



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR

Polissacarídeos de *Passiflora edulis* fo. *flavicarpa* O. Deg., Passifloraceae:
Estudo Químico-Estrutural e Avaliação dos Efeitos Antitumoral,
Antidiabético e Anti-inflamatório

DRAULIO COSTA DA SILVA

FORTALEZA-CEARÁ
2011

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR

Polissacarídeos de *Passiflora edulis* fo. *flavicarpa* O. Deg., Passifloraceae:
Estudo Químico-Estrutural e Avaliação dos Efeitos Antitumoral,
Antidiabético e Anti-inflamatório

DRAULIO COSTA DA SILVA

Tese Submetida à Coordenação do Curso de Pós-
Graduação em Bioquímica, como requisito para
obtenção do grau de Doutor em Bioquímica.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Ana Lúcia Ponte Freitas

FORTALEZA-CE
2011

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências e Tecnologia

-
- S579p Silva, Draulio Costa da.
Polissacarídeos de *Passiflora edulis* fo. *flavicarpa* O. Deg., Passifloraceae: estudo químico-estrutural e avaliação dos efeitos antitumoral, antidiabético e anti-inflamatório / Draulio Costa da Silva. – 2011.
162 f. : il. color., enc. ; 30 cm.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Departamento de Bioquímica Biologia Molecular, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Fortaleza, 2011.
Área de Concentração: Bioquímica Vegetal.
Orientação: Profa. Dra. Ana Lúcia Ponte Freitas.
1. Polissacarídeos. 2. Pectinas. 3. Citocinas. I. Título.

CDD 574.192

Esta Tese foi apresentada como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Bioquímica, outorgado pela Universidade Federal do Ceará, e encontra-se à disposição dos interessados na Biblioteca de Ciências e Tecnologia da referida Universidade.

A citação de qualquer trecho desta Tese é permitida, desde que seja feita de acordo com as normas da ética científica.

Draulio Costa da Silva

TESE APROVADA EM: ___/___/___

Dr.^a Ana Lucia Ponte Freitas
Depto. de Bioquímica e Biologia Molecular
Universidade Federal do Ceará- UFC
(Orientadora)

Dr.^a Glauce Socorro de Barros Viana
Faculdade de Medicina de Juazeiro do Norte, CE
(Co-orientadora e examinadora)

Dr.^a Ana de Fátima F. U. Carvalho
Depto. de Biologia
Universidade Federal do Ceará- UFC
(Examinadora)

Dr.^a Regina Célia M. A. de Paula
Depto. de Química Orgânica e Inorgânica
Universidade Federal do Ceará- UFC
(Co-orientadora e Examinadora)

Dr.^a Ana Cristina de O. Monteiro Moreira
Centro de Ciências da Saúde - Universidade de Fortaleza – UNIFOR, CE
(Examinadora)

Dedico à minha família: meus pais, *Rita e José*, minhas irmãs, *Daniele e Dávila*, e à minha esposa, *Carla*.

Agradecimentos

À **Prof.^a Ana Lúcia Ponte Freitas** que é para mim exemplo de humildade, compaixão e solidariedade. Tenho muito a agradecer por sua compreensão, sua dedicação e apoio e por sempre depositar em mim sua confiança.

À **Prof.^a Dr.^a Glauce Socorro de Barros Viana**, por sua agradável receptividade e acolhida, pelo apoio e orientação no desenvolvimento dos trabalhos e por sua valiosa cooperação na execução deste estudo;

À **Prof.^a Ana Cristina de Oliveira Monteiro Moreira** por sua colaboração na participação da banca examinadora.

À **Prof.^a Regina Célia Monteiro de Paula**, por sua inestimável orientação na discussão da caracterização química das amostras, por sua cordial receptividade e acolhida.

À **Prof.^a Ana de Fátima Fontenele Urano Carvalho** por me receber tão bem em seu laboratório, disponibilizando seus equipamentos e reagentes, além de sua colaboração com sugestões.

À **Prof.^a Letícia Veras Costa-Lotuf** pela ajuda nas discussões dos ensaios de ação antitumoral;

À **Kézia L. A. O. Lins** pela colaboração na execução dos ensaios de ação antitumoral;

Às **Prof.^{as} Ana Paula Nunes**, da Faculdade de Odontologia, e **Gerly A. Brito** do Depto. de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, pelas análises histopatológicas realizadas;

À **Prof.^a Nylane Alencar** do Depto. de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, pelas análises hematológicas realizadas;

À **Maria Vilani Rodriguez Bastos (Vila)**, a quem muito devo minha gratidão pela ajuda, mesmo em momentos difíceis de sua vida, sempre atenciosa e gentil.

À **Juvênia Bezerra Fontenele** pelas sugestões e explicações, sempre bem humorada e receptiva.

À **Prof.^a Jeanny da Silva Maciel** por toda a ajuda nos experimentos de Ressonância Magnética Nuclear;

À **Nathana**, membro do Laboratório de Bioprospecção, por toda a ajuda nas análises químicas de determinação de fibra alimentar total.

Aos amigos do Laboratório de Bioquímica de Algas Marinhas, **Luciano, Clark, Thaís, Juliana e Víctor**, pelos momentos de descontração e pelo apoio. Muito obrigado à **Jacilane**, por toda a ajuda.

Ao Laboratório de Oncologia Experimental (LOE) do Depto. de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará através do qual foi possível a realização dos ensaios de atividade citotóxica e antitumoral;

Ao Centro Nordestino de Aplicação e Uso da Ressonância Magnética Nuclear (CENAUREMN) pela disponibilização dos equipamentos imprescindíveis à realização deste trabalho;

Ao Depto. de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná pela realização das análises de composição elementar das amostras de polissacarídeos;

Ao CNPq pelo auxílio financeiro.

*Agradeço especialmente à minha família. Meus pais, **Rita e José**, pelo amor, respeito e apoio. Às minhas irmãs, **Davila e Danilele**, pelo carinho, amizade, afeto e auxílio incondicionais, e à minha esposa **Carla Daniela**, simplesmente por tudo o que fez e faz por mim.*

Este trabalho foi realizado com o apoio e a colaboração das seguintes instituições:

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), através do convênio com o Curso de Pós-graduação em Bioquímica e Biologia Molecular do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará e bolsa concedida ao autor.

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), através do convênio com o Curso de Pós-graduação em Bioquímica e Biologia Molecular do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará e auxílios de projetos e bolsas concedidas a este Departamento.

Universidade Federal do Ceará, através do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Departamento de Fisiologia e Farmacologia e Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, que viabilizou a execução deste trabalho em seus laboratórios e contribuiu para a formação do autor.

Biotério Central da Universidade Federal do Ceará, pela disponibilização dos animais necessários ao desenvolvimento deste estudo

Faculdade de Medicina de Juazeiro do Norte através da realização dos experimentos e testes de atividade antidiabética.

ÍNDICE

	Página
Lista de Tabelas	
Lista de Figuras	
Lista de Abreviaturas	
Resumo	
Abstract	
INTRODUÇÃO	21
<i>Apresentação da Pesquisa</i>	21
<i>Fibra Alimentar e Ação Terapêutica</i>	23
<i>Gênero <u>Passiflora</u>: aspectos gerais e estudos farmacológicos</i>	27
OBJETIVO GERAL	32
<u>CAPÍTULO I:</u>	33
CARACTERIZAÇÃO QUÍMICO-ESTRUTURAL DE UMA FRAÇÃO POLISSACARÍDICA ISOLADA DA CASCA DOS FRUTOS DE <i>PASSIFLORA EDULIS</i> FO. <i>FLAVICARPA</i> O. DEG., PASSIFLORACEAE	
1. REFERENCIAL TEÓRICO	34
<i>1.1. Pectinas</i>	34
<i>1.2. Pectina de <u>Passiflora edulis</u></i>	37
2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	39
3. MATERIAL E MÉTODOS	40
<i>3.1. Reagentes</i>	40
<i>3.2. Análise Química Elementar</i>	40
<i>3.2.1. Umidade</i>	40
<i>3.2.2. Cinzas</i>	40
<i>3.2.3. Proteína Bruta</i>	41
<i>3.2.4. Lipídeos</i>	41
<i>3.2.5. Fibra Alimentar Total</i>	42
<i>3.3. Extrações e obtenção da fração polissacarídica</i>	43
<i>3.4. Caracterização da fração polissacarídica</i>	43
<i>3.4.1. Composição monossacarídica</i>	44

3.4.2. Microanálise Elementar	44
3.4.3. Cromatografia de Exclusão Molecular de Alta Performance (HPSEC)	45
3.4.4. Espectroscopia na Região do Infravermelho (FT-IR)	45
3.4.5. Ressonância Magnética Nuclear	45
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
4.1. Análise da composição centesimal	46
4.2. Caracterização dos polissacarídeos obtidos dos frutos de <i>Passiflora edulis</i> por extração aquosa a quente e precipitação com etanol	47
5. CONCLUSÕES	56
<u>CAPÍTULO II:</u>	57
ESTUDO DOS EFEITOS ANTITUMORAIS DOS POLISSACARÍDEOS PÉCTICOS DE <i>PASSIFLORA EDULIS</i> FO. FLAVICARPA O. DEG., PASSIFLORACEAE EM CAMUNDONGOS COM SARCOMA 180	
1. REFERENCIAL TEÓRICO	58
1.1. Câncer	58
1.2. Polissacarídeos como agentes imunomoduladores	61
1.3. Plantas com atividade anticâncer	63
2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	66
3. MATERIAL E MÉTODOS	67
3.2. Atividade citotóxica <i>in vitro</i>	67
3.1.1. Obtenção e manutenção das linhagens celulares	67
3.1.2. Ensaio do MTT	67
3.1.3. Procedimento Experimental	67
3.2. Atividade antitumoral <i>in vivo</i>	68
3.2.1. Obtenção e Manutenção dos Animais	68
3.2.2. Procedimento Experimental	68
3.3. Análise morfológica e histopatológica	69
3.3.1. Procedimento experimental	69
3.4. Determinação dos parâmetros hematológicos e bioquímicos	70
3.4.1. Procedimento experimental	70
3.5. Análise Estatística	70

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	71
4.1. <i>Avaliação do efeito antitumoral de PFCM <u>in vivo</u> no modelo de Sarcoma 180</i>	71
4.2. <i>Análise dos parâmetros representativos de toxicidade</i>	74
4.2.1. <i>Peso dos Órgãos</i>	74
4.2.2. <i>Avaliação Histopatológica e Hematológica</i>	74
5. CONCLUSÕES	84
<u>CAPÍTULO III:</u>	85
ESTUDO DAS PROPRIEDADES HIPOGLICEMIANTE E HIPOLIPIDÊMICA E DA AÇÃO ANTI-INFLAMATÓRIA DOS POLISSACARÍDEOS PÉCTICOS DE <i>PASSIFLORA EDULIS</i> FO. FLAVICARPA O. DEG., PASSIFLORACEAE EM RATOS DIABÉTICOS	
1. REFERENCIAL TEÓRICO	86
1.1. <i>Considerações gerais sobre síndrome metabólica e diabetes mellitus</i>	86
1.2. <i>Tipos de diabetes</i>	90
1.3. <i>Diabetes e Inflamação</i>	93
1.4. <i>Formas de Tratamento do diabetes mellitus</i>	93
1.5. <i>Modelos Animais em diabetes mellitus</i>	95
1.6. <i>Plantas com Atividade Hipoglicemiante</i>	97
2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	100
3. MATERIAL E MÉTODOS	101
3.1. <i>Reagentes</i>	101
3.2. <i>Animais</i>	101
3.3. <i>Testes bioquímicos do sangue e atividade antidiabética em ratos</i>	101
3.3.1. <i>Determinação dos níveis de glucose</i>	102
3.3.2. <i>Determinação dos níveis de triglicérides</i>	103
3.3.3. <i>Determinação dos níveis de colesterol total</i>	103
3.3.4. <i>Determinação dos valores das transaminases (ALT/AST)</i>	103
3.4. <i>Edema de pata induzido por carragenina em ratos</i>	104
3.5. <i>Edema de pata induzido por formalina em camundongos</i>	105

<i>3.6. Histologia e análise imunohistoquímica para TNF-alfa e iNOS na pata com edema induzido por carragenina</i>	105
<i>3.7. Efeito de PFCM sobre a secreção de Mieloperoxidase (MPO) por neutrófilos humanos in vitro</i>	106
<i>3.8. Análise Estatística</i>	107
4. RESULTADOS	108
<i>4.1. Efeitos de PFCM nos parâmetros bioquímicos do sangue (glucose, triglicérides, colesterol total, ALT e AST) em ratos diabéticos.</i>	108
<i>4.2. Efeitos do tratamento com PFCM no edema de pata induzido por carragenina em ratos.</i>	117
<i>4.3. Efeitos de PFCM sobre a intensidade inflamatória avaliados como tempo de lambadura da pata em segundos na segunda fase do teste da formalina em camundongos.</i>	118
<i>4.4. Efeitos de PFCM sobre a secreção de mieloperoxidase (MPO) por neutrófilos humanos</i>	121
<i>4.5. Análise histológica de cortes do edema de pata induzido por carragenina em ratos antes e após tratamento com PFCM</i>	122
<i>4.6. Efeitos de PFCM na imunohistoquímica para TNF-alfa e iNOS em cortes do edema de pata induzido por carragenina em ratos</i>	122
5. DISCUSSÃO	125
6. CONCLUSÕES	134
CONSIDERAÇÕES FINAIS	135
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	136

LISTA DE TABELAS

TABELA	PÁGINA
1. Teor de fibra alimentar total (FAT) em resíduos de alimentos	26
1.1. Conteúdos de proteína bruta, lipídeos, cinzas e fibra alimentar total (FAT) da farinha da casca dos frutos de <i>Passiflora edulis</i>	46
1.2. Dados de composição proximal e monossacarídica da fração polissacarídica de <i>Passiflora edulis</i> (PFCM)	49
2.1. Linhagens de células tumorais utilizadas no ensaio de citotoxicidade <i>in vitro</i>	67
2.2. Representação dos grupos de animais utilizados de acordo com o tipo de substância teste, sua concentração e via de administração	69
2.3. Efeito inibitório do crescimento do tumor (Sarcoma 180) de diferentes polissacarídeos de acordo com a dose utilizada, origem e via de administração	73
2.4. Efeitos da fração polissacarídica (PFCM) isolada de <i>Passiflora edulis</i> , e do 5-FU no peso dos órgãos de camundongos injetados com Sarcoma 180 ($2,0 \times 10^6$ células/animal s.c.)	75
2.5. Efeitos da fração polissacarídica (PFCM) isolada de <i>Passiflora edulis</i> , e do 5-FU nos parâmetros bioquímicos sanguíneos dos animais inoculados com Sarcoma 180 ($2,0 \times 10^6$ células/animal s.c.)	76
2.6. Efeitos da fração polissacarídica (PFCM) isolada de <i>Passiflora edulis</i> , e do 5-FU nos parâmetros hematológicos periféricos. Os animais foram injetados com Sarcoma 180 ($2,0 \times 10^6$ células/animal s.c.). O tratamento foi iniciado um dia após a implantação do tumor, sendo continuado por 7 dias consecutivos	82
3.1. Valores de glicose plasmática (mg/dL) nos quadros normal e diabético em ratos adultos machos.	91
3.2. Valores de referência dos parâmetros bioquímicos glicose, triglicérides, colesterol total e transaminases hepáticas (ALT e AST) para indivíduos saudáveis da espécie <i>Ratus norvegicus</i>	102

LISTA DE FIGURAS

FIGURA	PÁGINA
1.1. Esquema representativo da estrutura básica de pectinas	36
1.2. Esquema de obtenção da fração de polissacarídeos extraída da casca dos frutos de <i>Passiflora edulis</i> (PFCM)	43
1.3. Cromatograma HPSEC dos polissacarídeos de <i>Passiflora edulis</i> (PFCM) em coluna Ultrahidrogel	50
1.4. Espectro FT-IV em pastilhas de KBr dos polissacarídeos de <i>Passiflora edulis</i> (PFCM) na região de comprimento de onda de 4000 – 500 cm^{-1}	52
1.5. Representação estrutural dos principais monossacarídeos constituintes de PFCM.	54
1.6. Espectro de RMN dos Polissacarídeos de <i>Passiflora edulis</i> (PFCM) em D_2O .	55
2.1. Ilustração esquemática mostrando as habilidades adquiridas pelas células neoplásicas.	61
2.2. Ativação de células do sistema imune por polissacarídeos modificadores da resposta biológica	63
2.3. Efeito dos polissacarídeos isolados de <i>Passiflora edulis</i> (PFCM) e 5-FU sobre o desenvolvimento do tumor em animais transplantados com Sarcoma 180	72
2.4. Microfotografias dos cortes histológicos (400x) de tumores de camundongos transplantados com células tumorais de S 180	77
2.5. Microfotografias dos cortes histológicos (400x) de fígados de camundongos transplantados com células tumorais S 180	78
2.6. Microfotografias dos cortes histológicos (400x) de rins de camundongos transplantados com células tumorais S 180	79
2.7. Microfotografias dos cortes histológicos (400x) de baços de camundongos transplantados com células tumorais S 180	80
3.1. Mecanismos de sinalização da insulina e relação com vias de inflamação	93
3.2. Efeitos da fração polissacarídica (PFCM 0,5, 2, 10, 25, 50 e 100 mg/kg, v.o. administrada diariamente por 5 dias) de <i>Passiflora edulis</i> nos níveis de glicose sanguínea em ratos com diabetes induzido por aloxano	110
3.3. Efeitos da fração polissacarídica (PFCM 0,5, 2, 10, 25, 50 e 100 mg/kg, v.o. administrada diariamente por 5 dias) de <i>Passiflora edulis</i> nos	111

níveis de triglicérides em ratos com diabetes induzido por aloxano

- 3.4. Efeitos da fração polissacarídica (PFCM 0,5, 2, 10, 25, 50 e 100 mg/kg, v.o. administrado diariamente por 5 dias) de *Passiflora edulis* nos níveis de colesterol total em ratos com diabetes induzido por aloxano 112
- 3.5. Efeitos da fração polissacarídica (PFCM 0,5, 2, 10, 25, 50 e 100 mg/kg, v.o. administrado diariamente por 5 dias) de *Passiflora edulis* nos níveis de aspartato transferase (AST) em ratos com diabetes induzido por aloxano. 113
- 3.6. Efeitos da fração polissacarídica (PFCM 0,5, 2, 10, 25, 50 e 100 mg/kg, v.o. administrado diariamente por 5 dias) de *Passiflora edulis* nos níveis de alanina transaminase (ALT) em ratos com diabetes induzido por aloxano 114
- 3.7. Efeitos de PFCM no teste preventivo em ratos diabéticos sobre os níveis dos parâmetros bioquímicos do sangue, glucose, triglicérides e colesterol total. 116
- 3.8. Efeitos da administração aguda de PFCM no edema de pata induzido por carragenina em ratos. 117
- 3.9. Efeitos da administração aguda de PFCM (1, 25, 50 e 100 mg/kg, i.p.) no edema de pata induzido por formalina em camundongos em relação ao tempo de lambadura de pata em segundos 119
- 3.10. Efeitos da administração aguda de PFCM (25 e 50 mg/kg, v.o.) no edema de pata induzido por formalina em camundongos em relação ao tempo de lambadura da pata em segundos 120
- 3.11. Efeitos de PFCM (0,1 a 100 µg/mL) na secreção de Mieloperoxidase por neutrófilos humanos estimulados por acetato de forbol miristato 121
- 3.12. Microfotografias de lâminas coradas com hematoxilina e eosina, representativas de secções de edema de pata induzido por carragenina em ratos 123
- 3.13. Imunohistoquímica para óxido nítrico sintase induzida (iNOS) e fator de necrose tumoral (TNF- α) em secções de tecidos inflamados das patas de ratos submetidos à injeção de carragenina no modelo de inflamação aguda. 124

