

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS UNIFAL-MG

**BRUNO CESAR CORREA SALLES**

**TEOR DE POLIFENÓIS E AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO EXTRATO SECO DE FOLHA DE MARACUJÁ AZEDO (*Passiflora edulis Sims*) SOBRE A GLICAÇÃO DE COLÁGENO E A ATIVAÇÃO PLAQUETÁRIA EM RATOS DIABÉTICOS**

Alfenas/MG

2014

**BRUNO CESAR CORREA SALLES**

**TEOR DE POLIFENÓIS E AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO EXTRATO SECO DE FOLHA DE MARACUJÁ AZEDO (*Passiflora edulis* Sims) SOBRE A GLICAÇÃO DE COLÁGENO E A ATIVAÇÃO PLAQUETÁRIA EM RATOS DIABÉTICOS**

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

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Fernanda Borges de Araújo Paula.

Co-Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Máisa Ribeiro Pereira Lima Brigagão.

Alfenas/MG

2014

Salles, Bruno Cesar Correa.

Teor de polifenóis e avaliação dos efeitos do extrato seco de folhas de Maracujá Azedo (*Passiflora edulis* Sims) sobre a glicação de colágeno e a atividade plaquetária em ratos diabéticos. / Bruno Cesar Correa Salles. - 2014.

65 f. -

Orientadora: Fernanda Borges de Araújo Paula.

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2014.

Bibliografia.

1. Diabetes Mellitus. 2. Colágeno. 3. Agregação plaquetária. 4. *Passiflora*. I. Paula, Fernanda Borges de Araújo. II. Título.

CDD: 616.462

BRUNO CESAR CORREA SALLES

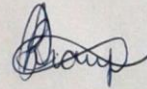
TEOR DE POLIFENÓIS E AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO EXTRATO SECO  
DE FOLHA DE MARACUJÁ AZEDO (*Passiflora edulis Sims*) SOBRE A  
GLICAÇÃO DE COLÁGENO E A ATIVAÇÃO PLAQUETÁRIA EM RATOS  
DIABÉTICOS

A Banca examinadora abaixo-assinada aprova a dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de mestre em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Alfenas. Área de Concentração: Obtenção e avaliação da atividade biológica de insumos farmacêuticos.

Aprovada em: 15 de Janeiro de 2014.


Prof<sup>o</sup>. Dr<sup>a</sup>.: Fernanda Borges de Araújo Paula  
Instituição: Universidade Federal de Alfenas  
UNIFAL-MG

Assinatura:



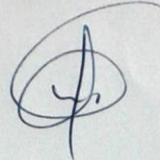
Prof<sup>o</sup>. Dr<sup>o</sup>.: José Antonio Dias Garcia  
Instituição: Universidade José do Rosário  
Vellano UNIFENAS

Assinatura:



Prof<sup>o</sup>. Dr<sup>o</sup>.: Geraldo Alves da Silva  
Instituição: Universidade Federal de Alfenas  
UNIFAL-MG

Assinatura:



Dedico todo esse trabalho a Deus, meu porto seguro nos momentos difíceis. A minha família, em especial a minha vó Olivina de Jesus Correa pelo carinho e cuidado, ao longo de todos esses anos de minha vida. Aos meus Professores, que sempre me ofereceram o conhecimento. A minha orientadora Fernanda Borges de Araújo Paula, que me proporcionou a oportunidade de realizar um sonho.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por me dar o dom da vida e da força necessária para concluir mais esta etapa.

Agradeço a Universidade Federal de Alfenas, ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas e aos membros do colegiado, pelo crescimento pessoal e profissional, assim como pelo companheirismo que me foi proporcionado ao longo destes anos.

Agradeço a Fabiana, secretária do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, pela disposição e pela paciência que sempre teve ao me orientar da melhor forma possível.

À Cnpq pelo apoio financeiro que tornou possível esse projeto bem como a minha dedicação exclusiva à pesquisa.

A Romilda e a Lucinda por estarem a disposição sempre que precisei.

A Eliane que sempre foi muito mais que uma funcionária do laboratório, mas sim uma amiga, por quem tenho muito carinho.

As alunas e amigas de Iniciação Científica Lara Taniguthi e Juliane Ferreira que estiveram ao meu lado nesta jornada.

A Paula Pennacchi e a Profa. Dra. Silvy Stuchi Maria-Engler, por toda ajuda, disponibilidade, suporte e aprendizado em que me ofereceu para a realização de meus experimentos.

Agradeço a Profa. Dra. Stella Maris da Silveira Duarte, ao Prof<sup>o</sup> MSc. Selmo de Ávila Lima e a Profa. Dra. Maria Rita Rodrigues pela amizade, conselhos, risadas e disponibilidade sempre que precisei.

À Profa. Dra. Maísa Ribeiro Brigagão não somente pela parceria na realização dos experimentos, mas também por ter se prontificado a me apoiar e acolher em momentos difíceis.

Ao Prof. Dr. Marcelo Aparecido Silva que abriu as portas do laboratório para a realização de nossos experimentos e por toda a sua disponibilidade, paciência e amizade.

A minha família que sempre me incentivou a buscar algo melhor e me apoiou nas minhas decisões.

Ao meu pai Paulo Cesar Salles pelos conselhos e apoio nas minhas decisões.

A minha mãe e amiga Angela Maria Correa que trava sua batalha diária para me ajudar a realizar meus sonhos profissionais.

E finalmente a duas pessoas que sem elas nada disso teria se concretizado, a duas pessoas que serei eternamente grato, a duas pessoas que tenho como mães que Deus me proporcionou ao longo de minha caminhada. A primeira minha vó Olivina de Jesus Correa, minha primeira professora, meu segundo porto seguro, meu apoio. Lembro como se fosse ontem o dia em que quando na quarta série do ensino fundamental minha vó, com seu jeito simples e humilde de ser, se desculpou e me disse que não poderia mais me ajudar nas minhas lições de casa, porque com a escolaridade dela, não conseguiria mais me ajudar. Entretanto ela se equivocou pois até hoje é a mais sábia professora que tenho em minha vida.

A segunda minha orientadora Profa. Dra. Fernanda Borges de Araújo Paula, que não a tenho somente como orientadora, mas como uma mãe ofertada por Deus. Saiba que sem a senhora não teria ido tão longe e esse meu sonho não teria se realizado. Obrigado por me dar a liberdade de arriscar, por me corrigir nas vezes que errei, por confiar a mim este projeto e acima de tudo obrigado por acreditar em mim.

Às duas mães ofertadas por Deus deixo meu obrigado e a certeza de que terão um lugar reservado em minhas orações.

“Se você força algo, você corre o risco de prejudicar ainda mais aquilo que você quer que aconteça. É por isso que até o empenho para a realização do sonho tem que passar pela moderação, tudo na vida é questão de equilíbrio”. (MELO, Fábio de, 2011)

## RESUMO

A busca de plantas medicinais com potencial para o alívio de dores e até mesmo a cura de doenças tem se expandido em diversos países, inclusive no Brasil. O Brasil é um grande produtor de maracujá, que além do seu valor nutricional de seus frutos, tem sido utilizado também com finalidade terapêutica, na medicina popular. Além das diversas aplicações do chá das folhas de maracujá na medicina popular, alguns autores têm sugerido também as atividades hipoglicemiantes, antioxidante, anti-glicante e antiagregante de plaquetas para extratos de folhas obtidos de diferentes espécies de maracujá. No entanto, o papel modulatório do extrato bruto seco de folhas *P. edulis* Sims sobre a glicação proteica e ativação plaquetária não está totalmente esclarecido. O diabetes mellitus é considerado como um importante problema de saúde pública, devido à sua elevada prevalência, ao desenvolvimento de complicações crônicas incapacitantes e ao alto custo econômico gerado pelo seu tratamento. Estudos desenvolvidos com diferentes modelos experimentais têm demonstrado que o DM leva à ativação de plaquetas com consequente aumento de sua agregação bem como ao aumento da glicação de proteínas, sendo estas alterações diretamente envolvidas nas vias bioquímicas que levam ao desenvolvimento das principais complicações crônicas induzidas pelo DM. Sendo assim, o presente trabalho teve como objetivo geral determinar o teor de polifenóis totais e avaliar os efeitos do extrato seco das folhas de *Passiflora edulis* Sims sobre marcadores bioquímicos, a glicação de colágeno, a ativação e a agregação plaquetária em ratos diabéticos. Ratos machos Wistar ( $300 \pm 25$ g) foram tratados com aloxano (150mg/Kg de peso corporal dissolvido em salina 0,9%, via intraperitoneal). As folhas secas de *Passiflora edulis* Sims foram coletadas no município de Alfenas-MG (21° 27' 33'' S; 46° 01' 59'' W; Altitude 789 m) e identificadas na Universidade Federal de Lavras-MG. O extrato seco foi obtido por maceração em solução hidroetanólica 70%(V/V), seguida de evaporação sob pressão reduzida e de liofilização. O extrato seco foi diluído em água e administrado por gavagem durante 90 dias após a indução do diabetes (200mg do extrato seco/Kg de peso do animal). O grupo controle recebeu apenas água. A agregação plaquetária foi avaliada em agregômetro da marca PA-04 Qualitem Eletrônica à 37°C. Os marcadores bioquímicos (glicemia, ureia, colesterol total e frações) foram dosados no soro por métodos enzimáticos e a creatinina foi determinada no soro dos animais pelo método de Jaffé modificado (rastreável ao IDMS). O conteúdo de colágeno glicado foi dosado por fluorescência. A produção de espécies oxidantes foi monitorada por quimiluminescência. A administração do extrato seco de folhas de *Passiflora edulis* Sims reduziu a glicemia em jejum bem como os níveis de HbA1C no sangue dos animais diabéticos. A administração do extrato seco das folhas de *Passiflora edulis* Sims impediu o aumento dos níveis de creatinina no soro dos animais diabéticos. O extrato seco das folhas de *Passiflora edulis* Sims foi capaz de reduzir a concentração de lipoproteínas aterogênicas no soro dos animais tratados. Os animais diabéticos apresentaram maior produção basal de oxidantes e a agregação plaquetária em relação aos animais não diabéticos. O tratamento dos animais diabéticos com o extrato de *Passiflora edulis* Sims atenuou os efeitos do diabetes sobre a produção de oxidantes e a agregação plaquetária. Os níveis de AGEs determinados em amostras de colágeno obtido do tendão de animais diabéticos foi maior que nos animais não diabéticos e o tratamento dos animais diabéticos com o extrato seco levou a uma redução da glicação do colágeno.

Palavras-chave: Diabetes. Colágeno. Agregação. Maracujá.

## ABSTRACT

The search for medicinal plants with potential for pain relief and even cure diseases has expanded in several countries, including Brazil. Brazil is a major producer of passion fruit, which is beyond the nutritional value of its fruit, also been used for therapeutic purposes in folk medicine. In addition to the various applications of tea leaves passion in folk medicine, some authors have also suggested the hypoglycemic activity, antioxidant, antiplatelet and antiplatelet glicante for leaf extracts obtained from different species of passion fruit. However, the modulatory role of dry crude extract of leaves *P. edulis* Sims on protein glycation and platelet activation is not fully understood. Diabetes mellitus is considered as a major public health problem due to its high prevalence, the development of disabling chronic complications and the high economic costs generated by their treatment. Studies carried out with different experimental models have shown that DM leads to platelet activation with consequent increase of aggregation as well as increased glycation of proteins, and these changes directly involved in the biochemical pathways leading to the development of major chronic complications induced by DM . Thus, the present work had as main objective to determine the content of total polyphenols and evaluate the effects of dry extract of *Passiflora edulis* Sims on biochemical markers of collagen glycation, activation and platelet aggregation in diabetic rats. Male Wistar rats (300±25g) were treated with alloxan (150mg/kg body weight dissolved in 0.9% saline) intraperitoneally. The fresh leaves of passion fruit were collected in Alfenas-MG (21° 27' 33" S; 46° 01' 59" w; Altitude 789 m) and identified at the Federal University of Lavras-MG. The dry extract was obtained by grinding in a hydroethanolic solution 70% (V/V), followed by evaporation under reduced pressure and lyophilization and administered (200mg dry extract / kg) to normal and diabetic rats, for ninety days. The control group received water only. Platelet aggregation was performed in aggregometer PA-04 Qualitem Eletronica to 37°C. Biochemical markers were determined in serum by enzymatic method. The collagen glycation content will be performed by fluorescence. The oxidant species production was monitored by chemiluminescence. The administration of dry extract of *Passiflora edulis* Sims leaves reduced fasting glucose and HbA1C levels in the blood of diabetic animals . The dry extract administration of *Passiflora edulis* Sims prevented the increase of serum creatinine levels of diabetic animals. The dry extract of *Passiflora edulis* Sims was able to reduce the concentration of atherogenic lipoproteins in the serum of treated animals. Diabetic animals had higher basal production of oxidants and platelet aggregation compared to non-diabetic animals. Treatment of diabetic animals with the extract of *Passiflora edulis* Sims attenuated the effects of diabetes on oxidant production and platelet aggregation. The AGEs levels determined in samples obtained from tendon collagen from diabetic rats was higher than in non- diabetic animals and the treatment of diabetic animals with dry extract led to a reduction of collagen glycation.

Keywords: Diabetes. Collagen. Aggregation. Passion fruit.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Mecanismo proposto para explicar o dano celular induzido pela hiperglicemia e o estresse oxidativo.....	18
Figura 2 -	Detalhes das folhas e das flores de <i>Passiflora edulis</i> Sims.....	24
Figura 3 -	Detalhe do fruto de <i>Passiflora edulis</i> Sims.....	25
Figura 4 -	Perfil cromatográfico e perfil de área da HbA <sub>1</sub> C em sangue total de ratos Wistar.....	41
	a) Perfil cromatográfico da HbA <sub>1</sub> C em sangue total de ratos não diabéticos.....	41
	b) Perfil cromatográfico da HbA <sub>1</sub> C em sangue total de ratos não diabéticos tratados com o extrato seco das folhas de <i>Passiflora edulis</i> Sims.....	41
	c) Perfil cromatográfico da HbA <sub>1</sub> C em sangue total de ratos diabéticos.....	42
	d) Perfil cromatográfico da HbA <sub>1</sub> C em sangue total de ratos diabéticos tratados com o extrato seco das folhas de <i>Passiflora edulis</i> Sims.....	42

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 -	Histograma de distribuição granulométrica das folhas de <i>Passiflora edulis</i> Sims.....	37
Gráfico 2 -	Curva concentração-resposta de ADP.....	47
Gráfico 3 -	Efeito do extrato seco de folhas de <i>Passiflora edulis</i> Sims sobre a Agregação Plaquetária em ratos controle e diabético.....	48
Gráfico 4 -	Efeito do extrato de <i>Passiflora edulis</i> Sims sobre a cinética de emissão de luz em sistemas contendo plaquetas de ratos diabéticos e não diabéticos.....	50
	a) Representação da cinética de emissão de luz em sistemas contendo plaquetas obtidas de ratos diabéticos. b) Representação da cinética de emissão de luz em sistemas contendo plaquetas obtidas de ratos não diabéticos.....	50
Gráfico 5 -	Determinação do efeito inibitório do extrato seco de folhas de <i>Passiflora edulis</i> Sims na formação de AGEs totais.....	53
Gráfico 6 -	Determinação do efeito inibitório do extrato seco de folhas de <i>Passiflora edulis</i> Sims na formação de pentosidinas.....	53

**LISTA DE TABELAS**

Tabela 1 -	Relação de massa fresca e seca das folhas de <i>Passiflora edulis</i> Sims.....	36
Tabela 2 -	Frequências percentuais e tamanho médio das partículas na análise granulométrica das folhas de <i>Passiflora edulis</i> Sims.....	37
Tabela 3 -	Conteúdo de fenóis totais (PT) do extrato seco de folhas de <i>Passiflora edulis</i> Sims.....	38
Tabela 4 -	Avaliação da glicemia de jejum e da concentração de hemoglobina glicada em ratos Wistar.....	40
Tabela 5 -	Avaliação da função renal no soro de ratos Wistar.....	44
Tabela 6 -	Avaliação do perfil lipídico no soro de ratos Wistar.....	46
Tabela 7 -	Avaliação dos efeitos do extrato seco de <i>Passiflora edulis</i> Sims sobre a produção de espécies oxidantes por plaquetas de ratos normais e diabéticos.....	49

