



TALITA CRISTINA COLOMEU

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E DOS
EFEITOS DO CONSUMO CRÔNICO DO EXTRATO
AQUOSO DE *PASSIFLORA ALATA* NA EXPRESSÃO DO
DIABETES MELITUS TIPO 1 EM CAMUNDONGOS NOD
(NON OBESE DIABETIC)**

CAMPINAS

2013



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

TALITA CRISTINA COLOMEU

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E DOS EFEITOS DO
CONSUMO CRÔNICO DO EXTRATO AQUOSO DE *PASSIFLORA
ALATA* NA EXPRESSÃO DO DIABETES MELITUS TIPO 1 EM
CAMUNDONGOS NOD (NON OBESE DIABETIC)**

Orientador: Prof. Dr. Ricardo de Lima Zollner

Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP para obtenção de título de Mestra em Ciências na área de concentração Clínica Médica.

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO
FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA POR
TALITA CRISTINA COLOMEU, E ORIENTADA PELO
PROF. DR. RICARDO DE LIMA ZOLLNER.



Assinatura do Orientador

CAMPINAS

2013

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

C717a Colomeu, Talita Cristina, Ano Nascimento-
Avaliação da atividade antioxidante e dos efeitos do
consumo crônico do extrato aquoso de *Passiflora alata*
Curtis na expressão do *diabetes mellitus* tipo 1 em
camundongos NOD (non obese diabetic) / Talita Cristina
Colomeu. -- Campinas, SP : [s.n.], 2013.

Orientador : Ricardo de Lima Zollner.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. *Passiflora alata* Curtis. 2. *Diabetes mellitus* tipo 1.
3. Camundongos endogâmicos NOD. I. Zollner, Ricardo
de Lima, 1954-. II. Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Evaluation of antioxidant activity and the effects of chronic consumption of aqueous *Passiflora alata* Curti extract in the expression of type 1 diabetes in NOD (non obese diabetic)

Palavras-chave em inglês:

Passiflora alata Curtis

Type 1 *Diabetes mellitus*

Mice, Inbred NOD

Área de concentração: Clínica Médica

Titulação: Mestra em Ciências

Banca examinadora:

Ricardo de Lima Zollner [Orientador]

Laura Maria Molina Meletti

Luís Gustavo Romani Fernandes

Data da defesa: 23-08-2013

Programa de Pós-Graduação: Clínica Médica

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE MESTRADO

TALITA CRISTINA COLOMEU

Orientador (a) PROF(A). DR(A). RICARDO DE LIMA ZOLLNER

MEMBROS:

1. PROF(A). DR(A). RICARDO DE LIMA ZOLLNER



2. PROF(A). DR(A). LUÍS GUSTAVO ROMANI FERNANDES



3. PROF(A). DR(A). LAURA MARIA MOLINA MELETTI



Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas

Data: 23 de agosto de 2013

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Edilene e Marcos, pelo amor e dedicação durante toda minha vida.

Aos meus familiares pelo apoio e incentivo durante toda minha jornada de estudos.

Ao Prof. Dr. Ricardo de Lima Zollner pelos valiosos ensinamentos, orientação e confiança em meu trabalho.

A Margarida pela amizade, companheirismo e auxílio em todos os momentos.

A Cinthia pela ajuda, auxílio e amizade durante todo esse trabalho.

A Daniella, Natalia e Nayara pela ajuda, disponibilidade para qualquer situação e principalmente pela amizade.

Ao Prof Dr. Felix Reys Reys pela disponibilidade do laboratório e do aparelho de cromatografia gasosa e espectrometria de massa.

A FAPESP pela concessão de verba para o projeto de pesquisa número 2011/06559-4.

A CAPES pela concessão da bolsa de estudo.

SUMÁRIO

RESUMO	xvii
ABSTRACT	Xix
1-INTRODUÇÃO	21
1.1 <i>Diabetes mellitus</i>	22
1.2 Camundongos NOD (non obese diabetic)	24
1.3 O diabetes e o processo de oxidação	26
1.4 Radicais Livres e Antioxidantes	31
1.5 <i>Passiflora alata</i> Curtis	36
2-OBJETIVOS	40
3-MATERIAL E MÉTODOS	42
3.1 <i>Passiflora alata</i> Curtis	43
3.2 Extração de compostos fenólicos	44
3.2.1 Extrato Metanol-Acetona	44
3.2.2 Extrato Etanol	44
3.2.3 Extrato Aquoso	45
3.3 Ensaio da Atividade Antioxidante	45
3.3.1 Sequestro do radical DPPH	45
3.3.2 Capacidade de redução do metal-FRAP	45
3.3.3 Captura do radical livre- ABTS	45
3.3.4 Captura do radical peroxila- ORAC	47
3.4 Fenóis Totais	47
3.5 Determinação da composição centesimal da folha de maracujá-doce (<i>Passiflora alata</i>)	48

3.6 Fibra Bruta	50
3.7 Análise Cromatográfica (HPLC-DAD)	51
3.8 Análise por espectrometria de massas (MS/MS)	52
3.9 Animais	53
3.10 Grupos Experimentais	53
3.11 Controle Biológico do extrato aquoso de <i>Passiflora alata</i>	54
3.12 Diagnósticos do diabetes e sacrifício dos animais	54
3.13 Avaliação histológica do pâncreas	55
3.14 Coloração HE (Hematoxilina e Eosina)	57
3.15 Imunofluorescência	57
3.16 Análise de insulina sérica	58
3.17 Análise de proteínas por Hartree	59
3.18 Análise de GSH- Glutathiona Reduzida	59
3.19 Túnel para análise de células em apoptose	60
3.20 Estresse Oxidativo	60
3.21 Análise Estatística	60
3.22 Formatação do texto	61
4-RESULTADOS	62
4.1 Atividade antioxidante pelas técnicas DPPH,FRAP,ABTS e ORAC nos extratos aquoso,etanol e ,etanol-acetona	63
4.2 Fénois totais dos extratos aquoso, etanol e metanol-acetona	63
4.3 Identificação da composição centesimal e fibras das folhas de <i>Passiflora alata</i>	67
4.4 Indetificação dos compostos vitexina, isovitexina e isoorientina por HPLC-DAD; MS/MS	67

4.5 Controle biológico do extrato aquoso	73
4.6 Consumo do extrato aquoso de <i>P.alata</i>	73
4.7 Efeito do tratamento com extrato aquoso de <i>P.alata</i> sobre a manifestação do diabetes autoimune espontâneo	73
	76
4.8 Efeito do tratamento com extrato aquoso de <i>P.alata</i> sobre o processo inflamatório e índice de infiltrado nas ilhotas pancreáticas	79
4.9 Imunofluorescência	83
4.10 Efeitos do extrato aquoso sobre a concentração sérica de insulina-ELISA	83
4.11 Níveis de glutathiona presentes no fígado e rins do camundongos NOD	86
4.12 Identificação de células em apoptose nas ilhotas pancreáticas	
4.13 Estresse Oxidativo nas ilhotas pancreáticas	86
5- DISCUSSÃO	93
6-CONCLUSÃO	102
7-CONSIDERAÇÕES FINAIS	104
8- REFERÊNCIAS	106

LISTA DE ABREVIATURA

APC	Células apresentadoras de antígenos
ADP	Adenosina difosfato
ATP	Adenosina trifosfato
AGE	Produto final de glicação avançada
BSA	Bovin Serum Albumin
CAT	Catalase
CD	Cluster designation
CEMIB	Centro Multidisciplinar de Investigação Biológica
DM	<i>Diabetes mellitus</i>
DM-1	<i>Diabetes mellitus</i> tipo 1
DM-2	<i>Diabetes mellitus</i> tipo 2
ERO	Espécie Reativa de Oxigênio
ERN	Espécie Reativa de Nitrogênio
GAD	Glutamato descarboxilase
GSH	Glutationa reduzida
GSSG	Glutationa Oxidada
HE	Hematoxilina e eosina
IFN-γ	Interferon-gamma
ICA	Inslet cells antibodies
IAA	Anti- Isulin Auto- Antibody

IL	Interleucina
MHC	Complexo de histocompatibilidade principal
NF-KB	Fator Nuclear Kappa B
NGF	Nerve growth factor
NOD	Non Obese Diabetic
NAD	Dinucleótido de nicotinamida e adenina
NADP	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
PBS	Tampão fosfato salina
PK-C	Protein Kinase C
RAGE	Receptor para produto final de glicação avançada
SPF	Specific Pathogen Free
SOD	Superóxido Desmutase
TNF	Fator de Necrose Tumoral
UNICAMP	Universidade Estadual de Campinas

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Via Poliois	30
Figura 2: Aumento da produção de AGEs	30
Figura 3: (A) <i>Folha do Passiflora alata</i> Curtis; (B) <i>Folha do Passiflora alata</i> Curtis seca e moída	43
Figura 4: (A) Porcentagem de sequestro do radical DPPH nos extratos aquoso, etanólico e metanólico/acetônico. Os resultados são expressos em porcentagem de sequestro ($p=0,007$); (B) Análise da atividade antioxidante pelo método FRAP nos extratos aquoso, etanólico e metanólico/acetônico ($p=0,0001$). Os resultados são expressos em expressos em média \pm desvio padrão de $\mu\text{M FeSO}_3/\text{g}$ e as diferentes letras demonstram diferença estatísticas entre os extratos	64
Figura 5: (A) Análise da atividade antioxidante pelo método ABTS nos extratos aquoso, etanólico e metanólico/acetônico ($p=0,0001$). Os resultados são expressos em $\mu\text{M Trolox/ g}$ amostra; (B) Atividade antioxidante pelo método ORAC nos extratos aquoso, etanólico e metanólico/acetônico. Os resultados são expressos em média \pm desvio padrão de $\mu\text{M Trolox/ g}$ amostra e as diferentes letras demonstram diferenças estatísticas entre os extratos	65
Figura 6: Fénois totais nos extratos aquoso, etanolico e metanolico/Acetona com resultados são expressos em média \pm desvio padrão de mg EAG/ g amostra. As diferentes letras representam diferença estatística entre os extratos ($p=0,005$)	66
Figura 7: Compostos fenólicos vitexina ($p=0,018$), isovitexina ($p=0,041$) e isoorientina ($p=0,018$) presentes da folha do <i>P.alata</i> . nos três solventes : etanólico e metanólico/acetona. Resultados expressos em média \pm desvio padrão e as diferentes letras representam Diferenças estatísticas	69
Figura 8: A) Cromatograma HPLC-UV/PDA ($\lambda=350\text{nm}$) do extrato aquoso das folhas de <i>P.alata</i> . B) (1) Espectro UV/PDA do composto isoorientina; (2) Espectro UV/PDA do composto vitexina; (3) Espectro UV/DAD do composto isovitexina	70

- Figura 9:** A) Cromatograma HPLC-UV/PDA ($\lambda=350\text{nm}$) do extrato etanólico das folhas de *P.alata*. B) (1) Espectro UV/PDA do composto isoorientina; (2) Espectro UV/PDA do composto vitexina; (3) Espectro UV/DAD do composto isovitexina 71
- Figura 10:** A) Cromatograma HPLC-UV/PDA ($\lambda=350\text{nm}$) do extrato metanólico/acetona das folhas de *P.alata*. B) (1) Espectro UV/PDA do composto isoorientina; (2) Espectro UV/PDA do composto vitexina; (3) Espectro UV/DAD do composto isovitexina 72
- Figura 11:** Consumo semanal de água e extrato aquoso dos camundongos NOD. Consumo de água $32,7 \pm 3,06$; Consumo de extrato aquoso $33,4 \pm 2,4$. 74
- Figura 12:** Incidência cumulativa do diabetes no camundongo NOD submetido ao tratamento com extrato aquoso de *P.alata* ou controle. Observa-se que 38% (16/42) dos animais tratados ficaram diabéticos, enquanto 63,% (19/30) apresentaram a doença. 75
- Figura 13:** Gráfico representativo da classificação das ilhotas pancreáticas segundo o grau de insulite em camundongo NOD controle (n=5), tratado com *P.alata* (n=5) controle diabético (n=5), e tratado com *P.alata* diabético (n=5) 77
- Figura 14:** Índice de infiltrado celular em ilhotas de camundongos NOD tratados com *P.alata* e os animais controles. Os resultados estão expressos por média \pm desvio padrão; as diferentes letras representam diferença estatística entre os grupos. 78
- Figura 15:** Dosagem séricas de insulina pelo método imunoenzimático ELISA em camundongos NOD tratados com extrato aquoso de *P.alata*, diabéticos (n=5) e não-diabéticos (n=5) e não tratados, também diabéticos (n=5) e não-diabéticos (n=5). Os resultados estão expressos pela média \pm desvio padrão (p=0,012). 84
- Figura 16:** Níveis de glutatona (GSH); (A) Glutaciona presente no fígado de camundongos NOD fêmeas do grupo controle (n=5), grupo *P.alata* (n=5), grupo controle diabético (n=5) e *P.alata* diabético (n=5) (p=0,0007); (B) 85

Glutathione presente no rim de camundongos NOD fêmeas do grupo controle (n=5), grupo *P.alata* (n=5), grupo controle diabético (n=5) e *P.alata* diabético (n=5) (p=0,0001). Os resultados são expressos em média \pm desvio padrão e as diferentes letras representam diferenças estatísticas

Figura 17: Porcentagem de células em apoptose nas ilhotas pancreáticas de camundongos NOD fêmeas (n=3) classificadas em diferentes graus de infiltrado 89

Figura 18: Porcentagem de estresse oxidativo nas ilhotas pancreáticas de camundongos NOD (n=3) classificadas em diferentes graus de infiltrado 92

LISTA DE PRANCHAS

- Prancha I:** Classificação das ilhotas segundo os critérios para classificação do infiltrado. A) Ilhota com GRAU 0; B) Ilhota com GRAU 1; C) Ilhota com GRAU 2; D) Ilhota com GRAU 3; E) Ilhota com GRAU 4 56
- Prancha II:** Imunofluorescência para detecção de linfócitos T CD4⁺, CD8⁺ e macrófagos (CD 11c⁺) em camundongos NOD 80
- Prancha III:** Apoptose em ilhotas pancreáticas de camundongo. (A) Ilhota de camundongo Balb/c como controle sem a presença de células em apoptose. (B) Ilhota de camundongo NOD do grupo água não diabético. (C) Ilhota de camundongo NOD do grupo controle diabético. (D) Ilhota de camundongo NOD do grupo P.alata não diabético. (E) Ilhota de camundongo NOD do grupo P.alata diabético. As setas indicam células em apoptose com coloração castanha presentes nessas ilhotas 87
- Prancha IV:** Estresse oxidativo em ilhotas pancreáticas. (A) Ilhota de camundongo Balb/c como controle. (B) Ilhota de camundongo NOD do grupo água não diabético. (C) Ilhota de camundongo NOD do grupo controle diabético. (D) Ilhota de camundongo NOD do grupo P.alata não diabético. (E) Ilhota de camundongo NOD do grupo P.alata diabético. A presença do estresse é caracterizada pela coloração castanha escura 90

LISTA DE TABELA

Tabela 1: Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio	34
Tabela 2: Composição centesimal e fibras da folha de <i>P.alata</i> seca. Os resultados são expressos em porcentagem e média com desvio padrão	68



RESUMO

A linhagem NOD (non obese diabetic) é utilizada como modelo experimental de DM-1, pois desenvolve espontaneamente a doença com marcante similaridade ao observado em humanos. Vários são os mecanismos propostos para ruptura da tolerância imunológica no DM-1, como a predisposição genética do indivíduo, juntamente com fatores ambientais, tais como estresse e alimentação, parecem favorecer o desencadeamento de mecanismos auto imunes. Nos últimos anos o interesse por alimentos fitoterápicos pelos órgãos governamentais, com a finalidade de auxiliar no tratamento de doenças vem aumentando. A espécie *Passiflora* sp., é descrita pela farmacopeia Brasileira como fitoterápico e seu uso na medicina popular está relacionado ao tratamento de diversas doenças. Estudos sobre as propriedades das folhas do *Passiflora alata* Curtis no *diabetes mellitus* são escassos. Neste contexto, investigamos quais os melhores solventes (água, etanol e metanol/acetona) para extração de compostos bioativos da folha de *P.alata*, a atividade antioxidante dos solventes pelas técnicas DPPH, FRAP, ABTS e ORAC, fenóis totais, composição centesimal e investigação de quatro compostos fenólicos (vitexina, isovitexina e isoorientina) nas folhas. Além disso, avaliamos as propriedades do consumo crônico do extrato aquoso das folhas de *P.alata* sobre a incidência do DM-1, a insulite, os níveis de GSH no fígado/rim, a insulina sérica nos camundongos NOD e o estresse oxidativo, a apoptose e a imunofluorescência de infiltrados CD4⁺,CD8⁺ e CD11⁺ nas ilhotas pancreáticas desses animais. Nossos resultados sugerem que o extrato aquoso em comparação com o metanol/acetona e etanólico, apresenta atividade antioxidante e fenóis totais superiores e que seu consumo crônico é capaz de diminuir o índice de infiltrado inflamatório e consequentemente a expressão do diabetes, ajudar a manter os níveis de GSH no fígado/rim e reduzir o estresse oxidativo e apoptose nos camundongos NOD.

Termos de Indexação: *Passiflora alata*; *diabetes mellitus* tipo 1; camundongo NOD



ABSTRACT

The strain of NOD mice (non obese diabetic) is common used for study with type 1 *diabetes mellitus*, because develops spontaneously the disease with strong similarity to the observed in humans. Several mechanisms are proposed to break immune tolerance in DM-1, such as genetic predisposition, environmental factors, as infections and dietetic, seem to favor the triggering of autoimmune mechanisms. In recent years the interest in herbal foods in order to prevent diseases is increasing in the population. The species *Passiflora* sp. is described by Brazilian Pharmacopoeia as herbal medicine and in folk medicine is related to the treatment of various diseases. Studies about properties of leaves of *Passiflora alata* Curtis related with *diabetes mellitus* are scarce. In this context, we investigate what the best solvent (water, ethanol and methanol/acetone) for the extraction of bioactive compounds from *P.alata* leaf, the antioxidant activity of the solvents by DPPH, FRAP, ABTS and ORAC, total phenols, composition and investigation of four phenolic compound (vetexin, isovitexin and isoorientin) in leaves. Furthermore, we evaluated the chronic consumption of aqueous extract on incidence of DM-1, insulits, GSH levels in liver/ kidney, serum insulin in NOD mice and oxidative stress, apoptosis and immunofluorescence of infiltrated CD4⁺,CD8⁺CD11⁺ in the pancreatic islets of these animals. Our results suggest that the aqueous extract shows higher values of antioxidant activity, total phenols and the chronic consumption can reduce the number of inflammatory infiltrate and consequently the expression of diabetes, help maintain the levels of GSH in the liver / kidney and reduce oxidative stress and apoptosis in NOD mice.

Index terms: *Passiflora alata*; type 1 *diabetes mellitus*; NOD mice



1. INTRODUÇÃO

1.1 *Diabetes Mellitus*

O *Diabetes mellitus* é um grupo de distúrbios metabólicos que apresenta em comum à hiperglicemia crônica. Considerando as características etiológicas do diabetes e seus mecanismos desencadeantes, essa doença é classificada em quatro tipos: *Diabetes mellitus* gestacional; outros tipos específicos de diabetes, incluindo diabetes secundário ou associado a outras patologias; *Diabetes mellitus* tipo 2; *Diabetes mellitus* tipo 1 (1) .

O *Diabetes mellitus* auto imune (DM-1) tem como característica geral início agudo, afetando frequentemente crianças e adolescentes, mas o(s) fator(s) desencadeante(s) dessa doença ainda não foram totalmente elucidados (1-2).

No DM-1 ocorre um processo inflamatório nas ilhotas pancreáticas, no qual as células apresentadoras de antígenos (APCs) expressam moléculas de MHC classe II/ I e coestimulantes que ativam clones específicos de CD4⁺ e CD8⁺. A ativação do CD8⁺ leva a uma ação citotóxica e os CD4⁺ a produção de várias citocinas, tais como interferon (IFN α , β , δ), fator de necrose tumoral (TNF), IL-2, entre outras. Esses linfócitos desencadeiam a destruição seletiva das células β produtoras de insulina, resultando na deficiência desse hormônio (3-5).

Outro aspecto importante no envolvimento dos linfócitos na determinação do DM-1 é a produção e liberação de citocinas, as quais alternariam a função das células β e contribuiria para destruição das ilhotas pancreáticas pela sua ação citotóxica induzindo a apoptose das células β (6).

Embora os linfócitos T auto-reativos participem ativamente na patogênese do diabetes auto imune, existem outros auto-anticorpos que caracterizam a doença, como os anticélula da ilhota (ICA- *Islet-Cell Antibody*), que são anticorpos policlonais que reagem com as células α , β e γ da ilhota pancreáticas. Os anti-insulina (IAA- *Anti- Insulin Auto-Antibody*) decorrente do uso prolongado de insulina ou espontâneo, no qual o próprio portador da doença produz o anti-corpo IAA. E o Anti-GAD, proteína glutamato descarboxilase (GAD) encontrada na membrana das células β , sendo o principal marcador no DM-1, o qual converte ácido glutâmico em ácido γ -aminobutírico (GABA), principal neurotransmissor inibitório do sistema nervoso central. Todos esses auto-anticorpos foram identificados sendo importantes antígenos envolvidos na patogênese do DM-1 (1, 3, 7-8). As ilhotas pancreáticas são circundadas por teia de fibras frouxas nervosas e por células de Schwann não mielinizadas. Antes de invadir as ilhotas, as células do sistema imune se acumulam fora das ilhotas em associação muito próxima a rede de células de Schwann e com o avanço da insulite essas células são destruídas. A associação da destruição das células de Schwann com o desenvolvimento do diabetes ainda não está confirmado (9-10).

Vários são os mecanismos propostos para ruptura da tolerância imunológica, como fatores genéticos e ambientais parecem favorecer para o desenvolvimento do DM-1, mas a análise da patogênese do diabetes em seres humanos é limitado e por essa razão o uso de modelo animal é importante. Muitas informações que sustentam as hipóteses do desenvolvimento do DM-1 decorre de estudos em modelos animais geneticamente predispostos a essa doença, como os camundongos da linhagem NOD (diabético não obeso).

1.2 Camundongos Nod (*Non obese diabetic*)

Os camundongos NOD representam um modelo experimental que desenvolvem espontaneamente o DM-1. A linhagem NOD foi inicialmente desenvolvida no Japão após o cruzamento de sub-linhagem CTS (propensa à catarata) com uma linhagem não consangüínea ICR. O primeiro camundongo NOD a desenvolver a DM-1 espontâneo foi observado em uma fêmea e a partir de cruzamentos seletivos de sua prole, a linhagem NOD isogênica foi estabelecida em 1980 no Laboratório SHIONOGI ABURAH como modelo animal para estudo do DM-1 (11-12).

No Brasil, a linhagem foi introduzida e implantada na Universidade Estadual de Campinas, a partir de colônias provenientes do laboratório INSERM U-25-Necker, na França. A colônia NOD estabelecida e mantida no Centro de Bioterismo da UNICAMP (CEMIB) em condições livres de patógenos (SPF), apresenta prevalência de diabetes entre 60-90% nas fêmeas e 5-20% nos machos (13). Fatores ambientais, dieta e exposição a vírus têm sido considerados como causa das diferenças de incidência da doença nesses animais (14).

O DM-1 clínico neste modelo animal desenvolve-se espontaneamente entre a 12^a e 24^a semana de vida. Polidipsia, poliúria, glicosúria elevada, hiperglicemia e deficiência de insulina são observadas nestes animais, acompanhados de uma rápida perda de peso (10, 12).

Estudos histológicos evidenciaram que no primeiro mês de vida são observadas poucas células imunes infiltradas nas ilhotas, mas apresentam infiltrados mononucleares que circulam as ilhotas pancreáticas, caracterizando a peri-insulite. As células mononucleares encontradas nesse período são linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺, podendo ocorrer também, a presença de células dendríticas, células NK, linfócitos B e CD11⁺, as quais progridem e invadem as ilhotas pancreáticas (15-16).

Durante o desenvolvimento da doença no NOD as células T CD4⁺ e o CD8⁺ exercem um papel sinérgico, uma vez que o diabetes só se desenvolverá na presença de ambos os subtipos (17-18). SHIZURU (19), verificou que a eliminação das células CD4⁺, através da utilização de anticorpos monoclonais anti-CD4⁺ suprime a insulite e, conseqüentemente, o aparecimento do diabetes no camundongo. Portanto os linfócitos T CD4⁺ podem ter um papel essencial na progressão do diabetes.

Já o papel do linfócito CD 8⁺ além dos mecanismos de destruição das ilhotas pancreáticas, esses linfócitos exercem função citotóxica através da liberação de grânulos de perforinas e granzimas, bem como a indução da apoptose através da interação Fas/Fas-L. O CD8⁺ parece estar também presente na fase efetora final da patogênese do diabetes, independente da presença de linfócitos T CD4⁺. Dessa maneira os linfócitos T auto-reativos e a ineficiência de sua eliminação podem desempenhar um papel fundamental no aparecimento do diabetes nesse modelo animal (20-21).