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS UTILIZADAS

5-FU	5-fluorouracil
A.O.A.C	The Scientific Association Dedicated to Analytical Excellence
AGP	Glicoproteína α -ácida
ALT	Alanina Aminotransaminase
AST	Aspartato Aminotransaminase
BSA	Albumina sérica bovina
Cg	Carragenina
DNA	Ácido desoxirribonucléico
FAT	Fibra alimentar total
GLC	Cromatografia líquida-gasosa
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HG	Homogalacturonanas
HPSEC	Cromatografia de exclusão molecular de alta performance
i.p.	Intraperitoneal
INDO	Indometacina
iNOS	Óxido sintase induzida
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
MPO	Mieloperoxidase
MTT	Brometo de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-il)-2,5 difeniltetrazolio
NO	Óxido nítrico
PFCM	Polissacarídeo da farinha comercial do maracujá
RG-I	Ramnogalacturonanas do tipo 1
RG-II	Ramnogalacturonanas do tipo 2
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RNA	Ácido ribonucléico
SNC	Sistema Nervoso Central
STZ	Estreptozotocina
TFA	Ácido trifluoroacético

TNF	Fator de necrose tumoral
UKPDS	United Kingdom Prospective Study
UV	Ultravioleta
v.o.	Via oral

RESUMO

Polissacarídeos de *Passiflora edulis* fo. *Flavicarpa* O. Deg., Passifloraceae: Estudo Químico-Estrutural e Avaliação dos Efeitos Antitumoral, Antidiabético e Anti-inflamatório

Draulio Costa da Silva

Estudos indicam que os carboidratos considerados fibras alimentares protegem contra doenças cardiovasculares, obesidade e diabetes. Essas moléculas são consideradas farmacologicamente ativas uma vez que modificam a resposta biológica, inclusive melhorando a resposta imunológica, sendo relatadas por reduzirem os riscos de desenvolvimento de alguns tipos de câncer. O maracujá (Família Passifloraceae) é uma planta típica de climas tropicais e objeto de diversos estudos na área farmacológica. A casca do fruto é rica em carboidratos fontes de fibra, principalmente pectinas. Neste trabalho, objetivou-se o isolamento e caracterização químico-estrutural de uma fração polissacarídica da casca do maracujá amarelo (*Passiflora edulis* fo. *Flavicarpa* O. Deg.) e a avaliação dos efeitos antitumoral, antidiabético e anti-inflamatório em modelos animais. A fração denominada PFCM foi obtida por extração em água (3% p/v) sob aquecimento (90 – 100 °C), na ausência de condições ácidas, e caracterizada por microanálise, espectroscopia na região do infravermelho (FT-IV), ressonância magnética nuclear (RMN) e cromatografia de exclusão molecular de alta performance (HPSEC). O componente majoritário de PFCM foi o ácido galacturônico (44,2 g/100g) ligado por ligações (1→4) (esterificado e não-esterificado). Açúcares neutros como arabinose (11,8 g/100g), glucose (11,8 g/100g), ramnose (10,6 g/100g), manose (9,0 g/100g), fucose (1,6 g/100g), xilose (3,6 g/100g) e ribose (1,3 g/100g) foram encontrados. A amostra de PFCM teve massa molar (8×10^4 g/mol) similar ao de pectinas extraídas de *P. edulis* sob condições ácidas. O teor de proteína foi de 3%. Estruturalmente, PFCM apresenta uma cadeia linear composta de homogalacturonanas (HG) e ramnogalacturonanas do tipo I (RG-1) com uma baixa razão ácido galacturônico/ramnose, e um baixo grau de esterificação ($26,2 \pm 0,8$ mol%). Quando tratados com PFCM (10 ou 25 mg/kg, i.p e 50 ou 100 mg/kg, v.o. durante setes dias), camundongos transplantados com células malignas de Sarcoma 180 mostraram inibição do crescimento do tumor variando de 40,59 a 72,89% dependendo da dose e via de administração (oral ou intraperitoneal). Análises hematológicas e histopatológicas nos animais mostraram que PFCM aumenta em número, os tipos celulares envolvidos nos mecanismos de defesa primária, e que nenhuma alteração significativa nos parâmetros bioquímicos (ALT, AST e uréia) foi observada. Mais ainda, eventos característicos de lesões nos órgãos (rins e fígado, por exemplo) nos animais inoculados com S-180 apresentaram-se potencialmente reversíveis nos grupos tratados com PFCM. Além disso, o tratamento com PFCM aumentou o peso do baço e reduziu a leucopenia quando comparado com a droga padrão, 5-fluorouracil, o que sugere uma relação imunoestimulante com a ação antitumoral observada. Também foram avaliados os efeitos de PFCM na glicemia, níveis de triglicérides e colesterol total no plasma de ratos com diabetes induzido por aloxano. Ratos machos foram divididos nos seguintes grupos: controle diabético e diabético tratado oralmente com PFCM durante 5 dias. glibenclâmida (Gli) e metformina (Met) foram usadas como drogas de referência. Quarenta e oito horas após a administração de aloxano, parâmetros sanguíneos foram determinados (antes do tratamento) e novamente após o quinto dia (após tratamento). PFCM (2 – 100 mg/kg, v.o.) diminuiu os níveis de glucose, triglicérides e colesterol total nos ratos diabéticos (reduções de até 65, 74 e 43%, respectivamente). De maneira a

avaliar a relação entre diabetes e inflamação, observou-se o efeito de PFCM sobre o edema de pata induzido por carragenina em ratos e no teste de lambedura da pata por formalina em camundongos, além da avaliação *in vitro* da secreção de mieloperoxidase (MPO) por neutrófilos humanos. PFCM reduziu o volume do edema de pata da segunda à quarta horas (31, 42 e 76%, respectivamente) e o tempo de lambedura da pata em camundongos durante a segunda fase do teste da formalina (até 89%), além de reduzir a secreção de mieloperoxidase (até 62%). Nos experimentos de edema de pata induzido por carragenina, as patas foram dissecadas para determinação imunohistoquímica do fator de necrose tumoral (TNF- α) e da óxido nítrico sintase induzida (iNOS), duas citocinas inflamatórias com concentrações caracteristicamente elevadas em diabéticos. Observou-se que PFCM diminuiu parcialmente, a produção de TNF- α e iNOS além de inibir significativamente, a migração de neutrófilos para o local de inflamação. Em conclusão, os dados obtidos indicam que na estrutura de PFCM, a porção HG está em proporção menor do que RG-I, e que os efeitos antitumorais encontrados estejam relacionados a propriedades imuno-estimulantes. Os resultados de atividade antidiabética indicam PFCM para uso potencial como tratamento alternativo para o diabetes tipo 2. Além disso, as propriedades anti-inflamatórias podem estar envolvidas na ação antidiabética observada.

Palavras-chave: polissacarídeo de *Passiflora edulis*, pectina, caracterização, propriedade antitumoral, efeitos antidiabético e anti-inflamatório, citocinas

ABSTRACT

Polysaccharide of *Passiflora edulis* fo. *Flavicarpa* O. Deg., Passifloraceae: Chemical structure study and evaluation of Antitumoral, Antidiabetic and Anti-inflammatory effects

Draulio Costa da Silva

Studies indicate that carbohydrates considered dietary fiber protect against cardiovascular diseases, obesity and diabetes. These molecules are considered pharmacologically active since that modify the biological response, including by improving the immune response, being reported by reducing the risk of developing some cancers. Passion fruit (Family Passifloraceae) is a typical plant of tropical and object of several studies in pharmacology. The skin of the fruit is rich in carbohydrates sources of fiber, especially pectin. This work purposes to isolate and characterize structurally and chemically a polysaccharide fraction from the bark of yellow passion fruit (*Passiflora edulis* fo. *Flavicarpa* O. Deg.) and the evaluation of anti-tumor, anti-diabetics and anti-inflammatory in animals models. Named PFCM, the fraction was obtained by water extraction (3% p/v) under heating (90 – 100 °C) without acid conditions and characterized by microanalysis, infrared spectroscopy (FT-IV), nuclear magnetic resonance (NMR) and highperformance size-exclusion chromatography (HPSEC). The major component in PFCM was galacturonic acid (44,2g/100g) linked by connections (1– 4) (esterified and unesterified). Neutral sugars such as arabinose (11,8 g/100g), glucose (11,8 g/100g), rhamnose (10,6 g/100g), mannose (9,0 g/100g), fucose (1,6 g/100g), xilose (3,6 g/100g) and ribose (1,3 g/100g) were found. The PFCM sample had a similar molar mass (8×10^4 g/moi) to that of pectin extracted from *Passiflora edulis* under acidic conditions. The protein grade was 3%. Structurally, PFCM has a linear chain, composed of homogalacturonan (HG) and type 1 rhamnogalacturonan (RG-1) with a low galacturonic/rhamnogalacturonan ratio and a low esterification level ($26,2 \pm 0,8$ mol%). When treated with PFCM (10 ou 25 mg/kg, i.p e 50 ou 100 mg/kg, v.o. during seven days), 180 sarcoma transplanted rats showed a tumor growth inhibition that varies from 40,59 to 72,89% depending on the dosage and type of administration (oral or intraperitoneal). Animals hematologic and *histopathological* analysis, show that PFCM increases in numbers, the cell types involved in primary defense and no significant changes in the biochemical parameters (ALT, AST and urea) were observed. Moreover, characteristic events of organs' damages (kidney and liver, for example) in S-180 inoculated animals, shows potentially reversible in PFCM treated groups. Besides, PFCM treatment increased the spleen weight and reduced leukopenia when compared with the standard drug, 5-fluorouacil, that suggests a immunostimulant relation with anti-tumor action observed. This study also evaluated PFCM effects in glycemia, total triglycerides and cholesterol levels in plasma's alloxan-induced diabetes rats. Male rats were divided into the following groups: diabetic control and PFCM orally treated diabetic during 5 days. Glibenclamide (gli) and Metformin (Met) were used as reference drugs. Forty-eight hours after alloxan administration, blood measures were determined (before treatment) and again after the fifth day (after treatment). PFCM (2 – 100 mg/kg, v.o.) decreased total glucose, triglyceride and cholesterol levels in diabetic rats (respective 65, 74 and 43% reductions). In a way to evaluate diabetes and inflammation relation, the effect of PFCM on carrageen-induced paw edema rats was observed and in the licking paw test by formalin in mice, besides of myeloperoxidase *in vitro* secretion evaluation(MPO) by human neutrophils. PFCM

reduced paw edema's quantity from second to forth (respectively 31, 42 and 76%) and licking paw time in mice during second level of formalin test (till 89%), over and above reducing myeloperoxidase's secretion (till 62%). In carrageen-induced paw edema experiments, paws were dissected for immunohistochemistry determination of tumor necrosis' factor (TNF- α) and of induced nitric oxide synthase (iNOS) two *inflammatory cytokines with high concentrations* characteristically in diabetics. This work remarked that PFMC partially reduced TNF- α and iNOS production, besides importantly suppress neutrophils' migration to the inflammation place. To conclude, obtained data indicate that in PFMC structure, HG part is in smaller proportion than RG-I and that the anti-tumor effects found are related to the immunostimulant properties. Anti-diabetics activities results indicate that PFMC has potential as an alternative treatment for type 2 diabetes. Besides, its anti-inflammatory properties are probably involved in its observed antidiabetic action.

Keywords: *Passiflora edulis* polysaccharide, pectin, characterization, antitumor properties, antidiabetic and anti-inflammatory effects, cytokines

INTRODUÇÃO

➤ *Apresentação da pesquisa*

As indústrias de medicamentos empregam os dados da pesquisa científica para a descoberta de possíveis novas fontes de substâncias terapêuticas, através da síntese de produtos mais eficazes para o tratamento das diferentes patologias que acometem a sociedade moderna. Atualmente, a pesquisa por novas terapias emprega informações da medicina popular, principalmente através do uso das chamadas plantas medicinais. Um processo observado nas últimas décadas é o de ampliação do uso de produtos originados diretamente de plantas pela população, sobretudo nos países em desenvolvimento, onde são muito empregadas na forma de chás, infusões e extratos (RATES, 2001; DI STASI *et al*, 1994)¹. Dentre as diversas atividades e propriedades biológicas detectadas em componentes de plantas, aquelas possuidoras de efeitos anticâncer e antidiabético são objetos de amplas discussões e análises nos últimos anos.

A síndrome metabólica característica do estado diabético é um fator bastante representativo como problema de saúde pública mundial. O diabetes configura um cenário preocupante, representando uma entre as dez maiores causas de morte nos países ocidentais (NEGRI, 2005). Segundo levantamento da Organização Mundial de Saúde, aproximadamente 3,8 milhões de pessoas no mundo morreram vítimas de doenças relacionadas ao diabetes em 2007, o que representa mais que 6% do total de óbitos. As estatísticas de descrição da incidência de morte em pacientes acometidos pela doença costumam subestimar a mortalidade por diabetes, isto porque apenas uma minoria de pessoas diabéticas morre de uma causa relacionada a uma única condição, como cetoacidose ou hiperglicemia. Cerca de 50% morrem de doença cardiovascular e de 10 a 20% de insuficiência renal, derivadas de complicações da doença (MORRISH *et al*, 2001). Estima-se que 1 (um) entre 14 (catorze) adultos terá diabetes em 2030. Serão 360 milhões de diabéticos em menos de vinte anos (WILD *et al*, 2004).

No Brasil, no ano de 2007, 5,8% da população entre 20 e 79 anos eram diabéticos. Para 2025, a previsão é que esse percentual suba para 11,4%. O país deve triplicar o número de diabéticos e subir duas posições no ranking mundial, (OMS, 2009).

¹ Embora estudos epidemiológicos mostrem que essa prática também ocorre em países desenvolvidos como Estados Unidos e França, nos quais extratos ou princípios ativos de plantas equivaliam a 25% e 50% das receitas médicas prescritas, respectivamente, entre os anos de 1959 a 1980 (FARNSWORTH, 1985; revisto por FARIAS, 1997).

O tratamento de patologias com tamanha incidência acarreta em custos elevados para os órgãos públicos. A OMS prevê que entre os anos de 2005 e 2015, haverá perda líquida da ordem de bilhões de dólares devido aos gastos com diabetes e doenças cardiovasculares em diversas nações. No Brasil, este valor está previsto em \$49 bilhões. Estas perdas decorrem da morte prematura das pessoas com a doença e da ineficiência de alguns dos tratamentos usuais. Um perfil semelhante é observado em relação aos tratamentos do câncer que se firma no cenário da saúde mundial como o responsável pelo maior número de mortes (OMS, 2009).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), anualmente cerca de 7,6 milhões de pessoas morrem no mundo devido a problemas relacionados ao câncer, contra 2,8 milhões de vítimas da AIDS. Mais de sete milhões ou 13% das cinquenta e seis milhões de mortes no ano de 2005 ocorreram devido a algum tipo de câncer. No Brasil os mais incidentes, seriam os cânceres de próstata e pulmão no sexo masculino, e de mama e colo de útero nas mulheres (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009).

Vale ressaltar que as perdas relacionadas ao diabetes e câncer não são apenas de aspecto econômico, mas também de caráter social onde a redução na qualidade de vida pode refletir efeito prejudicial de magnitude similar. Assim, a procura pela melhoria na qualidade de vida de pessoas acometidas pela doença promove a utilização de diversos produtos naturais, devido ao maior e mais fácil acesso à população, por serem derivados, na grande maioria das vezes, de plantas locais (RATES, 2001; GOTTLIEB; KAPLAN, 1993).

A pressão sócio-econômica exercida pelo diabetes e pelo câncer motiva diversos pesquisadores e organizações públicas e privadas a investirem na procura por novas drogas mais efetivas e capazes de amenizar os efeitos destas doenças. Dos diversos compostos químicos obtidos de vegetais com propriedades biológicas importantes, os polissacarídeos mostram-se como ferramentas farmacológicas potenciais, uma vez que possuem amplo espectro de propriedades terapêuticas com baixa toxicidade (PAULSEN, 2001; TZIANABOS, 2000).

Estudos indicam que os carboidratos considerados fibras alimentares protegem contra doenças cardiovasculares, obesidade, diabetes e câncer (LYON; REICHERT, 2010; MELLO; LAAKSONEN, 2009). Alguns tipos de fibra vegetal, sobretudo os de natureza pectínica, são relatados por seus efeitos benéficos à saúde, na medida em que diminuem os níveis de açúcares (hipoglicêmicos) e lipídeos (hipolipidêmicos) plasmáticos, além de proporcionarem reduções na absorção de elementos tóxicos e melhorarem o trânsito gastrointestinal (JANEBRO *et al*, 2010; PROSKI, 2000; DANSB, 1998; CHAU; HUANG,

2005). Essas moléculas são consideradas farmacologicamente ativas uma vez que modificam a resposta biológica, inclusive melhorando a resposta imunológica (LEUNG *et al*, 2006).