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADA	- Associação Americana de Diabetes
ADP	- Adenosina difosfato
AGEs	- Produtos Finais de Glicação Avançada
BCA-Na <sub>2</sub>	- Ácido Bicinconínico Dissódico
CaCl <sub>2</sub>	- Cloreto de Cálcio
CML	- Células Musculares Lisas
CO <sub>2</sub>	- Dióxido de Carbono
CuSO <sub>4</sub>	- Sulfato de Cobre
DM	- Diabetes Mellitus
Enos	- Óxido Nítrico Sintase Endotelial
ERN	- Espécies Reativas de Nitrogênio
ERRO	- Espécies Reativas de Oxigênio
GMPc	- Guanosina Monofosfato Cíclico
HbA <sub>1c</sub>	- Hemoglobina Glicada
HDL	- Lipoproteína de Densidade Alta
HPLC	- Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
KCl	- Cloreto de Potássio
LDL	- Lipoproteína de Baixa Densidade
NaCl	- Cloreto de Sódio
NADPH	- Nicotinamida adenina dinucleotideo fosfato-oxidase
NaHCO <sub>3</sub>	- Bicarbonato de Sódio
NaOH	- Hidróxido de Sódio
NO	- Óxido Nítrico
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	- Ânion Superóxido
ONOO <sup>-</sup>	- Peroxinitrito
NOS	- Óxido Nítrico Sintetase
PGI <sub>2</sub>	- Prostaciclina
PMA	- Acetato de Forbol Morostato
PPS	- Perda Por Secagem
PRP	- Plasma Rico em Plaquetas
SOD	- Superóxido Dismutase
TXA <sub>2</sub>	- Tromboxano A <sub>2</sub>
VLDL	- Lipoproteína de Densidade Muito Baixa
vWf	- Fator de von Willerbrand

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	15
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	17
2.1	DIABETES MELLITUS E A ATIVAÇÃO PLAQUETÁRIA.....	19
2.2	DIABETES MELLITUS E A GLICAÇÃO DE COLÁGENO.....	21
2.3	A ESPÉCIE <i>Passiflora edulis</i> Sims.....	23
2.4	USO DE EXTRATO DE FOLHAS DE MARACUJÁ.....	25
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	27
3.1	OBJETIVO GERAL.....	27
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	27
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	28
4.1	SECAGEM.....	28
4.2	GRANULOMETRIA.....	28
4.3	PREPARO DO EXTRATO SECO DAS FOLHAS DE <i>Passiflora edulis</i> Sims.....	29
4.4	ETAPA QUÍMICA.....	29
4.4.1	Análise quantitativa do teor de fenóis totais.....	29
4.5	ANIMAIS.....	29
4.5.1	Grupos experimentais.....	30
4.6	INDUÇÃO DO DIABETES MELLITUS.....	30
4.7	ADMINISTRAÇÃO DO EXTRATO SECO.....	30
4.8	OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS BIOLÓGICAS.....	31
4.9	OBTENÇÃO DAS PLAQUETAS LAVADAS.....	31
4.10	CONTAGEM DE PLAQUETAS.....	32
4.11	ENSAIOS.....	32
4.11.1	Avaliação da agregação plaquetária.....	32
4.11.2	Avaliação da produção de espécies oxidantes.....	32
4.11.3	Extração de colágeno tipo 1 de tendão de cauda de ratos Wistar.....	33
4.11.4	Análise da glicação de colágeno.....	33
4.11.5	Avaliação da glicemia de jejum, do colesterol total e das frações, da uréia e de creatinina.....	34
4.11.6	Avaliação da hemoglobina glicada.....	34

4.12	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	35
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÕES.....</b>	<b>36</b>
5.1	DROGA VEGETAL.....	36
5.2	ANÁLISE GRANULOMÉTRICA DOS PÓS.....	36
5.3	ETAPA QUÍMICA.....	38
5.3.1	Análise quantitativa do teor de fenóis totais.....	38
5.4	ETAPA BIOLÓGICA.....	39
5.4.1	Avaliação da glicemia de jejum e da glicação de proteínas no sangue total.....	39
5.4.2	Avaliação da função renal.....	44
5.4.3	Avaliação do perfil lipídico.....	45
5.4.4	Avaliação da agregação plaquetária.....	47
5.4.5	Avaliação da glicação de colágeno.....	51
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>55</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>56</b>

## 1 INTRODUÇÃO

As plantas medicinais têm sido utilizadas pela humanidade, desde os primórdios da civilização, quando os povos autóctones usavam óleos e unguentos preparados com plantas medicinais para a cura de feridas. Até os dias atuais, mesmo com os fármacos contemporâneos produzidos por meio de tecnologias avançadas, disponíveis no mercado, a busca de plantas medicinais com potencial para o alívio de dores e até mesmo a cura de doenças que afligem a população ainda é intensa, tanto na população leiga quanto no meio científico, para fins de estudos químicos e farmacológicos (VEIGA; PINTO; MACIEL, 2005; NOGUEIRA; MONTANARI; DOMINICI, 2009).

Uma das razões para este grande interesse é o fato de que cerca de 70% dos medicamentos derivados de plantas foram desenvolvidos com base no conhecimento popular. Além disso, várias moléculas oriundas de plantas medicinais têm sido utilizadas como estruturas básicas para planejamento, síntese e desenvolvimento de novos medicamentos (GARCIA, 1995). Entre estas podemos citar a aspirina (ácido acetil salicílico), que foi descoberta a partir de extratos da casca do salgueiro (*Spiraea ulmaria*) que fornece o ácido salicílico (PINTO, 2013).

Segundo a Organização Mundial de Saúde estima que cerca de 70 a 80% da população mundial utiliza, de algum modo, plantas medicinais no cuidado à saúde (WHO, 2008). Considerando que os países em desenvolvimento possuem 67% da biodiversidade vegetal, o uso das plantas medicinais no cuidado à saúde tem se expandido em diversos países, inclusive no Brasil (BRASIL, 2006).

O uso terapêutico das diversas espécies do gênero *Passiflora* é comum em diversos países. Estas espécies são utilizadas desde a antiguidade na medicina popular, com as funções sedativa, diurética, anti-helmíntica, anti-diarréica, estimulante da função digestiva, no tratamento dos sintomas da menopausa, da hipertensão, de cólicas infantis e de alguns carcinomas gástricos. Atualmente, alguns autores têm sugerido também as atividades hipoglicemiante e antioxidante para extratos etanólicos de folhas *Passiflora edulis*. Além disso, um efeito inibidor do extrato etanólico de *Passiflora nítida* Kunth sobre a agregação plaquetária induzida por adrenalina foi demonstrado recentemente.

Entretanto, a maioria dos estudos sobre avaliação das propriedades antioxidantes assim como sobre a agregação plaquetária de extratos de folhas de algumas espécies do

gênero *Passiflora* tem sido conduzidos *in vitro* e *ex vivo*. Sendo assim, o papel modulatório do extrato bruto seco de folhas *P. edulis* Sims sobre a ativação plaquetária não está totalmente esclarecido.

O diabetes mellitus é considerado como um importante problema de saúde pública, devido à sua elevada prevalência, ao desenvolvimento de complicações crônicas incapacitantes e ao alto custo econômico gerado pelo seu tratamento. O comprometimento do endotélio vascular tem sido considerado como um dos principais mecanismos que conduzem à maioria destas complicações. O aumento da atividade da via dos polióis, a glicação não-enzimática das proteínas com a produção dos produtos finais da glicação avançada (AGEs), o estresse oxidativo e as alterações da proteína quinase C, têm sido apontados como as principais vias que conduzem às disfunções endoteliais que precedem as graves complicações vasculares presentes no paciente diabético (BERTOLUCCI, et al., 2007; CORRÊA-GIANNELLA; VIEIRA, 2007).

Estudos desenvolvidos com diferentes modelos experimentais têm demonstrado que o DM leva à ativação de plaquetas com consequente aumento de sua agregação (AARON, et al., 2001; RANDRIAMBOAVONJY; FLEMING, 2012; FLIERL, et al., 2010). Além disso, a reatividade plaquetária aumentada em decorrência do DM tem sido associada ao descontrole na produção de ERO mediada pela NADPH oxidase, bem como ao aumento da mobilização de cálcio e à atividade aumentada de fosfolipase A2 com consequente aumento de tromboxano (HAOUARI; ROSADO, 2008; VIOLI; PIGNATELLI, 2014).

Assim, a busca por compostos com capacidade de reduzir ou prevenir a hiperativação plaquetária, que sejam capazes contribuir para a prevenção primária e secundária em relação aos eventos trombóticos associados ao diabetes mellitus tem sido alvo de diferentes estudos.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O diabetes mellitus (DM) trata-se de uma desordem metabólica de múltipla etiologia caracterizado por níveis elevados de glicose sanguínea, o que leva a anormalidades no metabolismo de carboidratos, de lipídios e de proteínas, conduzindo a complicações agudas e crônicas, como resultado de defeitos na secreção ou na ação da insulina (AVEZEDO; VICTOR; OLIVEIRA, 2010).

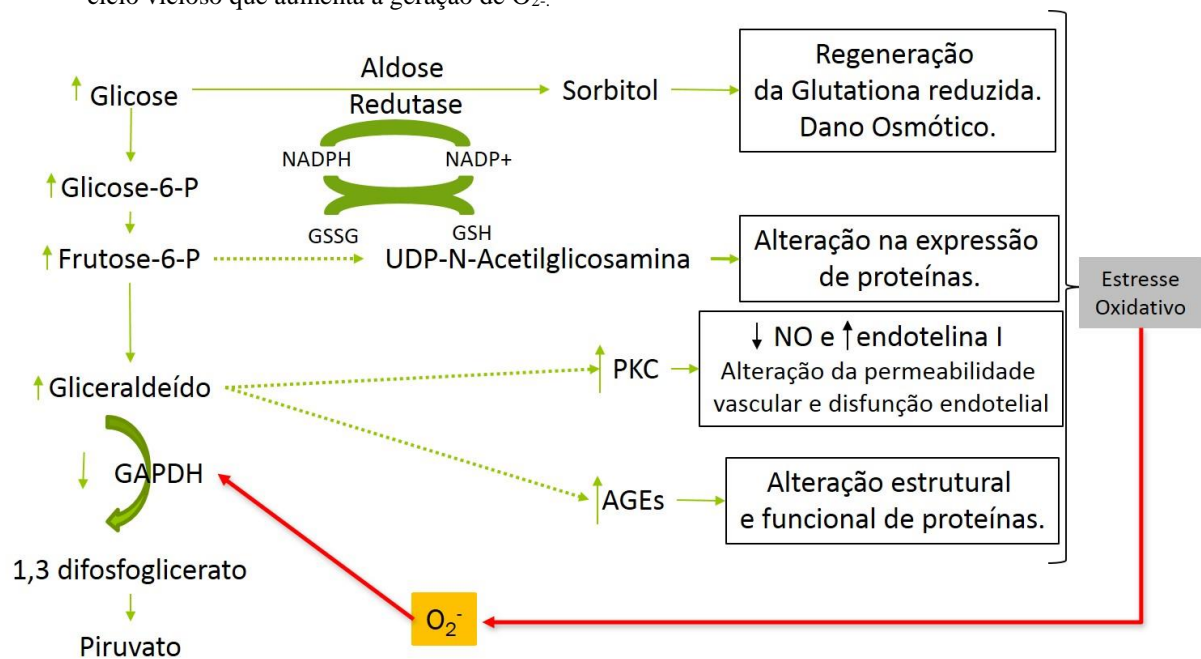
Constitui um sério problema de saúde pública devido aos altos índices de incidência e de morbimortalidade. Segundo a organização Mundial de Saúde, a prevalência de diabetes em 2000 era de 2,8% o que representaria 171 milhões de pessoas. Estima-se que em 2030 a prevalência será de 4,4% o que representará aproximadamente 366 milhões de pessoas (VIANA; RODRIGUEZ, 2011). No Brasil e em outros países em desenvolvimento, a estimativa é de que o número de indivíduos diabéticos aumente em 170% em relação ao período de 1995 a 2025. A alta morbimortalidade de pacientes diabéticos é atribuída principalmente às complicações crônicas induzidas pelo diabetes, que comprometem a produtividade, a qualidade de vida e a sobrevida do ser humano, gerando elevados custos diretos e indiretos (BRASIL, 2001).

As evidências experimentais e clínicas demonstram que as complicações vasculares (micro e macroangiopatia) apresentam-se de forma mais grave e difusa no paciente diabético, quando comparado com pacientes não-diabéticos e podem aparecer mesmo em estágios precoces da doença, se manifestando clinicamente como nefropatia, retinopatia, neuropatias, cardiopatias isquêmicas, doenças vasculares periféricas e acidente vascular cerebral (American Diabetes Association, 2011).

Dentre estas complicações, a doença cardiovascular tem sido considerada como a principal causa de morte (52%) entre os indivíduos diabéticos (BRASIL, 2001). A hiperglicemia prolongada leva a alterações celulares e moleculares, que contribuem significativamente para a lesão endotelial, sendo o fator primordial para o desenvolvimento da aterogênese e de suas complicações vasculares (BERTOLUCCI, et al., 2007). Muito esforço tem sido focado no intuito de reduzir a morbimortalidade das doenças crônicas cardiovasculares, tais como o incentivo a prática de atividade física, a dieta controlada, além do controle das principais doenças que atuam como fatores de risco, dentre elas o diabetes mellitus (VIANNA; GONZÁLEZ; MATIJASEVICH, 2012).

Os dados da literatura têm apontado a atividade da via dos polióis, a glicação não enzimática das proteínas com a produção de produtos finais da glicação avançada (AGEs), o estresse oxidativo e as alterações da proteína quinase C (PKC), como os principais mecanismos envolvidos nas disfunções endoteliais e na aterogênese, que precedem as graves complicações vasculares induzidas pelo diabetes mellitus (Figura 1) (BERTOLUCCI, et al., 2007; CORRÊA-GIANNELLA; VIEIRA, 2007).

Figura 1- Mecanismos propostos para explicar o dano celular induzido pela hiperglicemia e o estresse oxidativo como via final comum das quatro vias metabólicas ativadas. O excesso de radical superóxido ( $O_2^-$ ) inibe parcialmente a Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), uma enzima da via glicolítica, o que resulta aumento dos metabólitos formados antes da ação do GAPDH. Esses metabólitos são desviados para utilização nas quatro vias metabólicas responsáveis pelo dano celular da hiperglicemia, em um ciclo vicioso que aumenta a geração de  $O_2^-$ .



Fonte: CORRÊA-GIANNELLA; VIEIRA (2007, p. 378)

O endotélio normal secreta o óxido nítrico (NO), a prostaciclina ( $PGI_2$ ) e o fator hiperpolarizante, responsáveis pela manutenção do tônus vascular, da regulação da agregabilidade plaquetária e da coagulação, bem como pela modulação da fibrinólise, da dissolução de trombos intravasculares formados e da inflamação. Entretanto, em resposta à lesão induzida pelo DM, alterações funcionais adaptativas ocorrem no endotélio vascular levando a redução na síntese e na secreção desses fatores protetores favorecendo, portanto, os estados pró-constritor, pró-inflamatório e pró-agregante aos vasos sanguíneos (WAJCHENBERG, 2002; HAOUARI; ROSADO, 2008). Além disso, tem sido demonstrado que a hiperglicemia pode levar ao aumento da produção de superóxido ( $O_2^-$ ). A interação do

$O_2^-$  com o NO pode levar à produção de peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>), com a consequente diminuição da resposta vasodilatadora endotélio-dependente (HAOUARI; ROSADO, 2008; DIKALOV, 2011).

Em diferentes tipos celulares, a produção de superóxido pode ser mediada pela ativação da proteína quinase C, que induz complexo nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato-oxidase (NADPH oxidase). Tem sido demonstrado em plaquetas que a estimulação da NADPH oxidase mediada por estímulos como o adenosina difosfato (ADP) e o colágeno pode aumentar a produção de ânions superóxido e potencializar o recrutamento destas células bem como a formação de trombos (ESSEX, 2009).

Por outro lado, produtos finais de glicação avançada (AGEs), formados a partir de interações entre os açúcares redutores e as proteínas, podem formar ligações cruzadas com o colágeno. Estas alterações têm sido associadas à rigidez vascular e ao espessamento de membranas basais, comumente observados em decorrência do diabetes mellitus. Além disso, sabe-se também que a glicação da molécula de colágeno poderia inibir a liberação de óxido nítrico derivado do endotélio, levando à vasoconstrição, a redução do fluxo plasmático e à isquemia tissular.

Portanto, a ativação plaquetária e a glicação de colágeno têm sido propostos como um dos principais mecanismos responsáveis pelo desenvolvimento das complicações cardiovasculares induzidas pelo diabetes mellitus (BARBOSA; SUZANA; SEARA, 2008; YONEKURA, et al., 2003).

## 2.1 DIABETES MELLITUS E A ATIVAÇÃO PLAQUETÁRIA

De modo geral, a ativação plaquetária ocorre por meio de uma sequência de sinalização que inicia com a ligação de um agonista ao seu receptor específico dependente de proteína G, levando a ativação da fosfolipase C e, conseqüentemente, ao aumento de cálcio intracelular e a ativação de uma série de enzimas dependentes deste íon. Esta cascata de sinais intracelulares favorece a ligação do receptor de fibrinogênio ao seu ligante bem como a ligação das plaquetas ao fibrinogênio, ao fator de von Willebrand (vWf), a vitronectina e a fibronectina. Num segundo momento, inicia-se a segunda etapa de sinalização responsável

pela segunda onda de agregação e de reorganização do citoesqueleto, que leva à firme adesão e a estabilização dos grandes agregados de plaquetas (FREEDMAN, 2008).