Os mecanismos que desencadeiam o processo imunológico no DM-1 ainda não foram totalmente elucidados. A expressão de peptídeos imunogênicos na célula β , induzidos por toxinas e infecções virais, poderia auxiliar no aumento das reações auto imunes. Alguns estudos, investigam também, a hipótese de que à predisposição genética do indivíduo, fatores

ambientais e a ação danosa dos radicais livres parece favorecer o desencadeamento de mecanismos auto imunes gerando um processo inflamatório no DM-1(22).

1.3 O diabetes e o processo de oxidação

A progressão de diversas doenças está associada a modulação do estresse oxidativo nos mamíferos (23). No diabetes, evidências recentes sugerem que o estresse oxidativo pode estar relacionado ao efeito inibitório da insulina (24).

O estresse oxidativo pode ser definido como um estado de desequilíbrio entre os fatores que geram radicais livres e dos fatores que protegem o organismo, os antioxidantes. A maior compreensão do papel oxidativo no *Diabetes mellitus* é importante para novas estratégias de tratamento.

O *Diabetes mellitus*, auto imune ou adquirido, está associado com o estresse oxidativo e com a hiperglicemia. A hiperglicemia prolongada no diabetes leva ao aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e espécies reativas de nitrogênio (ERNs). Além disso, a hiperglicemia induz a ativação das proteínas quinases (PK-C), o aumento de formação de derivados glicosilados e estimula um aumento no fluxo de glicose na via aldose-reductase, resultando em um acúmulo de sorbitol. Esses seriam os principais mecanismos metabólicos pelos quais a hiperglicemia causa as complicações da diabetes (25).

A ativação da via polióis pela glicose é associado à alteração dos níveis de NAD⁺, que resulta na modificação de proteínas por glicosilação não enzimática e também está associado a diminuição dos níveis de glutathione (26).

A NADPH – oxidase é a maior fonte de produção de EROs em muitas células (27). A produção de espécies reativas pela oxidase em grandes quantidades pode gerar o dano oxidativo. Essas oxidases parecem ter funções de controle vascular, resposta a expressão

gênica, sinalização em processos celulares, como crescimento, apoptose, migração e remodelação da matriz extracelular (**Figura 1 pág.30**) (28).

A NADPH-oxidase é formada por subunidades de membrana que são ativadas e fosforiladas por várias quinases, incluindo a PKC (29). A PKC é uma das principais quinases que está envolvida em eventos de transdução de sinais, respondendo a estímulos específicos hormonais, neuronais e de fatores de crescimento. Atua catalisando a transferência de um grupo fosfato do ATP (adenosina tri-fosfato) a várias proteínas. Da mesma forma, a PKC também sofre fosforilação antes de ser ativado, o que ocorre durante sua translocação no citosol a membrana plasmática, aumentando o diacilglicerol (DAG) (30).

O DAG é um ativador da PKC e é possível que a ativação da via DAG-PKC, induzida pela hiperglicemia, seja resultado de glico-oxidação e existem evidências de que alguns oxidantes, como o H_2O_2 , podem ativar a PKC. Essa via é importante na regulação da permeabilidade vascular, ação de citocinas, adesão de leucócitos, entre outras, todas relacionadas a alterações que ocorrem durante o diabetes (31-32).

O DM-1 gera também um processo inflamatório, o qual aumenta as espécies reativas de oxigênio e a deficiência das defesas antioxidantes. O excesso das espécies reativas de oxigênio causam alterações na estrutura e funções das proteínas, membrana lipídica e nos ácidos nucleicos, levando eventualmente essas células à morte (33).

Diferentes mecanismos podem estar envolvidos para o aumento da oxidação no organismo. A oxidação da glicose, acredita-se ser uma das principais vias de produção dos EROs no diabetes. Essa oxidação leva a formação das AGEs (produtos finais da glicação avançada) as quais podem ser gerada pelos rearranjos de Amadori, pelo ácido ascórbico e outros carboidratos incluindo a frutose e intermediários metabólicos (34).

Os AGEs são proteínas ou lipídios que se tornam glicosados após a exposição a açúcares oxidados e contribuem para o desenvolvimento do DM. Sua ação leva a modificação de proteínas intracelulares envolvidas na regulação gênica e em moléculas da matriz vizinha, interferindo na sinalização entre a matriz e a célula, causando disfunção celular. Algumas proteínas como a albumina, ativam os receptores de AGEs os (RAGEs), estimulando a produção de citocinas inflamatórias, como a interleucina 1 e 6, fator de crescimento I, fator de necrose tumoral α , prostaglandinas e fator estimulador de colônias de granulócitos (35-36).

Os produtos finais da glicação avançada acumulam em órgãos como rim, retina e placas ateroscleróticas (37). Elevados níveis de AGEs tem sido documentado em vasos retinianos e em nervos periféricos de portadores de diabetes e em modelo animal, agindo na redução da velocidade de condução nervosa e no fluxo sanguíneo periférico (38-39).

A ligação das AGEs nos receptores RAGEs, na superfície celular, induz um estresse oxidativo caracterizado pelo aumento do fator de transcrição NF-kB que promove a produção de óxido nítrico. O óxido nítrico pode interagir com as EROs gerando o peroxinitrito, um oxidante potente que acredita-se ser um mediador das lesões nas células β das ilhotas pancreáticas. Exemplo na **Figura 2 pág. 30** (40-41).

Poucos são os estudos que avaliam o estresse oxidativo no DM-1.

Dominguez e cols. (42) avaliaram 24 pacientes adolescentes, após o início clínico do diabetes tipo 1, quando o controle metabólico já estava restaurado, demonstraram concentrações elevadas de malonaldeído (MDA) plasmático, produto final da oxidação de ácidos graxos poliinsaturados, em relação ao grupo controle, sugerindo que os radicais livres possam exercer papel toxicológico no início da doença. Esse efeito tóxico elevado também foi avaliado em pacientes de 2 a 22 anos de idade que apresentavam DM1. Demonstraram

também que pacientes recém diagnosticados apresentam baixos níveis de glutathione com relação ao grupo controle, com progressivo declínio durante a doença .

Em estudo mais recente, Hata e cols (43) demonstraram que pacientes com 5 anos de doença (DM1) apresentam aumento no 8-OHdG (8-hidroxi-2'- deoxiguanosina), marcador de estresse oxidativo, com relação ao controle. Em avaliação brasileira, Reis (44) verificou que indivíduos com dois anos de doença em tratamento intensivo com insulina observou-se diferença estatística entre a produção de ROS por granulócitos no DM1 em relação aos indivíduos não diabéticos.

Já Vessby e cols. (45) avaliaram um grupo de pacientes diabéticos e verificaram que não houve diferença estatísticas significante em marcadores de estresse oxidativo. Contudo, ainda não está totalmente elucidado o(s) fator(s) que desencadeiam o estresse oxidativo e que levam a doenças. Neste sentido sabe-se que para combater todo esse processo oxidativo existem moléculas chamadas antioxidantes capazes de inibir a oxidação e servirem como possível tratamento e/ou auxílio no DM1.

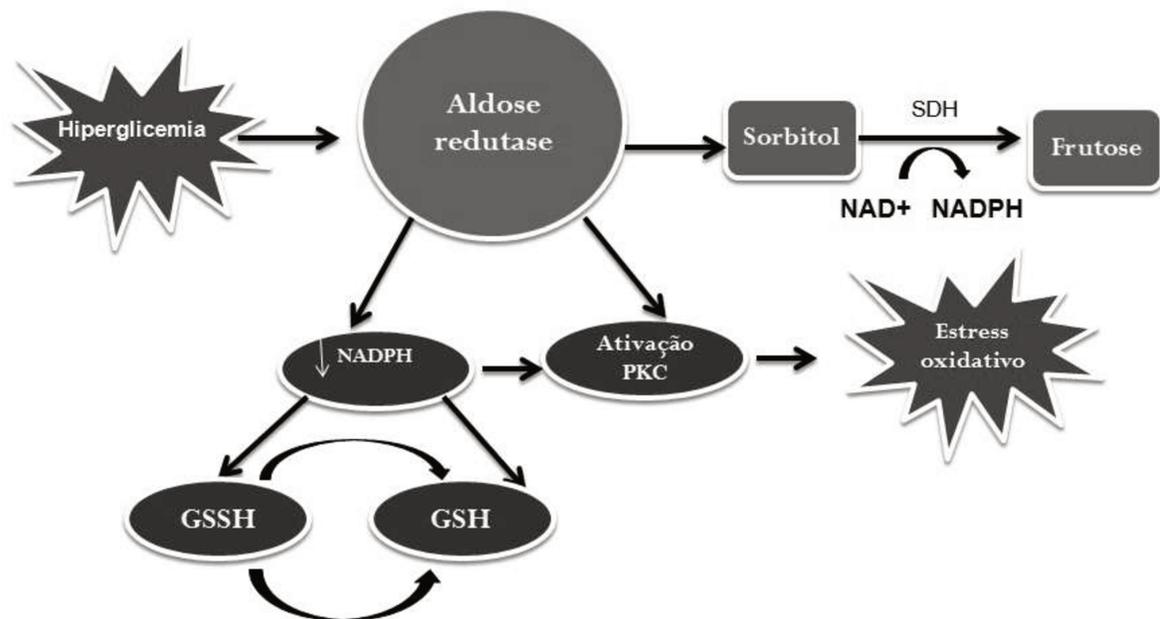


Figura 1: Via dos polióis. Adaptado do Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabologia.

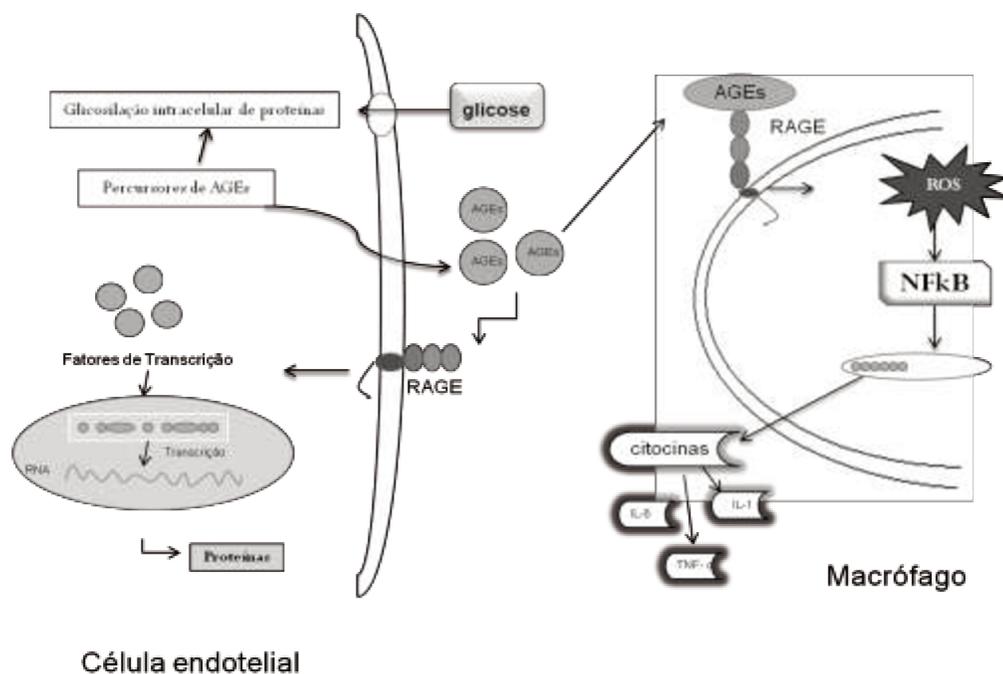


Figura 2: Aumento da produção de AGEs. Adaptado do Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabologia.

1.4 Radicais Livres e Antioxidantes

Os radicais livres são definidos como átomos capazes de existir independente contendo um ou mais elétrons não-pareados em seu orbital. A presença deste elétron não pareado altera a reatividade química do átomo ou molécula tornando-se mais reativo. Possuem meia-vida curta, mas são altamente instáveis podendo causar danos por reagir com diferentes moléculas (46).

O termo radical livre ou espécie reativa de oxigênio (EROs)/nitrogênio (ERNs) é usado para identificar os radicais que se apresentam como agentes oxidantes. Essas EROs/ERNs incluem o peróxido de hidrogênio, radical hidroxilo, superóxido, entre outras, como demonstrado na **Tabela 1 pág . 34** (47).

A oxidação do oxigênio é um processo metabólico que leva à produção de energia necessária para as atividades essenciais das células. As espécies reativas de oxigênio são produtos do metabolismo celular liberados durante o processo, o qual é utilizado para converter nutrientes provenientes da nossa alimentação em energia (48).

As EROs produzidas ajudam na manutenção da homeostase celular ,como também, em baixas concentrações, atuam de maneira benéfica nas defesas do organismo contra agentes infecciosos, na formação de ATP através da ADP na mitocôndria, na produção de oxigenases (lipooxigenase e ciclooxigenase) para formação de prostaglandina e leucotrienos e na regulação do crescimento celular (49).

A produção em excesso das espécies reativas de oxigênio ou a deficiência dos mecanismos de defesa do organismo podem ser prejudiciais induzindo a oxidação de proteínas, carboidratos, enzimas, lipídeos de membrana e DNA, gerando um desequilíbrio que leva ao estresse oxidativo (48, 50).

Para manter um equilíbrio e combater os fatores que promovem a oxidação existem os antioxidantes.

Os antioxidantes são moléculas presentes em baixas concentrações, que inibem o processo oxidativo, eliminando os radicais livres, agindo como agentes de redução. Os principais mecanismos de ação dos compostos antioxidantes incluem captadores de radicais e supressores que neutralizam ou eliminam os EROs, ERNs e a ligação de íons metálicos que são necessários para a produção das espécies oxidantes. (51).

Os mecanismos antioxidantes podem envolver processos enzimáticos e não enzimáticos. Os antioxidantes podem ser classificados como endógenos, como a glutathione peroxidase, a catalase e o superóxido desmutase. E também os exógenos, provenientes da nossa alimentação como vitaminas A, C, E, minerais, flavonoides, entre outros (40).

Sabe-se que os componentes celulares não são totalmente protegidos pelos antioxidantes endógenos, sendo necessários os antioxidantes exógenos obtidos na dieta. Assim, a presença dos antioxidantes, sejam endógenos ou presentes na dieta, podem ser aliados importantes na manutenção da saúde (52).

Um dos antioxidantes mais estudados, provenientes de fontes vegetais são os compostos fenólicos. Os compostos fenólicos são metabólicos secundários divididos em dois grupos principais: os fenóis e os flavonoides e sua distribuição depende do vegetal, podendo apresentar variação na própria espécie (53-54).

Sob o ponto de vista nutricional os flavonóides são reconhecidamente agentes antioxidantes capazes de inibir a oxidação. Essas características desempenham um papel importante na neutralização ou sequestro de radicais livres e quelação de metais de transição. Os intermediários formados pela ação de antioxidantes fenólicos são relativamente estáveis, devido ao anel aromático presente na estrutura destas substâncias (55).

Os danos causados aos componentes celulares contribuem para a degeneração das células e indução de doenças. O *Diabetes mellitus* leva a diminuição dos antioxidantes endógenos no organismo, ocasionando o aumento dos radicais livres . Os compostos antioxidantes provenientes da nossa alimentação podem ser uma alternativa para o tratamento do *Diabetes mellitus*. Neste sentido a busca por alimentos que possuam esses compostos químicos vem se intensificando.

Tabela 1: Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio

Espécies Reativas	Símbolo	Meia Vida (em seg)	Reatividade
Espécies reativas de oxigênio			
Superóxido	$O_2^{\bullet-}$	10^{-6} s	Gerado na mitocôndria, em sistema cardiovascular e outros.
Radical hidroxila	$\bullet OH$	10^{-9} s	Altamente reativo, gerado durante sobrecarga de ferro.
Peróxido de Hidrogênio	H_2O_2	Estável	Formado em nosso corpo pelo amplo número de reações, formando radicais potentes como $\bullet OH$
Radical peroxila	ROO	Segundos	Reativo e formado de lipídeos, proteínas, DNA açúcares, etc, durante o dano oxidativo.
Hidroperóxido orgânico	ROOH	Estável	Reage com íons metálicos formando espécies reativas.
Oxigênio singlete	$^1 O_2$	10^{-5} s	Altamente reativo formado por fotossensibilidade e reações químicas.
Ozônio	O_3	Segundos	Poluente atmosférico, pode produzir o O_2 .

**Espécies reativas de
nitrogênio**

Óxido nítrico	NO•	Segundos	Neurotransmissor e regulador da pressão sanguínea, pode gerar potentes oxidantes durante estados patológicos.
Próxinitrito	ONOO ⁻	10 ⁻³ s	Formado a partir no NO ⁻ e superóxido, é altamente reativo
Ácido peróxinitroso	ONOOH	Ligeiramente estável	Forma protonada do ONOO ⁻
Dióxido de nitrogênio	NO ₂	Segundos	Formado pela poluição do ar.

Adaptado de Devasgayam e cols., 2004

1.5 *Passiflora alata* Curtis

O gênero *Passiflora* possui aproximadamente 500 espécies, sendo largamente distribuída nos trópicos e regiões temperadas quentes, como a América do Sul e África. A região Centro-Norte do Brasil apresenta-se como maior centro de distribuição geográfica da espécie (56-58).

Dentre as espécies do *Passiflora* sp. duas possuem maior valor comercial no Brasil, o *Passiflora alata* e *Passiflora edulis*. Essa espécie é considerada uma planta lenhosa, perene e trepadeira que produz frutos comestíveis muito utilizados na indústria alimentícia (59).

Considerando a composição química descrita na literatura podemos encontrar substâncias fitoquímicas com ação antioxidante, dentre elas estão os polifenóis, destacando-se os ácidos fenólicos e os flavonóides, além dos compostos alcalóides (60-62).

O *Passiflora* sp. é usado, na medicina popular, como fitoterápico no preparo sedativos, diuréticos, ansiolíticos, e possível suporte como hipoglicêmico (63-64).

A espécie *Passiflora alata* Curtis, conhecida popularmente como “maracujá doce”, é considerada pela farmacopeia Brasileira como um fitoterápico (65). As suas folhas são utilizadas pela medicina popular no Brasil, como tranquilizante e sedativo (66).

A composição química do maracujá doce apresenta fitoconstituintes como flavonoides (vitexina; isovitexina; orientina; rutina; isoorientina; vitexina -2''-O-rhamnoside; entre outros), alcaloides (harmana), saponinas, entre outras (67-68).

Esses compostos possuem diversas características químicas e algumas vezes se apresentam com alto grau de complexidade. Sua composição pode apresentar capacidade antioxidativa desempenhando importante papel na neutralização de radicais livres no organismo.

A identificação dos compostos fitoquímicos em espécies vegetais tem sido explorada nos últimos anos, devido a crescente popularidade dos medicamentos fitoterápicos e na mudança de perspectiva dos consumidores, que buscam por alimentos com características bioativas, auxiliando na prevenção e combate de doenças.

Segundo Montanher (69), os compostos fitoquímicos da espécie *Passiflora edulis* pode ser fonte de componentes com propriedades anti-inflamatórias. Embora as espécies de *Passiflora alata* tenham diversas indicações terapêuticas na medicina popular e sua composição química tem sido extensamente investigada nos últimos anos, poucas investigações sobre as propriedades farmacológicas e bioquímicas da espécie são encontradas na literatura.

Oga *e cols* (70) descrevem os efeitos depressores do extrato bruto das folhas de *P.alata* no sistema nervoso central (SNC) com a administração intraperitoneal de 75 e 150 mg/kg de extrato. Os efeitos depressores do extrato de *P.edulis* no SNC também foram verificados por Maluf (71) em humanos e roedores.

Recentemente os efeitos ansiolíticos dos extratos hidroalcolico e aquoso da folha de *P.alata* e *P. edulis* foram também demonstrados por Petry *e cols.* (72) e Paris *e cols* (73) respectivamente.

Já Amaral *e cols.* (74), demonstraram a ausência de toxicidade reprodutiva em roedores com o tratamento oral de 800 mg/kg tanto para o extrato de *P.alata* como para o extrato de folhas de *P.edulis*.

As informações obtidas até o momento, sobre o uso fitoterápico das folhas do maracujá com relação ao *Diabetes mellitus* em modelos animais ou em humanos ainda é muito limitado, tornando-se importante as pesquisas relacionadas a essa doença e o uso do *Passiflora alata* Curtis. como um possível auxílio no tratamento para o DM.

Hipótese de trabalho: A espécie *Passiflora alata* Curtis por suas propriedades antioxidantes/antiinflamatórias diminui a expressão do diabetes tipo1 no modelo experimental camundongos NOD.



2. OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL:

Avaliar a atividade antioxidante do extrato aquoso das folhas do maracujá *Passiflora alata* Curtis e seu consumo crônico no desenvolvimento *Diabete mellitus* tipo 1 em camundongos NOD (non obese diabetic) fêmeas.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar:

- A composição centesimal da folha seca de *Passiflora alata* Curtis e sua atividade antioxidante nos extratos aquoso, etanol e metanol/acetona.
- O efeito da administração crônica do extrato aquoso da folha do *Passiflora alata* sobre a incidência de morbidade do DM-1 espontâneo em fêmeas de camundongo NOD.
- As propriedades do tratamento nos camundongos NOD com o extrato aquoso da folha do maracujá sobre o infiltrado inflamatório, apoptose e estresse oxidativo nas ilhotas pancreáticas.
- Os níveis de glutathiona reduzida (GSH) no fígado e rins dos camundongos NOD.



3.MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Processamento das folhas de *Passiflora alata* Curtis

As folhas do maracujá *P.alata* foram cedidas pelo Instituto Agronômico de Campinas, secas em estufa de circulação de ar (MARCONI, Piracicaba/SP) a 50°C/48 horas, trituradas até a obtenção de um pó e armazenadas sobre refrigeração a 8°C.

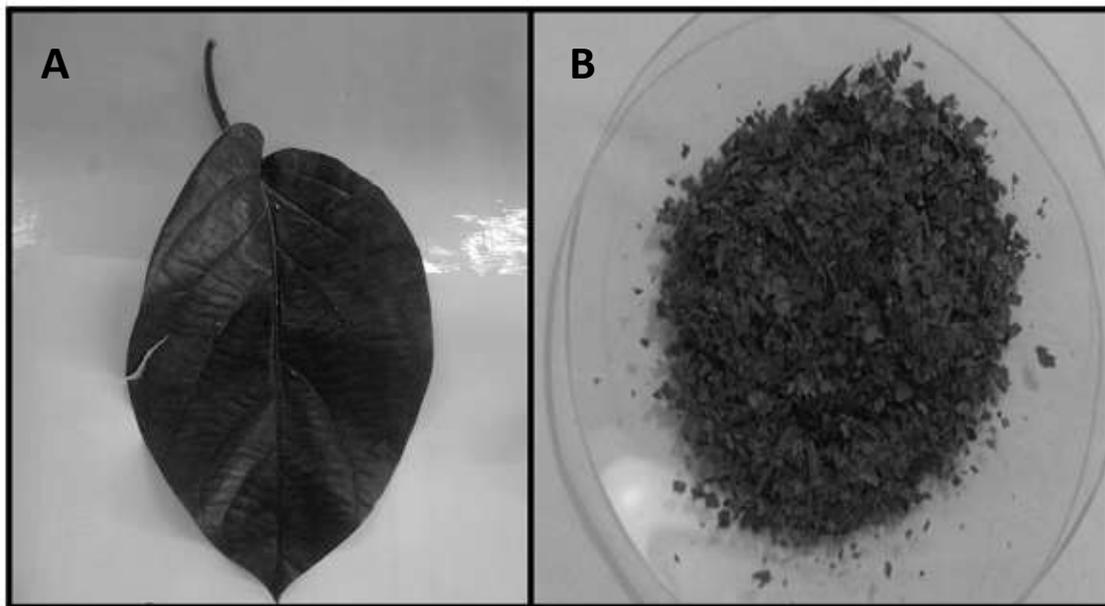


Figura 3: (A) *Folha do Passiflora alata* Curtis; (B) *Folha do Passiflora alata* Curtis seca e moída.

3.2 Extração dos Compostos Fenólicos

O processo de extração era realizado nas folhas secas e moídas com três diferentes solventes nas mesmas concentrações (4 mg/mL).

3.2.1 Extrato Metanol-Acetona

O preparo do extrato Metanol - Acetona conforme Larrauri *e cols* (75), pesou-se 1g folha e adicionou 15 mL de metanol 50% permanecendo em repouso por 60 minutos. Após esse tempo, a amostra era centrifugada a 9948 g durante 20 minutos / 22°C. O sobrenadante era transferido para um balão de volumétrico de 25 mL e o resíduo da folha ressuspenso em 10 mL de acetona 70% por mais 60 minutos. A amostra era centrifugada novamente a 9948 g durante 20 minutos. O sobrenadante era transferido para o mesmo balão volumétrico e o volume final de 25mL era acertado com água destilada. A amostra era armazenada em vidro âmbar sob a temperatura de 8°C até as análises.

3.2.2 Extrato Etanol

A 1g de folha seca era adicionada 15 mL de etanol 60%, mantendo em banho-maria a 70 °C por 1 hora, essa mistura era agitada a cada 15 minutos. Após esse tempo o extrato era filtrado em papel filtro e reservado o conteúdo. Ao resíduo era adicionado mais 10 mL de etanol 60%, mantendo novamente em banho-maria a 70 °C por 1 hora e filtrado em seguida. Os extratos obtidos após a filtragem eram transferidos para um balão volumétrico de 25 mL e seu volume final acertado com água destilada. A amostra era armazenada em vidro âmbar sob a temperatura de 8°C até as análises (76).

