

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

**BRUNO CESAR CORREA SALLES**

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO EXTRATO E DA FRAÇÃO FLAVONOÍDICA  
OBTIDOS DAS FOLHAS DO MARACUJÁ (*Passiflora edulis* Sims) SOBRE A  
MODULAÇÃO DA NADPH OXIDASE E AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA EM  
RATOS DIABÉTICOS.**

Alfenas/MG

2017

**BRUNO CESAR CORREA SALLES**

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO EXTRATO E DA FRAÇÃO FLAVONOÍDICA  
OBTIDOS DAS FOLHAS DO MARACUJÁ (*Passiflora edulis* Sims) SOBRE A  
MODULAÇÃO DA NADPH OXIDASE E AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA EM  
RATOS DIABÉTICOS.**

Tese apresentada a Universidade Federal de Alfenas – UNIFAL-MG, como requisito parcial para a obtenção do título de doutor em Ciências Farmacêuticas no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, sob orientação da Profa. Dra. Fernanda Borges de Araújo Paula e co-orientação do Prof. Dr. Marcelo Aparecido da Silva.

Alfenas/MG

2017

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

Salles, Bruno Cesar Correa.

Avaliação dos efeitos do extrato e da fração flavonoídica obtidos das folhas da maracujá (*Passiflora edulis* Sims) sobre a modulação da NADPH oxidase e agregação plaquetária em ratos diabéticos / Bruno Cesar Correa Salles. – Alfenas - MG, 2017.

106 f.

Orientadora: Fernanda Borges de Araújo Paula.

Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Alfenas, 2017.

Bibliografia.

1. Passiflora. 2. Diabetes Mellitus. 3. Agregação Plaquetária.  
4. Flavonoides. I. Paula, Fernanda Borges de Araújo. II. Título.

CDD-615.19

**BRUNO CESAR CORREA SALLES**

**“Avaliação dos efeitos do extrato e da fração flavonoídica obtidos das folhas do maracujá (*Passiflora edulis* Sims) sobre a modulação da NADPH oxidase e agregação plaquetária em ratos diabéticos”**

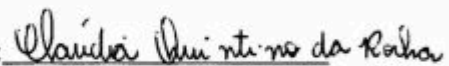
A Banca examinadora, abaixo assinada, aprova a Tese apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal de Alfenas.

Aprovado em: 24 / 04 / 2017

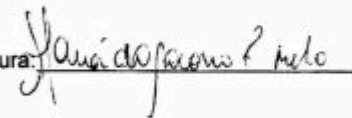
Profa. Dra. Fernanda Borges de Araújo  
Instituição: UNIFAL-MG

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

Profa. Dra. Cláudia Quintino da Rocha  
Instituição: UFMA

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


Profa. Dra. Maria do Socorro Fernandes Melo  
Instituição: UNIFAL-MG

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

Profa. Dra. Maria Rita Rodrigues  
Instituição: UNIFAL-MG

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

Prof. Dr. Renato Rizo Ventura  
Instituição: UNIFAL-MG

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

Dedico todo esse trabalho a Deus, 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

A Deus agradeço pelo dom da vida, pela força para lutar e por manter ao meu lado as pessoas importantes para mim.

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

Agradeço a Fabiana, secretária do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, pela disposição, pela paciência nas entregas de formulários e por estar sempre orientando da melhor forma possível.

À FAPEMIG pelo apoio financeiro que tornou possível esse projeto bem como a minha dedicação exclusiva à pesquisa, sem este apoio tudo seria muito mais difícil.

A Romilda e a Lucinda por estarem a disposição sempre que precisei, pelo companheirismo e conversas diárias.

A Eliana que sempre foi muito mais que uma funcionária do laboratório, sempre disposta a ajudar, a aconselhar, por ser uma amiga a quem tenho muito carinho e respeito.

As alunas e amigas de Iniciação Científica Krissia Caroline Lemes e Naiane Silva Cardoso que estiveram ao meu lado nesta jornada e nas longas noites de experimentação. Aos demais alunos do Laboratório de Pesquisa em Bioquímica Clínica e Experimental pelo convívio e partilha de conhecimento.

Aos Professores e alunos do Laboratório de Bioprospecção de Produtos Naturais da Universidade Estadual de São Paulo (UNESP), Campus Experimental do Litoral Paulista (São Vicente-SP), por toda ajuda, disponibilidade, suporte e aprendizado durante 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. Máisa Ribeiro Brigagão e ao Laboratório de Bioquímica Básica pela parceria na realização dos experimentos.

Ao Prof. Dr. Marcelo Aparecido Silva que abriu as portas do Laboratório de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos e ao longo dos anos me proporcionou um enorme ganho em conhecimento. Se tornou indispensável nesses anos todos, me forneceu sábios conselhos, boas risadas e acima de tudo me proporcionou uma amizade verdadeira.

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 tenho certeza ser os seus sonhos também. É um exemplo de persistência, dedicação, amor e carinho.

Muitas vezes nas tribulações do dia-a-dia dizemos que a amizade verdadeira está naqueles que nos apoiam diante das dificuldades. Mas sábio se fez MELO, Fábio de, (2011) ao dizer que “Amigos verdadeiros são os que suportam a tua felicidade!”. Diante desse pensamento, posso dizer que Carla Miguel de Oliveira é mais que uma companheira, é uma amiga a quem compartilho de minhas aflições, de minhas derrotas e vitórias. Hoje agradeço por estar ao meu lado vencendo comigo mais uma etapa.

São tantos obrigados que escreveria uma tese agradecendo tamanha conquista que um dia sonhei, mas como todos sabem, há pessoas que se destacam no meio de tantos, há pessoas que são a nossa base, nosso alicerce a quem recorremos, amamos e confiamos acima de tudo.

A primeira, minha vó Olivina de Jesus Correa, agradeço por ter sacrificado a sua vida durante todos esses anos a cuidar de mim. A acreditar em mim quando todos diziam que não conseguiria. Agradeço por me mostrar todos os dias de minha vida a bondade diante de um olhar, a beleza na simplicidade de nosso ser, a alegria em ajudar a quem está ao nosso lado e principalmente por ser a minha principal mentora durante toda minha vida. Palavras é pouco para retribuir todo amor e carinho durante todos os anos cuidando de mim.

A segunda, minha orientadora Profa. Dra. Fernanda Borges de Araújo Paula, desde quando comecei na iniciação científica foi ela quem acreditou em mim, proporcionando todas as condições necessárias para hoje ser o profissional que sou. Tenho orgulho de dizer que um dia fiz minha pós-

graduação com a Dra. Fernanda Borges de Araújo Paula, pois sei que ela foi um exemplo de sabedoria, de paciência, de compreensão, de profissionalismo e acima de tudo, foi um ser humano enfrentando todas as dificuldades ao meu lado e apoiando em minhas decisões. Meu muito obrigado por me permitir arriscar, por me corrigir quando necessário, por acreditar em mim e principalmente pelos sábios conselhos ao longo destes anos todos.

À Deus mais uma vez eu agradeço por me dar forças para vencer as etapas e coragem para enfrentar o que estiver por vir.



## RESUMO

O diabetes melitus está entre as doenças crônicas consideradas emergenciais. Produtos obtidos à base de plantas medicinais vêm apresentando resultados terapêuticos eficientes no tratamento dessas doenças crônicas. Com 56,3% da produção mundial, o Brasil é o maior produtor mundial e o maior consumidor de maracujá. Muitos estudos têm considerado a *P. edulis* como uma espécie promissora, inclusive para o tratamento do diabetes mellitus. Desta forma, este estudo avaliou os possíveis efeitos de insumos obtidos da espécie vegetal *P. edulis*, nos marcadores bioquímicos e modulação plaquetária em ratos diabéticos. O extrato bruto foi obtido por maceração em solução hidroetanólica 70% (v/v). A fração de flavonoides foi obtida por partição líquido-líquido. O marcador químico isorientina foi quantificado por análises de cromatografia líquida de ultra performance acoplado a espectrometria de massas. A caracterização química dos insumos foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência acoplado a espectrometria de massas. Ratos "Wistar" machos foram tratados com aloxano (150mg/kg de massa dissolvido em salina 0,9%) intraperitoneal. O extrato bruto (0,2g de extrato /kg) e a fração de flavonoides (20mg da fração/kg) foram administradas em ratos normais e diabéticos por 90 dias. Os animais dos grupos "Controle" e "Diabetes" receberam apenas água. A agregação plaquetária foi avaliada em agregômetro a 37°C. A produção de espécies oxidantes nas plaquetas de ratos diabéticos e não diabéticos foi avaliada na presença e na ausência de acetato miristato de forbol, por quimioluminescência. Os marcadores bioquímicos foram determinados no soro por método enzimático colorimétrico e a hemoglobina glicada foi avaliada por cromatografia líquida de alta eficiência em equipamento da marca Bio-Rad. Avaliando os resultados obtidos nas análises, os dados sugerem a presença de diversos flavonoides derivados da apigenina e luteolina, sendo a maioria c-heterosídeos. A quantificação do marcador químico confirma a presença da isorientina nos insumos obtidos, sendo a fração butanólica com o maior teor de isorientina (6,1%). A indução do diabetes mellitus levou ao aumento da glicemia bem como dos níveis de frutossamina e de hemoglobina glicada, com apresentação de sinais clássicos do diabetes polidipsia, polifagia e perda de peso. O diabetes mellitus induziu aumento na produção de espécies oxidantes e na agregação plaquetária. O tratamento dos animais com o extrato bruto e com a fração de flavonoides foi capaz de reduzir a ingestão de líquidos, o consumo de sólidos, os níveis glicêmicos, os níveis séricos de frutossamina, a agregação plaquetária e a produção de espécies oxidantes nos animais diabéticos. Todos estes resultados sugerem que as folhas de *P. edulis* apresentam um efeito benéfico no estado diabético, prevenindo o aparecimento das complicações crônicas.

Palavras-chave: *Passiflora*. Maracujá. Diabetes Mellitus. Agregação Plaquetária. Flavonoides.

## ABSTRACT

Diabetes mellitus is among the chronic diseases considered emergency. Products obtained from medicinal plants has been presenting efficient therapeutic results on treatment for chronic diseases. With 56.3% of world production, Brazil is the world's largest producer and the largest consumer of passion fruit. Many studies have considered *P. edulis* as a promising species, including for the treatment of diabetes mellitus. Thus the aim of this study was to evaluate the possible effects of the dry extract of leaves of passion fruit on biochemical markers and platelet aggregation in diabetic rats. The dry extract was obtained by grinding in a hydroethanolic solution 70% (V/V). The flavonoid fraction was obtained by liquid-liquid partition. The isoorientin chemical marker was quantified by ultra-performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry. The chemical characterization was performed by high performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry. Male "Wistar" rats were treated with alloxan (150 mg/kg body weight dissolved in 0.9% saline) intraperitoneally, dry extract was administered (0.2 g extract / kg) and flavonoid fraction was administered (20 mg flavonoid / kg) to normal and diabetic rats, for ninety days. The control and diabetic groups received water only. Platelet aggregation was performed in aggregometer to 37°C. The production of oxidizing species in platelets from diabetic and non-diabetic rats in the presence and absence of phorbol myristate acetate was evaluated by chemiluminescence. Biochemical markers were determined in serum by enzymatic method and glycated hemoglobin was evaluated by high performance liquid chromatography on Bio-Rad brand equipment. Our results suggest the presence of several flavonoids derived from apigenin and luteolin, being most c-heterosides. Chemical marker quantification confirms the presence of isoorientin, being the butanolic fraction with the highest isoorientin content (6.1%). The induction of diabetes mellitus led to hyperglycemia as well as the increase in levels of fructosamine and glycated hemoglobin, presenting classic signs of diabetes polydipsia, polyphagia and weight loss. Diabetes mellitus induced increased production of oxidant species and platelet aggregation. The treatment of the animals with the crude extract and flavonoid fraction was able to reduce fluid intake, solids consumption, glycemic levels, serum levels of fructosamine, platelet aggregation and the production of oxidant species in diabetic animals. All these results suggest that *P. edulis* leaf dry extract can present a beneficial health on the diabetic state, preventing the appearance of its complications.

Key words: *Passiflora*. Diabetes Mellitus. platelet aggregation. flavonoids.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Captação de glicose por GLUT 4 via IRS/PI3K/Akt.....	23
Figura 2 - Revisão esquemática das principais vias envolvidas na ativação plaquetária.....	33
Figura 3 - Mecanismos propostos para explicar o dano celular induzido pela hiperglicemia e o estresse oxidativo como via final comum das quatro vias metabólicas ativadas.....	36
Figura 4 - Detalhes das folhas e das flores de <i>Passiflora edulis</i> Sims. ....	41
Figura 5 - Detalhe do fruto de <i>Passiflora edulis</i> Sims.....	41
Figura 6 - Fluxograma resumido das etapas experimentais.....	46
Figura 7 - Estrutura básica das flavonas. Posições comuns para O- e C-glicosilação indicadas pelas setas.....	64
Figura 8 – Cromatograma obtido por HPLC-PDA em 254 nm das folhas de <i>P. edulis</i> .....	65
Figura 9 - Espectro representativo no UV no extrato das folhas de <i>P. edulis</i> .....	67
Figura 10 - Íon produto característico para quebras C-heterosídicas.....	68
Figura 11 - Espectro de massas full scan do extrato bruto, da Fr-EtOAc e da Fr-BuOH analisado em modo negativo por FIA-ESI-MS <sup>2</sup> . Faixa de íons m/z 100 a 1000 Da. ....	69
Figura 12 - Estrutura dos compostos presentes no extrato bruto das folhas de <i>P. edulis</i> .....	70
Figura 13 - Espectro de MS <sup>2</sup> , do íon precursor m/z 609, com energia de colisão de 30eV, no modo negativo.....	71
Figura 14 - Espectro de MS <sup>2</sup> , do íon precursor m/z 593, com energia de colisão de 20eV, no modo negativo.....	72
Figura 15 - Espectro de MS <sup>2</sup> , do íon precursor m/z 564, com energia de colisão de 20eV, no modo negativo.....	73
Figura 16 - Espectro de MS <sup>2</sup> , do íon precursor m/z 447, com energia de colisão de 20eV, no modo negativo.....	73
Figura 17 - Espectro de MS <sup>2</sup> , do íon precursor m/z 431, com energia de colisão de 20eV, no modo negativo.....	74

Figura 18 - Espectro de MS <sup>2</sup> , do íon precursor m/z 325, com energia de colisão de 20eV, no modo negativo.....	75
Figura 19 - Espectro de MS <sup>2</sup> , do íon precursor m/z 195, com energia de colisão de 25eV, no modo negativo.....	75
Figura 20 - Espectro de MS <sup>2</sup> , do íon precursor m/z 133, com energia de colisão de 25eV, no modo negativo.....	76
Figura 21 - Curva de quantificação da isoorientina .....	77
Figura 22 - Posições importantes na molécula de flavonoide, que é determinante na atividade biológica. ....	86
Figura 23 - Relação da estrutura e da atividade biológica de flavonoides encontrado nas folhas P. edulis .....	88

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Monitoramento do consumo de ração .....	80
Gráfico 2 - Monitoramento do consumo de líquido.....	81
Gráfico 3 - Efeito do extrato bruto e da fração de flavonoides de <i>P. edulis</i> sobre a cinética de emissão de luz em sistemas contendo plaquetas de ratos não diabéticos. ....	94
Gráfico 4 - Efeito do extrato bruto e da fração de flavonoides de <i>P. edulis</i> sobre a cinética de emissão de luz em sistemas contendo plaquetas de ratos diabéticos. ....	94
Gráfico 5 - Agregação Plaquetária em ratos Wistar .....	97

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Relação de massa fresca e seca das folhas de <i>P. edulis</i> . ....	59
Tabela 2 - Frequências percentuais e tamanho médio das partículas na análise granulométrica das folhas de <i>P. edulis</i> . ....	60
Tabela 3 – Rendimento obtido no processo de obtenção dos insumos farmacêuticos. ....	60
Tabela 4 - Teor de Polifenóis Totais e Flavonoides no extrato bruto e nas frações das folhas de <i>P. edulis</i> . ....	61
Tabela 5 - Diferentes tipos de solventes utilizados e os respectivos grupos de metabólitos majoritariamente encontrados. ....	62
Tabela 6 - Proposta das estruturas das substâncias encontradas no extrato bruto obtido das folhas da espécie de <i>P. edulis</i> . ....	70
Tabela 7 - Equação da curva de calibração e limites de quantificação (LOQ). ....	77
Tabela 8 - Concentração do marcador isorientina no extrato e nas frações ....	77
Tabela 9 - Resumo da precisão e exatidão. ....	78
Tabela 10 - Avaliação da glicemia de jejum e da concentração de hemoglobina glicada em ratos Wistar. ....	82
Tabela 11 - Níveis séricos de ureia e creatinina em ratos diabéticos e não diabéticos, tratados e não tratados com o extrato e as frações das folhas de <i>Passiflora edulis</i> Sims. ....	89
Tabela 12 - Avaliação do perfil lipídico no soro de ratos Wistar. ....	92
Tabela 13 - Produção de espécies oxidantes por plaquetas de ratos normais e diabéticos tratados e não tratados com o extrato bruto e com a fração de flavonoides de <i>P. edulis</i> . ....	93

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

a. C	- Antes de Cristo
ABNT	- Associação Brasileira de Normas Técnicas
ADA	- Associação Americana de Diabetes
ADP	- Adenosina difosfato
$\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	- Cloreto de Alumínio 6x hidratado
ATP	- Adenosina Trifosfato
AGEs	- Produtos Finais de Glicação Avançada
Akt	- <i>V-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1</i> / Proteína-quinase B
AMPc	- Adenosina monofosfato cíclico
ANOVA	- Análise de Variância
BCA- $\text{Na}_2$	- Ácido Bicinconínico Dissódico
$\text{CaCl}_2$	- Cloreto de Cálcio
CD36	- Grupo de diferenciação 36
$\text{CH}_3\text{COOK}$	- Acetato de potássio
cm	- Centrímetro
$\text{CO}_2$	- Dióxido de Carbono
COBEA	- Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
CV	- Coeficiente de Variação
Da	- Dalton
DCVs	- Doenças cardiovasculares
DM	- Diabetes Mellitus
DCCT	- The Diabetes Control and COmplications Trial Research Group
EDTA	- Ácido etilenodiamino tetra-acético
EAG	- Equivalente em ácido gálico
EQ	- Equivalente em quercetina
ERN	- Espécies Reativas de Nitrogênio
ERO	- Espécies Reativas de Oxigênio
ESI	- Ionização por "electrospray"
EtOH 70%	- Extrato etanólico 70%
eV	- Eletron volt
EUA	- Estados Unidos da América
FcR $\gamma$	- Receptor Fc de cadeia $\gamma$
FIA	- Injeção em fluxo contínuo
FrAqOH	- Fração Aquosa
Fr-BuOH	- Fração butanólica
Fr-EtOAc	- Fração Acetato
Fr-H	- Fração hexano
FvW	- Fator de von Willebrand

H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	- Peróxido de hidrogênio
GAPDH	- Gliceraldeído-3-Fosfato desidrogenase
GMPc	- Guanosina Monofosfato Cíclico
GpVI	- Glicoproteína VI
GPS	- Sistema Global de Posicionamento
GLUT1	- Transportador de Glicose 1
GLUT4	- Transportador de Glicose 4
gp91 <sup>phox</sup>	- Glicoproteína transmembrana de 91 KDa
H <sub>2</sub> O	- Água
HbA <sub>1c</sub>	- Hemoglobina Glicada
HDL	- Lipoproteína de Densidade Alta
HPLC	- Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
IDF	- Federação Internacional de Diabetes
IF	- Infravermelho
IRS	- Substrato receptor de insulina
IT	- Analisador tipo <i>ion-trap</i>
iNOS	- Óxido nítrico sintase indutiva
KCl	- Cloreto de Potássio
LDQ	- Limite de detecção
LDQ	- Limite de quantificação
LDL	- Lipoproteína de Baixa Densidade
LDLoxo	- Lipoproteína de Baixa Densidade oxidada
μL	- Microlitro
μm	- Micrômetro
MAPK	- Proteína-Quinase ativada por mitógeno
MeOH	- Alcool Metílico
MRM	- Multiple Reaction Monitoring
MS <sup>n</sup>	- Espectrometria de Massas Múltiplos estágios
<i>m/z</i>	- Razão massa por carga
N <sub>2</sub>	- Gás Nitrogênio
NaCl	- Cloreto de Sódio
NADPH	- Nicotinamida adenina dinucleotideo fosfato-oxidase
NO	- Óxido Nítrico
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	- Ânion Superóxido
OH <sup>·</sup>	- Radical hidroxila
ONOO <sup>-</sup>	- Peroxinitrito
NOS	- Óxido Nítrico Sintetase
PBS	- Tampão fosfato-salino



PI-3K	- Fosfoinositídeo-3-quinase
PMA	- Acetato de Forbol Morostato
ppm	- Partes por milhão
PKC	- Proteína quinase C
PKG	- Proteína quinase G
PPS	- Perda Por Secagem
PRP	- Plasma Rico em Plaquetas
RE	- Erro relativo
RMN	- Ressonância magnética nuclear
RSD	- Desvio padrão relativo
RTK	- Receptor Tirosina-quinase
S	- Sul
SBD	- Sociedade Brasileira de Diabetes
SOD	- Superóxido Dismutase
SPE	- Extração em fase sólida
SHP-2	- Domínio SH2 de proteína fosfatase
TXA2	- Tromboxano A2
UPLC	- Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência
UV	- Radiação ultravioleta
UV-PDA	- Detector ultravioleta associado ao arranjo de diodos
v/v	- Volume por volume
vWf	- Fator de von Willerbrand
UKDPDS	- UK Prospective Diabetes Study
W	- Oeste
WHO	- World Health Organization

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	19
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	22
2.1	EPIDEMIOLOGIA DO DIABETES MELLITUS.....	26
2.2	PLAQUETAS.....	29
2.3	DIABETES E ATIVAÇÃO PLAQUETÁRIA.....	34
2.4	USO POPULAR DE PLANTAS MEDICINAIS.....	38
2.5	A ESPÉCIE <i>Passiflora edulis</i> .....	40
2.6	ABORDAGEM QUÍMICA E FARMACOLÓGICA DAS FOLHAS DE MARACUJÁ ( <i>PASSIFLORA SPP</i> ).....	42
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	45
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	45
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	46
4.1	MATÉRIA PRIMA VEGETAL.....	47
4.2	SECAGEM.....	47
4.3	GRANULOMETRIA.....	47
4.4	PREPARO DO EXTRATO BRUTO DAS FOLHAS DE <i>Passiflora edulis</i> .Sims.....	48
4.5	OBTENÇÃO DA FRAÇÃO DE FLAVONOIDES DAS FOLHAS DE <i>P. edulis</i> .....	48
4.6	ETAPA QUÍMICA.....	48
	<b>Caracterização Química Por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência</b>	
4.6.1	<b>(HPLC)</b> .....	49
4.6.2	<b>Caracterização Química Por Espectrometria De Massas (FIA-ESI-IT-MSn)</b> ...	49
4.6.3	<b>Análises para quantificação de isoorientina no extrato bruto e nas frações de <i>Passiflora</i> por UPLC-ESI-Tq-MS</b> .....	50
4.6.4	<b>Preparo de amostra para análise quantitativa por UPLC-ESI-MS</b> .....	51
4.6.5	<b>Preparo das soluções padrão para análise de quantificação</b> .....	51
4.6.6	<b>Parâmetros de validação</b> .....	51
4.6.7	<b>Linearidade e limite de quantificação e detecção</b> .....	51
4.6.8	<b>Efeito da matriz e recuperação</b> .....	52
4.6.9	<b>Precisão e Exatidão</b> .....	52
4.6.10	<b>Determinação do teor de fenóis totais</b> .....	52

4.6.11	Determinação do teor de flavonoides.....	53
4.7	ETAPA BIOLÓGICA ENSAIOS FARMACOLÓGICOS.....	53
4.7.1	Grupos experimentais.....	54
4.7.2	Indução do diabetes mellitus.....	54
4.7.3	Administração do extrato bruto e da fração majoritária flavonoides.....	55
4.8	PARÂMETROS BIOLÓGICOS.....	55
4.8.1	Monitoramento do consumo alimentar e ingestão de líquido.....	55
4.8.2	Obtenção das amostras biológicas.....	56
4.8.3	Obtenção de plaquetas lavadas.....	56
4.8.4	Contagem de plaquetas.....	56
4.8.5	Avaliação do controle glicêmico.....	56
4.8.6	Avaliação do perfil lipídico e da função renal.....	57
	Avaliação dos efeitos do extrato bruto e da fração de flavonoides obtidos de	57
4.8.7	<i>P. edulis</i> sobre produção de espécies oxidantes.....	
4.8.8	Avaliação da agregação plaquetária.....	57
4.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	58
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÕES.....</b>	<b>59</b>
5.1	SECAGEM DO MATERIAL VEGETAL.....	59
5.2	ANÁLISE GRANULOMÉTRICA DOS PÓS.....	59
5.3	ETAPA QUÍMICA.....	60
	Determinação do teor de polifenóis totais no extrato bruto e nas frações obtidas	61
5.3.1	das folhas <i>P. edulis</i> .....	
	Determinação do teor de flavonoides no extrato bruto e nas frações obtidas das	62
5.3.2	folhas <i>P. edulis</i> .....	
5.3.3	Perfil fitoquímico das folhas <i>P. edulis</i> .....	62
5.3.4	Quantificação do marcador químico nos insumos obtidos da espécie vegetal.....	76
5.4	ETAPA BIOLÓGICA.....	79
5.4.1	Consumo Alimentar e ingestão de líquido.....	80
5.4.2	Glicemia de jejum e glicação de proteínas no sangue total e no soro.....	81
5.4.3	Níveis séricos de Uréia e Creatinina.....	89
5.4.4	Perfil Lipídico .....	91
5.4.5	Ativação Plaquetária.....	93
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>99</b>

<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>100</b>
-------------------------	------------

## 1. INTRODUÇÃO

As doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) causam hoje aproximadamente 16 milhões de mortes prematuras anualmente (WHO, 2016). Segundo o relatório anual da Organização Mundial de Saúde (WHO) publicado em 2016, as cardiopatias e pneumopatias, os acidentes cerebrovasculares, o câncer e o diabetes são os grandes responsáveis por elevados índices de mortes prematuras. No Brasil, estudos apontam para três grandes grupos responsáveis pela “epidemia de DCNT”, o diabetes, a doença cardiovascular e o acidente vascular encefálico (MALTA; SILVA JR, 2013).

Em 2011 a Organização das Nações Unidas (ONU) realizou a Reunião de Alto Nível sobre DCNT, que resultou em uma declaração política, onde os países-membros comprometeram-se a trabalhar para deter o crescimento das DCNT com ações de prevenção dos seus principais fatores de risco. No Brasil, o Plano de Ações Estratégicas para o enfrentamento das DCNT, teve como uma de suas metas a redução de 25% na probabilidade incondicional de mortalidade global de doenças crônicas, sendo que dentre estas, está o diabetes e a doença cardiovascular (LIFESTYLE; CHLORIDE, 2013; WHO, 2014).

O diabetes mellitus (DM) trata-se de uma desordem metabólica de múltipla etiologia caracterizada por níveis elevados de glicose sanguínea, que tem o estresse oxidativo como um ponto chave no desenvolvimento de complicações micro e macrovasculares. Estas podem resultar em lesão endotelial e levar ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares (BERTOLUCCI et al., 2007; ADA, 2016). Dados do *The Diabetes Control and Complications Trial Research Group* (DCCT) e do *UK Prospective Diabetes Study* (UKPDS) têm demonstrado uma relação direta entre hiperglicemia cronicamente mantida e as complicações macrovasculares que podem levar ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares (CURRIE et al., 2010).

De acordo com a WHO (2016), uma estimativa de 1,5 milhões de mortes causadas diretamente pelo diabetes mellitus e outras 2,2 milhões de mortes foram atribuídas aos altos níveis de glicose sanguínea. Em 2014, 8,5% dos adultos acima de 18 anos tiveram diabetes mellitus.

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; FLIERL *et al.*, 2010; RANDRIAMBOAVONJY; FLEMING, 2012). Além disso, a reatividade plaquetária aumentada em decorrência do DM tem sido associada ao descontrole na produção de ERO mediada pela NADPH oxidase. Wang *et al.*, (2015) relata que apesar do mecanismo molecular de regulação plaquetária por espécies oxidantes ser ainda largamente desconhecido, recentemente foi identificado que um domínio SH2 de uma proteína fosfatase (SHP-2) é um alvo crítico das espécies oxidantes durante a ativação plaquetária induzida por colágeno, que resultará em uma exposição de receptores de adesão plaquetária, como é o caso da Glicoproteína VI (GpVI), e formará junto ao receptor Fc de cadeia  $\gamma$  (FcR $\gamma$ ), um complexo multiprotéico. Estudos apontam esse complexo como o principal receptor envolvido na ativação plaquetária induzida por colágeno (HAOUARI; ROSADO, 2008; VIOLI; PIGNATELLI, 2014).

Por outro lado, a via de sinalização NO/cGMP/PKG é crucial para o controle da função plaquetária e o aumento da produção de espécies oxidantes pode levar a uma dessensibilização de cGMP nas plaquetas, o que resultará em uma hiperativação plaquetária (MAGWENZI *et al.*, 2015). Já os AGEs podem diretamente inativar a e-NOS, determinando impedimento da vasodilatação endotélio-dependente. Ao mesmo tempo pode levar a um aumento na permeabilidade vascular resultando em ativação da resposta local inflamatória, contribuindo para o estresse oxidativo (WAJCHENBERG, 2002).

Assim, a busca por compostos com capacidade de reduzir ou prevenir a hiperativação plaquetária, assim como para o tratamento das DCNT, tem sido alvo de diferentes estudos uma vez que os custos para o tratamento das DCNT causam um impacto gigantesco no sistema de saúde do país. Por outro lado, segundo Newman e Cragg (2016), o uso de produtos naturais tem sido uma fonte propícia para a descoberta de novos fármacos. Apenas para o tratamento do diabetes mellitus tipo I e II, de 1981 a 2014, um total de 29 fármacos aprovados foram derivados de produtos naturais (NEWMAN; CRAGG, 2016).

O uso terapêutico das diversas espécies do gênero *Passiflora* é comum em diversos países, inclusive no Brasil. Estas espécies são utilizadas desde a antiguidade na medicina popular, com diversas funções. Estudos *in vitro* têm demonstrado que o extrato de folhas de *Passiflora edulis* Sims apresentou atividade antioxidante bem como inibidora de glicação protéica e agregação plaquetária, sendo estes efeitos atribuídos principalmente aos flavonóides presentes nas folhas

desta espécie vegetal (CARVALHO et al., 2010). No entanto o papel modulatório do extrato bruto seco de folhas *P. edulis* Sims sobre a ativação plaquetária não está totalmente esclarecido.