Polissacarídeos pécnicos obtidos de plantas também são relatados por seu potencial imunorregulador, além de imunoadjuvante com efeitos moduladores *in vivo* e *in vitro* sendo vistos como ferramentas interessantes para o estudo de neoplasias (PAULSEN, 2001; INNGJERDINGEN *et al*, 2005). É conhecido que tais moléculas podem reduzir os riscos de desenvolvimento de alguns tipos de câncer (NANGIA-MAKKER *et al*, 2002; JACKSON *et al*, 2007; AZÉMAR *et al*, 2007; GLINSKY; RAZ, 2009).

➤ **Fibra alimentar e ação terapêutica**

A química dos polissacarídeos tem influência direta nos métodos de extração e purificação (LEUNG *et al*, 2006). Como exemplo, a celulose, o polissacarídeo mais abundante na natureza, cuja estrutura química é caracterizada por uma cadeia linear de unidades de glucose ligadas entre si por ligações glicosídicas do tipo β (1→4), o que impede sua digestibilidade no trato-digestório da maioria dos animais (RAVEN *et al*, 2007).

No entanto, o fato de polissacarídeos complexos como a celulose, serem não digeríveis, não significa, necessariamente, que não possuam outras propriedades importantes além do fornecimento da energia contida em suas ligações químicas, a qual não pode ser aproveitada por nós, por exemplo. Por não possuímos enzimas capazes de digerir tais polímeros, é possível que a maioria deles passe através do trato gastrointestinal com poucas alterações em suas estruturas, reduzindo o tempo de trânsito do bolo alimentar e aumentando o volume fecal, o que pode alterar a absorção de nutrientes e manter toxinas ligadas impedindo, assim, sua absorção (A.A.C.C., 2001).

Antigamente, os carboidratos eram considerados simplesmente por sua função de fornecimento de energia. Embora isso represente o maior papel dessas moléculas na dieta, carboidratos mais complexos ou pobremente absorvidos pelas células intestinais podem também reduzir os níveis glicêmicos e afetar o metabolismo lipídico (VANDERHOOF, 1998).

Certos carboidratos sofrem a ação da microbiota intestinal com o processo de fermentação, aumentando a produção de compostos voláteis (metano, hidrogênio e dióxido de carbono) além de ácidos graxos de cadeia curta. Após absorvidos são transportados pela via

entero-hepática e iniciam importantes eventos nutricionais e fisiológicos, atuando inclusive, como agentes benéficos sobre o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, úlceras, constipações, apendicites, obesidade, alguns tipos de câncer e *diabetes mellitus* (KHATTAK, 2002).

Segundo a A.A.C.C. (2001), a expressão fibra alimentar refere-se a carboidratos, de partes comestíveis de plantas, resistentes à digestão e absorção nas células intestinais humanas, sofrendo completa ou parcial fermentação ao longo de sua passagem pelo trato intestinal. Nessa categoria estão incluídos polissacarídeos, oligossacarídeos, lignina e substâncias associadas. Essas moléculas são hoje classificadas, de acordo com sua solubilidade em água, em solúveis e insolúveis, sendo capazes de desempenhar efeitos fisiológicos benéficos, dentre os quais se inserem a ação laxativa e a diminuição dos níveis de colesterol e glucose plasmáticos.

As propriedades físicas e químicas e a fermentação da fibra alimentar são consideradas fatores determinantes nos efeitos fisiológicos e no impacto metabólico que a mesma exerce quando ingerida. As fibras podem ser quase completamente fermentadas no cólon produzindo ácidos graxos de cadeia curta. Embora se conheça pouco sobre sua implicação e mecanismo de ação, esses ácidos podem inibir a síntese de colesterol no fígado e incrementar a depuração de LDL através de sua viscosidade e capacidade de proteção da mucosa intestinal, interferindo na absorção dos lipídios ou reduzindo a glicemia pós-prandial e o estímulo para a síntese hepática de colesterol (GUILLON; CHAMP, 2000).

A solubilidade possui profundos efeitos na função da fibra alimentar. Polissacarídeos solúveis viscosos podem impedir a digestão e a absorção de nutrientes no intestino. A habilidade da fibra de ligar-se quimicamente e reter ácidos biliares sugere um mecanismo pelo qual, certas fibras podem apresentar propriedades hipocolesterolêmicas (GUILLON; CHAMP, 2000).

Quanto à relação entre triglicérides e fibras alimentares, já em 1987, Miettinen sugeriu que a redução dos níveis dessa classe de lipídios no plasma resulte de uma interferência direta em sua absorção devido às fibras, o que pode ser evidenciado por uma maior excreção de triglicérides nas fezes. Desde então, a propriedade das fibras alimentares em diminuir os níveis de triglicérides plasmáticos tem sido relatada (PARKS, 2001; APRIKIAN *et al*, 2003; RAMOS *et al*, 2008; PAPATHANASOPOULOS; CAMILLERI, 2010; VILLANUEVA *et al*, 2011).

Alimentos funcionais são alimentos naturais ou modificados, ou ingredientes da alimentação que proporcionam algum benefício à saúde, seja na prevenção e/ou tratamento de

patologias, além da função básica de participação no metabolismo primário (CRAVEIRO; CRAVEIRO; QUEIROZ, 1999). As fibras originadas de plantas podem ser consideradas alimentos funcionais por proporcionarem benefícios à saúde, tais como: normalização do tempo gastrointestinal, prevenindo diverticulites e constipação, câncer de cólon, promovendo saciedade, ajudando na redução de peso, propriedades essas que têm sido creditadas às fibras insolúveis; e diminuição de colesterol e controle de glicemia, derivadas possivelmente, da ação de fibras hidrossolúveis (PROSKI, 2000; DANSB, 1998). Por outro lado, a incrementação de fibras em alimentos naturais, ou mesmo industrializados, atuando como suplemento alimentar, também representa a formulação de um alimento funcional. Alimentos com elevados teores de fibra alimentar e β -glucanas são considerados produtos de grande importância do ponto de vista nutricional (GIUNTINI *et al*, 2003).

Sob esse aspecto, o incentivo ao consumo de produtos vegetais representa uma maneira de proporcionar à população uma dieta rica em fibras e a possibilidade de usufruir dos benefícios que tais alimentos possam oferecer. Giuntini *et al* (2003) destacam a grande quantidade de alimentos convencionais ou não, de uso regional em países ibero americanos, que são importantes do ponto de vista nutricional e como fonte de fibra alimentar. Esses alimentos, tornando-se mais conhecidos, podem ser admitidos enquanto uma alternativa capaz de enriquecer as dietas habituais. Segundo os mesmos autores, uma elevada quantidade de produtos residuais da atividade industrial em diversos países, constitui uma fonte importante de fibra (TABELA 1) e poderiam ser inseridos gradativamente no consumo alimentar da população. Além disso, o aproveitamento de subprodutos industriais alia o aspecto econômico e ambiental à produção de alimentos de boa qualidade nutricional e comprovadamente benéficos à saúde.

Como definição, Slavin (2003) sugere que fibra alimentar é composta de carboidratos não-digeríveis, e lignina, originados de plantas. Dentre esses, os que apresentam algum efeito fisiológico benéfico em humanos enquadram-se como fibras funcionais, enquanto a soma destas duas classes constitui a fibra total.

Nem todas as fibras produzem o mesmo efeito. A lignina, um polímero fenólico derivado da madeira de troncos, sementes de frutos e na camada externa de cereais, tem efeito hipocolesterolêmico, enquanto a celulose não apresenta a capacidade de reduzir os níveis de lipídios, embora a celulose cristalina possa reduzir a concentração de glucose no plasma em ratos por promover um aumento na viscosidade durante a digestão (TAKAHASHI *et al*, 2005).

A ação das fibras no controle do colesterol relaciona-se às propriedades físico-químicas (retenção de água, retenção de gordura, viscosidade e solubilidade) (GIUNTINI *et al*, 2003). Por outro lado, o consumo de pectina, um polímero presente na parte branca da casca de diversos frutos, exibe efeitos muito positivos na redução dos níveis de glicemia. Gomathy *et al* (1990) isolaram a pectina do talo de *Musa sapientum* e demonstraram sua ação hipoglicêmica em ratos normais. Após administração evidenciou-se um aumento na concentração de glicogênio no fígado, o que demonstra uma elevação na atividade da enzima glicogênio sintetase. Outro trabalho realizado por Kim (2005) atestou a capacidade de pectinas com alto grau de metoxilação diminuírem efetivamente a absorção intestinal de glucose.

TABELA 1 - Teor de fibra alimentar total (FAT) em resíduos de alimentos

País	Alimento	FAT (%)
Cuba	Abacaxi (casca)	85,2
Chile	Tremoço (farelo)	85,14
Colômbia	Maracujá (casca)	82,1
Cuba	Cevada (resíduo)	70,3
Colômbia	Milho (torta)	68,4
Cuba	Soja (casca)	65,1
Chile	Trigo (farelo)	44,5
Brasil	Milho (casca)	39,78
Brasil	Arroz (farelo)	24,34
Chile	Tremoço (farinha)	23,42
México	Beterraba (bagaço)	22,6
Chile	Aveia (farelo)	13,5
Brasil	Cenoura (folha, crua)	7,91
Brasil	Banana (casca)	4,92

Adaptado de GIUNTINI *et al* (2003)

Fibras alimentares são relatadas por seus efeitos hipoglicêmicos inclusive em indivíduos diabéticos (GIACO *et al*, 2000; SINGH *et al*, 2005; BENNETT *et al*, 2006; KAYODE *et al*, 2009; WOLFRAM; ISMAIL-BEIGI, 2011).

Por outro lado, tem-se demonstrado a propriedade das fibras de atuarem como moduladores da resposta imunológica (LEUNG *et al*, 2006), sendo capazes de induzir respostas fisiológicas benéficas frente a diferentes tipos de câncer (SCHEPETKIN; QUINN, 2006; KIM *et al*, 2007; LI *et al*, 2007; CHENG *et al*, 2010; RAMBERG *et al*, 2010).

Nos vegetais, a maioria dos polissacarídeos encontrados é relativamente não tóxica e apresenta poucos efeitos colaterais, o qual é o maior problema associado a compostos sintéticos. Esses dois fatores em conjunto tornam os polissacarídeos extraídos de plantas, ferramentas interessantes para terapia antitumoral e imunomodulatória (OVODOV, 1998; SHERENESHEVA *et al*, 1998). O uso desses polissacarídeos tem se mostrado bastante promissor particularmente na terapia anticâncer devido à insatisfação generalizada com as formas de tratamentos tradicionais, como a radio e quimioterapia que, apesar de ainda serem as mais utilizadas, freqüentemente apresentam efeitos colaterais e toxicidade para as células saudáveis. O crescimento de tumores está intrinsecamente relacionado a imunodeficiência (PRESTWICH *et al*, 2008). Dessa forma, a busca por substâncias naturais capazes de potencializar o sistema imune tem se tornado alvo de muitas pesquisas biomédicas.

➤ *Gênero Passiflora: aspectos gerais e estudos farmacológicos*

Tido como originado da América do Sul, o gênero *Passiflora* compreende cerca de 500 espécies classificadas na família Passifloraceae. As espécies conhecidas popularmente como maracujá estão distribuídas em regiões temperadas e tropicais do mundo, sendo muito raras na Ásia e Austrália (MCGUIRE, 1999).

As plantas do gênero *Passiflora* apresentam aspecto arbustivo ou herbáceo. São trepadeiras vigorosas, constituídas de muitas ramificações, com folhas geralmente, alternadas, algumas vezes simples, lobadas ou palmadas. As flores podem ser bissexuais ou unissexuais e chamam à atenção por suas cores e beleza exóticas, sendo muito utilizadas na ornamentação (DHAWAN *et al*, 2004).

Algumas espécies são comercialmente importantes na região dos trópicos, e apreciadas por seus frutos comestíveis, sendo a mais conhecida e comercializada a *Passiflora edulis* (MCGUIRE, 1999). Essa espécie, conhecida popularmente no Brasil como maracujá amarelo ou maracujá azedo, é uma das poucas frutas nacionais que apresentaram aumento no

consumo domiciliar (aproximadamente 283%, durante os anos de 1987 e 1996)². É caracterizada por sua resistência à moléstias e por sua grande produtividade, adaptando-se facilmente ao clima tropical com a produção de frutos maiores com melhor rendimento de polpa para a fabricação de sucos na indústria (I.T.A.L., 1980).

O Brasil é um dos maiores produtores de maracujá. Das 150 espécies nativas do Brasil, 60 produzem frutos que podem ser utilizados como alimento de maneira direta e indireta. A espécie *P. edulis* é a mais cultivada e sua produção destina-se predominantemente à produção de sucos (SILVA; MERCADANTE, 2002).

Devido à grande utilização da polpa do fruto na indústria de sucos, elevadas quantidades da casca de maracujá são dispensadas e consideradas como resíduo de produtos industriais. Empregar tais resíduos como matéria prima para obtenção de produtos de elevado valor de mercado, como as pectinas, é uma forma de conciliar a diminuição de elementos poluentes com a obtenção e comercialização de elementos rentáveis financeiramente (MADHAV; PUSHPALATHA, 2002; PINHEIRO *et al*, 2008; YAPO, 2009; KLIEMANN *et al*, 2009; KULKARNI; VIJAYANAND, 2010).

A casca do maracujá compõe cerca de 52% da massa do fruto e apresenta características e propriedades importantes para a fabricação de novos produtos alimentares (MEDINA, 1980). Dentre os polissacarídeos da parede celular da casca do maracujá, celulose e pectinas são os principais componentes, sendo os polissacarídeos pécticos equivalentes a 19.1% do peso seco da casca (YAPO; KOFFI, 2006). Aliado a esse fato, o incremento de pectinas como tipo de fibra alimentar aos alimentos naturais ou mesmo industrializados, também representa a formulação de um alimento funcional (GIUNTINI *et al*, 2003). Além disso, foi demonstrado que a ingestão de pectinas contribui para a manutenção da homeostase e representa fatores benéficos para a saúde sob diversos aspectos em casos de diabetes e câncer.

Várias espécies do gênero *Passiflora* são usadas extensivamente na terapia tradicional em muitos países. Diversos extratos de partes aéreas, bem como compostos purificados da planta são descritos como possuidores de uma gama de propriedades biológicas, fornecendo amplo espectro de ferramentas farmacológicas interessantes.

Dhawan *et al* (2004) realizaram uma extensa revisão bibliográfica sobre o gênero *Passiflora* e descreveram vários trabalhos com muitas espécies do gênero. Os autores citam um grande número de constituintes fitoquímicos, como alcalóides, fenóis, glicosídeos, e

² Segundo IBGE, 1999

compostos cianogênicos, os quais são referidos na literatura como importantes agentes farmacológicos.

Espécies de *Passiflora* têm sido usadas como ansiolíticos, sedativos, diuréticos e analgésicos (OGA *et al*, 1984). Frutos de *P. caerulea* são tradicionalmente usados como sedativos e ansiolíticos (HICKEY; KING, 1988). Essa mesma espécie foi usada como vermífugo, antiespasmódico, remédio para insônia, antimicrobiano e no tratamento de doenças como pneumonia (ANESINI; PEREZ, 1993).

A espécie *P. edulis* é usada na medicina popular em diversas regiões do mundo como sedativo, diurético, antihelmíntico, tônico e também, no tratamento da hipertensão, sintomas desagradáveis da menopausa e cólica infantil, além de ser empregada como estimulante digestivo, no tratamento de carcinomas gástricos, disenteria, constipação, histeria e insônia (CHOPRA *et al*, 1956; KIRTIKAR; BASU, 1975; MORREY, 1993; WATT; BREYER-BRANDWIJK, 1962; JAMIR *et al*, 1999; NWOSU, 1999, citados por DHAWAN; DHAWAN; SHARMA, 2004).

Extratos das folhas de *Passiflora incarnata* foram avaliados quanto a distúrbios do sono em ratos. Contudo, nenhuma alteração significativa foi evidenciada no tempo de latência dos animais (SHINOMYTA *et al*, 2005). Por outro lado, os extratos de *P. incarnata* em associação com extratos de *Piper methysticum*, prolongaram o período de sono induzido por barbitúricos (CAPASSO; SORRENTINO, 2005). Extratos metanólicos das folhas de *P. edulis*, ricos em polifenóis, administrados oralmente nas doses de 10 e 50 mg/kg, baixaram significativamente a pressão sanguínea sistólica em ratos hipertensos (ICHIMURA *et al*, 2006).

Também são relatadas na literatura atividades antioxidantes de espécies de *Passiflora*. Tomonnaro *et al* (2007) isolaram uma nova xiloglucana da casca dos frutos de *P. ligulares* e evidenciaram o efeito antioxidante do polissacarídeo. Talcott *et al* (2003) e Vasco; Ruales; Kamal-Eldin (2008) demonstraram a atividade antioxidante elevada em frações da casca de *P. edulis* e sugerem que a ação esteja relacionada à presença de polifenóis. Efeito antioxidante também foi relatado para extratos aquosos e etanólicos das flores de *Passiflora incarnata*, sendo o extrato em álcool mais eficiente em neutralizar os radicais livres do que o extrato obtido em água (MASTEIKOVA *et al*, 2008).

Ensaio de toxicologia pré-clínica em animais foram realizados com extratos de *P. incarnata*. O tratamento em doses elevadas por 180 dias não mostrou indícios de efeito tóxico em nenhum parâmetro analisado. Segundo os autores, a utilização não oferece riscos à saúde em humanos (TABACH *et al*, 2009).

Trabalhos evidenciando a atividade anti-inflamatória de espécies do gênero *Passiflora* também são encontrados na literatura (MONTANHER *et al*, 2006; GONÇALVES FILHO *et al*, 2006; FRODE *et al*, 2007; VARGAS *et al*, 2007; MONTANHER *et al*, 2007). Alguns estudos têm mostrado uma relação próxima entre inflamação e doenças metabólicas como o próprio diabetes (LUCA; OLEFSKY, 2008; SNELL-BERGEON *et al*, 2010; DEVARAJ *et al*, 2008; ZOZULINSKA; WIERUSZ-WYSOCKA, 2006; WU; WU, 2006; LIN *et al*, 2008; GOLDBERG, 2009; KING 2008). Nessa abordagem, alguns trabalhos mostram o potencial hipoglicemiante e hipolipidêmico de espécies de *Passiflora*, analisados a partir de diferentes órgãos da planta como folhas e sementes (EDWIN *et al*, 2007; CHAU; HUANG, 2004; OU *et al*, 2001).