3.2.3 Extrato Aquoso

O preparo do extrato aquoso utilizou-se 1g folha seca e 25 mL de água, era autoclavado por 20 minutos a 121°C. O chá formado pelo processo de autoclavagem era filtrado e transferido para balão volumétrico de 25mL. A amostra era armazenada em vidro âmbar sob a temperatura de 8°C até as análises (77).

3.3 Ensaios da Atividade Antioxidante

Os extratos aquosos, metanol/acetona e etanol do extrato do maracujá (*Passiflora alata* Curtis) eram submetidos a quatro diferentes ensaios (DPPH; FRAP; ABTS; ORAC) para averiguar qual apresenta maior atividade antioxidante. Para esses ensaios, as amostras dos três extratos (aquoso, etanol e metanol/acetona) eram diluídas nas seguintes concentrações 0.004, 0.01, 0.02 e 0.03 g/mL. Os ensaios de atividade antioxidante seguiram os seguintes passos:

3.3.1 Sequestro do radical orgânico DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl): O ensaio DPPH seguiu Brand-Williams e cols (78), com algumas modificações. Dissolveu 1,2 mg de DPPH em 50 mL de álcool metílico para obter uma concentração final de 0,06mM. Eram misturados 25 µL dos extratos da folha com 1 mL de solução DPPH 0,06mM e após 30 min sua leitura era feita a 515nm em espectrofotômetro (SpectraMAX 190®, CA, EUA). A leitura da curva era linear entre 0,004 e 0,024 mg/mL de DPPH. Os resultados eram expressos em porcentagem de sequestro desse radical.

3.3.2 Capacidade de redução do metal-FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power): O ensaio seguiu Benzie & Strain (73) e Pulido e cols (74), com algumas modificações. Eram preparadas soluções estoques de tampão acetato 300 mM (3.1g acetato de sódio - $C_2NaO_2 \cdot 3H_2O$ / 16 mL ácido acético glacial - $C_2H_4O_2$) pH 3.6 ; TPTZ 10 mM (2,4,6-tripirydyl-s-triazine) em solução de ácido clorídrico 40nM (HCl) , cloreto férrico 20mM ($FeCl_3 \cdot 6H_2O$) e sulfato ferroso 2mM ($FeSO_4$). No momento do uso era preparado a solução de FRAP contendo 50 mL de tampão de acetato, 5 mL de TPTZ e 5 mL de cloreto férrico

($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$). Os extratos da folha (30 μL) eram misturados com 90 μL de água e 900 μL solução FRAP, homogeneizado e mantido em banho-maria a 37°C por 30 min. Sua leitura era feita a 595nm em espectrofotômetro. A leitura da curva era linear entre 500 e 2.000 μM de sulfato ferroso (FeSO_4 2mM) . Os resultados eram expressos em equivalente de FeSO_4/g .

3.3.3 Captura do radical livre ABTS (2,2'-AZINO-BIS(3-ethylbenzo-thiazoline-6-sulfonic acid): Este procedimento foi adaptado de Larrauri *et al.* e Nenadis *et al.* (75, 79). A solução estoque de ABTS (192 mg ABTS+ 50 mL de água) era misturada com 88 μL de persulfato de potássio 140 mM - $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$ (378,4 mg persulfato de potássio + 10mL água) e mantida em repouso por 16 horas no escuro em temperatura ambiente. Após esse período era diluído 1 mL dessa mistura em aproximadamente 55 mL de álcool etílico até obter a absorvância de 0,70nm \pm 0,05nm a 734 nm em espectrofotômetro. Os extratos da folha (10 μL) eram misturados com 1 mL de solução ABTS por 6min e sua leitura era feita a 734nm. A leitura da curva era linear entre 100 e 2.000 μM de Trolox 2mM (6-Hidroxi-2,5,7,8-tetrametilchroman-2-ácido carboxílico) Os resultados eram expressos em equivalentes μM de Trolox (TE/g).

3.3.4 Capacidade de absorção do radical Oxigênio- ORAC (*Oxygen Radical Absorbance Capacity*): Este procedimento era adaptado de Prior e cols. (80). Eram preparadas soluções de tampão fosfato de Potássio 75mM pH 7,4; A solução estoque de fluoresceína sódica (Estoque 1) era preparada com 3,8 mg em 1 mL de tampão de fosfato de potássio; A segunda solução estoque (Estoque 2) era preparada diluindo 10 μL da solução estoque 1 com 990 μL de tampão; E a terceira solução de fluoresceína era preparada apenas no momento do uso adicionando 160 μL da solução estoque 2 e 15.840 mL de tampão.

A solução de Trolox (1500 μM) era utilizada para curva estabelecida nas concentrações de 700 a 10 μM de trolox equivalente em tampão de fosfato. O preparo do radical AAPH era realizado no momento do uso, pesando-se 648 mg para 6 mL. Em placa para leitor de ELISA era colocado em cada poço 60 μL de AAPH + 120 μL de fluoresceína (terceira solução) + 20 μL do extrato. A leitura da placa era feita a 37°C com excitação de 485/20 e emissão de 528/20 em cinética de 80 minutos. Os resultados eram expressos em μM trolox equivalente/g amostra.

3.4 Fenóis Totais

A determinação do teor de fenóis totais presentes na amostra foi realizada no extrato aquoso, etanol e metanol-acetona. Adicionou-se 150 μL do extrato, 2.400 μL de água destilada e 150 μL do reagente Folin – Ciocalteu, homogeneizando. Foi acrescentado 300 μL de solução carbonato de sódio 1N (Na_2CO_3), homogeneizado e incubado por 2 horas em temperatura ambiente/escuro. A curva de fenóis totais era feita pela diluição do ácido gálico-mg/mL nas concentrações de 0,1 a 0,016 mg/mL.

A quantificação foi realizada em espectrofotômetro a 725nm e os resultados eram expressos em equivalentes de ácido gálico - $\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_5$ (EAG/mg/100g amostra) (81).

3.5 Determinação da Composição Centesimal da folha de maracujá – doce (*Passiflora alata* Curtis).

A composição centesimal da folha de *P.alata* era determinada por meio da quantificação do teor proteico, teor de lipídeos totais, cinzas (minerais totais) / umidade e o teor de carboidratos.

Para determinar a quantidade de proteína na amostra utilizou-se a técnica Kjeldahl (82). Pesou-se 1 g de folha seca em 4 mL ácido sulfúrico e 1,5 g de mistura catalisadora (Na_2SO_4 e $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) onde era digerida em bloco digestor a 350°C . Após a digestão, o material era destilado com 20 mL de hidróxido de sódio 50% (NaOH) e misturado a uma solução contendo 15 mL de ácido bórico (H_3BO_3) e 3 gotas do indicador de Andersen (50mL de 0,2% azul de metileno em álcool etílico+ 25mL de 0,2% vermelho de metila em álcool etílico) até a destilação atingir 100 mL. O produto da destilação era então titulado em solução ácido clorídrico 0,02N (HCL). Analisando o teor de nitrogênio total identificamos a porcentagem de proteína bruta presente na amostra, através do cálculo:

$$\% \text{ Nitrogênio} = \frac{\text{mL HCl} \times \text{NHCl} \times 0,014 \times 100}{\text{Peso da amostra (g)}}$$

A porcentagem de lipídeos nas folhas era determinada pelo método Bligh & Dyer (83) pesando-se 3 g de folha seca, adicionando 10 mL de clorofórmio, 20 mL de metanol e 8 mL de água destilada. Essa mistura era mantida em agitador rotativo por 30 minutos. Adicionou-se 10 mL de clorofórmio (CHCl_3) e 10 mL de solução de sulfato de sódio 1,5% (Na_2SO_4) agitando por 2 minutos. Descartou a camada superior dessa solução e a inferior foi filtrada em papel filtro. Do filtrado 5mL era transferido para um Becker tarado e levado a estufa a 100°C para evaporar o solvente e pesado quando frio. A porcentagem de lipídeo era calcula seguindo a fórmula:

$$\% \text{ Lipídeos} = \frac{\text{peso dos lipídeos} \times \text{fator de diluição} \times 100}{\text{Peso da amostra (g)}}$$

A umidade era mensurada pela remoção da água livre em 1 g de amostra da folha com auxílio de estufa a 105°C overnight. O conteúdo de cinzas (sólidos totais) era determinado pela carbonização de 1 g de folha seguindo de ± 3 horas na mufla a 550°C ou até sua completa incineração (84).

A porcentagem de umidade e cinzas era calculada seguindo as fórmulas:

$$\% \text{ Sólidos totais} = \frac{\text{g do resíduo}}{\text{g amostra}} \times 100$$

$$\% \text{ Umidade} = \frac{100 - \text{sólidos totais}}{\text{g amostra}}$$

O teor de carboidrato é expresso subtraído 100% da soma dos resultados anteriores.

3.6 Fibra Bruta

Para análise de fibras bruta utilizava-se 1g da amostra de folha com 150 mL de ácido sulfúrico 1,25% (H₂SO₄), durante por 30 min a 100° C. Após esse tempo, o material era filtrado em tela de malha 200 mesh e ao resíduo adicionava-se 150 mL de hidróxido de sódio 1,25% (NaOH). As amostras eram submetidas novamente ao processo descrito acima por 30 min a 100° C, filtrado em papel filtro Whatman com peso conhecido. O resíduo contido no papel filtro era lavado com álcool etílico a 96° Gl, transferido para um cadinho com peso conhecido e levado à estufa a 105°C por 3 horas. O peso do cadinho era verificado após seu resfriamento. Após a secagem em estufa os cadinhos eram levados a mufla a 550°C para incinerar por 2 horas e seu peso era verificado após resfriamento (84).

A porcentagem de fibra bruta foi calculada seguindo a fórmula:

$$\%FB = \frac{(A-C)-B \times 100}{P}$$

Onde:

A= peso conjunto (cadinho + resíduo + papel seco) (g)

B= peso conjunto (cadinho + cinzas) (g)

C= papel filtro peso (g)

P= peso da amostra (g)

3.7 Análise Cromatográfica (HPLC-DAD)

Os extratos eram diluídos em metanol 80% e para validação utilizava-se padrão externo. A quantificação dos flavonóides vitexina, isovitexina, isoorientina e apigenina (Sigma, Louis, EUA) foi realizada utilizando solução estoque dos padrões (10 mg mL^{-1}) para a obtenção de uma curva analítica com 5 pontos variando de 2 a $16 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ (vitexina r^2 0,9997, isovitexina r^2 0,9997, isoorientina r^2 0,9991, apigenina r^2 0,9993). Os extratos foram filtrados em membrana de $0.45 \mu\text{m}$ Chromafil® Xtra RC 45/25 (MACHEREY-NAGEL), antes da injeção de $20.0 \mu\text{L}$ em sistema HPLC–UV/DAD com fluxo de vazão 1 mL min^{-1} , com controle de temperatura da coluna em 30°C . A quantificação dos flavonoides era determinada com base na análise de três cromatogramas obtidos a $\lambda 350 \text{ nm}$.

O sistema HPLC Agilent Technologies 1200 series, consiste de um degaseificador com bomba quaternária, injetor automático e detector fotodiodo. A coluna cromatográfica utilizada na análise era a Luna A $250 \times 4.6 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$ C18 (2) (Phenomenex - Torrance, CA). As seguintes fases móveis e seus respectivos tempos eram utilizados: 75% água deionizada acidificada, 10% acetonitrila e 15% metanol no tempo de 0 min; A porcentagem das fases móveis aumentavam linearmente para 15 % de acetonitrila e 20% de metanol no tempo de 25 min e em 30 min retornavam as condições iniciais.

3.8 Análise por Espectrometria de Massas (MS/MS)

As mesmas amostras utilizadas na análise HPLC-UV/DAD também eram analisadas em equipamento de espectrometria de massas em série (MS/MS) para confirmação das identidades dos compostos detectados. Para tanto, era utilizado um espectrômetro de massas composto de um sistema híbrido de analisadores de massas, sendo um analisador do tipo quadrupolo (Q) e outro do tipo tempo de voo (“*time of flight*”, ToF), da Micromass (Q-ToF Micro®, Waters, EUA), com uma fonte de ionização por eletronebulização (ESI-MS/MS). O controle do instrumento e o processador de dados foram realizados pelo software Masslynx 4.0 (Micromass, UK).

Com objetivo de melhorar as razões sinal-ruído, o analisador de massas do tipo quadrupolo era utilizado como filtro para a seleção dos íons. Desta forma, o quadrupolo era programado para selecionar íons com razão massa/carga (m/z) numa faixa próxima às massas moleculares dos íons correspondentes aos compostos de interesse.

Para as análises de confirmação de identidade, os íons moleculares e os íons de produto eram considerados. Para tanto, as condições de ionização selecionadas eram definidas: fluxo de cone de gás (50L h^{-1}), o fluxo do gás de dessolvatação (400L h^{-1}), a polaridade (ESI^+), a energia capilar (3000V), a amostra de cone de energia (50V), extração com cone de energia (2V), a temperatura de dessolvatação (250°C), temperatura da fonte (100°C), a energia de ionização (2V), energia de colisão (15V), e multi-canal de energia da placa do detector (2780V).

O método permitiu a confirmação das identidades dos analitos e a técnica QToF permitiu a obtenção da razão m/z com menos de 10 ppm de erro para cada analito.

3.9 Animais

Os camundongos fêmeas da linhagem NOD utilizados neste estudo eram provenientes do INSERM U-25, Hospital Necker (Paris, França), implantada e mantida no Centro de Bioterismo da Unicamp (CEMIB) desde 1994 (13).

Os procedimentos envolvendo animais e seus cuidados eram conduzidos de acordo com as diretrizes e recomendações estabelecidas pelo Comitê Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) protocolo número 2387-1.

3.10 Grupos Experimentais

Os 72 camundongos NOD fêmeas eram mantidos em condições SPF, com controle de luz, temperatura e umidade no Laboratório de Imunologia & Alergia Experimental (LIAE). Os grupos experimentais eram estabelecidos como descrito a seguir:

Grupo Extrato Aquoso: 42 camundongos NOD tratados com ração industrial autoclavada (LABINA –PURINA ®) + extrato aquoso da folha do maracujá *Passiflora alata* Curtis (15g folha/litro de água) *ad libitum*. A concentração do extrato aquoso era estabelecida pelo IC₅₀ (concentração inicial), ou seja, onde o extrato aquoso sequestrava 50% do radical DPPH. Sua troca era feita a cada dois dias para manutenção da sua atividade antioxidante.

Grupo Controle: 30 camundongos NOD tratados com ração industrial autoclavada (LABINA –PURINA ®) + água *ad libitum*.

Todos os animais eram tratados a partir da 4ª semana de vida até a 28ª semana e sua glicemia e o peso corpóreo era monitorado semanalmente. Para averiguar o consumo de água e do extrato aquoso o mesmo era mensurado a cada troca.

3.11 Controle Biológico do Extrato Aquoso de *P.alata*

O controle biológico do extrato aquoso era feito antes de ser oferecido para os camundongos e após sua retirada. As placas contendo meio de cultura Sabouraud eram feitas pesando-se 65g Difco Sabouraud Dextrose Agar em 1 litro de água destilada mantendo sobre agitação até completa diluição. A mistura era autoclavada por 15 minutos a 121°C e após resfriado colocados em placa de Petri estéril. A inoculação do extrato aquoso era feita sob capela de fluxo laminar para evitar contaminação do meio.

3.12 Diagnóstico do Diabetes e Sacrifício dos Animais

A ocorrência do *Diabetes mellitus* tipo 1 era monitorada em todos os animais a partir da 10ª semana de vida. As glicemias eram monitoradas semanalmente através de glicosímetro Prestige LX[®] (Home Diagnostic, EUA) retirando-se uma amostra de sangue da veia caudal do animal. Os animais eram considerados diabéticos ao apresentarem glicemia superior a 220 mg/dl, durante duas semanas consecutivas.

Os animais que apresentavam diabetes ou ao completarem 28ª semanas, eram anestesiados com uma combinação de cloridrato de Ketamina (100-200 mg/Kg peso corpóreo) e cloridrato de Xilasina (5- 16mg/Kg peso corpóreo). Ao serem anestesiados os animais eram submetidos à coleta de sangue periférico por meio de punção cardíaca, com transferência imediata para tubo plástico de 1,5 mL (livre de RNase) para posterior separação do seu soro sendo utilizado para dosagem de insulina, o por meio da técnica de

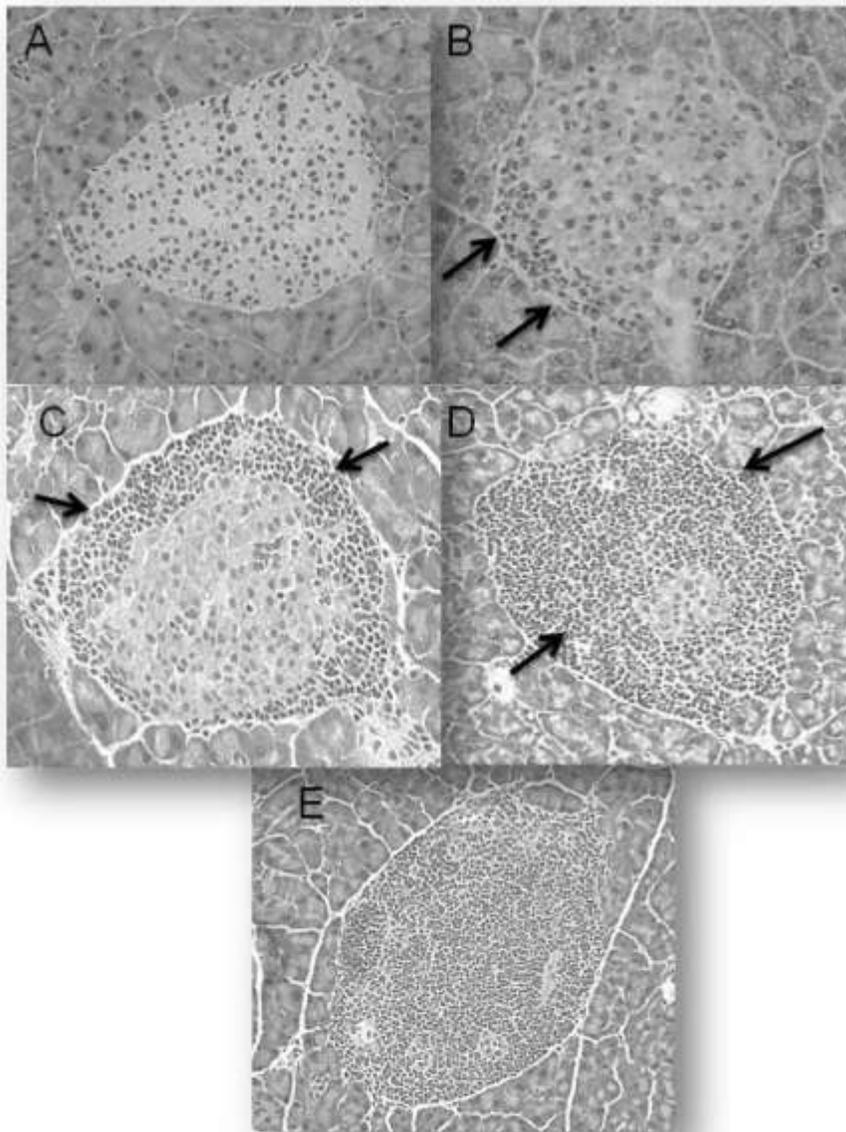
ELISA. Após esse procedimento, realizava-se a remoção do pâncreas juntamente com a retirada do fígado e dos rins. O fígado e os rins eram acondicionados em um tubo de plástico 2,0 mL (livre de RNase) contendo 1 mL de Ácido Tricloroacético (TCA) 5%, politronado e congelado em seguida, para futura análise de glutatona reduzida- GHS. O pâncreas era depositado em cápsulas contendo meio de inclusão O.C.T (Tissue Freezing Medium[®]) e rapidamente congelados em nitrogênio líquido. Essas inclusões eram submetidos à criocortes (Criostato – Leica, C M 1850) para estudo morfológico, imunofluorescência, apoptose e estresse oxidativo. As peças de pâncreas incluídas em O.C.T e as de fígado e rim em TCA 5% eram conservadas em bio-freezer a – 80 °C até a análise destinada.

3.13 Avaliação Histológica do Pâncreas

A avaliação histológica do pâncreas objetiva a análise da morfologia das ilhotas pancreáticas e de seu eventual grau de insulite. Os cortes histológicos eram feitos no criostato coletando uma série de 15 cortes consecutivos com 5 µm de espessura, depositados em lâminas histológicas previamente sinalizadas (γ -Methacryl-Oxipropil-Methoxysilane Sigma Co, St Louis, EUA). Após a obtenção da primeira série de cortes, o pâncreas era desbastado 150µm e, a seguir, outra série de 15 cortes era igualmente processada. As lâminas nº: 1, 15, 16, 30, 31 e 45 eram corados pela técnica HE (hematoxilina e eosina). Os cortes depois de corados eram submetidos à contagem de ilhotas pancreáticas e classificadas segundo o grau de infiltrado celular (insulite) em microscópio óptico. A classificação das ilhotas analisadas era realizada segundo os critérios estabelecidos por SIGNORE *e cols.* (85) e adaptado por Ventura-Oliveira D *e cols.*, (86):

- A) 0= normal
- B) 1= Peri-insulite, presença de <25% de infiltrado ao redor da ilhota
- C) 2= insulite moderada, 25-80% da ilhota invadida pelo infiltrado
- D) 3= insulite invasiva, >80% da ilhota invadida
- E) 4= insulite destrutiva, invasão total da ilhota pelo infiltrado.

200x



Prancha I: Classificação das ilhotas segundo os critérios para classificação do infiltrado. A) Ilhota com GRAU 0; B) Ilhota com GRAU 1; C) Ilhota com GRAU 2; D) Ilhota com GRAU 3; E) Ilhota com GRAU 4.

As ilhotas eram contadas e classificadas por grau, em três planos de cortes diferentes por órgão. Os resultados eram representados pela média e desvio padrão referentes ao número de ilhotas de cada grau / total contadas por animal, para cada grupo experimental, e calculado o índice de infiltrado celular, segundo a fórmula: $I = (0 \times N_0) + (1 \times N_1) + (2 \times N_2) + (3 \times N_3) + (4 \times N_4) / 4 \times (N_0 + N_1 + N_2 + N_3 + N_4)$, onde: 0, 1, 2, 3 e 4 representam os diferentes graus de insulite (como descrito anteriormente); N₀, N₁, N₂, N₃ e N₄, o número total de ilhotas com seus respectivos graus de infiltração e o I (índice) destruição total da ilhota. As lâminas subsequentes eram utilizadas para a caracterização linfocitária para CD4+, CD8+, CD11+, células em apoptose e estresse oxidativo.

3.14 Coloração HE (Hematoxilina e Eosina)

As lâminas n° 1,15,16,30,31 e 45 de cada animal era mantida por 15 minutos na acetona gelada. Após esse tempo os cortes eram colocados na hematoxilina por 1 minuto, lavado em água corrente seguindo de mais 5 minutos na Eosina, seguido de água corrente para retirada do excesso de corante. Em seguida 4 lavagens em álcool 99.5% eram feitas para eliminar o excesso de água. Durante 3 minutos as lâminas eram mantidas no xilol I (xilol 100%) e 5 minutos no xilol II (xilol 100%). As lâminas eram montadas com meio Entellan (Merk® KGaA, Darmstadt, Germany) para observação no microscópio óptico.

3.15 Imunofluorescência

Para a especificação do infiltrado inflamatório nas ilhotas pancreáticas era realizado a fenotipificação do infiltrado para linfócito T expressando marcadores CD4⁺ e CD8⁺ e CD11⁺ (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA) como marcador de superfície

proveniente dos cortes histológicos, através da técnica de imunofluorescência indireta. As lâminas eram mantidas por 15 min em acetona e lavadas 3 vezes por 10 min em PBS 1M pH 7,4 (tampão fosfato salino). Em seguida, uma solução bloqueio a 2% com soro de cabra era colocado sob os cortes por 2hrs em temperatura ambiente. Após esse período era lavado novamente os cortes com PBS 1M. A diluição dos anticorpos primários de cada um dos marcadores (CD4⁺, CD8⁺ e CD11⁺) era feita em solução diluente a 0,5% (10 mL PBS + 50 mg de BSA). Cada corte era incubado com o anticorpo primário overnight a 4°C. No dia seguinte os cortes eram lavados 3 vezes por 10 min em PBS 1M e incubados com anticorpo secundário por 2 hrs em temperatura ambiente. A montagem das lâminas eram feitas com meio de montagem DABCO (500 mg de Dabco + 18 mL de glicerol+1,2 mL de PBS1 M) e sua visualização era feita em microscópio para imunofluorescência (Nikon eclipse 80i, Japão). A análise de infiltrado inflamatório era feita pelo programa computacional para análise de imagem Image J[®] (NIH, EUA), licença aberta.

3.16 Análise de Insulina Sérica

A análise de insulina sérica seguiu o protocolo do ELISA Kit rat/mouse Insulin descrito pelo fabricante (Millipore[®], Bellirica, EUA). O soro dos animais eram colocados na placa junto com a curva na concentração de 0,2-10 ng/ μ L e os dois controles Q1 e Q2 provenientes do kit. Sua leitura era feita a 450nm e 590nm em espectrofotômetro de placa de ELISA e sua curva lida em 4 parâmetros.