Sendo assim, estudos que visem avaliar as ações deste extrato bem como de seus principais componentes sobre processos que levam a ativação plaquetária poderão fornecer informações importantes a respeito do uso racional deste extrato, como uma possível terapia para identificar novas entidades químicas para o tratamento do diabetes mellitus

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O diabetes mellitus (DM) trata-se de um grupo heterogêneo de distúrbios metabólicos, tendo a hiperglicemia como fator comum, que pode ser um resultado de defeitos na ação da insulina, na secreção de insulina ou em ambas (SBD, 2015). De acordo com Malheiros (2006), a insulina está sempre associada com a condição inicial de hiperglicemia, mas a presença deste hormônio também significa uma situação de alto suprimento energético para as células e nesta situação, as reações anabólicas serão favorecidas.

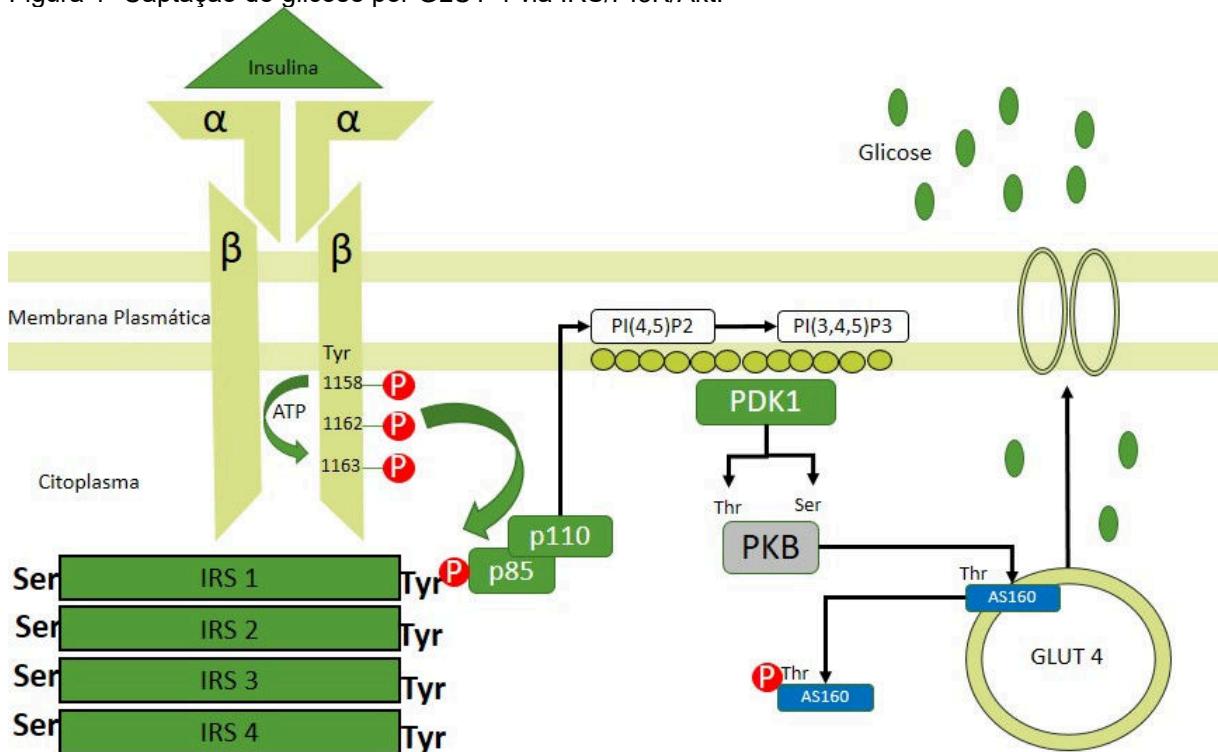
Desta forma, além do papel fundamental no transporte de glicose e metabolismo energético celular, a insulina possui funções na ativação da síntese de glicogênio, de proteínas, de lipídeos e da transcrição de genes específicos. Ao mesmo tempo, inibe a degradação destas substâncias (CARVALHEIRA; ZECCHIN; SAAD, 2002; CZECH, 1977).

O receptor proteico de superfície celular específico para a insulina é um receptor tirosina-quinase (RTK) capaz de se auto-fosforilar e promover a atividade intrínseca de tirosina-quinase, sendo que o resultado final da ativação do receptor será uma cascata de sinalização intracelular, dentre os quais poderá levar ao aumento na captação de glicose via transportador de glicose (Figura 1) (LEMMON; SCHLESSINGER, 2010; NELSON, 2011; LEITE; CALLADO; RIBEIRO, 2012;).

Dentre os vários transportadores de glicose, o GLUT4 é conhecido por ter sua regulação dependente de estímulos mediados pela insulina e encontra-se predominantemente nos tecidos adiposo e muscular (MACHADO; SCHAAN; SERAPHIM, 2006). Nos hepatócitos há um predomínio na expressão da isoforma GLUT2, um transportador não dependente de insulina já presente na membrana plasmática (DEVLIN, 1999).



Figura 1- Captação de glicose por GLUT 4 via IRS/PI3K/Akt.



Fonte: Adaptado de CARVALHEIRA, ZECCHIN E SAAD (2002, p.420).

Legenda: Quando fosforilada a AS160 se dissocia das vesículas de GLUT4, possibilitando a translocação do GLUT4 para a membrana plasmática.

Dentre os diversos substratos do receptor de insulina (IRS) podemos destacar os substratos 1-4 do receptor de insulina (IRS1-4), que irão integrar o metabolismo intermediário ao seu efeito celular final (CAMPOREZ; ALMEIDA; MARÇAL, 2013). A expressão do receptor de insulina ocorre em praticamente todos os tecidos de mamíferos, porém sua concentração poderá variar desde 40 receptores nos eritrócitos circulantes a mais de 200.000 receptores no tecido adiposo, no tecido muscular e no tecido hepático (HABER et al., 2001). Nos tecidos periféricos, a insulina atua através da via IRS/PI3K/AKT, afetando o metabolismo de glicogênio, de lipídeos e a captação de glicose, bem como da via IRS/MAPK/ERK, que atua no controle da expressão gênica, do crescimento e da diferenciação celular (CZECH, 1977; GOALSTONE; DRAZNIN, 1997; STEPHENS et al., 1998; LEMMON; SCHLESSINGER, 2010; KONG et al., 2014; NELSON, 2011; RAMALINGAM; OH; THURMOND, 2014; NADEEM; AHMED; EL-DENSHARY, 2015). Alguns dos efeitos da insulina podem ser observados em segundos ou minutos, porém outros como a

síntese de proteínas e expressão gênica podem levar dias (HILAL-DANDAN & BRUNTON, 2015).

Portanto, alterações funcionais que acarretem na sinalização intracelular mediada pela insulina, ou até mesmo defeitos fisiopatológicos que levem a uma anormalidade na produção do hormônio anabólico insulina, implicarão em distúrbio na homeostase da glicose, conduzindo ao diabetes mellitus.

De acordo com a *American Diabetes Association* (ADA, 2016), o diabetes mellitus pode ser classificado em quatro categorias clínicas: o diabetes mellitus Tipo 1 (DM1), que ocorre em consequência da destruição das células- $\beta$  e geralmente leva à deficiência absoluta de insulina; o diabetes mellitus Tipo 2 (DM2), que tem como causa principal a resistência à insulina associada a um defeito progressivo na sua secreção; o diabetes mellitus gestacional (DMG), que ocorre quando o diabetes mellitus é diagnosticado durante a gravidez; outros tipos específicos de diabetes devido a diversas causas, como por exemplo, defeitos genéticos na função da célula  $\beta$ , defeitos genéticos na ação da insulina, doenças do pâncreas exócrino (tais como fibrose cística) ou induzido por fármacos ou agentes químicos.

Entre estes, o DM1 e o DM2 são os mais frequentes na população e contribuem significativamente para o alto índice de morbidade decorrente desta patologia. O DM1, está presente em 5% a 10% dos casos, e apresenta diagnóstico frequente em crianças e adolescentes (75% dos casos) (SBD, 2014). Apresenta-se nas formas clássica e silenciosa. O tratamento com insulina exógena é mandatório e associado a sobrevida do paciente, onde normalizar a glicemia e a HbA1C, além de prevenir a cetoacidose e a hipoglicemia, permite controlar o desenvolvimento de complicações micro e macrovasculares (HIRATA e HIRATA, 2006). Nos pacientes sintomáticos é comum a poliúria, polifagia, polidipsia, perda de peso e alterações visuais (VIANA; RODRIGUEZ, 2011).

O DM2 é uma síndrome heterogênea, observada em cerca de 90% do total de diabéticos. Os pacientes com o tipo 2 também podem apresentar poliúria, polidipsia e polifagia, além de alterações visuais e feridas de difícil cicatrização nos estágios mais avançados da doença. É um distúrbio comum em que o fator hereditário e a obesidade apresentam maior importância do que no tipo 1 e apesar desses pacientes produzirem insulina normalmente, suas células são incapazes de usar toda essa insulina secretada pelo pâncreas, fazendo com que seus níveis

permaneçam altos no sangue, o que é conhecido como resistência à insulina (VIANA; RODRIGUEZ, 2011).

Desta forma, a deficiência na secreção e ou na ação da insulina, são fatores essenciais para desenvolvimento desta patologia assim como das alterações bioquímicas observadas em decorrência do DM, tais como: hiperglicemia em jejum e pós-prandial, glicogenólise aumentada, catabolismo proteico e lipídico elevados, aumento da glicação e aumento da produção de corpos cetônicos nos caso em que houver um descontrole glicêmico acentuado (CARVALHEIRA; ZECCHIN; SAAD, 2002; LIMA-SILVA et al., 2007 CL, 2011; ROACH et al., 2012; BEUREL; GRIECO; JOPE, 2015; RAMACHANDRAN; SARAVANAN, 2015).

Além disso, a hiperglicemia está fortemente associada ao aparecimento das complicações crônicas que incluem a macroangiopatia, a microangiopatia e as neuropatias periféricas e autonômicas. Estas podem envolver principalmente, o sistema cardiovascular, os rins, nervos periféricos e tecido ocular (TSCHIEDEL, 2014).

Neste contexto, vale enfatizar que segundo Tschiedel, (2014) o risco relativo de morte devido a complicações vasculares é três vezes maior nos pacientes com DM do que na população com as doenças cardiovasculares (DCV) não portadora de DM, sendo que 80% dos óbitos em portadores de DM, são em consequência de complicações cardiovasculares.

Segundo a SBD, (2015) o controle de fatores de risco modificáveis, tais como dieta, atividade física, tabagismo e excesso de peso, estão associados a redução da incidência da doença em si. Entretanto uma vez instalada a doença é de extrema importância a prevenção secundária, de tal forma que o controle metabólico tem um papel importante na prevenção do surgimento e ou progressão das complicações crônicas. O estudo clínico *Diabetes Control and Complications Trial* (DCCT) já havia demonstrado em 1999, a importância do controle glicêmico em pacientes portadores de diabetes mellitus tipo 1, reduzindo o desenvolvimento de complicações microvasculares. Entretanto até a década de 70 apenas a glicosúria e as dosagens ocasionais da glicemia de jejum eram utilizados como monitorização do controle glicêmico em pacientes portadores de diabetes mellitus (GROSS et al., 2002; SBD, 2015).

Com o avanço dos métodos de monitorização terapêutica, tivemos a introdução de marcadores tais como a hemoglobina glicada, capaz de avaliar a

longo prazo o controle glicêmico. Hoje segundo a SBD (2015) sabe-se que apenas a glicemia de jejum não é mais suficiente para o acompanhamento do controle glicêmico em pacientes com diabetes mellitus, pois reflete apenas a glicemia momentânea. Por outro lado, a determinação pós-prandial tem sido utilizada para acompanhar picos hiperglicêmicos que podem se associar a riscos cardiovascular e estresse oxidativo (GROSS; FERREIRA; OLIVEIRA, 2003; GELONEZE; LAMOUNIER; COELHO, 2006; SBD, 2015).

Como medida que visa melhor avaliação do controle glicêmico e monitorar o risco a desenvolvimento de complicações crônicas, a HbA1c é um parâmetro que vem sendo utilizado na clínica laboratorial para avaliar o controle glicêmico a longo prazo. Por outro lado, a medida da glicação de proteínas séricas glicadas, dita como frutossamina, tende a avaliar o controle glicêmico ao longo de um período de aproximadamente duas semanas (GROSS et al., 2002; FEITOSA; ANDRADE, 2014; SBD, 2015). Apesar dos níveis de frutossaminas não estarem tão bem associados as complicações crônicas do DM quanto a HbA1c, sabe-se que o controle conjunto dos parâmetros glicemia de jejum, de frutossamina e de HbA1c gera expectativas na prevenção do aparecimento das complicações crônicas do DM.

Desta forma torna-se de grande importância o tratamento dos indivíduos portadores de DM, visando não somente o controle glicêmico como também o estabelecimento de terapias capazes de atuar nos pontos cruciais para a prevenção das complicações crônicas advindas do DM.

## 2.1 EPIDEMIOLOGIA DO DIABETES MELLITUS

A prevalência do diabetes mellitus tem aumentado consideravelmente nas últimas décadas, assim como o número total de pessoas portadoras deste distúrbio. A crescente urbanização, envelhecimento populacional e mudanças significativas no estilo de vida da sociedade, em especial quanto à alimentação e à prática de exercícios físicos que levam a obesidade e sedentarismo, contribuem para a intensificação dos fatores de risco (GUARIGUATA et al., 2014). Segundo a IDF(2015), um em cada dois indivíduos com diabetes não sabe que é portador da doença, sendo observado também que a cada 11 indivíduos adultos, um é portador de diabetes.

Estatísticas demonstraram que em 1980 havia 118 milhões de pessoas com

diabetes mellitus. Em 2014, esse número aumentou para 442 milhões de casos de diabetes mellitus. Além disso, a prevalência no mundo de diabetes mellitus quase duplicou desde o ano de 1980, passando de 4,7% para 8,5% na população adulta nos dias atuais (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016). Em 2012 nos Estados Unidos, 29,1 milhões de americanos conviveram com essa doença, representando cerca de 9,3 % da população total (REGENSTEINER et al., 2015).

Estima-se que ao menos 20% dos pacientes americanos com mais de 65 anos de idade possuem diabetes mellitus, e que essa porcentagem tenderá a elevar-se rapidamente nas próximas décadas (ADA,2016). Por outro lado, estudos têm evidenciado um aumento acentuado na proporção de jovens diagnosticados com diabetes mellitus. De acordo com a IDF (2015), “mais que 79.000 crianças desenvolveram diabetes mellitus tipo 1 em 2013”.

Apesar do aumento mundial no número de pacientes portadores da doença, há uma marcante diferença na prevalência de diabetes mellitus entre diversos países e grupos étnicos. Em Nauru, na Oceania, e entre os índios Pima, no Arizona, nos Estados Unidos, foram observadas as maiores taxas de prevalência de diabetes mellitus, onde praticamente metade da população adulta são portadores do diabetes mellitus (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES-SBD, 2015a).

No Brasil, segundo a SBD (2015), “Uma epidemia de diabetes mellitus está em curso”. Desde o final da década de 1980, a prevalência de diabetes mellitus na população adulta passou de 7,6% à taxas mais elevadas que chegam a 13,5% para a cidade de São Carlos-SP e a 15% para a cidade de Ribeirão Preto-SP. Apenas no ano de 2013, estimou-se que existiram 11.933.580 pessoas, na faixa etária de 20 a 79 anos, portadores de diabetes mellitus no Brasil. Atualmente, sabe-se que a incidência de diabetes mellitus tipo 1 vem aumentando, particularmente na população infantil com menos de 5 anos de idade (SBD, 2015)

O diabetes mellitus é considerado um problema de saúde pública, pois está associado a diversas complicações sérias para o paciente como alterações microvasculares, na qual se pode citar a retinopatia, neuropatia e nefropatia, e complicações macrovasculares que são observadas, incluindo doença cardíaca coronária e acidente vascular cerebral. Além disso, há relatos atuais de associação do diabetes mellitus com outras co-morbidades como a osteoporose e depressão (MA, 2015; WHO, 2016).

As taxas de morte causadas direta ou indiretamente pelo diabetes mellitus vem aumentando a cada dia. De acordo com a WHO (2016), uma estimativa de 1,5 milhões de mortes foram causadas diretamente pelo diabetes mellitus e outras 2,2 milhões de mortes foram atribuídas aos altos níveis de glicose sanguínea.

A Sociedade Brasileira de Diabetes relata que em 2011 as taxas de mortalidade por DM (por 100 mil habitantes) eram de 30,1 para a população geral, 27,2 nos homens e 32,9 nas mulheres (SBD, 2015). Entretanto, apesar da alta prevalência e mortalidade em decorrência do diabetes mellitus, na declaração de óbito nem sempre se menciona o DM, pelo fato de serem suas complicações particularmente as cardiovasculares e cerebrovasculares, as causas da morte.

O diabetes mellitus está associado ao aumento no risco cardiovascular quando comparado a indivíduos não-diabéticos. Dados do *The Diabetes Control and Complications Trial Research Group* (DCCT) e do *UK Prospective Diabetes Study* (UKPDS) têm demonstrado uma relação direta entre hiperglicemia cronicamente mantida e as complicações macrovasculares que podem levar ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares (CURRIE et al., 2010). Segundo dados da Federação Internacional de Diabetes, as doenças cardiovasculares são consideradas as principais causas de morte e de inaptidão em pessoas com diabetes. Segundo a IDF, (2016) “Ações devem ser tomadas para diminuir o impacto das doenças cardiovasculares em pessoas com diabetes”.

Na América do Norte, na Europa Ocidental, na Austrália e no Japão a maioria das pessoas portadoras de diabetes mellitus, são de idade acima de 50 anos, e são consideradas com alto risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares. Nestes mesmos países, é estimado que entre 15 e 41% das pessoas acima de 50 anos de idade, portadores de diabetes mellitus, já tiveram doença cardiovascular (IDF, 2016). Uma parcela importante desses óbitos ocasionados direta ou indiretamente pelo diabetes mellitus é prematura, ocorrendo quando os indivíduos ainda contribuem economicamente para a sociedade.

Neste sentido se considerarmos a natureza crônica, a gravidade das complicações e os meios necessários para controlá-las, o DM torna-se uma doença cujos gastos econômicos são elevados não apenas para os indivíduos afetados e suas famílias, mas também para o sistema de saúde. No Brasil, o custo do tratamento de indivíduos portadores de DM gira em torno de 3,9 bilhões de dólares americanos, sendo que os custos do tratamento ambulatorial destes pacientes é da

ordem de 2.108 dólares americanos por paciente, levando a um impacto significativo no orçamento anual do Sistema de Saúde Pública (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2015a). Além disso, os custos intangíveis acarretados aos indivíduos que incluem a dor, a ansiedade, a inconveniência e a perda de qualidade de vida, por si só acarretam um grande impacto na vida dos portadores de diabetes e seus familiares.

Ainda, as alterações nos hábitos de vida em decorrência de complicações crônicas, tais como mudanças no ambiente de trabalho, assim como limitações no desempenho profissional, são custos sociais inestimáveis. Desta forma a prevenção, seja no início do DM ou até mesmo de suas complicações agudas e ou crônicas tornam-se alvos importantíssimos para a melhoria da qualidade de vida de milhões de pessoas portadores do DM.

## 2.2 PLAQUETAS

Os fragmentos anucleados de megacariócitos da medula óssea com um alto grau de organização e ricas em diferentes organelas, como mitocôndrias viáveis, sistema tubular denso e três tipos de grânulos morfologicamente diferentes que estocam diferentes tipos de constituintes: os grânulos alfa, os grânulos densos e os lisossomas, são conhecidos como plaquetas (LOPES-PIRES, 2013). As plaquetas por si só, estão envolvidas em diversas patologias importantes, sejam síndromes ou quadros trombóticos graves (CASTRO et al., 2006).

No esfregaço de sangue periférico, as plaquetas se apresentam como fragmentos citoplasmáticos de aspecto granular, entretanto sua aparência simples é na verdade uma estrutura discóide complexa. Internamente as plaquetas são subdivididas em uma região que inclui as membranas externa e interna e as estruturas estritamente associadas, como o sistema denominado “Sistema canalicular aberto”. Este sistema é o essencial na troca de moléculas com o meio externo, sendo o grande responsável pela liberação de diversas moléculas após a ativação plaquetária, a chamada “secreção plaquetária” (CASTRO et al., 2006; MAGWENZI et al., 2015).

Durante o processo de secreção plaquetária, apesar de haver mudanças nas suas características físicas, a liberação do conteúdo granular plaquetário ocorre sem lise celular e com manutenção da membrana plaquetária. Já na membrana celular,

observa-se grande quantidade de glicoproteínas e fosfolípídeos de membrana cuja função é adesão, ativação intracelular e até mesmo a coagulação. Além da função coagulatória dos fosfolípídeos de membrana, estes serão utilizados como substratos para a produção de agonistas da agregação plaquetária, como por exemplo o tromboxano A2 (TXA2), potente agonista da agregação plaquetária. Toda essa região presente nas plaquetas, é conhecida como zona periférica (BROOS et al., 2011; DA SILVA; D'AMICO, 2010).

Logo abaixo da zona periféria, encontra-se uma região denominada de zona sol-gel, que é composta basicamente de citoesqueleto para fornecer sustentação à forma discóide plaquetária e ao sistema contrátil. Sob ativação plaquetária o sistema contrátil permite a mudança da forma discóide, o prolongamento de pseudópodes, a contração interna e a liberação dos constituintes granulares (grânulos alfa e grânulos densos) (CASTRO et al., 2006).

Os grânulos alfa são compostos basicamente de proteínas adesivas, de fator de von Willebrand (FvW), de trombospondina, de vitronectina, de fator de crescimento derivado de plaquetas, de fator IV plaquetário, de fatores da coagulação (fator XI) e de inibidor do ativador plasminogênio. Estes grânulos são conhecidos como os mais abundantes grânulos secretores plaquetários e o principal sítio de armazenamento de proteínas (YADAV; STORRIE, 2016).

Por outro lado, os grânulos densos, são compostos de adenosina trifosfato (ATP), de adenosina difosfato (ADP), de serotonina e de cálcio. Além da presença dos grânulos alfa e denso, a zona de organela apresenta componentes celulares, tais como lisossomos e mitocôndrias, além de conter ATP e ADP, dentre outras moléculas críticas para a função plaquetária (PAGEL et al., 2016).

Por fim, as plaquetas possuem um sistema membranar onde basicamente nesta zona observa-se a presença do sistema tubular denso, local onde se encontra concentrado o cálcio (BROOS et al., 2012). Apesar de anucleadas, as plaquetas apresentam um papel importante no processo de hemostasia, estando diretamente envolvidas em diversas síndromes e patologias. De tal forma a regulação na ativação plaquetária torna-se alvo terapêutico importante no tratamento de processos patológicos que envolvam as doenças cardiovasculares (CASTRO et al., 2006; YADAV; STORRIE, 2016).

Vale lembrar que o sistema homeostático é formado não apenas pelas plaquetas, mas pelos fatores de coagulação que resultarão na formação de fibrina,



nos fatores fibrinolíticos que são os grandes responsáveis por dissolverem o coágulo, controlando a sua extensão; pelos inibidores proteicos e até mesmo pelas células endoteliais que revestem os vasos sanguíneos e contribuem para a manutenção do fluxo sanguíneo (CASTRO et al., 2006; WATT et al., 2012).

A interação com os componentes extracelulares da parede dos vasos sanguíneos, é a primeira etapa em um complexo mecanismo de ativação plaquetária, e para que isso ocorra as plaquetas apresentam diversas proteínas de adesão, dentre elas o complexo glicoprotéico (glicoproteína [Gp]) Ib-V-IX e GpVI, que se ligam respectivamente ao fator de von Willebrand (FvW) e ao colágeno (AMARANTE et al., 2007; BROOS et al., 2011, 2012).

A estabilização da adesão plaquetária à matriz extracelular, ocorre de maneira coordenada e envolve tanto uma firme adesão como ativação plaquetária, sendo que a sua adesão primária envolve a sua ligação com o colágeno, com a fibronectina e ou com a laminina. A rápida transdução de sinal mediante a adesão plaquetária irá desencadear diversos efeitos como ativação plaquetária, mudanças em seu citoesqueleto, expansão de pseudópodes, contração e secreção de conteúdos de seus grânulos que irão sustentar a adesão e subsequente agregação plaquetária via receptor de fibrinogênio (CARAMORI et al., 1998; GOMES et al., 2000; CASTRO et al., 2006; BROOS et al., 2011).

Além do complexo glicoprotéico Gp Ib-V-IX e GpVI, podemos encontrar outros receptores de colágeno como a proteína  $\alpha_2\beta_1$ , o receptor de fibronectina  $\alpha_5\beta_1$  e o receptor de laminina  $\alpha_6\beta_1$ . Uma vez aderida, ocorre o processo de secreção plaquetária, onde observamos a liberação dos conteúdos de seus grânulos e a exposição da glicoproteína IIb/IIIa (GpIIb/IIIa). De tal forma, a GpIIb/IIIa é extremamente importante durante a fase de agregação, pois é através dela que o fibrinogênio irá reconhecer uma pequena sequência dita como RGD (arginina, glicina e aspartato) fazendo a ponte de ligação entre as plaquetas, proporcionando a formação do agregado plaquetário (GOMES et al., 2000).

Na Figura 2 estão exemplificadas algumas vias capazes de modular o agregado plaquetário. Os receptores plaquetários para os agonistas trombina, colágeno, ADP, tromboxano A2 e ou complexos imune Fc $\gamma$ RIIa agem através da proteína G ou por ativação de tirosina quinases.

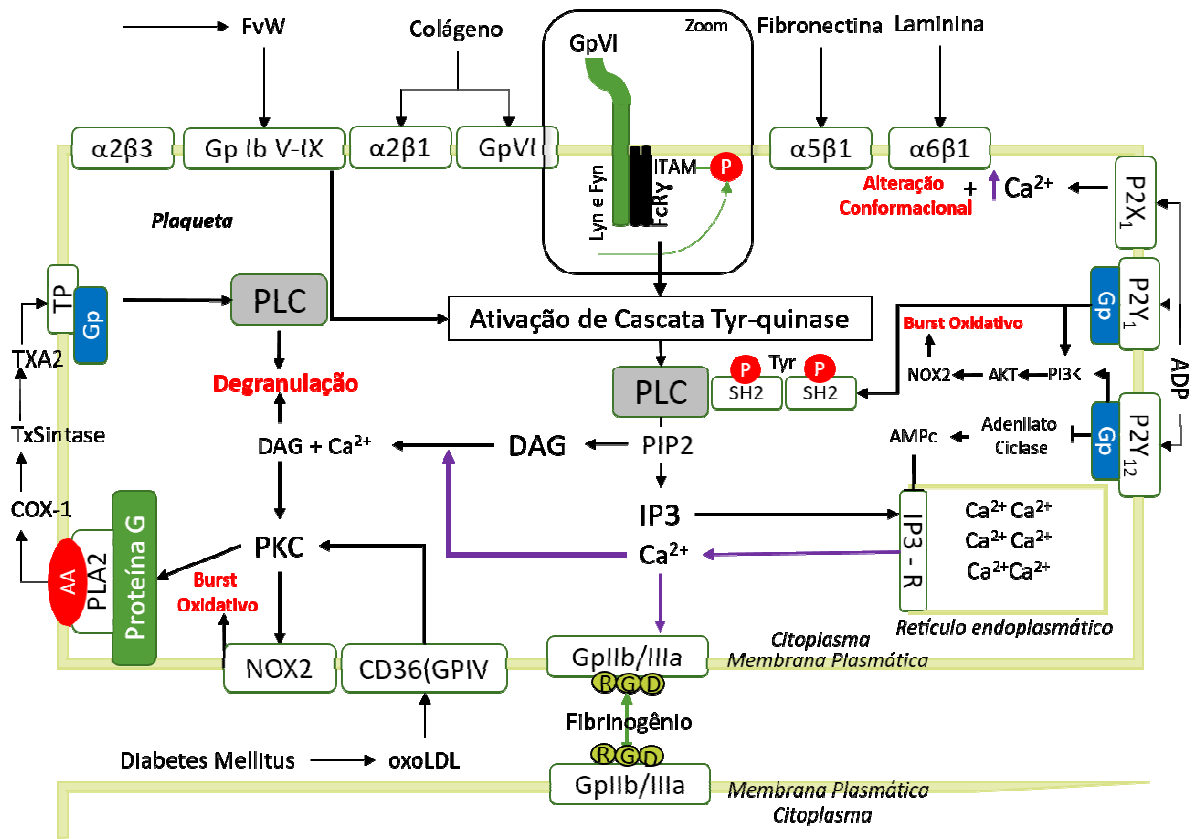
A GpVI um membro da superfamília de imunoglobulinas, formada por um complexo transmembrana com dois domínios de ligação extracelular, uma região

transmembrana e uma pequena região citoplasmática, é um dos principais sítios de ligação do agonista de agregação colágeno. Na região transmembrana da GpVI, encontra-se associada a cadeia FcR $\gamma$  formando um receptor de ativação tirosina quinase (BROOS et al., 2011).

A fosforilação da cadeia de FcR $\gamma$  em uma região de conservação dita como ITAM (Imuno-receptor baseado em tirosina) por membros da família de Src quinase (Lyn e Fyn) da GpVI, permite o recrutamento de diversas proteínas quinase de domínio SH2. Desta forma, uma cascata de sinalização irá resultar na ativação da fosfolipase C (PLC), via fosforilação de Tyr de seu domínio SH2. Em continuidade a propagação de sinal, a PLC irá hidrolisar o fosfatidilinositol 4,5 bifosfato (PIP2) produzindo inositol 1,4,5 trifosfato (IP3) e 1,2 diacilglicerol (DAG). Neste ponto, o IP3 (molécula de fácil difusão e solubilidade em água) irá se ligar ao seu receptor no sistema tubular denso plaquetário (DST), também conhecido como retículo endoplasmático. O DST é um canal seletivo de cálcio que permitirá o efluxo de Ca<sup>2+</sup> propiciando o aumento citoplasmático de Ca<sup>2+</sup> (CARAMORI et al., 1998; CASTRO et al., 2006; BROOS et al., 2011, 2012; WATT et al., 2012).

Por outro lado, o DAG junto com o Ca<sup>2+</sup> funciona como um receptor interno para a serina/treonina proteína quinase C (PKC). A PKC por sua vez transloca para a membrana e torna-se ativa. Desta forma, é iniciada uma série de eventos de ativação, incluindo a ativação de fosfolipase A2 (PLA2) que leva à alteração da forma plaquetária resultando em uma degranulação e como consequência resulta na agregação plaquetária com exposição de receptor de fibrinogênio GpIIb/IIIa.

Figura 2 - Revisão esquemática das principais vias envolvidas na ativação plaquetária.



Fonte: Adaptado de BROOS et al., (2011, p.156).

Além da via de transdução de sinal tirosina quinase, as plaquetas contam com sete receptores transmembrana acoplados a proteína G (GPCRs). A literatura relata que tanto os efeitos de inibição como de ativação podem ocorrer via proteína G (BROOS et al., 2012; PAGEL et al., 2016). A formação de tromboxano A2 (TxA2) é um exemplo clássico de ativação via proteína G. O aumento nos níveis de cálcio resulta na fosforilação do aminoácido Ser na posição 505 da PLA2 por proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK). Em consequência, ocorre a clivagem de ácidos graxos dos fosfolípidos de membrana com liberação de ácido aracdônico.