A fibra alimentar isolada das sementes de *Passiflora edulis* por Chau; Huang (2004) exibiu alta capacidade de troca catiônica, promovendo a desestabilização de emulsões lipídicas e diminuindo conseqüentemente, a difusão e absorção de gorduras e colesterol nas células intestinais. Também foi demonstrada pelos autores uma alta capacidade de ligação à glucose, diminuindo os níveis do açúcar disponível para absorção no intestino, e uma ação inibidora da atividade α -amilásica.

Outro trabalho (DOYAMA *et al*, 2005) relata a utilização de extratos aquosos das folhas de *P. alata*, conhecido como maracujá-doce. As amostras foram administradas em ratos normais três vezes por semana durante 15 dias. Após esse período, amostras de sangue dos animais foram colhidas e analisadas quanto aos níveis de glucose, colesterol, HDL, LDL, triglicérides e peso corpóreo. Segundo os autores, as condições gerais e o comportamento dos animais durante o experimento se mostraram normais e não foram observadas alterações em relação às concentrações de glucose, triglicérides, colesterol e LDL, mas foram evidenciados aumentos nos níveis de HDL.

Um estudo clínico com 36 voluntários saudáveis que fizeram uso da farinha da casca de *P. edulis* durante 8 semanas atestou boa tolerância ao produto, sem o relato de reações adversas. Ao final do ensaio, os resultados evidenciaram atividade hipoglicemiante e hipolipidêmica com reduções tanto nos níveis de colesterol total quanto de triglicérides (MEDEIROS *et al*, 2009).

Ensaio clínico para avaliar os efeitos da farinha da casca do maracujá amarelo em pacientes diabéticos tipo 2 mostraram redução significativa na glicemia de jejum, juntamente com reduções nos valores médios de hemoglobina glicada, além de reduzir os níveis plasmáticos de triglicérides sem contudo, alterar as concentrações de colesterol e LDL durante os sessenta dias de tratamento com a dieta. A fórmula utilizada poderia, inclusive,

ser empregada no tratamento paralelo ou como terapia alternativa para a síndrome metabólica (JANEIRO *et al*, 2008; 2010).

Ramos e colaboradores (2007) avaliaram o efeito da farinha da casca de *P. edulis f. flavicarpa* na redução do colesterol em um estudo clínico piloto com dezenove mulheres, com idade entre 30 e 60 anos e apresentando hipercolesterolemia. O tratamento consistiu na ingestão diária de 30 g da farinha da casca de maracujá por 60 dias. Após esse tempo, foi observada uma redução nos níveis de colesterol total e colesterol LDL. Os autores sugerem que a farinha da casca de maracujá seja utilizada na alimentação humana juntamente com os alimentos ou como matéria prima na produção de outros produtos, com o objetivo de reduzir o colesterol.

Atualmente, a farinha da casca dos frutos é utilizada como suplemento alimentar. Considerada uma potencial fonte de fibras, principalmente pectinas (YAPO; KOFFI, 2006), a farinha é consumida pela população em geral para o controle do diabetes. De fato, alguns trabalhos citados na literatura demonstram a propriedade da farinha em reduzir a glicemia de jejum, além de alterar positivamente os níveis de triglicérides relacionados ao quadro diabético. Contudo, os estudos existentes são relacionados à utilização da farinha da casca dos frutos ou de extratos de partes aéreas da planta (JANEIRO *et al*, 2008; 2010; RAMOS *et al*, 2007), nenhum trabalho demonstrando a ação direta da fibra obtida a partir da casca do maracujá foi relatado, o que revela uma carência de estudos que foquem a utilização de seus carboidratos constituintes e, mais ainda, é necessário analisar as características químicas dessas moléculas de modo a facilitar o entendimento de suas propriedades biológicas.

Poucos trabalhos na literatura científica abordam estudos de espécies de maracujá frente a tipos de câncer. Ação antiproliferativa de extratos etanólicos de *Passiflora foetida* contra células de adenocarcinoma foi avaliada por Moongkarndi *et al* (2004), que propuseram um estudo mais aprofundado da atividade detectada. Rowe *et al* (2004) sugeriram que componentes fitoquímicos presentes em frutos de *P. incarnata* estejam relacionados com a atividade anticâncer detectada por esses autores. Células normais submetidas a tratamento com agente carcinogênico foram incubadas com o suco obtido da polpa dos frutos. A amostra foi eficaz em reduzir em tamanho e número, as células transformadas. Segundo os autores, compostos fitoquímicos presentes no suco seriam capazes de interferir no processo de apoptose. Um segundo trabalho com essa mesma espécie revelou o potencial de um alcalóide isolado a partir de extratos das flores, em reduzir a supressão pós-cirúrgica da atividade de células NK, podendo assim, atuar como antimetástico (BEAUMONT *et al*, 2008).

OBJETIVO GERAL

Caracterização químico-estrutural de uma fração polissacarídica obtida por extração a quente em água e precipitação alcoólica a partir da casca dos frutos de *Passiflora edulis*, avaliando sua ação antitumoral em modelo animal de Sarcoma 180 e seus efeitos nos parâmetros fisiológicos em ratos diabéticos.

CAPÍTULO I

Caracterização químico-estrutural de uma fração polissacarídica isolada da casca dos frutos de *Passiflora edulis* fo. *flavicarpa* O. Deg., Passifloraceae.

1. REFERENCIAL TEÓRICO

1.1. *Pectinas*

Carboidratos são polihidroxi aldeídos ou polihidroxi cetonas, ou substâncias capazes de formar tais compostos quando hidrolisadas. Constituem o grupo de biomoléculas mais abundante na natureza. Bilhões de toneladas de gás carbônico e água são, anualmente, convertidas por plantas e algas, em celulose e em vários outros produtos vegetais. Certos carboidratos, como açúcares simples e amido, são a base alimentar de organismos não-fotossintetizantes, sendo oxidados e utilizados em vias metabólicas para suprir a demanda energética (LEHNINGER *et al*, 2006).

Essas moléculas podem ser agrupadas em três classes, de acordo com o seu tamanho: monossacarídeos, os açúcares mais simples, constituídos por uma única unidade de poliidroxi aldeído ou cetona (glucose, galactose, xilose, ácido galacturônico, ramnose, arabinose são exemplos); oligossacarídeos, compostos de cadeias curtas, formadas de monossacarídeos unidos entre si por ligações glicosídicas, sacarose e frutose, por exemplo; e polissacarídeos. Estes últimos apresentam cadeias longas, lineares ou ramificadas, de centenas a milhares de unidades de monossacarídeos (LEHNINGER *et al*, 2006).

A forma ramificada ou linear como o composto se apresenta, constitui sua estrutura espacial. O arranjo diversificado das moléculas de polissacarídeos permite às mesmas adotar uma grande variedade de formas. A maneira como suas ligações químicas estão formadas, dita, na maioria das vezes, as propriedades e papéis biológicos que possuem e desempenham (LEUNG *et al*, 2006).

A matriz extracelular das plantas é formada principalmente por água, proteínas e uma mistura de polissacarídeos complexos, dentre os quais se destacam pectinas, celulose e hemicelulose (RAVEN *et al*, 2007). As quantidades de celulose, hemicelulose e pectina podem variar de 25 a 30%, 30 a 55% e de 10 a 30%, respectivamente, dependendo da espécie, do tipo celular e estágio de maturação (LEUNG *et al*, 2006).

Pectinas são polissacarídeos com alto grau de solubilidade em água, ricos em ácido galacturônico o que lhes confere um caráter ácido (LEUNG *et al*, 2006). São considerados polissacarídeos formados de hidrocolóides com ocorrência natural em plantas

superiores, sendo muito usadas na indústria de alimentos devido a sua capacidade de formar géis e atuarem como estabilizante e emulsificante (WINNING *et al*, 2007). Na célula, as pectinas estão relacionadas com proteção e com a manutenção do meio iônico, modificando a difusão de íons pela parede celular e regulando sua porosidade (BUCKERIDGE, TINÉ, 2000).

Quimicamente, pectinas são misturas de polissacarídeos complexos com a predominância de homogalacturonanas (HG) podendo também ser constituídas por ramnogalacturonanas (RG) (**FIGURA 1.1**). Contém 10% ou mais de substâncias orgânicas, compostas de arabinose, galactose ou outros açúcares neutros como glucose, ramnose e xilose (MADHAV; PUSHPALATHA, 2002; YAPO; KOFFI, 2006), podendo também apresentar açúcares raros tais como apiose (DARVILL *et al*, 1978), ácido acérico (ou 3-Ccarboxi- 5-deoxi-L-xilose) (SPELLMAN *et al*, 1983), 2-O-metil-fucose (BARRETT; NORTHCOT, 1965; DARVILL *et al*, 1978), 2-O-metil-xilose (BARRETT; NORTHCOT, 1965; DARVILL *et al*, 1978), Kdo (ácido 2-ceto-3-deoxi-D-mano-octulosônico) (STEVENSON *et al*, 1988) e Dha (ácido 3-deoxi-D-lixo-2-heptulosárico) (**FIGURA 1.1**) (YORK *et al*, 1985).

As homogalacturonanas são tipicamente polímeros lineares com unidades repetidas de ácido galacturônico unidas por ligações glicosídicas α -(1→4), formando longas cadeias (CAPEL *et al*, 2006), nas quais grupos ácidos podem estar metil-esterificados ou O-acetiladas em C-2 e C-3. Em cada caso, o percentual de esterificação é expresso como grau de metoxilação (DM) e grau de acetilação, respectivamente (LEVIGNE *et al*, 2002). Pectinas com DM equivalente a 14% e médias de esterificação entre 50 e 80% são consideradas como altamente metoxiladas, por outro lado, as que apresentam DM máximo de 7% ou grau de esterificação menor que 50% são classificadas como de baixo grau de metoxilação (LIMA *et al*, 2010). A qualidade do gel formado pela pectina é dependente de seu conteúdo metoxil (MADHAV, 2002).

Ramnogalacturonanas constituem a região ramificada das pectinas sendo divididas em dois tipos: ramnogalacturonanas I (RG-I) e ramnogalacturonanas II (RG-II). RG-I consiste de uma cadeia principal de unidades alternantes de ácido D-galacturônico ligadas por ligações glicosídicas α -(1→4), e ramnose ligadas por α -(1→2), a qual se ligam cadeias laterais neutras tais como arabinanas e arabinogalactanas (De VRIES, 1988). RG-II é o menor e mais complexo polissacarídeo péctico das paredes celulares vegetais (PELLERIN *et al*, 1996). Contém uma alta proporção de unidades de ramnose ligadas (1→3) e (1→2,3,4) como unidades terminais (VORAGEN *et al*, 1995).

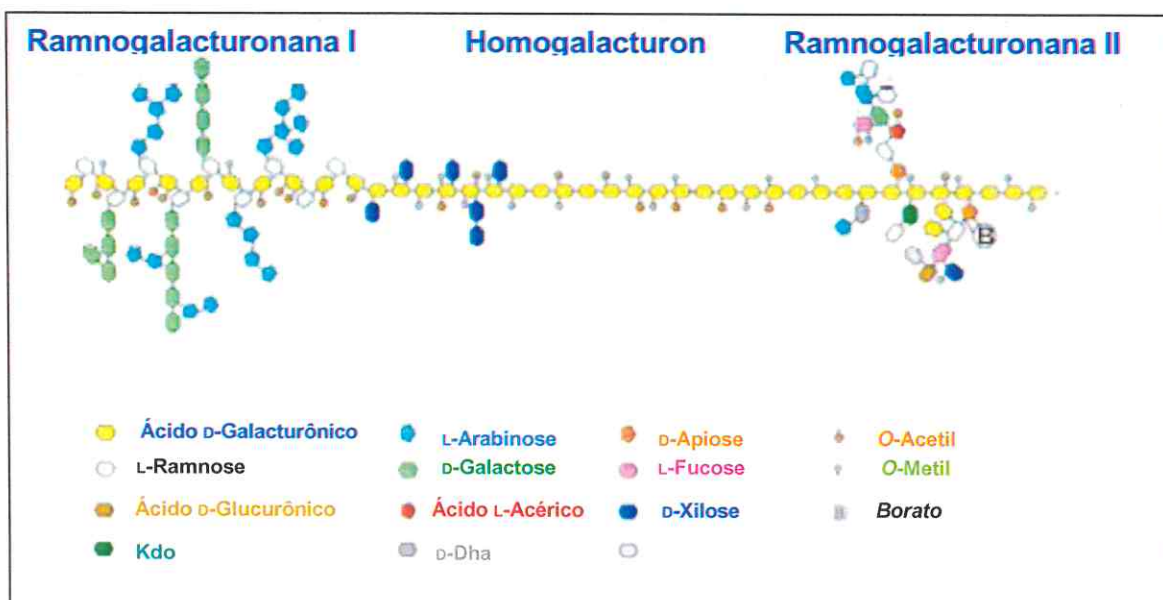


Fig. 1.1- Esquema representativo da estrutura básica de pectinas. Ilustração da estrutura convencional evidenciando a cadeia linear composta de ácido galacturônico e, em determinadas regiões, a alternância de ácido galacturônico e ramnose. Também estão ilustradas as cadeias laterais de açúcares neutros, além de alguns açúcares raros como apiose e ácido acético. Ligados à cadeia principal encontram-se grupos metil e acetil esterificados às unidades de ácido galacturônico.
Fonte: http://www.jbei.org/images/feedstocks/pectin_structure.png.

As arabinanas são polissacarídeos que apresentam uma cadeia principal de unidades furanosídicas de L-arabinose unidas por ligações glicosídicas α -(1→5), com ramificações ligadas a várias unidades da cadeia principal na posição O-2 e/ou O-3 (PÉREZ *et al*, 2000; VORAGEN *et al*, 1995).

As arabinogalactanas ocorrem em duas formas estruturalmente diferentes. As arabinogalactanas do tipo I têm uma cadeia linear de unidades piranosídicas de D-galactose ligadas β -(1→4) com 20-40% de unidades furanosídicas de L-arabinose ligadas α -(1→5) presentes em cadeias laterais curtas conectadas na posição O-3 das unidades de galactose (PÉREZ *et al*, 2000; VORAGEN *et al*, 1995).

Já as arabinogalactanas do tipo II são polissacarídeos altamente ramificados, com cadeias de unidades de β -D-galactopiranosose unidas por ligações (1→3) e (1→6). As ligações (1→3) predominam nas cadeias internas, enquanto que as ligações (1→6) ocorrem principalmente nas cadeias externas, que são geralmente terminadas por unidades L-arabinofuranosil e em algum grau por unidades L-arabinopiranosil (VORAGEN *et al*, 1995).

1.2. Pectina de *Passiflora edulis*

As condições de extração dos polissacarídeos são fatores determinantes sobre o rendimento e caracterização química e estrutural dos compostos, levando, muitas vezes a alterações importantes nas propriedades funcionais da molécula em estudo. No caso de pectinas, alterações ocorrem notavelmente na sua habilidade de formar géis o que determina as diferentes formas de uso do polissacarídeo na indústria de alimentos e na indústria farmacêutica (PINHEIRO *et al*, 2008; YAPO *et al*, 2009; KLIEMANN *et al*, 2009).

É observado que fatores como condições de pH, temperatura, tempo de extração e o álcool precipitante influenciam profundamente as propriedades químicas da pectina (KALAPATHY; PROCTOR, 2001; LIMA *et al*, 2010).

A extração de pectinas a partir de diferentes frutos tem sido demonstrada por diversos trabalhos. Algo similar à maioria destes é a utilização de condições ácidas para proceder à extração do polissacarídeo (JOYE; LUZIO, 2000; LIU *et al*, 2006). A extração empregando soluções ácidas diluídas também tem sido utilizada visando à obtenção de pectina de frutos de *Passiflora edulis* (YAPO; KOFFI, 2006; PINHEIRO *et al*, 2008). Mais ainda, o tipo de ácido utilizado no processo de extração da pectina do maracujá amarelo altera os valores de rendimento do material e o grau de metoxilação (YAPO *et al*, 2009).

A casca do maracujá constitui cerca de 50% do peso total do fruto e apresenta em sua constituição química, nutrientes como proteínas, carboidratos e lipídeos em quantidades razoáveis, o que sugere sua utilização como fonte de novos produtos comerciais e alimentícios. Essa parte do fruto revelou ser uma fonte de elementos importantes como fibras e alguns minerais. Chau e Huang (2004) caracterizaram um tipo de fibra insolúvel extraída das sementes de *P. edulis*. Os autores demonstraram que a semente do fruto representa uma rica fonte de fibras insolúveis com cerca de 24% desse componente em sua constituição. Trabalhos relatando essas características em resíduos de frutos industrializados sugerem que os mesmos podem, desse modo, ser empregados na formulação de novos alimentos não-convencionais. Giuntini *et al* (2003) ressaltam diversos aspectos quantitativos e qualitativos para a utilização de subprodutos derivados da produção comercial e sua inserção gradativa no consumo alimentar da população. Dentre esses produtos ressalta-se o maracujá. Considerado uma excelente fonte de fibra alimentar (YAPO; KOFFI, 2008; PINHEIRO *et al*, 2008), a utilização de sua casca e sementes é avaliada do ponto de vista econômico e ambiental, uma vez que promove a redução de produtos comumente descartados em grandes quantidades

anualmente, os quais tem-se demonstrado experimentalmente, como possuidores de efeitos benéficos à saúde.

Yapo e Koffi (2006) publicaram um dos primeiros trabalhos sobre a extração e caracterização química de pectinas da casca do maracujá amarelo (*P. edulis*). Os autores empregaram fracionamento dos polissacarídeos através de extração em água, solução de oxalato de amônio e em meio ácido diluído, à temperatura de 30 °C. A pectina extraída era rica em ácido galacturônico e com baixo grau de metilesterificação, além de apresentar baixo teor de grupos acetil e açúcares neutros. Neste trabalho, os autores evidenciam a casca dos frutos de *P. edulis* como potencial fonte de pectina com baixo grau de metoxilação.

Embora com número ainda modesto, alguns estudos envolvendo a pectina do maracujá vêm sendo desenvolvidos de modo a aperfeiçoar a forma de obtenção do polissacarídeo. Pinheiro *et al* (2008) analisaram o efeito combinado de diferentes variáveis sobre o grau de esterificação da pectina. Os autores empregaram diferentes concentrações de ácido cítrico em diferentes períodos de tempo para a extração sob a temperatura de 97 °C. Concluíram que uma concentração de ácido de 0,086% durante 60 min corresponde à condição ideal para a extração de pectina altamente esterificada.

