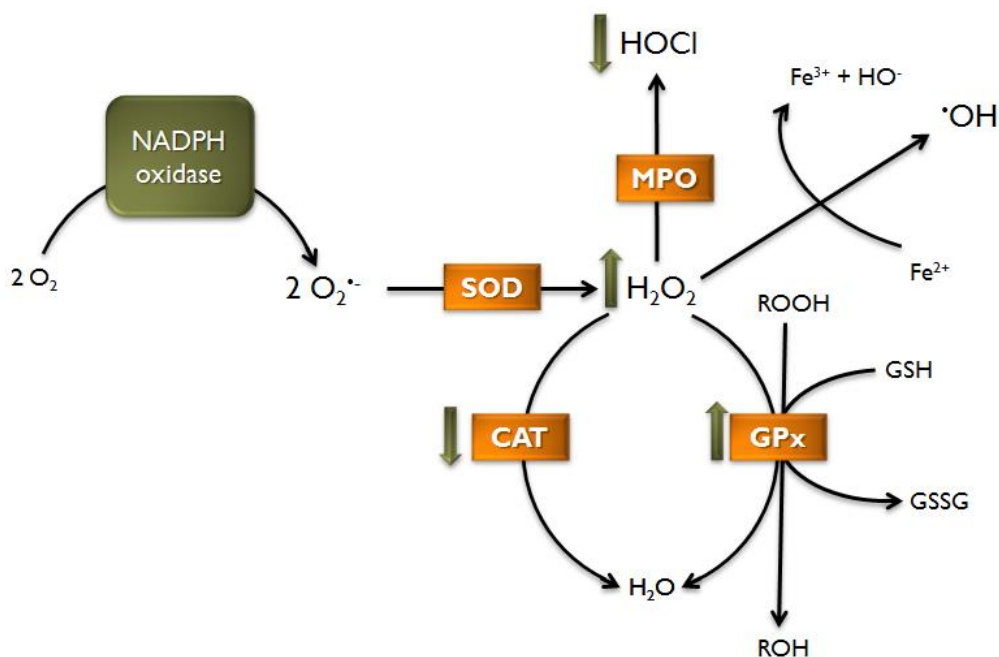
Estudo realizado por Krych e Gebicka (2013) mostrou que os flavonoides são capazes de inibir a atividade de CAT de fígado bovino *in vitro*. O efeito inibidor desses compostos deve-se, em parte, aos grupos hidroxilas presentes nessas moléculas. A formação de ligações de hidrogênio entre a enzima CAT e os flavonoides causa uma mudança conformacional da estrutura dessa enzima, o que impede a reação de  $H_2O_2$  com o grupamento heme da CAT.

A diminuição da atividade de CAT observada, principalmente, na dose de 300 mg/kg de *P. edulis* resultaria em um acúmulo de  $H_2O_2$  nos neutrófilos. Isso poderia favorecer a formação de  $\cdot OH$ , uma espécie altamente reativa e danosa, formada através da reação de  $H_2O_2$  com íons  $Fe^{2+}$  (reação de Fenton), conforme mostrado no esquema da Figura 12. O  $\cdot OH$  é a EO mais deletéria ao organismo, pois, devido à sua meia-vida muito curta, dificilmente pode ser sequestrado *in vivo*. Sua reação ocorre assim que ele é formado, causando danos ao DNA, RNA, proteínas, lipídios e membranas celulares (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007; LUBOS; LOSCALZO; HANDY, 2011).

Portanto, o aumento nos níveis de  $H_2O_2$  representa um estado de estresse oxidativo, podendo se tornar um risco à célula. Um mecanismo de

compensação da diminuição da atividade de CAT (Gráfico 9) seria o aumento da atividade de GPx (Gráfico 10).

**Figura 12** – Modelo esquemático do efeito do extrato sobre o metabolismo oxidativo de neutrófilos



Fonte: Do Autor

A GPx é considerada uma das enzimas mais efetoras em reduzir o estresse oxidativo pela conversão de GSH em GSSG com a concomitante redução de  $H_2O_2$  e peróxidos orgânicos (LUBOS; LOSCALZO; HANDY, 2011). Como essa enzima também utiliza peróxidos orgânicos como substrato (representados pela sigla ROOH no modelo da Figura 12), o aumento na atividade de GPx pode ser relacionado à diminuição da peroxidação lipídica.