Neste ponto da via, podemos ter a ativação de diversas enzimas, entre as quais se destaca a enzima constitutiva ciclo-oxigenase (COX-1). A ativação da COX-1 leva à formação de mediadores lipídicos a partir do ácido aracdônico denominados eicosanoides, como por exemplo, a prostaglandina cíclica endoperóxido. Mais tardiamente, a tromboxano sintase irá mediar a formação do TxA2, utilizando como substrato as prostaglandinas produzidas anteriormente.

O ADP liberado pela secreção plaquetária atua não apenas na amplificação da onda de agregação plaquetária, via receptor de membrana P2Y1, como também é capaz de ligar-se ao receptor P2Y12. Este por sua vez, acoplado a proteína G, propiciará a inibição da enzima adenilil ciclase, que tem como função gerar o cAMP a partir do ATP, além de mediar a desfosforilação da fosfoproteína vasodilatadora (VASP). O cAMP reverte os altos níveis de cálcio limitando a ativação e agregação plaquetária. Por outro lado, há relatos de que a ativação de receptores P2Y12 e P2Y1 pode levar à ativação de uma série de proteínas quinases (PI3K/Akt) culminando na ativação da enzima NADPH oxidase (NOX2). Assim, o aumento de espécies oxidantes via ativação de NOX2 também contribui diretamente para a modulação da agregação plaquetária (SENO et al., 2001; WATT et al., 2012).

Apesar do imenso e complexo sistema de ativação e transdução de sinal para a ativação plaquetária, alguns autores (WATT et al., 2012, 2012; MAGWENZI et al., 2015; WANG et al., 2015) têm associado a ativação plaquetária em pacientes diabéticos, com um quadro oxidativo exacerbado decorrente da ativação da NOX2.

### 2.3 DIABETES E ATIVAÇÃO PLAQUETÁRIA

É de conhecimento que o diabetes mellitus é uma das maiores emergências globais do século 21, com um número de portadores da doença crescendo rapidamente pelo mundo. Por outro lado, sabe-se que a principal causa de morte e incapacitação entre as pessoas com diabetes mellitus é em consequência das doenças cardiovasculares, que incluem o acidente vascular cerebral, a doença arterial coronariana e a doença arterial periférica (IDF, 2016).

Em estudos conduzidos com pessoas portadoras de diabetes mellitus, com idade entre 28 e 44 anos, vivendo em países de média e alta renda, foi constatado que aproximadamente 16% teve uma história de doença cardiovascular, sendo que 2 % teve uma história de acidente vascular encefálico e 1 % teve uma história de ataque cardíaco (KOIVISTO, 1996; DAVID, 2010; KAUTZY-WILLER, 2013). Estes números são ainda mais assustadores quando o paciente encontra-se entre 50 e 69 anos de idade. Nesta população foi observado que aproximadamente 41% teve uma história de doença cardiovascular, sendo que 10% teve uma história de acidente vascular encefálico e 14% teve uma história de ataque cardíaco (IDF, 2016; XAVIER et al., 2013).

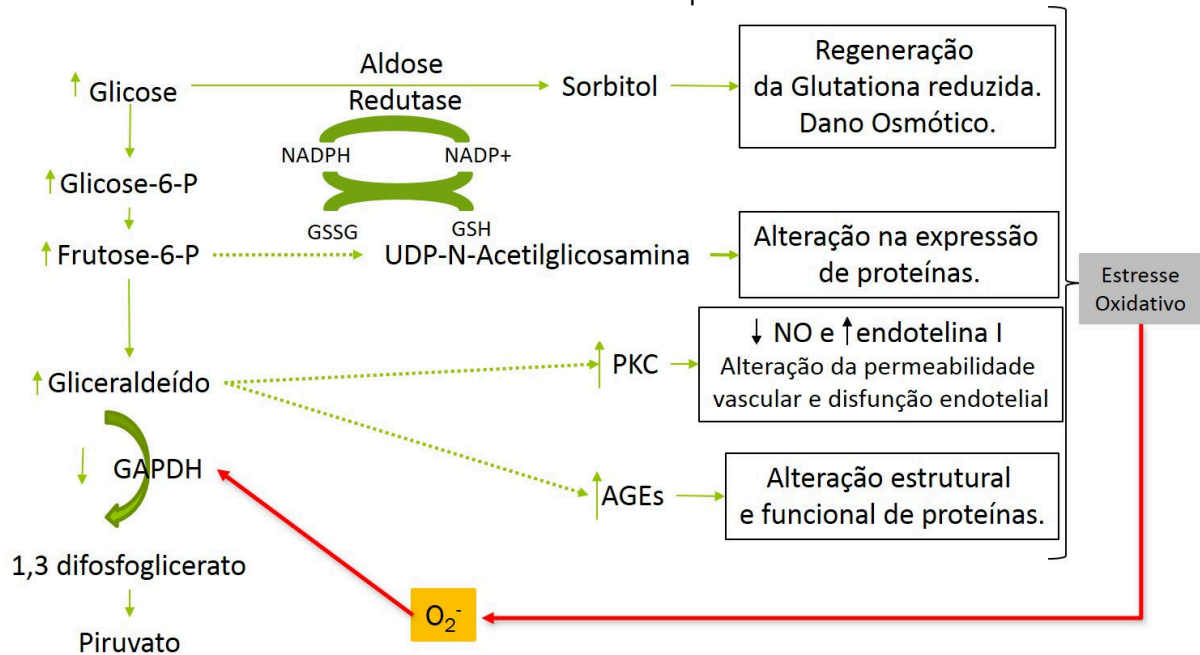
Os dados da literatura têm apontado a atividade da via dos polióis, a glicação não enzimática das proteínas com a produção de AGE, o estresse oxidativo e as alterações da proteína quinase C (PKC), como os principais mecanismos envolvidos nas disfunções endoteliais e na aterogênese, que precedem as graves complicações vasculares induzidas pelo diabetes mellitus (Figura 2) (BERTOLUCCI, et al., 2008; CORRÊA-GIANNELLA; VIEIRA, 2007).

Estudos desenvolvidos com diferentes modelos experimentais têm demonstrado que o DM induz alterações na função plaquetária, levando ao aumento de sua reatividade e com conseqüente aumento na agregação destas células (RANDRIAMBOAVONJY V.; FLEMING I., 2012; FLIERL U. *et al.*, 2010). Estas alterações favorecem a formação de trombos e podem comprometer o endotélio vascular, sendo consideradas, portanto, como um dos principais mecanismos desencadeadores das complicações cardiovasculares induzidas pelo DM.

Apesar dos mecanismos intracelulares que levam a esta hiper-reatividade plaquetária ainda não estarem totalmente esclarecidos, diversos estudos têm associado a hiperagregação plaquetária observada no diabetes mellitus a um possível desbalanço redox nestas células. Neste contexto, tem sido proposto que alterações na função plaquetária poderiam levar à produção descontrolada de ERO e ERN com conseqüente aumento na adesão e agregação plaquetária (FERRONI et al., 2011).

Estas espécies são moléculas altamente bioativas e com vida curta derivadas, principalmente, da redução do oxigênio molecular. Entre as diversas fontes de ERO nas plaquetas, o sistema nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato-oxidase (NADPH oxidase - gp91<sup>phox</sup>/NOX2) que pode ser ativado não somente por agonistas como adenosina difosfato (ADP), colágeno e ácido araquidônico, capazes de induzir agregação plaquetária, mas também por mitógenos como por exemplo, o acetato de forbol miristato (PMA) (KRÖTZ, 2004).

Figura 3 - Mecanismos propostos para explicar o dano celular induzido pela hiperglicemia e o estresse oxidativo como via final comum das quatro vias metabólicas ativadas.



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

Legenda: 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  $O_2^-$ .

As primeiras evidências de expressão de NADPH oxidase em plaquetas surgiram em 2001 por Seno et al. que detectaram as subunidades p22phox e p67phox em plaquetas lisadas humanas. Mais tarde, foram encontradas as subunidades gp91phox e p47phox (VIOLI; PIGNATELLI et al., 2014). Tem sido demonstrado que a produção de ânion superóxido e consequentemente de peróxido de hidrogênio, por plaquetas estimuladas com PMA ocorre principalmente à custa da ativação do complexo NADPH oxidase. Sob condições fisiológicas, a formação e eliminação destas substâncias parecem ser balanceadas nas plaquetas. Durante o desbalanço redox, entretanto, há um predomínio de agentes pró-oxidantes, superando a capacidade de defesa antioxidante, levando a um estresse oxidativo com consequente alteração na sinalização celular.

De acordo com dados da literatura, a estimulação do complexo NADPH oxidase em plaquetas tem sido proposta como um dos principais mecanismos responsáveis pela ativação destas células. Uma vez ativo, este sistema multienzimático é responsável pela transferência de elétrons do NADPH para o oxigênio molecular, formando o ânion superóxido ( $O_2^-$ ). Este pode passar por

dismutação espontânea e/ou catalisada pela enzima superóxido dismutase (SOD) levando á formação de outra espécie oxidante, o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) ou ainda, elicitar a geração de isoprostanos F2 a partir da oxidação não enzimática do ácido araquidônico (VIOLI; PIGNATELLI, 2014). Além disso, a interação do ânion superóxido com óxido nítrico produzido através de uma reação catalisada pela enzima óxido nítrico sintase indutiva (iNOS), pode levar a formação de outra ERN, o peroxinitrito. Esta reação pode levar à depleção de óxido nítrico e favorecer a agregação plaquetária.

O ânion superóxido e o peróxido de hidrogênio têm sido apontados como segundo mensageiros nesta via, sendo que o aumento na produção destas espécies está fortemente associado ao aumento na agregação plaquetária (VIOLI; PIGNATELLI, 2014).

Krötz et al. (2002) demonstraram um aumento no recrutamento e na agregação plaquetária dependente da produção de ânion superóxido mediada pela NADPH oxidase. Uma associação entre agregação plaquetária induzida por colágeno e aumento na produção de  $H_2O_2$ , tem sido relatada por Violi; Pignatelli, (2014). Neste estudo os autores sugeriram que o  $H_2O_2$  poderia ativar as plaquetas por meio da mobilização de cálcio intracelular com consequente aumento na liberação de ácido araquidônico a partir da membrana plaquetária, formação de tromboxano A2 e ativação de fosfolipase C.

Pires et al.(2013) relata que o  $O_2^-$  pode aumentar a agregação induzida por trombina, colágeno, ADP ou ácido araquidônico. Este mesmo autor cita que a produção de espécies oxidantes pode aumentar a ativação do receptor de fibrinogênio em plaquetas e que a utilização de inibidor da NADPH oxidase e ou sequestrador de ânion superóxido também reduzem a agregação plaquetária. Por outro lado, uma das enzimas responsáveis pela defesa antioxidante, a SOD, pode inibir a agregação plaquetária indiretamente, ao diminuir a disponibilidade de ânion superóxido, promovendo o aumento de NO plaquetário e assim a inibição da agregação.

Nestes sistemas pode ocorrer também a formação de radical hidroxila ou de oxigênio singlete. Outros estudos têm demonstrado que a NADPH oxidase plaquetária pode ser ativada via PKC e que a ativação da PKC está relacionada com a presença de lipoproteínas de baixa densidade oxidada (LDLoxo) (MAGWENZI et al., 2015). É reconhecido que o descontrole hiperglicêmico irá acarretar na oxidação

de lipoproteínas, tais como a lipoproteína de baixa densidade (LDL) e desta forma poderá ativar a NADPH oxidase via PKC (WAJCHENBERG, 2002; MOURA, 2010 ).

Um dos mecanismos importantes envolvido na modulação da atividade plaquetária é a ativação da PKC. A PKC é uma das três principais serina-treonina quinases. Ela está envolvida em eventos de transdução de sinais, respondendo a estímulos específicos hormonais, neuronais e de fatores de crescimento (ELISA; PIRES, 2013; MAGWENZI et al., 2015). Alguns autores já demonstraram que a utilização de inibidores não seletivos para os membros da família PKC inibe ou abole a ativação plaquetária incluindo secreção de grânulos e agregação plaquetária, uma vez que a PKC esta diretamente relacionada a ativação plaquetária pela via da tirosina quinase (WATSON; HAMBLETON, 1989; ATKINSON et al., 2001; GRESELE et al., 2002; BROOS et al., 2012).

A lipoproteína de baixa densidade, segundo Magwenzi et al., (2015) na sua forma oxidada ativa NADPH oxidase em plaquetas via receptor *scavenger* de membrana CD36, sendo uma via dependente de PKC, que por sua vez está envolvida na ativação da NADPH oxidase. Desta forma, a produção de espécies oxidantes dependentes da ativação da PKC pela fosforilação da gp91<sup>phox</sup>/NOX2 representa a principal fonte de geração de espécies oxidantes plaquetárias. A ativação da NADPH oxidase dependente de PKC requer um mediador citosólico p47<sup>phox</sup> que uma vez fosforilado irá se dirigir a membrana para se associar com a p22<sup>phox</sup> e gp91<sup>phox</sup> levando a formação da haloenzima ativa (MAGWENZI et al., 2015).

Desta forma a via de sinalização PKC/ NADPH oxidase está diretamente envolvida na ativação e modulação paquetária, sendo seu estudo um ponto importante na elucidação dos mecanismos de ação dos flavonoides na inibição da agregação plaquetária.

## 2.4 USO POPULAR DE PLANTAS MEDICINAIS

Toda e qualquer planta administrada ao homem ou ao animal, por qualquer via ou forma e que exerça alguma ação terapêutica é denominada de planta medicinal e o seu tratamento é tido como fitoterapia (FIRMO et al., 2011). Sendo assim, o uso de plantas medicinais e suas diferentes formas farmacêuticas, sem a utilização de um princípio ativo isolado é caracterizado como fitoterapia.



Em 500 a. C começaram a aparecer os primeiros registros sobre a utilização de plantas medicinais. Segundo Firmo et al., (2011) textos Chineses relatam nomes, doses e indicações de uso de plantas para tratamento de doenças. Outros registros foram encontrados no manuscrito Egípcio “Ebers Papyrus”, de 1.500 a. C., que continham informações sobre 811 prescrições e 700 farmacos, incluindo extratos de plantas, metais (chumbo e cobre) e até mesmo veneno de animais. Algumas dessas plantas ainda são utilizadas, como Ginseng (*Panax spp.*), *Ephedra spp.*, *Cassia spp.* e *Rheum palmatum L.*, inclusive como fontes para indústrias farmacêuticas (FIRMO et al., 2011; LIMA, 2013; ROSA, 2015).

Mesmo antes do surgimento da escrita, o homem já usava ervas para fins alimentares e medicinais. Na procura das ervas mais apropriadas para a alimentação ou para a cura de doenças, foi possível observar tanto as alegrias do sucesso quanto as tristezas do fracasso.

De tal forma, ervas e chás são utilizados desde sempre, um grande exemplo da importância e benefício de se estudar as plantas medicinais, é provinda de relatos da Grécia com o Pai da Medicina, Hipócrates (RIBEIRO; IC; SHAYNAN, 2012; LIMA, 2013). A reflexão sobre a relação dor e doença, fez com que Hipócrates recorresse a plantas para aliviar o sofrimento (LIMA, 2013). As preparações prescritas por Hipócrates incluíam desde cascas a folhas de salgueiro para o tratamento de febres e para aliviar as dores do parto. A aspirina, também conhecida como ácido acetilsalicílico, é hoje o medicamento mais vendido no mundo e um dos grandes exemplos da importância das plantas com fins medicinais para a descoberta de novos medicamentos. Segundo Lima, (2013), apenas nos Estados Unidos da América (EUA), são consumidos mais de 30 bilhões de comprimidos por ano.

Possuidor de uma área de aproximadamente 8,5 milhões de km<sup>2</sup>, com uma diferença climática entre as regiões abrangentes do território brasileiro e grande biodiversidade, devido à presença da floresta amazônica, do cerrado, do pantanal, da caatinga, do manguezal e hospedando cerca de 24% das espécies de primatas conhecidas, além de ser portador de 10 a 15 milhões de espécies de insetos conhecidas e cerca de 22% das espécies de plantas populares do mundo, o Brasil é um país geneticamente rico.

No Brasil, o conhecimento popular devido às tradições associado a grande diversidade da flora brasileira, contribui para o uso diversificado das plantas medicinais, que muitas vezes é o único recurso utilizado na atenção básica à saúde

para grande parte da população de baixa renda. Segundo Rosa, (2015) as pesquisas demonstram que, cerca de, 91% da população brasileira fazem uso de alguma planta medicinal, sendo que 46% da mesma mantêm cultivo caseiro dessas plantas. Esse dado denota que muitos brasileiros usufruem de fontes naturais como alternativa à saúde (LIMA; LIMA; DONAZZOLO, 2007; VEIGA JUNIOR, 2008; ETHUR et al., 2011).

Sendo assim, o conhecimento da população sobre as espécies vegetais com atividade terapêutica se torna um elemento valorizado pelos pesquisadores que atuam na área de desenvolvimento de novos fármacos a partir de produtos naturais (FABRI et al., 2011).

## 2.5 ABORDAGEM QUÍMICA E FARMACOLÓGICA DE PASSIFLORA

Dentre as diferentes plantas utilizadas pela população para o tratamento do diabetes mellitus, destaca-se, a *P. edulis*. Esta espécie é conhecida popularmente como maracujá, maracujá azedo, maracujá-de-comer, maracujá-comum, maracujá do mato, maracujá-mirim, maracujá-peroba, maracujá-roxo, maracujá-de-ponche (ALMEIDA, 1993; PEÑA, SHARP; WYSOKI, 2002).

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 de *Passiflora edulis* 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 3).

Figura 4 - Detalhes das folhas e das flores de *Passiflora edulis* Sims.

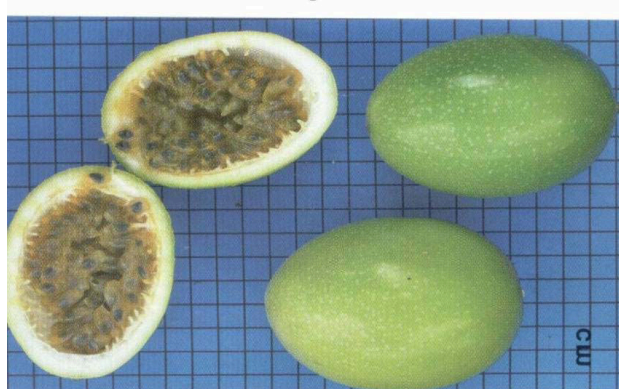


Fonte: Do autor.

O fruto é globóide com 5,0 a 7,0 cm de diâmetro, amarelo ou amarelo-esverdeado ou salpicado arroxeadado quando maduro (Figura 4). Floresce desde setembro até março, quando ocorre a frutificação (SACCO, 1980; ALMEIDA, 1993).

Segundo Cepa, (2015) com 56,3% da produção mundial, o Brasil é o maior produtor mundial e o maior consumidor da fruta. Em 2010 a produção foi de aproximadamente 920 toneladas de maracujá. Dentre os estados brasileiros, o estado da Bahia é considerado o maior produtor brasileiro com 63% da produção de maracujá seguido pelo estado de Santa Catarina, com cerca de 20% do total anual.

Figura 5 - Detalhe do fruto de *Passiflora edulis* Sims.



Fonte: Lorenzi (2002).

Os fito-constituintes da *P. edulis* são geralmente os glicosídeos (MARECK et al., 1991), os alcaloides e os compostos fenólicos (CHASSAGNE et al., 1999), entre

os quais, destacam-se os flavonóides (DOYAMA, et al., 2005). Além destes constituintes, outros compostos também podem ser encontrados nas folhas de *P. edulis* como algumas lactonas (BERNEREUTHER *et al*, 1989), saponinas (DOYAMA, et al., 2005) e alguns óleos voláteis e aminoácidos (ARRIAZA et al., 1997).

Por outro lado, dados da literatura demonstram que os extratos das folhas de *P. edulis* têm sido utilizados na medicina popular com diferentes funções tais como, sedativa, ansiolítica, antihelmíntica, antidiarréica, antihipertensiva, anti-inflamatória, hipoglicemiante e antibacteriana (REZA *et al*, 2010, BARBOSA *et al* 2008; KANNAN, 2011). Além disso, componentes ativos obtidos das folhas de *P. edulis* estão incluídos em diversas preparações fitoquímicas citadas pela Farmacopéia Brasileira (1998). Os extratos etanólicos de folhas de *P. edulis* e *P. alata* tem sido relatado com potencial atividade antioxidante assim como inibidora de glicação protéica e agregação plaquetária *in vitro* (CARVALHO et al., 2010).

A grande maioria dos estudos tem atribuído os efeitos benéficos da utilização de plantas medicinais, em parte aos flavonoides presentes nas diversas espécies estudadas (MCCULLOUGH; PETERSON, 2012; KHANGHOLI et al., 2015; LUIS ROS; FRANCINI; SCHINELLA, 2015; KESHARI et al., 2016).

Claramente, a literatura mostra uma variedade de constituintes bioativos presentes em espécies do gênero *Passiflora* pelo qual se pode atribuir os resultados clínicos observados com o tratamentos (MIRODDI et al., 2013). Atualmente, os pesquisadores acreditam que apenas uma parcela dos compostos farmacologicamente ativos foram identificados, sendo que basicamente as partes aéreas de espécies do gênero *Passiflora* é caracterizada pela presença de constituintes tais como, os flavonoides, o maltol, os glicosídeos cianogênicos e alcalóides indólicos (LI et al., 2011; MIRODDI et al., 2013; COLOMEU; ZOLLNER, 2014; SALLES, 2014; PIA et al., 2015).

Segundo Miroddi et al., (2013) cerca de 2,5% dos compostos presentes nas plantas do gênero *Passiflora* são flavonoides e dentre os quais podem ser citados a vitexina, a isovitexina, a orientina, a isorientina, a apigenina, o canferol, a lucenina, a saporanina dentre outros flavonoides. Os flavonoides são vistos com bons olhos no meio científico pois apresentam um potencial hipoglicemiante, antioxidante e inibidor da agregação plaquetária.

Diferentes grupos de pesquisas da Austrália, da Austría, da Alemanha, da Itália e de outros países tem desenvolvido pesquisas analíticas com o intuito de verificar a suposta variabilidade no teor de flavonoides C-heterosídeos (MIRODDI et al., 2013). A grande importância de se verificar em teor de flavonoides C-heterosídeos, se dá pelo fato da grande maioria dos marcadores químicos de espécies do gênero *Passiflora* serem flavonoides C-heterosídeos.

Muitos estudos tem considerado a *P. edulis* como uma espécie promissora (COLOMEU et al., 2014). Entretanto, informações científicas a respeito do tratamento das folhas de *P.edulis* no tratamento do diabetes ainda é controverso (RUDNICKI et al., 2007).

Alguns flavonóides têm sido relatados por aumentar a liberação de insulina das ilhotas isoladas de Langerhans de forma dependente de sua concentração (KOSHY; VIJAYSLAKSHMI et al., 2001; ZUCOLOTTO et al., 2009; SIMIRGIOTIS et al., 2013; KHANGHOLI et al., 2015). Os extratos brutos das folhas de diversas espécies vegetais têm apresentado atividade hipoglicemiante em diferentes modelos experimentais (HNATYSZYN et al., 2002; WU et al., 2013).

Khangholi et al., (2015) demonstrou que flavonoides monoglicosídeos, como a isorientina e isovitexina, tem demonstrado forte ação inibitória da  $\alpha$ -amilase, reduzindo desta forma a absorção de açúcares. Por outro lado, diversos estudos relatam propriedades antiglicante para os flavonoides, em especial os flavonoides C-heterosídeos (HEGDE; CHANDRAKASAN; CHANDRA, 2002; Li et al. 2011; KHANGHOLI et al., 2015; KESHARI et al., 2016).

Mccullough e Peterson, (2012) relataram que muitos flavonoides apresentam alto potencial antioxidante e antiinflamatório, podendo até mesmo reduzir a oxidação de lipoproteínas aterogênicas, como a lipoproteína de baixa densidade (LDL) e regular a síntese endotelial de óxido nítrico.

Em outros estudos tem sido demonstrado que estes compostos poderiam inibir a agregação plaquetária atuando sobre diferentes vias relacionadas á agregação plaquetária, tais como, inibição de fosfolipase C plaquetária, aumento dos níveis de adenosina monofosfato cíclico (AMPc), tromboxano A2 (TXA2) e antagonistas de receptores de trombina, bem como inibição de inositol monofosfato (FUENTES E.; PALOMO I.,2013). Além disso, tem sido observado que alguns flavonoides podem apresentar ações inibidoras da NAPH-oxidase ou sequestradoras de espécies oxidantes (VIOLI; PIGNATELLI P, 2014).

De acordo com estes e muitos outros relatos na literatura e considerando os efeitos do extrato de *P.edulis* sobre a glicação proteica e possíveis efeitos sobre a agregação plaquetária, estudar o envolvimento plaquetário na presença de flavonoides tem ganhado destaque no meio científico.

### 3. OBJETIVOS

Avaliar os efeitos do extrato e da fração flavonoídica obtida das folhas de *Passiflora edulis* Sims sobre a modulação da NADPH oxidase e agregação plaquetária em ratos diabéticos

#### 3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

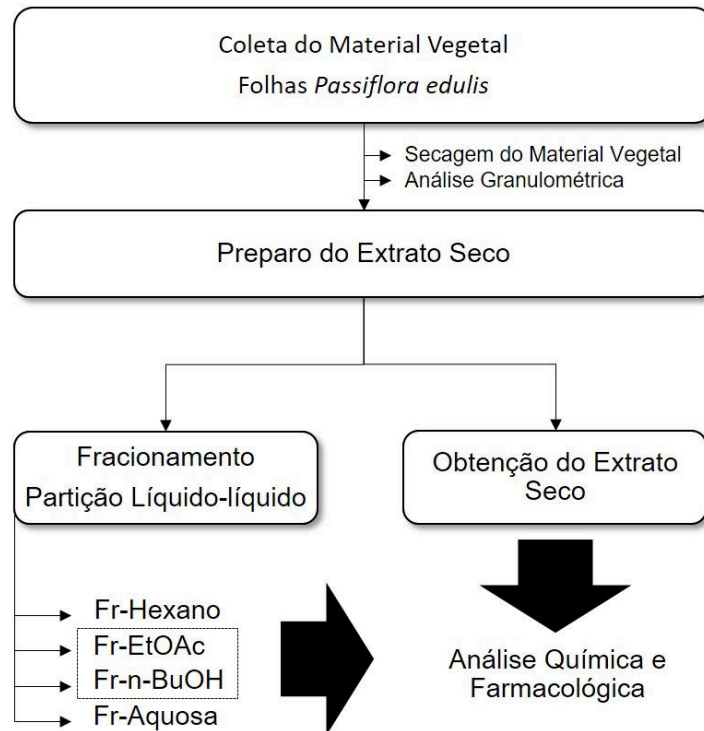
Para atingir tais objetivos, as seguintes metas foram propostas:

- a) Preparar o extrato hidroetanólico de folhas de *P. edulis*;
- b) Fracionar o extrato hidroetanólico para obtenção de uma fração enriquecida de flavonoides;
- c) Quantificar o marcador isorientina no extrato bruto e na fração de flavonoides;
- d) Analisar os efeitos do extrato bruto e da fração de flavonóides obtidos das folhas de *P. edulis* sobre o controle glicêmico, perfil lipídico e função renal de ratos diabéticos;
- e) Avaliar os efeitos do extrato bruto e da fração de flavonóides obtidos de folhas de *P. edulis* sobre a produção de espécies oxidantes em plaquetas de ratos diabéticos;
- f) Analisar os efeitos do extrato bruto e da fração de flavonóides obtidos de folhas de *P. edulis* sobre a agregação plaquetária induzida por ADP em ratos diabéticos.

#### 4. MATERIAIS E MÉTODOS

Os procedimentos utilizados neste estudo encontram-se resumidos na Figura 6.

Figura 6 - Fluxograma resumido das etapas experimentais



##### Análises químicas:

- Análise qualitativa LC-MS e HPLC;
- Análise quantitativa do marcador isorientina por UPLC-ESI-Tq-MS;
- Determinação quantitativa de compostos fenólicos;
- Determinação quantitativa de flavonoides;

##### Ensaio Farmacológicos:

- Monitoramento do consumo alimentar e ingestão de líquidos;
- Avaliação do controle glicêmico;
- Avaliação do Perfil lipídico e função renal;
- Avaliação da ativação de NOX2;
- Avaliação da agregação plaquetária;

Fonte: Do autor.



#### 4.1 MATÉRIA PRIMA VEGETAL

Como matéria prima vegetal foram utilizadas as folhas de *Passiflora edulis*, coletadas em setembro de 2014, no período da manhã, no município de Alfenas-MG tendo as seguintes coordenadas de GPS latitude 21° 24' 54,16" S, longitude 45° 52' 14,78" W a 786,8 m. Após a coleta, estas foram identificadas pelo Prof. Dr. Marcelo Polo da Universidade Federal de Alfenas e a exsicata depositada sob o registro nº 2542.

#### 4.2 SECAGEM

A secagem das folhas de *P. edulis* foi realizada em estufa Marconi® com circulação e renovação forçada de ar à aproximadamente 40,2 ± 0,2°C com a droga vegetal fresca, onde seu peso foi mensurado em turnos de 5h até peso constante, para a determinação da perda por secagem de constituintes voláteis.

#### 4.3 GRANULOMETRIA

A granulometria foi realizada de acordo com a Farmacopéia Brasileira 5ª Ed. (2010). Foram pesados 150 g das folhas secas e pulverizadas em moinho de faca Marconi®. Em seguida foram submetidas à passagem por tamises em tamizador Belter®, previamente tarados, com aberturas de malha previamente padronizadas de 125 µm, 150 µm, 180 µm, 280 µm, 355 µm e 710 µm, durante 15 min. O tamanho médio das partículas foi determinado 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 Barni; Cechinel Filho; Couto, (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.

#### 4.4 PREPARO DO EXTRATO BRUTO DAS FOLHAS DE *P. EDULIS*

As folhas de *P. edulis* secas e pulverizadas foram submetidas à maceração exaustiva, na proporção de 1 parte de pó para 10 partes de solução hidroetanólica à 70%(V/V). A mistura (pó das folhas secas + líquido extrator) foi filtrada através de um filtro de papel e a solução extrativa (líquido extrator + metabólitos secundários) foi evaporada sob pressão reduzida a  $46,4 \pm 1,9$  °C, eliminando o solvente orgânico. A água foi retirada pelo processo de liofilização por aproximadamente 79 horas. Após a eliminação do solvente orgânico e aquoso, o extrato bruto foi armazenado em freezer a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

O extrato bruto das folhas de *P. edulis* obtido após o processo de extração foi submetido a extração líquido-líquido (partição) para obtenção da fração de flavonoides.