3.17 Análise de Proteína – Hartree

A análise de proteína seguiu Hartree (87) com algumas modificações. As amostras de fígado e rim mantidas em TCA 5% eram diluídas 5 vezes em água e era adicionado 900µL de solução A (1g $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ + 50g $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ + 250 mL NaOH 1N + 500 mL H_2O), levada ao banho-maria a 50°C por 10 minutos. Na sequência adicionou-se 100 µL de solução B (2g NaCl + 1g $\text{CuSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ + 90 mL H_2O + 10 mL NaOH 1N) e manteve em temperatura ambiente por mais 10 minutos. Após esse tempo 3 mL da solução C (10 mL Folin Ceacalteau + 150 mL H_2O) era adicionada rapidamente, deixando em banho-maria 50°C por mais 10 minutos. A leitura era feita em espectrofotômetro a 650 nm. O valor encontrado de proteína era utilizado para calcular a quantidade de glutatona presente nas amostras de fígado e rim.

3.18 Análise GHS- Glutaciona Reduzida

As amostras de fígado e de rim eram descongeladas em temperatura de 2°C e centrifugadas a 4°C, 68 g., por 15 minutos em centrifuga Jouan MR23i[®]. O sobrenadante era coletado e mantido sobre gelo até o uso. Em uma placa para leitor de ELISA colocou 100 µL de tampão tris /EDTA (12 mg Tris+100 mL água, pH 8,2 / 37,5 mg EDTA +5mL água-misturar 100µL de EDTA na solução de Tris), 100 µL da curva de GSH (nas concentrações 2.5 a 500) e 100 µL das amostras de fígado e rim. Sua primeira leitura era feita a 412nm em espectrofotômetro. Após essa leitura, 20 µL de Reativo DTNB - ácido 5,5 – ditiobis-2-nitrobenzóico 10mM- (20 mg DTNB + 5 mL de Metanol) era aplicado em cada poço da placa. A placa era mantida no escuro, em temperatura ambiente por 15 minutos e após esse período era feita a segunda leitura a 412 nm. O cálculo da glutaciona era efetuado dividindo o valor total de proteína, estabelecido pela técnica de HARTREE, pelo valor de glutaciona

encontrado nas amostras de fígado e rim. O resultado era expresso em g/proteína (glutaciona).

3.19 Túnel para análise de células em Apoptose

As análises de apoptose eram feitas pelo Kit Insitu cell death detection, POD. (Roche) seguindo o protocolo estabelecido pelo fabricante. As lâminas eram montadas com meio Entellan (Merk® KGaA, Darmstadt, Germany) para observação no microscópio óptico (Nikon eclipse 80i, Japão) e seus resultados eram analisados pelo programa computacional Image J® (National Institute of Mental Health, USA).

3.20 Estresse Oxidativo em cortes histológicos

Para a análise de estresse oxidativo utilizou-se o Kit OxyLHC-Oxidative Stress Detection (Millipore, Billerica, USA) com algumas modificações. As lâminas de cada animal eram fixadas em methacarn (30mL metanol + 15mL clorofórmio+ 5mL ácido acético glacial) por 15 minutos. O bloqueio era feito com água oxigenada 3% por 10 minutos. Os processos seguintes seguiram os passos estabelecidos pelo fabricante. As lâminas eram montadas com meio Entellan (Merk® KGaA, Darmstadt, Germany) para observação no microscópio óptico (Nikon eclipse 80i, Japão).

3.21 Análise Estatística

Os resultados eram expressos como média e desvio padrão e submetidos à análise teste *t-Student* ou quando necessário de variância (ANOVA) entre grupos, seguindo pelo teste *Turkey* para análise de contrastes. Serão considerados os dados estatísticos significativos com $p < 0.05$.

3.22 Formatação do Texto

Para formatação das citações e referências bibliográficas, empregou-se o programa computacional EndNote X3 (Copyright© The Thompson Corporation.EUA) e o formato Vancouver, segundo as normas da Comissão de Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas- Unicamp.



4.RESULTADOS

4.1 Atividade Antioxidante pelas técnicas DPPH, FRAP, ABTS e ORAC nos extratos Aquoso, Etanol e Metanol/Acetona

A porcentagem da atividade antioxidante (%AA) pelo método DPPH, corresponde à quantidade de DPPH consumida pelo extrato. O extrato aquoso apresentou maior sequestro ($56,1 \pm 5,9$) quando comparado com os outros dois extratos, etanólico ($38,4 \pm 3,3$) e metanólico/acetônico ($41,3 \pm 4,2$). Já a análise FRAP apresentou resultados semelhantes ao DPPH, sendo que o extrato aquoso ($226,9 \pm 4,9$) mostrou atividade antioxidante maior quando comparado com o etanólico ($145,1 \pm 5,3$) e metanólico/acetônico ($199,5 \pm 7,6$) (Fig.4, A pág. 64 e B ,pág. 64).

A técnica ABTS apresentou resultados semelhantes a técnica DPPH, sendo o extrato aquoso com maior atividade (3439 ± 188), seguido pelo etanólico (1733 ± 436) e metanólico/acetônico (1127 ± 41). Já a técnica ORAC não apresentou diferenças estatísticas significativas entre os extratos aquoso ($302,1 \pm 19,4$), etanólico ($318,0 \pm 5,0$) e metanólico/acetônico ($291,0 \pm 17,0$). (Fig.5 A pág.65 e B, pág.65).

4.2 Fênois Totais dos extratos Aquoso, Etanol e Metanol/Acetona

A análise de fênois totais das folhas de *Passiflora alata* mostrou uma concentração de fênois maiores no extrato aquoso ($9,5 \pm 2,8$) que o extrato etanólico ($5,5 \pm 1,6$) e extrato metanólico/acetona ($4,9 \pm 0,3$) (Fig.6, pág.66).

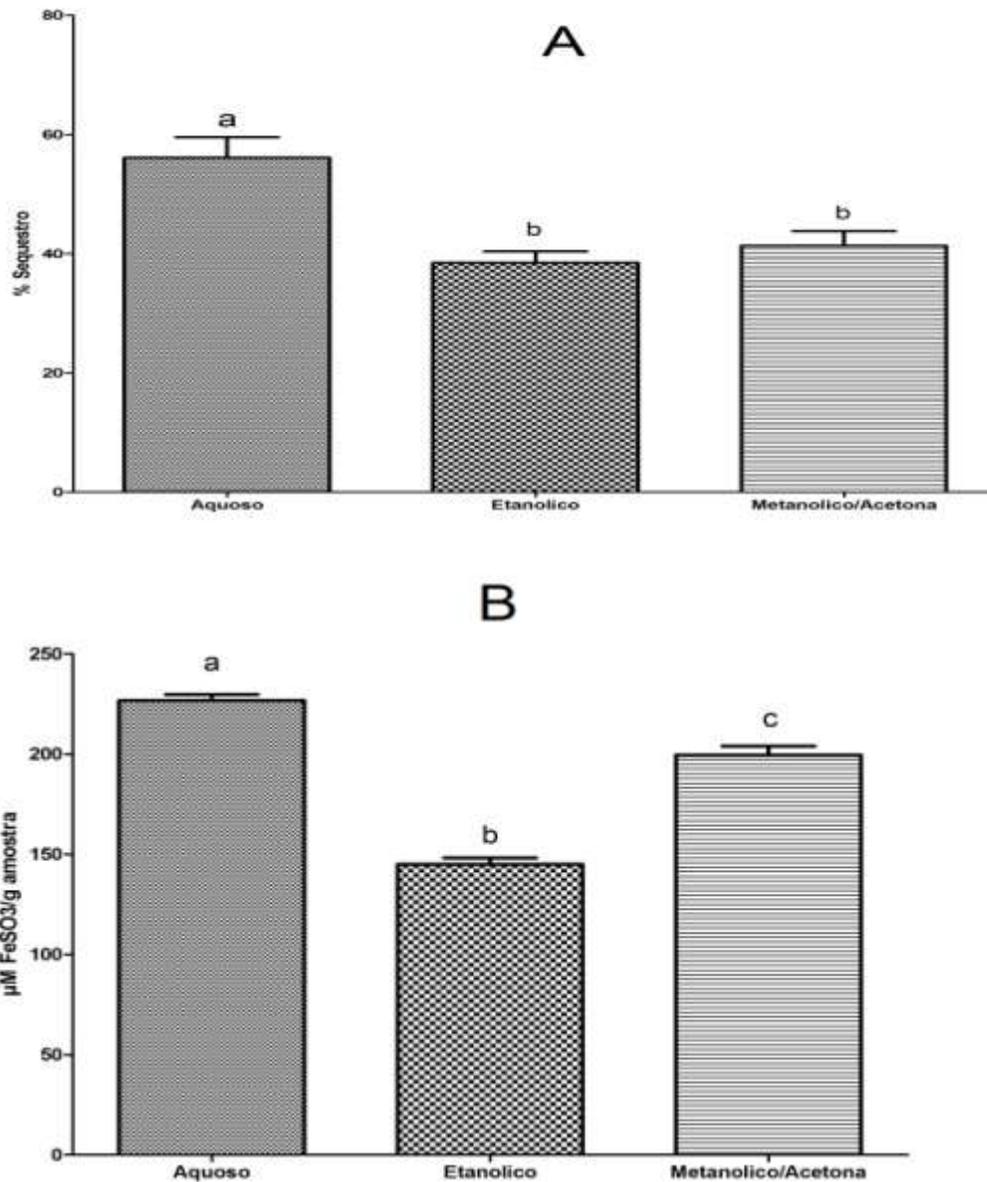


Figura 4: (A) Porcentagem de sequestro do radical DPPH nos extratos aquoso, etanólico e metanólico/acetônico. Os resultados são expressos em porcentagem de sequestro e as diferentes letras demonstram diferença estatísticas entre os extratos ($p=0,007$); (B) Análise da atividade antioxidante pelo método FRAP nos extratos aquoso, etanólico e metanólico/acetônico. Os resultados são expressos em expressos em média \pm desvio padrão de $\mu\text{M FeSO}_3/\text{g}$ e as diferentes letras demonstram diferença estatísticas entre os extratos ($p=0,0001$).

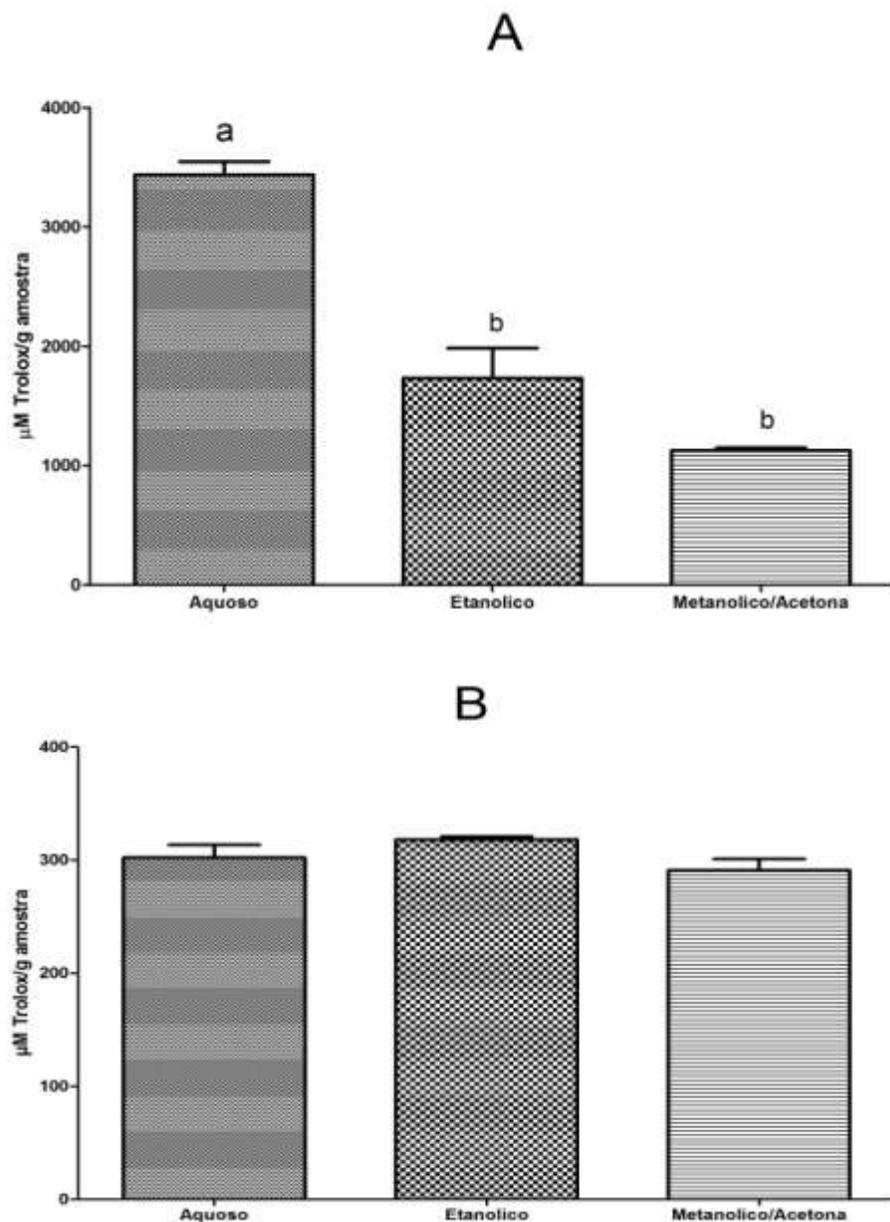


Figura 5: (A) Análise da atividade antioxidante pelo método ABTS nos extratos aquoso, etanólico e metanólico/acetônico. Os resultados são expressos em μM Trolox/ g amostra ($p=0,0001$); (B) Atividade antioxidante pelo método ORAC nos extratos aquoso, etanólico e metanólico/acetônico ($p=0,174$). Os resultados são expressos em média \pm desvio padrão de μM Trolox/ g amostra e as diferentes letras demonstram diferenças estatísticas entre os extratos

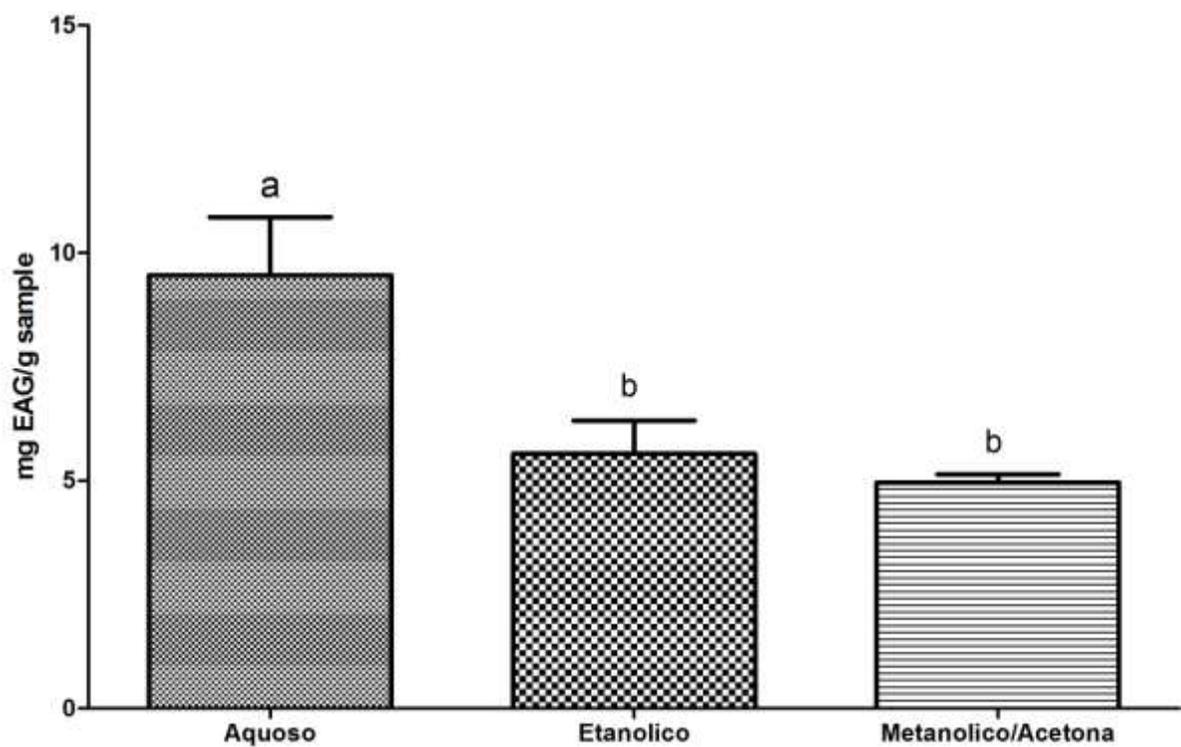


Figura 6: Fénois totais nos extratos aquoso, etanólico e metanólico/Acetona com resultados são expressos em média \pm desvio padrão de mg EAG/ g amostra. As diferentes letras representam diferença estatística entre os extratos ($p=0,005$).

4.3 Identificação da Composição Centesimal e Fibras das Folhas de *P.alata*

Na análise da composição centesimal das folhas de *P.alata* foi avaliado o percentual de proteínas, lipídeos, cinzas, carboidratos e fibras. Os resultados mostraram que existe uma concentração elevada de carboidratos e proteínas (63,72%; 20,10%), seguido do teor de fibras (11,9%), cinzas (8,16%), umidade (6,68%) e de lipídeos (1,34%) (Tabela 2, pág.68).

4.4 Identificação dos Compostos Vitexina, Isovitexina, Isoorientina e Apiginina por HPLC-DAD ; MS/MS

A análise dos extratos aquoso, etanólico e metanólico/acetônico por HPLC-DAD conseguiu identificar apenas três flavonoides: vitexina, isovitexina e isoorientina, sendo confirmado pelo análise MS/MS (Fig. 7, pág.69). A avaliação era realizada com base no tempo de retenção em HPLC (vitexina r^2 0,9997; isovitexina r^2 0,9997 ; isoorientina r^2 0,9991) e usando o espectro UV/PDA para comparação dos padrões. Além disso, o MS/MS foi realizado para confirmar a presença desses compostos e os picos observados apresentaram a mesma massa molecular (m / z 433,113 e 449,108) (Fig. 8. pág 70, Fig 9 pág.71 e Fig 10 pág.72).

Folha de <i>P.alata</i>	
Carboidrato	63,72
Proteína	20,10 ±0,33
Cinzas	8,16 ±0,39
Umidade	6,68 ±0,09
Lipídeos	1,34 ±0,40
Fibras	11,9 ±0,2

Tabela 2: Composição centesimal e fibras da folha de *P.alata* . Os resultados são expressos para carboidrato, proteína, cinzas, umidade e lipídeos em um total de 100% e porcentagem de fibras com média ± desvio padrão.

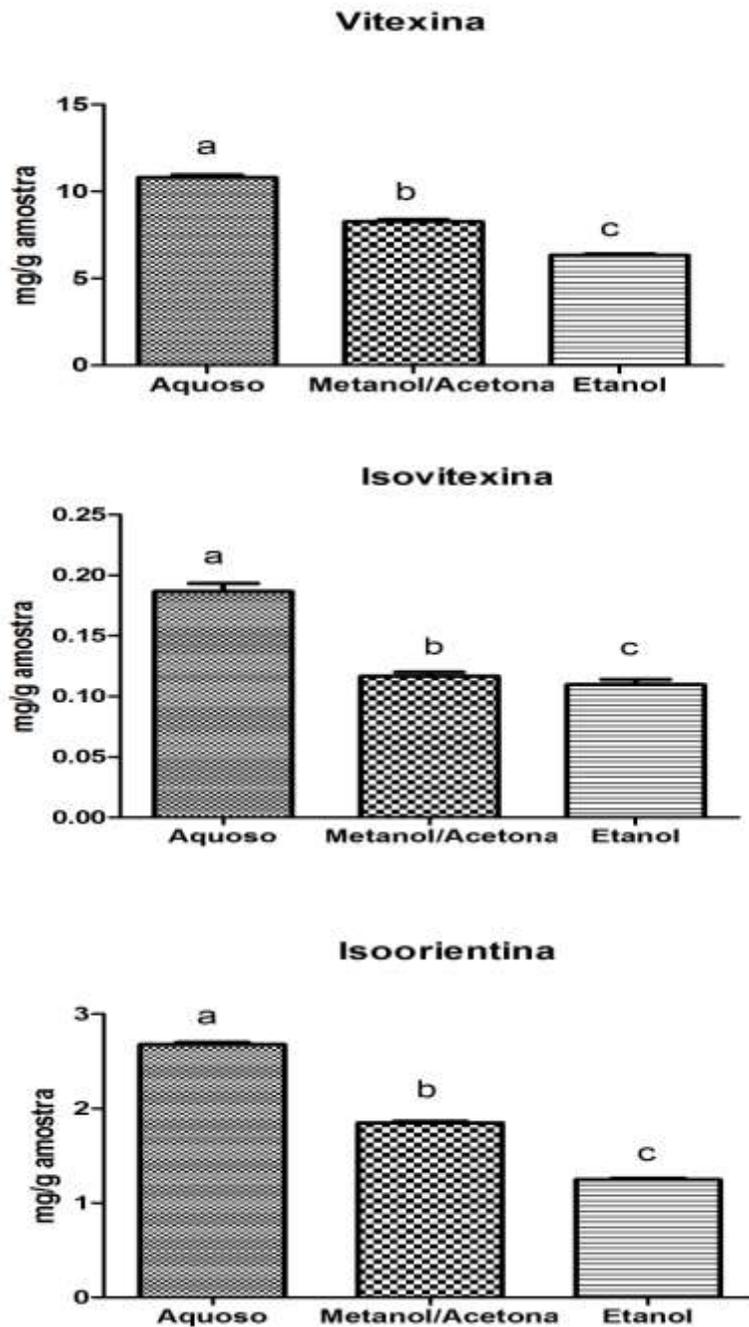


Figura 7: Compostos fenólicos. Vitexina, no extrato aquoso ^ap=0,0002; Metanol/Acetona ^bp=0,0001; Etanol ^cp=0,0002. Isovitexina no extrato aquoso ^ap=0,0001; Metanol/Acetona ^bp=0,0001; Etanol ^cp=0,0001 e Isoorientina, no extrato aquoso ^ap=0,0013; Metanol/Acetona ^bp=0,0008; Etanol ^cp=0,0016. Resultados expressos em média ± desvio padrão e as diferentes letras representam diferenças estatísticas.

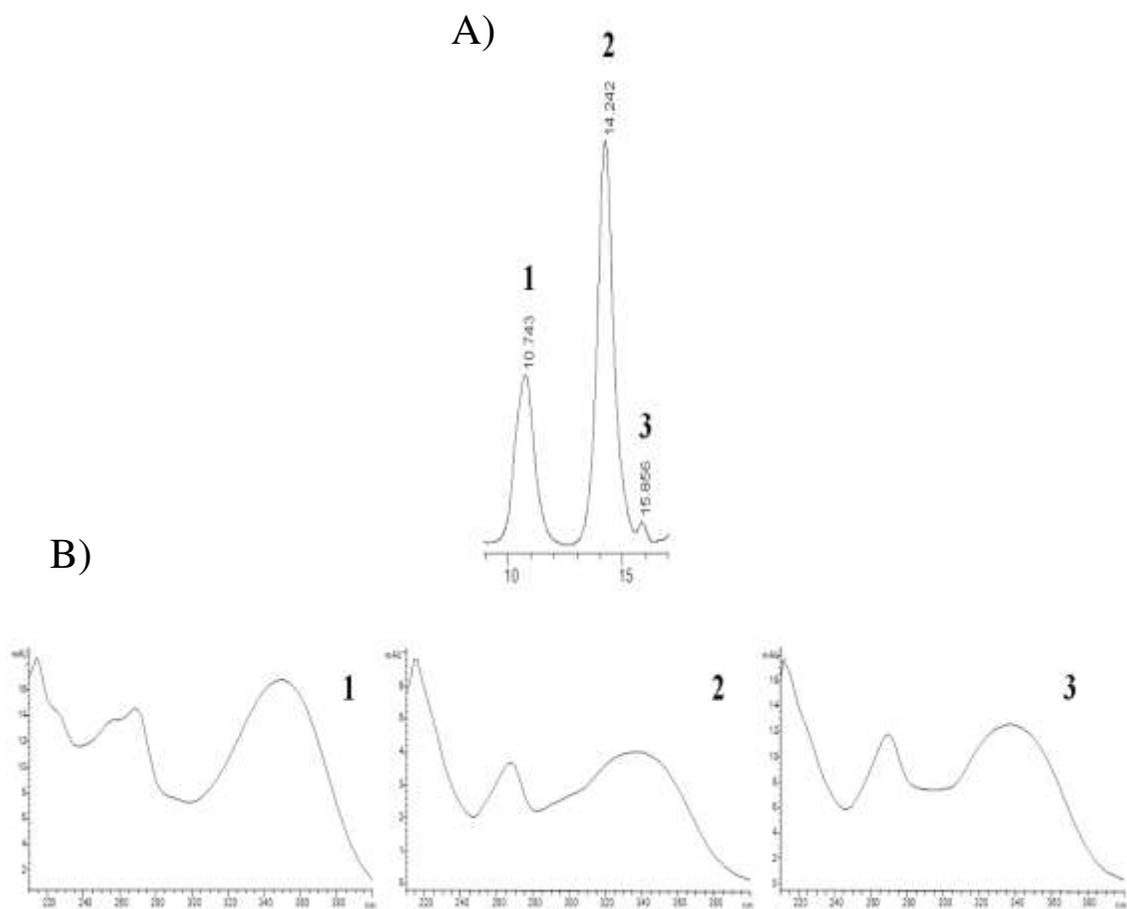


Figura 8: A) Cromatograma HPLC-UV/PDA ($\lambda=350\text{nm}$) do extrato aquoso das folhas de *P.alata*. B) (1) Espectro UV/PDA do composto isorientina; (2) Espectro UV/PDA do composto vitexina; (3) Espectro UV/DAD do composto isovitexina.