O dano oxidativo a lipídios é um processo complexo que envolve a interação de espécies reativas com ácidos graxos poli-insaturados das membranas celulares, resultando na formação de hidro ou lipoperóxidos. Essas espécies são altamente reativas e podem dar início a uma cascata oxidativa, que resulta em desorganização estrutural e consequente perda da seletividade das membranas, podendo levar à morte celular (TSANG; CHUNG, 2009).

Souza et al. (2012) demonstraram redução da peroxidação lipídica no plasma de ratos Wistar que receberam suco de maracujá duas vezes por dia durante 28 dias. Além disso, estudo realizado por Silva et al. (2013) demonstrou que o

extrato aquoso das folhas de *P. edulis* foi capaz de reduzir a peroxidação lipídica no fígado em 20% em relação ao grupo controle. Dessa forma, observa-se que os compostos presentes tanto nas folhas quanto no fruto do maracujá são importantes para neutralizar os danos causados pela peroxidação lipídica.

Outra forma importante de eliminação do excesso de  $H_2O_2$  é através da ação da enzima MPO, utilizando-o como substrato para produção de HOCl. Conforme apresentado no Gráfico 7, a atividade de MPO reduziu de acordo com o aumento da dose do extrato seco das folhas de *P. edulis*.

Dessa forma, podemos sugerir a seguinte hipótese em relação ao efeito do extrato sobre as atividades das enzimas CAT, GPx e MPO: a inibição da enzima CAT resultaria em aumento dos níveis de  $H_2O_2$  que, por sua vez, induziria uma resposta adaptativa levando ao aumento da atividade de GPx para sua eliminação (Figura 12). Se a regulação sobre a enzima GPx for suficiente para reduzir o substrato da MPO, esta ação contribuiria para a diminuição da produção de HOCl.

Por outro lado, como mencionado anteriormente, Zeraik et al. (2011) demonstraram que a isoorientina é capaz de inibir a atividade de MPO. Dessa forma, outra hipótese sobre a ação do extrato seco das folhas de *P. edulis* seria a inibição das enzimas MPO e CAT, o que resultaria no aumento dos níveis de  $H_2O_2$  e, portanto, modulação da atividade da enzima GPx. Entretanto, para confirmação de tais hipóteses, novos estudos são necessários.

De uma forma geral, como as EO podem potencializar o processo inflamatório, nossos resultados sugerem que o potencial anti-inflamatório do extrato seco das folhas de *P. edulis* Sims poderia estar relacionado não somente à diminuição do recrutamento de neutrófilos como também à modulação do metabolismo oxidativo dessas células. Dessa forma, o extrato ajudaria a prevenir a permanência do processo inflamatório.

## 6 CONCLUSÕES

Diante dos resultados obtidos no presente estudo com o extrato seco das folhas de *P. edulis*, podemos observar que:

- a) A análise por espectro de massas sugeriu a presença de seis compostos, dentre eles isoorientina e isovitexina, principais constituintes dessa espécie;
- b) O extrato reduziu o recrutamento de neutrófilos para o foco inflamatório;
- c) O extrato não interferiu na viabilidade de neutrófilos peritoneais de ratos;
- d) O extrato não alterou a ativação do sistema NADPH oxidase, mas apresentou atividade antioxidante modulando os subprodutos formados a partir da ativação desse sistema;
- e) O extrato reduziu a atividade da enzima MPO, refletida pela diminuição da produção de HOCl;
- f) O extrato modulou a resposta de enzimas antioxidantes reduzindo a atividade de CAT, aumentando a atividade de GPx e não alterando a atividade de SOD.



## REFERÊNCIAS

AEBI, H. Catalase *in vitro*. **Methods in Enzymology**, v. 105, p. 121-126, 1984.

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

ANTUNES, F.; HAN, D.; CADENAS, E. Relative contributions of heart mitochondria glutathione peroxidase and catalase to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> detoxification in *in vivo* conditions. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 33, n. 9, p. 1260-1267, 2002.

BABIOR, B. M. Phagocytes and oxidative stress. **The American Journal of Medicine**, v. 109, p. 33-44, 2000.