Variáveis como tipo de ácido, faixa de temperatura, pH e tempo de contato foram avaliadas para se determinar as melhores condições de extração da pectina da casca de *P. edulis*. As condições ótimas para obtenção do melhor rendimento foram obtidas com o uso de solução de ácido cítrico a 80 °C durante 10 min a pH 1. Segundo os autores o procedimento foi eficiente na obtenção de pectina com baixo grau de metoxilação (KLIEMANN *et al*, 2009).

Kulkarni e Vijayanand (2010) determinaram que é possível obter pectina de boa qualidade a partir da casca dos frutos de maracujá utilizando meio ácido para extração e uma proporção de 1:30 (p/v), com temperatura superior a 90 °C por 60 min, utilizando duas extrações. Segundo os autores, a pectina obtida pode ser usada com propriedades funcionais em diferentes produtos alimentícios.

2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar uma fração de polissacarídeos a partir da farinha das cascas dos frutos de *Passiflora edulis* fo. *flavicarpa* O. Deg., Passifloraceae, por meio de extração em água a quente sem acidificação, seguida por precipitação com etanol;
- Determinar através de hidrólise ácida e cromatografia gasosa, qualitativamente e quantitativamente os monossacarídeos constituintes na amostra do polissacarídeo de *P. edulis*;
- Determinar a composição centesimal (umidade, cinza e proteínas);
- Estabelecer a distribuição da massa molar da amostra por cromatografia de exclusão molecular;
- Caracterizar estruturalmente os polissacarídeos através de métodos espectroscópicos (Espectrofotometria na região do infravermelho - FT-IV; Ressonância magnética nuclear unidimensional- RMN).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. *Reagentes*

Padrões de açúcares e Kit enzimático para determinação de fibra foram obtidos da Sigma Aldrich, St Louis, (U.S.A). Os demais reagentes foram de grau analítico e obtidos comercialmente. A farinha pulverizada da casca dos frutos (*Passiflora edulis f. flavicarpa*) foi obtida da empresa Pectina do Brasil, incubada no Parque de Desenvolvimento Tecnológico do Ceará (PADETEC), município de Fortaleza.

3.2. *Análise Química Elementar*

Os itens 3.2.1 a 3.2.5 são referentes às análises da farinha da casca dos frutos de *P. edulis*.

3.2.1. *Umidade*

Aproximadamente 4 g de farinha fresca foram pesadas em pesa-filtros previamente tarados. As amostras foram secadas à temperatura estabilizada de 105 °C em estufa de esterilização e secagem durante 12 h, levadas ao dessecador e após o equilíbrio térmico foram pesados. Em seguida os pesa-filtros retornaram à estufa por mais 12 h, sendo esta etapa repetida até o aparecimento de pesos constantes. O teor de umidade foi obtido pela diferença entre o peso inicial e o peso final das amostras, sendo expresso em percentagem. O protocolo empregado seguiu a metodologia da A.O.A.C (1990).

3.2.2. *Cinzas*

Cadinhos de porcelana, previamente tarados, contendo 4 g da amostra seca, referente a cada lote, foram colocados em forno mufla (Modelo EDGCON 1P; capacidade 3000/ 7000 EDG) a 550 °C durante 4 h, quando se deu a completa mineralização e carbonização do material. Em seguida, os cadinhos foram mantidos em dessecador até

alcançar a temperatura ambiente, quando foram pesados. O teor de cinzas foi obtido através da diferença entre os pesos inicial e final e expresso em percentagem (A.O.A.C, 1990).

3.2.3. Proteína bruta

Para determinação dos teores de proteína da farinha da casca de *P. edulis* seguiu-se o método de Kjeldhal, citado pela A.O.A.C (1990). Amostras de 2 g foram colocadas em balões de Kjeldhal contendo 30 mL de H₂SO₄, 0,5 g do catalisador sulfato de cobre e 9,5 g de sulfato de sódio. Em seguida, os balões foram levados ao digestor por 30 minutos (Modelo TE 40/25 – TECNAL 007A) para completa mineralização das amostras. Após o resfriamento foram adicionados à cada amostra, 200 mL de água destilada, 1,0 g de zinco em pó e 100 mL de NaOH 40%. A mistura foi destilada até cerca de 2/3 do volume inicial. Como solução receptora foram utilizados 50 mL de ácido sulfúrico 0,1 M e como indicador o vermelho de metila. Após a destilação (Aparelho de titulação de nitrogênio TE 036/1 – TECNAL), o excesso de ácido sulfúrico foi titulado com solução de NaOH 0,1 M.

3.2.4. Lipídeos

Na determinação dos teores de lipídios da farinha da casca de *P. edulis* foi empregado o método descrito pela A.O.A.C (1990). As amostras secas provenientes da determinação de umidade foram pesadas, transferidas para cartuchos de filtração, os quais foram colocados no aparelho extrator (Aparelho de Soxlet, marca FANEM, modelo 308.26; 220 v; 60 Hertz; 1800 Watts), em presença de 100 mL de hexano por 8 h. Ao final da extração, o solvente foi parcialmente evaporado em banho-maria a 70 °C e os frascos transferidos para estufa a 100 °C, e logo após pesados. O teor de lipídeo das amostras foi calculado através da relação entre o peso dos lipídeos extraídos e o peso inicial da amostra, sendo expresso em percentagem.

3.2.5. Fibra alimentar total

A determinação de fibra alimentar total (FAT) da farinha da casca de *P. edulis* foi feita de acordo com o método enzimático-gravimétrico, utilizando kit para determinação de fibra (Sigma Chemical Co.). Amostras de farinha foram homogeneizados em tampão

MES/Tris (0,05 M, pH 8,2) sob agitação, e tratados com α -amilase (0,1 mL/g de farinha) por 15 min em banho-maria a 95 °C com agitação contínua. Em seguida, a amostra foi mantida a 60 °C para digestão com protease (0,1 mL/g de farinha) em tampão MES/Tris (0,05 M, pH 8,2) por 30 min em banho-maria a 60 °C. Após esse período, o pH da solução foi ajustado a 4,7 e solução de amiloglicosidases (0,3 mL/g de farinha) foi adicionada e incubada por 30 min em banho-maria também a 60 °C. Para determinação do teor de FAT, álcool 95% foi adicionado à solução de digestão (1:4 v/v) e mantido à temperatura ambiente por 1h para proceder à precipitação dos sólidos insolúveis. A solução foi filtrada em funil de placa sinterizada G4. O filtrado foi lavado com etanol 78% (v/v), seguido por etanol 95% (v/v) e acetona absoluta. O material foi finalmente, secado em estufa a 40 °C até obtenção do peso constante (AOAC, 1992).

3.3. Extrações e obtenção da fração polissacarídica

O esquema de obtenção da fração de polissacarídeos de *P. edulis* está representado na **figura 1.2**. Amostras da farinha (20 g) foram dissolvidas em água destilada na concentração de 3% (p/v) e mantidas sob agitação contínua por duas horas a temperatura de 90-100 °C. Após filtração em tecido fino, o extrato foi centrifugado a 17.000 x g por 20 min a 20 °C. O sobrenadante foi filtrado a vácuo em funil de placa sinterizada G3. A fração polissacarídica foi precipitada com etanol absoluto (1:4 v/v) durante uma hora, e separada por nova centrifugação. O precipitado foi lavado exaustivamente com etanol 95%, seguido por lavagem com etanol absoluto. A fração obtida foi ressolubilizada em água destilada sob agitação leve por uma hora à temperatura ambiente, em seguida, concentrada sob pressão reduzida para retirada do excesso de etanol. O material foi centrifugado e o sobrenadante, filtrado como citado anteriormente. O pH do concentrado resultante foi ajustado a 7,0 com solução diluída de hidróxido de sódio 0,1 M. O material foi submetido à nova precipitação com etanol absoluto (1:4 v/v) por 12 h a 4 °C. Após esse período, a mistura foi novamente centrifugada, sendo o precipitado obtido, lavado com etanol e acetona. O material foi secado a 40 °C e estocado (6,97 g). A fração isolada foi denominada PFCM.

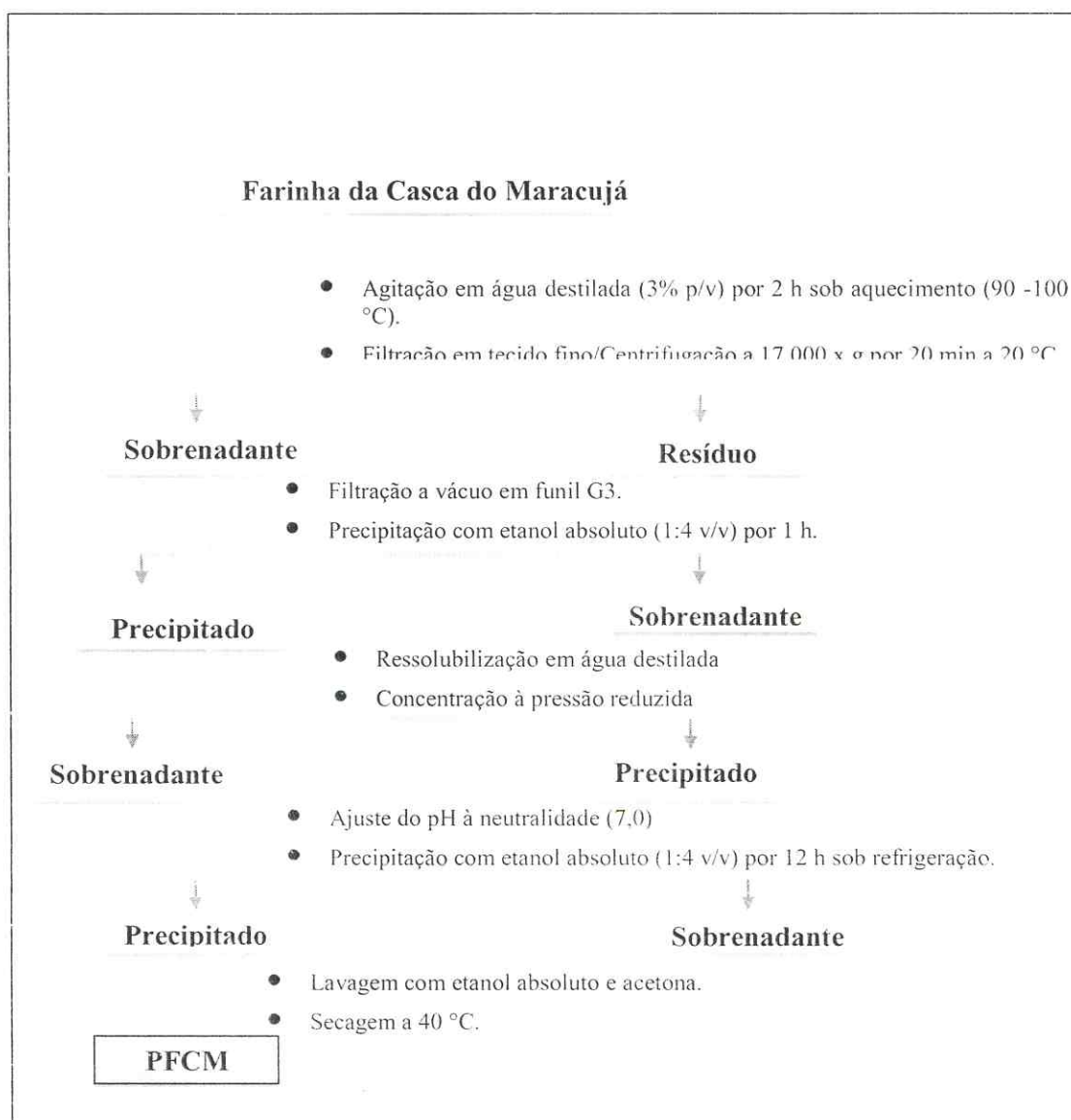


Fig. 1.2. Esquema de obtenção da fração de polissacarídeos extraída da casca dos frutos de *Passiflora edulis* (PFCM). Os polissacarídeos foram extraídos em água a quente (90 – 100 °C) sob agitação contínua por duas horas. Seguiu-se uma sequência de filtrações e centrifugações. A fração foi obtida por uma série de precipitações com etanol.

3.4. Caracterização da fração polissacarídica

3.4.1. Composição monossacarídica

Os monossacarídeos foram identificados na forma de seus alditois-acetatos, a partir das etapas de hidrólise, redução e acetilação.

A hidrólise foi realizada com ácido trifluoroacético (TFA) 4 M por 5 horas a 96 °C em tubos de hidrólise rosqueados, com cinco repetições. Para cada 10 mg de amostra foram acrescentados 4 mL da solução

de TFA. O material hidrolisado foi lavado com metanol para eliminação do ácido, e secado em evaporador rotativo até completa neutralização. Aos resíduos provenientes da hidrólise foram acrescentados de 1 a 1,5 mL de água destilada e, em seguida, adicionado boroidreto de sódio até pH básico, sendo o meio alcalino mantido por duas horas. Em seguida, foram acrescentadas pequenas porções de resina catiônica diretamente nos tubos de hidrólise para remoção dos íons sódio (Na^+) e neutralização dos íons hidróxido (OH^-). A resina foi removida através de filtração comum em papel de filtro. O sobrenadante foi evaporado até secura utilizando metanol para formação do borato de metila.

Aos resíduos secos obtidos da etapa de redução foram adicionados 0,5 mL de piridina e 0,5 mL de anidrido acético, sendo os tubos mantidos vedados durante três dias até completa acetilação. Os monossacarídeos foram convertidos em alditóis de acetato por sucessiva redução com NaBH_4 seguido por acetilação com piridina- Ac_2O . Em seguida, foram adicionados 3 mL de clorofórmio a cada tubo submetidos a agitação. Acrescentou-se a seguir 2 mL de solução de sulfato de cobre (5%), sendo os tubos novamente agitados. O sistema permaneceu em repouso até separação das fases, sendo a fase aquosa superior removida. A porção clorofórmica final foi empregada nas análises cromatográficas.

Análises de cromatografia líquida-gasosa (GLC) foram conduzidas em Cromatógrafo Gasoso 3800 Varian acoplado a Espectrômetro de Massa 2000 R-12 Varian com gás Hélio como carreador (2,0 mL/min). A coluna capilar DB-23 foi usada e programada a 40 °C/min a 220 °C (temperatura constante). Os derivados resultantes foram identificados por seus perfis de impacto eletrônico. As análises foram realizadas no Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná.

O conteúdo de ácido urônico foi determinado usando o método meta-hidroxidifenil (BLUMENKRANTZ *et al*, 1973) através da construção de uma curva padrão de ácido galacturônico.

3.4.2. Microanálise elementar

O conteúdo de nitrogênio da fração polissacarídica foi determinado por microanálise elementar usando equipamento Perkin-Elmer CHN 2400 sendo o conteúdo de proteína calculado através do fator de conversão de 6, 25.

3.4.3. Cromatografia de exclusão molecular de alta performance (HPSEC)

O pico de massa molar de amostras de PFCM foi determinado por HPSEC usando cromatógrafo Shimadzu LC-10AD com detectores de índice de refração (RID-6A) e ultravioleta (SPD-10AV; 280 nm). A análise foi realizada utilizando-se coluna Ultrahidrogel (7,8 x 300 mm), com fluxo de 0,5 mL/min, solução de polissacarídeo de concentração 0,1% (m/v), água como solvente, NaNO_3 0,1 M como eluente e temperatura ambiente. O volume injetado de amostra foi de 50 μl . A massa molar do polissacarídeo foi estimada usando pululanas como padrão. A regressão linear entre a faixa de massa molar das pululanas e o volume de eluição é dada na equação 1:

$$\text{Log M} = 14,016 - 0,951 \text{ Ve} \quad (\text{Equação 1}),$$

$R = 0,991$, onde V_e corresponde ao volume de eluição e M é a massa molar.

3.4.4. Espectroscopia na Região do Infravermelho (FT-IV)

Os espectros FT-IV foram realizados com pastilhas KBr em espectrofotômetro FT-IR Shimadzu 8300, na faixa de comprimento de onda de 4000 a 500 cm^{-1} com resolução de 2 cm^{-1} .

3.4.5. Ressonância magnética nuclear (RMN)

Espectros 1D (^1H and ^{13}C) de soluções de PFCM a 3% (p/v) em D_2O a 343 K foram realizados em espectrômetro bruker, modelo avance-DRX-500. 2,2-dimetilsilapentano-5-sulfonato de sódio (DSS) foi usado como padrão interno (0,00 ppm para ^1H).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 - *Análise da composição centesimal*

Os conteúdos de lipídeos, cinzas e proteína bruta da farinha da casca dos frutos de *P. edulis* foram de 1,37, 7,58 e 8,2%, respectivamente (TABELA 1.1). Comparando esses valores com os dados da literatura para amostras da casca de *P. edulis*, observa-se que o conteúdo lipídico está próximo ao encontrado por Souza *et al* (2008) a partir da casca como resíduo industrial (1,75%), e superior aos encontrados por Pinheiro *et al* (2008), Gondim *et al* (2005) e Cordova *et al* (2005) que relataram valores menores que 1% de extrato etéreo. O teor de cinzas determinado neste estudo condiz com os dados encontrados na literatura de 7,52% (PINHEIRO *et al* 2008). Quanto ao conteúdo de proteínas, observa-se que esse valor é maior que o teor de proteínas (4,05%) determinado por Pinheiro *et al* (2008) para a casca dos frutos da mesma espécie. Baixos teores de proteína (0,67% - 1,5%) para a casca dos frutos de *P. edulis* foram determinados por outros autores (GONDIM *et al*, 2005; CORDOVA *et al*, 2005). Porém, valores elevados de conteúdo proteico (12,52%) foram relatados por Souza *et al* (2008) com base na matéria seca.

Tabela 1.1 – Conteúdos de proteína bruta, lipídeos, cinzas e fibra alimentar total (FAT) da farinha da casca dos frutos do maracujá (*Passiflora edulis*)

Casca do fruto de <i>Passiflora edulis</i>	
Umidade	9,37%
Base seca (89,66g)	g/100g de farinha
Composição aproximada (% p/p)	
Proteínas totais	8,2
Lipídios totais	1,37
Cinzas	7,58
Teor de Fibra Alimentar Total - método A.O.A.C (% p/p)	
FAT	69,51 ± 1,20

Dados são representados pela média ± SD (n=3).