#### 4.5 OBTENÇÃO DA FRAÇÃO DE FLAVONOIDES DAS FOLHAS DE *P. EDULIS*

A fração de flavonoides foi obtida por extração líquido-líquido (partição) do extrato bruto. Três gramas do extrato bruto das folhas foram dissolvidos em água (300 mL) e submetidos ao processo de partição. O hexano (100mL por três vezes) foi o primeiro solvente a ser particionado com a mistura (água + extrato). Em seguida, o acetato de etila (100 mL por três vezes) foi particionado com a mistura (água + extrato), sendo repetido o mesmo procedimento com o n-butanol (100 mL por três vezes). Após a extração, os solventes das frações, foram recuperados por rotaevaporação e as frações liofilizadas. Com isso, quatro frações foram produzidas: fração hexano (Fr-H), fração acetato de etila (Fr-EtOAc), fração butanólica (Fr-BuOH) e fração aquosa (FrAqOH). Esse processo foi repetido até obtenção de 35,19 gramas da fração de flavonoides, quantidade suficiente para a execução dos ensaios biológicos, análise por cromatografia líquida de alta eficiência e quantificação de marcador por UPLC-ESI-IT-MS.

#### 4.6 ETAPA QUÍMICA

Na etapa química as frações foram analisadas quantitativamente, tendo como marcador flavonoides equivalentes em quercetina e em Isorientina, qualitativamente

por espectrometria de massas utilizando um LC-MS. As análises foram realizadas no Laboratório de Bioprospecção de Produtos Naturais da Universidade Estadual de São Paulo (UNESP), Campus Experimental do Litoral Paulista (São Vicente-SP), sob colaboração e supervisão dos professores Dr. Vagner Vilegas e Dra. Cláudia Quintino da Rocha.

O preparo da amostra para análise foi realizado por extração em fase sólida (SPE), conforme a metodologia descrita por Bovanová, Brandšteterová e Baxa (1998). Para isto, 5 mg do extrato bruto e das frações de *P. edulis* foram dissolvidos em 3 mL de metanol, grau massas. A solução foi filtrada em cartucho Sepak RP-18<sup>®</sup> eluido com MeOH/H<sub>2</sub>O 8:2 (v/v) e posteriormente, em um disco de membrana de Nylon (Flow Supply<sup>®</sup>), com 22,25 mm de diâmetro e 0,22 µm de tamanho de poro.

O extrato bruto e as frações foram analisados por LC-MS em um espectrômetro de massas LCQ Fleet, Thermo Scientific<sup>®</sup> e por HPLC em um cromatógrafo Jasco.

#### **4.6.1 Caracterização Química Por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)**

Os cromatogramas foram obtidos em um cromatógrafo Jasco PU2086 equipado com um detector PDA Jasco PU2086. A separação por HPLC foi realizada utilizando coluna cromatográfica Kinetex<sup>®</sup> C18 100 Å com poros de 5µm, e dimensões de 4,6 x 100 mm. O volume de injeção foi ajustado à 20 µL (10mg/mL). A fase móvel utilizada consistiu em água, ácido fórmico 0,1% (A) e acetonitrila mais ácido fórmico 0,1% (B), acrescentadas de ácido fórmico 0,1%, em gradiente exploratório, iniciando com 10% a 100% de B em 32 minutos, em um fluxo de 1,0 mL/min. O efluente foi enviado ao detector do tipo PDAe analisados a 254nm.

Bruno, alguém (Claudia ou Socorro) pediu para melhorar a escrita sobre as condições cromatográficas e Tb da espectrometria de massas

#### **4.6.2 Caracterização Química Por Espectrometria De Massas (FIA-ESI-IT-MS<sup>n</sup>)**

Os espectros de massas foram obtidos no espectrômetro de massas LCQ Fleet da Thermo Scientific<sup>®</sup>, equipado com um dispositivo de inserção direta da amostra via análise por injeção em fluxo contínuo (FIA). A amostra foi ionizada por

electrospray (ESI) e as fragmentações foram obtidas em múltiplos estágios ( $MS^n$ ), em uma interface do tipo *ion-trap* (IT). O modo negativo foi escolhido para a geração e análise de todos os espectros. As condições experimentais foram: voltagem do capilar -35 V, voltagem do spray -5000 V, temperatura do capilar a 350°C, gás de arraste ( $N_2$ ) e fluxo 60 (unidades arbitrárias). A faixa de aquisição foi de  $m/z$  100-2000, com dois ou mais eventos de varredura realizados simultaneamente no espectro.

#### **4.6.3 Análises para quantificação de isoorientina no extrato bruto e nas frações de Passiflora por UPLC-ESI-Tq-MS**

A quantificação foi realizada em sistema de UPLC Waters® Acquity (Waters Corp., Milford, MA, USA), consistindo de bomba quaternária, amostrador automático e espectrômetro de massas XevoTqD® equipado com fonte de ionização por eletrospray e analisador tipo triplo-quadrupolo. Os parâmetros da fonte foram ajustados como segue: fluxo do gás de dessolvatação a 600 L/h, temperatura de dessolvatação a 300°C, fluxo de gás de colisão a 1L/h e temperatura da fonte a 150°C. A voltagem do capilar foi ajustada em 3,50 kV e a voltagem do cone em 40 V. A detecção da isoorientina foi realizada através de *multiple reaction monitoring* (MRM), pela transição 447>327 para quantificação e 447>357 para confirmação. Os dados foram coletados monitorando ion precursor e ion produto simultaneamente. Foi utilizada coluna ACQUITY™ UPLC ACQUITY UPLC Xbridge C18 (2.1 x 50 mm, 2.5  $\mu$ m column; Waters Corp., Milford, MA, USA). A fase móvel consistindo de A (0,1% de ácido fórmico mais água, v/v) e B (metanol), em sistema gradiente: 0–4 min, 47–70% B, 4-5 min, 70-100% B, fluxo de 0,4 mL/min, o tempo total de corrida foi de 5 minutos. A coluna foi equilibrada por 2 minutos antes de cada injeção. A temperatura da coluna e o volume de injeção foram ajustados para 25°C e 5  $\mu$ L, respectivamente. As análises de quantificação por detecção em espectrometria de massas foram realizadas usando um Waters ACQUITY™ Xevo TQD triple quadrupole tandem mass spectrometer (Waters Corp., Manchester, UK) equipado com fonte ESI, probe Zspray operando em modo negativo. Os dados foram adquiridos em full scan (faixa de  $m/z$  100-1000). Todas as análises foram realizadas utilizando o software Masslynx™ V4.1 software.

#### 4.6.4 Preparo de amostra para análise quantitativa por UPLC-ESI-MS

Para as análises de quantificação por UPLC-ESI-MS, 2 mL de solução de cada amostra (extrato bruto e frações) (1mg/mL) em MeOH/H<sub>2</sub>O 8:2 (v/v) foram submetidos a extração em cartucho Sepak RP-18<sup>®</sup> eluido com MeOH/H<sub>2</sub>O 8:2 (v/v). Depois de seco, 1 mg foi dissolvido em 1 mL de solução MeOH/H<sub>2</sub>O 8:2 (v/v) (solução A). Uma alíquota de (10µL) foi diluída em MeOH/H<sub>2</sub>O 8:2 (v/v) até o volume final de 1 mL (100ppm), e filtrada em um disco de membrana de Nylon (Flow Supply<sup>®</sup>), com 22,25 mm de diâmetro e 0,22 µm de tamanho de poro.

#### 4.6.5 Preparo das soluções padrão para análise de quantificação

O padrão de isoorientina foi dissolvido em 1mL (1mg/mL) de MeOH/H<sub>2</sub>O 8:2 (v/v) e filtrado em um disco de membrana de Nylon (Flow Supply<sup>®</sup>), com 22,25 mm de diâmetro e poros de 0,22 µm. Uma alíquota de (10 µL) foi diluída em MeOH/H<sub>2</sub>O 8:2 (v/v) para o volume final de 1 mL (100 ppm, solução A). A solução A foi diluída para se obter soluções filhas à 0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 8.0, 16.0, 32.0 ppm.

#### 4.6.6 Parâmetros de validação

Para a validação do método foram respeitados os parâmetros de limite de linearidade, limite de quantificação, efeito da matriz, recuperação, precisão, exatidão, limite de detecção e limite de quantificação.

#### 4.6.7 Linearidade e limite de quantificação e detecção.

A curva de calibração linear da isoorientina foi equivalente a 0.5, 1, 2, 4, 8, 16 e 32 µg/mL em metanol com três replicatas para os ensaios intradia e interdia. A curva de calibração para o flavonoide foi gerada plotando a área de cada pico (y) versus a concentração (x) dos padrões usando o método dos mínimos quadrados para se obter a curva de regressão linear. As concentrações de flavonoides em isoorientina foram calculadas pela interpolação linear da curva de calibração.

O limite de detecção (LDQ) representa a menor concentração da substância em exame que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, utilizando um determinado procedimento experimental. O LDQ pode ser calculado

de três maneiras diferentes: método visual, método relação sinal-ruído, método baseado em parâmetros da curva analítica (RIBANI et al., 2004). O limite de detecção (LDQ) foi determinado como o sinal equivalente a 3.3 vezes o valor da relação do coeficiente linear (a) em relação a inclinação (b) ( $3.3 \times a / b$ ) obtido pela equação da curva analítica de calibração. O limite de quantificação (LOQ) foi dado como 10 vezes o valor desta relação.

#### **4.6.8 Efeito da matriz e recuperação.**

O efeito da matriz foi determinado pela comparação da área do pico do analito (isoorientina) na amostra de extrato bruto e frações (A) com o da solução padrão do analito (B). O efeito da matriz foi considerado insignificante quando a relação (A/B x 100) % dos analitos ficaram entre 85% e 115%.

A recuperação do analito foi determinada pela comparação da área do pico da solução padrão do analito (8ppm) depois da extração em fase sólida (SPE) com a solução padrão dos analitos (8ppm) antes da SPE o que representou 100% de recuperação. A relação depois SPE/antes SPE x 100 foi determinada.

#### **4.6.9 Precisão e Exatidão**

A precisão e a exatidão foram realizadas em três dias consecutivos usando uma mistura contendo baixa, média e alta concentração da solução padrão do analito (1, 25 e 50 ppm) (Tabela 3). A precisão foi expressa como desvio padrão relativo (RSD %), a exatidão foi calculada usando a seguinte equação:  $[(\text{concentração média analisada} - \text{concentração adicionada}) / (\text{concentração adicionada})] \times 100\%$ . A precisão e exatidão intradia e interdia foram determinadas pelas análises repetidas da amostra do analito.

#### **4.6.10 Determinação do teor de fenóis totais**

O teor de polifenóis foi determinado em alíquotas do extrato bruto e nas frações 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.

#### 4.6.11 Determinação do teor de flavonoides

O teor de flavonoides totais no extrato bruto e nas frações foi determinado em soluções contendo o extrato bruto (1 mg/mL), Fr-BuOH (0,2 mg/mL) e Fr-EtOAc (0,2 mg/mL), de acordo com Kalia et al., (2008). A complexação estável entre o alumínio e os flavonoides em meio contendo metanol ou etanol foi quantificada por espectrofotometria à 425 nm, uma vez que neste comprimento de onda é possível quantificar o teor de flavonóides sem a interferência de substâncias fenólicas (SOUZA, 2007).

A 0,5 mL de cada amostra foi adicionado 1,5 mL de etanol absoluto. Em seguida foi adicionado 0,1 mL da solução de cloreto de alumínio ( $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) 10% (m/v) em água destilada e, posteriormente, 0,1 mL de acetato de potássio ( $\text{CH}_3\text{COOK}$ ) 1M (m/v) em água destilada. O volume da solução foi completado para 5 mL com 2,8 mL de água destilada. Os tubos foram agitados para a homogeneização e mantidos em repouso por 30 minutos. Em seguida, foram feitas as leituras em espectrofotômetro no comprimento de onda de 425 nm, ajustando o zero de absorvância com a solução do branco, constituída por todos os reagentes e 0,5 mL de etanol absoluto.

Os mesmos procedimentos foram realizados com a quercetina em solução etanólica, nas concentrações de 10, 20, 40, 60, 80, 100  $\mu\text{g/mL}$ , a fim de se obter a curva analítica:  $C = (A + 0,0099) / 0,0067$ , onde C é a concentração de flavonoides equivalente em quercetina, A é a absorvância a 425 nm, tendo como coeficiente de correlação  $R = 0,9896$ . A quantidade de flavonoides foi determinada pela interpolação da absorvância das amostras contra a curva de calibração e os valores foram expressos como equivalentes de quercetina (g de quercetina/100g de amostra). As análises foram realizadas em triplicata.

#### 4.7 ETAPA BIOLÓGICA ENSAIOS FARMACOLÓGICOS

Foram utilizados ratos machos *Wistar*, com peso de  $311 \pm 29\text{g}$ , 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 664/2015).

#### 4.7.1 Grupos experimentais

Para o desenvolvimento dos experimentos, os animais foram alojados em caixa de polietileno, tipo kaefiq, contendo 5 animais por caixa, em ambiente climatizado, com ciclo de claro-escuro de 12 horas. Foram utilizados seis grupos experimentais contendo 20 animais, em cada grupo. Estes foram subdivididos para a realização de dois experimentos, sendo um dos experimentos destinado a agregação plaquetária e o outro experimento destinado a avaliação da produção de espécies oxidantes mediadas pela NADPH oxidase. Em ambos os experimentos os parâmetros bioquímicos foram determinados.

- a) Grupo controle: foi composto por animais não diabéticos e não submetidos ao tratamento com o extrato bruto ou flavonoides das folhas de *Passiflora edulis*;
- b) Grupo diabetes: composto por animais submetidos ao tratamento com aloxano e não tratados com o extrato bruto ou com flavonoides;
- c) Grupo extrato bruto: foi composto por animais não diabéticos e tratados com extrato bruto;
- d) Grupo diabetes-extrato bruto: foi composto por animais submetidos ao tratamento com o aloxano e tratados com o extrato bruto;
- e) Grupo flavonoide: foi composto animais não diabéticos e tratados com a fração majoritária em flavonoides;
- f) Grupo diabetes-flavonoides: foi composto por animais submetidos ao tratamento com aloxano e tratados com a fração majoritária em flavonoides;
- g) Grupo diabetes-clopidogrel: composto por animais submetidos ao tratamento com aloxano e tratados com o fármaco bissulfato de clopidogrel. Este grupo foi utilizado apenas para o experimento de agregação plaquetária.

#### 4.7.2 Indução do diabetes mellitus



Para induzir o diabetes, a droga diabetogênica aloxano foi administrada aos ratos, por via intraperitoneal, na dose de 150 mg/Kg de peso corporal, dissolvido em salina 0,9% (pH 4,5). Os animais que apresentaram a glicemia casual acima de 200mg/dL foram considerados diabéticos e distribuídos uniformemente entre os grupos diabéticos para que todos os grupos apresentassem no início do experimento média glicêmica estatisticamente igual (JAOUHARI et al., 2000; TANG et al. 2006).

#### **4.7.3 Administração do extrato bruto e da fração majoritária flavonoides**

O extrato bruto e a fração de flavonoides (Fr-BuOH) das folhas de *P. edulis* foram reconstituídos em água e administrados por gavagem durante 90 dias. A quantidade de extrato bruto administrada aos animais foi de 200 mg do extrato por quilo de massa do animal e a quantidade da fração de flavonoides administrada aos animais foi de 20 mg da fração de flavonoides por quilo de massa do animal (GARY R, 2003).

### **4.8 PARÂMETROS BIOLÓGICOS**

Os parâmetros biológicos foram avaliados ao longo do tratamento dos animais, por meio do monitoramento do consumo alimentar e da ingestão de líquidos. Ao término do tratamento, os animais foram anestesiados para a coleta do sangue e realização dos ensaios bioquímicos nestas amostras.

#### **4.8.1 Monitoramento do Consumo alimentar e ingestão de líquido**

O consumo alimentar e a ingestão de líquido foram determinados diariamente, durante os últimos 30 dias experimentais . A média do consumo de ração por cada grupo experimental foi corrigida pela massa corporal dos animais pertencentes aos grupos e expressa em gramas de ração consumida por quilo de massa corporal de animal. A média do volume de água ingerida por cada grupo experimental foi corrigida pela massa corporal dos animais pertencentes aos diferentes grupos e expressa em mililitros (mL) por quilo de massa corporal de animal. A ração comercial e a água foram fornecidas pelo Biotério Central da UNIFAL-MG. O monitoramento foi realizado até o dia anterior à obtenção das amostras biológicas.

#### **4.8.2 Obtenção das amostras biológicas**

No nonagésimo primeiro dia os animais foram anestesiados com tiopental (60 mg/kg de massa corporal), o sangue foi colhido por punção da artéria aorta posição abdominal, utilizando scalp 19G e distribuído em tubos de coleta de sangue contendo EDTA ou citrato de sódio e em tubos siliconizados sem aditivos.

#### **4.8.3 Obtenção de plaquetas lavadas**

O sangue colhido com citrato de sódio na proporção de 1:9 (v/v) foi centrifugado a 435 g, em temperatura ambiente por 15 minutos e lavado em tampão de lavagem (NaCl 140 mM, KCl 0.5 mM, citrato trisódico 12 mM, glicose 10 mM e sacarose 12.5 mM, pH 6). Este foi centrifugado por 13 min a 822 g. O precipitado plaquetário foi ressuspensão 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> para a realizar a agregação plaquetária. Para o ensaio de quimioluminescência o precipitado plaquetário foi ressuspensão em tampão fosfato-salino (PBS) contendo glicose pH 7,4.

#### **4.8.4 Contagem de plaquetas**

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

#### **4.8.5 Avaliação do controle glicêmico.**

Para avaliar o controle glicêmico foram determinados os parâmetros de glicemia de jejum, frutossamina e hemoglobina glicada (HbA<sub>1c</sub>). A concentração de glicose, foi determinada no soro, por método enzimático colorimétrico de ponto final. A determinação dos níveis séricos de frutossamina foi realizada por método cinético colorimétrico baseado na redução do Nitrobluetetrazol, em equipamento semi-automatizado da marca Bio2000®. Para a avaliação da hemoglobina glicada foi determinada a concentração de HbA<sub>1c</sub> no sangue total, colhido com EDTA, por

cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), em equipamento da marca Bio-Rad D-10™ Hemoglobin Testing System.

#### **4.8.6 Avaliação do perfil lipídico e da função renal.**

As concentrações de 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 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).

#### **4.8.7 Avaliação dos efeitos do extrato bruto e da fração de flavonoides obtidos de *P. edulis* sobre produção de espécies oxidantes.**

A produção de espécies oxidantes na suspensão de plaquetas lavadas ( $2 \times 10^8$  células) foi monitorada por quimioluminescência durante 50 minutos, em luminômetro Glomax 20/20, utilizando como sonda sensível a espécies reativas de oxigênio, o luminol (1mM), na presença e na ausência de acetato de forbol miristato (PMA) (16ng/ensaio), e de superóxido dismutase (0,3 KU/mL na reação final), (HALLIWELL, GUTTERIDGE, 1991).

#### **4.8.8 Avaliação da agregação plaquetária**

Para a realização do ensaio, foram utilizadas  $2 \times 10^8$  plaquetas por reação, previamente incubadas com 1mM de Cloreto de Cálcio ( $\text{CaCl}_2$ ), por 5 minutos a 37°C (MUSTAD, et al., 1997). Em seguida foi adicionado o agente agregante, adenosina 5'-difosfato (ADP) 5µM, da marca Sigma. A variação da transmissão da luz foi monitorada pelo método turbidimétrico durante 5 minutos, a 37°C (SILVA; AMICO, 2010). O volume final de reação foi 410µL e as determinações foram realizadas em cubetas de agregação, utilizando agregômetro de plaquetas PA-04 Qualitem Eletronica e como controle de reação foi utilizado o grupo de animais tratado com o medicamento clopidogrel (3mg/kg).

#### 4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os valores observados de cada nível (grupo experimental) foram submetidos à análise de variância, tendo uma variável resposta analisada (ANOVA-one way). 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 DISCUSSÃO

Foram coletadas 10,81 kg de matéria prima vegetal, obtendo ao final do processo de secagem 677,15 g de droga vegetal. A determinação da PPS das folhas de *P. edulis* ocorreu em estufa à  $40,2 \pm 0,2^\circ\text{C}$  com 199,03 g durante um período de 77h, conforme demonstram os resultados da tabela 1. O tempo necessário para a secagem completa da droga vegetal fresca, foi determinado após três pesagens consecutivas obtendo peso constante.

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

Massa Fresca (g)	Massa Seca (g)	Perda (g e %)	Temperatura ( $^\circ\text{C}$ )	Tempo (h)
199,03	53,71	145,6 e 73,2	$40,2 \pm 0,2$	77

Fonte: Do autor.

A redução da umidade de modo a reduzir o risco da proliferação microbiana, assim como reduzir a ação enzimática é dita como secagem. 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). Após o procedimento de secagem a droga vegetal passou por processos de trituração em moinho de faca, sendo realizada no intuito de conseguir partículas de tamanho reduzido para melhorar o rendimento extrativo.

### 5.1 ANÁLISE GRANULOMÉTRICA DOS PÓS

Os resultados do teste da determinação da granulométrica dos pós das folhas de *P. edulis* realizada segundo Brasil (2010), estão apresentados na Tabela 2.

O grau de divisão ou a granulometria de pós é expresso pela referência à abertura nominal da malha do tamis utilizado (BRASIL, 2010). 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 obtidos (Tabela

2) mostram que as partículas do material vegetal se encontram predominantemente distribuídas no tamis com abertura de malha de 250  $\mu\text{m}$ , representando  $32,35 \pm 1,14$  % de todo material. O diâmetro médio de partícula calculado conforme equação 1 pag.27, do pó das folhas foi de  $206,12 \pm 11,4$   $\mu\text{m}$ .

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

Nº do Tamis (ABNT/ASTM)	Abertura de Malha ( $\mu\text{m}$ )	Massa de Pós Retido (g)	Fração Retida (%)
0	0	$3,04 \pm 1,41$	$2,02 \pm 0,12$
120	125	$11,72 \pm 5,06$	$7,79 \pm 0,42$
100	150	$32,64 \pm 3,37$	$21,71 \pm 0,22$
80	180	$39,21 \pm 2,04$	$26,08 \pm 0,87$
60	250	$48,63 \pm 4,48$	$32,35 \pm 1,14$
45	355	$14,63 \pm 3,92$	$9,72 \pm 0,57$
25	710	$0,32 \pm 0,11$	$0,21 \pm 0,01$
d <sub>médio</sub> ( $\mu\text{m}$ )			$206,12 \pm 11,4$

Fonte: Do autor

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

## 5.2 ETAPA QUÍMICA

O processo de fracionamento do extrato bruto levou a obtenção de duas frações enriquecidas em flavonoides, porém com rendimentos distintos (Tabela 3).

Tabela 3 – Rendimento obtido no processo de obtenção dos insumos farmacêuticos.

Amostra	Rendimento (%)
Extrato Bruto	$24,83 \pm 0,79$
Fr-EtOAc	$3,13 \pm 0,06$
Fr-BuOH	$11,01 \pm 0,01$

Fonte: Do autor.

Apesar de ambas as frações (Fr-EtOAc e Fr-BuOH) apresentarem-se majoritárias em flavonoides a Fr-BuOH apresentou um rendimento de aproximadamente 4 vezes maior que a Fr-EtOAc.

### 5.2.1 Determinação do teor de polifenóis totais no extrato bruto e nas frações obtidas das folhas *P. edulis*.

Os compostos fenólicos, nos vegetais, constituem um grupo quimicamente heterogêneo, com aproximadamente 10.000 compostos. A solubilidade dos compostos fenólicos é governada pela polaridade do solvente utilizado, sendo que alguns são solúveis apenas em solventes orgânicos, enquanto outros como, por exemplo, ácidos carboxílicos e glicosídeos são solúveis em solventes polares (MIRA et al., 2008). O conteúdo de polifenóis totais pode variar de acordo com as diferentes partes da espécie vegetal trabalhada, assim como o tipo de solvente utilizado na sua extração. Os dados revelaram que a concentração de polifenóis totais foi maior na Fr-BuOH quando comparado com as demais frações e com o extrato bruto (Tabela 4).

Tabela 4 - Teor de Polifenóis Totais e Flavonoides no extrato bruto e nas frações das folhas de *P. edulis*.

<b>Amostra</b>	<b>Polifenóis Totais (g EAG/100g)</b>	<b>Flavonoides (g EQ/100g)</b>
Extrato Bruto	1,94 ± 0,09	2,02 ± 0,09
Fr-EtOAc	3,23 ± 0,37	4,25 ± 0,27
Fr-BuOH	4,90 ± 0,09	8,78 ± 0,44

Fonte: Do autor.

Desta forma a partição em solvente butanol foi eficiente ao ponto de concentrar o conteúdo de polifenóis totais, fazendo com que esta se torne uma fração rica em conteúdo de polifenóis totais. O conteúdo de polifenóis totais encontrado no extrato bruto foi semelhante aos valores relatados na literatura (RAMAIYA et al., 2014). Entretanto os valores encontrados nas folhas de *P. edulis* em nossos estudos foram maiores que os valores obtidos por Kelly et al. (2013) ( $0.83 \pm 0.07$  g EAG/100g) e menores que o valor encontrado por Ramaiya et al. (2012) (9.25 g EAG/100g). Esta divergência pode ser atribuída as variações entre as diferentes partes da planta, assim como aos solventes utilizados nestes estudos (RAMAIYA et al., 2014).

### 5.2.2 Determinação do teor de flavonoides no extrato bruto e nas frações obtidas das folhas *P. edulis*.

A partição com solventes orgânicos é uma das maneiras de se obter frações majoritárias em uma determinada classe química. Assim a utilização de solventes com diferentes polaridades, tem por objetivo principal extrair seletivamente os compostos de igual polaridade, sendo que a escolha do solvente influenciará diretamente na classe de metabólito a ser extraída. Por outro lado, a eficiência da extração dependerá não apenas da polaridade do solvente utilizado, mas da afinidade do soluto pelo solvente de extração, da razão das fases e do número de extrações. Sendo assim os métodos de partição entre solventes eliminam uma grande parte do material indesejado obtendo rapidamente, frações enriquecidas com as substâncias desejada. Na tabela 5 seguem alguns exemplos dos solventes mais utilizados e os respectivos grupos de metabólitos majoritariamente encontrados nos diferentes meios.

Tabela 5 - Diferentes tipos de solventes utilizados e os respectivos grupos de metabólitos majoritariamente encontrados.

<b>Solvente</b>	<b>Substâncias preferencialmente extraídas</b>
Éter de petróleo, hexano	Lipídeos, ceras, pigmentos, furanocumarinas
Tolueno, diclorometano, clorofórmio	Bases livres de alcalóides, antraquinonas livres, óleos voláteis
Acetato de etila, n-butanol	Flavonóides, cumarinas simples
Etanol, metanol	Heterosídeos em geral
Misturas hidroalcoólicas, água	Saponinas, taninos
Água acidificada	Alcalóides
Água alcalinizada	Saponinas

Fonte: Simões, (2017)

Observamos com estes resultados que as frações Fr-EtOAc e Fr-BuOH, apresentaram-se majoritárias em flavonoides quando comparadas ao extrato bruto. Isto demonstra que o método utilizado para a obtenção de uma fração enriquecida em flavonoides foi eficiente, aumentando aproximadamente 2 a 4 vezes a quantidade de flavonoides presente na amostra (Tabela 3).

### 5.2.3 Perfil fitoquímico das folhas *P. edulis*.

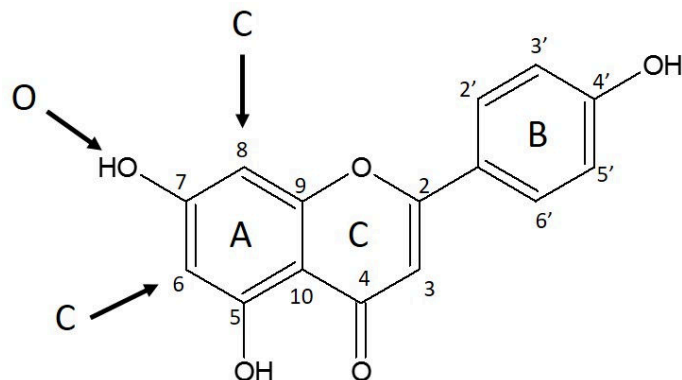


A composição química de extratos bruto das folhas de *P. edulis*, tem sido extensamente estudada, relatando-se a presença de alcaloides, de saponinas e principalmente de polifenóis (PEREIRA, et al. 2004; MULLER, et al. 2005; COLOMEU; ZOLLNER, 2014; PIA et al., 2015; KESHARI et al., 2016). Entretanto, estudos fitoquímicos indicam que dentre os diversos metabólitos presentes na espécie estudada, a classe dos metabólitos especiais flavonoides, é a principal classe produzida pelas espécies do gênero *Passiflora*. De acordo com Rosa, (2015) um dos fatos que justificam a expressiva presença dos flavonoides dentre os compostos presentes naturalmente no reino vegetal é sua capacidade de proteção das plantas contra o dano oxidativo gerado pela radiação ultravioleta (UV). Essa radiação converte-se em três bandas, com comprimento de onda variando entre 280 a 315 nm, sendo o de menor comprimento de onda a mais energética. Os danos oxidativos causados pela radiação UV é irreversível e capaz de produzir alterações que normalmente são imperceptíveis aos nossos olhos (SIES, 2015).

Os flavonoides devido a presença de anéis aromáticos associados a hidroxilas ácidas têm capacidade de anular os efeitos potencialmente deletérios de radicais livres produzidos, doando átomos de hidrogênio e aumentando a estabilidade do radical podendo assim inibir as reações em cadeia provocadas pelo estado oxidativo. Por outro lado, a presença de duplas alternadas na molécula do flavonoide, promove a sua estabilização por ressonância de deslocamento do elétron desemparelhado. Assim o flavonoide passa a ter propriedades fotoprotetoras, em prol da planta a que pertencem, atuando como antioxidantes na inativação dos radicais livres (DEGÁSPARI; WASZCZYNSKYJ, 2004; SOUZA et al., 2005; SIES, 2015).

As técnicas cromatográficas, vem sendo amplamente utilizada para a caracterização química de espécies vegetais, sendo bastante útil como ferramenta de controle de qualidade de insumos obtidos de plantas medicinais. O acoplamento de técnicas espectroscópicas e espectrométricas tais como o UV, MS e RMN à cromatografia, torna-se uma ferramenta valiosa na caracterização de misturas complexas.

Figura 7 - Estrutura básica das flavonas. Posições comuns para O- e C- glicosilação indicadas pelas setas.