BARNI, S. T.; CECHINEL FILHO, V.; COUTO, A. G. Caracterização química e tecnológica das folhas, caules e planta inteira da *Ipomoea pes-caprae* (L.) R. Br., Convolvulaceae, como matéria-prima farmacêutica. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 4, p. 865-870, 2009.

BENINCÁ, J. P. et al. Evaluation of the anti-inflammatory efficacy of *Passiflora edulis*. **Food Chemistry**, v. 104, n. 3, p. 1097-1105, 2007.

BERALDO, J.; KATO, E. T. M. Morfoanatomia de folhas e caules de *Passiflora edulis* Sims, Passifloraceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 3, p. 233-239, 2008.

BORGES, D. B. et al. Comparação das metodologias da Farmacopeia Brasileira para determinação de água em matérias-primas vegetais, e validação da determinação de água em analisador de umidade para *Calendula officinalis* L., *Foeniculum vulgare* Miller, *Maytenus ilicifolia* Mart. ex. Reissek e *Passiflora alata* Curtis. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 3, p. 229-236, 2005.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1/2, p. 248-254, 1976.

BRASIL. **Farmacopeia Brasileira**. 5. ed. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Direção de Administração e Finanças. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. **RENISUS – Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS**. 2009. Disponível em: <<http://www.unifal-mg.edu.br/hpmed/files/RENISUS.pdf>>. Acesso em: 19 dez. 2014.

BYLUND, J. et al. Intracellular generation of superoxide by the phagocyte NADPH oxidase: How, where, and what for? **Free Radical Biology & Medicine**, v. 49, p.1834-1845, 2010.

CALIXTO, J. B. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America: a personal view. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, p.131-134, 2005.

CALIXTO, J. B.; OTUKI, M. F.; SANTOS, A. R. S. Anti-inflammatory compounds of plant origin. Part I. Action on arachidonic acid pathway, nitric oxide and nuclear factor  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B). **Planta Medica**, v. 69, p. 973-983, 2003.

CALIXTO, J. B.; SIQUEIRA JÚNIOR, J. M. Desenvolvimento de medicamentos no Brasil: desafios. **Gazeta Médica da Bahia**, v. 78, p. 98-106, 2008.

CAROCHO, M.; FERREIRA, I. C. F. R. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. **Food and Chemical Toxicology**, v. 51, p. 15-25, 2013.

CHAU C. F.; HUANG Y. L. Effects of the insoluble fiber derived from *Passiflora edulis* seed on plasma and hepatic lipids and fecal output. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 49, p. 786-790, 2005.

CHELIKANI, P.; FITA, I.; LOEWEN, P. C. Diversity of structures and properties among catalases. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 61, p. 192-208, 2004.

COUSSENS, L. M.; WERB, Z. Inflammation and cancer. **Nature**, v. 420, p. 860-867, 2002.

CUYCKENS, F.; CLAEYS, M. Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 39, p. 1-5, 2004.

DAHLGREN, C.; KARLSSON, A. Respiratory burst in human neutrophils. **Journal of Immunological Methods**, v. 232, p. 3-14, 1999.

DEBY-DUPONT, G.; DEBY, C.; LAMY, M. Neutrophil myeloperoxidase revisited: it's role in health and disease. **Intensivmed**, v. 36, p. 500-513, 1999.

DECOURSEY, T. E.; LIGETI, E. Regulation and termination of NADPH oxidase activity. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 62, n. 19, p. 2173-2193, 2005.

DE-PARIS, F. et al. Pharmacochemical study of aqueous extracts of *Passiflora alata* Dryander and *Passiflora edulis* Sims. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 21, p. 5-8, 2002.

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

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.

EKMEKCI, O. B. et al. Iron, nitric oxide, and myeloperoxidase in asthmatic patients. **Biochemistry (Moscow)**, v. 69, n. 5, p. 462-467, 2004.

FAVACHO, H. A. S. **Caracterização fitoquímica e avaliação da atividade anti-inflamatória e antinociceptiva do óleo fixo de *Euterpe oleracea* mart.** 2009. 79f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências da Saúde, Belém, 2009.

FERNANDES, P. Antibacterial discovery and development – the failure of success? **Nature Biotechnonology**, v. 24, p. 1497-1503, 2006.