Vários agonistas fisiológicos capazes de induzir a agregação plaquetária têm sido relatados na literatura, tais como, a adenosina difosfato, a trombina, a tromboxano A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) e o colágeno, enquanto que substâncias como a prostaciclina (PGI<sub>2</sub>) e o NO inibem a agregação plaquetária (KRÖTZ; SOHN; POHL, 2004). Entretanto, sabe-se que espécies reativas de oxigênio (ERO) e/ou nitrogênio (ERN) como o ânion superóxido, o peróxido de hidrogênio, o radical hidroxila e o peroxinitrito também podem exercer o papel modulatório na atividade plaquetária (KRÖTZ; SOHN; POHL, 2004; BAKDASH; WILLIAMS, 2008; FREEDMAN, 2008; HAOUARI; ROSADO, 2008; KVIETYS; GRANGER, 2012). Diversos mecanismos têm sido propostos para explicar as ações pró-coagulantes destas espécies, entre os quais se destacam: a inativação do NO por interação com o ânion superóxido levando a formação de peroxinitrito, a inibição de ecto-ADPases redox-sensíveis e ao aumento da reatividade de plaquetas a agonistas como, a trombina, ADP e o colágeno (KVIETYS; GRANGER, 2012).

Entre as diversas fontes de espécies oxidantes nas plaquetas, o sistema NADPH oxidase tem recebido maior atenção pelo fato desta enzima ser ativada por agonistas como o colágeno e o ácido araquidônico, que também induzem a ativação plaquetária (SENO, et al., 2001; KRÖTZ, et al., 2002). Além disso, algumas substâncias inibidoras da NADPH-oxidase e sequestradoras de ânion superóxido, têm apresentado a ação inibitória sobre a agregação plaquetária e a deposição de colágeno no trombo (BEGONJA, et al., 2005).

No diabetes mellitus observa-se o aumento na atividade e na agregação plaquetária, sendo demonstrado que as plaquetas de pacientes diabéticos são mais sensíveis aos agonistas e apresentam melhor adesão e agregação, tanto na presença como na ausência de agentes agregantes (HAOUARI; ROSADO, 2008; GOMES; LERÁRIO, 2009). Esta atividade plaquetária aumentada em pacientes com DM tem sido associada ao aumento da produção de espécies oxidantes, a mobilização aumentada de íons cálcio e ao aumento da proteína fosforilante de tirosina (HAOUARI; ROSADO, 2008).

Apesar dos mecanismos intracelulares que levam a esta hiper-reatividade plaquetária ainda não estarem totalmente esclarecidos, os dados clínicos e experimentais demonstram que as alterações morfológicas e funcionais de plaquetas são fatores determinantes para a patogênese das alterações micro e macroangiopáticas decorrentes do DM (HAOUARI; ROSADO, 2008).

Sendo assim, a Associação Americana de Diabetes (ADA) tem recomendado que o antiagregante de escolha para os pacientes diabéticos deve ser o ácido acetil salicílico como estratégia nas prevenções primária e secundária (GOMES; LERÁRIO, 2009). O clopidogrel e a ticlopidina poderiam ser indicados nos casos de contraindicações ao uso de ácido acetil salicílico (GOMES; LERÁRIO, 2009).

Alguns estudos têm demonstrado ineficácia do ácido acetil salicílico na prevenção de eventos trombóticos (GABRIEL, et al., 2006). Além disso, algumas particularidades limitam o benefício do clopidogrel em alguns casos, principalmente a variabilidade de resposta, o início de ação lento e a irreversibilidade do seu efeito, enquanto que a ticlopidina apresenta como principal inconveniente o risco de neutropenia (GOMES; LERÁRIO, 2009; WALLENTIN, et al., 2009). Entretanto, segundo as Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes publicada em 2009, o uso de outros tipos de antiagregantes plaquetários para a prevenção de eventos trombóticos em pacientes diabéticos ainda está sendo discutido (GOMES; LERÁRIO, 2009).

## 2.2 DIABETES MELLITUS E A GLICAÇÃO DE COLÁGENO

Em condições fisiológicas, a formação de AGEs ocorre vagarosamente, porém na presença de hiperglicemia ou de estresse oxidativo, a geração de AGEs aumenta intensamente. O acúmulo destes produtos pode contribuir para o desenvolvimento e a progressão das complicações vasculares do diabetes por induzir as alterações tanto nas propriedades celulares quanto em componentes da matriz extracelular. Entre os mecanismos pelos quais os AGEs poderiam alterar a homeostase vascular, a interação desses compostos com receptores presentes na superfície celular e com as proteínas que compõem a matriz extracelular e as membranas vasculares merecem destaque (BARBOSA; SUZANA; SEARA, 2008).

A matriz extracelular constitui a mistura de colágenos, de glicoproteínas e de proteoglicanos, que atuam modulando a adesão, a migração e a proliferação celular. Desta forma a matriz extracelular está sujeita a alterações constantes em função da resposta celular do organismo (REES, et al., 2008).

No diabetes mellitus, componentes da matriz extracelular podem interagir com os açúcares livres ou ligados à proteínas por meio de reações não enzimáticas covalentes ou de oxidação. Neste processo, a molécula de glicose pode ligar-se a estrutura de proteínas, através de uma reação não enzimática denominada de reação de Maillard ou de glicação (ARONSON, 2003). No estágio inicial a glicose ou outros açúcares redutores (frutose, pentoses, galactose, manose, ascorbato e xilose) reagem com os radicais amina presentes em várias moléculas como as proteínas, os ácidos nucleicos e os lipídios formando uma base de Schiff, instável. Esta por sua vez, passa por um rearranjo gerando a cetoamina estável, conhecida como “Produto de Amadori”. No estágio intermediário, os produtos de Amadori passam por reações de oxidação e de desidratação levando a formação de uma variedade de compostos carbonila, como o glioxal, o metil glioxal e as deoxiglicosonas. Estes são mais reativos que seus precursores e atuam propagando reações com os grupos amina livres de proteínas. No estágio final, estes propagadores podem interagir com os grupamentos amina, passar por rearranjos e formar os compostos com ligações cruzadas, fluorescentes, insolúveis e irreversíveis, denominados de produtos finais de glicação avançada (AGEs), que se acumulam nas proteínas de longa duração e levam a lesões tissulares (LAPOLLA; TRALDI; FEDELE, 2005). O grau de glicação não enzimática é determinado principalmente pela glicemia e tempo de exposição das proteínas às moléculas de glicose. Portanto, o acúmulo de AGEs em proteínas de longa meia-vida na parede dos vasos que ocorre continuamente em condições fisiológicas, pode ser acelerado no diabetes (ARONSON, 2003; BARBOSA; SUZANA; SEARA, 2008).

Desta forma, vários estudos têm associado a presença de ligações cruzadas proteína-proteína na estrutura do colágeno à alterações vasculares observadas em decorrência do diabetes mellitus. Há evidências de que a formação de ligações cruzadas entre AGEs e o colágeno ou elastina conduza ao aumento na área da matriz extracelular, resultando no aumento da rigidez da vasculatura e no espessamento da membrana basal (SJOBERG; BULTERIJS, 2009).

Os AGEs podem interferir também nas interações entre as células e os componentes da matriz. Sabe-se que a agregação e a adesão plaquetária dependem da estrutura quaternária do colágeno. Tem sido demonstrado que a glicação do colágeno pode aumentar a agregação plaquetária e conseqüentemente o risco de eventos trombóticos, que por sua vez poderiam contribuir para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares (BAILEY; TURNER, 1996; HANAI, et al., 2009).

Portanto, o controle da glicação protéica é essencial para a prevenção ou redução do risco de desenvolvimento de complicações vasculares induzidas pelo diabetes mellitus (BARBOSA; SUZANA; SEARA, 2008).

### 2.3 A ESPÉCIE *Passiflora edulis* Sims

O gênero *Passiflora* compreende mais de 500 espécies e dentre estas, muitas são cultivadas pelas suas propriedades alimentícias, ornamentais ou medicinais (PEÑA; SHARP; WYSOKI, 2002; DHAWAN; DHAWAN; SHARMA, 2004).

A espécie *Passiflora edulis* é conhecida popularmente como maracujá, maracujá-de-comer, maracujá-comum, maracujá-de-doce, maracujá do mato, maracujá-mirim, maracujá-peroba, maracujá-roxo, maracujá-de-ponche (ALMEIDA, 1993; SACCO, 1980; PEÑA, SHARP; WYSOKI, 2002). Na região de Alfenas esta espécie é conhecida como maracujá azedo.

É uma planta trepadeira glabra, com as folhas simples, trilobadas com lobos elípticos ou ovado-elípticos, agudos ou acuminados, dentadas quando adultas, com a base arredondada, subtruncada ou cuneada; a lâmina foliar subcoriácea, lustrosa na face adaxial e trinervada. Apresenta as flores brancas solitárias nas axilas das folhas, com franja roxa, medindo cerca de 5,0 cm de diâmetro; o pedúnculo firme com até 6,0 cm de comprimento; as sépalas alongadas, externamente verdes e internamente brancas; as pétalas obtusas e brancas; a coroa com 4 a 5 séries filamentosas sendo, duas séries externas com até 2,5 cm de comprimento, encrespadas no ápice, brancos e arroxeados na base; o ovário globóide ou volumoso, tomentoso, raramente glabro (Figura 2).

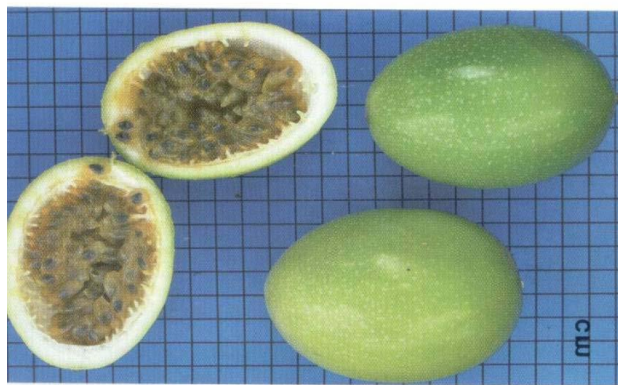
Figura 2 - Detalhes das folhas e das flores de *Passiflora edulis* Sims.



Fonte: Lorenzi (2002).

O fruto é globóide com 5,0 a 7,0 cm de diâmetro, amarelo ou amarelo-esverdeado ou salpicado arroxeadado quando maduro (Figura 3). Floresce desde setembro até março, quando ocorre a frutificação (SACCO, 1980; ALMEIDA, 1993).

Figura 3 - Detalhe do fruto de *Passiflora edulis* Sims.



Fonte: Lorenzi (2002).

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

Dentre os constituintes químicos da *Passiflora edulis* estão os glicosídeos (MARECK, et al, 1991), os alcalóides (LUTOMSKI; MALEK, 1975) e os compostos fenólicos (CHASSAGNE; BOULANGER; CROUZET, 1999; WINTERHALTER, 1990; CHALLIER,

et al, 1990), entre os quais, destacam-se os flavonóides tais como a isoorientina, a orientina, a vitexina, a apigenina, entre outros (DHAWAN; DHAWAN; SHARMAL, 2004; ZERAIK, et al., 2012).

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

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

#### 2.4 USO DE EXTRATO DE FOLHAS DE MARACUJÁ

Os dados da literatura demonstram que os extratos das folhas de *Passiflora edulis* Sims têm sido utilizados na medicina popular com diferentes funções tais como: sedativa, ansiolítica, anti-helmíntica, anti-diarréica, anti-hipertensiva, anti-inflamatória, hipoglicemiante e antibacteriana (DHAWAN; DHAWAN; SHARMA, 2004; BARBOSA; SUZANA; SEARA, 2008; KANNAN; PARIMALA; JAYAKAR, 2011). Além disso, os componentes ativos obtidos das folhas de *Passiflora edulis* Sims estão incluídos em diversas preparações fitoquímicas citadas pela Farmacopéia Brasileira (1977)

Garros, et al (2006) relataram que as folhas de *Passiflora edulis* Sims 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 de fibroblastos. O extrato das folhas foi obtido por maceração hidroetanólica a 70%. A aplicação tópica foi realizada com a pasta obtida na maceração, após a filtragem e a evaporação do solvente.

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

Rudnicki (2007) observaram a atividade antioxidante *in vitro* e *ex vivo* em extratos etanólicos de folhas de *P. edulis* e *P. alata*. Ainda neste estudo, os autores demonstraram que

estes extratos foram capazes de inibir a formação de produtos finais de glicação (AGEs), sugerindo que possam exercer um efeito benéfico sobre o controle do diabetes. Contudo o mecanismo de inibição da formação de AGEs por extratos de plantas do gênero *Passiflora* ainda não está totalmente estabelecido.

Carvalho, et al. (2010) demonstraram através de ensaios *in vitro* que o extrato etanólico de *Passiflora nítida* Kunth apresentou o efeito inibidor sobre a agregação plaquetária induzida pela adrenalina, sendo este efeito superior ao observado pelo ácido acetil salicílico, utilizado como controle. Os autores atribuíram esta atividade em parte, à presença de flavonóides e de cumarinas, sugestivamente presentes na caracterização fitoquímica realizada para esta espécie.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho tem como objetivo geral determinar o teor de fenóis totais e avaliar os efeitos do extrato seco das folhas de *Passiflora edulis* Sims sobre os marcadores bioquímicos, a glicação de colágeno, a ativação e a agregação plaquetária em ratos diabéticos.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Para atingir tais objetivos, realizamos a padronização e a obtenção do extrato seco das folhas de *Passiflora edulis* Sims e analisamos o efeito do extrato seco das folhas de *Passiflora edulis* Sims sobre a produção de espécies oxidantes em plaquetas, a glicemia de jejum e os níveis de hemoglobina glicada no sangue, os marcadores séricos da função renal, o perfil lipídico sérico, a glicação de colágeno e a agregação plaquetária induzida pelo ADP em ratos normais e diabéticos.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

O material vegetal de escolha foram as folhas de *Passiflora edulis* Sims, onde estas foram coletadas no Bairro Mandassaia, município de Alfenas-MG, localizadas a 789 m do nível do mar, com latitude 21° 27' 33'' S, longitude 46° 01' 59'' W. A excisata 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 22356.

### 4.1 SECAGEM DAS FOLHAS

A determinação da perda por secagem (PPS) das folhas de *Passiflora edulis* Sims foi realizada em estufa à  $39,6 \pm 0,7^\circ\text{C}$  com 205,24g da droga vegetal fresca, sendo mensurado seu peso em turnos de 5h, até o peso constante.

### 4.2 GRANULOMETRIA

Foram pesados 150 g das folhas secas e pulverizadas em moinho de faca Marconi®, onde em seguida foram submetidas à passagem por tamises em tamizador Belter®, previamente tarados, com as aberturas de malha previamente padronizadas de 125 µm, 150 µm, 180 µm, 280 µm, 355 µm e 710 µm, durante 15 min. Para a análise dos dados foram calculados o tamanho médio das partículas pelo método aritmético, conforme a Equação 1, e construído o histograma de frequência para a análise da distribuição granulométrica.

Foi utilizada a seguinte expressão dada por Samyra, et al., (2009) para o cálculo do diâmetro médio das partículas:

$$d_{\text{médio}} = \frac{\sum(AM \cdot Fr\%)}{100\%} \quad [1]$$

Onde:  $d_{\text{médio}}$  = 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

As folhas de *Passiflora edulis* Sims foram secas em estufa, a temperatura de  $39,6 \pm 0,7^{\circ}\text{C}$ , durante 72h, sendo em seguida pulverizadas. O extrato seco foi obtido por maceração, das folhas secas e pulverizadas, na proporção de 1 parte de pó para 10 partes de solução hidroetanólica 70%(V/V), seguida de evaporação sob pressão reduzida à  $45,7 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$  e de liofilização à  $-53^{\circ}\text{C}$ , 429  $\mu\text{Hg}$  por 78 horas e 55 minutos (MANCINI, 2001). O extrato seco obtido após o processo de extração, teve um rendimento total de  $18,64 \pm 0,6$  g de extrato seco em 100 g da droga vegetal seca e pulverizada.

#### 4.4 ETAPA QUÍMICA

##### 4.4.1 Análise quantitativa do teor de fenóis totais.

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

#### 4.5 ANIMAIS

Foram utilizados ratos machos *Wistar*, com peso de  $300 \pm 25\text{g}$ , obtidos no Biotério da Universidade Federal de Alfenas. Os animais foram mantidos em caixas de polietileno,

receberam água e ração comercial ad libitum. Os procedimentos foram realizados de acordo com os princípios éticos na experimentação animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), aprovado pelo comitê de ética em pesquisas animais da Universidade Federal de Alfenas (nº 398/2012).

#### 4.5.1 Grupos experimentais

Para o desenvolvimento dos experimentos foram utilizados quatro grupos experimentais contendo 72 animais. Foram considerados como grupo controle negativo, os animais não diabéticos e não submetidos ao tratamento com o extrato seco das folhas de *Passiflora edulis* Sims. O grupo denominado de “diabetes” foi composto por animais submetidos ao tratamento com o aloxano e não tratados com o extrato seco. O grupo denominado de “extrato seco” foi composto por animais não diabéticos e tratados com extrato seco, enquanto que o grupo denominado de “diabetes extrato seco” foi composto por animais submetidos ao tratamento com o aloxano e tratados com o extrato seco.