O conteúdo de fibra alimentar total (FAT) obtida a partir da casca dos frutos de *P. edulis* através de método enzimático-gravimétrico foi de 69,51% (TABELA 1.1). Esse dado

está próximo ao encontrado por Yapo e Koffi (2008) que relataram o teor de 73,5% de FAT para as cascas do maracujá amarelo, e superior ao obtido por Pinheiro *et al* (2008) (57,36%). Essa diferença pode ser devido à procedência da matéria prima ou até mesmo, às possíveis diferenças nos métodos de extração empregados para a obtenção da fibra. O elevado conteúdo de fibra alimentar presente na casca de *P. edulis* faz desse material uma ótima fonte para extração de pectina.

4.2 - Caracterização dos polissacarídeos obtidos dos frutos de *Passiflora edulis* por extração aquosa a quente e precipitação com etanol.

A extração do polissacarídeo da casca do fruto de *Passiflora edulis* foi realizada em água a 90 -100 °C sem etapas de acidificação. O pH de extração foi determinado em potenciômetro (pH 6,0). Seguiu-se concentração a vácuo e a obtenção da fração polissacarídica por precipitação com etanol. Uma vez que a precipitação de pectinas requer alta quantidade de álcool etílico, a concentração a vácuo do extrato reduz significativamente a quantidade de etanol necessária para a precipitação da fração de pectinas. A avaliação de alguns estudos indica que nenhuma alteração significativa é observada na qualidade das pectinas obtidas por este método (KULKARNI; VIJAYANAND, 2010). Zhang e Liu (2000) estudaram as condições para a precipitação de pectinas extraídas das cascas de *Citrus grandis*. As amostras foram submetidas à precipitação com álcool e sulfato de alumínio, separadamente. As pectinas obtidas a partir de precipitação com sulfato de alumínio apresentaram qualidade significativamente menor que as precipitadas com etanol. Resultados similares foram encontrados para os métodos de extração da pectina das cascas da maçã e manga (CHEN; LI, 1994; YINHUA; HUAFANG, 2003; YU; VALLE, 1979). Na literatura, a maioria dos trabalhos emprega a precipitação com etanol para a obtenção de pectina a partir da casca de *P. edulis* (YAPO; KOFFI, 2006; YAPO, 2009; PINHEIRO *et al*, 2008; KULKARNI; VIJAYANAND, 2010; KLIEMANN *et al*, 2009).

O rendimento da fração PFCM em relação ao peso seco da farinha foi de 34,9%. Esse valor é superior ao encontrado por D'addósio *et al* (2005), que utilizaram hexametáfostato de sódio para extração da pectina da casca de *P. edulis* (18,45%), e aos valores de 13,6 e 20% obtidos para extrações de pectinas em soluções ácidas por Corona *et al*, (1996) e Matsumoto e Otagaki (1990), respectivamente. Yapo e Koffi (2006) obtiveram rendimento de apenas 2,9% para pectinas da casca de *P. edulis* extraídas em água, porém com acidificação do meio através de acréscimo de solução de ácido nítrico.

Os dados da análise química elementar de PFCM estão mostrados na **Tabela 1.2**. O componente majoritário do polissacarídeo foi ácido galacturônico (44,2%), o que sugere a natureza péctica da fração de carboidrato obtida. Contudo, tal valor foi bem menor que o determinado por Yapo e Koffi (2006) para a pectina de *P. edulis* extraída em água sob aquecimento, que foi de 76,3%, valor este, próximo ao encontrado por D'addósio *et al* (2005) para pectina de *P. edulis* extraída por hidrólise ácida (78%). É provável que tais diferenças nos percentuais de ácido galacturônico sejam devidas ao meio ácido empregado na extração dos polissacarídeos por esses autores.

Os açúcares neutros componentes da fração polissacarídica e determinados por cromatografia gasosa GC/MS foram arabinose (11,8%), glucose (11,8%), ramnose (10,6%), manose (9,0%), galactose (6,1%) e pequenos teores de xilose (3,6%), fucose (1,6%) e ribose (1,3%). Esses valores são superiores aos determinados para pectinas comerciais de citrus, sendo que açúcares neutros também foram encontrados em frações pécticas de frutos de *P. edulis*, com predominância de arabinose, ramnose e galactose (YAPO; KOFFI, 2006). Chau e Huang (2004) demonstraram a presença de 8 monossacarídeos nas diferentes frações de carboidratos isoladas das sementes do maracujá. Esses autores encontraram quantidades mais elevadas de unidades de glucose celulósica, seguidas de xilose (1,75-9,67%), arabinose (4,68-5,5%), ramnose (0,63-1,96%) e galactose (1,03-1,39%).

Pelos dados listados na **Tabela 1.2** é possível sugerir que PFCM apresenta uma estrutura linear composta de homogalacturonanas (HG), além de uma região de ramnogalacturonanas do tipo 1 (RG-1) com ramificações constituídas de açúcares neutros. A baixa razão de ácido galacturônico/ramnose (4,17) indica que RG-1 está em uma proporção maior do que HG. Este resultado é muito diferente do encontrado por Yapo e Koffi (2006) para a pectina extraída de *P. edulis* em condições ácidas, a qual apresentou estrutura constituída majoritariamente por homogalacturonanas.

A ocorrência de arabinose e ramnose dentre os açúcares neutros individuais principais em PFCM, além da presença de galactose (6,1%), sugere a presença de arabinanas, e/ou arabinogalactanas como cadeias laterais do polissacarídeo. Os valores de glucose (11,8%) e ácido galacturônico (44,2%), encontrados em PFCM indicam que celulose e substâncias pécticas são os principais polissacarídeos diferentes de amido presentes na fração isolada (YAPO; KOFFI, 2008).

O conteúdo de proteínas totais (g/100g) determinado para PFCM por microanálise foi de 3% (**TABELA 1.2**). Esse teor é muito menor que os 12,8% encontrados nos polissacarídeos obtidos por Yapo e Koffi (2008) a partir da casca de frutos de *P. edulis*

processados industrialmente. Contudo, foi superior ao encontrado por Chau e Huang (2004) na fibra obtida a partir das sementes de *P. edulis* (1,6%). Frações de pectina extraídas da casca de *P. edulis* por Yapo e Koffi (2006) mostraram conteúdo de proteína variável dependendo do tratamento usado no processo. A extração realizada em solução de ácido nítrico (pH 1,3) apresentou teor proteico de 5,1%, enquanto a pectina extraída em água, mas sob acidificação (pH 4,0), exibiu conteúdo proteico de 1,4% (YAPO; KOFFI, 2006), valor inferior ao encontrado em PFCM. Contudo, a metodologia usada para a extração de PFCM foi eficiente em reduzir o conteúdo de proteína a partir da casca do fruto (8,2% como citado no item 4.1).

Tabela 1.2—Dados de composição proximal e monossacarídica da fração polissacarídica de *Passiflora edulis* (PFCM)

Composição proximal	Valores (g/ 100 g de PFCM)
Umidade	14,3
Cinzas	13,8
Proteínas (N x 6,25)	3,0
Polissacarídeo	82,7
Açúcar	
Ácido galacturônico	44,2
Arabinose	11,8
Ramnose	10,6
Glucose	11,8
Manose	9,0
Galactose	6,1
Xilose	3,6
Ribose	1,3
Fucose	1,6

O cromatograma HPSEC para determinação da massa molar de PFCM usando IR está mostrado na **Figura 1.2**. O detector IR mostrou um único e amplo pico com volume de eluição máximo de 9,78 mL.

A massa molar do polissacarídeo foi estimada por HPSEC levando em conta o volume de eluição obtido através do detector de IR, aplicado à equação 1. A massa molar estimada para PFCM foi de $6,0 \times 10^4$ g/mol. Este valor é bem próximo aos encontrados por Yapo e Koffi (2006) para as pectinas da casca de *P. edulis* extraídas em água sem aquecimento ($6,4 \times 10^4$ g/mol), e através de solução de ácido nítrico com aquecimento a 80 °C ($5,1 \times 10^4$ g/mol).

Contudo, pectinas com massa molar de $1,04 \times 10^5$ g/mol e $2,5 \times 10^5$ g/mol foram extraídas da casca de *P. edulis* em soluções de ácido sulfúrico e cítrico, respectivamente,

sendo que alterações na concentração do ácido empregado proporcionam a obtenção de polissacarídeos de diferentes massas molares, de modo que um aumento na concentração do ácido proporciona a extração de pectinas com massa molar também mais elevada (YAPO, 2009). Segundo Yapo (2009), o ácido cítrico é capaz de solubilizar os polissacarídeos pécnicos da parede celular com menor degradação, o que justifica a massa molar elevada em virtude do maior tamanho das cadeias que compõem a molécula.

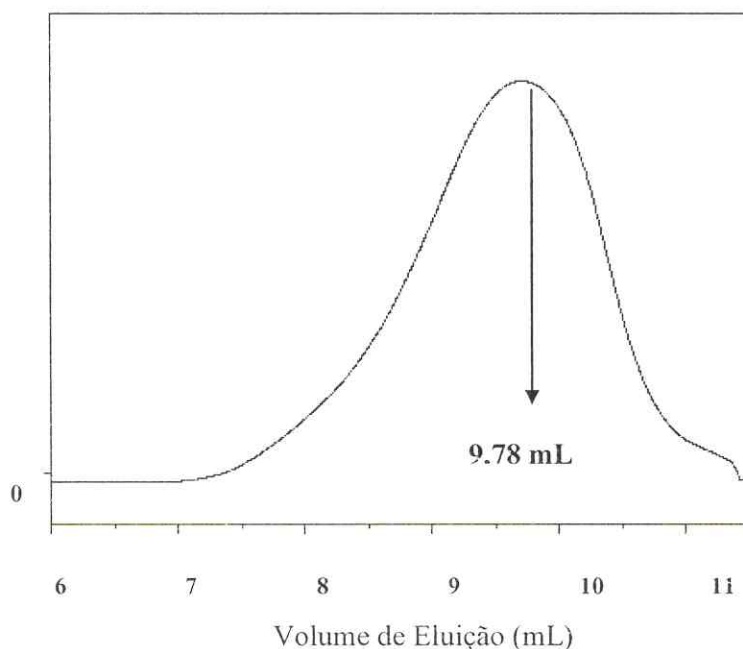


Fig. 1.3. Cromatograma HPSEC dos polissacarídeos de *Passiflora edulis* (PFCM) em coluna Ultrahidrogel (7,8 x 300 mm), com fluxo de 0,5 mL/min. A concentração da solução de polissacarídeo era de 0,1% (p/v). Água foi usada como solvente, NaNO_3 0,1 M como eluente. O volume injetado de amostra foi de 50 μl . A massa molar do polissacarídeo foi estimada usando pululanas como padrão ($5,9 \times 10^3$ - $7,9 \times 10^5$ g/mol).

O espectro na região do infravermelho (FT-IV) de PFCM (**FIGURA 1.3**) mostrou bandas em 3396 cm^{-1} e 2930 cm^{-1} devido à vibração de grupos O-H e C-H, respectivamente. As bandas a 1740 cm^{-1} e 1653 cm^{-1} são atribuídas, respectivamente, à vibração dos grupos C=O de ácidos galacturônicos esterificados e não esterificados (MARRIQUE; LAJOLO, 2002; IAGHER *et al*, 2002; SOUZA *et al*, 2009).

O grau de esterificação (DE) de PFCM foi calculado usando o método proposto por Marrique e Latojo (2002). Neste, o cálculo da área do pico de FT-IV referente à vibração

do grupo carbonila de ácido urônico esterificado (1740 cm^{-1}) foi relacionada a área referente ao grupo carbonila de ácido urônico não-esterificado (1653 cm^{-1}), através da equação 2:

$$\text{DE (mol\%)} = 124.7 R + 2.2013 \quad \text{Equação 2}$$

Onde $R = A_{1740} / (A_{1740} + A_{1653})$.

O baixo percentual de esterificação (DE) encontrado em PFCM ($26,2 \pm 0,8\text{ mol\%}$) é consistente com os valores observados na pectina de *P. edulis* obtida por Yapo e Koffi (2006) a partir de extração em água a $30\text{ }^\circ\text{C}$ ($32,4\text{ mol\%}$), e muito próximo quando comparado à pectina obtida a partir de extrações em solução diluída de ácido nítrico ($26,3\text{ mol\%}$) e sem aquecimento (YAPO; KOFFI, 2006). O valor de DE para PFCM também está próximo aos resultados obtidos com a pectina extraída de *P. edulis* por Pinheiro *et al* (2008) utilizando solução diluída de ácido cítrico 2,5% durante 60 minutos ($27,52\%$). Comparados a outros dados da literatura, o grau de esterificação encontrado em PFCM foi inferior ao determinado para as pectinas de *P. edulis* extraídas por Corona *et al* (1996) ($71,6\text{ mol\%}$), D'adósio *et al* (2005) ($69,7\text{ mol\%}$) e Matsumoto e Otagaki (1990) ($73,2\text{ mol\%}$) através de diferentes condições empregando ácido clorídrico como agente extrator. Também foi inferior ao obtido por Kliemann *et al* (2009) com a pectina da casca de *P. edulis* extraída a pH 1,0 em ácido cítrico 0,5 M por 10 minutos a $80\text{ }^\circ\text{C}$ ($45,94\text{ mol\%}$) e por Lima *et al* (2010) para extrações em água acidificada a pH 2,2 - 3,0 com solução de ácido cítrico que resultaram em pectinas com alto grau de metoxilação ($69,22\%$).

Foi relatado que a casca de *P. edulis* consiste de cerca de 19,1% de substâncias pécicas a partir do peso seco (YAPO, 2009). O fracionamento destas substâncias pécicas com água, oxalato de amônio e soluções diluídas de ácido nítrico promoveu a obtenção de pectinas com baixo grau de esterificação e elevado teor de ácido galacturônico (YAPO; KOFFI, 2006). Pinheiro *et al* (2008) demonstraram que o grau de esterificação de pectinas extraídas da casca de *P. edulis* aumenta quando baixas concentrações de ácido cítrico são usadas na extração sendo que uma concentração de 0,086% por 60 minutos fornece pectina altamente esterificada. Lima *et al* (2010) demonstraram que extremos de pH ácido e básico diminuem significativamente o grau de metoxilação em pectinas extraídas do mesocarpo de *P. edulis* ($48,64$ e $20,44\%$, respectivamente). Foi demonstrado que condições extremas de pH causam de-esterificação e de-polimerização das cadeias de pectina (PINHEIRO *et al*, 2008).

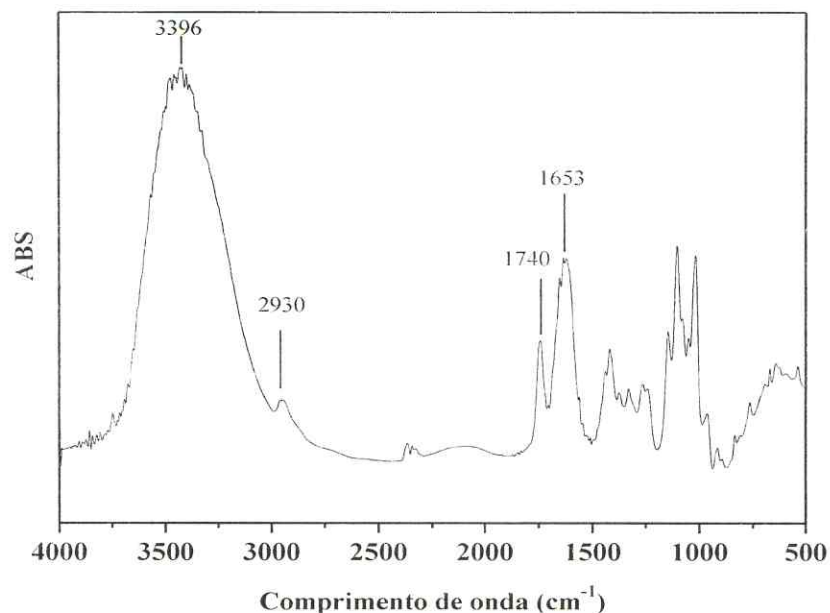


Fig. 1.4. Espectro FT-IV em pastilhas de KBr dos Polissacarídeos de *Passiflora edulis* (PFCM) na região de comprimento de onda de 4000 – 500 cm^{-1} . Bandas em 3396 cm^{-1} e 2930 cm^{-1} são devidos à vibração de grupos O-H e C-H, respectivamente. As bandas a 1740 cm^{-1} e 1653 cm^{-1} são atribuídas, respectivamente, à vibração dos grupos C=O de ácidos galacturônicos esterificados e não esterificados.

Os constituintes principais da ramnogalacturonana I que predominam na estrutura de PFCM estão representados na **Figura 1.4**. O espectro ^1H - NMR de PFCM (**FIGURA 1.5-A**) mostrou intenso sinal em δ 3,80 devido a grupos metil esterificados a unidades de ácido galacturônico (GalA Me) (CAZZOLINO *et al*, 2006; TAMAKI *et al*, 2008). Dois sinais de δ 2,17 e δ 2,06 foram observados para grupos acetil ligados a 2-O e 3-O-ácido galacturônico, respectivamente (PERRONE *et al*, 2002; TAMAKI, 2008). Grupos Metil de L-ramnose foram observados em δ 1,25. As regiões em δ 4,9 e na faixa de δ 4,6-4,7 do espectro são devidas ao próton H-5 de ácido galacturônico esterificado e não-esterificado, respectivamente (GRASDALEN *et al*, 1988). Os sinais em δ 5,3 e δ 5,13 foram atribuídos, respectivamente, ao H-1 de ramnose e ácido galacturônico. Espectro ^{13}C NMR de PFCM (**FIGURA 1.5-B**) mostrou um pico de ressonância a δ 53,6 característico de metil éster de GalA Me. Na região anomérica, os sinais a δ 101,1; 100,9 e 108,5 podem ser assinalados como carbonos anoméricos de ácido galacturônico (GalA), ácido galacturônico metil esterificado (GalA Me) e arabinofuranose (Arab), respectivamente. Sinal de baixa intensidade a δ 17,5 relativo ao grupo CH_3 em ramnose confirma a presença desse açúcar na amostra analisada. Na região

carbonila do espectro, os dois sinais a δ 171,3 e 175,3 correspondem a C=O de GalA e GalAMe, respectivamente.