FERRERES, F. et al. New C-deoxyhexosyl flavones and antioxidant properties of *Passiflora edulis* leaf extract. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 10187-10193, 2007.

FLANNAGAN, R. S.; JAUMOILLÉ, V.; GRINSTEIN, S. The cell biology of phagocytosis. **Annual Review of Pathology**, v. 7, p. 49-86, 2012.

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, n. 3, p. 55-65, 2006.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in biology and medicine**. 4.ed. New York: Oxford University, 2007.

HANADA, T.; YOSHIMURA, A. Regulation of cytokine signaling and inflammation. **Cytokine Growth Factor Reviews**, v. 13, p. 413–421, 2002.

IKAWA, M. et al. Utilization of Folin-Ciocalteu phenol reagent for the detection of certain nitrogen compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 1811-1815, 2003.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Produção Agrícola Municipal – Culturas temporárias e permanentes**. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/>>. Acesso em: 02 jan. 2015.

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

JOHNSON, F.; GIULIVI, C. Superoxide dismutases and their impact upon human health. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 26, p. 340-352, 2005.

JONES, O. T. G.; HANCOCK, J. T. Assays of plasma membrane NADPH oxidase. **Methods in Enzymology**, v. 223, p. 222–229, 1994.

KANEKO, T.; BABA, N.; MATSUO, M. Protection of coumarins against linoleic acid hydroperoxide-induced cytotoxicity. **Chemico-Biological Interactions**, v. 142, p. 239-254, 2003.

KAPLAN, M. et al. Use of herbal preparations in the treatment of oxidant-mediated inflammatory disorders. **Complementary Therapies in Medicine**, v. 15, p. 207-216, 2007.

KETTLE, A. et al. Measuring chlorine bleach in biology and medicine. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1840, p. 781-793, 2014.

KETTLE, A. J.; WINTERBOURN, C. C. Assays for the chlorination activity of myeloperoxidase. **Methods in Enzymology**, v. 233, p. 206-220, 1994.

KHLEBNIKOV, A. I. et al. Improved quantitative structure-activity relationship models to predict antioxidant activity of flavonoids in chemical, enzymatic, and cellular systems. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 15, n. 4, p. 1748-1770, 2007.

KLEBANOFF, S. J. et al. Myeloperoxidase: a front-line defender against phagocytosed microorganisms. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 93, p. 185-198, 2013.

KRAHN, C.L. et al. Avaliação do efeito da casca desidratada do maracujá (*Passiflora edulis*) e seu extrato aquoso na redução da glicemia em ratos diabéticos induzidos por aloxano. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 89, p. 32-34, 2008.

KRYCH, J.; GEBICKA, L. Catalase is inhibited by flavonoids. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 58, p. 148-153, 2013.

KUEPELI, E. et al. Evaluation of *in vivo* biological activity profile of isoorientin. **Journal of Biosciences**, v. 59, p. 787-790, 2004.

LEE, W. L.; HARRISON R. E.; GRINSTEIN S. Phagocytosis by neutrophils. **Microbes and Infection**, v. 5, p. 1299-1306, 2003.

LIN, C. M. et al. Isovitexin suppresses lipopolysaccharide-mediated inducible nitric oxide synthase through inhibition of NF-kappa B in mouse macrophages. **Planta Medica**, v. 71, p. 748-753, 2005.

LOPES, A. A. **Avaliação da atividade anti-inflamatória e antioxidante das cápsulas do extrato seco padronizado e da afrormosina, isoflavonoide, obtidos de *Amburana cearenses* A C Smith**. 2010. 135 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2010.

LÓPEZ-ALARCÓN, C; DENICOLA, A. Evaluating the antioxidant capacity of natural products: A review on chemical and cellular-based assays. **Analytica Chimica Acta**, v. 763, p. 1-10, 2013.

LUBOS, E.; LOSCALZO, J.; HANDY, D. E. Glutathione peroxidase-1 in health and disease: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 15, n. 7, p. 1957-1997, 2011.

MALLE, E. et al. Myeloperoxidase: a target for new drug development? **British Journal of Pharmacology**, v. 152, p. 838-854, 2007.

MARECK, U. et al. The 6-C-chinovoside and 6-C-fucoside of luteolin from *Passiflora edulis*. **Phytochemistry**, v. 30, n. 10, p. 3486-3487, 1991.