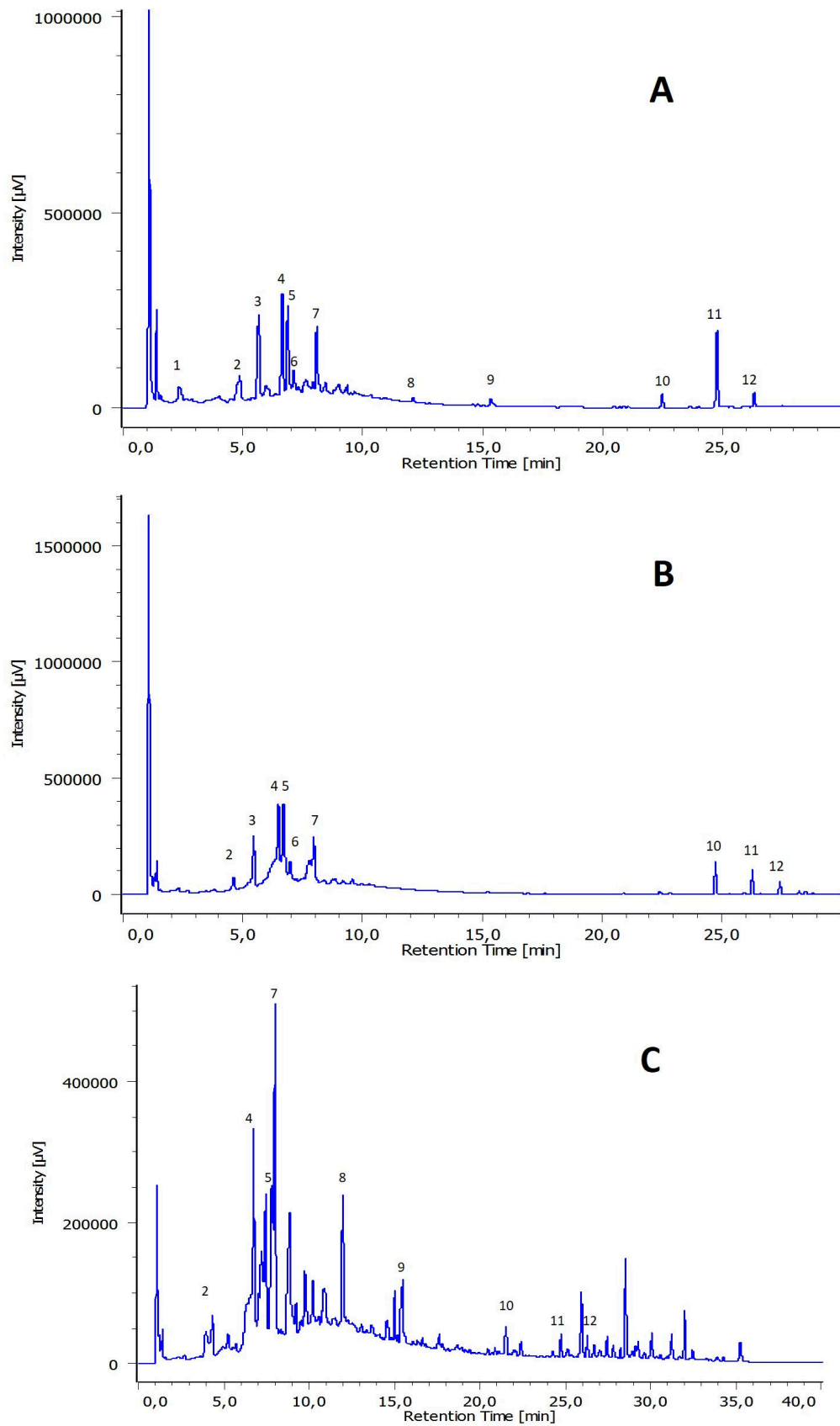
Fonte: Do autor.

Os flavonoides compreendem um grande grupo de metabólitos especiais de compostos fenólicos, são derivados de flavonas contendo 15 átomos de carbono em seu núcleo básico arranjados na configuração  $C_6-C_3-C_6$ , sendo 2 anéis aromáticos ligados por 3 carbonos que podem ou não formar um terceiro anel (Figura 7) (CUYCKENS; CLAEYS, 2004; KESHARI et al., 2016; DU, et al., 2016).

A intensa absorção no UV dos flavonoides, proporciona um espectro exibindo duas bandas características: a primeira banda absorve entre 320-385 nm e corresponde ao anel B e a segunda banda que absorve entre 250-285 nm corresponde a absorção do anel A. As flavonas apresentam uma banda de absorção I entre 304-350 nm, enquanto que os flavonóis a banda de absorção I esta entre 352-385 nm (ZUANAZZI, 2001).

O detector PDA, é um tipo de detector de comprimento de onda variável operando na região do ultravioleta, tornando possível a análise em diferentes comprimentos de onda simultâneos. Desta forma, possibilita uma “varredura” na região do UV-visível em uma única corrida analítica. A análise do extrato bruto e das frações por detector ultravioleta associado ao arranjo de diodos (UV-PDA), resultou em um cromatograma com a presença de 12 picos cromatográficos, sendo que 6 apresentaram um perfil de absorção no UV característico ao de flavonoides e 3 apresentaram um perfil característico ao dos ácidos fenólicos (Figura 9). A figura 8 apresenta o cromatograma do extrato bruto e das frações obtidas com o espectro no UV.

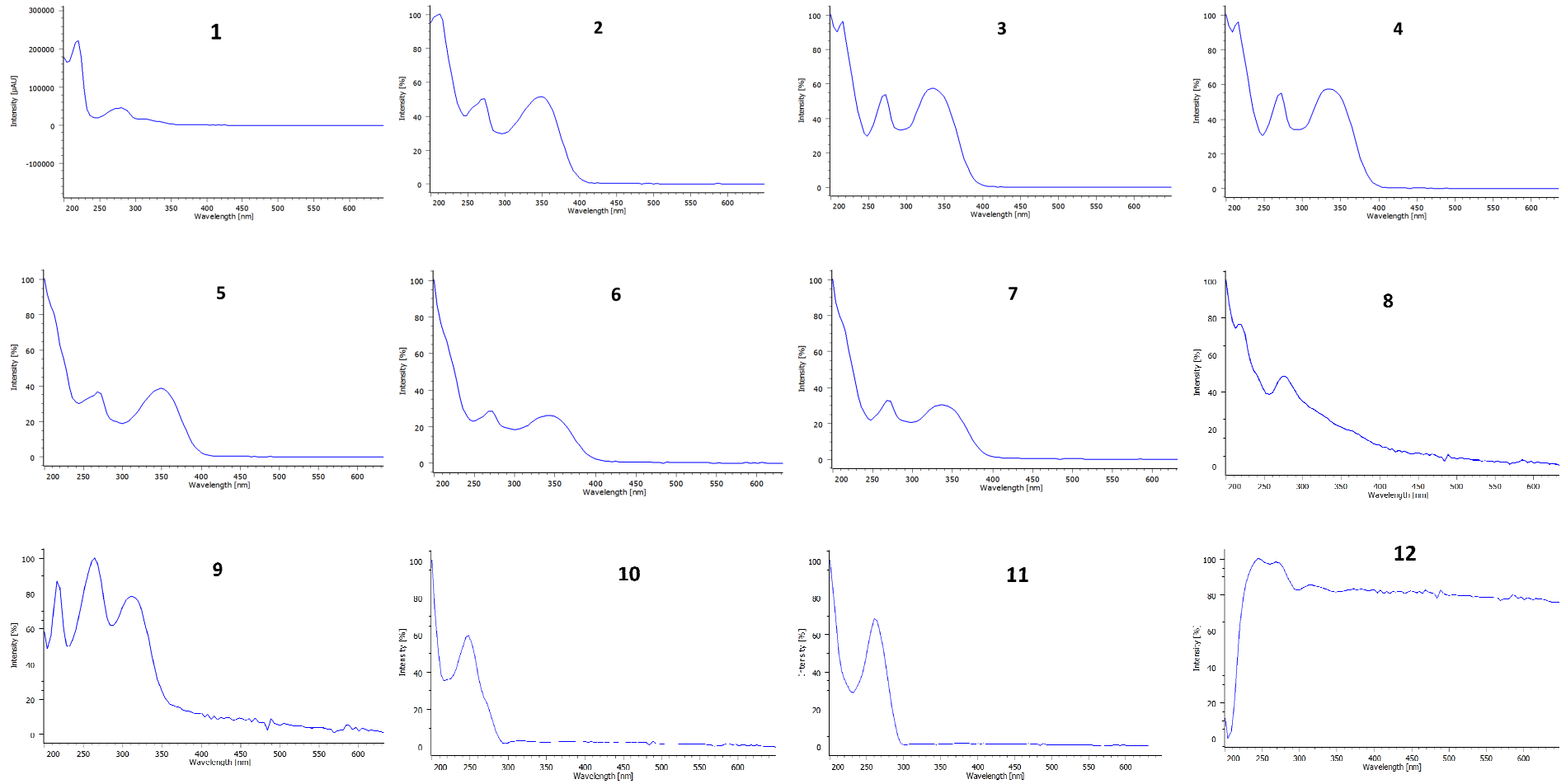
Figura 8 – Cromatograma obtido por HPLC-PDA em 254 nm das folhas de *P. edulis*



Fonte: Do autor.

Legenda: A – Extrato Bruto; B - Fr-BuOH; C - Fr-EtOAc

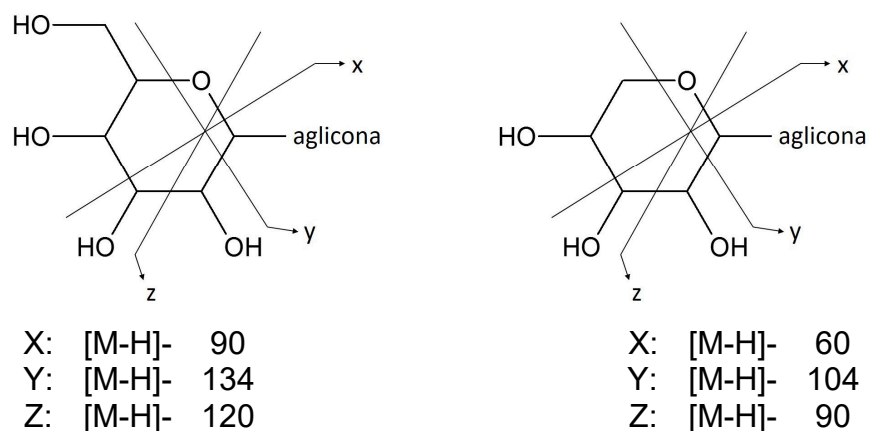
Apenas com os resultados do perfil de absorção no UV, não foi possível a identificação de cada constituinte químico presente no extrato e nas frações, entretanto com o perfil de absorção no UV foi possível observar a presença majoritária de flavonoides como constituintes químicos nas folhas da *P. edulis*.

Figura 9 - Espectro representativo no UV no extrato das folhas de *P. edulis*

Fonte: Do autor.

As análises por LC-ESI-IT-MS e FIA-ESI-IT-MS<sup>n</sup> confirmaram a presença de diversos flavonoides destacando os c-heterosídeos (Figura 12 e Tabela 5). Os flavonoides C-heterosídeos apresentam a unidade sacarídica diretamente ligada ao núcleo do flavonoide por uma ligação ácido resistente C-C (CUYCKENS & CLAEYS, 2004; ESSAFI, *et al.*, 2005; PIA *et al.*, 2015; KESHARI *et al.*, 2016). Para os flavonoides C-heterosídeos a via de fragmentação preferencial é aquela que se baseia na clivagem interna da unidade sacarídica, enquanto que nos flavonoides O-glicosídicos a eliminação intacta do açúcar é favorecida (Figura 10).

Figura 10 - Íon produto característico para quebras C-heterosídicas



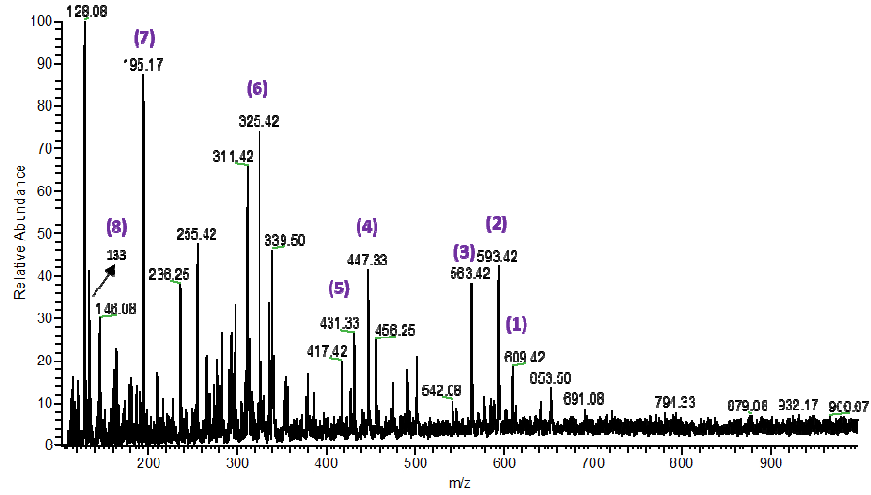
Fonte: Adaptado de CUYCKENS; CLAEYS (2004, p.10).

As evidências fornecidas pelo espectro de massas nos permitiram distinguir 2 fragmentações características para estes metabólitos. Os fragmentos (a) que mostram a perda do açúcar hexose do pico do íon molecular, com o pico do íon base, e a detecção do pico correspondente a aglicona, sugestivo da presença de flavonoide O-glicosídeos e os fragmentos (b) consistentes com flavonoides C-heterosídeos, produzindo íons típicos [(M-H)-90]<sup>-</sup> e [(M-H)-120]<sup>-</sup>.

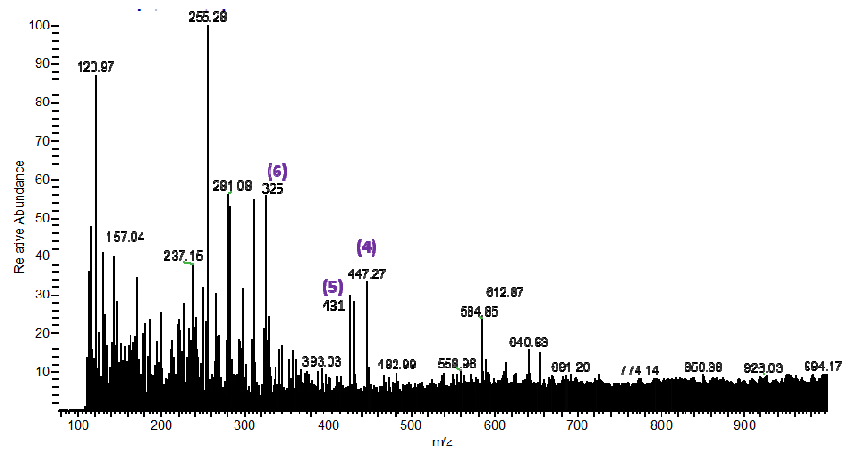
A figura 11 mostra o espectro *full scan*, em modo negativo, do extrato bruto e das frações. O modo negativo foi escolhido por favorecer a ionização dos compostos fenólicos.

Figura 11 - Espectro de massas full scan do extrato bruto, da Fr-EtOAc e da Fr-BuOH analisado em modo negativo por FIA-ESI-MS<sup>2</sup>. Faixa de íons m/z 100 a 1000 Da.

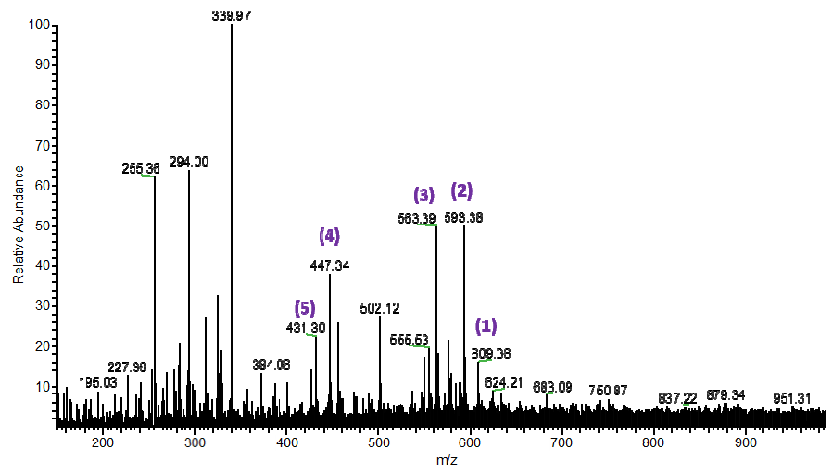
### Extrato Bruto



### Fr-EtOAc



### Fr-BuOH



Fonte: Do autor.

A análise do espectro *full scan* evidenciou uma mistura complexa de substâncias no extrato bruto, sugerindo a presença de uma série de metabólitos secundário descrito na literatura para o gênero *Passiflora*.

Em concordância com as observações no UV, as fragmentações dos íons de *m/z* 609, 593, 563, 447, 431, 325, 195 e 133, no modo negativo sugerem a presença de alguns flavonoides, dentre os quais podemos destacar o derivado heterosídeo da luteolina, luteolina-7-O-piranosil-3-O-glicosídeo ou luteolina-6-C-piranosil-8-C-glicosídeo; os derivados c-heterosídeos da apigenina, a apigenina-6-8-di-C-glicosídeo e a apigenina-6-C-arabinosídeo-8-C-glicosídeo, além da presença da isorientina e a isovitexina (Tabela 6).

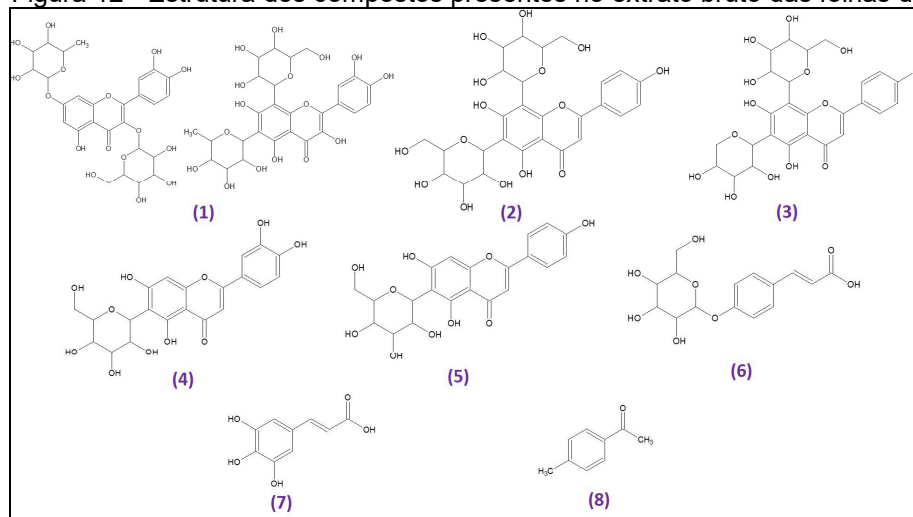
Tabela 6 - Proposta das estruturas das substâncias encontradas no extrato bruto obtido das folhas da espécie de *P. edulis*.

Nº	Composto Proposto	MS ( <i>m/z</i> )	Fragmentos MS <sup>2</sup> ( <i>m/z</i> )	Referência
1	Luteolina-7-O-piranosil-3-O-glicosídeo ou Luteolina-6-C-piranosil-8-C-glicosídeo	609	519;489;447;462; 301	PIA et al., 2015.
2	Apigenina-6-8-di-C-glicosídeo	593	325;297	Zuccolotto et al., 2011
3	Apigenina-6-C-arabinosídeo-8-C-glicosídeo	563	504; 473; 443	Colombo et al, 2008
4	Isoorientina	447	327; 357	PIA et al., 2015
5	Isovitexina	431	341; 311	PIA et al., 2015
6	Ácido 4-O-D-glicopiranosil caféico	325	183	
7	Ácido Fenólico	195	-	
8	Derivado de Ácido Fenólico	133	-	

Fonte: Do autor

Na figura 12 estão representadas as estruturas para as substâncias presentes no extrato bruto das folhas de *P. edulis*.

Figura 12 - Estrutura dos compostos presentes no extrato bruto das folhas de *P. edulis*

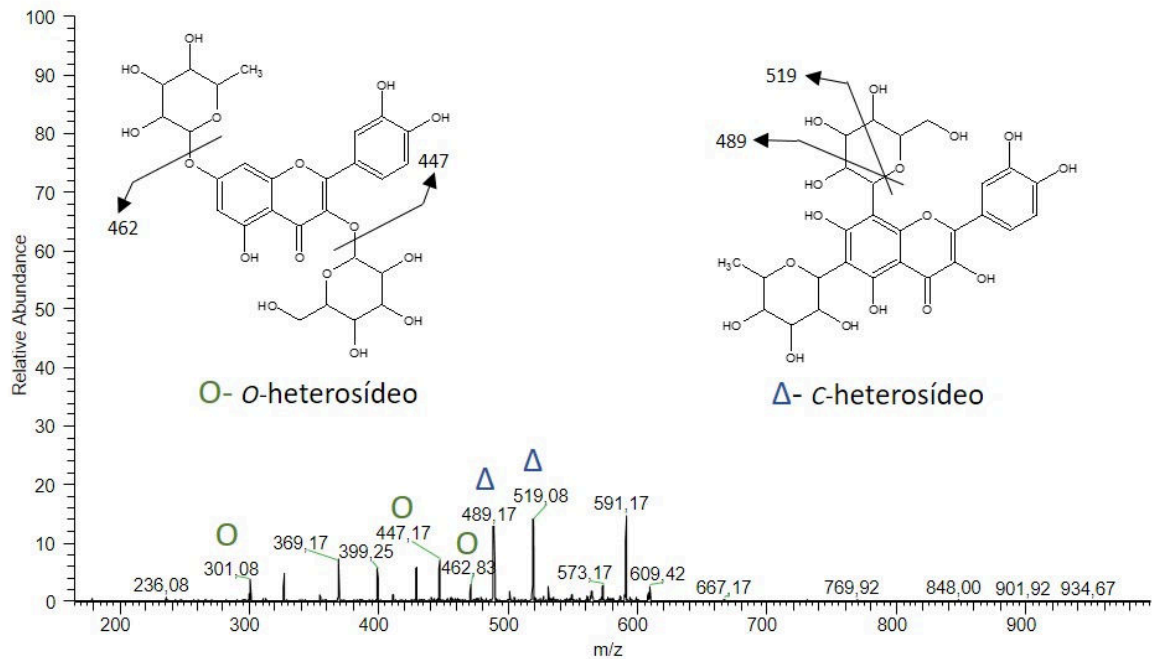


Fonte: Do autor.



Observando a fragmentação  $MS^2$  do pico de  $m/z$  de 609 (número 1 apresentado na Figura 12), os fragmentos sugerem a possibilidade de duas moléculas diferentes. Os íons de razão  $m/z$  519 e 489, analisado pelo  $MS^2$ , são consistentes com flavonoides C-heterosídeos, produzindo íons típicos  $[(M-H)-90]^-$  e  $[(M-H)-120]^-$ . Por outro lado, o fragmento de razão  $m/z$  447, sugere a presença de um flavonoide O-heterosídeo, proveniente da perda de uma unidade sacarídica de  $m/z$  162. Sendo que, a perda das duas unidades sacarídicas do heterosídeo leva a formação de uma unidade com razão  $m/z$  de 301 referente a sua aglicona (Figura 13).

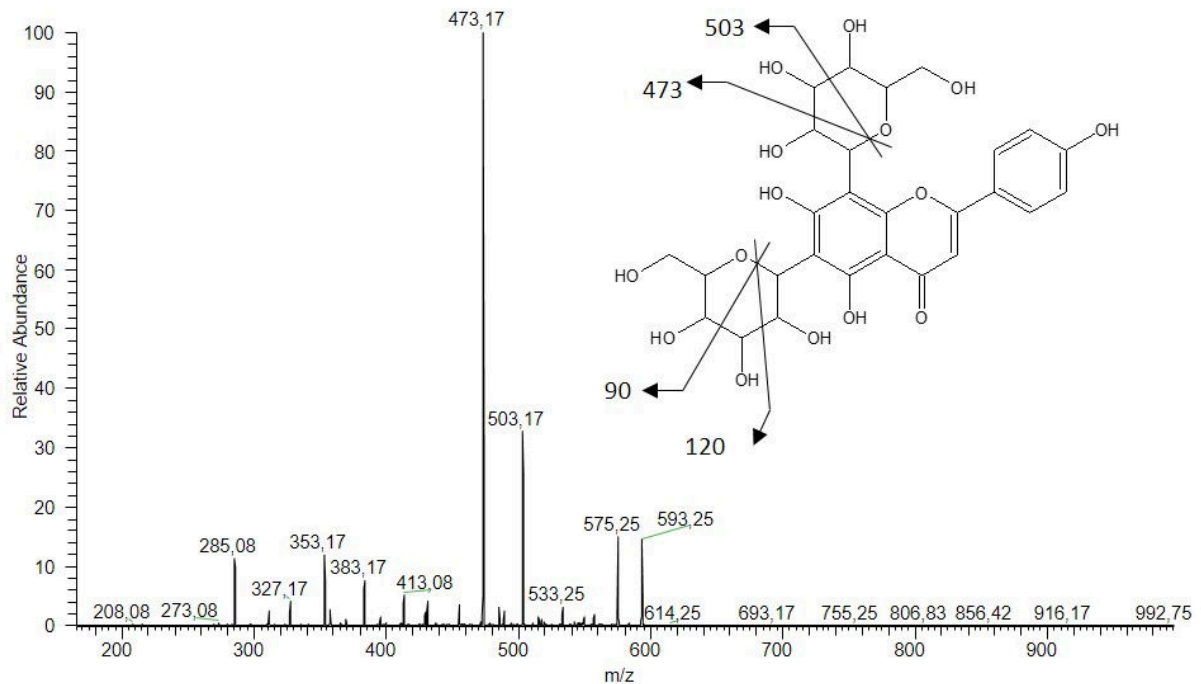
Figura 13 - Espectro de  $MS^2$ , do íon precursor  $m/z$  609, com energia de colisão de 30eV, no modo negativo.



Fonte: Do autor.

Os fragmentos produzidos pelos íons precursores dos compostos 2, 3, 4 e 5 são consistentes com fragmentos de flavonoides C-heterosídeos, produzindo íons típicos  $[(M-H)-90]^-$  e  $[(M-H)-120]^-$ . O íon de razão  $m/z$  593 apresentado na Figura 12 (composto número 2), analisado pelo  $MS^2$ , revelou íon  $m/z$  503, 473, 383 e 353 (Figura 14). O íon  $m/z$  503 e 473 propõe ser relativo à perda de um íon típico  $[(M-H)-90]^-$  e  $[(M-H)-120]^-$  respectivamente. Enquanto que o íon  $m/z$  383 e 353 sugere a perda de  $[(M-H)-120-90]$  e  $[(M-H)-120-120]$ , respectivamente. Os íons produtos gerados pelo espectro  $MS^2$  do íon  $m/z$  593 sugere a presença do derivado C-glicosídeo da apigenina (Tabela 4) (ARGENTIERI et al., 2015).

Figura 14 - Espectro de MS<sup>2</sup>, do íon precursor  $m/z$  593, com energia de colisão de 20eV, no modo negativo.

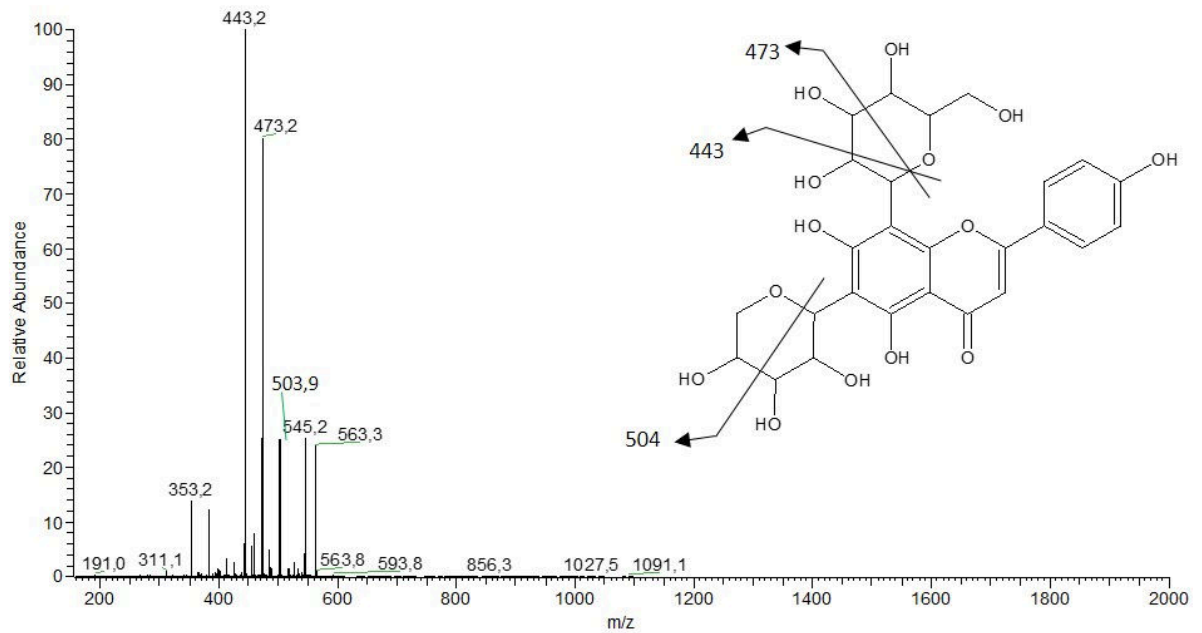


Fonte: Do autor.

Por outro lado, a análise do íon precursor de  $m/z$  563 sugere a presença da Apigenin-6-C-arabinoside-8-C-glucoside, um derivado C-heterosídeo da apigenina (número 3 apresentado na Figura 12). O espectro de MS<sup>2</sup> levou aos íons produtos de  $m/z$  504, 473 e 443 (Figura 15). O conjunto de dados fornecidos pelo espectro de massas sugeriu a presença da molécula também conhecida como Schaftoside na composição do extrato (COLOMBO; YARIWAKE; MCCULLAGH, 2008). O Schaftosídeo assim como a isorientina e isovitexina têm sido descrito como um dos principais flavonoides heterosídeos presentes em grandes quantidades nas espécies do gênero Passiflora (SAKALEM; NEGRI; TABACH, 2012).