#### 4.6 INDUÇÃO DO DIABETES MELLITUS

Para induzir o diabetes foi administrado, por via intraperitoneal, a droga diabetogênica Aloxano na dose de 150 mg/Kg de peso corporal, dissolvido em salina 0,9% (pH 4,5). Foram considerados diabéticos os animais que apresentaram glicemia casual, pelo teste de glicemia capilar usando tiras reativas, os animais que apresentaram glicemia acima de 200mg/dL (JAOUHARI; LAZREK; JANA, 2000; TANG, et al., 2006).

#### 4.7 ADMINISTRAÇÃO DO EXTRATO SECO

O extrato foi reconstituído em água e administrado por gavagem durante 90 dias,

tendo como início do tratamento, um mês após a indução e a confirmação do diabetes pelo teste de glicemia capilar. A quantidade de extrato administrada aos animais foi de 200 mg do extrato por quilo de peso do animal. A concentração da solução final foi de 0,2g/mL, sendo calculado para cada animal o volume adequado ao seu peso. Para o grupo controle negativo foi administrado 0,5 mL de água (DHANABAL, et al., 2005).

#### 4.8 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS BIOLÓGICAS

Os animais foram anestesiados e o sangue foi colhido por punção da artéria abdominal, utilizando scalp 19G e distribuído em três alíquotas. A primeira alíquota do sangue colhido foi distribuída em tubos para centrífuga tipo falcon contendo como anticoagulante o citrato de sódio e utilizada para a obtenção do plasma rico em plaquetas (PRP). A proporção de sangue e de anticoagulante foi igual 1:9 (v/v). A segunda alíquota de sangue foi distribuída em tubos contendo gel ativador de coágulo para a obtenção do soro. Após a coagulação do sangue, as amostras foram centrifugadas a 2500 rpm por 10 minutos. O soro foi separado e utilizado para a avaliação dos parâmetros bioquímicos. A terceira alíquota do sangue colhido foi distribuída em tubos contendo anticoagulante EDTA e o sangue total foi utilizado para a dosagem da hemoglobina glicada (HbA<sub>1C</sub>).

#### 4.9 OBTENÇÃO DAS PLAQUETAS LAVADAS

O sangue colhido com o citrato de sódio 1:9 foi centrifugado em centrífuga da marca Excelsa<sup>®</sup> II Mod. 206 BL a 435 g a temperatura ambiente por 15 minutos, dentro de no máximo quatro horas após a coleta do sangue, para a obtenção do plasma rico em plaquetas (PRP). Em seguida, o tampão de lavagem (NaCl 140 mM, KCl 0.5 mM, citrato trissódico 12 mM, glicose 10 mM e sacarose 12.5 mM, pH 6) na proporção 7:5 (tampão/plasma) foi adicionado ao PRP e centrifugados por 13 min a 822 g. O precipitado plaquetário foi ressuspenso em solução de Krebs-Ringer desprovida de cálcio, com pH rigorosamente ajustado para a faixa de 7,2 – 7,4 em CO<sub>2</sub>.

#### 4.10 CONTAGEM DE PLAQUETAS

A contagem de plaquetas foi realizada, baseando-se em princípios de impedância proposto por Wallace Coulter, em aparelho automatizado da marca Wiener lab. Counter 19.

#### 4.11 ENSAIOS

##### 4.11.1 Avaliação da agregação plaquetária

A avaliação da agregação plaquetária através da curva de agregação trata-se de um método baseado na medida de formação de agregados plaquetários frente a um agente agregante. Para a realização do ensaio, foi utilizado  $2 \times 10^8$  plaquetas por reação, previamente incubado com 1mM de Cloreto de Cálcio ( $\text{CaCl}_2$ ), por 5 minutos a  $37^\circ\text{C}$  (MUSTAD, et al., 1997). Em seguida foi adicionado  $5\mu\text{M}$  do agente agregante adenosina 5'-difosfato (ADP) da marca Sigma  $\geq 95\%$ , sendo a variação da transmissão da luz monitorada pelo método turbidimétrico por 5 minutos estandarizado na temperatura de  $37^\circ\text{C}$  (SILVA; AMICO, 2010). As medidas de agregação foram realizadas em cubetas de agregação em agregômetro de plaquetas PA-04 Qualitem Eletronica tendo como volume final de reação  $410\mu\text{L}$ .

Para a determinação da concentração do agente agregante utilizado, foi determinado uma curva de concentração-resposta de ADP ( $0,75\mu\text{M}$ ,  $1\mu\text{M}$ ,  $2,5\mu\text{M}$ ,  $5\mu\text{M}$ ,  $7,5\mu\text{M}$ ,  $10\mu\text{M}$  e  $20\mu\text{M}$ ), onde determinamos a concentração de  $5\mu\text{M}$  sendo a melhor concentração para o ensaio. Segundo Silva e Amico, (2010), os agentes agregantes em doses baixas ( $0,75\mu\text{M}$ ) podem aumentar o número de hipoagregantes, assim como agentes agregantes em doses altas ( $10\mu\text{M}$ ) tendem a falsear o efeito de fármacos na prevenção de eventos trombóticos pela atuação do fármaco na função das plaquetas.

##### 4.11.2 Avaliação da produção de espécies oxidantes

A produção de espécies oxidantes foi determinada por quimiluminescência dependente de luminol, um agente amplificador de quimioluminescência, em aparelhador da marca Glomax 20/20 Luminometer. Durante o ensaio, o luminol interage com as espécies reativas de oxigênio formadas durante o *burst* respiratório tais como, o radical hidroxila, o oxigênio singlete e o ácido hipocloroso formando o ânion aminoftalato (eletronicamente excitado) que ao retornar ao seu estado basal emite luz. Para a avaliação da produção destas espécies, a suspensão de plaquetas ( $2 \times 10^8$  céls/reação) foi incubada com PBS e 30  $\mu$ L de luminol  $10^{-3}$  M. Em seguida foi adicionado PMA (16 ng/ensaio) e a reação foi monitorada durante 50 minutos, na presença e ausência de SOD.

#### 4.11.3 Extração de colágeno tipo 1 de tendão de cauda de ratos Wistar.

De acordo com Maria e Wada (1996) extraímos dos tendões de cauda de ratos Wistar, com auxílio de alicate/pinça Kelly. As fibras foram secas à temperatura ambiente por 24 horas, pesadas e lavadas em etanol 70%. O colágeno foi então solubilizado em ácido acético (0,5M), sob agitação por 48 horas a 4°C.

A solução de colágeno foi purificada por centrifugação, lavagem em solução de NaCl 20% e dialise em membrana de diálise Spectra® com a capacidade de vol/cm de 3,2mL, e a abertura de 12 – 14000 kD, contra água destilada autoclavada a 2 - 8 °C sob agitação por 48 horas. Após a dialise o colágeno foi armazenado entre 2 - 8 °C para análise da glicação por fluorescência conforme Paeon, et al., 2007.

#### 4.11.4 Análise da glicação do colágeno

A quantificação dos níveis de pentosidina e de AGEs totais nas amostras de colágeno, foi determinada por fluorimetria de acordo com Paeon, et al., (2007). Ao colágeno previamente dialisado, foi adicionado de pepsina 0,2mg pepsina/mL ácido acético 0,5M, na

proporção de 1:1 v/v e incubado em overnight à 37°C sob agitação para a digestão da proteína. Ao final da incubação o pH foi ajustado para 7 com NaOH 1M, sendo posteriormente centrifugado à 3000g por 10 minutos. O sobrenadante foi recolhido, onde foram quantificados os teores de pentosidina e de AGEs totais em fluorímetro da marca Cary Eclipse Varian®. Tendo para pentosidina  $\lambda$  excitação à 328 nm e  $\lambda$  emissão à 378 nm e para os AGEs totais  $\lambda$  excitação à 370 nm e  $\lambda$  emissão à 440 nm. Os valores de fluorescência foram corrigidos pelos valores de proteínas totais.

Os teores de proteínas totais nas amostras de colágeno foram determinados usando o ensaio de Ácido Bicinconínico dissódico (BCA-Na<sub>2</sub>). Uma alíquota de amostra, previamente diluída (1:50 em água deionizada), foi incubada por 60 minutos à 60°C, na presença de CuSO<sub>4</sub> (0,16 M), BCA-Na<sub>2</sub> (0,1 M), NaCO<sub>3</sub> (0,8 M), NaOH (0,4 M) e KNaC<sub>4</sub>H<sub>4</sub>O<sub>6</sub>·4H<sub>2</sub>O (0,006 M, tendo pH ajustado para 11,25 com a adição controlada do pó de NaHCO<sub>3</sub>. Após a incubação, foram feitas as leituras em leitor de microplaca, utilizando o comprimento de onda de 562 nm. A concentração de proteínas foi determinada utilizando uma curva padrão de albumina proveniente de soro bovino, marca Sigma-Aldrich®, nas concentrações de 31,25 à 500 µg/mL.

#### 4.11.5 Avaliação da glicemia de jejum, do colesterol total e das frações, da uréia e de creatinina.

As concentrações de glicose, uréia, colesterol total e frações foram determinadas no soro por método enzimático colorimétrico de ponto final. Os níveis séricos de creatinina foram determinados pelo método de Jaffé modificado, utilizando um kit adquirido comercialmente, cujo procedimento de medição foi calibrado com o material de referência SRM 914 do *National Institute of Standards and Technology* (NIST), tornando os resultados rastreáveis ao método definitivo (espectrometria de massas com diluição isotópica) (BURTIS; ASHWOOD, 1999).

#### 4.11.6 Avaliação da hemoglobina glicada

Para a avaliação da hemoglobina glicada foi determinada a concentração de HbA<sub>1</sub>C no sangue total por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), em equipamento da marca Bio-Rad D-10<sup>TM</sup> Hemoglobin Testing System.

#### 4.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os valores observados de cada variável foram submetidos à análise de variância. As comparações múltiplas entre as médias dos diferentes tratamentos foram realizadas utilizando-se o teste Tukey a 5% de probabilidade no programa Sisvar versão 5.3.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 5.1 DROGA VEGETAL

A determinação da PPS das folhas de *Passiflora edulis* Sims ocorreu em estufa à  $39,6 \pm 0,7^\circ\text{C}$  com 205,24g da droga vegetal fresca, onde a estabilização no processo de secagem da droga vegetal se deu após 72h de secagem em estufa, conforme demonstram os resultados da tabela 1.

Tabela 1 - Relação de massa fresca e seca das folhas de *Passiflora edulis* Sims.

<b>Massa Fresca (g)</b>	<b>Massa Seca (g)</b>	<b>Perda (g e %)</b>	<b>Temperatura (<math>^\circ\text{C}</math>)</b>	<b>Tempo (h)</b>
205,24	51,92	153 e 74,7	$39,6 \pm 0,7$	72

Fonte: Do autor.

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

### 5.2 ANÁLISE GRANULOMÉTRICA DOS PÓS

O grau de divisão ou a granulometria de pós é expresso pela referência à abertura nominal da malha do tamis utilizado (BRASIL, 2010). Sendo que 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 droga vegetal e o líquido extrator (ROLIM, et al., 2012).

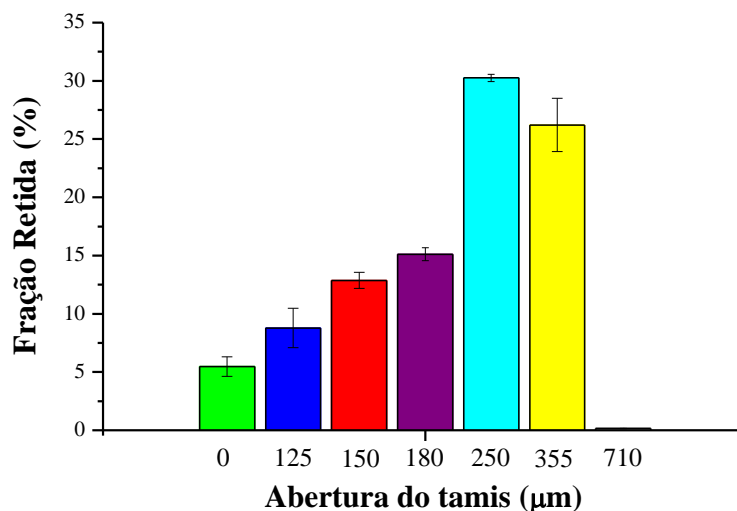
Os resultados do teste da determinação da granulométrica dos pós de *Passiflora edulis* Sims e o histograma de distribuição granulométrica realizados segundo Brasil (2010), estão apresentados na tabela 2 e Gráfico 1. Os resultados mostra que as partículas do material vegetal encontram-se predominantemente distribuída no tamis com abertura de malha de 250  $\mu\text{m}$ , representando  $30,25 \pm 0,30$  % de todo material. O diâmetro médio de partícula calculado conforme equação 1, do pó das folhas foi de  $226 \pm 7,81$   $\mu\text{m}$ .

Tabela 2 - Frequências percentuais e tamanho médio das partículas na análise granulométrica das folhas de *Passiflora edulis* Sims.

Nº do Tamis (ABNT/ASTM)	Abertura de Malha ( $\mu\text{m}$ )	Massa de Pós Retido (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	$0,23 \pm 0,03$	$0,15 \pm 0,02$
$d_{\text{médio}} (\mu\text{m})$			$226 \pm 7,81$

Fonte: Do autor

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



Fonte: Do autor.

Desta forma, segundo Simões, (2007) classificamos o corte das folhas de *Passiflora edulis* Sims como sendo, corte fino, uma vez que o diâmetro médio de partícula encontra se entre 50 e 500  $\mu\text{m}$  de diâmetro.

### 5.3 ETAPA QUÍMICA

#### 5.3.1 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, de saponinas e principalmente de polifenóis (MULLER, et al. 2005; PEREIRA, et al. 2004).

Considerando os resultados observados em diferentes estudos que têm demonstrado a presença de compostos fenólicos em extratos obtidos de folhas de *Passiflora edulis* Sims, no presente estudo foi determinada a concentração de fenóis totais presentes no extrato seco utilizando do método de Folin & Ciocalteu, cujo resultado encontra-se na tabela 3.

Tabela 3 – Conteúdo de polifenóis totais (PT) do extrato seco de folhas de *Passiflora edulis* Sims.

<b>Concentração Extrato (g%)</b>	<b>PT<sup>1</sup> (g EAG/100 g de Extrato)</b>
Extrato Seco	4,67 ± 0,115

Legenda: Os resultados representam a média ± erro padrão da média, realizadas em triplicata. <sup>1</sup> PT = Polifenóis Totais.

Fonte: Do Autor

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

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

Apesar do reagente Folin-Ciocalteu ser um método muito utilizado para estimar conteúdo destes compostos em extratos vegetais, este é capaz de interagir também com compostos não fenólicos, como açúcares e metais, podendo resultar em valores superestimados de fenóis totais (IKAWA, et al., 2003). Sendo assim, alguns autores têm

sugerido que os resultados obtidos através desta metodologia deveriam ser interpretados como uma estimativa da capacidade redutora total das amostras analisadas (HUANG; OU; PRIOR, 2005)

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

## 5.4 ETAPA BIOLÓGICA

### 5.4.1 Glicemia de jejum e glicação de proteínas no sangue total.

A ação de compostos fenólicos presentes nos extratos vegetais tem sido alvo de diversos estudos que buscam avaliar os seus possíveis efeitos terapêuticos sobre diversas patologias entre as quais destaca-se o diabetes mellitus (LAPOLA; TRALDI; FEDELE, 2005).

Estudos têm demonstrado que as desordens metabólicas e as complicações crônicas frequentemente observadas em indivíduos diabéticos estão diretamente relacionadas à hiperglicemia assim como à concentração de produtos de glicação no sangue (SILVA-COSTA, 2008; RONDEAU; BOURDON, 2011; COHEN, et al., 2003; BROWLEE, 1995). Assim, a determinação de produtos de glicação como as frutosaminas e a hemoglobina glicada tem sido utilizada para avaliar o controle metabólico de pacientes diabéticos (LAPOLLA; TRALDI; FEDELE, 2005).

No presente trabalho foram avaliados os efeitos do extrato seco de *Passiflora edulis* Sims sobre a glicemia e níveis de hemoglobina glicada em ratos diabéticos, sendo observado que a glicemia de jejum assim como a concentração de hemoglobina glicada no sangue dos animais diabéticos tratados com o extrato seco foram significativamente menores quando comparados com os animais diabéticos não tratados (Tabela 4, Figura 4).

Tabela 4 - Avaliação da glicemia de jejum e da concentração de hemoglobina glicada em ratos Wistar.