MARTINS, C. F. R. **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**. 2013. 73 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, 2013.

MATOS, D. C. **Estudo comparativo da atividade anti-inflamatória e anti-tumoral de proteínas inativadoras de ribossomos extraídas de plantas**. 2008. 148 f. Dissertação (Mestrado em Análises Clínicas) – Programa de Pós-graduação em Análises Clínicas, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Araraquara, 2008.

MAYER-SCHOLL, A.; AVERHOFF, P.; ZYCHLINSKY, A. How do neutrophils and pathogens interact? **Current Opinion in Microbiology**, v. 7, p. 62-66, 2004.

MEDEIROS, J.; KANIS, L. A. Avaliação do efeito de polietilenoglicóis no perfil de extratos de *Mikania glomerata* Spreng., Asteraceae, e *Passiflora edulis* Sims, Passifloraceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 5, p. 796-802, 2010.

MEDZHITOF, R. Origin and physiological roles of inflammation. **Nature**, v. 454, p. 428-435, 2008.

MONTANHER, A. B. et al. Evidence of anti-inflammatory effects of *Passiflora edulis* in an inflammation model. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 109, n. 2, p. 281-288, 2007.

MORAIS, S. M. et al. Plantas medicinais usadas pelos índios Tapebas do Ceará. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 15, n. 2, p. 169-177, 2005.

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

MULLER, S. D. et al. LC and UV determination of flavonoids from *Passiflora alata* medicinal extracts and leaves. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 37, n. 2, p. 399-403, 2005.

MYHRE, O. et al. Evaluation of the probes 2',7'-dichlorofluorescein diacetate, luminol, and lucigenin as indicators of reactive species formation. **Biochemical Pharmacology**, v. 65, p. 1575-1582, 2003.

NEWMAN, D. J. et al. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. **Journal of Natural Products**, v. 66, p.1022-1037, 2003.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. **Journal of Natural Products**, v. 70, p. 461-477, 2007.

ODONTUYA, G.; HOULT, J. R.; HOUGHTON, P. J. Structure–activity relationship for anti-inflammatory effect of luteolin and its derived glycosides. **Phytotherapy Research**, v. 19, p. 782-786, 2005.

OYANAGUI, Y. Reevaluation of assay methods and establishment of kit for superoxide dismutase activity. **Analytical Biochemistry**, v. 142, n. 2, p. 290-296, 1984.

PEREIRA, C. A. et al. A HPTLC densitometric determination of flavonoids from *Passiflora alata*, *Passiflora edulis*, *Passiflora incarnata* and *Passiflora caerulea* and comparison with HPLC method. **Phytochemical Analysis**, v. 15, n. 4, p. 241-248, 2004.

PEREIRA, C. A. M.; VILEGAS, J. H. Y. Constituintes químicos e farmacologia do gênero *Passiflora* com ênfase a *P. alata* Dryander., *P. edulis* Sims e *P. incarnata* L. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 3, n. 1, p. 1-12, 2000.

PETRY, R. D. et al. Comparative pharmacological study of hydroethanol extracts of *Passiflora alata* and *Passiflora edulis* leaves. **Phytotherapy Research**, v. 15, p. 162-164, 2001.

PRUCHNIAK, M. P.; ARAZNA, M.; DEMKOW, U. Life of neutrophil: From stem cell to neutrophil extracellular trap. **Respiratory Physiology & Neurobiology**, v. 187, p. 68-73, 2013.

RAHMAN, K. Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors. **Clinical Interventions in Aging**, v. 2, n. 2, p. 219,236, 2007.

RANG, H. P. et al. A hipófise e o córtex supra-renal. In: RANG, H. P. et al. **Farmacologia**. 5a ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2003. cap. 27, p. 462-479.

ROCK, K. L.; KONO, H. The inflammatory response to cell death. **Annual Reviews of Pathology**, v. 3, p. 99-126, 2008.

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 vinífera*) variedades Tannat e Ancelota. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, p. 238-244, 2008.

RODRIGUES, M. R. et al. Macrophage activation includes high intracellular mieloperoxidase activity. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 292, p. 869-873, 2002.