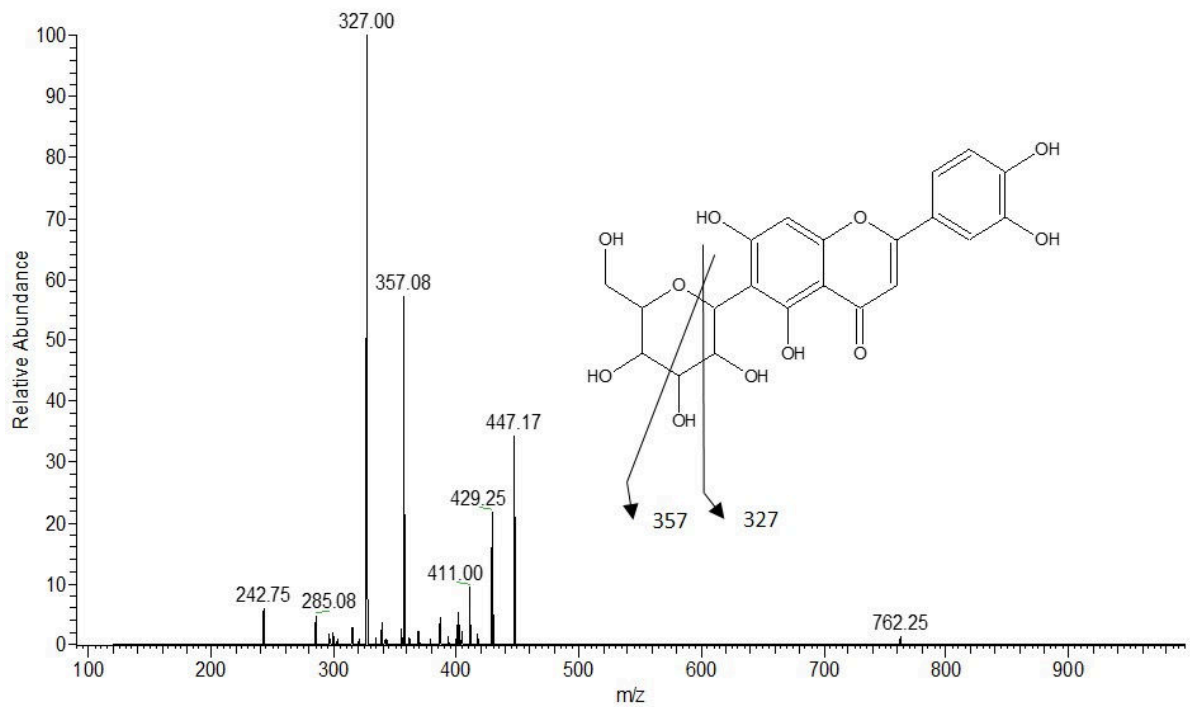
A análise do íon precursor de  $m/z$  447 corresponde a  $[M-H]^-$  da isorientina, composto número 4, apresentado na Figura 12. O espectro de MS<sup>2</sup> levou aos íons produtos de  $m/z$  327, 357 (Figura 16) (CUYCKENS; MAGDA, 2004; PIA et al., 2015).

Figura 15 - Espectro de MS<sup>2</sup>, do íon precursor m/z 564, com energia de colisão de 20eV, no modo negativo.



Fonte: Do autor.

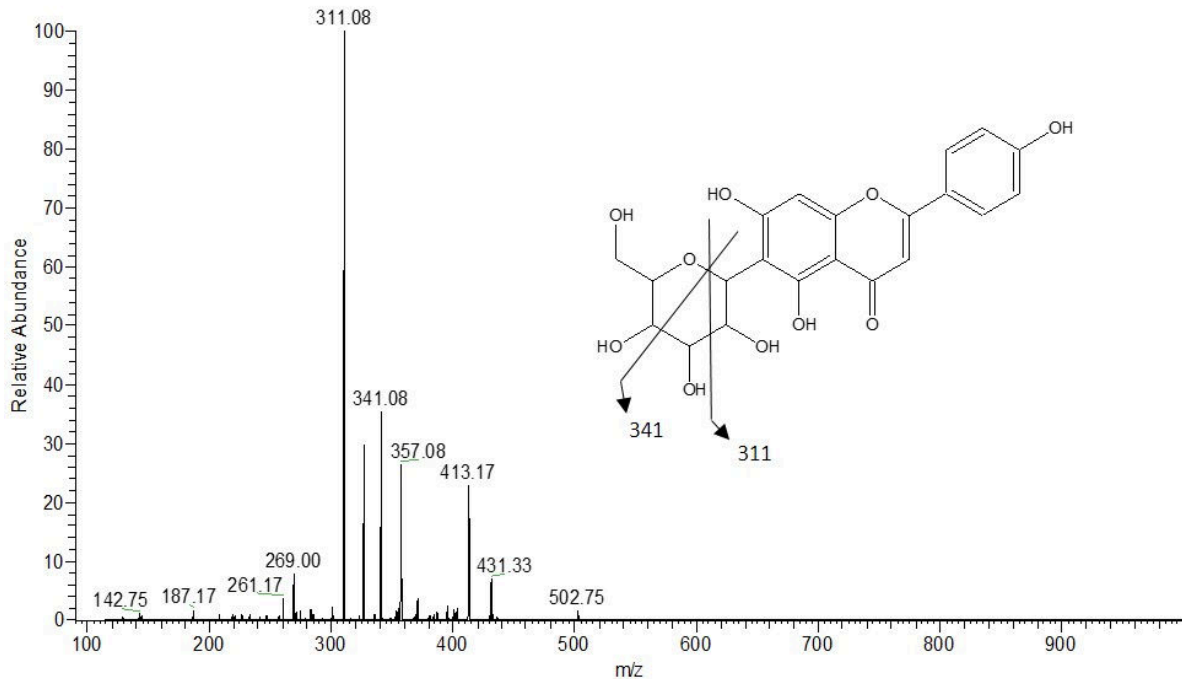
Figura 16 - Espectro de MS<sup>2</sup>, do íon precursor m/z 447, com energia de colisão de 20eV, no modo negativo.



Fonte: Do autor.

A análise do íon precursor de  $m/z$  431 sugere a presença da  $[M-H]^-$  isovitexina, composto número 5, apresentado na Figura 12. O espectro de  $MS^2$  levou aos íons produtos de  $m/z$  341 e 311 (Figura 17) (COLOMBO; YARIWAKE; MCCULLAGH, 2008; PIA et al., 2015).

Figura 17 - Espectro de  $MS^2$ , do íon precursor  $m/z$  431, com energia de colisão de 20eV, no modo negativo.



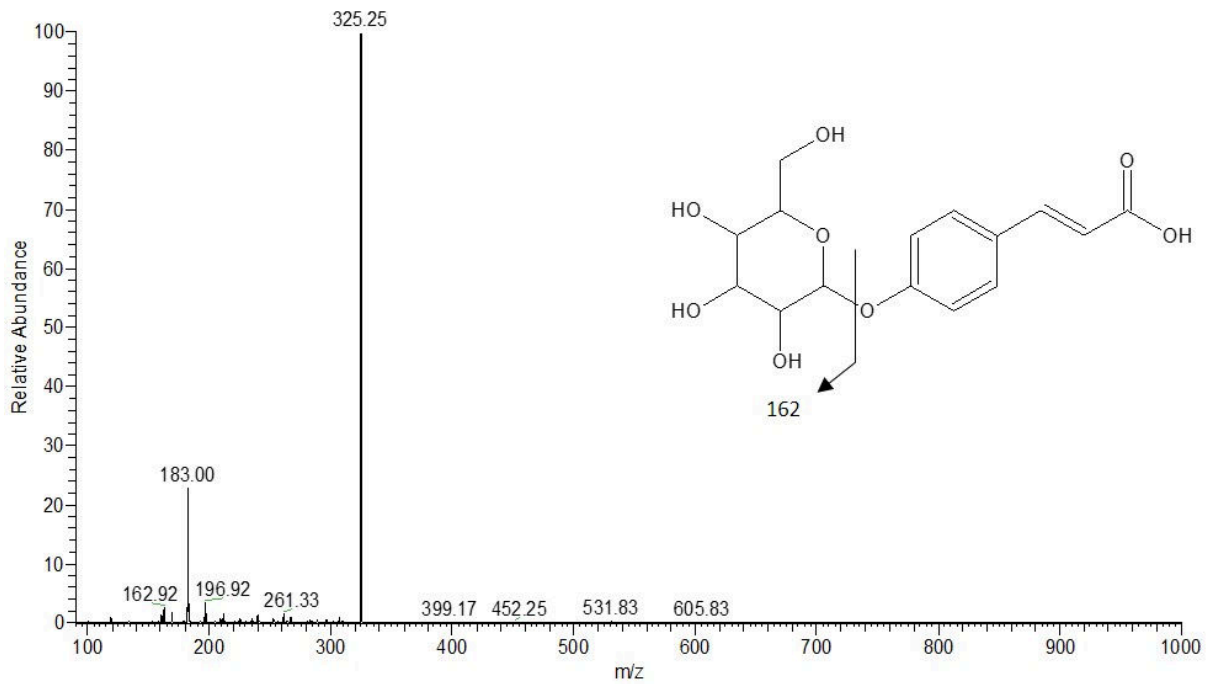
Fonte: Do autor.

O íon de razão  $m/z$  325 apresentado na Figura 12 (composto número 6), obtido pelo  $MS^2$ , revela íon  $m/z$  162 sugerindo a presença do ácido 4-*O-D*-glicopiranosil caféico (Figura 18). Esse íon propõe ser relativo à perda do açúcar de massa 162 (hexose).

O pico de  $m/z$  163 sugere ser de um derivado do ácido cinâmico, formado após a perda de um açúcar de massa 162 (hexose).

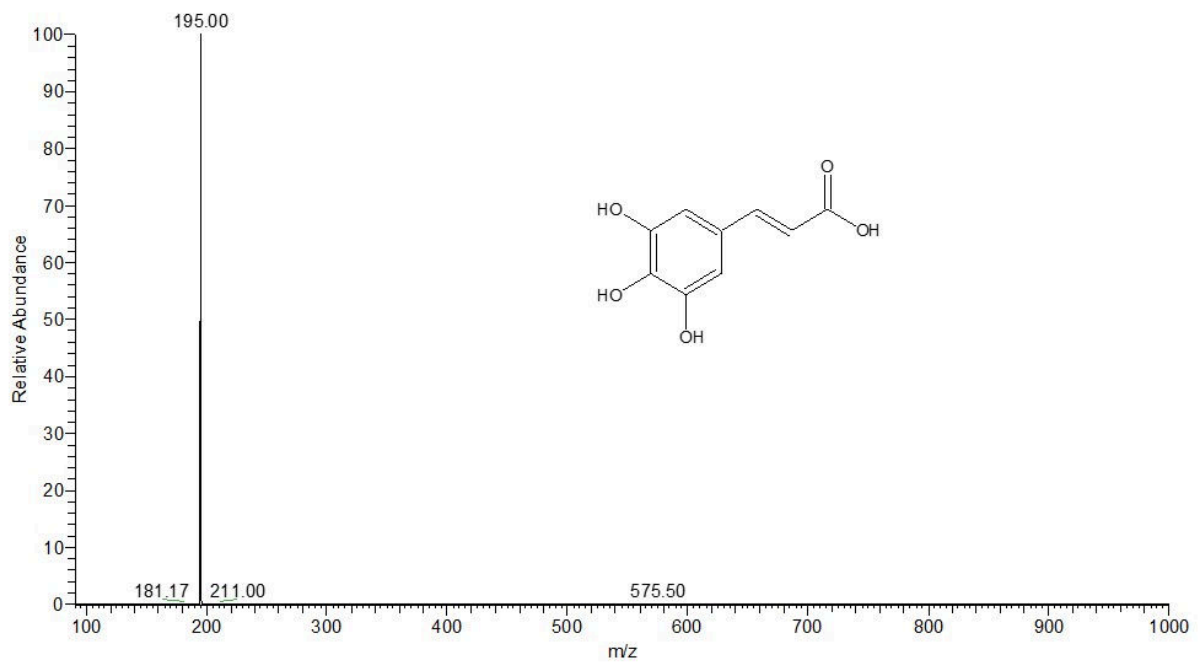
Além da presença de flavonoides C- e O-heterosídeos, o conjunto de dados fornecidos pelo espectro de massas dos íons precursores de  $m/z$  195 e de 133 sugere a presença de um derivado do ácido cinâmico apresentado nas Figuras 12 e 19 composto número 7) e de um derivado da acetofenona na composição do extrato (composto número 8), apresentado nas Figuras 12 e 20,. Ambos são estão presentes naturalmente em espécies vegetais.

Figura 18 - Espectro de MS<sup>2</sup>, do íon precursor m/z 325, com energia de colisão de 20eV, no modo negativo.



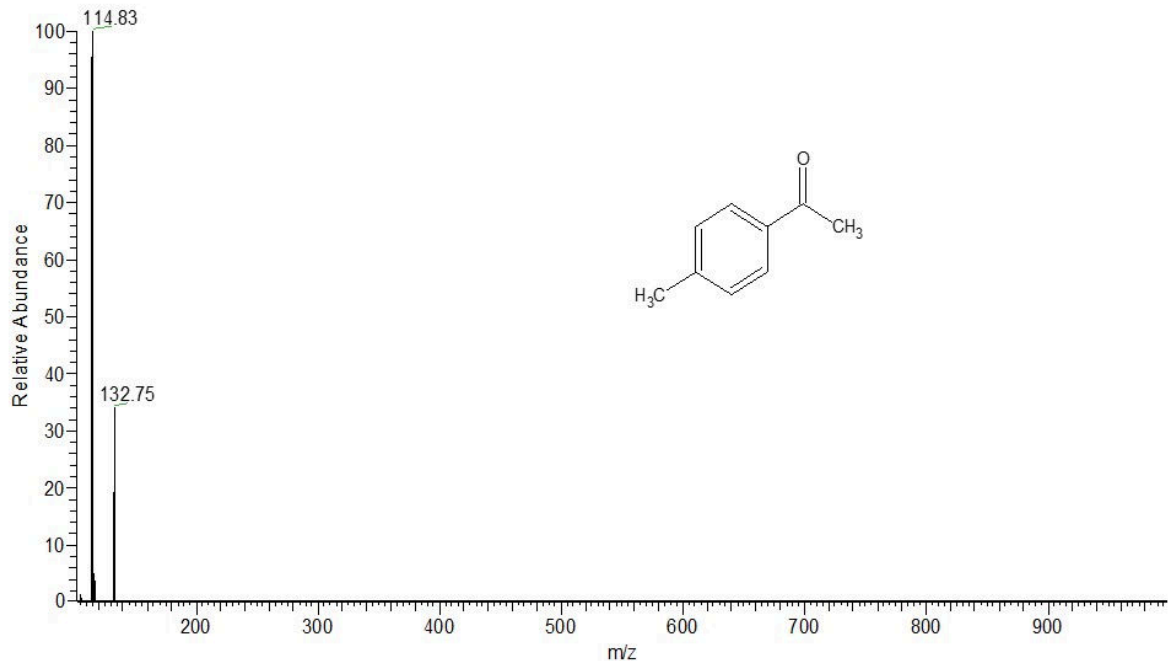
Fonte: Do autor.

Figura 19 - Espectro de MS<sup>2</sup>, do íon precursor m/z 195, com energia de colisão de 25eV, no modo negativo.



Fonte: Do autor.

Figura 20 - Espectro de MS<sup>2</sup>, do íon precursor m/z 133, com energia de colisão de 25eV, no modo negativo.



Fonte: Do autor.

#### 5.2.4 Quantificação do marcador químico nos insumos obtidos da espécie vegetal

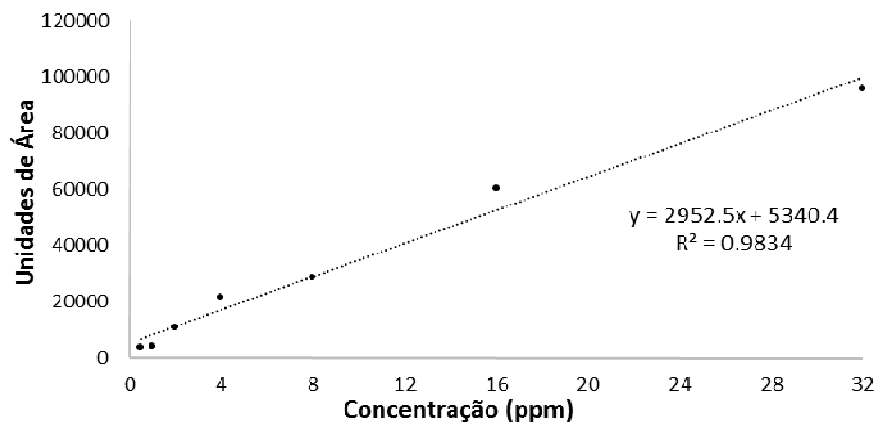
Os flavonoides mais comuns relatados na espécie *P. edulis* são os derivados heterosídicos da apigenina e da luteolina, onde podemos destacar a isoorientina, orientina, isovitexina e vitexina (ZUCOLOTTO et al., 2009). A quantificação destes marcadores torna-se indispensável na garantia da qualidade do produto final obtido, e além disso, poderá auxiliar na elucidação dos possíveis mecanismos de ação. Sendo assim, utilizando um padrão interno de isoorientina como marcador químico fomos capazes de confirmar a presença da isoorientina no extrato bruto e nas Fr-EtOAc e Fr-BuOH.

A curva de quantificação do padrão de isoorientina foi estabelecida em modo negativo UPLC-ESI-MS/MS Triplo Quadrupolo em experimentos de Monitoramento de Reações Múltiplas (MRM). Os resultados de validação do método mostraram um bom coeficiente de correlação, 0.9834 nas concentrações de massas de 0.5 – 32 ppm (Tabela 7 e Figura 21).

O valor encontrado para as amostras, foram extrapolados na curva de calibração para a obtenção da concentração de Isoorientina. Na Tabela 8 estão representados os valores de isoorientina no extrato bruto e nas frações.

Apesar da similaridade na composição química do extrato bruto e das frações obtidas, a quantificação de isoorientina no extrato bruto e nas frações analisadas mostraram algumas diferenças.

Figura 21 - Curva de quantificação da isoorientina



Fonte: Do autor.

Tabela 7 - Equação da curva de calibração e limites de quantificação (LOQ).

Padrão	Equação da Reta	Faixa de linearidade (ppm)	r <sup>2</sup>	LDQ (ppm)	LOQ (ppm)
Isoorientina	y = 2952.5 x + 5340.4	0.5-32	0.9834	1.82	18.24

Fonte: Do autor.

Legenda: LDQ: Limite de detecção; LOQ: Limite de quantificação; r<sup>2</sup>: Coeficiente de determinação.

Tabela 8 - Concentração do marcador isoorientina no extrato e nas frações

Amostra	Concentração do marcador (%)
EtOH 70%	3,9
Fr-EtOAc	2,4
Fr-BuOH	6,1

Fonte: Do autor.

O efeito da matriz foi considerado insignificante uma vez que a razão (A/B x 100) % (pág. 37) dos analitos foi de 96,3% ficando dentro da faixa aceitável de 85% e 115% para a isoorientina sugerindo que não houve interferências endógenas no modo MRM para nenhum dos padrões (BEATRIZ et al., 2004; MORANO et al., 2008

INMETRO, 2011). A recuperação após a extração em fase sólida (SPE) foi de 97.4%. Estes resultados mostram que todos os valores estão dentro das faixas aceitáveis (RIBANI et al., 2004).

A precisão representa a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, sob condições definidas (RIBANI et al., 2004). Uma das formas de se expressar a precisão é através da estimativa do desvio padrão relativo (RSD), também conhecido como coeficiente de variação (CV). Normalmente, métodos que quantificam compostos em macro quantidades requerem um RSD de 1 a 2%. Em métodos de análise de traços ou impurezas, são aceitos RSD de até 20%, dependendo da complexidade da amostra (MORANO et al., 2008).

Já a exatidão, representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados em um determinado ensaio e um valor de referência aceito como verdadeiro (RIBANI et al., 2004). Na tabela 9 estão apresentados os valores dos RSD da precisão e da exatidão, os resultados obtidos nas análises de precisão e exatidão demonstram valores de desvio padrão relativo abaixo de 20%, desta forma, assume-se assim que o método de análise para a quantificação da isoorientina foi preciso e exato.

Tabela 9 - Resumo da precisão e exatidão.

<b>Padrão</b>	<b>Concentração (ug/mL)</b>	<b>Precisão Intra-dia (%, RSD)</b>	<b>Exatidão Intra-dia (%, RE)</b>	<b>Precisão Inter-dia (%, RSD)</b>	<b>Exatidão Inter-dia (%, RE)</b>
	1	5.7	6.8	1.5	0.9
Isoorientina	25	8.7	4.6	6	1.6
	50	3.2	1.9	2.5	2.5

Fonte: Do autor

Legenda: RSD: desvio padrão relativo; RE: erro relativo

Todos os valores de validação do método analítico apresentaram limites aceitáveis e demonstraram uma boa precisão e exatidão do método instrumental proposto (MORANO et al., 2008; RIBANI et al., 2004).

Além do mais, a quantificação do marcador químico por UPLC-ESI-MS/MS, em concordância com os resultados apresentados na quantificação de flavonoides totais equivalentes em quercetina, permitiu observar que a Fr-BuOH apresentou o maior teor de flavonoide quantificado em isoorientina, demonstrando ser a fração majoritária em flavonoides.



Muitos relatos da literatura, a respeito de compostos naturais com potencial normoglicemiante têm associado estes efeitos à presença de flavonoides monoglicosídeos, tais como a isorientina e isovitexina. Portanto, de acordo com os nossos resultados, podemos sugerir que a Fr-BuOH possui maior potencial para apresentar resultados biológicos frente ao diabetes mellitus em comparação com as demais frações obtidas neste estudo.

### 5.3 ETAPA BIOLÓGICA

Considerando que os resultados da caracterização fitoquímica das frações analisadas neste estudo, demonstraram que a FrBuOH se apresentou enriquecida em flavonoides, além de obter maior rendimento em relação as demais frações, os ensaios biológicos foram conduzidos com a administração desta fração aos animais.

A ingestão diária de flavonóides pode ser influenciada principalmente pelos hábitos culturais de uma determinada população, podendo levar à divergências em relação à concentração diária de flavonoides ingeridos entre diversas populações. Gary (2003), relata que o consumo diário total de flavonoides pela população mundial pode variar entre 20 mg/dia, em países como os Estados Unidos da América, Dinamarca e Finlândia à 70 mg/dia quando se trata da Holanda.

Por outro lado, alguns estudos têm demonstrado que o tratamento de ratos com de flavonoides extraídos da semente da uva da classe das proantocianidinas (50mg/kg/dia), durante três semanas, demonstrou resultado significativo para patologia da aterosclerose. Neste mesmo estudo, foi observado que o fluxo coronário e o aórtico foram recuperados, além de haver uma melhora na pressão sanguínea (GIEHL et al., 2007). Em estudos envolvendo ratos diabéticos, Cazarolli (2004) demonstrou que a administração de dois flavonoides O-heterosídeos, na concentração de 100 mg/kg, foi capaz de reduzir a glicemia de ratos 24 horas após o tratamento. Já Vessal e colaboradores, (2003) com a administração de 10-15 mg/kg do flavonoide quercetina observou redução nos níveis glicêmicos de ratos tratados.

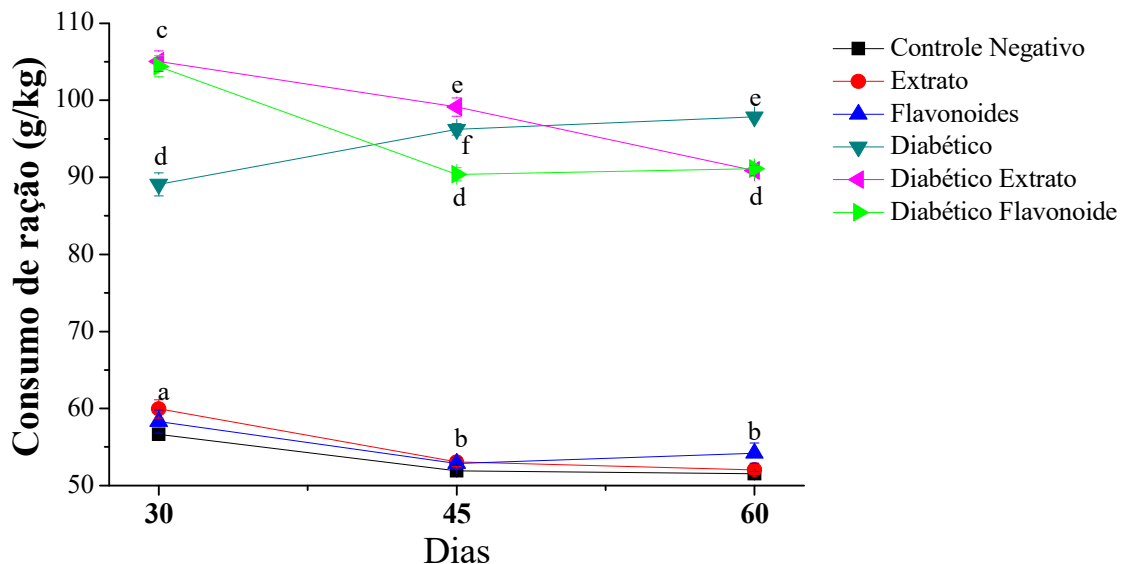
Sendo assim, a quantidade de flavonoides administrados diariamente aos diferentes modelos biológicos, depende claramente da composição dos flavonoides. Considerando que esta concentração pode variar entre 10 e 100mg/kg de massa de animal (VESSAL; HEMMATI; VASEI, 2003;CAZAROLLI, 2004; KESHARI et al., 2016), optamos por trabalhar com a administração de 20 mg/kg/dia aos animais.

### 5.3.1 Consumo Alimentar e ingestão de líquido

A sede (polidipsia) e a fome (polifagia) constante, assim como a perda de massa e o aumento do fluxo urinário (poliúria) são sintomas clássicos e frequentes em portadores de diabetes mellitus. Na maioria das vezes o quadro hiperglicêmico é o grande responsável pelos sintomas clínicos. A associação entre a hiperglicemia e perda de massa sinaliza a deficiência de insulina e, em geral, um estágio mais avançado ou mais descompensado da doença. No diabetes mellitus tipo 1 a característica principal é a insuficiência na produção de insulina (ADA, 2013; TSCHIEDEL, 2014).

O monitoramento dos animais durante os últimos 30 dias experimentais demonstrou que os animais diabéticos apresentaram um consumo de ração de  $97,8 \pm 1,50$  g/Kg de massa de animal, enquanto que os animais não diabéticos ingeriram  $51,5 \pm 0,50$  g/Kg de massa de animal. Com o tratamento com da fração Fr-BuOH e do extrato bruto os animais diabéticos diminuíram o consumo alimentar para  $91,1 \pm 1,37$  e  $90,8 \pm 1,30$  g/Kg de massa de animal, respectivamente (Gráfico 1).

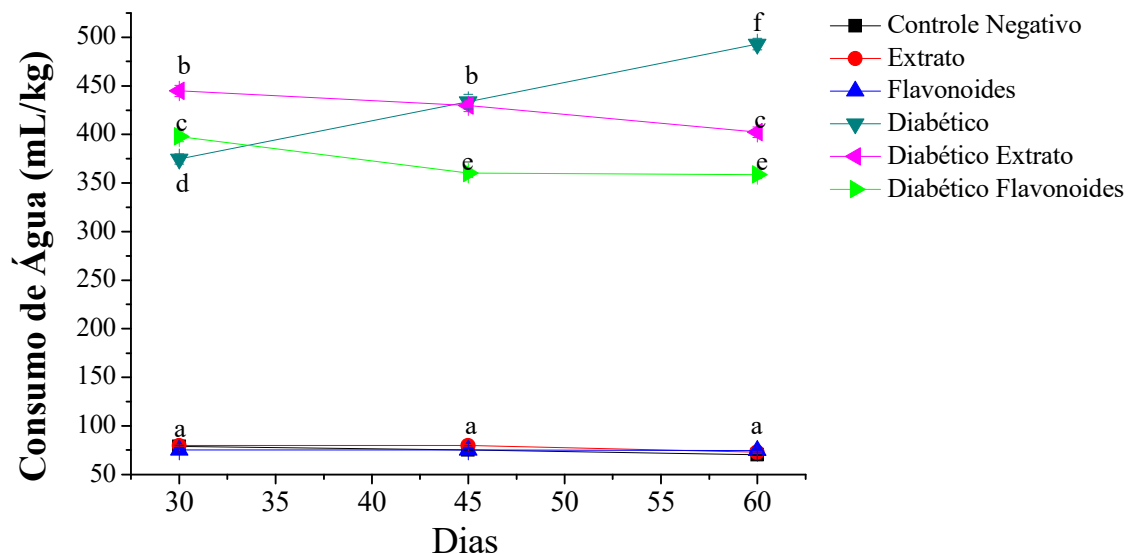
Gráfico 1 - Monitoramento do consumo de ração



Fonte: Do autor.

Legenda: Os resultados representam a média  $\pm$  desvio padrão de determinações realizadas em intervalos de 15 dias consecutivos por tratamento. Foi determinado a ANOVA tendo como significância  $p < 0,05$ . Letras diferentes representam média estatística diferentes.

Gráfico 2 - Monitoramento do consumo de líquido.



Fonte: Do autor.

Legenda: Os resultados representam a média  $\pm$  desvio padrão de determinações realizadas em intervalos de 15 dias consecutivos por tratamento. Foi determinado a ANOVA tendo como significância  $p < 0,05$ . Letras diferentes representam média estatística diferentes.

No monitoramento da ingestão de líquidos, foi possível observar que os animais do grupo “Diabetes” ingeriram  $492,9 \pm 5,2$  mL/Kg de massa de animal (7 vezes mais água do que os animais do grupo) “Controle Negativo” que ingeriu  $70,2 \pm 1,1$  mL/Kg. O tratamento dos animais diabéticos tanto com o extrato bruto ( $400,2 \pm 5,8$  mL/Kg) como com a fração Fr-BuOH ( $358,8 \pm 5,5$  mL/Kg), foi capaz de reduzir em 5 vezes o consumo de água em relação ao grupo “Controle Negativo” durante os 30 dias experimentais (Gráfico 7). Estes resultados demonstram que o tratamento dos animais com o extrato bruto e com a fração de flavonoides foi capaz de controlar sintomas clássicos do diabetes mellitus nos animais tratados.

### 5.3.2 Glicemia de jejum e glicação de proteínas no sangue total e no soro.

No presente trabalho foram avaliados os efeitos do extrato bruto e da fração de flavonoides (Fr-BuOH) de *P. edulis* sobre a glicemia de jejum, frutossamina e os níveis de hemoglobina glicada em ratos diabéticos. Como esperado, a glicemia de jejum foi significativamente maior no grupo “Diabético” quando comparado com os animais dos grupos “Controle Negativo”, “Extrato” e “Flavonoides”, demonstrando

que o protocolo de indução utilizado neste estudo foi eficiente. Por outro lado, observamos que a glicemia de jejum dos animais do grupo “Diabetes Extrato” e do grupo “Diabetes Flavonoides” foi estatisticamente menor quando comparada á glicemia dos animais do grupo “Diabetes” (Tabela 9).

A determinação da glicemia de jejum normalmente é utilizada para a avaliação do controle glicêmico a curto prazo, já que reflete os níveis glicêmicos momentâneos. Por outro lado, as frutossaminas e hemoglobina glicada têm um papel fundamental na monitorização do controle glicêmico e podem ser consideradas como parâmetros para a avaliação do controle glicêmico em médio e longo prazo, respectivamente (PORTO BARBOSA; DE OLIVEIRA; SEARA, 2009; SBD, 2015).

Nos resultados obtidos em nossos experimentos, não observamos diferença significativa na concentração de hemoglobina glicada entre os grupos diabético e diabéticos tratados com o extrato bruto ou com a fração Fr-BuOH. Entretanto, o tratamento dos animais diabéticos com o extrato bruto e com a fração de flavonoides foi capaz de reduzir significativamente os níveis séricos de frutossaminas (Tabela 10).