<b>Grupos</b>	<b>Glicemia de Jejum (mg/dl)</b>	<b>HbA1C (%)</b>
Controle Negativo (n=16)	171,9 ± 14,4 <sup>a</sup>	11,5 ± 0,51 <sup>a</sup>
Extrato Seco (n=17)	177,7 ± 39,1 <sup>a</sup>	10,6 ± 0,99 <sup>a</sup>
Diabético (n=16)	486,8 ± 18,9 <sup>b</sup>	21,2 ± 2,43 <sup>b</sup>
Diabético Extrato Seco (n=18)	353,7 ± 99,6 <sup>c</sup>	16,9 ± 2,60 <sup>c</sup>

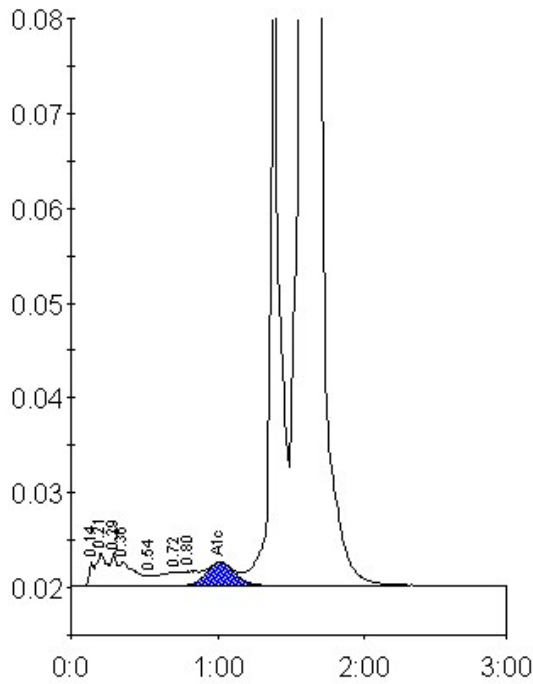
Legenda: As determinações foram realizadas em amostra de sangue total e soro, obtidas durante e após a eutanásia, respectivamente. Os resultados representam a média ± desvio padrão de 16-18 determinações por tratamento. Foi determinado a ANOVA tendo como significância  $p < 0,05$ .

Fonte: Do autor.

Sabe-se que a formação da hemoglobina glicada, envolve a interação entre o grupo nucleofílico de moléculas de glicose e o grupamento amina da hemoglobina. Desta forma, a determinação da glicemia de jejum reflete o controle glicêmico momentâneo enquanto que a determinação de hemoglobina glicada reflete o controle glicêmico de algumas semanas anteriores à coleta do sangue (BURTIS; ASHWOOD, 1999; KOGA, et al., 2013). Portanto, nossos resultados demonstraram que o extrato de *Passiflora edulis* Sims foi capaz de melhorar o controle glicêmico nos animais diabéticos.

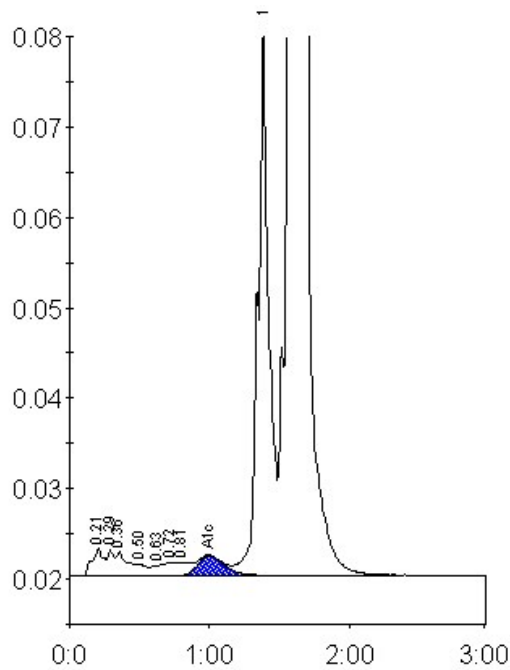
Entre as estratégias adotadas para prevenção do retardo da progressão de complicações crônicas induzidas pelo diabetes, o controle glicêmico e a manutenção dos níveis de hemoglobina glicada dentro dos limites desejáveis, são sem dúvida os principais (ADA, 2012). Diversos estudos têm utilizado a mensuração de produtos de glicação no sangue de diabéticos para avaliar o risco de progressão de complicações, demonstrando a correlação positiva entre níveis de proteínas glicadas em amostras sanguíneas e a prevalência de complicações crônicas induzidas pelo diabetes mellitus (RONDEAU; BOURDON, 2011; COHEN, et al., 2003; BROWLEE, 1995).

Figura 4 - Perfil cromatográfico e perfil de área da HbA<sub>1c</sub> em sangue total de ratos Wistar.



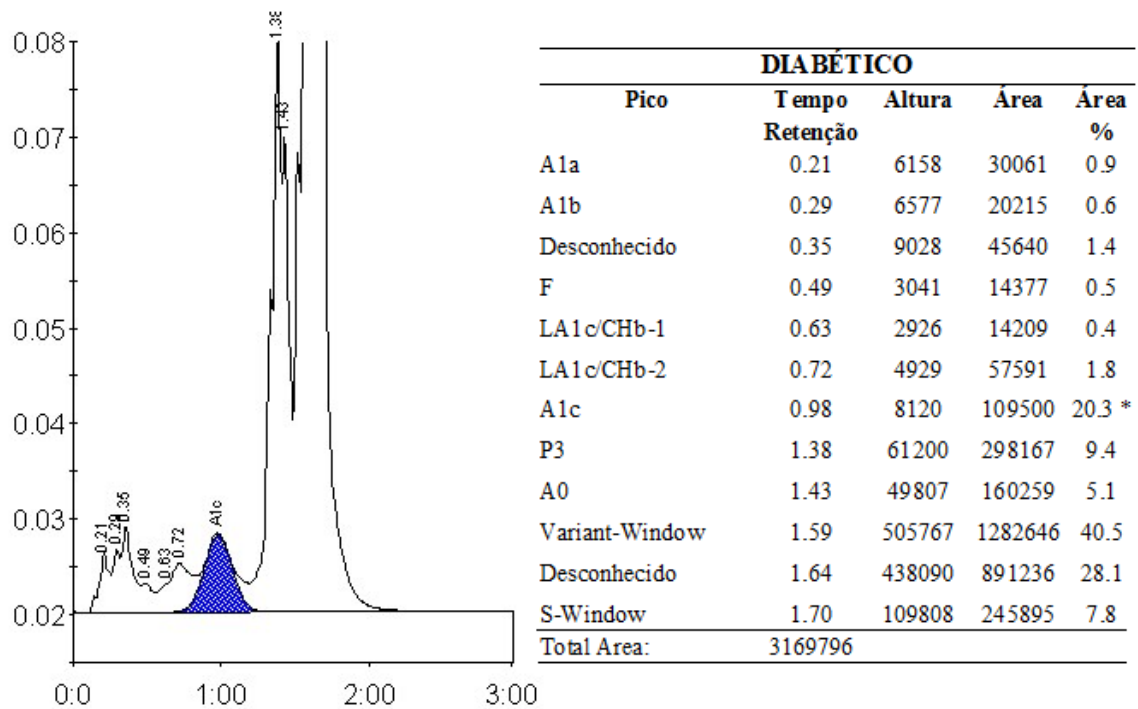
<b>CONTROLE NEGATIVO</b>				
Pico	Tempo Retenção	Altura	Área	Área %
A1a	0.21	3469	16577	0.5
A1b	0.29	3464	9490	0.3
Desconhecido	0.36	2555	17409	0.6
F	0.54	1140	5008	0.2
LA1c/CHb-1	0.72	1405	13622	0.4
LA1c/CHb-2	0.80	1412	15674	0.5
A1c	1.02	2441	32816	10.9
P3	1.38	71353	324811	10.7
Variant-Window	1.60	529740	1382925	45.6
Desconhecido	1.64	444092	935403	30.9
S-Window	1.70	105000	271253	9.0
<b>Total Área:</b>			<b>3030399</b>	

a)

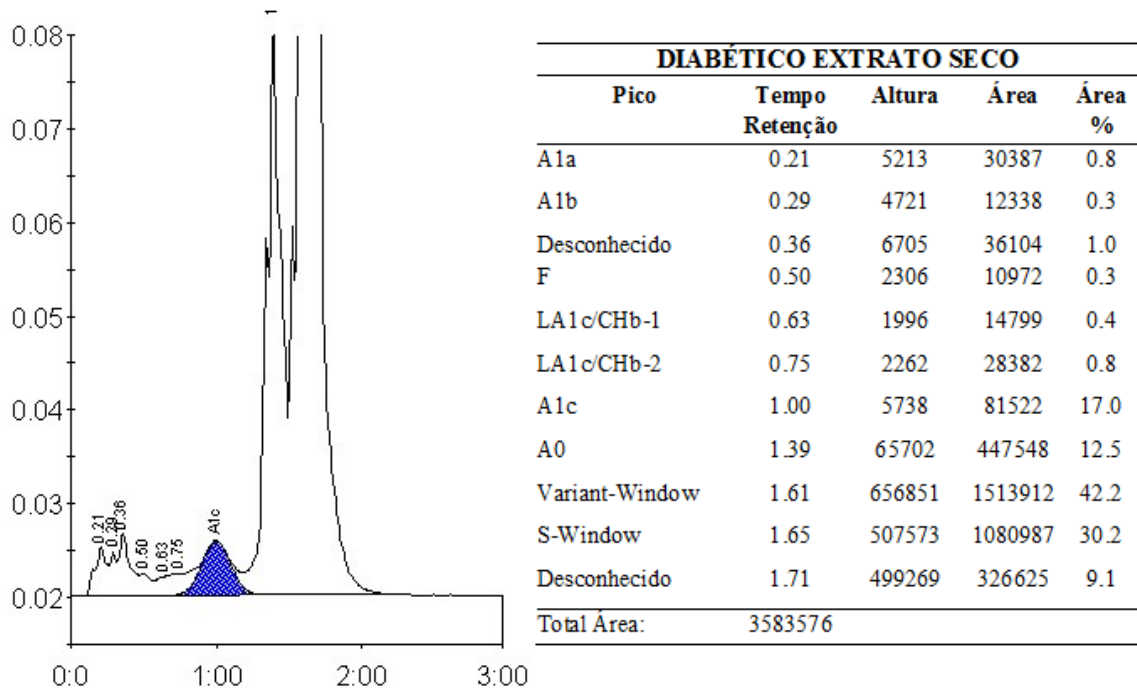


<b>CONTROLE EXTRATO SECO</b>				
Pico	Tempo Retenção	Altura	Área	Área %
A1a	0.21	3114	17467	0.6
A1b	0.29	2934	9505	0.3
Desconhecido	0.36	2647	15798	0.6
F	0.50	1260	6115	0.2
LA1c/CHb-1	0.63	1142	6682	0.2
LA1c/CHb-2	0.81	1328	13449	0.5
A1c	1.00	2232	30139	10.1
P3	1.38	61258	330708	11.9
Variant-Window	1.60	507705	1219270	43.8
Desconhecido	1.65	396925	862921	31.0
S-Window	1.70	115883	258348	9.3
<b>Total Área:</b>			<b>2781125</b>	

b)



c)



d)

Legenda: A Figura acima representa o perfil cromatográfico de um animal por grupo. a) Perfil cromatográfico da HbA<sub>1c</sub> em sangue total de ratos não diabéticos, b) Perfil cromatográfico da HbA<sub>1c</sub> em sangue total de ratos não diabéticos tratados com o extrato seco das folhas de *Passiflora edulis* Sims; c) Perfil cromatográfico da HbA<sub>1c</sub> em sangue total de ratos diabéticos, d) Perfil cromatográfico da HbA<sub>1c</sub> em sangue total de ratos diabéticos tratados com o extrato seco das folhas de *Passiflora edulis* Sims. As determinações foram realizadas em amostra de sangue total, obtidas durante a eutanásia. Os resultados representam o perfil cromatográfico de uma determinação para cada grupo analisado.

Fonte: Do autor.

Nossos resultados corroboram com dados da literatura que relatam uma ação hipoglicemiante para extratos de folhas de diferentes espécies do gênero *Passiflora*. Doyama (2005) relataram que extratos alcoólicos de folhas de *P. edulis*, *P. mollissima* e *P. quadrangulares* apresentaram a ação hipoglicemiante quando administrados por via oral a ratos diabéticos, durante o período de 8 dias. Gupta, et al. (2012) observaram que o extrato metanólico de *Passiflora incarnata* foi capaz de reduzir os níveis glicêmicos de camundongos portadores de diabetes induzido por estreptozotocina. Colomeu, (2014) observaram que o extrato aquoso de *Passiflora alata* foi capaz de reduzir frequência de diabetes o efeito em camundongos com diabetes tipo 1 espontâneo (diabéticos não obeso –NOD). Além disso, estudos *in vitro* demonstraram que os extratos hidroetanólicos das folhas de *P. alata* inibiram a formação de AGEs a partir da interação entre albumina e glicose (RUDNICKI, et al., 2007). Nestes estudos, os autores sugeriram que estes efeitos poderiam ser atribuídos aos compostos fenólicos presentes nestes extratos.

Tendo em vista os resultados obtidos na análise quantitativa do teor de fenóis totais, assim como diversos estudos demonstrando que plantas medicinais ricas em polifenóis podem apresentar atividade hipoglicemiante e ou anti-glicante (RUDNICKI, et al., 2007; LUCENFORD; GUGLIUCCI, 2005), nossos resultados sugerem que os efeitos do extrato de *Passiflora edulis* Sims sobre a glicemia de jejum e concentração de HbA1C no sangue de ratos diabéticos observados neste estudo também poderiam ser atribuídos à presença de compostos fenólicos no extrato analisado.

Embora os mecanismos farmacológicos responsáveis por estes efeitos ainda não estejam totalmente esclarecidos, tem sido sugerido que os polifenóis poderiam inibir dissacaridases tais como a  $\alpha$ -amilase e a glicosidase no lumen intestinal, reduzindo a absorção de açúcares. Outro mecanismo que poderia justificar os efeitos hipoglicemiantes de compostos fenólicos seria o aumento da captação de glicose pelo músculo esquelético e pelo tecido adiposo bem como da atividade da glicoquinase hepática, favorecendo a síntese de glicogênio e suprimindo a gliconeogênese. Ainda, os polifenóis poderiam proteger a célula beta pancreática, favorecendo a secreção de insulina (ANHÊ, et al., 2013).

Além de seus efeitos hipoglicemiantes, é conhecido que compostos fenólicos, principalmente alguns flavonoides, são capazes de inibir processos oxidativos, sendo sugerido que o uso racional destes compostos poderia contribuir para a prevenção ou redução da progressão de doenças associadas ao estresse oxidativo.

A via de glicação protéica envolve auto-oxidação de açúcares livres na presença de oxigênio e de metais livres, formação de compostos carbonila mais reativos e de cetoaminas altamente reativas (BARBOSA; SUZANA; SEARA, 2008). Desta forma, a redução da concentração de HbA1C observada nos animais diabéticos tratados com o extrato seco de *Passiflora edulis* Sims poderia ser explicada tanto pelo efeito hipoglicemiante do mesmo como também pelo interrompimento de uma das reações que levam à glicação protéica.

#### 5.4.2 Níveis séricos de uréia e creatinina

Considerando que a glicação de proteínas tem sido apontada como um dos principais mecanismos responsáveis pelas lesões glomerulares observadas na nefropatia diabética (FARIA, 2001; VLASSARA; STRIKER, 2013), foram avaliados os níveis de uréia e de creatinina no soro dos animais pertencentes aos diferentes grupos estudados (Tabela 5). Foi observado o aumento significativo nos níveis séricos de uréia e de creatinina no grupo de animais diabéticos não tratados com o extrato seco de *Passiflora edulis* Sims quando comparados aos animais não diabéticos. Os níveis séricos de creatinina no grupo de animais diabéticos tratados com o extrato foram significativamente menores que no grupo de animais diabéticos não tratados. Nenhuma diferença significativa foi observada em relação aos níveis séricos de uréia quando estes dois grupos foram comparados.

Tabela 5 – Níveis séricos de ureia e creatinina em ratos diabéticos e não diabéticos, tratados e não tratados com o extrato seco de folhas de *Passiflora edulis* Sims.

<b>Grupos</b>	<b>Uréia (mg/dl)</b>	<b>Creatinina (mg/dl)</b>
Controle Negativo (n=16)	51,57 ± 12,3 <sup>a</sup>	0,57 ± 0,05 <sup>a</sup>
Extrato Seco (n=17)	48,12 ± 4,64 <sup>a</sup>	0,51 ± 0,07 <sup>a</sup>
Diabético (n=16)	119,6 ± 32,4 <sup>b</sup>	0,82 ± 0,09 <sup>b</sup>
Diabético Extrato Seco (n=18)	109,3 ± 30,6 <sup>b</sup>	0,50 ± 0,15 <sup>a</sup>

Legenda: As determinações foram realizadas em amostra de soro obtidas após a eutanásia. Os resultados representam a média ± desvio padrão de 16-18 determinações por tratamento. Foi determinado a ANOVA tendo como significância  $p < 0,05$ .

Fonte: Do autor.