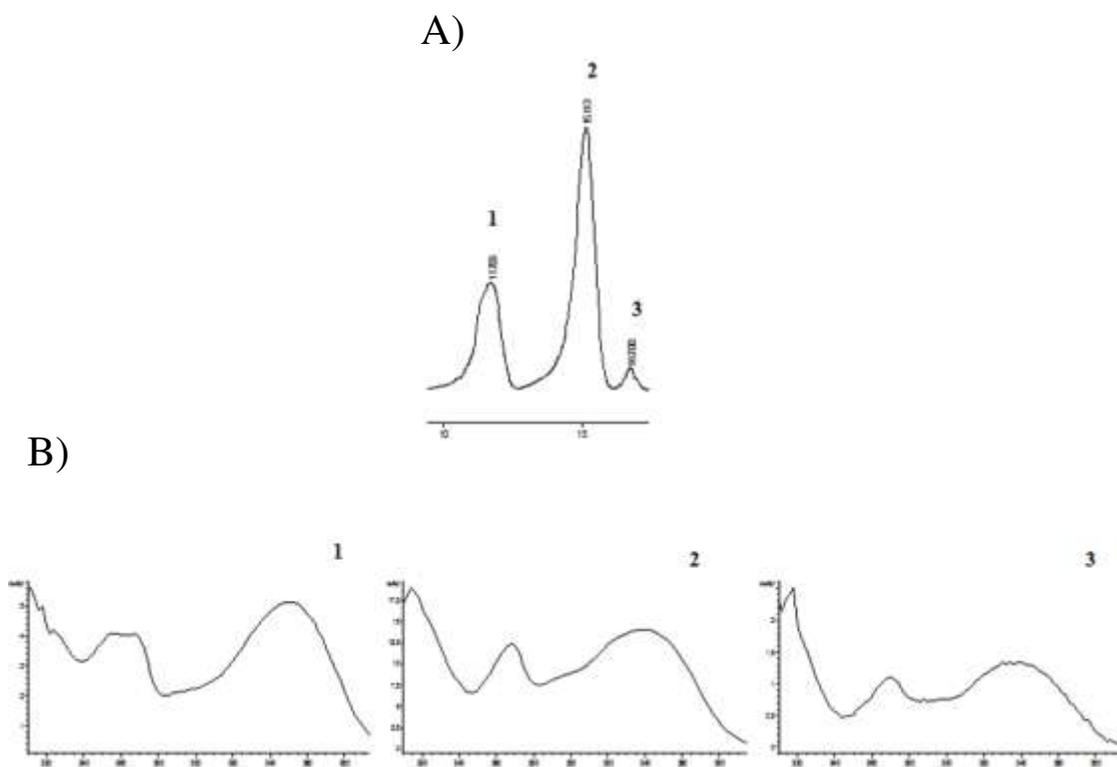


Figura 9: A) Cromatograma HPLC-UV/PDA ($\lambda=350\text{nm}$) do extrato etanólico das folhas de *P.alata*. B) (1) Espectro UV/PDA do composto isoorientina; (2) Espectro UV/PDA do composto vitexina; (3) Espectro UV/DAD do composto isovitexina.

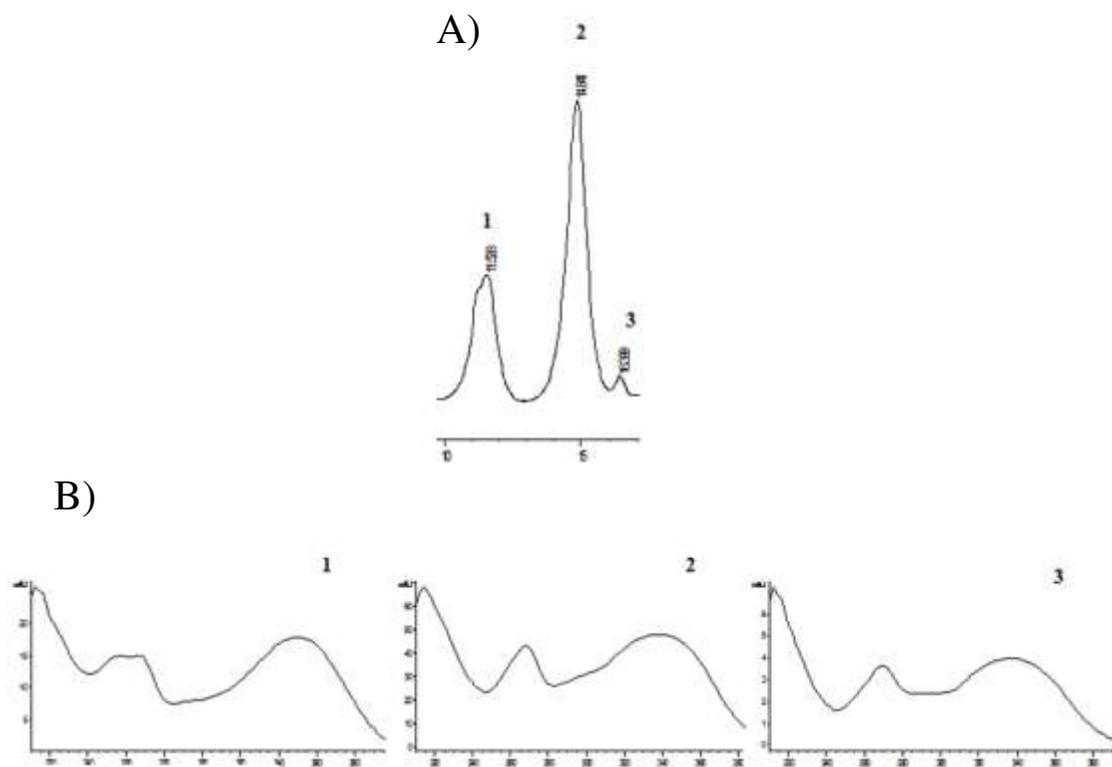


Figura 10: A) Cromatograma HPLC-UV/PDA ($\lambda=350\text{nm}$) do extrato metanólico/acetona das folhas de *P.alata*. B) (1) Espectro UV/PDA do composto isorientina; (2) Espectro UV/PDA do composto vitexina; (3) Espectro UV/DAD do composto isovitexina.

4.5 Controle Biológico do extrato Aquoso

O controle microbiológico era feito em placas com meio Saborou e meio Agar Sangue para verificação de fungos e bactérias presentes no extrato aquoso. A análise era feita antes do extrato aquoso ser oferecido para os animais e após o seu consumo. Em nenhuma análises apresentou contaminação desse extrato.

4.6 Consumo do extrato aquoso de *P.alata*

O consumo de água e extrato aquoso dos camundongos NOD era mensurado a cada dois dias. Os resultados do consumo de água ($32,7 \pm 3,06$) e extrato aquoso ($33,4 \pm 2,4$) não apresentaram diferença estatística significativa entre os dois grupos (Fig. 11. pág.74).

4.7 Efeito do tratamento com extrato Aquoso de *P.alata* sobre a manifestação do diabetes auto imune espontâneo

O tratamento de camundongos NOD com extrato aquoso de *P.alata* mostrou-se capaz de reduzir a manifestação do diabetes, visto que 38% dos animais tratados (16/42) desenvolveram a doença. Por outro lado, nos animais controle verificou-se a ocorrência de incidência da doença em 63,3% dos animais (19/30) (Fig. 12, pág. 75).

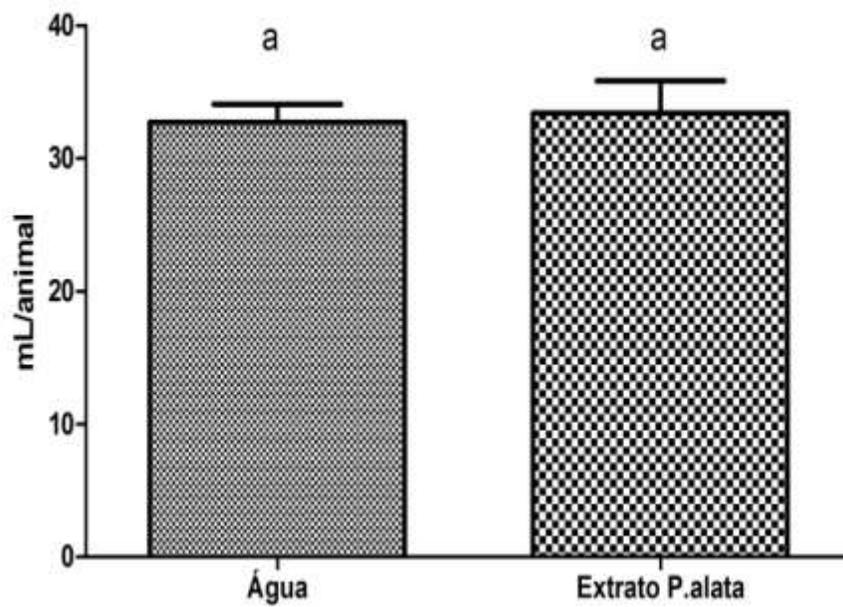


Figura 11: Consumo semanal de água e extrato aquoso dos camundongos NOD. Consumo de água $32,7 \pm 3,06$; Consumo de extrato aquoso $33,4 \pm 2,4$.

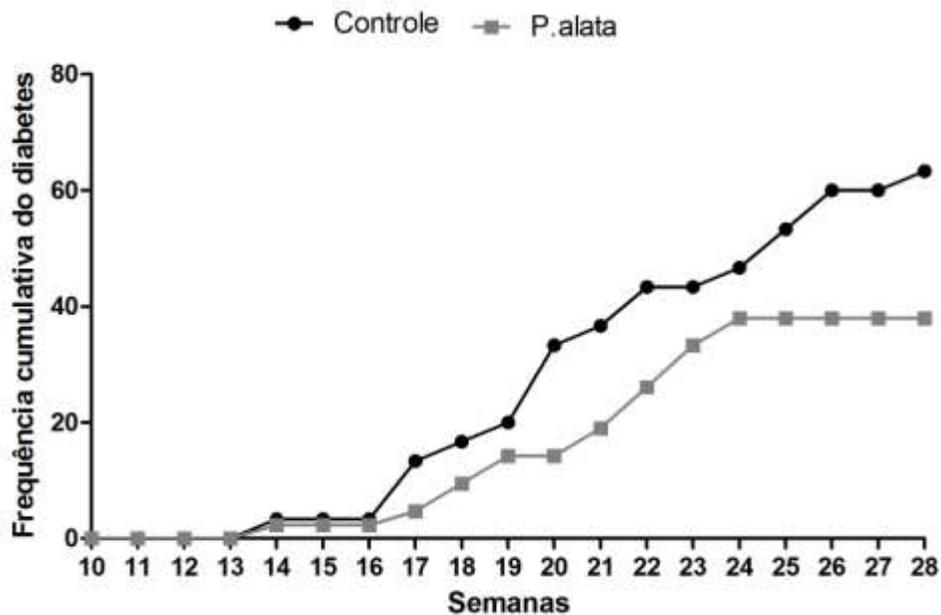


Figura 12: Frequência cumulativa sobre a incidência do diabetes nos camundongos NOD submetido ao tratamento com extrato aquoso de *P.alata* ou controle. Observa-se que 38% (16/42) dos animais tratados ficaram diabéticos, enquanto 63,3% (19/30) apresentaram a doença.

4.8 Efeito do tratamento com extrato aquoso *P.alata* sobre o processo inflamatório e índice de infiltrado nas Ilhotas Pancreáticas

A quantificação do grau de infiltrado nas ilhotas de animais tratados com *P.alata* e controle foram determinados por meio do grau de infiltrado linfomononuclear (Fig.13, pág. 77).

A análise morfológica pela coloração de H.E, seguida pela classificação das ilhotas segundo o grau de infiltrado celular revelou que nos animais não diabéticos e diabéticos tratados com extrato aquoso de *P.alata*, apresentou maior quantidade de ilhotas com grau I e II comparada com os animais não diabéticos e diabéticos do grupo controle que apresentou ilhotas de grau II e III. A partir do índice de insulite, pode-se observar que os animais tratados com *P.alata* apresentam resultados $0,56\pm 0,05$, no *P.alata* diabético $0,64\pm 0,01$, nos animais controle $0,63\pm 0,05$ e no controle diabético $0,67\pm 0,01$ (Fig. 14,pág.78).

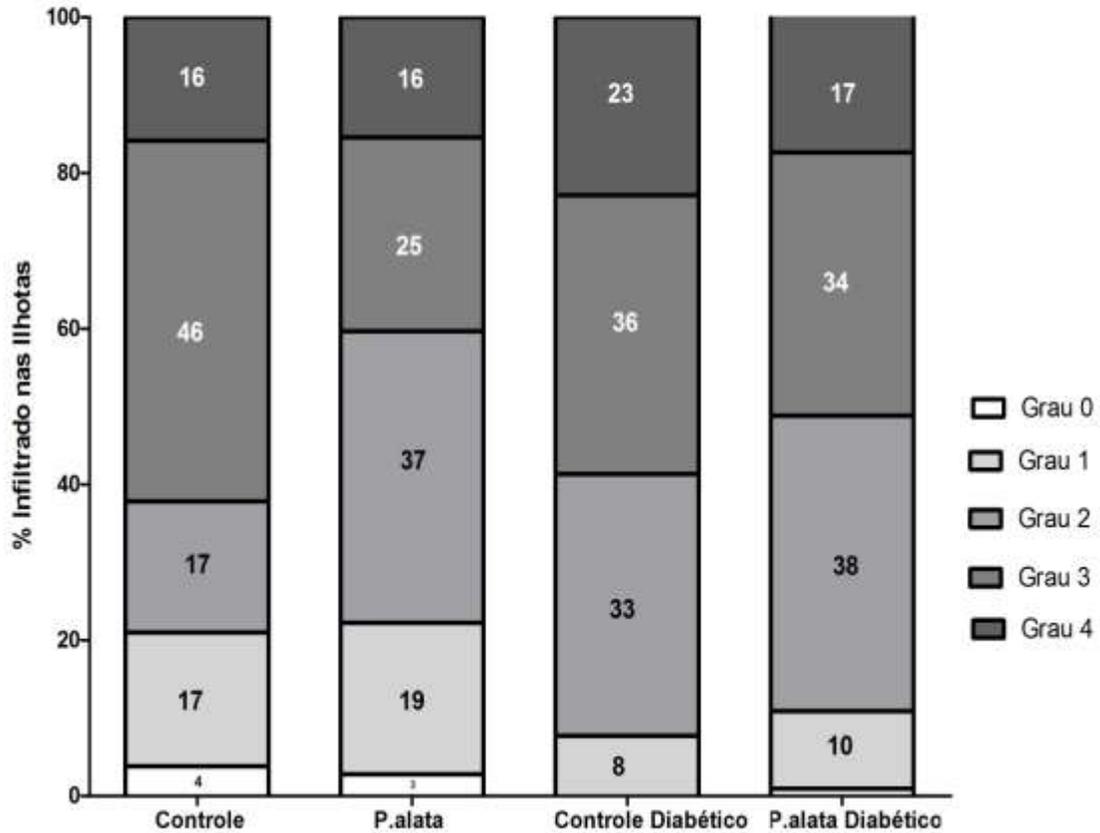


Figura 13: Gráfico representativo da classificação das ilhotas pancreáticas segundo o grau de insulite em camundongo NOD controle (n=5), tratado com P.alata (n=5) controle diabético (n=5), e tratado com P.alata diabético (n=5). Cerca de 90 ilhotas foram analisadas por grupo.

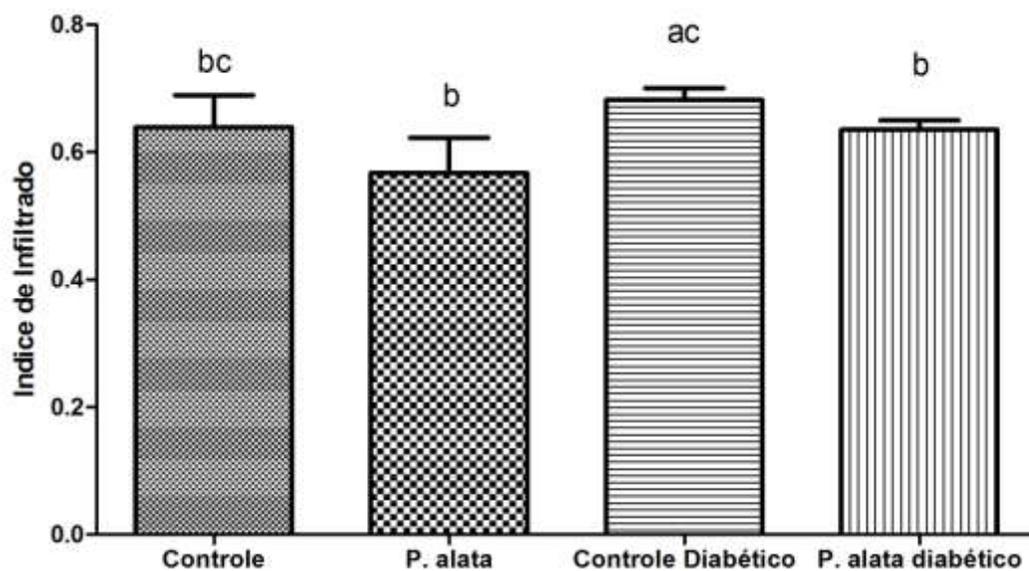


Figura 14: Índice de infiltrado celular em ilhotas de camundongos NOD tratados com *P.alata* e os animais controles. Os resultados estão expressos por média \pm desvio padrão; as diferentes letras representam diferença estatística entre os grupos, onde o Controle $p=0,0002$; *P.alata* $p=0,0005$; Controle Diabético $p=0,0001$; *P.alata* Diabético $p=0,0001$. Cerca de 90 ilhotas foram analisadas por grupo.

4.9 Imunofluorescência

A análise de imunofluorescência do infiltrado insular revelou a presença de linfócitos para CD4⁺, CD8⁺ e macrófagos (CD 11c⁺), especialmente intensos em animais diabéticos independente do tratamento (Prancha II, pág 80,81 e 82).

Nos animais não diabéticos do grupo *P.alata* observou-se a presença de infiltrado nas ilhotas pancreáticas constituído de CD4⁺, CD8⁺ e CD11c⁺. Já nos animais não diabéticos do grupo Controle observou-se aumento no número dessas células CD4⁺, CD8⁺ e CD11c⁺.

Foi possível verificar também aumento de células de CD4⁺, CD8⁺ e macrófagos nos animais diabéticos tratados e não tratados do grupo controle, ocupando quase a totalidade da ilhota (Prancha II- figuras C, D, G, H, K e L, pág. 80,81e 82).

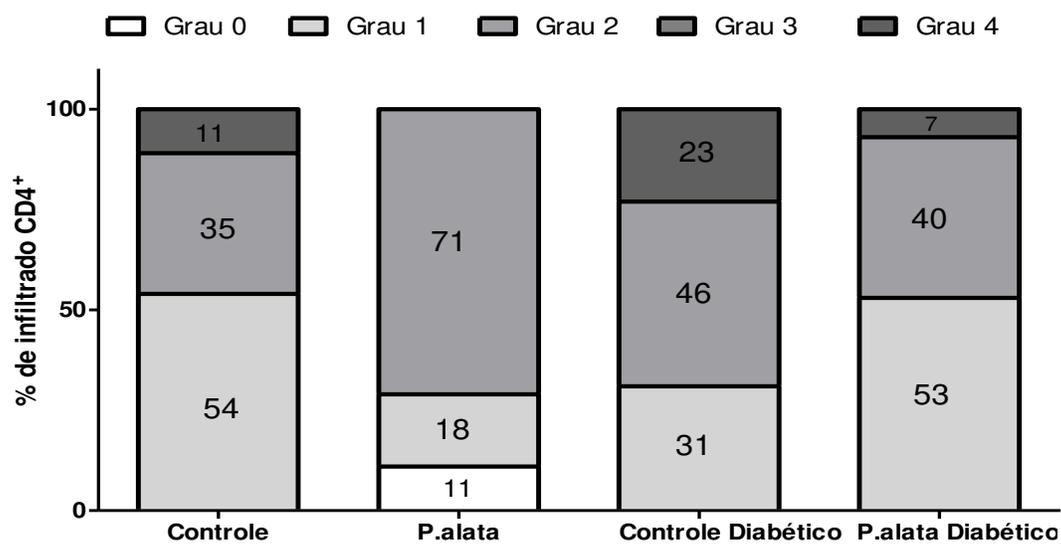
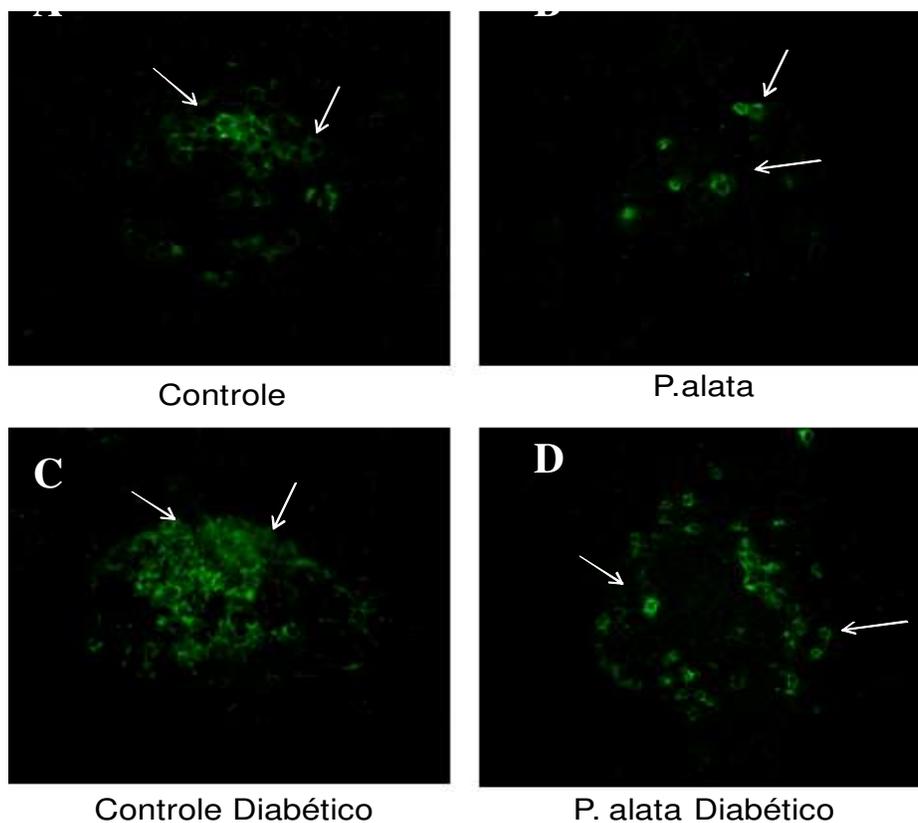
A análise de infiltrado nas ilhotas pancreáticas pelo programa Image J ® mostrou que os animais tratados (não diabéticos e diabéticos) apresentaram grau de infiltrado I e II e os animais controle (não diabéticos e diabéticos) ilhotas com grau II e IV.