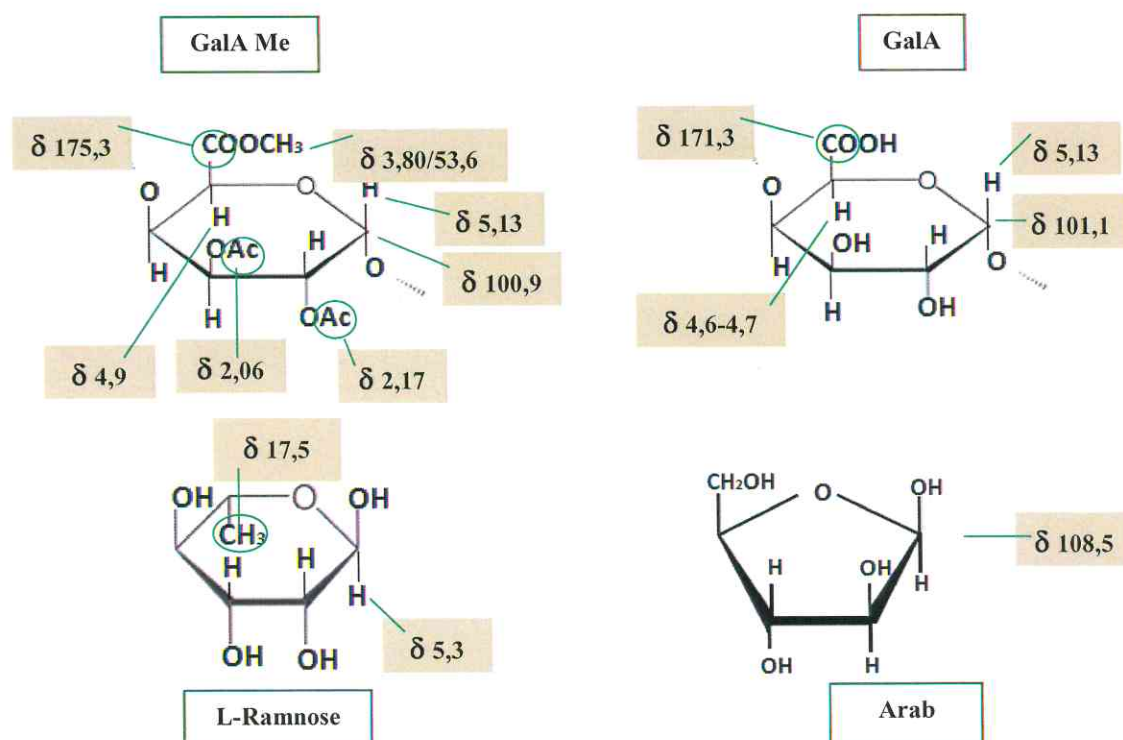


Fig. 1.4. Representação estrutural dos principais monossacarídeos constituintes de PFCM. A estrutura do polissacarídeo mostra-se composta, predominantemente, por Ramnogalacturonanas tipo I. Os sinais do espectro ^1H -RMN e ^{13}C -RMN relativos aos grupos químicos característicos de cada composto estão evidenciados. GalA Me: Ácido galacturônico metil esterificado; GalA: Ácido galacturônico; Arab: Arabinofuranose.

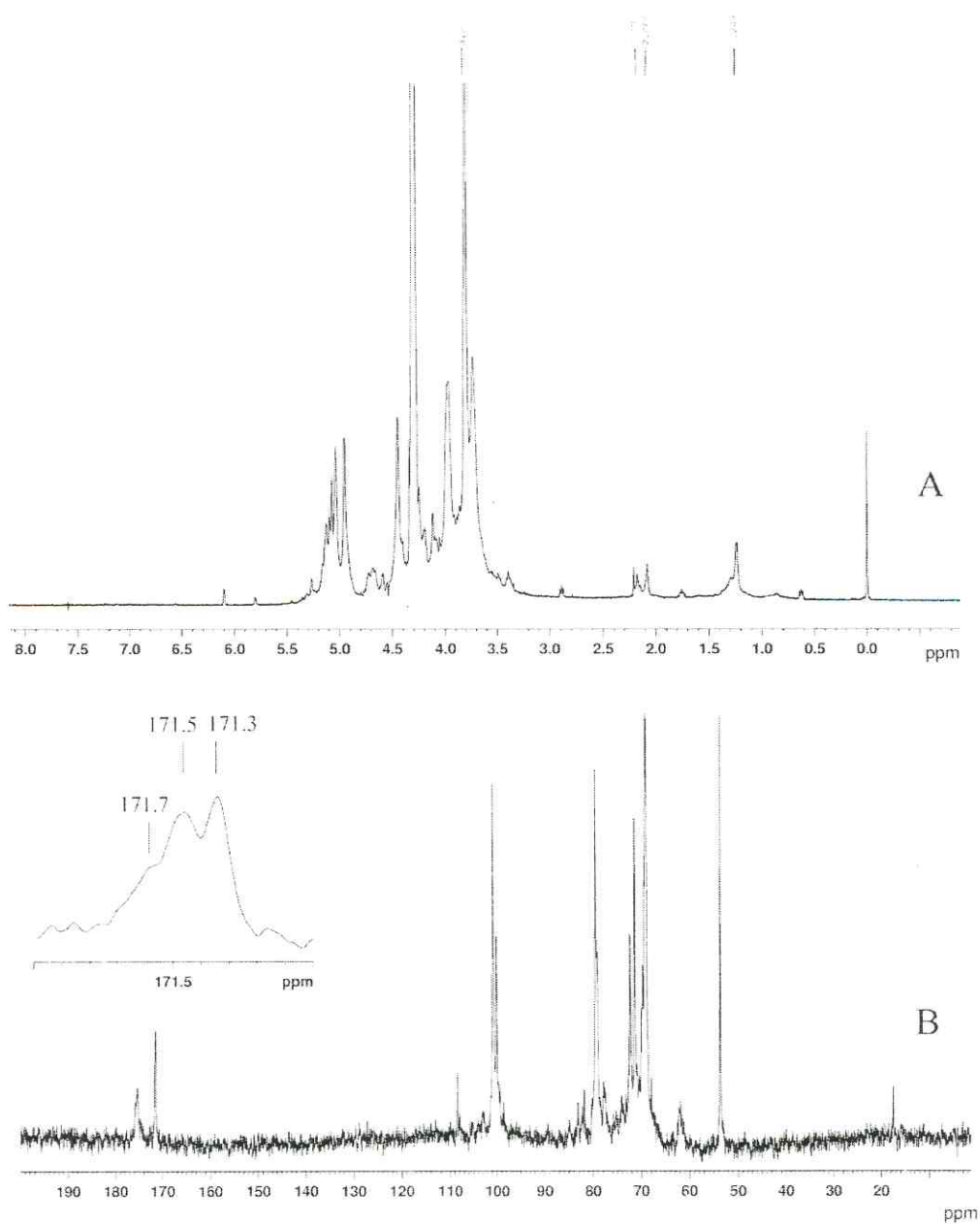


Fig. 1.5. Espectro de RMN dos Polissacarídeos de *Passiflora edulis* (PFCM) em D₂O. (A) ¹H – espectro RMN; (B) ¹³C – espectro RMN.

A distribuição de grupos metoxil em polissacarídeos ácidos foi investigada por Westerlund *et al* (1991) e Catoire *et al* (1998) usando o padrão de região da carbonila em ¹³C NMR. Os autores propuseram que as mudanças químicas do carbono do grupo carbonila são influenciadas por efeitos de resíduos precedentes e próximos à vizinhança. Triades de ácido

galacturônico não-esterificado (U) e esterificado (E) como UEU, EEE e UUU foram identificadas em PFCM (o sublinhado denota o resíduo observado). Tomando como estimativa a divisão da ressonância da carbonila, tríades de ácidos totalmente esterificados (EEE) possuem menor deslocamento químico do que aqueles onde as unidades ácidas não-esterificadas estão presentes nas tríades (UEU). Tríades com apenas grupos não-esterificados são observadas nas regiões de δ 175 e δ 177 (CATOIRE *et al*, 1998). A **Figura 1.5** mostra a amplificação da região de grupos carbonila de PFCM. Na região δ 171-172 podem ser observados dois sinais bem definidos e um ombro em δ 171.3, δ 171.5 e δ 171.7 representando GalAMe nas tríades EEE, UEE e UEU, respectivamente, e o sinal na região entre δ 173.0-175.7 devido às ressonâncias de regiões não-esterificadas. A tríade EEE é mais intensa (43%) do que UEE (35%) e UEU (22%) sugerindo uma alta quantidade de tríades totalmente esterificadas no polissacarídeo estudado (NESTERLUND *et al*, 1991; CATOIRE *et al*, 1998).

5 CONCLUSÕES

Os dados de composição, determinados por microanálise, e espectroscópicos obtidos para a fração de carboidratos PFCM, obtida da casca dos frutos de *P. edulis* na ausência de condições ácidas e sob aquecimento, evidenciam um heteropolissacarídeo de natureza péctica com estrutura química composta predominantemente por Ramnogalacturonana do tipo I.

O Açúcar majoritário em PFCM foi ácido galacturônico, o que sugere a natureza péctica dos polissacarídeos. Os açúcares neutros componentes da fração, e determinados por cromatografia gasosa GC/MS foram arabinose (11,8%), glucose (11,8%), ramnose (10,6%), manose (9,0%), galactose (6,1%) e pequenos teores de xilose (3,6%), fucose (1,6%) e ribose (1,3%). A ocorrência de arabinose e ramnose dentre os açúcares neutros individuais principais em PFCM, além da presença de galactose (6,1%), sugere a presença de arabinanas, e/ou arabinogalactanas como cadeias laterais do polissacarídeo. Os valores de glucose (11,8%) e ácido galacturônico (44,2%), encontrados em PFCM indicam que celulose e substâncias pécticas são os principais polissacarídeos diferentes de amido presentes na fração isolada

A fração polissacarídica obtida apresentou um baixo percentual de esterificação ($26,2 \pm 0,8$ mol%). Os valores de massa molar (6×10^4 g/mol) foram condizentes com os encontrados em outras pectinas extraídas de *Passiflora edulis* em água e em meios ácidos, e sob diferentes temperaturas (30 a 80 °C).

CAPÍTULO II

Estudo dos efeitos antitumorais dos polissacarídeos pécicos de *Passiflora edulis* fo. *flavicarpa* O. Deg., Passifloraceae em camundongos com sarcoma 180

1. REFERENCIAL TEÓRICO

1.1. *Câncer*

O câncer é considerado a maior causa de morte no mundo. Estima-se que em 2008 o câncer tenha sido responsável pela morte de 7,6 milhões de pessoas e que 12,4 milhões de diferentes novos casos tenham surgido. Entre os homens os tipos de câncer mais incidentes são o de pulmão e de próstata, enquanto que nas mulheres predominam o câncer de mama e o de colo do útero (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2008).

O surgimento de células cancerígenas envolve alterações no genoma capazes de afetar genes envolvidos na apoptose e proliferação celular. Ao serem afetados, esses genes induzem um conjunto de alterações na fisiologia da célula que coletivamente promovem o surgimento do fenótipo maligno (HANAHAN; WEINBERG, 2000). A aquisição dessas alterações ocorre por meio de ciclos repetidos de mutação e seleção de clones de células, onde cada ganho em direção a malignidade confere vantagem de um clone sobre os demais (NOWELL, 1976).

Uma das características adquiridas por células neoplásicas é a capacidade de evadir-se da apoptose. Esse processo de morte celular programada acontece naturalmente quando o organismo tem interesse de eliminar células indesejadas (KER *et al*, 1972), podendo ser ativado por vários sinais fisiológicos, os quais, uma vez iniciados, conduzem à uma série de eventos que culminam na morte celular (TAYLOR *et al*, 2008).

Uma das funções da apoptose é servir como mecanismo de proteção, impedindo que células com danos no DNA se proliferem. A resistência à apoptose por células tumorais pode ser adquirida de várias maneiras, porém a mais comum é através da inativação do gene supressor de tumor, o *p53*. A inativação funcional de seu produto, a proteína *p53* pode ser observada em mais de 50% dos cânceres humanos e resulta na remoção de um componente chave na detecção de danos no DNA capaz de induzir a cascata apoptótica (HARRIS, 1996).

Em um organismo saudável, o controle da proliferação celular se dá através do balanço entre os sinais estimulatórios (fatores de crescimento) e os sinais inibitórios. As células cancerígenas devem driblar esses dois mecanismos de controle tornando-se insensíveis aos fatores antiproliferativos, e simultaneamente auto-suficientes, em relação aos fatores de crescimento. Essa auto-suficiência pode ser alcançada pela síntese inapropriada de fatores de crescimento (estimulação autócrina), expressão inapropriada de receptores de fatores de crescimento ou através da ativação permanente de proteínas envolvidas nas vias de

sinalização ativadas por mitógenos (BERTRAM, 2001). Provavelmente o gene mais estudado capaz de conferir auto-suficiência de sinais estimulatórios é o *ras*. O seu produto é uma proteína de membrana que funciona como um transdutor de sinal atuando na diferenciação e no estímulo à proliferação celular. O oncogene *ras* é o mais largamente ativado em cânceres humanos podendo alcançar uma incidência de até 90% em câncer no pâncreas e de 50% em câncer de cólon (BOS, 1989).

A insensibilidade a fatores antiproliferativos ocorre principalmente através de alterações no circuito de sinalização da proteína do retinoblastoma (pRb). A pRb normalmente se encontra no estado não fosforilado em associação com o fator de transcrição E2F. Tal combinação atua como um complexo de silenciamento (WEINTRAUB *et al*, 1995). Após estimulação por mitógeno, o complexo ciclina D/cdk4 fosforila pRb na região C-terminal promovendo a liberação do fator de transcrição E2F. Uma vez liberado, o E2F permite a transcrição de genes cruciais para a entrada no ciclo celular (BERTRAM, 2001).

Outra aquisição importante das células tumorais é a capacidade de proliferar-se indefinidamente. A maioria das células animais possui um limite para o número de divisões celulares em função da incapacidade da enzima DNA polimerase de replicar completamente a extremidade 3' da molécula de DNA (COUNTER *et al*, 1992). Conseqüentemente, a célula perde progressivamente parte da extremidade final de seus cromossomos a cada replicação. Essa região do cromossomo é chamada de telômero e compõe-se de várias repetições de uma seqüência de seis pares de base. As células cancerígenas adquirem a capacidade de se proliferarem indefinidamente através do aumento no nível de expressão da enzima telomerase, a qual adiciona nucleotídeos aos telômeros (BRYAN; CECH, 1999).

As células cancerígenas, assim como as outras células do organismo demandam quantidades adequadas de nutrientes e oxigênio. Essa demanda é suprida por meio dos capilares sanguíneos. Dessa forma, as células tumorais precisam adquirir a capacidade de induzir a formação de novos capilares ao seu redor. Esse processo é chamado de angiogênese e de modo análogo à proliferação celular, resulta do balanço entre sinais estimulatórios e inibitórios (BOUCK *et al*, 1996; HANAHAN; FOLKMAN, 1996).

Em um organismo saudável, a falta de oxigênio em praticamente qualquer tipo de célula causa um aumento na concentração intracelular da forma ativa do gene de uma proteína reguladora chamada fator I induzido por hipoxia (HIF-1). O HIF-1, por sua vez estimula a transcrição do gene do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF). A proteína VEGF é secretada, difunde-se através do tecido e atua sobre células endoteliais próximas. Em resposta, as células endoteliais passam por uma série de mudanças que culminam na migração celular e

formação de novos vasos (BRUCE *et al*, 2002). Os tumores induzem a angiogênese no momento em que aumentam a expressão de proteínas estimulatórias, como o VEGF e o FGF (Fator de crescimento do fibroblasto) ou ainda ao diminuir a expressão de proteínas inibitórias, como a trombospodina-1 e o interferon- β (SINGH *et al*, 1995; VOLPERT *et al*, 1997).

Por fim, as células cancerígenas devem ser capazes de deixar o tumor inicial e estabelecer novas colônias em diferentes tecidos do organismo. Esse processo é chamado de metástase e é responsável por 90% das mortes causadas por câncer (SPORN, 1996). A metástase é provavelmente o aspecto mais temido e menos compreendido do câncer. Para adquirir essa habilidade são essenciais a ativação de proteases extracelulares e a alteração da especificidade de ligação de proteínas envolvidas na adesão celular, como as caderinas, integrinas e cateninas (APLIN *et al*, 1998).

A **figura 2.1** resume as características necessárias para que uma célula saudável adquira o fenótipo maligno. Todas essas características adquiridas pelas células tumorais, a evasão da apoptose, a auto-suficiência em sinais de crescimento, a insensibilidade a sinais inibidores de crescimento, a indução da angiogênese, a capacidade proliferativa ilimitada e a metástase, representam diferentes alvos terapêuticos para combater o câncer (HANAHAN; WEINBERG, 2000).

As três principais formas de tratamento para o câncer são a quimioterapia, a radioterapia e a cirurgia (ALMEIDA *et al*, 2005). No entanto, têm-se tornado insatisfatórias devido a seus diversos efeitos colaterais. A imunoterapia tem se destacado nos últimos anos devido ao seu potencial de ser específica para tumores, em contraposição aos métodos convencionais (ABBAS *et al*, 2008). No estágio em que se encontra, porém, a imunoterapia não é utilizada de modo isolado, mas em associação com outras formas de tratamento. As imunoterapias podem ser divididas em ativas e passivas. Os principais métodos utilizados na imunoterapia ativa são a imunização com células tumorais mortas e antígenos tumorais (vacinação) e a administração de substâncias que estimulam o sistema imunológico, como citocinas e polissacarídeos modificadores da resposta biológica.

Nos últimos anos, polissacarídeos de origem natural têm sido descritos por sua atividade antitumoral (LEUNG, *et al*, 2006). Tais moléculas usualmente são possuidoras de baixa toxicidade e de poucos efeitos adversos, o que as torna adequadas para a imunoterapia contra o câncer. As propriedades antitumorais dessas moléculas estão geralmente relacionadas à ativação de macrófagos e à modulação do sistema complemento (CHIHARA, 1992; WANG *et al*, 1997).