Tabela 10 - 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>	<b>Frutosamina (uM)</b>
Controle Negativo	127,7 ± 6,76 <sup>a</sup>	9,88 ± 0,28 <sup>a</sup>	62,5 ± 4,39 <sup>a</sup>
Extrato	143,6 ± 7,10 <sup>a</sup>	10,1 ± 0,32 <sup>a</sup>	62,1 ± 5,37 <sup>a</sup>
Flavonoide	141,6 ± 7,97 <sup>a</sup>	9,97 ± 0,25 <sup>a</sup>	62,5 ± 5,24 <sup>a</sup>
Diabético	647,8 ± 10,2 <sup>b</sup>	18,9 ± 0,60 <sup>b</sup>	174,0 ± 4,90 <sup>b</sup>
Diabético Extrato	450,4 ± 35,5 <sup>c</sup>	16,9 ± 0,83 <sup>b</sup>	142,6 ± 5,59 <sup>c</sup>
Diabético Flavonoide	503,4 ± 24,8 <sup>c</sup>	17,4 ± 0,42 <sup>b</sup>	142,3 ± 3,11 <sup>c</sup>

Fonte: Do autor.

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  $p < 0,05$ .

A discrepância observada entre os resultados de frutossaminas e de hemoglobina glicada poderia ser atribuída a diversos fatores tais como, diferenças da meia vida destas proteínas na corrente sanguínea, distribuição destas proteínas entre os diferentes compartimentos do organismo e tempo necessário para o início da efetividade do tratamento com o extrato bruto e com a fração de flavonoides em estudo (BARBOSA; OLIVEIRA; SEARA, 2008; PORTO BARBOSA; DE OLIVEIRA; SEARA, 2009; CHILELLI; BURLINA; LAPOLLA, 2013; ADA, 2016).

É conhecido que a glicação de proteínas depende diretamente das concentrações de glicose. A glicação da hemoglobina ocorre ao longo de todo o período de vida das hemácias e reflete o controle glicêmico por cerca de até 120 dias antes da coleta da amostra (longo prazo), enquanto que a produção das frutosaminas depende principalmente da glicação da albumina, que constitui cerca de 70% das proteínas plasmáticas e reflete o controle glicêmico por cerca de 21 dias anteriores à coleta da amostra (médio prazo) (PORTO BARBOSA; DE OLIVEIRA; SEARA, 2009).

Além disso, estudos têm demonstrado que cerca de 50% da concentração de HbA1C detectada no sangue é formada no mês precedente à coleta da amostra, 25% no mês anterior a este e os 25% remanescentes, são formados no terceiro ou quarto mes antes do exame.

Sendo assim, os resultados das determinações de glicose, frutosaminas e de HbA1C observados neste estudo, sugerem que a administração do extrato bruto e da fração de flavonoides pode não ter apresentado um impacto significativo sobre o controle glicêmico desde os primeiros dias de tratamento, porém apresentou um efeito benéfico sobre o controle glicêmico a curto e médio prazo, evidenciados pela redução da glicemia e dos níveis séricos de frutosaminas.

Conforme relatado neste estudo, as análises do extrato bruto assim como da fração majoritária de flavonoides demonstraram a presença de diversos flavonoides dentre os quais, 4 apresentaram características de fragmentação de flavonoides C-heterosídeos, sendo os derivados C-heterosídeos da apigenina, a apigenina-6-8-di-C-glicosídeo e a apigenina-6-C-arabinosídeo-8-C-glicosídeo, além da presença da isorientina e a isovitexina.

Diversos estudos tem demonstrado que diferentes flavonóides tais como canferol, canferitrina, canferol 3-O- $\beta$ -L-ramnopiranosil, canferol 3- $\beta$ -D-glicopiranosídeo, canferol 7-O- $\alpha$ -L-ramnopiranosídeo e canferol-3-neohesperidosídeo, além de flavonoides de núcleo apigenina tem sido capazes de reduzir a glicemia de jejum em ratos Wistar 2 horas após o tratamento (REVILLA et al., 2002; CARVALHO, 2011; PIZZILO et al., 2011; EL-SAYED, 2011; FALLIS, 2013). Embora os mesmos autores relatem que os mecanismos farmacológicos responsáveis por estes efeitos ainda não estão 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. Khangholi et al., (2015) demonstrou

que flavonoides com apenas uma unidade sacarídica apresenta forte efeito inibitório na atividade de  $\alpha$ -amilase, reduzindo assim a absorção de açúcar.

Outro mecanismo que poderia justificar os efeitos de compostos fenólicos sobre os níveis glicêmicos 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, ou até mesmo favorecendo a eliminação urinária de glicose (JAOUHARI; LAZREK; JANA, 2000; ANHÊ et al., 2013; WU; JIN; JIN, 2013; VINAYAGAM; XU, 2015).

Além disso, estudos recentes têm investigado a relação estrutura atividade de flavonoides com potencial hipoglicemiante. Keshari et al., (2016) isolaram quatro flavonoides da casca do caule da *Ficus racemosa*, caracterizando suas estruturas por ressonância magnética nuclear (RMN) e espectro de infra vermelho (IF). Neste estudo, os autores confirmaram a presença dos flavonoides canferol, quercetina, naringenina e baicaleina. Estes mesmos autores demonstraram que o tratamento de animais diabéticos com os flavonoides canferol, quercetina, naringenina e baicaleina, levou à redução significativa nos níveis glicêmicos dos animais, sugerindo que estes flavonoides apresentaram uma atividade hipoglicêmica. Em paralelo, observaram que a massa corporal dos animais diabéticos tratados com os flavonoides foi restaurada ao fim do experimento. Ainda neste estudo, Keshari et al., (2016) propuseram um possível mecanismo de ação destes flavonoides, executando testes de *docking* molecular, utilizando vários receptores alvos, sendo um deles o transportador de glicose GLUT1. Os autores observaram que os flavonoides isolados apresentaram uma energia de interação com o GLUT1 da ordem de 10 kcal/mol., indicando que o ligante apresentou ação agonista com o receptor (KESHARI et al., 2016). Com estes resultados os autores concluíram que um dos mecanismos de ação dos flavonoides utilizados no estudo de Keshari et al., (2016) foi por interação com o transportador de glicose GLUT1.

Os dados das análises de caracterização química do extrato bruto e da fração de flavonoides realizadas neste estudo, os sugeriram a presença de diversos flavonoides O-heterosídeo e flavonoides C-heterosídeos derivados da apigenina e luteolina, que poderiam ser responsáveis pela ação antihiperlicemiante evidenciada.

Carvalho, (2011) relata que diversos estudos têm demonstrado que flavonóides C-glicosídeos isolados de frações de *W. ebracteata* apresentaram alto potencial hipoglicemiante. Ainda neste estudo o autor relata que a luteolina e apigenina demonstraram potencial protetor das células  $\beta$  e aumentando ainda as concentrações plasmáticas de insulina. Estes resultados já haviam sido observados por outros autores em ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina (ZARZUELO et al., 1996; PANDA; KAR, 2007; LI et al., 2007).

Por outro lado, keshari et al., (2016) têm demonstrado que flavonoides O-heterosídeo, tal como o canferol-3,7-O- $\alpha$ -L-diramnosídeo têm apresentado alto potencial hipoglicemiante. Além disso, De Sousa e colaboradores (2004) relatam que o composto majoritário da fração n-butanol das folhas da *Bauhinia forficata*, o canferol-3,7-O-( $\alpha$ )-L-diramnosídeo, apresentou efeito hipoglicêmico em ratos diabéticos. Ainda, o canferol foi capaz de aumentar a captação de [ $^{14}$ C]-deoxi-D-glicose no músculo sóleo de ratos sem alterar a síntese protéica e os níveis de glicose urinária num período agudo 1h após a incubação do músculo com o flavonoide em estudo.

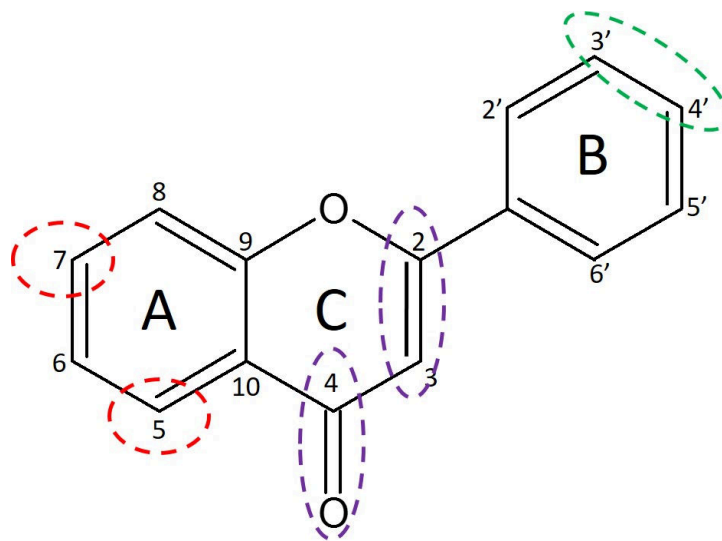
Cazarolli, (2005) relatou que outros flavonóides com estruturas semelhantes ao canferol 3-O- $\beta$ -L-ramnopiranosil- $\beta$ -D-glicopiranosídeo-7-O- $\alpha$ -L-ramnopiranosídeo, como a canferitrina e o canferol-3-neohesperidosídeo também apresentaram atividade hipoglicemiante. Entretanto, este mesmo autor relata que a ausência de uma unidade sacarídica na molécula do flavonóide resulta na perda de sua atividade. A atividade dos flavonóides e seus metabólitos depende da estrutura química e orientação das ligações na molécula. A presença de flavonoides na forma heterosídica influencia as propriedades químicas, físicas e biológicas além de afetar a absorção dos mesmos pelas células intestinais. Assim, estes possíveis mecanismos poderiam justificar a ação antihiperglicemiante do extrato bruto e da fração de flavonoides observada neste estudo.

Além da redução dos níveis glicêmicos nos grupos “Diabetes Flavonoides” e “Diabetes Extrato”, observamos que a glicação proteica no soro dos animais pertencentes a estes grupos foi significativamente menor quando comparada ao grupo “Diabetes” (Tabela 8). A inibição da glicação proteica pode ser facilitada tanto pela melhora no controle glicêmico, como pela presença de compostos com potencial antioxidante e ou antiglicante. Em estudos mais recentes, Khangholi et al., (2015) demonstraram que 3 posições na estrutura dos flavonoides são de extrema

importância para que estes compostos possam exercer tais ações: a presença do grupo catecol (hidroxilas na posição 3' e 4') no anel B, a dupla ligação na posição 2,3 conjugada com um grupo 4-oxo, a presença de hidroxila no carbono 3 do anel C e a presença de hidroxila na posição 5,7 no anel A (Figura 22).

De maneira semelhante as posições de hidroxilação, flavonoides monoheterosídeos (ex. isoorientina e isovitexina) tem apresentado melhores atividades biológicas quando comparados com flavonoides poliheterosídeos. Desta forma, flavonoides que apresentam características químicas similares às descritas, podem prevenir a formação de radicais livres e a glicação proteica, por apresentarem atividade antioxidante não enzimática além de impedirem a ligação cruzada entre o colágeno e os produtos finais de glicação avançada (AGEs), evitando assim, o seu acúmulo em tecidos.

Figura 22 - Posições importantes na molécula de flavonoide, que é determinante na atividade biológica.



Fonte: Do autor.

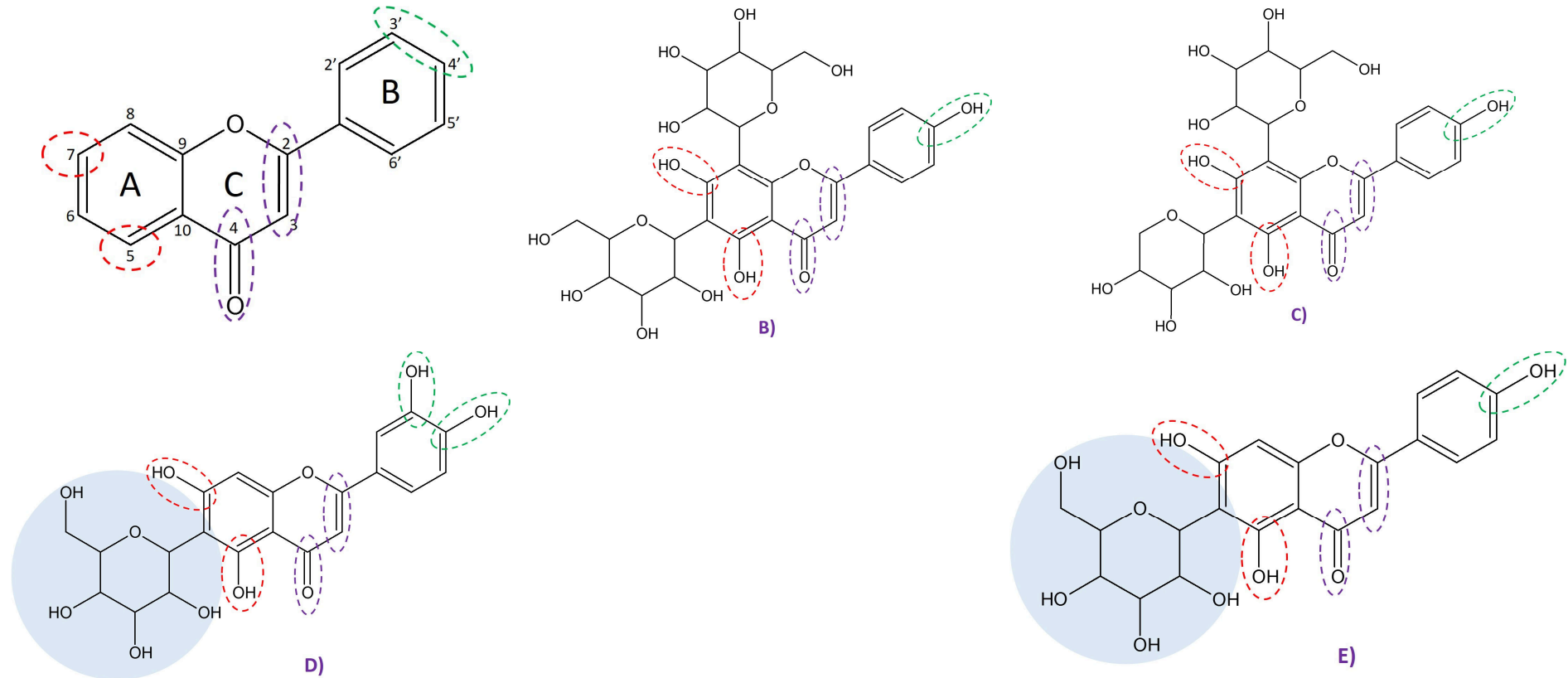
Ao analisarmos a composição química do extrato bruto e da fração de flavonoides, podemos observar a presença de flavonoides com características similares às relatadas na literatura. Dentre estes compostos, a confirmação da presença da isoorientina pela quantificação com adição de padrão interno, nos leva a sugerir que este flavonoide pode ser um dos grandes responsáveis pelos efeitos biológicos observados neste estudo. Além da presença da isoorientina, as análises sugeriram a presença de flavonoides derivados da apigenina e luteolina e flavonoide O-heterosídeo. Se analisarmos a estrutura química dos compostos presentes no



extrato bruto e na fração de flavonoides, podemos observar características compatíveis com as relatadas acima para os compostos 1, 2, 3, 4 e 5 (Tabela 5, Figura 10 e 23).

Desta forma, observamos que estes compostos fitoquímicos sejam talvez os grandes promissores no controle glicêmico e da glicação de proteínas como terapia para tratamento das complicações do diabetes mellitus.

Figura 23 - Relação da estrutura e da atividade biológica de flavonoides encontrado nas folhas *P. edulis*



Fonte: Do autor.

Legenda: A – Posições importantes na molécula de flavonoide; B - Apigenina-6-8-di-C-glicosídeo; C - Apigenina-6-C-arabinosídeo-8-C-glicosídeo; D – Isorientina; E – Isovitexina.

### 5.3.3 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 11). Foi observado um aumento significativo nos níveis séricos de uréia e de creatinina no grupo de animais diabéticos não tratados com o extrato e os flavonoides de *Passiflora edulis* Sims quando comparados aos animais não diabéticos. Os níveis séricos de uréia no grupo de animais diabéticos tratados com a fração de flavonoides foram significativamente menores que no grupo de animais diabéticos não tratados. Nenhuma diferença significativa foi observada em relação aos níveis séricos de creatinina quando estes dois grupos foram comparados.

Tabela 11 - Níveis séricos de ureia e creatinina em ratos diabéticos e não diabéticos, tratados e não tratados com o extrato e as frações das folhas de *Passiflora edulis* Sims.

Grupos	Uréia (mg/dl)	Creatinina (mg/dl)
Controle Negativo	36,40 ± 0,55 <sup>a</sup>	0,41 ± 0,02 <sup>a</sup>
Extrato Seco	40,60 ± 1,16 <sup>a</sup>	0,42 ± 0,02 <sup>a</sup>
Flavonoide	43,11 ± 1,46 <sup>a</sup>	0,41 ± 0,03 <sup>a</sup>
Diabético	104,0 ± 8,30 <sup>b</sup>	0,75 ± 0,06 <sup>b</sup>
Diabético Extrato Seco	96,02 ± 5,86 <sup>b</sup>	0,74 ± 0,03 <sup>b</sup>
Diabético Flavonoide	78,16 ± 6,05 <sup>c</sup>	0,76 ± 0,04 <sup>b</sup>

Fonte: Do autor.

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  $p < 0,05$ .

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 da fração enriquecida de flavonoides das folhas de *Passiflora edulis* Sims foi capaz de prevenir o aumento dos níveis séricos de uréia quando comparados com os animais do grupo diabético, sugerindo que a fração de flavonoides apresentou um efeito benéfico sobre a função renal nos animais diabéticos. Estes resultados poderiam ser atribuídos ao melhor controle glicêmico apresentado por estes animais, conforme avaliado através da determinação da glicemia em jejum e da concentração de frutossamina (Tabela 9).

Apesar da uréia ser considerada como um marcador da função renal mais sensível do que a 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.

Portanto, o aumento dos níveis sérios de uréia nos animais diabéticos poderia estar associado não somente a uma redução da filtração glomerular, decorrente de uma possível nefropatia diabética como também poderia ser atribuído a fatores extra-renais decorrentes de alterações metabólicas comumente observadas no diabetes mellitus (BURTIS; ASHWOOD, 1999).

Um efeito protetor dos flavonoides do vinho sobre a nefrotoxicidade induzida pelo Tacrolimus em estudos experimentais com ratos, tem sido relatado por alguns autores. Neste mesmo estudo, os autores associaram o efeito protetor a capacidade antioxidantes dos flavonoides (SILVA et al., 2011). Já Singh et al., (2017) demonstraram em estudos recentes que a mistura dos flavonoides crisina e baicalina apresentou um efeito protetor contra a apoptose induzida por metilglioxal em células do epitélio renal. Segundo os autores, os flavonoideis em estudo foram capazes de atenuar o estresse oxidativo, estabilizar o potencial da membrana mitocondrial e reduzir a apoptose em células tratadas com os flavonoides.

Diversos outros estudos têm utilizado flavonoides tais como a apigenina e a miricetina a antineoplásicos, como tratamento coadjuvante. Nestes estudos os autores demonstraram a nefropatia como um dos grandes limitantes na utilização de antineoplásico. Entretanto, a administração de flavonoides concomitante a utilização de antineoplásicos têm exibido um efeito protetor ao dano renal causado por estes fármacos (SULTANA; VERMA; KHAN, 2012; HASSAN et al., 2017; XU et al., 2015).

Xu et al., (2015) em estudo recente, demonstrou que a administração do flavonoide luteolina em ratos com lesão renal induzida por *D*-galactose, foi capaz de prevenir o aumento nos níveis séricos de creatinina e de uréia. Estes mesmos autores, atribuíram os resultados observados ao efeito antioxidante da luteolina

reduzindo os níveis de malonaldeído e a manutenção de enzimas tais como a SOD, GPx e Catalase.

Dessa forma podemos observar que apesar dos possíveis mecanismos pré-renais envolvidos no aumento dos níveis séricos de uréia, a administração dos flavonoides aos animais diabéticos sugere um possível efeito na prevenção do aparecimento de lesões renais. De acordo com os relatos bibliográficos e os resultados observados das substâncias encontradas na caracterização química das folhas de *P. edulis*, os derivados heterosídeos da luteolina podem ser os grandes responsáveis por prevenir o aumento dos níveis séricos de uréia atenuando os danos renais nos animais diabéticos tratados com a fração de flavonoides.

#### **5.3.4 Perfil Lipídico**

Foi observado um aumento na concentração de colesterol total, de colesterol HDL e de colesterol não HDL no soro dos animais diabéticos quando comparados aos animais não diabéticos (Tabela 11), compatível com as alterações metabólicas observadas no diabetes mellitus.

A dislipidemia observada nos animais diabéticos pode ser atribuída à hiperglicemia apresentada pelos mesmos. A hipercolesterolemia decorrente do DM tipo 2 tem sido associada ao aumento na concentração de lipoproteínas aterogênicas tais como, a lipoproteína de baixa densidade (LDL) e a lipoproteína de densidade muito baixa (VLDL). Entretanto, no DM tipo 1, um aumento na concentração sérica do colesterol HDL, que pode estar associado a concentrações elevadas ou normais das demais lipoproteínas tem sido relatado (KAHRI, et al., 1993). Neste caso, apesar dos níveis aumentados de colesterol HDL, não há redução do risco cardíaco nestes indivíduos, já que alterações no tamanho, na composição e na estrutura das HDL podem estar presentes, comprometendo a sua funcionalidade e interferindo negativamente em suas propriedades antiaterogênicas (SVIRIDOV, D.; et al.2008).

Os animais tratados com a fração enriquecida de flavonoides das folhas de *Passiflora edulis* Sims apresentaram níveis séricos de colesterol total e de colesterol não HDL significativamente menores que o animal não tratado, entretanto, nos animais diabéticos tratados com o extrato bruto foi observada apenas uma redução dos níveis séricos de colesterol não HDL. Por outro lado, nenhuma alteração

significativa foi observada na concentração sérica de colesterol HDL quando os grupos diabético e diabético tratado com a fração enriquecida de flavonoides foram comparados (Tabela 12).

Tabela 12 - Avaliação do perfil lipídico no soro de ratos Wistar

<b>Grupos</b>	<b>Triglicerídeos (mg/dl)</b>	<b>Colesterol Total (mg/dl)</b>
Controle Negativo	55,6 ± 5,70 <sup>a</sup>	58,0 ± 3,17 <sup>a</sup>
Extrato Seco	63,1 ± 6,89 <sup>a</sup>	62,6 ± 4,01 <sup>a</sup>
Flavonoide	58,1 ± 5,89 <sup>a</sup>	60,4 ± 4,27 <sup>a</sup>
Diabético	126,5 ± 14,3 <sup>b</sup>	89,7 ± 6,76 <sup>b</sup>
Diabético Extrato Seco	113,9 ± 14,6 <sup>b</sup>	78,4 ± 5,31 <sup>b</sup>
Diabético Flavonoide	103,3 ± 8,04 <sup>b</sup>	74,2 ± 3,23 <sup>c</sup>

<b>Grupos</b>	<b>Colesterol HDL (mg/dl)</b>	<b>Colesterol não HDL (mg/dl)</b>
Controle Negativo	35,1 ± 1,25 <sup>a</sup>	23,2 ± 2,89 <sup>a</sup>
Extrato Seco	37,4 ± 1,37 <sup>a</sup>	25,3 ± 3,28 <sup>a</sup>
Flavonoide	36,0 ± 2,16 <sup>a</sup>	23,9 ± 3,74 <sup>a</sup>
Diabético	58,9 ± 6,21 <sup>b</sup>	30,8 ± 1,53 <sup>b</sup>
Diabético Extrato Seco	54,2 ± 2,56 <sup>b</sup>	24,2 ± 3,55 <sup>a</sup>
Diabético Flavonoide	55,1 ± 2,20 <sup>b</sup>	18,4 ± 1,87 <sup>a</sup>

Fonte: Do autor.

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  $p < 0,05$ .

Esses resultados sugerem que sua ação poderia estar relacionada à redução da concentração de lipoproteínas aterogênicas no soro destes animais, podendo ser justificados pela melhora no controle glicêmico destes animais, conforme observado anteriormente (Tabela 10).

Por outro lado, estudos recentes vem demonstrando que o tratamento combinado entre as estatinas e fitoterápicos, têm sido capaz de reduzir os níveis de hemoglobina glicada, de triglicerídeos, de colesterol total e de colesterol LDL em pacientes entre 40 e 60 anos portadores de diabetes mellitus tipo 2 (KIANBAKHT; NABATI; ABASI, 2016). Neste mesmo estudo, a quantificação do teor e flavonoides, de polifenóis totais e de quercetina, foram atribuídos como os grandes responsáveis pelos efeitos observados.

Em 2009 Mulvihill et al., (2009) já havia demonstrado que a flavanona Naringenina foi capaz de inibir a síntese de colesterol em culturas de hepatócitos, assim como a síntese de ácidos graxos prevenindo o acúmulo de triglicerídeos em células musculares. Estes autores deixam claro que o uso deste flavonoide é capaz de corrigir diversos distúrbios metabólicos associados a resistência a insulina.

Sendo assim, além da melhora no controle glicêmico destes animais, não podemos descartar a possibilidade de um efeito dos flavonoides nas vias de síntese e metabolização das lipoproteínas nos animais diabéticos tratados com o extrato bruto ou com a fração enriquecida de flavonoides das folhas de *P. edulis*, como vem sendo observado em diversos relatos na literatura (MULVIHILL et al., 2009; ZIDAN et al., 2014; HÜGEL et al., 2016).

### 5.3.5 Ativação Plaquetária

É de conhecimento que o diabetes mellitus é um fator de risco notável para a progressão da aterosclerose. Neste sentido, a ativação plaquetária tem sido proposta como um dos principais mecanismos responsáveis pelo desenvolvimento das complicações cardiovasculares induzidas pelo diabetes mellitus (NEIL, 2003; MOURA, 2010; SALLES, 2014).

No presente estudo, foi monitorada a produção de espécies oxidantes, por quimioluminescência dependente de luminol, na presença e na ausência de PMA. Nossos resultados demonstraram que a produção de espécies oxidantes em plaquetas dos animais do grupo “Diabetes” foi maior quando comparada ao grupo “Controle Negativo (Tabela 13, Gráfico 3 e 4).

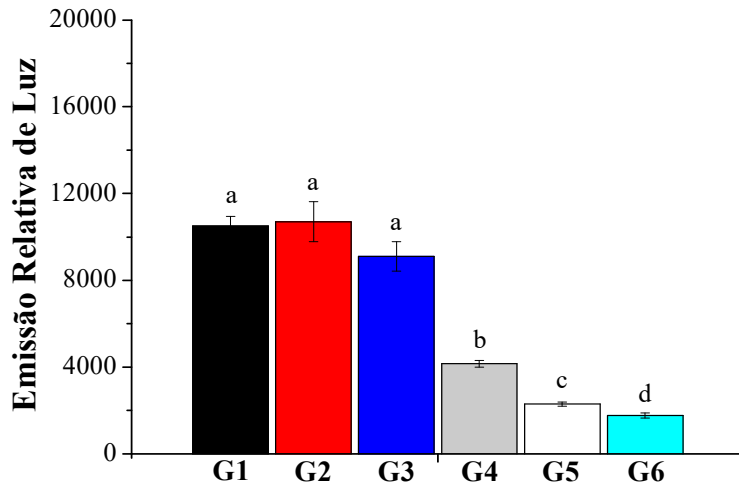
Tabela 13 - Produção de espécies oxidantes por plaquetas de ratos normais e diabéticos tratados e não tratados com o extrato bruto e com a fração de flavonoides de *P. edulis*.

Grupos	Basal <sup>1</sup>	PMA <sup>2</sup>
Controle Negativo	$0,27 \times 10^4 \pm 0,22 \times 10^3$ <sup>a</sup>	$1,05 \times 10^4 \pm 0,45 \times 10^3$ <sup>a</sup>
Extrato Seco	$0,32 \times 10^4 \pm 0,27 \times 10^3$ <sup>a</sup>	$1,07 \times 10^4 \pm 0,92 \times 10^3$ <sup>a</sup>
Flavonoide	$0,26 \times 10^4 \pm 0,13 \times 10^3$ <sup>a</sup>	$0,91 \times 10^4 \pm 0,68 \times 10^3$ <sup>a</sup>
Diabético	$0,80 \times 10^4 \pm 0,01 \times 10^3$ <sup>b</sup>	$1,65 \times 10^4 \pm 1,20 \times 10^3$ <sup>b</sup>
Diabético Extrato Seco	$0,55 \times 10^4 \pm 0,21 \times 10^3$ <sup>c</sup>	$1,01 \times 10^4 \pm 0,54 \times 10^3$ <sup>a</sup>
Diabético Flavonoide	$0,39 \times 10^4 \pm 0,19 \times 10^3$ <sup>d</sup>	$0,86 \times 10^4 \pm 1,13 \times 10^3$ <sup>a</sup>

Fonte: Do autor.

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.

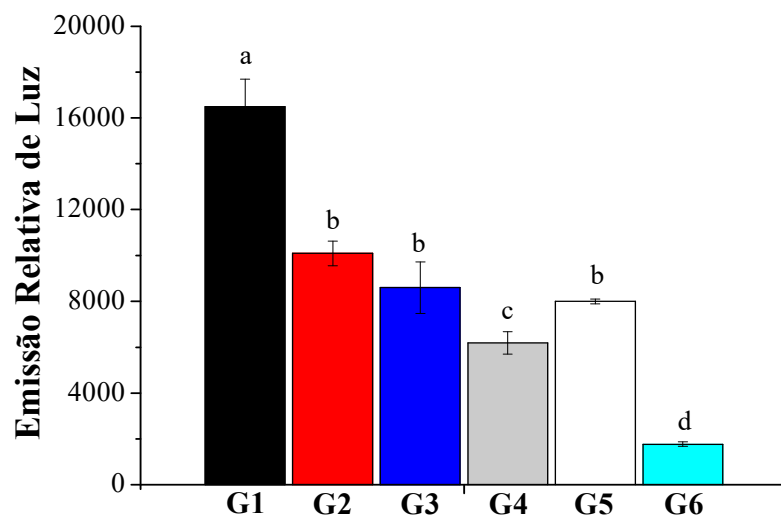
Gráfico 3 - Efeito do extrato bruto e da fração de flavonoides de *P. edulis* sobre a cinética de emissão de luz em sistemas contendo plaquetas de ratos não diabéticos.



Fonte: Do autor.

Legenda: Grupo 1 – Controle Negativo, Grupo 2 - Controle Extrato, Grupo 3 – Controle Flavonoide, Grupo 4 – Reação Com Superóxido Dismutase, Grupo 5 – Reação Sem PMA, Grupo 6 – Reação Sem Luminol. 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  $p < 0,05$ .

Gráfico 4 - Efeito do extrato bruto e da fração de flavonoides de *P. edulis* sobre a cinética de emissão de luz em sistemas contendo plaquetas de ratos diabéticos.



Fonte: Do autor.