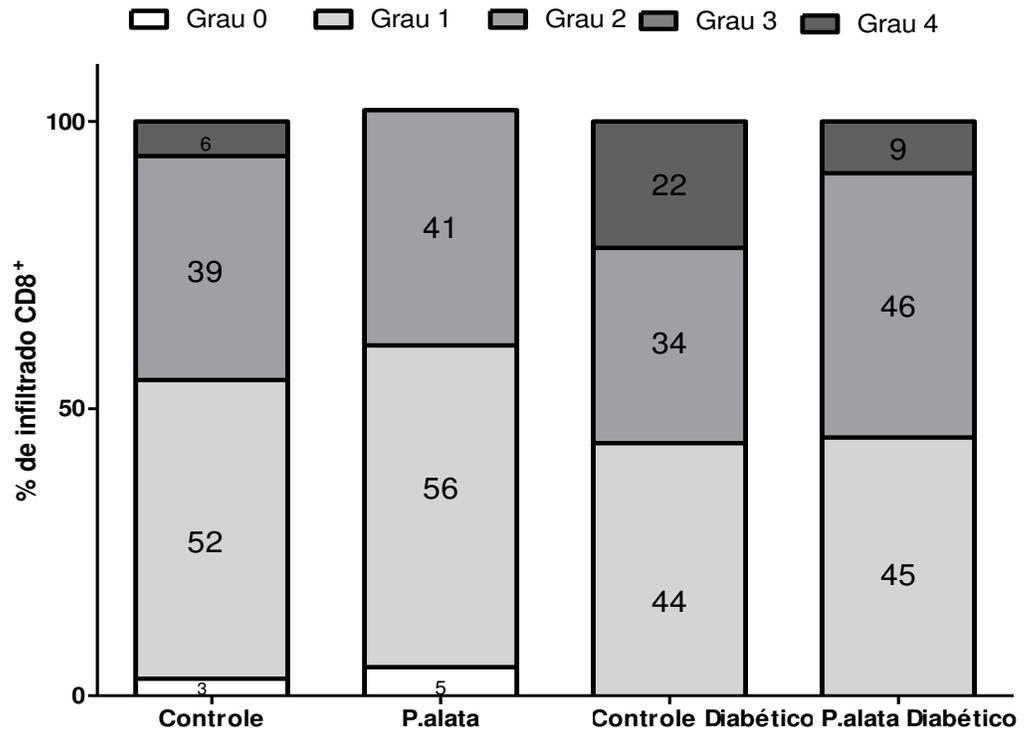
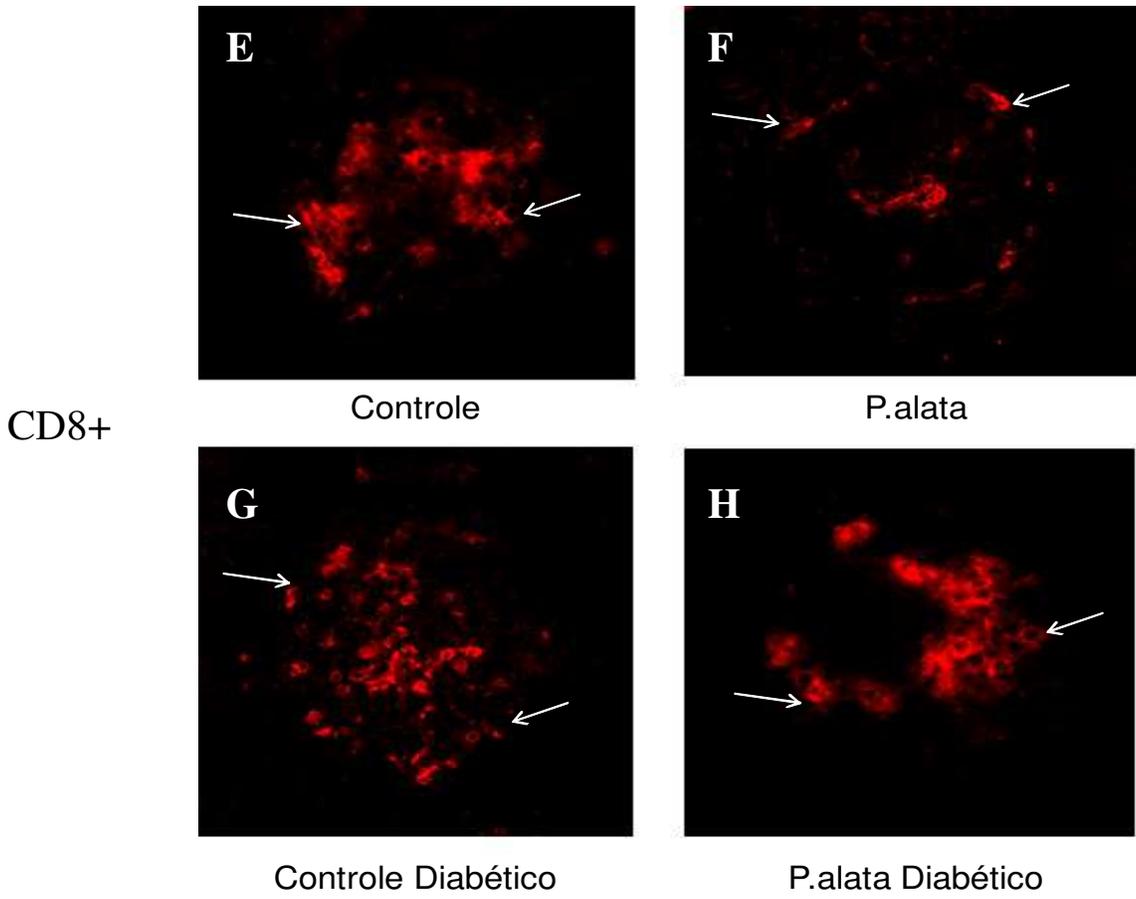
Prancha II - Imunofluorescência para detecção de células CD4⁺, CD8⁺ e macrófagos (CD 11c⁺) em camundongos NOD.

- **CD4+:** (A) Controle ; (B) *P.alata*; (C) Controle Diabético; (D) *P.alata* Diabético.
- **CD8+:** (D) Controle; (F) *P.alata*; (G) Controle Diabético; (H) *P.alata* Diabético.
- **CD11c+:** (I) Controle; (J) *P.alata* ; (K) Controle Diabético; (L) *P.alata* Diabético.

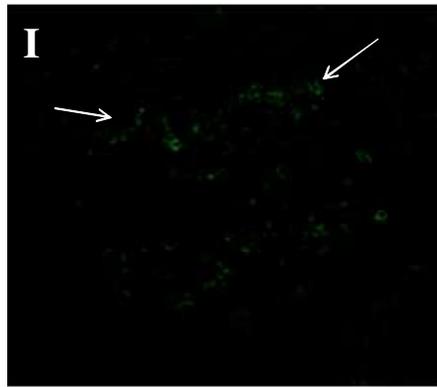
Aumento de 200x.

CD4⁺

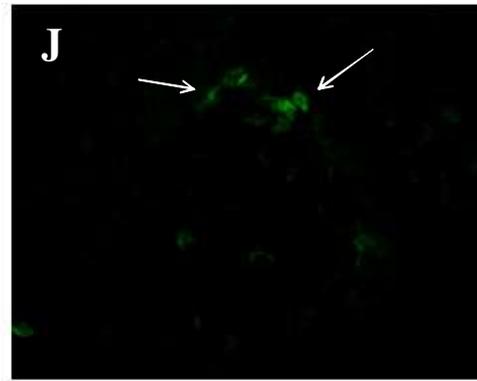




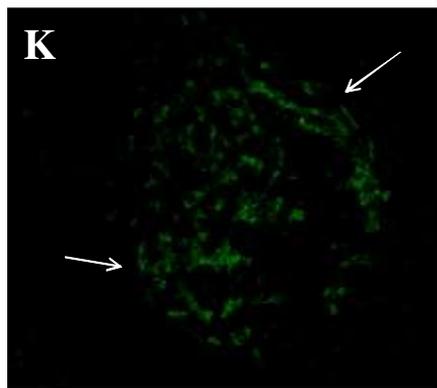
CD11⁺



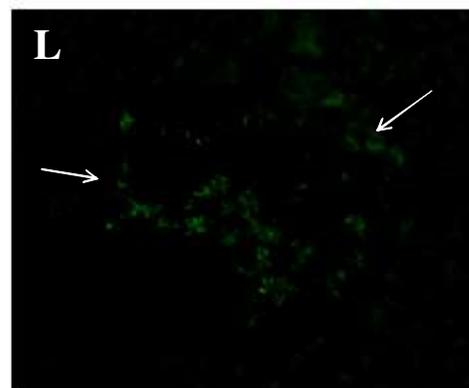
Controle



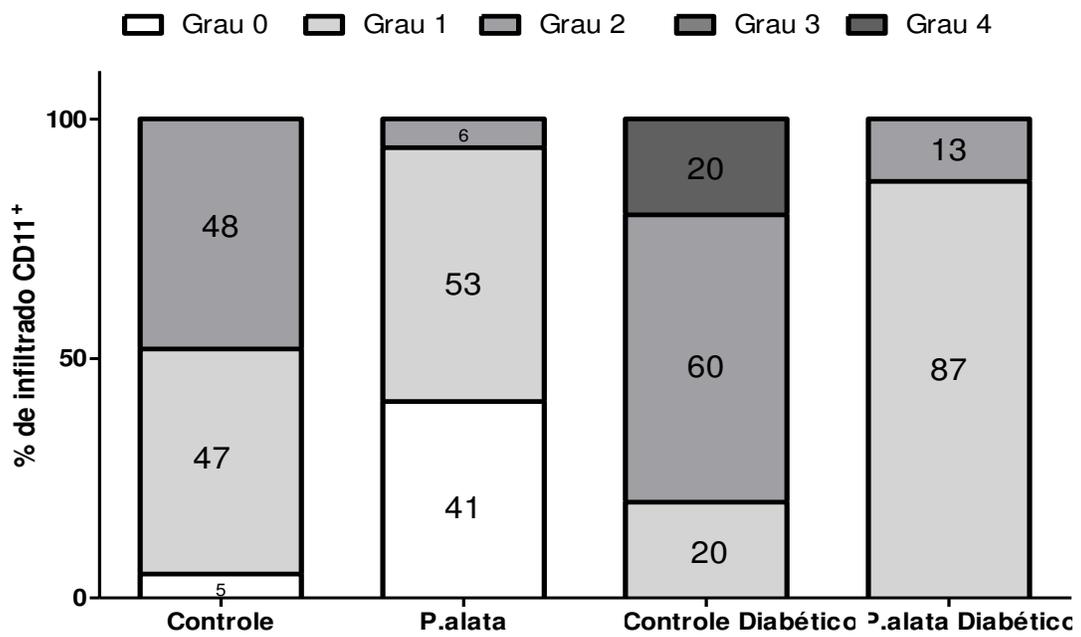
P.alata



Controle Diabético



P.alata Diabético



4.10 Efeitos do extrato Aquoso sobre a concentração sérica de Insulina-Elisa

A insulina foi dosada no soro dos animais controle e tratados com o extrato aquoso pela técnica ELISA. Os níveis séricos de insulina (Fig. 15, pág 84) nos animais não diabéticos do grupo controle e grupo tratado não apresentaram diferença estatística. Todavia nos animais diabéticos, o grupo tratado apresentou níveis de insulina maiores que no grupo controle.

4.11 Níveis de glutathiona presentes no fígado e rins do camundongo NOD

A quantidade de glutathiona – GSH era analisada no fígado e rim dos camundongos NOD fêmeas. Para exclusão de outras proteínas presentes nesses órgãos era feita a técnica de Hartree.

O fígado dos animais tratados com o extrato do *P.alata* apresentaram quantidades de glutathiona superiores (*P.alata* 6795±1970; *P.alata* DM 2537±287) aos animais controle (controle 4588±659; controle DM 1463±115) como demonstrado na Fig. 16 A ,pág.85.

O rim dos animais tratados (*P.alata* 4071±1220 ; *P.alata* DM 2666±627) também apresentaram também valores superior aos animais controle (controle 2160±1415; controle DM 2100±524) Fig. 16 B, pág. 85.

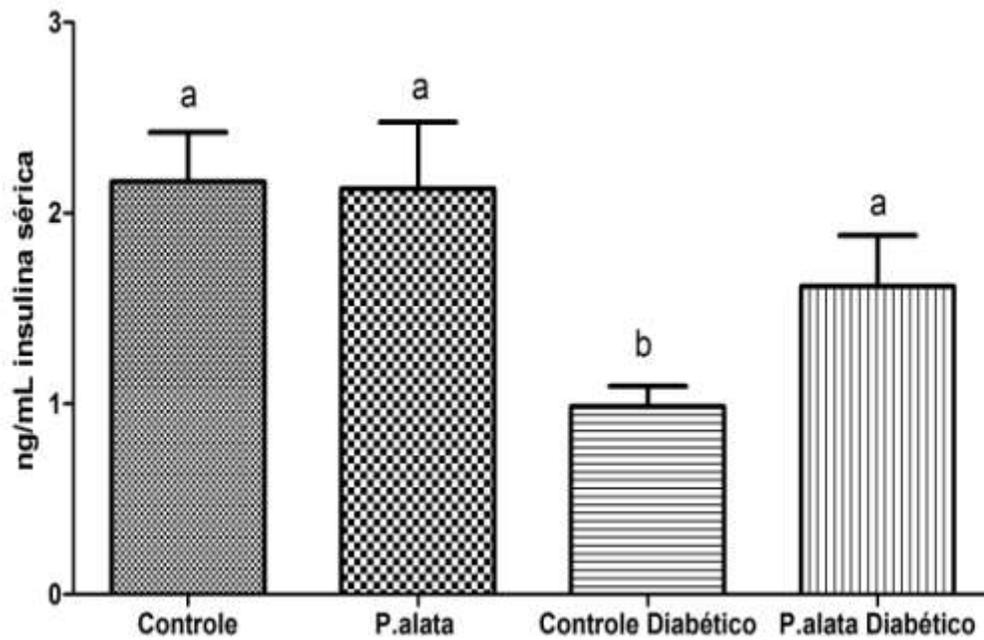
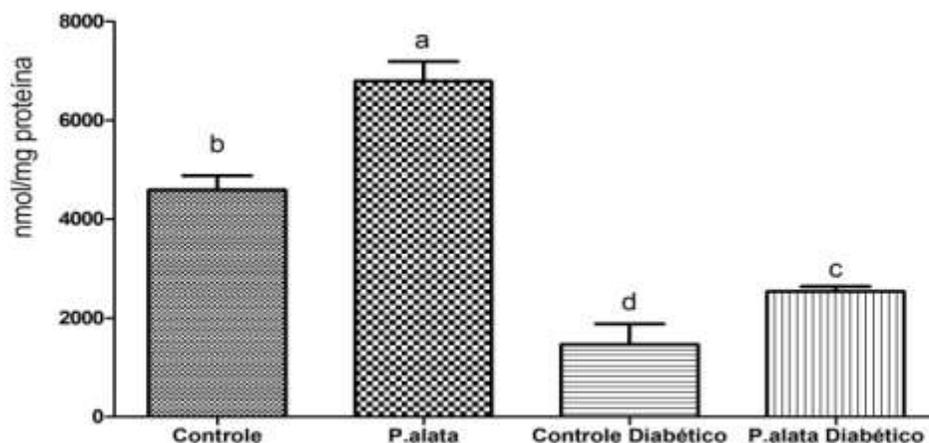


Figura 15: Dosagem séricas de insulina pelo método imunoenzimático ELISA em camundongos NOD tratados com extrato aquoso de *P.alata*, diabéticos (n=15) e não-diabéticos (n=15) e não tratados, também diabéticos (n=15) e não-diabéticos (n=15). Os resultados estão expressos pela média \pm desvio padrão (p=0,012).

A



B

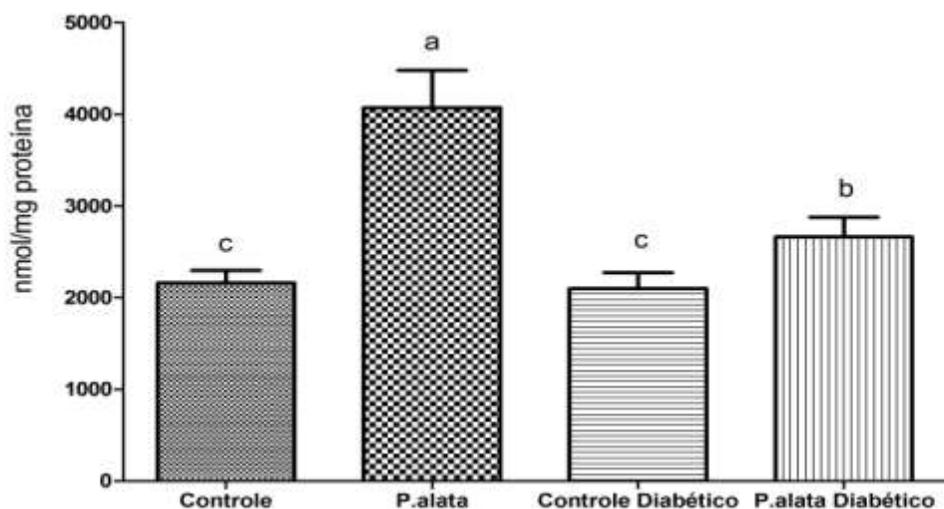


Figura 16: Níveis de glutatona reduzida; (A) Glutaciona presente no fígado de camundongos NOD fêmeas do grupo controle (n=5); ^bp<0,0001, grupo *P.alata* (n=5); ^ap<0,0001, grupo controle diabético (n=5); ^dp<0,0128 e *P.alata* diabético (n=5); ^cp=<0,0001 (p=0,0007); (B) Glutaciona presente no rim de camundongos NOD fêmeas do grupo controle (n=5); ^cp=0,0001, grupo *P.alata* (n=5); ^ap=0,0001, grupo controle diabético (n=5); ^cp=0,0001 *P.alata* diabético (n=5); ^bp=0,0001. Os resultados são expressos em média ± desvio padrão e as diferentes letras representam diferenças estatísticas.

4.12 Identificação de células em Apoptose nas Ilhotas Pancreáticas

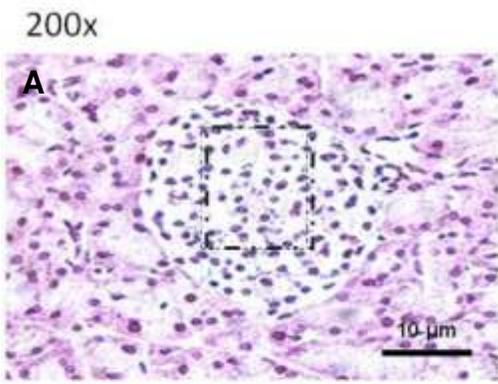
A identificação das células em apoptose era feita por Tunel em ilhotas de nove cortes do pâncreas (n=3). As células apoptóticas eram identificadas pela coloração castanha como demonstrado na prancha III, pág. 87.

Os animais do grupo controle não diabéticos e diabéticos apresentaram grau de células I e IV. Já os animais do grupo tratado não diabéticos células grau I e nos diabéticos grau I e IV (Fig. 17, pág.89).

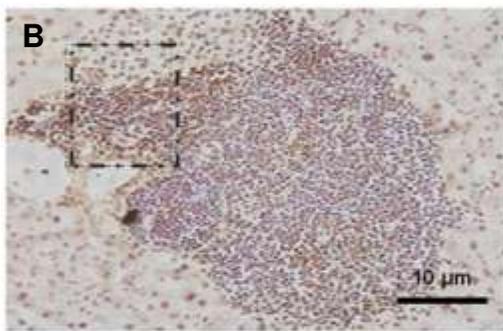
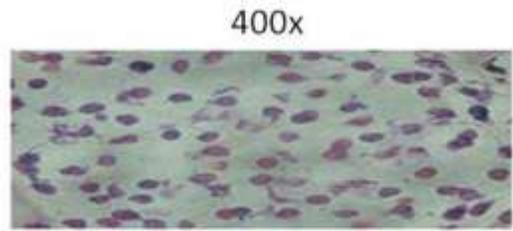
4.13 Estresse Oxidativo nas Ilhotas Pancreáticas

O estresse oxidativo era analisado em nove cortes histológicos do pâncreas (n=3) e suas ilhotas classificadas nos diferentes graus (0,1,2,3 e 4). Os animais do grupo controle apresentaram grau de estresse II ; III e os animais tratados com o extrato aquoso das folhas apresentaram ilhotas com grau II (Prancha. IV, pág. 90). Os resultados eram apresentados como porcentagem de estresse oxidativo presente nas ilhotas como demonstrado na figura 18, pág 92.

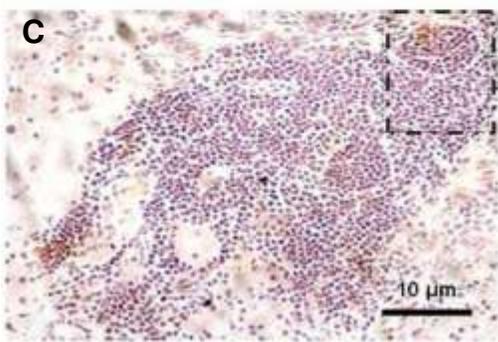
Aumento de 400x



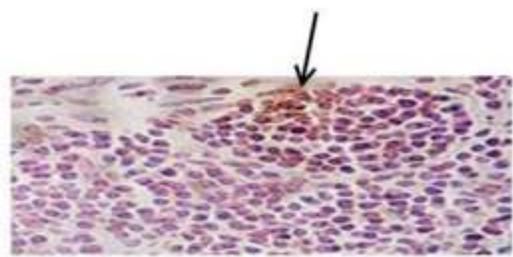
Balb/c



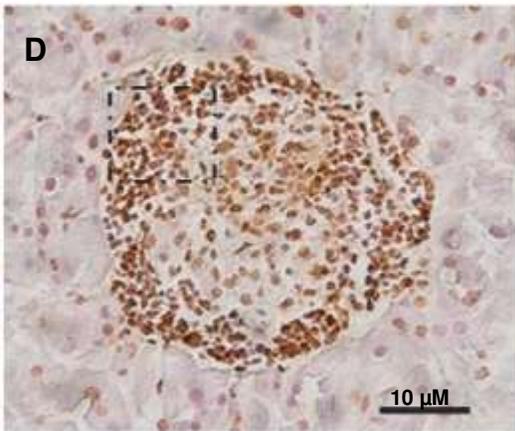
Controle 28 sem



Palata 28 sem

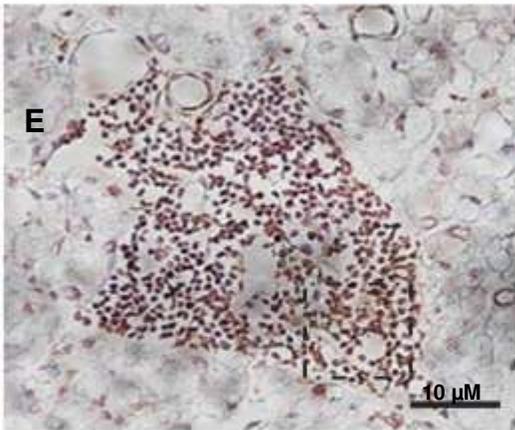
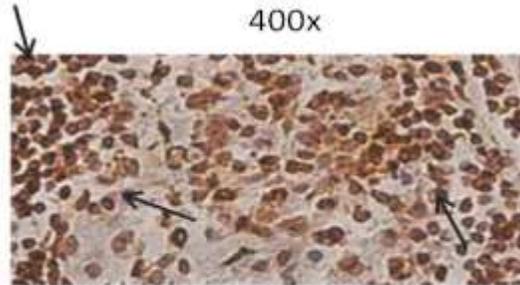


200x

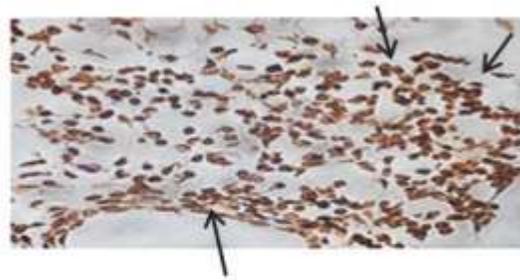


Controle Diabético

400x



Palata Diabético



Prancha III: Apoptose em células das ilhotas pancreáticas de camundongo. (A) Ilhota de camundongo Balb/c como controle sem a presença de células em apoptose. (B) Ilhota de camundongo NOD do grupo água não diabético. (C) Ilhota de camundongo NOD do grupo água diabético. (D) Ilhota de camundongo NOD do grupo *P.alata* não diabético. (E) Ilhota de camundongo NOD do grupo *P.alata* diabético. As setas indicam células com coloração castanha apoptóticas das ilhotas pancreáticas.