ROLIM, N. P. J. et al. Caracterização fitoquímica e físico-química das folhas de *Bauhinia forficata* Link coletada em duas regiões brasileiras. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 33, n. 1, p. 57-62, 2012.

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

SALINAS, G. Bioquímica de la selenocisteína, el 21er aminoácido, y rol de las selenoproteínas en la salud humana. **Mensaje Bioquímico**, v. 34, p. 121-133, 2010.

SCORZONI, L. et al. The use of standard methodology for determination of antifungal activity of natural products against medical yeasts *Candida* sp. and *Cryptococcus* sp. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 391-397, 2007.

SÉFORA-SOUSA, M.; DE ANGELIS-PEREIRA, M.C. Mecanismos moleculares de ação anti-inflamatória e antioxidante de polifenóis de uvas e vinho tinto na aterosclerose. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Campinas, v. 15, n. 4, p. 617-626, 2013.

SILVA, J. K. et al. Antioxidant activity of aqueous extract of passion fruit (*Passiflora edulis*) leaves: *in vitro* and *in vivo* study. **Food Research International**, v. 53, p. 882-890, 2013.

SINET, P. M. et al. Increase in glutathione peroxidase activity in erythrocytes from trisomy 21 subjects. **Biochemistry and Biophysical Research Communications**, v. 67, p. 910-915, 1975.



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

SIQUEIRA JUNIOR, J. F. Inflamação aguda: mediadores químicos. In: SIQUEIRA JUNIOR, J. F.; DANTAS, C. J. S. **Mecanismos celulares e moleculares da inflamação**. Rio de Janeiro: MEDSI Editora Médica e Científica Ltda, 2000a. cap. 7, p. 83-103.

\_\_\_\_\_. Inflamação Crônica. In: SIQUEIRA JUNIOR, J. F.; DANTAS, C. J. S. **Mecanismos celulares e moleculares da inflamação**. Rio de Janeiro: MEDSI Editora Médica e Científica Ltda, 2000b. cap. 9, p. 107-111.

SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de Nutrição**, v. 15, n. 1, p. 71-81, 2002.

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

SOUZA, M. S. S. et al. Effects of *Passiflora edulis* (yellow passion) on serum lipids and oxidative stress status of Wistar rats. **Journal of Medicinal Food**, v. 15, n. 1, p. 78-82, 2012.

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

TSANG, A. H.; CHUNG, K. K. Oxidative and nitrosative stress in Parkinson's disease. **Biochimica and Biophysica Acta**, v. 1792, p. 643-650, 2009.

VARGAS, A. J. et al. *Passiflora alata* and *Passiflora edulis* spray-dried aqueous extracts inhibit inflammation in mouse model of pleurisy. **Fitoterapia**, v. 78, n. 2, p. 112-119, 2007.

WANNMACHER, L.; FERREIRA, M. B. C. Princípios gerais no tratamento da inflamação. In: FUCHS, F. D.; WANNMACHER, L.; FERREIRA, M. B. C. **Farmacologia clínica**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004, p. 294-295.

YOGISHA, S.; RAVEESHA, K. A. In-vitro antibacterial effect of selected medicinal plant extracts. **Journal of Natural Products**, v. 2, p. 64-69, 2009.

ZERAIK, M. L. et al. Evaluation of the antioxidant activity of passion fruit (*Passiflora edulis* and *Passiflora alata*) extracts on stimulated neutrophils and myeloperoxidase activity assays. **Food Chemistry**, v. 128, p. 259-265, 2011.

ZERAIK, M. L. et al. Maracujá: um alimento funcional? **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 3, p. 459-471, 2010.

ZUCOLOTTO, S. M. **Estudo fitoquímico das folhas, frutos e raízes de *P. edulis* forma *flavicarpa* Degener**. 2005. 127 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-graduação em Farmácia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.

ZUCOLOTTO, S. M. et al. Analysis of C-glycosyl flavonoids from South American *Passiflora* species by HPLC-DAD and HPLC-MS. **Phytochemical Analysis**, v. 23, p. 232-239, 2012.

ZUCOLOTTO, S. M. L. **Avaliação da composição química e atividades biológicas de espécies de *Passiflora***. 2009. 167 f. Tese (Doutorado em Farmácia) – Programa de Pós-graduação em Farmácia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2009.