A lesão renal é uma complicação crônica microvascular muito frequente em pacientes diabéticos e em modelos animais com diabetes induzido por drogas (LEVEY, et al., 2006; FARIA, 2001). Estes danos têm sido associados à glicemia e as concentrações de

hemoglobina glicada elevadas (MURUSSI, et al., 2008; VIANNA; GONZÁLEZ; MATIJASEVICH, 2012; MORESCO, et al., 2013).

Sabe-se que em casos de lesão renal os níveis de uréia e de creatinina apresentam-se elevados. No presente estudo observamos que a administração do extrato seco das folhas de *Passiflora edulis* Sims foi capaz de manter os níveis séricos de creatinina em valores comparáveis aos dos animais não diabéticos, sugerindo que o extrato apresentou um efeito benéfico sobre a função renal nos animais diabéticos, uma vez que a determinação da creatinina sérica pode ser considerada como um teste de rastreio da filtração glomerular. Estes resultados poderiam ser atribuídos ao melhor controle glicêmico apresentado por estes animais, conforme avaliado através da determinação da glicemia em jejum e concentração de HbA1C no sangue (Tabela 4).

Por outro lado, a administração do extrato não foi capaz de conter o aumento dos níveis séricos de uréia. Apesar da determinação de uréia ser mais sensível que a de creatinina, é conhecido que sua determinação sérica tem menor especificidade na avaliação da filtração glomerular, já que seus níveis séricos podem elevar-se devido a causas não renais tais como a desidratação, o catabolismo proteico aumentado, a redução do volume sanguíneo, entre outras. Neste sentido, é importante ressaltar que além de uma possível desidratação induzida pela poliúria em consequência da hiperglicemia, no diabetes mellitus, o catabolismo proteico pode estar mais acentuado. Estas duas situações poderiam contribuir para um aumento na reabsorção tubular ou na síntese de uréia, respectivamente (BURTIS; ASHWOOD, 1999). Sendo assim, os resultados de uréia observados no presente estudo poderiam ser justificados pela menor especificidade deste marcador.

#### 5.4.3 Perfil lipídico

Foi observado um aumento na concentração de colesterol total, colesterol HDL e colesterol não HDL no soro dos animais diabéticos quando comparados aos não diabéticos. Os animais tratados com o extrato de *Passiflora edulis* Sims apresentaram níveis séricos de colesterol total e de colesterol não HDL significativamente menores que os animais não tratados, entretanto, nenhuma alteração significativa foi observada na concentração sérica de

colesterol HDL quando os grupos diabético e diabético tratado com o extrato foram comparados (Tabela 6).

Tabela 6 - Avaliação do perfil lipídico no soro de ratos Wistar.

Grupos	Triglicerídeos (mg/dl)	Colesterol Total (mg/dl)
Controle Negativo (n=16)	92,7 ± 14,5 <sup>a</sup>	114,1 ± 9,30 <sup>a</sup>
Extrato Seco (n=17)	65,8 ± 15,5 <sup>a</sup>	55,99 ± 10,0 <sup>c</sup>
Diabético (n=16)	114,1 ± 29,1 <sup>b</sup>	265,5 ± 29,7 <sup>b</sup>
Diabético Extrato Seco (n=18)	116,7 ± 47,8 <sup>b</sup>	84,10 ± 8,67 <sup>c</sup>

Grupos	Colesterol HDL (mg/dl)	Colesterol não HDL (mg/dl)
Controle Negativo (n=16)	47,39 ± 7,84 <sup>a</sup>	66,7 ± 8,21 <sup>a</sup>
Extrato Seco (n=17)	47,01 ± 7,27 <sup>a</sup>	8,98 ± 4,43 <sup>c</sup>
Diabético (n=16)	68,98 ± 6,88 <sup>b</sup>	174,8 ± 50,6 <sup>b</sup>
Diabético Extrato Seco (n=18)	67,44 ± 9,83 <sup>b</sup>	16,65 ± 6,75 <sup>c</sup>

Legenda: As determinações foram realizadas em amostra de soro obtidas após a eutanásia. Os resultados representam a média ± desvio padrão de 16-18 determinações por tratamento. Foi determinado a ANOVA tendo como significância  $p < 0,05$ .

Fonte: Do autor.

A dislipidemia observada nos animais diabéticos pode ser atribuída á hiperglicemia apresentada pelos mesmos. Além do aumento na concentração de lipoproteínas aterogênicas tais como, a lipoproteína de baixa densidade (LDL) e/ou a lipoproteína de densidade muito baixa (VLDL), muitas vezes observa-se também uma redução na concentração de lipoproteínas de alta densidade (HDL), em decorrência do DM. Entretanto, no presente estudo foram observados níveis elevados de HDL nos animais diabéticos quando comparados aos animais do grupo controle.

Tem sido observado que no diabetes tipo 1, pode ocorrer um aumento na concentração sérica HDL, que pode estar associado a concentrações elevadas ou normais das demais lipoproteínas (KAHRI, et al., 1993). Apesar dos níveis aumentados de HDL, não há redução do risco cardíaco nestes indivíduos. Além disso, importante considerar que alterações no tamanho, na composição e na estrutura das HDL podem comprometer a sua funcionalidade e interferir com suas propriedades antiaterogênicas (TCHOUA, et al., 2008). Sendo assim, o aumento nos níveis séricos de HDL observado nos animais diabéticos poderia ser atribuído ao fato de que o modelo experimental utilizado neste estudo é comparável ao diabetes mellitus tipo 1.

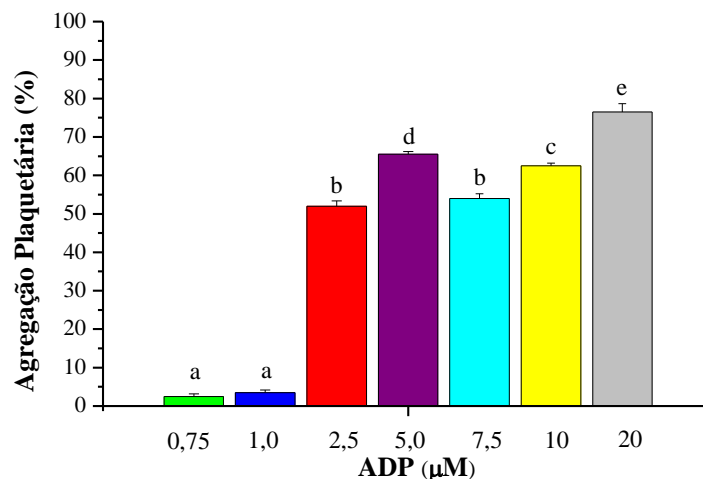
A administração do extrato apresentou um efeito benéfico sobre o perfil lipídico dos animais, uma vez que foi capaz de reduzir tanto os níveis de colesterol total quanto de

colesterol não HDL, nos grupos tratados, sugerindo que sua ação poderia estar relacionada à redução da concentração de lipoproteínas aterogênicas no soro destes animais. Estes resultados poderiam ser justificados pela melhora no controle glicêmico destes animais, conforme observado anteriormente (Tabela 4).

#### 5.4.4 Ativação plaquetária

Para a realização dos ensaios, a agregação plaquetária de ratos não diabéticos foi avaliada previamente utilizando diferentes concentrações, como pode ser observado no Gráfico 2. Com base nesta curva, optamos por usar a concentração de 5  $\mu\text{M}$  de ADP para o experimento. A razão desta escolha se baseou no fato de que alguns autores têm relatado que doses altas de agonistas podem falsear efeitos terapêuticos de fármacos na prevenção de eventos trombóticos (SILVA; AMICO, 2010).

Gráfico 2 - Curva concentração-resposta de ADP.



Legenda: Os resultados representam a média  $\pm$  desvio padrão do *pool* plaquetário de 5 animais. As análises foram realizadas em triplicata. Foi determinado a ANOVA, as letras indicam que houve diferença estatística do teste Tukey-Kramer de múltiplas comparações, tendo como significância  $p < 0,05$ .

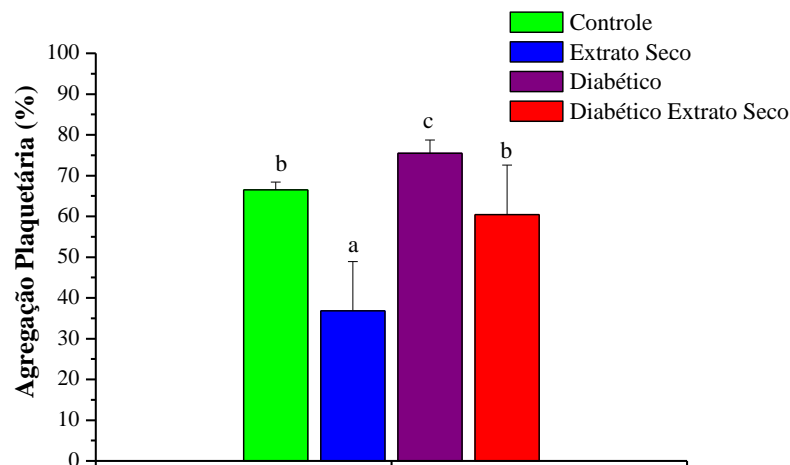
Fonte: Do autor.

Nossos resultados demonstraram que a agregação plaquetária foi significativamente maior nos animais diabéticos em relação aos não diabéticos e a administração do extrato seco

de folhas de maracujá reduziu a agregação plaquetária tanto em ratos diabéticos como nos animais controle tratados (Gráfico 3).

O aumento na agregação plaquetária em decorrência do diabetes mellitus tem sido observado em diferentes estudos. Neste sentido, alguns autores têm relatado que este aumento na agregação plaquetária poderia estar associado ao aumento na produção de espécies oxidantes, uma vez que estas espécies participam diretamente na regulação da ativação plaquetária e formação do trombo.

Gráfico 3 - Efeito do extrato seco de folhas de *Passiflora edulis* Sims sobre a Agregação Plaquetária em ratos controle e diabético.



Legenda: As determinações foram realizadas em suspensão de plaquetas ( $2 \times 10^8$  céls/reação), contendo  $\text{CaCl}_2$  1mM e ADP  $5 \mu\text{M}$  como agonista. Os resultados representam a média  $\pm$  desvio padrão de 8-10 determinações por tratamento. Foi determinado a ANOVA tendo como significância  $p < 0,05$ .

Fonte: Do autor.

Por outro lado, há também estudos relatando que quando as plaquetas são expostas a grandes quantidades de espécies oxidantes, estas podem ter efeitos tanto pró-agregante quanto anti-agregante. Sabe-se que as plaquetas por si só produzem as espécies oxidantes providas de fontes tais como NADPH oxidase, ciclooxigenase, eNOS, xantina oxidase e por respiração mitocondrial. Entretanto, a agregação plaquetária pode ser inibida por liberação de óxido nítrico, por prostaciclina e por enzimas endoteliais. Portanto, o equilíbrio na produção de tais espécies parece ser um dos pontos determinantes da homeostasia do organismo e assim, na presença da produção exacerbada de espécies oxidantes, alguns destes efeitos poderiam estar deficientes (WATT, et al., 2012; KRÖTZ; SOHN; POHL, 2004).

Considerando que o desequilíbrio na produção de espécies oxidantes tem sido apontado como um dos mecanismos responsáveis pelas alterações na ativação e na agregação

plaquetária observada no diabetes mellitus, foi avaliada no presente trabalho, a produção de espécies oxidantes por plaquetas de animais diabéticos e não diabéticos tratados com o extrato seco de folhas de *Passiflora edulis* Sims, através de ensaios de quimioluminescência amplificada com luminol. Neste ensaio, as espécies oxidantes produzidas oxidam as moléculas de luminol transferindo-o para o estado excitado, resultando na produção de luz.

Nossos resultados demonstraram que nos sistemas de reação sem a adição do PMA, a produção de espécies oxidantes das plaquetas dos animais diabéticos foi maior quando comparada ao grupo controle, sugerindo que o metabolismo oxidativo basal das plaquetas se encontra ativado nos animais diabéticos (Gráfico 4). O tratamento dos animais diabéticos com o extrato seco de *Passiflora edulis* Sims inibiu a produção destas espécies (Tabela 7).

Tabela 7 - Produção de espécies oxidantes por plaquetas de ratos normais e diabéticos tratados e não tratados com extrato seco de *P. edulis* Sims

Grupos	Basal <sup>1</sup>	PMA <sup>2</sup>
Controle Negativo (n=8)	$1,05 \times 10^5 \pm 7,46 \times 10^4$ a	$2,08 \times 10^5 \pm 1,02 \times 10^5$ a
Extrato Seco (n=9)	$5,66 \times 10^4 \pm 4,88 \times 10^4$ a	$1,93 \times 10^5 \pm 1,39 \times 10^5$ a
Diabético (n=8)	$2,50 \times 10^5 \pm 1,11 \times 10^5$ b	$3,03 \times 10^4 \pm 1,93 \times 10^4$ b
Diabético Extrato Seco (n=10)	$1,20 \times 10^5 \pm 1,01 \times 10^5$ a	$2,16 \times 10^5 \pm 9,44 \times 10^4$ a

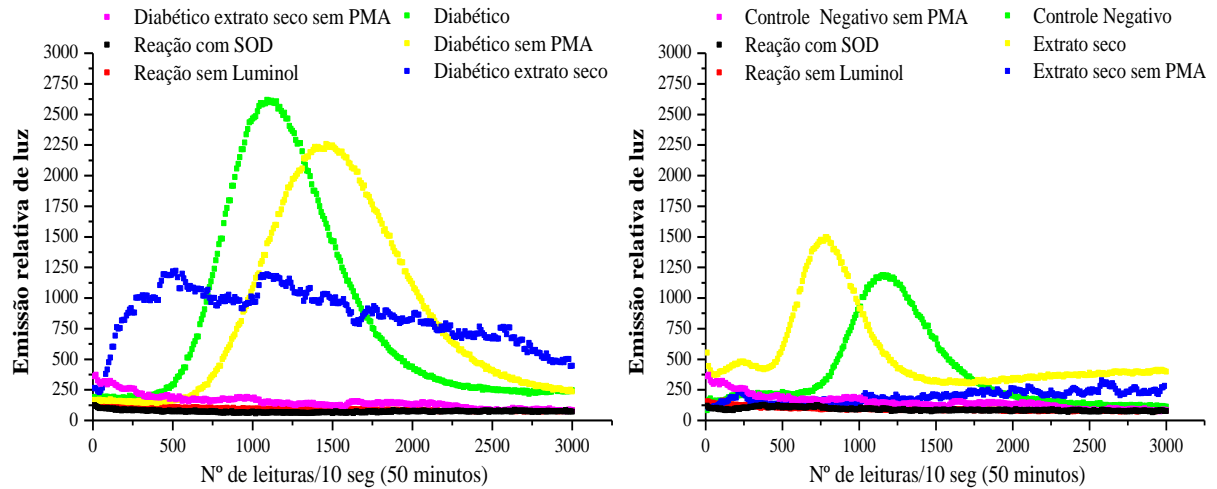
Legenda: Os resultados representam a média  $\pm$  desvio padrão de 8-10 determinações por tratamento, estimadas através da área integrada de emissão de luz. Foi determinado a ANOVA, as letras indicam que houve diferença estatística do teste Tukey-Kramer de múltiplas comparações, tendo como significância  $p < 0,05$ . 1- Basal: representa a área correspondente à emissão de luz pelas células nos sistemas de reação sem estímulo com PMA. 2- PMA: representa a área correspondente à emissão de luz pelas células nos sistemas de reação referente ao estímulo com PMA.

Fonte: Do autor.

A estimulação basal observada nos animais diabéticos poderia ser atribuída a alterações na atividade ou expressão de enzimas tais como, NADPH oxidases, xantina oxidase, cicloxigenase, lipoxigenase. Além destas enzimas, as proteínas glicadas também poderiam contribuir para esta ativação. Assim, no diabetes mellitus, a ativação plaquetária pode ocorrer por meio de diferentes vias (PLUMB, et al, 2005).

Tem sido demonstrando que a produção de ânion superóxido e conseqüentemente de peróxido de hidrogênio, por plaquetas estimuladas com PMA ocorre principalmente à custa da ativação do complexo NADPH oxidase. O ânion superóxido formado pode ser dismutado a peróxido de hidrogênio e na presença de metais de transição pode levar a formação do radical hidroxila. Nestes sistemas pode ocorrer também a formação de radical hidroxila ou de oxigênio singlete. A adição de superóxido dismutase ao sistema de reação foi capaz de inibir a parte da luz emitida, sugerindo a presença do ânion superóxido nestes sistemas (Gráfico 4).

Gráfico 4 – Efeito do extrato de *Passiflora edulis* Sims sobre a cinética de emissão de luz em sistemas contendo plaquetas de ratos diabéticos e não diabéticos.



a)

b)

Legenda: Os resultados representam a cinética de emissão de luz de um animal por grupo. a) Representação da cinética de emissão de luz em sistemas contendo plaquetas obtidas de ratos diabéticos. b) Representação da cinética de emissão de luz em sistemas contendo plaquetas obtidas de ratos não diabéticos. Os sistemas completos (diabético, diabético extrato, controle negativo e controle extrato) continham: plaquetas ( $1 \times 10^8$  células/ensaio), luminol (1mM) e PMA (16ng/ensaio). O sistema denominado completo com SOD continha plaquetas de ratos diabéticos ou controle ( $1 \times 10^8$  células/ensaio), luminol (1mM), PMA (16ng/ensaio) e superóxido dismutase (0,3 KU/mL na reação final). Os sistemas contendo plaquetas de animais diabéticos e não diabéticos foram avaliados na ausência de luminol (diabético sem luminol e controle sem luminol) assim como de PMA (diabético sem PMA e controle sem PMA). Os resultados representam a emissão de luz obtida em uma determinação por tratamento.