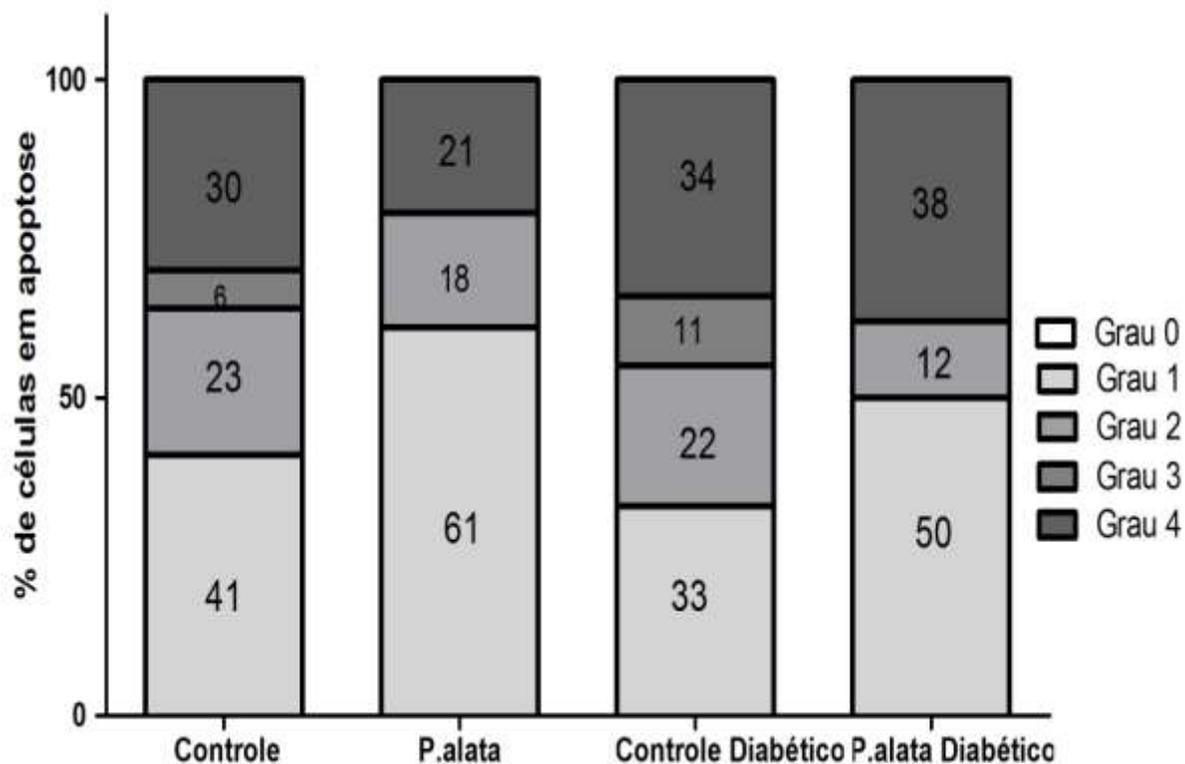
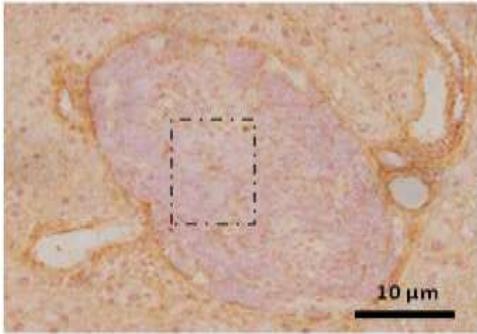
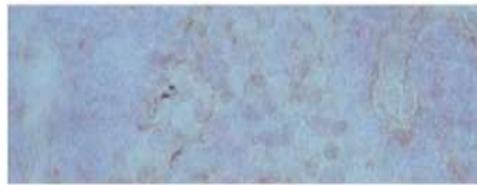


Figura 17: Porcentagem de células em apoptose em 80 ilhotas pancreáticas (20 ilhotas/animal por grupo) de camundongos NOD fêmeas (n=12) classificadas em diferentes graus de infiltrado.

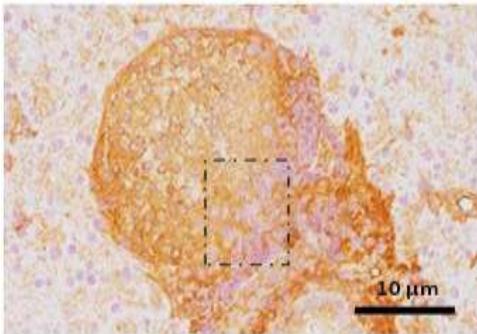
200x



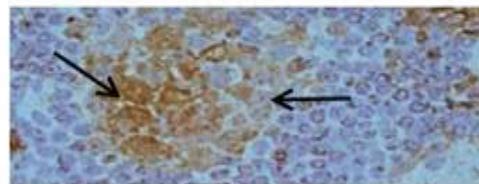
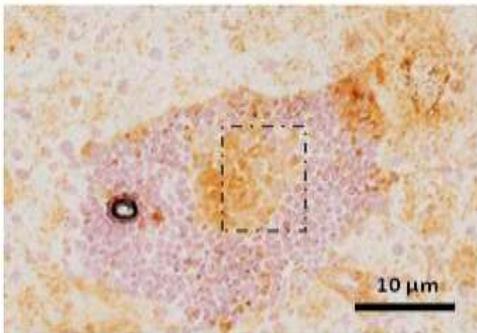
400x



Balb/c

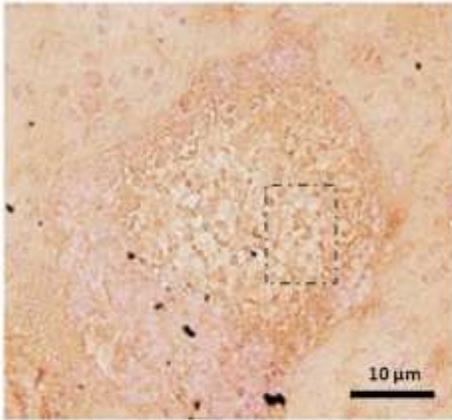


Controle 28 sem



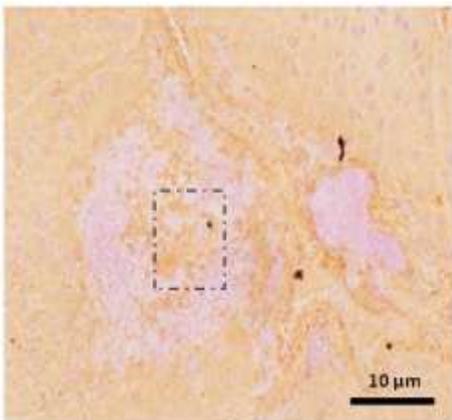
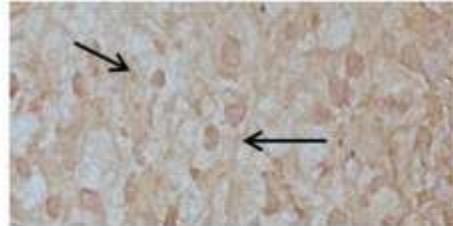
P.alata 28 sem

200x

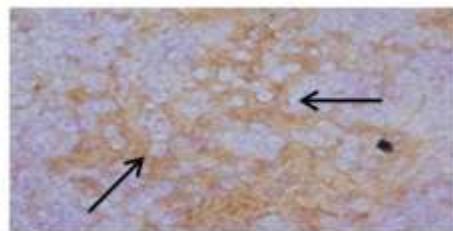


Controle Diabético

400x



P.alata Diabético



Prancha IV: Estresse oxidativo em ilhotas pancreáticas. (A) Ilhota de camundongo Balb/c como controle. (B) Ilhota de camundongo NOD do grupo água não diabético. (C) Ilhota de camundongo NOD do grupo água diabético. (D) Ilhota de camundongo NOD do grupo *P.alata* não diabético. (E) Ilhota de camundongo NOD do grupo *P.alata* diabético. A presença do estresse é caracterizada pela coloração castanha escura.

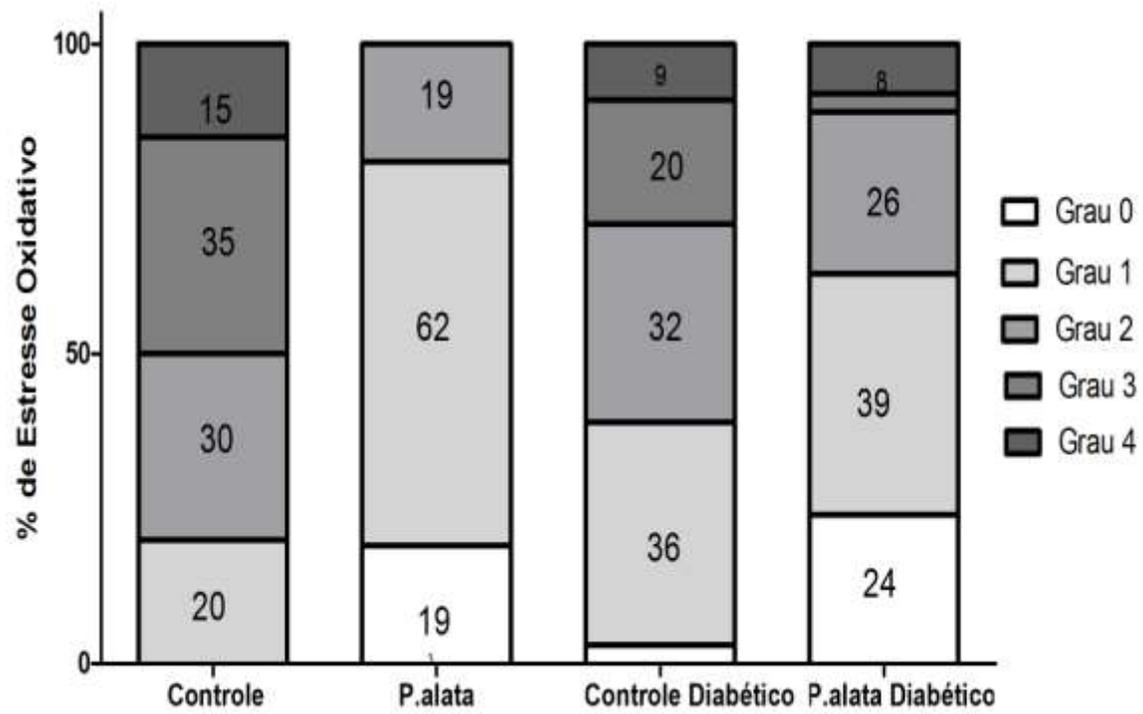


Figura 18: Porcentagem de estresse oxidativo em 80 ilhotas pancreáticas (20 ilhotas/animal por grupo) de camundongos NOD (n=12) classificadas em diferentes graus de infiltrado.



5. DISCUSSÃO

Existem diversas metodologias para a determinação da capacidade antioxidante e essas podem estar sujeitas a interferências como, coloração, compostos e estabilidade da amostra, além de se basearem em diversos fundamentos. Dessa forma, a utilização de duas ou mais técnicas é necessário para confirmar os resultados, já que nenhum ensaio usado isoladamente para determinar a capacidade antioxidante irá refletir exatamente à “capacidade total” de uma amostra (88).

O presente trabalho utilizou três diferentes extratos (aquoso, etanol e metanol/acetona) para identificar qual solvente consegue extrair melhor os compostos fenólicos da folha seca de *Passiflora alata*. Apesar do solvente etanol e metanol serem muito utilizados e efetivos para extração dos compostos fenólicos (89), nossos resultados demonstraram que a água é o melhor solvente para extrair esses compostos. Além disso, é observado que a alta temperatura é mais eficiente para extração dos compostos fenólicos (90), sendo assim a autoclavagem do extrato aquoso com a alta temperatura controlada conseguiu extrair mais compostos.

Já nas análises antioxidantes DPPH; FRAP; ABTS; ORAC foi verificado diferentes resultados. Essa diferença pode estar relacionada à interação dos compostos antioxidantes presentes nas folhas e os radicais livres, como também na sua estrutura química. Nas análises antioxidantes o extrato aquoso mostrou maior atividade quando comparado com os outros extratos (etanol e metanol/acetona).

Jorge *e cols.* (91) descrevem que a atividade do extrato etanólico das sementes de *Passiflora edulis* apresenta 42,93 mg/100g de fenóis totais e 113,41 µg/ml de atividade antioxidante analisados por DPPH. Melo *e cols.*(92) demonstraram que o extrato aquoso da polpa do maracujá (*Passiflora sp*) apresenta 77,06±6,12/100g de fenóis totais e no extrato metanólico 6,03±0,46/100g . Esses resultados descritos na literatura mostram que as

sementes e a polpa do *Passiflora* sp. apresentam valores inferiores de compostos antioxidantes e fenóis totais quando comparados com as folhas do *Passiflora alata*.

Na análise de fenóis totais também foi verificado que o extrato aquoso apresenta maior atividade. Os fenóis totais possuem atividade antioxidante que agem na neutralização dos radicais livres, ajudando no combate do estresse oxidativo (93).

A concentração dos compostos bioativos em plantas, bem como os seus efeitos biológicos, pode depender da geografia, fotoperíodo e temperatura. Estas diferenças foram relatadas como fatores que influenciam a biossíntese de metabolitos secundários, como muitos flavonóides e pode ser relacionado a variações no potencial antioxidante (94-95).

A ação protetora dos alimentos funcionais tem sido atribuída à presença de antioxidantes (96-97), mas a identificação da composição centesimal dos alimentos também é importante para o seu consumo adequado e para alcançar uma segurança alimentar. O conhecimento da composição de alimentos é um elemento básico para ações de orientação nutricional. Em nossa análise a concentração de carboidratos, minerais e proteínas nas folhas do *Passiflora alata* são relativamente similares ao encontrado em folhas de coentro desidratado (98).

Além da identificação da composição centesimal, o interesse pela identificação de compostos antioxidantes presentes em plantas consideradas medicinais vêm crescendo nos últimos anos.

Estudos têm trabalhado na separação, identificação e quantificação de compostos fenólicos em alimentos e enfrentam diversos problemas metodológicos, pois englobam diversas substâncias (fenóis totais, ácidos fenólicos, flavonoides, taninos e ligninas) e na

maioria das vezes são de grande polaridade, muito reativas e suscetíveis à ação enzimáticas (99-100).

Os quatro compostos analisados pelo HPLC-DAD e MS/MS neste trabalho, nos extratos aquoso, etanol e metanol/acetona, somente três deles (vitexina, isovitexina e issorientina) foram identificados. Há trabalhos que citam a presença da apiginina no *Passiflora* sp. , mas a presença nas folhas do *P.alata* não foi identificada (101-102).

Peng e cols (103) descreve que a vitexina e isovitexina apresenta função antioxidante com efetiva inibição dos AGEs e do fator nuclear kappa B (NFkB) em monócitos/macrófagos. O isoorientina tem a função analgésica e anti-inflamatória (104). Essas substâncias podem auxiliar a minimizar o processo anti-inflamatório gerado pelo DM1.

Estudar a ação desses compostos antioxidantes em doenças desenvolvidas e/ou prejudicadas pelo estresse oxidativo vem se tornando cada vez mais popular nas pesquisas. Ampliar o conhecimento pela etiologia de diversas doenças e os meios pelos quais elas podem ser evitadas é essencial para identificar a potencial ação dos antioxidantes.

Na literatura são citadas como doenças relacionadas ao estresse oxidativo, a obesidade, doenças cardiovasculares, síndrome metabólica, doenças neurodegenerativas, o câncer, o diabetes, entre outras (105).

Na população mundial a prevalência de distúrbios metabólicos vem crescendo rapidamente, como no caso do *Diabetes mellitus*. A compreensão do papel do estresse oxidativo no desenvolvimento do DM é importante, pois esse processo oxidativo pode modular fatores desencadeantes da doença.

O desenvolvimento do diabetes é resultado da destruição de células β nas ilhotas pancreáticas através de um processo inflamatório que pode ser gerado pelo estresse

oxidativo. Grande parte dos conhecimentos da fisiopatologia desta doença está fundamentada em estudos com modelos animais, como os da linhagem NOD (106).

Esses animais apresentam características semelhantes ao encontrado em humanos, como a hiperglicemia e infiltração de leucócitos auto-reativos nas ilhotas pancreáticas que induzem a destruição das células β (107-108).

Os estudos voltados para investigações de terapias para o DM, baseadas na alimentação, podem ser estratégias promissoras para impedir a instalação e/ou evolução da doença. Assim o estudo de substâncias com propriedades anti-inflamatórias tem atraído o interesse nos últimos anos.

Nossos resultados mostram que o consumo crônico do extrato aquoso do *P.alata* é capaz de reduzir a incidência do diabetes, visto que 62% dos animais tratados diminuíram a expressão da doença, contrastando com os animais do grupo controle com 36,7%.

No camundongo NOD a insulite inicia-se na 4ª semana de vida com progressão de células inflamatórias infiltrativas que ocorre em paralelo á destruição das células β (107). Nos animais tratados com extrato aquoso, o índice de insulite, representando a gravidade do comprometimento das ilhotas, estava diminuído em relação ao grupo controle. Podemos observar ainda, que os animais tratados apresentaram ilhotas com grau I e II, sugerindo, desta maneira, a existência de fator(es) de proteção das ilhotas pancreáticas.

As primeiras células imunes a infiltrarem nas ilhotas dos camundongos NOD são os linfócitos T seguidas por macrófagos, células NK e linfócitos B (109-110). As subpopulações de linfócitos T, CD4 e CD8, associados a insulite, foram identificados por Kikutani e Makino (15). Com a progressão do diabetes há um aumento na proporção de células CD8, macrófagos, linfócitos B e células NK em associação a destruição das células β (111-112).

Neste contexto, nos ensaios de imunofluorescência verificamos que as células CD4, CD8 e CD 11c nos animais tratados com extrato aquoso de *P.alata*, tanto não diabéticos como os diabéticos, apresentaram menor infiltrado quando comparado com o grupo controle, não-diabético e diabético. Esses resultados sugerem que há uma ação protetora do extrato nas ilhotas pancreáticas.

A função de sobrevivência das células β depende de nutrientes e fatores de crescimento, como glicose e NGF. A interação desses nutrientes e dos fatores de crescimento promove a manutenção das células por meio de mecanismos ainda não elucidados. (113).

A destruição dessas células β , nas ilhotas pancreáticas, gera uma deficiência e/ou perda na produção de insulina. Os radicais livres tem mostrado um papel importante na resistência à insulina, podendo ser benéficos ou maléficos. Por exemplo, a produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) regula a glicose estimulando a liberação de insulina nas células β , atuando na cascata da insulina por inibição da tirosina fosfatase, mas o excesso na produção dessa ROS pode ocasionar distúrbios e levar a patogênese de várias doenças, como o DM (114-115).

Em nossas análises de insulina sérica os animais do grupo controle diabético apresentaram uma menor concentração de insulina quando comparado ao grupo tratado. Isso pode estar relacionado ao estresse oxidativo e com ROS presentes nesses animais.

Há estudos, clínicos e com modelos experimentais que identificam correlação entre a resistência a insulina, o DM e/ou doenças metabólicas com o estresse oxidativo (116-117). Culturas de células musculares, que respondem a insulina, mantidas com o peróxido de hidrogênio levam à resistência a esse hormônio (118-119). Archuleta e cols. (120), demonstram que a exposição crônica de células musculares de rato com o peróxido de

hidrogênio prejudica a sinalização da insulina e também causa uma acentuada redução na atividade do transporte de glicose.

A resistência à insulina e o diabetes estão associados com a redução dos níveis das defesas antioxidantes, incluindo GSH, SOD, Gpx, vitamina E e vitamina C (121).

As defesas antioxidantes podem ser classificadas em exógenas, provenientes da nossa alimentação e endógenas como GSH, SOD e CAT que atuam direta ou indiretamente em muitos processos biológicos incluindo a síntese de proteína, metabolismo e proteção celular (40, 122).

Em nossos resultados verificamos que os animais tratados com extrato aquoso apresentaram níveis de GSH superior aos animais não tratados, tanto no fígado quanto no rim. O nível de glutathione maiores nos animais tratados pode ser devido a conservação dessa enzima com ajuda dos compostos antioxidantes presentes no extrato aquoso.

Os níveis de GSH em células de mamíferos estão na faixa de 0,5 a 10 mmol L⁻¹ e alterações nesses valores podem indicar doenças relacionadas ao estresse oxidativo, como o *Diabetes mellitus*. O baixo nível de glutathione, durante o diabetes, potencializa os efeitos das espécies reativas de oxigênio. A GSH parece diminuir por dois mecanismos: o efeito direto da glicose e insulina sobre a síntese do GSH e pelo consumo do NADPH necessário para regeneração do GSSG, através da via polioliol. A primeira enzima da via polioliol é a aldose que converte o sorbitol através de uma reação dependente de NADPH (123).

Kidd (124) descreve também que as células T helper 1 e T helper 2 (Th1 ; Th 2) são ativadas durante o diabetes e uma série de fatores influenciam na maturação dessas células incluindo os níveis de glutathione. Quando as células apresentadoras de antígenos tem alto nível de glutathione intracelular, essas secretam citocinas favorecendo o desenvolvimento da

célula Th1. Já quando a o nível de GSH reduz ocorre a inibição da resposta apropriada de Th1 e o aumento de Th2.

A GSH também desenvolve um papel na morte celular incluindo a apoptose devido à queda desse antioxidante. A redução das células β ocorre devido a apoptose das mesmas.

A análise de apoptose mostrou que os animais tratados não diabéticos apresentaram menor grau (GRAU I) de células em apoptose que os animais controle, mas semelhantes nos animais diabéticos.

A apoptose, ou morte celular programada, é uma forma coordenada de uma série de eventos que levam a morte da célula. Este é um processo fisiológico que desempenha papel importante na manutenção e remoção de células infectadas ou que foram estimuladas pelos linfócitos T nas ilhotas pancreáticas. O desequilíbrio entre a replicação e/ou neogênese e a apoptose de células β pode gerar o diabetes.

A apoptose das células β pode ocorrer por três diferentes fatores: I- morte celular induzida por citocina (125-126); II- Perturbação mitocondrial, por exemplo, ocasionado pelos radicais livres (127) ; III- Problemas no retículo endoplasmático (128-129). As células β pancreáticas são vulneráveis a esses três fatores que podem ser provocados por alterações metabólicas (glicotoxicidade e lipotoxicidade).

Dessa forma, nossos resultados sugerem que a ação protetora do extrato aquoso nas ilhotas pancreáticas, provavelmente relacionada a atividade antioxidante dos compostos fenólicos presentes na folha do *P.alata* , inibem a proliferação de linfócitos T e processos apoptóticos.

O processo apoptótico, o dano celular e o desenvolvimento de doenças podem estar relacionados com o estresse oxidativo. O estresse oxidativo é uma condição biológica em que ocorre o desequilíbrio entre os radicais livres e os antioxidantes.

O organismo humano sofre ação constante das EROS e por alguma disfunção biológica gera uma queda nos antioxidantes, como por exemplo em processos inflamatórios

A oxidação é parte fundamental da vida aeróbica e do nosso metabolismo produzindo assim os radicais livres. Esses radicais livres apresentam elétrons desemparelhados altamente reativos que produzem as espécies reativas de oxigênio ou nitrogênio (ERRO ou ERN) (47, 130-131)

Essas ERO e ERN estão envolvidas na produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular, sinalização intracelular e síntese de substâncias biológicas importantes. No entanto, seu excesso apresenta efeitos prejudiciais como a peroxidação dos lipídeos de membrana, agressão às proteínas dos tecidos e das membranas, às enzimas, carboidratos e DNA, levando a várias patologias (132).

O estresse oxidativo analisado nas ilhotas pancreáticas mostraram que os animais tratados apresentaram grau II de estresse, cerca de 25% das ilhotas com estresse e os animais controle apresentaram grau de estresse de II e III, entre 25 – 50% das ilhotas com estresse. Esses resultados mostram que o estresse oxidativo nos animais que receberam o tratamento com o extrato aquoso de *P.alata* apresentaram menor oxidação nas ilhotas pancreáticas.

Dessa forma, podemos relacionar esses resultados aos compostos bioativos presentes no extrato, que podem auxiliar no controle dos radicais livres nos animais tratados.



6.CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos neste trabalho podemos concluir que:

1. As análises das atividades antioxidantes nos extratos aquoso, etanol e metanol-acetona mostrou que o extrato aquoso apresenta maior atividade antioxidante.
2. O consumo crônico do extrato aquoso de *P.alata* em camundongos NOD fêmeas a partir da 4ª semana de vida mostrou-se capaz de diminuir o índice de infiltrado inflamatório e consequentemente a expressão do diabetes em relação ao grupo controle.
3. A análise da imunofenotipificação do infiltrado celular em animais tratados como extrato aquoso, não diabético e diabético, mostrou diminuição da presença de células CD4⁺, CD8⁺ e CD11⁺. Além disso, nas ilhotas pancreáticas dos camundongos NOD tratados com extrato aquoso e não diabéticos exibem menor estresse oxidativo e células apoptóticas, sugerindo uma possível proteção da integridade da ilhota.
4. A concentração de glutathiona hepática e renal nos camundongos NOD tratados com o extrato aquoso de *P.alata* estava mais elevada que nos animais controles.



7. CONSIDERAÇÕES

FINAIS

O tratamento crônico com o extrato aquoso das folhas secas de *Passiflora alata* apresentou resultados promissores, reduzindo a incidência do *diabetes mellitus* tipo 1, apoptose, estresse oxidativo e infiltrado celular, além de ter conservado os níveis de glutathiona hepática e renal. Esses resultados podem estar relacionados aos compostos presentes na folha e sua ação antioxidante.

Apesar dos efeitos promissores que encontramos durante esse trabalho, serão necessários estudos complementares para identificar os efeitos de diferentes concentrações do extrato aquoso, bem como sua dose diária, para complementar essas informações objetivando consolidar e transferir estes resultados para estudos clínicos.