Legenda: Grupo 1 – Diabético, Grupo 2 - Diabético Extrato, Grupo 3 – Diabético Flavonoide, Grupo 4 – Reação Com Superóxido Dismutase, Grupo 5 – Reação Sem PMA, Grupo 6 – Reação Sem Luminol. 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  $p < 0,05$ .



Sabe-se que as plaquetas por si só produzem espécies oxidantes, no entanto, a maior produção basal (sistemas sem PMA) destas espécies no grupo de animais diabéticos em relação aos animais não diabéticos, demonstra que o metabolismo oxidativo basal das plaquetas se encontra ativado nos animais diabéticos (Tabela 13).

Em plaquetas, estas espécies oxidantes podem ser provindas de fontes tais como NADPH oxidase, ciclooxigenase, eNOS, xantina oxidase e respiração mitocondrial. Entretanto, evidências sugerem que o complexo NADPH oxidase seja a principal fonte de geração de  $O_2^-$ , que ocorre por meio da ativação da proteína quinase C (PKC) (ELISA; PIRES, 2013; MAGWENZI et al., 2015; WANG et al., 2015).

Tem sido demonstrado que a ativação da PKC está relacionada com a presença de lipoproteínas de baixa densidade oxidadas (LDLoxo) (MAGWENZI et al., 2015) e que o descontrole glicêmico pode contribuir para oxidação de tais lipoproteínas, ativando assim, a NADPH oxidase (WAJCHENBERG, 2002; MOURA, 2010). O acúmulo de produtos finais de glicação avançada induzido pela hiperglicemia, pode promover inativação do  $NO$ , ativação de moléculas de adesão (VECAM -1, ICAM -1) e quimocinas como a MCP-1, (quimocina que atrai macrófagos para o interstício vascular), favorecendo a migração de monócitos e linfócitos T em áreas suscetíveis da íntima arterial onde aconteceria a oxidação de LDL (PLUMB, et al, 2005; AMARANTE et al., 2007).

Como observado em nossos resultados a administração do extrato bruto e da fração de flavonoides, foi capaz de melhorar o perfil lipídico dos animais diabéticos tratados reduzindo principalmente o colesterol não HDL (Tabela 11). A redução do colesterol não HDL, representa a redução das lipoproteínas aterogênicas tais como VLDL e LDL colesterol. Sendo assim a melhora no perfil lipídico pode contribuir para na prevenção da ativação da PKC via LDLoxo, uma vez em que a disponibilidade de LDL encontra-se reduzida (MAGWENZI et al., 2015).

A ativação da NADPH oxidase leva ao aumento da produção de ânion superóxido. Entretanto, este pode ser dismutado a peróxido de hidrogênio e na presença de metais de transição pode levar a formação do radical hidroxila. Além disso, nestes sistemas, pode ocorrer também a formação de radical hidroxila ou de oxigênio singlete. Embora a técnica de quimioluminescência utilizada neste estudo não seja capaz de diferenciar os efeitos de cada uma das espécies oxidantes que

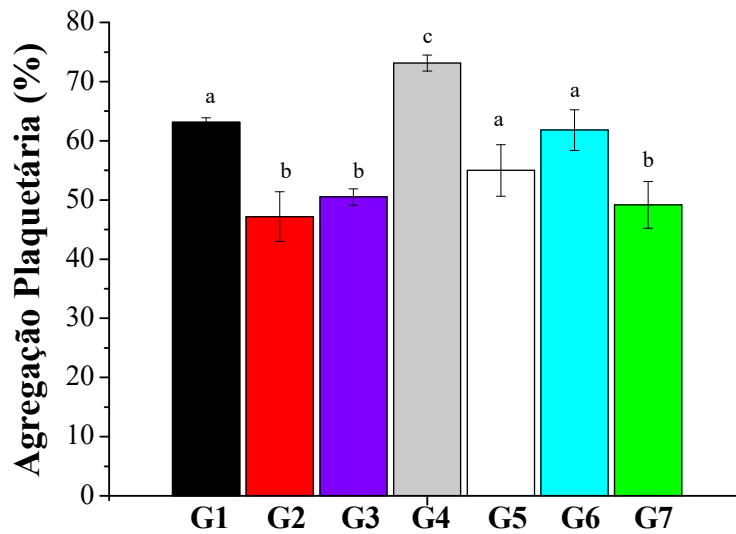
reagem com o luminol, a adição da enzima superóxido dismutase (SOD) ao sistema de reação levou à inibição da produção basal de espécies oxidantes em plaquetas de animais diabéticos (Gráfico 9), sugerindo que o ânion superóxido possa ser o principal responsável pela luminescência observada nestes sistemas. Sendo assim, nossos resultados corroboram com dados da literatura que têm demonstrado o aumento da produção de ânions superóxido induzido pelo estado diabético em diferentes tipos celulares, inclusive em plaquetas (ESSEX, 2009; LOPES-PIRES, 2013; SALLES, 2014; MAGWENZI et al., 2015).

Assim, é bem possível que o aumento da produção de espécies oxidantes observado neste estudo esteja associado à estimulação da NADPH oxidase, devido à alterações na atividade e ou na expressão das subunidades do complexo enzimático NADPH oxidase, uma vez que este complexo é o principal gerador de ânion superóxido em plaquetas (MAGWENZI et al., 2015).

Tem sido relatado que quando as plaquetas são expostas a grandes quantidades de espécies oxidantes, estas podem ter efeitos tanto pró-agregante quanto anti-agregante (MAGWENZI et al., 2015; WANG et al., 2015). Neste estudo a agregação plaquetária induzida por ADP foi avaliada nos diferentes grupos de animais, sendo observado que a agregação plaquetária foi significativamente maior nos animais do grupo “Diabetes” em relação aos animais do grupo “Controle Negativo” (Gráfico 3).

O aumento na agregação plaquetária em decorrência do diabetes mellitus tem sido observado em diferentes estudos. 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 (AMARANTE et al., 2007; HORIZONTE, 2008; MOURA, 2010). Além disso, tem sido demonstrado que a SOD, pode inibir a agregação plaquetária indiretamente, ao diminuir a disponibilidade de ânion superóxido, promovendo o aumento de NO plaquetário e assim a inibição da agregação destas células (WATT et al., 2012; WANG et al., 2015).

Gráfico 5 - Agregação Plaquetária em ratos Wistar



Fonte: Do autor.

Legenda: Grupo 1 – Controle Negativo, Grupo 2 - Controle Extrato, Grupo 3 – Controle Flavonoide, Grupo 4 – Diabético, Grupo 5 – Diabético Extrato, Grupo 6 – Diabético Flavonoide, Grupo 7 – Diabético Clopidogrel. Os resultados representam a média  $\pm$  desvio padrão de 8-10 determinações por tratamento. Foi determinado a ANOVA, as letras indicam que houve diferença estatística do teste Tukey-Kramer de múltiplas comparações, tendo como significância  $p < 0,05$ .

Assim, o aumento da agregação plaquetária observado nos animais diabéticos poderia ser atribuído à maior produção de espécies oxidantes induzidas pelo estado diabético. Neste contexto, o controle glicêmico e a presença de antioxidantes são importantes fatores que poderiam contribuir para a modulação da ativação plaquetária induzida pelo diabetes mellitus.

A administração do extrato bruto assim como da fração de flavonoides foi capaz de inibir a produção de espécies oxidantes e de reduzir a agregação plaquetária nos animais diabéticos (Gráficos 3, 4 e 5, tabela 13). Estes resultados poderiam ser atribuídos à presença de diversos flavonoides presentes no extrato bruto e na fração de flavonoides, tais como: os derivados C- e O- heterosídeos da apigenina e luteolina, além de outros compostos que ainda não foram caracterizados neste estudo.

Os flavonoides são considerados como antioxidantes efetivos devido as suas propriedades seqüestrantes de radicais livres e por quelar íons metálicos, protegendo assim os tecidos dos radicais livres e da peroxidação lipídica. Esta

propriedade é direcionada principalmente sobre o radical hidroxil ( $\text{OH}^\cdot$ ) e o ânion superóxido ( $\text{O}_2^\cdot^-$ ), que são espécies altamente reativas, envolvidas na iniciação da peroxidação lipídica (KANDASWAMI; MIDDLETON, 1994). Além disso, vale lembrar que de acordo com Khangholi et al., (2015), estes flavonoides apresentam estrutura química favorável à atividade antiglicante. Assim, estas propriedades podem influenciar não somente a ativação da NADPH oxidase, via PKC, como também de enzimas como lipoxigenase, cicloxigenase e ou fosfolipase  $A_2$ , que por sua vez estão diretamente envolvidas nas vias que levam à agregação plaquetária (BEHLING et al., 2004).

Portanto, os resultados obtidos sugerem que os flavonoides presentes no extrato e na fração de flavonoides (Fr-BuOH) podem ser os principais responsáveis pela melhora no controle glicêmico bem como na redução da glicação protéica e da ativação plaquetária observada nos animais dos grupos “Diabéticos Extrato e Diabéticos Flavonoide”, analisados neste estudo.

Estes resultados são de grande interesse para a área da saúde, pois poderão fornecer informações importantes não somente para o uso racional do extrato bruto de *P. edulis* visando a prevenção ou o tratamento das complicações vasculares induzidas pelo diabetes mellitus como também para a elucidação do seu mecanismo de ação.

## 6. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos podemos concluir que:

- a) Dos fitoconstituintes presentes na espécie estudada, houve uma prevalência em metabólitos da classe dos flavonoides tanto para amostra EtOH 70% quanto para a amostra Fr-BuOH. O método de caracterização por detector de arranjo de diodos (PDA) utilizado neste estudo, foi eficiente ao identificar 6 picos cromatográficos com um perfil de absorção no UV característico ao de flavonoides dos 12 picos identificados.
- b) Os resultados das análises por HPLC-ESI-IT-MS<sup>n</sup> e FIA-ESI-IT-MS<sup>n</sup> sugeriram a presença de flavonoides em que a maioria é C-heterosídeos onde a unidade sacarídica está diretamente ligada ao núcleo do flavonoide por uma ligação ácido resistente C-C.
- c) A amostra Fr-BuOH mostrou ser mais rica em flavonoides quando comparada com a amostra EtOH 70% e com a amostra Fr-EtOAc.
- d) A indução do diabetes mellitus com aloxano, levou ao aumento da glicemia bem como dos níveis de frutossamina e de hemoglobina glicada, com apresentação de sinais clássicos do diabetes polidipsia, polifagia e perda de peso. Além disso, os animais apresentaram uma dislipidemia secundária ao diabetes com aumento nos níveis de colesterol total, de triglicérides, de colesterol HDL e de colesterol não HDL. Em paralelo, houve alteração na função renal com aumento dos níveis séricos de creatinina e uréia.
- e) Os nossos resultados confirmam que os metabólitos presentes nas folhas da espécie *P. edulis* apresentam um efeito benéfico no diabetes mellitus, evidenciado pela melhora no controle glicêmico, com consequente redução dos sintomas do diabetes (poliúria e polifagia), redução do dano renal e prevenção do risco cardiovascular com redução do colesterol total, colesterol não HDL e agregação plaquetária, abrindo perspectivas para o seu possível uso no tratamento complementar do diabetes mellitus..

## REFERÊNCIAS

- AARON, et al. Platelet Dysfunction in type 2 Diabetes. **Diabetes Care**. v. 24, n. 8, p. 1476-1485, Aug. 2001.
- ALMEIDA, E. R. **Plantas medicinais brasileiras**: conhecimentos populares e científico. 6. ed. São Paulo, SP, Brasil: Hemus, 1993. 341p.
- AMARANTE, R. D. M. et al. Diabetes Mellitus como fator de risco na aterogênese: Diabetes Mellitus as a risk factor in vascular diseases. **Arq. Med Hosp Fac Med Santa Casa São Paulo**, v. 52, n. 3, p. 87–93, 2007.
- ARGENTIERI, M. P. et al. Phytochemical analysis of *P assiflora loefgrenii* Vitta, a rich source of luteolin-derived flavonoids with antioxidant properties. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 67, n. 11, p. 1603–1612, 2015.
- BARBOSA, J. H. P.; OLIVEIRA, S. L.; SEARA, L. T. E. O papel dos produtos finais da glicação avançada (AGEs) no desencadeamento das complicações vasculares do diabetes. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 52, n. 6, p. 940–950, 2008.
- BEHLING, E. B. et al. Flavonóide Quercetina : Aspectos Gerais E. **Alimentos e Nutrição - Brazilian Journal of Food and Nutrition**, v. 15, n. 3, p. 285–292, 2004.
- BEUREL, E.; GRIECO, S. F.; JOPE, R. S. Glycogen synthase kinase-3 (GSK3): Regulation, actions, and diseases. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 148, p. 114–131, 2015.
- BROOS, K. et al. Platelets at work in primary hemostasis. **Blood Reviews**, v. 25, n. 4, p. 155–167, 2011.
- BROOS, K. et al. Blood platelet biochemistry. **Thrombosis Research**, v. 129, n. 3, p. 245–249, 2012.
- CAMERON, F. Teenagers with diabetes--management challenges. **Australian family physician.**, v. 35, n. 6, p. 386–390, 2006.
- CAMPOREZ, J. P. G.; ALMEIDA, F. N.; MARÇAL, A. C. Efeitos do exercício físico sobre a via de sinalização da insulina. **Revista Mackenzie de Educação Física e Esporte**, v. 12, n. 2, p. 172–186, 2013.
- CARAMORI, P. R. A. et al. Inibição do Receptor Plaquetário Glicoproteína ( GP ) IIb / IIIa em Síndromes Isquêmicas Agudas e Intervenções Coronárias. v. 71, n. nº 5, p. 725–734, 1998.
- CARVALHEIRA, J. B. C.; ZECCHIN, H. G.; SAAD, M. J. A. Vias de Sinalização da Insulina. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 46, n. 4, p. 419–425, 2002.
- CARVALHO, A. A. Estudo Do Potencial Antimetastático Da Biflorina. p. 70, 2011.
- CASTRO, H. C. et al. Plaquetas: ainda um alvo terapêutico. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 42, n. 5, p. 321–332, 2006.
- CAZARIN, C. B. B. et al. Capacidade antioxidante e composição química da casca de maracujá (*Passiflora edulis*). **Ciência Rural**, v. 44, n. 9, p. 1699–1704, 2014.
- CAZAROLLI, L. H.

CEPA. Boletim Agropecuário. **Centro de Socioeconomia e Planejamento Agrícola**, n. 29, p. 12–13, 2015.

CHILLELLI, N. C.; BURLINA, S.; LAPOLLA, A. AGEs, rather than hyperglycemia, are responsible for microvascular complications in diabetes: A “glycooxidation-centric” point of view. **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases**, v. 23, n. 10, p. 913–919, 2013.

COLOMBO, R.; YARIWAKE, J. H.; MCCULLAGH, M. Study of C- and O-glycosylflavones in sugarcane extracts using liquid chromatography - Exact mass measurement mass spectrometry. **Journal Brazilian Chemical Society**, v. 19, n. 3, p. 483–490, 2008.

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, 2014.

CUYCKENS, F.; CLAEYS, M. Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 39, n. 1, p. 1–15, 2004.

CZECH, M. P. Molecular Basis of Insulin Action. **Annual Reviews of Biochemistry**, v. 46, p. 359–84, 1977.

DA SILVA, L. L.; D'AMICO, E. A. Comparative study of platelet aggregation by turbidometric and impedance methods in patients under acetylsalicylic acid antiplatelet therapy. **Rev Bras Hematol Hemoter**, v. 32(6), p. 463–468, 2010.

DEGÁSPARI, C. H.; WASZCZYNSKYJ, N. Propriedades Antioxidantes De Compostos Fenólicos. **Visão Acadêmica, Curitiba**, v. 5, n. 1, p. 33–40, 2004.

EL-SAYED, M. I. K. Effects of *Portulaca oleracea* L. seeds in treatment of type-2 diabetes mellitus patients as adjunctive and alternative therapy. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 137, n. 1, p. 643–651, 2011.

FEITOSA, A. C. R.; ANDRADE, F. S. Avaliação da frutossamina como parâmetro de controle glicêmico na gestante diabética. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 58, n. 7, p. 724–730, 2014.

FIRMO, W. D. C. A. et al. Contexto histórico, uso popular e concepção científica sobre plantas medicinais. **Cad. Pesq.**, v. 18, n. n. especial, p. 90–95, 2011.

GARY R, B. Overview of Dietary Flavonoids: Nomenclature, Occurrence and Intake. **The Journal of nutrition**, v. 133, n. 10, p. 3244S–3246S, 2003.

GELONEZE, B.; LAMOUNIER, R. N.; COELHO, O. R. Postprandial hyperglycemia: Treating its atherogenic potential. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 87, n. 5, p. 604–670, 2006.

GIEHL, M. R. et al. Eficácia dos flavonóides da uva, vinho tinto e suco de uva tinto na prevenção e no tratamento secundário da aterosclerose. **Scientia Medica**, v. 17, n. 3, p. 145–155, 2007.

GOALSTONE, M. L.; DRAZNIN, B. Conferences and Reviews Insulin Signaling Insulin Signaling. **Conferences and Reviews**, v. 167, n. 3, p. 166–173, 1997.

GOMES, M. E. W. et al. Antagonistas do receptor plaquetário GPIIb/IIIa. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 46, n. 3, p. 255–264, 2000.

GROSS, J. L. et al. Diabetes Melito: Diagnóstico, Classificação e Avaliação do Controle Glicêmico. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabologia**, v. 46, n. 1, p. 16–26, 2002.

GROSS, J. L.; FERREIRA, S. R. G.; OLIVEIRA, J. E. Glicemia pós-prandial. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 47, n. 6, p. 728–738, 2003.

GUARIGUATA, L. et al. Global estimates of diabetes prevalence for 2013 and projections for 2035. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 103, n. 2, p. 137–149, 2014.

HABER, E. P. et al. Secreção da insulina e efeito autócrino da insulina e modulação por ácidos graxos **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 45, n. 3, p. 219–227, 2001.

HASSAN, S. M. et al. Protective effects of apigenin and myricetin against cisplatin-induced nephrotoxicity in mice. **Pharmaceutical Biology**, v. 55, n. 1, p. 766–774, 2017.

HESS, N. C. L. et al. Clinically meaningful blood pressure reductions with low intensity isometric handgrip exercise. A randomized trial. **Physiological Research**, v. 65, n. 3, p. 461–468, 2016.

HÜGEL, H. M. et al. Polyphenol protection and treatment of hypertension. **Phytomedicine**, v. 23, n. 2, p. 220–231, 2016.

JAOUHARI, J. T.; LAZREK, H. B.; JANA, M. The hypoglycemic activity of *Zygophyllum gaetulum* extracts in alloxan-induced hyperglycemic rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 69, n. 1, p. 17–20, 2000.

KESHARI, A. K. et al. Isolated flavonoids from *Ficus racemosa* stem bark possess antidiabetic, hypolipidemic and protective effects in albino Wistar rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 181, p. 252–262, 2016.

KHANGHOLI, S. et al. The Mechanisms of Inhibition of Advanced Glycation End Products Formation through Polyphenols in Hyperglycemic Condition. **Planta Medica**, v. 82, n. 1–2, p. 32–45, 2015.

KIANBAKHT, S.; NABATI, F.; ABASI, B. *Salvia officinalis* (Sage) Leaf Extract as Add-on to Statin Therapy in Hypercholesterolemic Type 2 Diabetic Patients: a Randomized Clinical Trial. *n. Cvd*, p. 1–8, 2016.

KONG, K. et al. How insulin engages its primary binding site on the insulin receptor. **Nature**, v. 493, n. 7431, p. 241–245, 2013.

LA FID. Atlas de Diabetes. **Artículo de la FID**, p. 160, 2013.

LEITE, C. A. V. G.; CALLADO, R. B.; RIBEIRO, R. A. Receptores tirosina-quinase : implicações terapêuticas no câncer. **revista Brasileira de Oncologia Clínica**, v. 8, n. 29, p. 130–142, 2012.

LEMMON, M. A.; SCHLESSINGER, J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. **Cell**, v. 141, n. 7, p. 1117–1134, 2010.

LI, H. et al. Comparative studies on anxiolytic activities and flavonoid compositions of



*Passiflora edulis* “edulis” and *Passiflora edulis* “flavicarpa”. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 133, n. 3, p. 1085–1090, 2011.

LIMA-SILVA, A. E. et al. Metabolismo do glicogênio muscular durante o exercício físico: Mecanismos de regulação. **Revista de Nutricao**, v. 20, n. 4, p. 417–429, 2007.

LIMA, J. J. F. As Plantas na História da Dor. **Revista Sociedade Portuguesa Anestesiologia**, v. 22, p. 126–133, 2013.

LOPES-PIRES, M. E. Estudo das vias de sinalização envolvidas na ativação da NADPH oxidase e na inibição da agregação plaquetária na sepse experimental. p. 97, 2013.

MACHADO, U. F.; SCHAAN, B. D.; SERAPHIM, P. M. Transportadores de glicose na síndrome metabólica. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 50, n. 2, p. 177–189, 2006.

MAGWENZI, S. et al. Oxidized LDL activates blood platelets through CD36 / NOX2 – mediated inhibition of the cGMP / protein kinase G signaling cascade. **Platelets and Thrombopoiesis**, v. 125, n. 17, p. 2693–2704, 2015.

MALHEIROS, S. V. Regulação do metabolismo celular - um resumo. **Revista Brasileira de Ensino de Bioquímica e Biologia Molecular**, n. 1, p. 1–7, 2006.

MALTA, D. C.; SILVA JR, J. B. DA. O Plano de Ações Estratégicas para o Enfrentamento das Doenças Crônicas Não Transmissíveis no Brasil e a definição das metas globais para o enfrentamento dessas doenças até 2025: uma revisão. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 22, n. 1, p. 151–164, 2013.

MCCULLOUGH, M.; PETERSON, J. Flavonoid intake and cardiovascular disease mortality in a prospective cohort of US adults. **The American Journal of Clinical Nutrition**, p. 454–464, 2012.

MIRA, N. V. M. DE et al. Extração, análise e distribuição dos ácidos fenólicos em genótipos pigmentados e não pigmentados de arroz (*Oryza sativa* L.). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n. 4, p. 994–1002, 2008.

MIRODDI, M. et al. *Passiflora incarnata* L.: Ethnopharmacology, clinical application, safety and evaluation of clinical trials. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 150, n. 3, p. 791–804, 2013.

MORANO, S. C. et al. PLANILHA DE VALIDAÇÃO: UMA NOVA FERRAMENTA PARA ESTIMAR FIGURAS DE MÉRITO NA VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS UNIVARIADOS Fabiana Alves de Lima Ribeiro e Márcia Miguel Castro Ferreira\*. **Quim.Nova**, v. 31, n. 1, p. 164–171, 2008.

MOURA, J. M. DOS S. P. DE. Oxidação das Lipoproteínas Humanas de Baixa Densidade , Inflamação e Aterosclerose. p. 544, 2010.

MULVIHILL, E. E. et al. Naringenin Prevents Dyslipidemia, Apolipoprotein B Overproduction, and Hyperinsulinemia in LDL Receptor–Null Mice With Diet-Induced Insulin Resistance. **Diabetes Journal**, v. 58, n. October, p. 2198, 2009.

NADEEM, R. I.; AHMED, H. I.; EL-DENSHARY, E. E. D. S. Effect of Imipramine, Paroxetine, and Lithium Carbonate on Neurobehavioral Changes of Streptozotocin in

Rats: Impact on Glycogen Synthase Kinase-3 and Blood Glucose Level. **Neurochemical Research**, v. 40, n. 9, p. 1810–1818, 2015.

NEIL, A. Diabetes and cardiovascular disease. **Diabetes, Obesity and Metabolism**, v. 5, n. SUPPL. 1, p. S11–S18, 2016.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. **Journal of Natural Products**, v. 79, n. 3, p. 629–661, 2016.

PAGEL, O. et al. Taking the stock of granule cargo: Platelet releasate proteomics. **Platelets**, v. 0, n. 0, p. 1–10, 2016.

PIZZIOLO, V. R. et al. Plantas com possível atividade hipolipídica: Uma revisão bibliográfica de livros editados no Brasil entre 1998 e 2008. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 13, n. 1, p. 98–109, 2011.

PORTO BARBOSA, J. H.; DE OLIVEIRA, S. L.; SEARA, L. T. Produtos da glicação avançada dietéticos e as complicações crônicas do diabetes. **Revista de Nutricao**, v. 22, n. 1, p. 113–124, 2009.

RAMACHANDRAN, V.; SARAVANAN, R. Glucose uptake through translocation and activation of GLUT4 in PI3K/Akt signaling pathway by asiatic acid in diabetic rats. **Human & Experimental Toxicology**, v. 34, n. 9, p. 884–893, 2015.

RAMALINGAM, L.; OH, E.; THURMOND, D. C. NOVEL ROLES FOR INSULIN RECEPTOR (IR) IN ADIPOCYTES AND SKELETAL MUSCLE CELLS VIA NEW AND UNEXPECTED SUBSTRATES. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 70, n. 16, p. 2815–2834, 2014.

RANDRIAMBOAVONJY, V.; FLEMING, I. Platelet function and signaling in diabetes mellitus. **Current vascular pharmacology**, v. 10, n. 5, p. 532–538, 2012.

REGENSTEINER, J. G. et al. Sex Differences in the Cardiovascular Consequences of Diabetes Mellitus. **Circulation**, v. 132, n. 25, p. 2424–2447, 2015.

REIS, J. S. et al. Oxidative stress: a review on metabolic signaling in type 1 diabetes. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v. 52, n. 7, p. 1096–105, 2008.

REVILLA, M. C. et al. Hypoglycemic effect of Equisetum myriochaetum aerial parts on type 2 diabetic patients. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 81, n. 1, p. 117–120, 2002.

RIBANI, M. et al. VALIDAÇÃO EM MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS E ELETROFORÉTICOS. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771–780, 2004.

RIBEIRO, A.; IC, S.; SHAYNAN, É. Da Medicina De Hipócrates Ao Início Da Química De Boyle : Um Olhar Da Filosofia E História Da Química. 2012.

RÍOS, J. L.; FRANCINI, F.; SCHINELLA, G. R. Natural Products for the Treatment of Type 2 Diabetes Mellitus. **Planta Medica**, v. 81, n. 12–13, p. 975–994, 2015.

ROACH, P. J. et al. Glycogen and its metabolism: some new developments and old themes. **Biochemical Journal**, v. 441, n. 3, p. 763–787, 2012.

ROSA, C. P. ESTUDO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DE *Annona crassiflora* Mart. (ANNONACEAE). 2015.

RUDNICKI, M. et al. Antioxidant and antiglycation properties of *Passiflora alata* and

- Passiflora edulis extracts. **Food Chemistry**, v. 100, n. 2, p. 719–724, 2007.
- SAKALEM, M. E.; NEGRI, G.; TABACH, R. Chemical composition of hydroethanolic extracts from five species of the Passiflora genus. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 22, n. 6, p. 1219–1232, 2012.
- SALLES, B. C. C. **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**. 2014.
- SENO, T. et al. Involvement of NADH/NADPH oxidase in human platelet ROS production. **Thrombosis Research**, v. 103, n. 5, p. 399–409, 2001.
- SIES, H. Oxidative stress: A concept in redox biology and medicine. **Redox Biology**, v. 4, p. 180–183, 2015.
- SILVA, W. T. et al. Efeito renoprotetor dos flavonoides do vinho na nefrotoxicidade do imunossupressor Tacrolimus. **ACTA Paulista de Enfermagem**, v. 24, n. 3, p. 388–392, 2011.
- SIMIRGIOTIS, M. J. et al. The Passiflora tripartita (banana passion) fruit: A source of bioactive flavonoid C-glycosides isolated by HSCCC and characterized by HPLC-DAD-ESI/MS/MS. **Molecules**, v. 18, n. 2, p. 1672–1692, 2013.
- SINGH, J.; CHAUDHARI, B. P.; KAKKAR, P. Baicalin and chrysin mixture imparts cyto-protection against methylglyoxal induced cytotoxicity and diabetic tubular injury by modulating RAGE, oxidative stress and inflammation. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 50, n. 80, p. 67–75, 2017.
- SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. **Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes**. 2015.
- SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. **Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes**. São Paulo: Ac Farmacêutica, 2015b.
- SOUZA, T. M. et al. Avaliação da atividade fotoprotetora de Achillea millefolium L. (Asteraceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 1, p. 36–38, 2005.
- STEPHENS, L. et al. Protein kinase B kinases that mediate phosphatidylinositol 3,4,5- trisphosphate-dependent activation of protein kinase B. **Science**, v. 279, n. 5351, p. 710–714, 1998.
- SULTANA, S.; VERMA, K.; KHAN, R. Nephroprotective efficacy of chrysin against cisplatin-induced toxicity via attenuation of oxidative stress. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 64, n. 6, p. 872–881, 2012.
- TSCHIEDEL, B. Complicações crônicas do diabetes. **J. bras. med**, v. 102, n. 5, p. 7–12, 2014.
- VESSAL, M.; HEMMATI, M.; VASEI, M. Antidiabetic effects of quercetin in streptozocin-induced diabetic rats. **Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology**, v. 135, n. 3, p. 357–364, 2003.
- VIANA, M. R.; RODRIGUEZ, T. T. Complicações cardiovasculares e renais no diabetes mellitus. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 10, n. 3, p. 290–296, 2011.

VINAYAGAM, R.; XU, B. Antidiabetic properties of dietary flavonoids: a cellular mechanism review. **Nutrition & Metabolism**, v. 12, n. 1, p. 1–20, 2015.

WAJCHENBERG, B. L. Disfunção Endotelial no Diabetes do Tipo 2. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 46, n. 5, p. 514–519, 2002.

WANG, S. BIN et al. Kaempferol suppresses collagen-induced platelet activation by inhibiting NADPH oxidase and protecting SHP-2 from oxidative inactivation. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 83, p. 41–53, 2015.

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, 2012.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global Report on Diabetes. **Isbn**, v. 978, p. 88, 2016.

WU, F.; JIN, Z.; JIN, J. Hypoglycemic effects of glabridin, a polyphenolic flavonoid from licorice, in an animal model of diabetes mellitus. **Molecular Medicine Reports**, v. 7, n. 4, p. 1278–1282, 2013.

XAVIER, H. T. et al. V DIRETRIZ BRASILEIRA DE DA ATEROSCLEROSE V D iretriz B rasileira de D islipidemias e P revenção. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 101, n. 4, supl.1, p. 1–20, 2013.

XU, Y. et al. Luteolin attenuate the galactose-induced renal damage by attenuation of oxidative stress and inflammation. **Natural Product Research**, v. 29, n. 11, p. 1078–1082, 2015.

YADAV, S.; STORRIE, B. The cellular basis of platelet secretion: Emerging structure/function relationships. **Platelets**, v. 0, n. 0, p. 1–11, 2016.

ZIDAN, Y. et al. Portulaca oleracea reduces triglyceridemia, cholesterolemia, and improves lecithin: Cholesterol acyltransferase activity in rats fed enriched-cholesterol diet. **Phytomedicine**, v. 21, n. 12, p. 1504–1508, 2014.

ZUCOLOTTO, S. M. et al. Bioassay-guided isolation of anti-inflammatory C-glycosylflavones from passiflora edulis. **Planta Medica**, v. 75, n. 11, p. 1221–1226, 2009.