No entanto, a produção de espécies oxidantes estimulada por PMA foi significativamente menor nos animais diabéticos quando comparadas aos demais grupos analisados (Tabela 7). De acordo com estes resultados duas hipóteses podem ser levantadas. De um lado, tem sido demonstrado que no diabetes alguns tipos de células parecem permanecer no estado de hiperativação constante, levando a uma cinética de produção de espécies oxidantes diferente daquela observada em animais não diabéticos (FERREIRA, et al., 2012). Assim, esta hiperativação basal poderia justificar a menor de resposta das plaquetas de animais diabéticos frente ao PMA quando comparadas aos animais não diabéticos.

Por outro lado, vale lembrar que a estimulação de plaquetas com PMA pode levar também ao aumento na produção de ânion superóxido e este ao reagir com o óxido nítrico poderia levar à formação de peroxinitrito, inibindo assim a produção de luz nestes sistemas (KASINA, et al., 2006). Assim, os resultados observados nos sistemas estimulados com PMA poderiam ser atribuídos a maior estimulação da enzima óxido nítrico sintase indutiva, que por sua vez contribuiria para o aumento na produção de óxido nítrico e de peroxinitrito. O

aumento na formação de peroxinitrito pode contribuir para o aumento na agregação plaquetária (SCHILDKNECHT, et al., 2008).

O efeito do tratamento dos animais com o extrato seco das folhas de *Passiflora edulis* Sims sobre a agregação plaquetária bem como sobre a produção basal de espécies oxidantes por animais diabéticos poderia estar relacionado à sua capacidade de atuar como antioxidante e assim inibir a ação de espécies oxidantes, conforme observado em estudos anteriores.

Em estudos prévios verificamos que o extrato seco de folhas de maracujá apresentou concentrações significativas de fenóis totais e atividade sequestradora de radicais livres DPPH *in vitro*. Além disso, Carvalho, et al., (2010) demonstraram através de ensaios *in vitro* que o extrato etanólico de *Passiflora nítida* Kunth apresentou um efeito inibidor sobre a agregação plaquetária induzida por adrenalina, sendo este efeito superior ao observado pelo ácido acetil salicílico, utilizado como controle. Os autores atribuíram esta atividade em parte, à presença de flavonóides e de cumarinas, sugestivamente presentes na caracterização fitoquímica realizada para esta espécie.

Portanto, os resultados obtidos sugerem o efeito benéfico do extrato seco das folhas de folhas de *Passiflora edulis* Sims sobre as complicações cardiovasculares no DM, uma vez que inibiu a agregação plaquetária em animais tratados e controlou o metabolismo oxidativo basal no grupo diabético. Porém investigações adicionais a respeito do uso racional deste extrato como o tratamento alternativo para as complicações do diabetes são necessárias para se estabelecer intervenções seguras que melhorem a qualidade de vida dos milhões de portadores desta enfermidade.

#### 5.4.5 Avaliação da glicação de colágeno

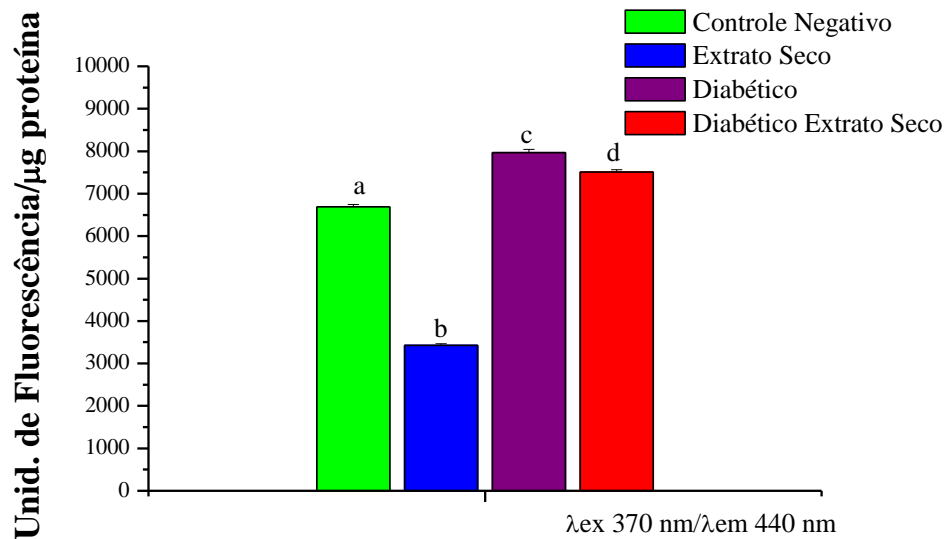
A glicação de colágeno tem sido associada ao desenvolvimento de diversas complicações induzidas pelo diabetes mellitus (MEGAN, et al., 2010; MONNIER, et al., 2013; GAUTIERI, et al., 2013; BARBOSA; SUZANA; SEARA, 2008). De acordo com a sua complexidade e sua diversidade estrutural, o colágeno pode ser classificado em diferentes tipos, no entanto, todos possuem uma característica comum: a tripla hélice composta por três cadeias  $\alpha$  de polipeptídios orientada para a direita. Estas cadeias são configuradas por

sequências repetitivas de aminoácidos (glicina, prolina e hidroxiprolina). Entre os diferentes tipos de colágeno, o tipo I é o mais abundante, sendo encontrado principalmente nos ossos, nos tendões, na pele, nos ligamentos, na córnea e em vários tecidos conjuntivos. Além disso, podem ser encontrados associados ao colágeno tipo III, que por sua vez está presente nos vasos sanguíneos. Sua principal função é fornecer força e rigidez aos tecidos ou aos órgãos onde estão presentes. No entanto, a ligação de AGEs ao colágeno pode levar à alterações estruturais e funcionais nestas proteínas, contribuindo para o espessamento de membranas bem como para o aumento da resistência e da perda de elasticidade das paredes de vasos sanguíneos (GELSE; POSCHL; AIGNER, 2003). Desta forma, vários autores têm associado o aumento na glicação de colágeno ao desenvolvimento ou progressão de complicações micro e macroangiopáticas decorrentes do diabetes mellitus, tais como a nefropatia e as doenças cardiovasculares (LEE, et al., 2010; MORESCO, et al., 2013).

No presente estudo foram avaliados os efeitos do extrato seco das folhas de *Passiflora edulis* Sims sobre a concentração de AGEs em colágeno obtido do tendão de ratos diabéticos. Foi observado que a concentração de AGEs foi significativamente menor no grupo de animais diabéticos tratados com o extrato quando comparados aos animais diabéticos não tratados (Gráfico 5 e 6). Estes resultados podem ser apoiados por dados da literatura científica que têm demonstrado que a inibição da glicação de colágeno pode ser favorecida tanto pela melhora no controle glicêmico como também pela presença de compostos com potencial antioxidante nos extratos avaliados. Estes compostos poderiam inibir reações da via de glicação, uma vez que a oxidação catalisada por metais está envolvida na via de glicação do colágeno (HEGDE; CHANDRAKASAN; CHANDRA, 2002).

Estudos *in vitro* demonstraram que os extratos metanólicos de *Eleusine coracana* e de *Paspalum scrobiculatum* inibiram a glicação e a formação de ligações cruzadas em colágeno obtido da cauda de ratos. Os resultados obtidos foram atribuídos à possível presença de polifenóis nos extratos analisados (HEGDE; CHANDRAKASAN; CHANDRA, 2002). Lee, et al (2010) verificaram através de ensaios *in vitro* que ácido quelúbico, um composto isolado de frutos de *Terminalia chebula*, foi capaz de inibir a glicação de albumina.

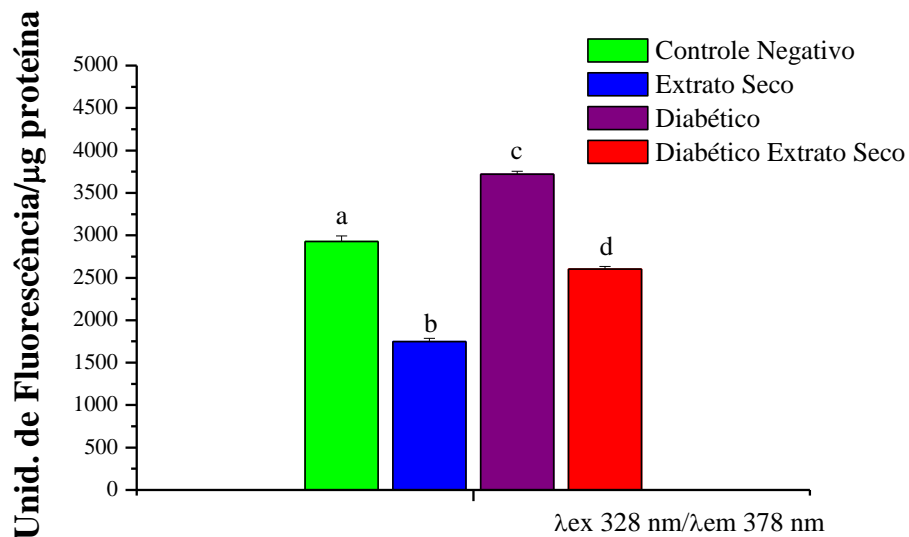
Gráfico 5 - Determinação do efeito inibitório do extrato seco de folhas de *Passiflora edulis* Sims na formação de AGEs totais.



Legenda: As determinações foram realizadas em amostra colágeno tipo I do tendão da cauda de ratos Wistar, obtidas após a eutanásia. Os resultados representam a média  $\pm$  desvio padrão de 5 determinações por tratamento. Foi determinado a ANOVA tendo como significância  $p < 0,05$ .

Fonte: Do autor.

Gráfico 6 - Determinação do efeito inibitório do extrato seco de folhas de *Passiflora edulis* Sims na formação de pentosidinas.



Legenda: As determinações foram realizadas em amostra colágeno tipo I do tendão da cauda de ratos Wistar, obtidas após a eutanásia. Os resultados representam a média  $\pm$  desvio padrão de 5 determinações por tratamento. Foi determinado a ANOVA tendo como significância  $p < 0,05$ .

Fonte: Do autor.

Babu, et al. (2007) relataram que o chá verde foi capaz de reduzir a formação de AGEs e a formação de ligações cruzadas entre o colágeno e os AGEs no coração de ratos diabéticos,

quando administrado por via oral durante 6 semanas. Os autores atribuíram estes efeitos à ação hipoglicemiante bem como à atividade antioxidante apresentada pelo chá verde neste mesmo estudo. Meng, et al. (2011) relataram que polissacarídeos extraídos de *Ganoderma lucidum* atenuaram a formação de ligações cruzadas, sendo este efeito associado à diminuição do nível de AGEs e ao aumento da atividade de enzimas antioxidantes em coração de ratos diabéticos. Al-Qattan, et al. (2013) relataram o efeito inibidor da glicação glomerular em ratos diabéticos tratados com extrato aquoso de *Allium sativum* durante 8 semanas que foi associado à atividade hipoglicemiante apresentada pelo extrato.

Sendo assim, os resultados obtidos no presente estudo demonstraram que o extrato seco de *Passiflora edulis* Sims apresentou potencial hipoglicemiante e anti-glicante, sugerindo uma possível indicação do mesmo como tratamento complementar do diabetes mellitus. Porém investigações adicionais a respeito do uso racional deste extrato como tratamento complementar do diabetes são necessárias para se estabelecer intervenções seguras que melhorem a qualidade de vida dos milhões de portadores desta enfermidade.

## 6 CONCLUSÕES

- A administração do extrato seco de folhas de *Passiflora edulis* Sims reduziu a glicemia em jejum bem como os níveis de HbA1C no sangue dos animais diabéticos;
- A administração do extrato seco das folhas de *Passiflora edulis* Sims impediu o preveniu o aumento dos níveis de creatinina no soro dos animais diabéticos;
- O extrato seco das folhas de *Passiflora edulis* Sims que foi capaz de reduzir a concentração de lipoproteínas aterogênicas no soro dos animais tratados.
- Os animais diabéticos apresentaram maior produção basal de oxidantes e a agregação plaquetária em relação aos animais não diabéticos;
- O tratamento dos animais diabéticos com o extrato de *Passiflora edulis* Sims atenuou os efeitos do diabetes sobre a produção de oxidantes e a agregação plaquetária;
- Os níveis de AGEs determinados em amostras de colágeno obtido do tendão de animais diabéticos foi maior que nos animais não diabéticos e o tratamento dos animais diabéticos com o extrato seco levou a uma redução da glicação do colágeno.

## REFERÊNCIAS

AARON, et al. Platelet Dysfunction in type 2 Diabetes. **Diabetes Care**. v. 24, n. 8, p. 1476-1485, Aug. 2001.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Standards of medical care in diabetes (Position Statement). **Diabetes Care**, v. 35, n. 1, p. 511-563, Jan. 2012.

ANHÊ F. F. et al. Polyphenols and type 2 diabetes: A prospective review. **Pharma Nutrition**. v. 1, n. 4, p. 105-114, Oct. 2013.

ALMEIDA, E. R. **Plantas medicinais brasileiras**: conhecimentos populares e científico. 6. ed. São Paulo, SP, Brasil: Hemus, 1993. 341p.

AL-QATTAN K. K et al. Garlic (*Allium sativum*) attenuate glomerular glycation in streptozotocin-induced diabetic rats: A possible role of insulin. **Pathophysiology**. v. 20, n. 2, p. 147-152, Apr. 2013.

ARONSO, D. Cross-linking of glycated collagen in the pathogenesis of arterial and myocardial stiffening of aging and diabetes. **Journal of Hypertension**. v. 21, n. 1, p. 3-11, Jan. 2003.

ARRIAZA, A. M. C. et al. Volatile constituents from fruit shells of *P. edulis* Sims. **Journal of Essential Oil Research**. v.9, n. 2, p.235–236, Mar.-Apr. 1997.

AVEZEDO S.; VICTOR E. G.; OLIVEIRA D. C. Diabetes mellitus and atherosclerosis: basic pathophysiology for physicians. **Revista Brasileira de Clínica Médica**. São Paulo. v.8, n.6, p.520-6, Nov-Dez. 2010.

BABU, P.V. A. et al. Green tea attenuates diabetes induced Maillard-type fluorescence and collagen cross-linking in the heart of streptozotocin diabetic rats. **Pharmacological Research**. v. 55, n. 5, p. 433-440, May, 2007.

BAILEY C. J.; TURNER R.C. Metformin. Review Article. **New England Journal of Medicine**. v. 334, n. 9, p. 574-579, Feb. 1996.

BAKDASH, N.; WILLIAMS, M. S. Spatially distinct production of reactive oxygen species regulates platelet activation. **Free Radical Biology & Medicine**. v. 45, n. 2, p. 158-166, Jul. 2008.

BARBOSA, J. H. P.; SUZANA, L. O.; SEARA, L. T. O Papel dos Produtos Finais da Glicação Avançada (AGEs) no Desencadeamento das Complicações Vasculares do Diabetes. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**. v. 52, n. 6, p. 940-950, Mar. 2008.

BEGONJA, A. J. et al. Platelet NAD(P)H-oxidase-generated ROS production regulates alphaIIbeta3-integrin activation independent of the NO/cGMP pathway. **Blood**. v. 106, n. 8, p. 2757-2760, Oct. 2005.

BERTOLUCCI, M. C. et al. Alterações Microcirculatórias no Diabetes. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia Metabólica**. v. 51, n. 2, p. 204-211, Jan. 2007.

BERNEREUTHER, A.; CHRISTOPH, N; SCHRIER, P. Determination of the enantiomeric composition of gamma-lactones in complex natural matrices using multidimensional capillary gas chromatography. **Journal of Chromatography**. v. 481, n. 1, p. 363-367, Nov. 1989

BORGES, D.B. et al. Comparação das metodologias da Farmacopéia 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, Jun. 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS - PNPIC-SUS**. Ministério da Saúde. Brasília, 2006. 92p.

BRASIL. Secretaria de Políticas de Saúde. **Plano de reorganização da atenção à hipertensão arterial e ao Diabetes Mellitus**. Ministério da Saúde. Brasília, 2001.

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

BROWNLEE M. Advanced protein glycosylation in diabetes and aging. **Annual Review of Medicine**. v. 46, n. 1, p. 223-34, Feb., 1995.

CARVALHO, M. J. et al. Estudo farmacognóstico e atividade in vitro sobre a coagulação sanguínea e agregação plaquetária das folhas de *Passiflora nitida* Kunth (Passifloraceae). **Revista Acta amazônica**. v. 40, n. 1, p. 199-206, Mar. 2010.