8. REFERÊNCIAS

1. Wasserfall CA M. Autoantibody markers for the diagnosis and prediction of type 1 diabetes. *Autoimmun Rev.* 2006;5:424-8.
2. Notkins ALL, A. . Autoimmune type 1 diabetes: resolved and unresolved issues. *JClinInvest.* 2001;108:1237-52.
3. SESTERHEIM PS, D; STAUB, H.L. . Are we ready to predict and prevent endocrine/organ specific autoimmune diseases? . Springer *Semin Immunopathol* 2002;24(3):273-95.
4. ABBAS AKL, A.H; PILLAI, S. *Imunologia Celular e Molecular.* 6ªedição. . 2007.
5. Seissler J SW. Are we ready to predict and prevent endocrine/organ specific autoimmune diseases? Springer *Semin Immunopathol.* 2002;24:273-95.
6. Rabinovitch A S-PW. Role of cytokines in the pathogenesis of autoimmune diabetes mellitus *Rev Endocr Metab Disord.* 2003;4(3):291-9.
7. Bottazzo GF F-CA, Doniach D. Islet-cell antibodies in diabetes mellitus with autoimmune polyendocrine deficiencies. *Lancet.* . Islet-cell antibodies in diabetes mellitus with autoimmune polyendocrine deficiencies. *Lancet* 1974;2(7892):1279-83.
8. Gross J.L SS, Camargo JL, Reichelt AJ, Azevedo MJ. Diabetes Mellitus:Diagnóstico,Classificação e Avaliação do Controle Glicêmico. *ArqBras Endocrinologia & Metabologia.* 2002;146(1):16-26.
9. Winer S TH, Lau A, Song A, Li X, Cheung RK, et al. Autoimmune islet destruction in spontaneous type 1 diabetes is not beta-cell exclusive. *Nat Med* 2003;9(2):198-205.
10. Vieira K P, Zollner ARASL, Malaguti C, Vilella C A, Zollner R L. Ganglioside GM1 effects on the expression of nerve growth factor (NGF), Trk-A receptor, proinflammatory cytokines and on autoimmune diabetes onset in non-obese diabetic (NOD) mice. *Cytokine.* 2008;42:92-104.
11. Lara FA. Utilização do camundongo NOD (Non-obese diabetic) como modelo de estudo sobre a eficacia da autohemoterapia2010: Available from: www.rnsites.com.br/auto-hemoterapia-camundongos.pdf.
12. Makino S KK, Muraoka Y, Mizushima Y, Katagiri K, Tochino Y. Breeding of a non-obese diabetic strain of mice. . *Jikken Dobutsu* 1980;29(1):1-13.
13. Pavin E J ZRL. Implantação da linhagem NOD mice (camundongos diabéticos não-obesos) no Brasil: contribuição deste modelo animal ao estudo do diabetes mellitus insulino-dependente e outras doenças autoimunes. *ArqBras Endocrinologia & Metabologia.* 1994;38:105-8.
14. Bach JF. Immunotherapy of type 1 diabetes: lessons for other autoimmune diseases. *Arthritis.* 2002;4(3):3-15.
15. Kikutani H MS. The Murine Autoimmune Diabetes Model: NOD and Related Strains. . *Advances in immunology* 1992;51:285-322.
16. Mark S BJA. The NOD Mouse: A Model of Immune. *Annu Rev Immunol.* 2005;23:447-85.
17. Graser R T DTP, Wang F, Christianson G J, Chapman H D, Roopenian D C, Nathenson S G, Serreze D V. Identification of a CD8 T Cell That Can Independently Mediate Autoimmune Diabetes Development in the Complete Absence of CD4 T Cell Helper Functions. *The Journal of Immunology.* 2000;164:3913-8.
18. Wong FS VI, Flavell RA, Janeway Jr CA. CD8T cell form young nonobese diabetic (NOD) Islet can transfer rapid onset of diabetes in NOD Mice in the absence of CD4 cells. *JExpMed.* 1996;183:67-76.

19. Shizuru J A T-EC, Banks B A, Gregory A K, Fathman C G. Immunotherapy of the nonobese diabetic mouse: treatment with an antibody to T-helper lymphocytes. *Science*. 1988;240(4852):659-62.
20. Nagata M sP, Kawamura T, Utsugi T, Yoon J W. Evidence for the role of CD8+ cytotoxic T cells in the destruction of pancreatic beta-cells in nonobese diabetic mice. *J Immunol* 1994;152(4):2042-50.
21. Eizirik D L M-PT. A choice of death-the-signal-transduction of immune-mediated beta- cell apoptosis. *Diabetologia*. 2001;44(12):2115-33.
22. Fillippi C M EEA, Oldham J E, Von Herrath M G Immunoregulatory mechanisms triggered by viral infections protect from type 1 diabetes in mice. *The Journal of Clinical Investigation*. 2009;119(6):1515-23.
23. Finkel T HN. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 2000;408:239-47.
24. Gardner CD ES, reynolds CM, Eguchi K, Frank GD, Motley ED. Hydrogen Peroxide Inhibits Insulin Signaling in Vascular Smooth Muscle Cells. *Experimental Biology and Medicine*. 2003;228:836-42.
25. Tanji N MGS, Fu C, Kislinger T, Taguchi A, Pischetsrieder M, Stern D, Schmidt A M, D'Agati V D. Expression of Advanced Glycation End Products and Their Cellular Receptor RAGE in Diabetic Nephropathy and Nondiabetic Renal Disease. *J Am Soc Nephrol*. 2000;11:1656-66.
26. Chandra D JEB, Ramana K V, Kelley R, Srivastava S K, Bhatnagar A. Nitric Oxide Prevents Aldose Reductase Activation and Sorbitol Accumulation During Diabetes. *Diabetes*. 2002;51:3095-101.
27. Li JM SA. ROS generation by nonphagocytic NADPH oxidase: potential relevance in diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol*. 2003;14(3):S221-S6.
28. Zalba G SJG, Moreno MU, Fortuno MA, Fortuno A, Beaumont FJ, Diez J. Oxidative stress in arterial hypertension: role of NAD(P)H oxidase. *Hypertension*. 2001;38(6):1395-9.
29. El-Benna J DP, Gougerot-Pocidallo MA, Elbim C. Phagocyte NADPH oxidase: a multicomponent enzyme essential for host defenses. *Arch Immunol Ther Exp*. 2005;53:199-206.
30. Idris I DR. Protein Kinase C activation: isozyme-specific effects on metabolism and cardiovascular complications in diabetes. *Diabetologia*. 2001;44:659-73.
31. Way JK KN, King GL. Protein Kinase C and the development of diabetic vascular complications. *Diabetic Medicine*. 2001;18:945-59.
32. Koya D KG. Protein Kinase C Activation and the Development of Diabetic Complications. *Diabetes*. 1998;47:859-66.
33. Contreras-Calderón J C-JL, Guerra-Hernández E, García-Villanova B. . Antioxidant capacity, phenolic content and vitamin C in pulp, peel and seed from 24 exotic fruits from Colombia. *Food Research International*. 2010;10(16):1-7.
34. Baynes J W TSR. Role of Oxidative Stress in Diabetic Complications . A New Perspective on an Old Paradigm. *Diabetes*. 1999;48:1-7.
35. Browniee, M. The pathobiology of diabetic complications. *Diabetes*. 2005;54:1615-25.
36. Goldin A BJ, Schmidt AM, Creager MA. Advanced Glycation End Products : Sparking the Development of Diabetic Vascular Injury. *Circulaion*. 2006;114:597-605.
37. Barbosa JHP OS, Seara L. O papel dos produtos finais de glicação avançada (AGEs) no desencadeamento das complicações vasculares do diabetes. *ArqBras Endocrinol Metab*. 2008;52(6):940-50.
38. Chen AS TT, Sugiura M, Wakasugi Y, Kamei A, Wang MW, Miwa I. Pyridoxal- Aminoguanidine Adduct is More Effective than Aminoguanidine in preventing Neuropathy and Cataract in diabetic rats. *Horm Mtab*. 2004;36(3):183-7.

39. Treins C G-PS, Murdaca J, Obberghen EV. Regulation of Vascular Endothelial Growth Factor Expression by Advanced Glycation End Products. *The Journal of Biological Chemistry*. 2001;27(47):43836-41.
40. Maritim A C SRA, Watkins III J B. Diabetes, Oxidative Stress, and Antioxidants: A Review. *J Biochem Molecular Toxicology*. 2002;17(1):24-38.
41. Bhatia S SR, Venkata S, Gambhir J K, Prabhu K M. Antioxidant status, lipid peroxidation and nitric oxide end products in patients of type 2 diabetes mellitus with nephropathy. *Clinical Biochemistry*. 2003;36:557-62.
42. Dominguez C RE, Gussinye M, Carrascosa A. Oxidative Stress at Onset and in Early Stages of type 1 Diabetes in Children and Adolescents. *Diabetes Care*. 1998;21:1736-42.
43. Hata I KM, Hirano S, Shigematsu Y, Tsukahara H, Mayumi M. Urinary oxidative stress markers in young patients with type 1 diabetes. *Pediatrics International*. 2006;48:58-61.
44. Reis J. DIABETES TIPO 1: ESTUDO DA ASSOCIAÇÃO ENTRE O BALANÇO OXIDANTE/ANTIOXIDANTE COM PARÂMETROS CLÍNICOS E BIOQUÍMICOS. Belorizonte, Programa de Pós-graduação e pesquisa da Santa Casa de Belo Horizonte. 2006.
45. Vessby J BS, Mohsen R, Berne C, Vessby B. Oxidative Stress and antioxidant status in type 1 diabetes mellitus *J Intern Med*. 2002;251(1):69-76.
46. Devasdagayam TPA TJ, Bloor KK, Sane KS, Ghaskadbi SS, Lele RD. Free Radicals and Antioxidants in Human Health: Current Status and Future Prospects. *Japi*. 2004;52(794-804).
47. Halliwell B. Free radicals and other reactive species in disease. *Encyclopedia of life sciences*. 2005:1-7.
48. Valko M LD, Mancol J, Cronin MTD, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2007;39:44-84.
49. Devasagayam TPA TJC, Bloor KK, Sane KS. Free Radicals and Antioxidants in Human Health: Current Status and Future Prospects. *Japi*. 2004;52(794-804).
50. Halliwell B. Free Radicals and Other Reactive Species in Disease. *Encyclopedia of Life Sciences*. 2005;1:1-7.
51. Temple NJ. Antioxidants and Disease: More Question Than Answers. *Nutrition Research*. 2000;20(3):449-59.
52. Cerqueira FM MM, August O. Antioxidantes dietéticos : controvérsias e perspectivas. *Quim Nova*. 2007;30(2):441-9.
53. Aherne SA ObN. Dietary flavonols : chemistry, food content, and, metabolism. *Nutrition Research*. 2002;18(1):75-81.
54. Burns J GP, Matthews D, Duthie GC, Lean MEJ, Crozler A. Extraction of Phenolics and Changes in Antioxidant Activity of Red Wines during Vinification. *J Agric Food Chem*. 2001;49:5797-808.
55. Sousa CMM SH, Vieira-Jr GM, Ayres MCC, Costa CLS, Araújo DS, Cavalcante LCD, Barros EDS, Araújo PBM, Brandão MS, Chaves MH. FENÓIS TOTAIS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE CINCO PLANTAS MEDICINAIS. *Quim Nova*. 2007;30(2):351-5.
56. Bernacci L C MLMM, Soares-Scott M D, da Silva Passos I R Espécies de maracujá: caracterização e conservação da biodiversidade. *Embrapa Cerrados* 2005;1(22):559-86.
57. Faleiro F G JNTV, Braga M F. Germoplasma e melhoramento genético do maracujazeiro-desafios da pesquisa. *Embrapa Cerrados*. 2005;1(18):187-210.
58. Sousa J S I MLMM. Maracujá: espécies, variedades, cultivo. *FEALq*. 1997:179.
59. Crochemore M L MHB, Stenzel N M C. CARACTERIZAÇÃO AGROMORFOLÓGICA DO MARACUJAZEIRO (*Passiflora* spp.). *Rev Bras Frutic*. 2003;25(1):5-10.

60. Kaur C KHC. Anti-oxidant activity and total phenolic content of some Asian vegetables. *Journal of Food Science and Technology*. 2002;37:153-61.
61. Martinez-Valverde I PMJ, Ros G. Significado nutricional de los compuestos fenólicos de la dieta. *Archivos Latino Americano de Nutricion*. 2000;50(1):5-18.
62. Petry RD RF, Paris F, Gosmann G, Salgueiro JB, Quevedo J, Kapezinski F, Ortega GG, Schenkel EP. Comparative pharmacological study of hydroethanol extracts of *Passiflora alata* and *Passiflora edulis* Leaves. *Phytotherapy Research*. 2001;15:162-4.
63. Dhawan K DS, Sharma A. Passiflora: a review update. *Journal of Enthno-pharmacology*. 2004;94:1-23.
64. Medeiros JS DM, Srus AUOS, Pessoa MB. Avaliação das atividades hipogliceminas e hipolipeminas da casca do maracujá-amarelo (*Passiflora edulis*, f. *flavicarpa*). *RBAC*. 2009;41(2):99-101.
65. *Farmacopeia Brasileira*. 2010;2:546.
66. Doyama JT RH, Novelli ELB, Cereda E, Veligas W. Chemical investigation and effects of the tea of *Passiflora alata* on biochemical parameters in rats. *Journal of Ethnopharmacology*. 2005;96:371-4.
67. Noriega P DFMD, Strasser M, Kato ETM, Bacchi EM. *Passiflora alata* Curtis: a Brazilian medicinal plant. *Boletim Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinarias y Aromáticas*. 2011;10(5):398-413.
68. Chen BL LH. Components and Antioxidants Activity in Teas after Treatment. *Crop, Environment & Bioinformatics*. 2011;8:109-18.
69. Montanher A B ZSM, Schenkel E P, Frode T S. Evidence of anti-inflammatory effects of *Passiflora edulis* in an inflammation model. *Journal of Enthno-pharmacology*. 2007;107:281-8.
70. Oga S dFP, Silva ACG, Hanada S. *Plantas Medicinarias: Medicinal Plants*. *AnFarm Quim*. 1984;24(303-306).
71. Maluf E BH, Frochtengarten ML, Benti R , Leite JR. Assessment of the Hypnotic/Sedative effects and toxicity of *Passiflora edulis* Aqueous Extract in Rodents and Humans. *Phytotherapy Research*. 1991;5(262-266).
72. Petry RD RF, Paris F, Gosmann G, Salgueiro JB, Quevedo J, Kapezinski F, Ortega GG, Schenkel EP. Comparative Pharmacological study of hydroethanol extracts of *Passiflora alata* and *Passiflora edulis* Leaves. *Phytotherapy Research*. 2001;15:162-4.
73. Paris F PR, Reginatto FH, Gosmann G, Quevedo J, Salgueiro JB, Kapczinski F, Gonzalez Ortega G, Schenkel EP. Pharmacochemical Study of Aqueous Extracts of *Passiflora alata* Dryander and *Passiflora edulis* Sims. *Acta Farm Bonaerense*. 2002;21(1):5-8.
74. Amaral KM SE, Langeloh A. Avaliação da Toxicidade Reprodutiva dos Extratos Aquosos Liofilizados de *Passiflora alata* Dryander e *Passiflora edulis* Sims em ratas Wistar. *Acta Farm Bonaerense*. 2001;20(3):215-20.
75. Larrauri JA RP, Saura-Calixto F. Effect of drying temperature on the stability of polyphenols and antioxidant activity of red grape pomace pells. *J Agric Food Chem*. 1997;45:1390-3.
76. Spagolla LC SM, Passos LML, Aguiar CL. Extração alcoólica de fenólicos e flavonóides totais de mirtilo "Rabbiteye" (*Vaccinium ashei*) e sua atividade antioxidante. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*. 2009;30(2):59-64.
77. Chamorro S GI, Viveros A, Hervert-Hernández D, Brenes A. Changes in polyphenolic content and antioxidant activity after thermal treatment of grape seed extract and grape pomace. *Eur Food Res Technol*. 2012;234:147-55.
78. Brand-Williams W CM, Bersel C. Use a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm Wiss u Technol*. 1995;28:25-30.

79. Nenadis N WLF, Tsimidou M, Zhang HY. Estimation of scavenging activity of Phenolic compounds using the ABTS assay. *Journal of Agricultural and food chemistry*. 2004;52:4669-74.
80. Prior RL HH, Gu L, Wu X, Bacchiocca M, Howard L, Hampsch-Woodhl, M, Huang D, Ou B, Jacob R. Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance (ORACFL)) of Plasma and Other Biological and Food Samples. *Journal of Agricultural and food chemistry* 2003;51:3273-9.
81. Siger A N-KM, Lampart-Szczpa E. The content and antioxidant activity of phenolic compounds in cold-pressed plant oils. *Journal of food Lipids*. 2007;15:137-49.
82. (AOAC) AoOAC. *Official Methods of Analysis* 1997;16th ed.
83. Bligh EG DW. A rapid method of total liped extration and purification *Canadian Journal of Biochemistry and Phsyology*. 1959;37:911-7.
84. Lutz IA. *Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz*. Instituto adolfo Lutz. 1985;1:21-43.
85. Signore A PP, Gale EAM, Andreani D, Beverley PCL. The natural history of lymphocyte subsets infiltrating the pancreas of NOD mice. *Diabetologia*. 1989;32(282-289).
86. Ventura-Oliveira D VC, Zanin ME, Castro CM, Moreira Filho DC, Zollner RL. Kinetics of TNF-alpha and IFN-gamma mRNA expression in islets and spleen of NOD mice. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 2002;35:1347-55.
87. Hartree EF. Determination of the lowry method that gives a linear photometric response. *Analytical Biochemistry*. 1972;48:422-7.
88. Huang D OB, Prior RL. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2005;53:1841-56.
89. Siddhurge B, Becker K. Antioxidant Properties of Various Solvent Extracts of Total Phenolic Constituents from Three Different Agroclimatic Origins of Drumstick Tree (*Moringa oleifera* Lam.) Leaves. *J Agric Food Chem*. 2003;51:2144-55.
90. Sultana B AF AM. Effect of Extraction Solvent/Technique on the Antioxidant Activity of Selected Medicinal Plant Extracts. *Molecules*. 2009;14:2167-80.
91. Jorge N MCR, Angelo P M, Andreo D. Composição centesimal e atividade antioxidante do extrato de sementes de maracujá (*Passiflora edulis*) em óleo de soja. *PesqAgropecTrop*. 2009;39(4):380-5.
92. Melo E A MMIS, Lima V L A G, Araújo CR. Teor de fenólicos totais e capacidade antioxidante de polpas congeladas de frutas. *Alim Nutr*. 2008;19(1):67-72.
93. Sousa CMMReS, H.; Vierira-Jr, G.M.; Ayres, M.C.C.; Da Costa, C.L.S.; Araújo, D.S.; Cavalcante, L.C.D.; Barros, E.D.S., Araújo, P.B.M.; Brandão, M.S.; Chaves, B.M. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. *Quimica Nova*. 2007;30(2):212-7.
94. Jaakola L HA. Effect of latitude on flavonoid biosynthesis in plants. *Plant, Cell & Enviroment*. 2010;33:1239-47.
95. Kumazawa S HT, Nakayama T. Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. *Food Chemistry*. 2004;84:329-39.
96. Kalt W KM. The Role of Oxidative Stress and Antioxidants in Plant and Human Health: Introduction to the Colloquium. *HortScience*. 2000;35(4):572.
97. Prior RL CG. Antioxidant Phytochemicals in Fruits and Vegetables: Diet and Health Implications. *HortScience*. 2000;35(4):588-92.
98. *Tabela Brasileira de composição de alimentos* 2011;4 ed.
99. Soares S. Ácidos fenólicos como antioxidantes. *RevNutr*. 2002;15(1):71-81.
100. Vasco C RJ, Kamal-Eldin A. Total phenolic compounds and antioxidant capacities of major fruits from Ecuador. *Food Chemistry*. 2008;111:816-23.

101. Ferreres F SC, Valentão P, Andrade PB, Seabra RM, Gil-Izquierdo A. New C-Deoxyhexosyl Flavones and Antioxidant Properties of *Passiflora edulis* Leaf Extract. *JAgricuc Food Chem.* 2007;55(25):10187–93.
102. Dhawan K, Dhawan S, Sharma A. *Passiflora*: a review update. *J Ethnopharmacol.* 2004 Sep;94(1):1-23.
103. Peng X ZZ CK, Shan F, Ren GX, Chen F, Wang M. Inhibitory effect of mung bean extract and its constituents vitexin and isovitexin on the formation of advanced glycation endproducts. *Food Chemistry.* 2008(106).
104. Kupeli E AM GI, Yesilada E. Evaluation of in vivo Biological Activity Profile of Isoorientin. *Verlag der Zeitschrift für Naturforschung,* . 2004:787-90.
105. Gottlieb MG MA, Cruz IBM. Transição epidemiológica, estresse oxidativo e doenças crônicas não transmissíveis sob uma perspectiva evolutiva. *Scientia Medica.* 2011;21(2):69-80.
106. Yoon JW JH. Celular and molecular pathogenic mechanisms of insulin-dependent diabetes mellitus. *Ann N Y Acad Sci.* 2001;928:200-11.
107. Anderson MS BJ. The NOD mouse: a model of immune dysregulation. *Annu Rev Immunol.* 2005;23:447-85.
108. Mordes JP BR, Blankenhorn EP, Rossini AA, Greiner DI. Rat models of type 1 diabetes: genetics, environment, and autoimmunity. *Ilar J.* 2004;45(3):278-91.
109. Rosmalen JG LP, Pelegri C, Drexhage HA, Homo-delarche F. Islet abnormalities in the pathogenesis of autoimmune diabetes. *Trends Endocrinol Metab.* 2002;13(5):209-14.
110. Saraiva F H-DF. Is innervation an early target in autoimmune diabetes? *Trends Immunol.* 2003;24(11):574.
111. Kay TW CH, Parker JL, Stephens LA, Thomas HE. CD4+ and CD8+ T lymphocytes: clarification of their pathogenic roles in diabetes in the NOD mouse. *Res Immunol.* 1997;148(5):320-7.
112. Thomas HE KT. Beta cell destruction in the development of autoimmune diabetes in the non-obese diabetic (NOD) mouse. *Diabetes Metab Res Rev.* 2000;16(4):251-61.
113. Raile K KJ, Laue S, Garten A, Bluher M, Kralisch S et al. Glucose concentration and AMP-dependent kinase activation regulate expression of insulin receptor family members in rat and INS-1E beta cells. *Diabetologia.* 2005;48(9):1798-809.
114. Pi J BY, Zhang Q, Wong V, Floering LM, Daniel K, Reece JM, Deeney JT, Andersen ME, Corkey BE, Collins S Reactive Oxygen Species as a Signal in Glucose-Stimulated Insulin Secretion. *Diabetes.* 2007;56:1783-91.
115. Mahadev K WX, Zilbering A, Zhu L, Lawrence TR, Goldsteins BJ. Hydrogens Peroxide Generated during Cellular Insulin Stimulation Is Integral to Activation of the Distal Insulin Signaling Cascade in 3T3-L1 Adipocytes. *The Journal of Biological Chemistry.* 2001;276(52):48662-9.
116. Goodarzi MT NA, Rezaei M, Babahmadi-Rezael H. Oxidative Damage to DNA and lipids: Correlation with Protein Glycation in Patients With Type 1 Diabetes. *Journal of Clinical Laboratory Analysis.* 2010;24:72-6.
117. Al-Abaldy H JH. Oxidative DNA damage and obesity in type 2 diabetes mellitus. *European Journal of Endocrinology* 2011;164:899-904.
118. Dokken BB SV, Kim JS, Teachey MK, Henriksen EJ. Oxidative stress- induced insulin resistance in ra skeletal muscle: role of glycogen synthase kinase-3. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2008;294(615-621).
119. Maddux BA SW, Lawrence Jr JC, Goldfine AL, Goldfine ID, Evans JL. Protection Against Oxidative Stress-Induced Insulin Resistance in Rat L6 Muscle Cells by Micromolar Concentrations of alpha-Lipoic Acid. *Diabetes* 50:404-10.

120. Archuleta TL LA, Saengsirisuwan V, Teachey MK, Lindborg KA, Kim JS, Henriksen EJ. Oxidant stress-induced loss of IRS-1 and IRS-2 proteins in rat skeletal muscle: role of p38 MAPK. *Free Radic Biol Med.* 2009;47(10):1486-93.
121. Marra G CP, Pitocco D, Manto A, Di Leo MAS, Ruotoo V, Caputo S, Giardina B, Ghirlanda G, Santini SA. Early Increase of Oxidative Stress and Reduced Antioxidant Defenses in Patients With Uncomplicated type 1 Diabetes. *Diabetes Care.* 2002;25:370-5.
122. Halliwell B AR, Loliger J, Aruoma OI. The characterization of Antioxidants. *Fd Chem Toxic.* 1995;33(7):601-17.
123. Styskal J RH, Richardson A, Salmon AB. Oxidative stress and diabetes: what can we learn about insulin resistance from antioxidant mutant mouse models? *Free Radic Biol Med.* 2012;52:46-58.
124. Kidd P. Th1/Th2 Balance: The hypothesis, its Limitations, and Implications for Health and Disease. *Alternative Medicine Review.* 2003;8(3):223-46.
125. Curtin JF CT. Live and let die: regulatory mechanisms in Fas-mediated apoptosis. *Cellular Signalling.* 2003;15:983-92.
126. Wajant H. The Fas Signaling Pathway: More Than a Paradigm. *Science.* 2002;296:1635-6.
127. Gibson GE HH. Mitochondrial Enzymes and Endoplasmic Reticulum Calcium Stores as Targets of Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes.* 2004;36(4):335-40.
128. Ferri KF KG. Organelle-specific initiation of cell death pathways. *Nature Cell Biology.* 2001;3:E255-E63.
129. Schroder M KR. ER stress and the unfolded protein response. *Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis.* 2005;569:29-63

130. Pieta PG. Flavonoids as Antioxidants. *JNat Prod.* 2000;63(7):1035-42.
131. Halliwell B. Antioxidants in human health and disease. *Anu Rev Nutr.* 1996;16:33-50.
132. Temple NJ . Antioxidants and disease: more question than answers. *Nutrition Research.* 2000;20(3):449-59.