CAVALCANTE, P. B. **Frutas comestíveis da Amazônia**. 2.ed. Belém: Falangola, 1976. 156p.

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

CHASSAGNE, D. ; BOULANGER, R. ; CROUZET, J. Enzymatic hydrolysis of edible *Passiflora* fruit glycosides. **Food Chemistry.** v. 66, n. 3, p. 281–288, Aug. 1999.

COHEN, D. et al. Diabetes mellitus in 93 chronic schizophrenic inpatients. **European Journal of Psychiatry.** v. 17, n. 1, p. 38-47, Sept. 2003.

COLOMEU T.C. et al. Antioxidant and anti-diabetic potential of *Passiflora alata* Curtis aqueous leaves extract in type 1 diabetes mellitus (NOD-mice). **International Immunopharmacology.** v. 18, n. 1, p. 106-115, Jan. 2014.

CORRÊA-GIANNELLA M. L.; VIEIRA S. M. A Predisposição Genética para o Desenvolvimento da Microangiopatia no DM1. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia Metabólica.** v. 52, n. 2, dez. 2008.

DAWES, N. H.; PAUL, J. S. Volatile constituents of passion fruit juice. **Journal of Food Science.** v. 26, n. 6, p. 557–563, Aug. 1961.

DHANABAL, S. P. et al. Hypoglycemic Effect Of Alcoholic Extract Of Various Species Of *Passiflora* On Alloxan Induced Diabetes Mellitus In Albino Rats. **Nigerian Journal of Nature Products and Medecine.** v. 8, n. 1, p. 19-21, Jan. 2005.

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

DIKALOV, S. Cross talk between mitochondria and NADPH oxidases. **Free Radical Biology & Medicine.** v. 51, n. 7, p. 1289-1301, Oct. 2011.

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, n. 3, p. 371-374, Jan. 2005.

ESSEX, D. W. Redox Control of Platelet Function. **Antioxidants and Redox Signaling.** v.11, n. 5, p. 1192-1204, May. 2009.

FARIA, J.B.L. Fisiologia e fisiopatologia: Patogênese da nefropatia diabética. **Jornal Brasileiro de Nefrologia.** v. 23, n. 2, p. 121-129, Jan. 2001.

FARMACOPEIA brasileira. 3.ed. rev. e complementada conforme a Portaria Ministerial n. 383/1977. São Paulo: Organizacao Andrei, 1977. 1213 p.

FARMACOPÉIA brasileira. 5. ed., Agência Nacional de Vigilância Sanitária / Fundação Oswaldo Cruz, 2010.

FERREIRA, C. S. et al. Neutrophil dysfunction induced by hyperglycemia: modulation of myeloperoxidase activity. **Cell Biochemical Function**. v. 30, n. 7, p. 604-610, May. 2012.

FLIERL, U. et al. The novel P2Y<sub>12</sub> antagonist AZD6140 rapidly and reversibly reduces platelet activation in diabetic rats. **Trombosis Research**. v. 125, p. e93-e99, Sept. 2010.

FREEDMAN, J. E. Oxidative Stress and Platelets. **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**. v. 28, n. 3, p. 11-16, Mar. 2008.

GABRIEL, S. A. et al. Avaliação da agregação plaquetária e dosagem do fibrinogênio em pacientes com doenças cardiovasculares e sua correlação com o uso de aspirina e fatores de risco coronariano. **The Brazilian Journal of Cardiovascular Surgery**. v. 21, n. 3, p. 289-294, jun. 2006.

GAUTIERI, A. et al. Age- and diabetes-related nonenzymatic crosslinks in collagen fibrils: Candidate amino acids involved in Advanced Glycation End-products. **Matrix Biology**. Sept. 2013.

GARCIA, E.S. Biodiversidade, Biotecnologia e Saúde. **Cad. Saúde Públ**, v. 11, n.3, p. 491-494, 1995.

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, jun. 2006.

GELSE, K.; POSCHL, E.; AIGNER, T. Collagens—structure, function, and biosynthesis. **Advanced Drug Delivery Reviews**. v. 55, n. 12, p. 1531-1546, Nov. 2003.

GOMES, M. B.; LERÁRIO, A. C. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes. 3<sup>a</sup> ed. **Sociedade Brasileira de Diabetes**. Itapevi, SP: A. Araujo Silva Farmacêutica, p. 400, nov. 2009.

GUPTA, R.K. et al. Antidiabetic activity of *Passiflora incarnata* Linn. in streptozotocin-induced diabetes in mice. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 139, n. 3, p. 801-806, Dec., 2012.

HANAI, Y. et al. Collagen-induced p38MAP kinase activation is a biomarker of platelet hyper-aggregation in patients with diabetes mellitus. **Life Sciences**. v. 85, n. 9, p. 386-394, Aug., 2009.

HAOUARI, M.; ROSADO, J. A. Platelet signalling abnormalities in patients with type 2 diabetes mellitus: A review. **Blood Cells, Molecules, and Diseases**. v. 41, n.1, p. 119-123, Jul-Aug., 2008.

HEGDE, P.S.; CHANDRAKASAN, G.; CHANDRA, T.S. Inhibition of collagen glycation and crosslinking in vitro by methanolic extracts of Finger millet (*Eleusine coracana*) and Kodo millet (*Paspalum scrobiculatum*). **Journal of Nutritional Biochemistry**. v. 13, n. 9, p. 517-521, April, 2002.

HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 53, p. 1.841-1.856, Feb. 2005.

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, n. 7, p. 1811-1815, Mar., 2003.

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

KANNAN, S.; PARIMALA, B.; JAYAKAR, B. Antibacterial evaluation of the methanolic extract of *Passiflora edulis*. **Journal for Drugs and Medicines**. v. 3, n. 1, p. 46-49, Jan. 2011.

KASINA, S. et al. Singh Phorbol ester mediated activation of inducible nitric oxide synthase results in platelet proWlin nitration. **Nitric Oxide**. v. 14, n. 1, p. 65-71, Feb., 2006.

KOGA, M. et al. Calculation of HbA1c and glycated albumin from serially measured self-monitored blood glucose in patients with type 1 diabetes mellitus. **Clinica Chimica Acta**. v. 425, n. 1, p. 188-191, Aug., 2013.

KRÖTZ, F.; SOHN, H. Y.; POHL, U. Reactive Oxygen Species : Players in the Platelet Game. **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**. v. 24, p. 1988-1996, September, 2004.

KRÖTZ, F. et al. NAD(P)H oxidase–dependent platelet superoxide anion release increases platelet recruitment. **Blood**. v. 100, n. 3, p. 917-924, Aug., 2002.

KVIETYS, P. R.; GRANGER, D. N. Role of reactive oxygen and nitrogen species in the vascular responses to inflammation. **Free Radical Biology and Medicine**. v. 52, n. 3, p. 556-592, Feb., 2012.

LAPOLLA, A.; TRALDI, P.; FEDELE, D. Importance of measuring products of non-enzymatic glycation of proteins. **Clinical Biochemistry**, v. 38, n. 2, p. 103-115, Feb., 2005.

LEE, H. S. et al. Preventive effects of chebulic acid isolated from *Terminalia chebula* on advanced glycation endproduct-induced endothelial cell dysfunction. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 131, n. 3, p. 567-574, Oct., 2010.

LERCO, M. M., et al . Caracterização de um modelo experimental de Diabetes Mellitus, induzido pela aloxana em ratos. Estudo clínico e Laboratorial. **Acta Cirúrgica Brasileira**. v. 18, n.2, p. 132-142, Fev., 2003.

LEVEY, A.S. et al. Using Standardized Serum Creatinine Values in the Modification of Diet in Renal Disease Study Equation for Estimating Glomerular Filtration Rate. **Annals of Internal Medicine**. v. 145, n. 4, p. 247- 254, Aug., 2006.

- LORENZI, H. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. 5. ed. Nova Odessa, SP: **Instituto Plantarum de Estudos da Flora**, 2008.
- LUTOMSKI, J., MALEK, B. Pharmacological investigations on raw materials of the genus *Passiflora*. **Planta Medica**. v.27, n. 2, p. 381–384, May., 1975.
- LUNCEFORD, N; GUGLIUCCI, A. Ilex paraguariensis extracts inhibit AGE formation more efficiently than green tea. **Fitoterapia**. v. 76, n. 5, p. 419-427, Jul., 2005.
- 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, Mar., 1991.
- MARIA, S. S.; WADA, M. L. F. Cytochemical analysis of Vero cells on collagen gel in long term culture. **In vitro Cell Dev Biol-Anilamal**. v. 33, n. 10, p. 748-750, 1996.
- MANCINI, F.J. Importância química e nutricional dos antioxidantes naturalmente presentes nos alimentos. **Ciência de alimentos: avanços e perspectivas**. v. 2, p. 174-176, 2001
- 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, Out.-Nov., 2010.
- MEGAN, E.F.S. et al. Collagen glycation alters neovascularization *in vitro* and *in vivo*. **Microvascular Research**. v. 80, n. 1, p. 3-9, Jul., 2010.
- MENG, G. et al. Attenuating effects of Ganoderma lucidum polysaccharides on myocardial collagen cross-linking relates to advanced glycation end product and antioxidant enzymes in high-fat-diet and streptozotocin-induced diabetic rats. **Carbohydrate Polymers**. v. 84, n. 1, p. 180-185, Jan., 2011.
- MONNIER, V.M. et al. The association between skin collagen glycation and past progression of microvascular and neuropathic complications in type 1 diabetes. **Journal of Diabetes and Its Complications**. v. 27, n. 2, p. 141-149, Mar., 2013.
- 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, Feb., 2005.
- MORESCO, R.N. et al. Diabetic nephropathy: Traditional to proteomic markers. **Clínica Chimica Acta**. v. 421, p. 17-30, Jun., 2013.
- MURUSSI, M. et al. Early detection of diabetic nephropathy. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia Metabolica**. v. 5, n. 3, p. 442-451, Apr., 2008.
- NOGUEIRA, L.J.; MONTANARI, C.A.; DONNICI, C.L. Histórico da evolução da química medicinal e a importância da lipofilia: de Hipócrates e Galeno a Paracelsus e as contribuições de Overton e de Hansch. **Revista Virtual de Química**. v.1, n.3, p. 227-240, 2009.

OLIVEIRA, F.; SAITO, M. L. Alguns vegetais brasileiros empregados no tratamento da diabetes. **Revista Brasileira de Farmácia**. v. 2-4, p. 137-189, 1995.

PAGEON, H. et al. Collagen glycation triggers the formation of aged skin *in vitro*. **Europe Journal of Dermatology**. v. 17, n. 1, Aug., 2007.

PEÑA, J.; SHARP, J.; WYSOKI, M. Tropical fruit pests and pollinators: biology, economic importance, natural enemies and control. Oxon, UK: **CABI**, 430p., 2002.

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

PINTO, A.C. Alguns aspectos da história da aspirina. Disponível em [http://www.sbq.org.br/filiais/adm/Upload/subconteudo/pdf/Historias\\_Interessantes\\_de\\_Produtos\\_Naturais05.pdf](http://www.sbq.org.br/filiais/adm/Upload/subconteudo/pdf/Historias_Interessantes_de_Produtos_Naturais05.pdf). Acesso em 30 mar. 2013.

PLUMB, R.D. et al. NAD(P)H-dependent superoxide production in platelets: The role of angiotensin II and protein kinase C. **Clinical Biochemistry**. v. 38, n. 7, p. 607-613, Jul., 2005.

RANDRIAMBOAVONJY, V.; FLEMING, I. Platelet Function and Signaling in Diabetes Mellitus. **Current Vascular Pharmacology**. v. 10, n. 5, p. 532-538, Oct., 2012.

REES, M. D. et al. Oxidative damage to extracellular matrix and its role in human pathologies. **Free Radical Biology and Medicine**. v. 44, n. 12, p. 1973-2001, Jun., 2008.

ROCKENBACH, I.I. et al. Influência do solvente no conteúdo total de polifenóis, antocianinas e atividade antioxidante de extratos de bagaço de uva (*Vitis vinifera*) variedades *Tannat* e *Ancelota*. **Ciência e Tecnologia de Alimento**. v. 28, p. 238-244, Dez., 2008

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 Farmacêutica Básica e Aplicada**. v. 33, n. 1, p. 57-62, Set., 2012.

RONDEAU, P., BOURDON, E. The glycation of albumin: Structural and functional impacts. **Biochimie**. v.93, n. 4, p. 645-658, Apr., 2011.

RUDNICKI, M. et al. Antioxidant and antiglycation properties of *Passiflora alata* and *Passiflora edulis* extracts. **Food Chemistry**. v. 100, n. 2, p. 719-724, Oct., 2007.

SAMYRA T. B.; VALDIR C. F.; ANGÉLICA G. C. 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, Oct.-Dec., 2009.

SACCO, J.C. Flora Ilustrada Caibutarinense: Passifloráceas. Itajaí: **R. Reitz**, 132p., 1980.

SCHILDKNECHT, S. et al. Endogenous peroxynitrite modulates PGHS-1-dependent thromboxane A2 formation and aggregation in human platelets. **Free Radical Biology and Medicine**. v. 45, n. 4, p. 51-520, Aug., 2008.

SILVA-COSTA, E. et al. Metformin interacts with physical training decreasing glycemia and increasing glycogen supply in diabetic rats. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**. v.14, n.4, p.337-340, Jul.-Aug., 2008.

SILVA, L.L.; AMICO, E.A. Comparative study of platelet aggregation by turbidimetric and Impedance methods in patients under acetylsalicylic acid antiplatelet therapy. **Rev Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**. v. 32, n. 6, p. 463-468, Jun., 2010.

SIMÕES, et al., **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Florianópolis; Porto Alegre: Ed. da UFSC; Ed. da UFRGS, 2007. 1102p.

SINGLETON, V.L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA, R.R.M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. **Methods in enzymology**. v. 299, p. 152-178, Nov., 1999.

SENO, T. et al. Involvement of NADH/NADPH Oxidase in Human Platelet ROS Production. **Thrombosis Research**. v. 103, n. 5, p. 399-409, Sept., 2001.

SJÖBERG, J.S.; BULTERIJS, S. Characteristics, formation, and pathophysiology of glucosepane: a major protein cross-link. **Rejuvenation Research**. v. 12, n. 2, p.137-48, Apr., 2009.

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

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

TCHOUA, U. et al. The Effect of CETP overexpression and inhibition on Reverse Cholesterol Transport. **Cardiovascular Research**. v. 77, n. 4, p. 732-739, Dec., 2008.

VIANA, M. R.; RODRIGUEZ, T. T., Complicações cardiovasculares e renais no diabetes *mellitus*. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, Salvador, v.10, n.3, p.290-296, set.-dez., 2011.

VIANNA, C. A.; GONZÁLEZ, D. A.; MATIJASEVICH, A. Utilização de ácido acetilsalicílico (AAS) na prevenção de doenças cardiovasculares: um estudo de base populacional Aspirin use in cardiovascular disease prevention: a population-based study. **Caderno de Saúde Pública**, v. 28, n. 6, p. 1122-1132, jun., 2012.

VEIGA, J.V.F.; PINTO, A.C.; MACIEL, M.A.M. Plantas medicinais: cura segura? **Química Nova**. v. 28, p. 519, 2005.

VIOLI F.; PIGNATELLI P. Platelet NOX, a novel target for anti-thrombotic treatment. **Thrombosis and Haemostasis**. v. 111, n. 5, p. 1-7, Jan., 2014.

VLASSARA H., STRIKER G. E. Advanced Glycation Endproducts in Diabetes and Diabetic Complications. **Endocrinology and Metabolism Clinics of North America**. v. 42, n. 4, p. 697-719, Dec., 2013.

WAJCHENBERG, B. L. Endothelial Dysfunction in Type 2 Diabetes Mellitus. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia Metabolica** v. 46, n. 5, p. 514-519, maio, 2002.

WALLENTIN, L. et al. A. Ticagrelor versus Clopidogrel in Patients with Acute Coronary Syndromes. **The New England Journal of Medicine**. v. 361, n. 11, p. 1045-1057, Sep., 2009.

WATT, J. et al. The effect of reactive oxygen species on whole blood aggregation and the endothelial cell-platelet interaction in patients with coronary heart disease. **Thrombosis Research**. v. 130, n. 2, p. 210-215, Aug., 2012.

WINTERHALTER, P. Bound terpenoids in the juice of the purple passion fruit (*P. edulis* Sims). **Journal of Agriculture and Food Chemistry**. v.38, n. 2, p.452-455, Feb., 1990.

YONEKURA, H. et al. Novel Splice variants of the receptor for advanced glycation end-products expressed in human vascular endothelial cells and pericytes, and putative roles in diabetes-induced vascular injury. **Biochemical Journal** v. 370, n. 3, p.1097-1109, Mar., 2003.

ZERAIK, M.L. et al. Analysis of Passion Fruit Rinds (*Passiflora Edulis*): Isoorientin Quantification by HPTLC and Evaluation of Antioxidant (Radical Scavenging) Capacity. **Quim. Nova**. v. 35, n. 3, p. 541-545, Nov., 2012.