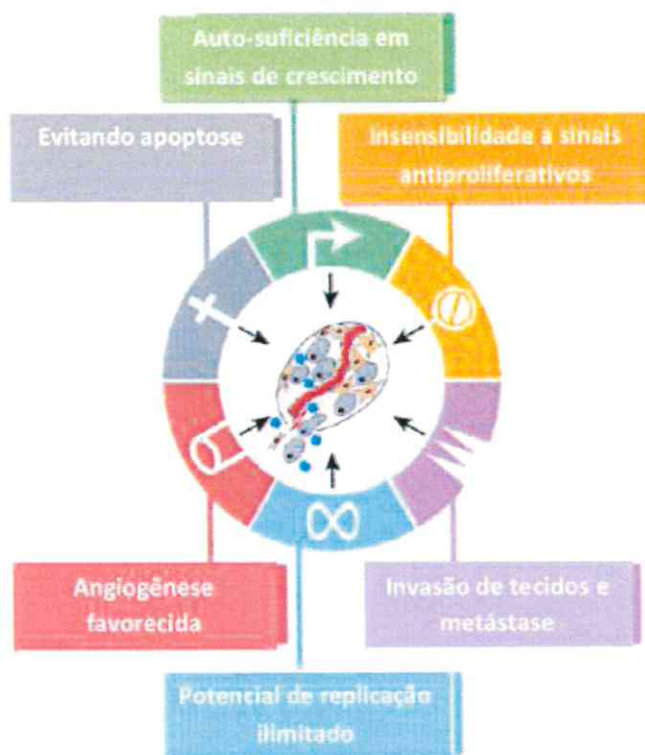


Fig. 2.1. Ilustração esquemática mostrando as habilidades adquiridas pelas células neoplásicas. (Adaptado de HANAHAN; WEINBERG, 2000).

1.2. Polissacarídeos como agentes imunomoduladores

Compostos capazes de interagir com o sistema imunológico regulando sua atividade de modo positivo ou negativo podem ser classificados como imunomoduladores ou modificadores da resposta biológica (LEUNG *et al*, 2006). Algumas vezes o mesmo composto pode apresentar atividade imunossupressora ou imunoestimulante. O tipo de atividade exibida pelo composto é influenciado por uma série de fatores, como a dose, via de administração e seu mecanismo de ação (TZIANABOS, 2000).

Polissacarídeos imunomoduladores possuem origens variadas e podem ser encontrados em bactérias, fungos, algas e plantas (LEUNG *et al*, 2006). De acordo com a

composição, existem três grandes grupos de polissacarídeos modificadores da resposta biológicas: β -(1 \rightarrow 3)-D-glucanas, α/β -(1 \rightarrow 4)-mananas e os heteropolissacarídeos com alto grau de ramificação (LIU *et al*, 2006). As β -(1 \rightarrow 3)-D-glucanas são derivadas principalmente da parede celular ou de reservas citoplasmáticas de fungos (DOMER *et al*, 1988; BLASCHEK *et al*, 1992). As α/β -(1 \rightarrow 4)-mananas são derivadas majoritariamente da parede celular de leveduras (GARNER; HUDSON, 1996) e os polissacarídeos de composição heterogênea são caracteristicamente derivados de pectinas e exsudatos de plantas (GUO *et al*, 2000; YANEVA *et al*, 2002; EBRINGEROVA *et al*, 2003).

Em fungos, a maioria dos polissacarídeos modificadores da resposta biológica é de β -glucanas e α -mananas. (SCHEPETKIN; QUINN, 2006), enquanto as fontes mais abundantes de polissacarídeos imunomoduladores encontrados em bactérias são a parede celular e a cápsula bacteriana (LEUNG *et al*, 2006). Os Polissacarídeos capsulares, também conhecidos como antígenos K são importantes fatores de virulência na patogênese de animais e plantas (MOXON; KROLL, 1990). Em bactérias gram-negativas os lipopolissacarídeos (LPS) formam uma classe de potentes modificadores da resposta biológica.

Nos vegetais a maioria dos polissacarídeos encontrados é relativamente não tóxica e apresenta poucos efeitos colaterais, o qual é o maior problema associado a polissacarídeos imunomoduladores bacterianos e composto sintéticos. Esses dois fatores em conjunto tornam os polissacarídeos extraídos de plantas interessantes para terapia antitumoral e imunomodulatória (OVODOV, 1998; SHERENESHEVA *et al*, 1998). O uso desses polissacarídeos tem se mostrado bastante promissor particularmente na terapia anticâncer devido à insatisfação generalizada com as formas de tratamento tradicionais, como a radio e quimioterapia. As formas tradicionais de tratamento, apesar de ainda serem as mais utilizadas freqüentemente apresentam efeitos colaterais e toxicidade para as células saudáveis. O crescimento de tumores está intrinsecamente relacionado à imunodeficiência. Dessa forma, a busca por substâncias naturais capazes de potencializar o sistema imune tem se tornado alvo de muitas pesquisas biomédicas (PRESTWICH *et al*, 2008).

Essas respostas biológicas promovidas pelos polissacarídeos são acionadas através do reconhecimento desses polissacarídeos por receptores específicos pertencentes ao sistema imune inato. Esses receptores são conhecidos conjuntamente como receptores de reconhecimento de padrão associados a patógenos, e reconhecem estruturas moleculares conservadas freqüentemente encontradas em um largo número de microorganismos (SCHAPETKIN; QUINN, 2006). Ao se ligarem aos seus respectivos ligantes, esses receptores iniciam uma série de reações que culminam em diferentes tipos de respostas por

parte das células do sistema imune. Existem diferentes tipos de receptores os quais os polissacarídeos podem se ligar, como os receptores do tipo Toll-like (TLR), receptores *scavenger* (SR), receptores de β -glucanos, receptor do complemento tipo 3 (CR3), receptor de manose, e lectina manose ligante (MBL) (LEUNG *et al*, 2006). Os mecanismos de ação envolvidos nas respostas aos polissacarídeos estão resumidos na **figura 2.2**.

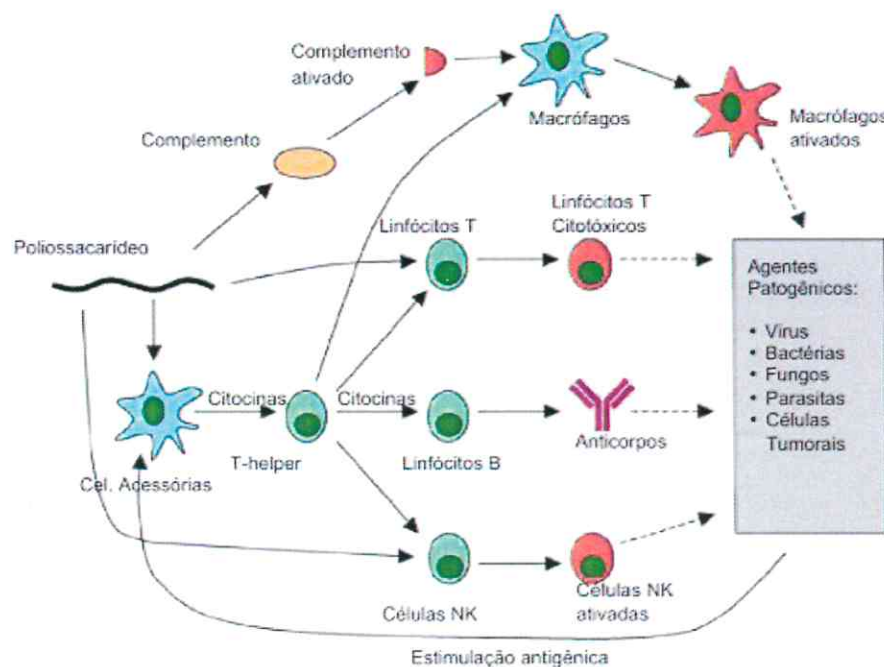


Fig. 2.2 Ativação de células do sistema imune por polissacarídeos modificadores da resposta biológica. Setas contínuas representam ativação e setas pontilhadas representam supressão ou destruição (Adaptado de LEUNG *et al*, 2006).

1.3. Plantas com atividade anticâncer

Produtos derivados de plantas têm um longo registro de uso na terapia contra o câncer. Em 2005, cerca de 60% dos agentes anticâncer utilizados clinicamente eram derivados de produtos naturais, incluindo as plantas (CRAGG; NEWMAN, 2005). Contudo, a utilização de plantas medicinais ou de drogas desenvolvidas a partir de substâncias extraídas de plantas para essa terapia tem sido bastante difundida atualmente. Estudos recentes mostraram que mais de 60% dos pacientes com câncer fazem uso de vitaminas e ervas medicinais como terapia para a doença (MADHURI; PANDEY, 2008). Mais de 50% de todas as drogas modernas em uso clínico são de produtos naturais, muitos dos quais têm a habilidade de controlar o desenvolvimento de células cancerosas (MADHURI; PANDEY, 2009).

Um número extenso de dados na literatura aborda a caracterização de diferentes espécies de plantas com potencialidade na terapia do câncer. Estas plantas têm sido usadas frente a vários tipos de tumores e cânceres como sarcomas, linfomas, carcinomas e leucemias. Muitas destas plantas têm se mostrado efetivas experimentalmente em ensaios clínicos (MADHURI; PANDEY, 2009).

Já na década de 1990, a ação antitumoral de produtos derivados de plantas foi registrada contra diversas linhagens de células cancerosas em roedores e humanos (LIN *et al*, 1996). Dentre as plantas que apresentam compostos com atividade anticâncer ou com atividade citotóxica contra células tumorais, destacam-se as espécies dos gêneros *Catharanthus*, *Taxus*, *Camptotheca*, *Podophyllum*, *Colchicum*, *Salvia*, *Brucea*, *Rubia*, e *Maytenus* (ITOKAWA *et al*, 2008).

O taxol (paclitaxel), um diterpeno taxano extraído de *Taxus brevifolia* também apresenta atividade antineoplásica ao interagir com a tubulina, impedindo a mitose. O paclitaxel atua sobre o equilíbrio polimerização/despolimerização das moléculas de tubulina, promovendo a formação anormal dos feixes de microtúbulos. Esse composto tem sido particularmente importante contra o câncer de mama (ITOKAWA *et al*, 2008).

No início da década de 1960 descobriu-se a camptotecina, um potente antitumoral alcalóide pentacíclico isolado da planta nativa da China *Camptotheca acuminata* (Nyssaceae) (WALL *et al*, 1966). A camptotecina atua sobre a Topoisomerase I impedindo a replicação do DNA nas células. O Topotecan (Hycantin[®]) e Irinotecan (Camptosar[®]), análogos da Camptotecina são comercializados atualmente pela indústria farmacêutica para o tratamento de câncer de ovário e cólon retal (SRIVASTAVA *et al*, 2005).

Plantas representantes do gênero *Podophyllum* (Berberidaceae), incluindo as espécies americanas *P. peltratum* e a indiana *P. emodi* têm sido usadas com plantas medicinais há bastante tempo. A podofilina, uma resina obtida de um extrato alcoólico do rizoma de *Podophyllum* e usada para tratar verrugas encontra-se listado na farmacopéia norte-americana de 1820 a 1942. Em 1880, a podofilotoxina, um composto com atividade antineoplásica foi isolado de *P. peltratum*, porém se mostrou extremamente tóxico, o que impediu seu uso direto na clínica. Extensas modificações na sua estrutura conduziram ao desenvolvimento de duas drogas semi-sintéticas chamadas de etoposídeo e tenoposídeo. Esses compostos têm como alvo a DNA topoisomerase II e são amplamente utilizados no tratamento do câncer de pulmão, testicular, linfomas e leucemias (ITOKAWA *et al*, 2008).

Plantas medicinais possuem propriedades imunomodulatória e antioxidante, levando à atividade anticâncer. São conhecidas por sua versatilidade em estimular ambas as imunidades específica e não-específica, além de possuidoras de vários compostos fitoquímicos, os quais são dotados de elevada atividade antioxidante (PANDEY *et al*, 2006; AGRAWALA *et al*, 2001). Essa propriedade pode prevenir tipos de câncer e outras doenças uma vez que proporcionam proteção às células contra danos causados por radicais livres e compostos reativos de oxigênio (BALUNAS *et al*, 2006).

A inclusão de plantas ricas em compostos antioxidantes como frutos, por exemplo, na dieta, pode prover efeitos protetores à saúde. Muitas substâncias e compostos de origem vegetal presentes na dieta humana têm sido identificadas como agentes quimopreventivos e seu consumo regular pode prevenir o desenvolvimento de câncer (FERRARI; TORRES, 2002; BALUNAS *et al*, 2006). Estudos têm demonstrado que indivíduos vegetarianos estão menos ligados ao diagnóstico de câncer, além de apresentarem uma intensa função imune o que explicaria possivelmente, essa relativa proteção contra a doença (MADHURY; PANDEY, 2008; ARMSTRONG *et al*, 1981).

2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o potencial antitumoral *in vitro* da fração polissacarídica PFCM contra as linhagens celulares HL-60, HCT-8, MDA-MB435 e SF-295.
- Avaliar o potencial antitumoral *in vivo* da fração polissacarídica PFCM em camundongos (*Mus musculus*, linhagem Swiss) transplantados com tumor sarcoma 180.
- Avaliar o efeito da fração polissacarídica PFCM por meio de exame histopatológico, parâmetros hematológicos e bioquímicos em camundongos com Sarcoma 180.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. *Atividade citotóxica in vitro*

3.1.1. *Obtenção e manutenção das linhagens celulares*

O tipo histológico e a origem das células utilizadas no ensaio de citotoxicidade estão listados na **tabela 2.1**. Todas as linhagens são pertencentes ao Laboratório de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará.

As células foram cultivadas em meio RPMI 1640 complementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibióticos (penicilina/estreptomicina) em frascos plásticos para cultura (75cm², volume de 250 mL). A incubação das células foi feita em estufa a 37 °C com atmosfera de 5% de CO₂ e o crescimento celular, observado com o auxílio de um microscópio de inversão a cada 24 horas. Quando necessário, as células eram repicadas em meio de cultura fresco, em concentração de 0,5-1,0x10⁶ células/mL.

Tabela 2.1 – Linhagens de células tumorais utilizadas no ensaio de citotoxicidade in vitro

<i>Linhagem</i>	<i>Tipo Histológico</i>	<i>Origem</i>
HL-60	Leucemia promielocítica	Humano
HCT-8	Carcinoma de cólon	Humano
MDA-MB435	Carcinoma de mama	Humano
SF-295	Carcinoma do sistema nervoso	Humano

3.1.2. *Ensaio do MTT*

A citotoxicidade foi avaliada através do ensaio de MTT (MOSMANN, 1983). Este ensaio pode ser utilizado para medir a citotoxicidade de um composto ao quantificar de modo indireto, por análise colorimétrica, o número de células viáveis expostas ao composto de interesse em diferentes concentrações. O ensaio do MTT se baseia na redução do sal brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT), um composto de cor amarelo, a formazan, de coloração púrpura, por enzimas mitocondriais presentes somente em células metabolicamente ativas.

3.1.3. *Procedimento Experimental*

As células, em uma concentração de 3x10⁵ células/mL, foram plaqueadas em multiplacas de 96 poços. O polissacarídeo foi incubado durante 72 horas juntamente com a suspensão de células em concentrações variando de 0,5 a 100 µg/mL. A doxorubicina foi

utilizada como controle positivo. Após a incubação, as placas foram centrifugadas a 1.500 rpm por 15 minutos e o sobrenadante, descartado. Em seguida, cada cavidade recebeu 200 μ L de solução MTT (0,5 mg/mL) e a placa foi reincubada por mais 3 horas em estufa a 37 °C e 5% de CO₂. Uma nova centrifugação foi realizada (3.000 rpm/10min), sendo o sobrenadante descartado e o precipitado ressuspendido em 150 μ L de solução salina. A quantificação do sal reduzido nas células foi deduzida a partir das absorbâncias lidas no comprimento de onda de 550 nm, com o auxílio de espectrofotômetro de placas, DTX 880 multimode detector, Beckman Coulter.

3.2. Atividade antitumoral in vivo

3.2.1. Obtenção e Manutenção dos Animais

Camundongos fêmeas (*Mus musculus*, linhagem Swiss) foram obtidos do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará e mantidos com livre acesso à água e alimento (*ad libitum*). O modelo de tumor utilizado foi o Sarcoma 180.

O animal de manutenção foi anestesiado com éter etílico e sacrificado por deslocamento cervical. A transferência de tumor se deu por meio da coleta do líquido ascítico da cavidade intraperitoneal, sendo preparada uma suspensão de células com 5,0 mL de solução Ringer lactato, 0,2 mL de gentamicina (5 mg/mL) e 0,5 do líquido ascítico para posterior contagem de células.

3.2.2. Procedimento Experimental

Os animais foram divididos em 9 grupos, dos quais 8 foram inoculados com o tumor sarcoma 180. Cada grupo era composto de 8 animais. Uma suspensão de células na concentração de 2×10^6 células/0,5 mL foi injetada na região axilar esquerda em cada animal que compunham os 8 grupos submetidos à inserção do tumor. Após 24 horas o tratamento com as substâncias testes foi iniciado, sendo mantido durante 7 dias consecutivos. A cada dia, sempre no mesmo horário, cada grupo era inoculado com sua respectiva substância e concentração (TABELA 2.2). Salina fisiológica foi empregada nos grupos controle negativo (C-), enquanto 5-fluorouracil (5-FU) 25 mg/kg foi utilizado como quimioterápico padrão nos animais do grupo controle positivo (C+). As vias oral (v.o) e intraperitoneal (i.p) foram utilizadas para administração das substâncias testes. PFCM foi testado nas doses de 10 mg/kg e 25 mg/kg i.p, e por via oral nas doses de 50 mg/kg e 100 mg/kg.

Após 24 horas do término do tratamento, os animais foram sacrificados por meio de deslocamento cervical. Tumores, rins, fígado e baço foram retirados para pesagem e análise histológica. O percentual de inibição do crescimento tumoral (IT) foi calculado pela fórmula: $IT (\%) = [(A-B) / A] \times 100$, onde A é a média dos pesos dos tumores no grupo controle e B, a média de peso dos tumores nos animais tratados. Os dados foram comparados por meio de análise de variância (ANOVA) seguido do teste de Newman Keuls ($p < 0,05$).

Tabela 2.2-Representação dos grupos de animais utilizados de acordo com o tipo de substância teste, sua concentração e via de administração

	GRUPOS	SOLUÇÃO	VIA DE ADMINISTRAÇÃO
Animais transplantedos com tumor sarcoma 180	1	Salina 0,9% (C-)	i.p
	2	Salina 0,9% (C-)	v.o
	3	5-FU 25 mg/Kg/dia (C+)	i.p
	4	5-FU 25 mg/Kg/dia (C+)	i.p
	5	PFCM 10 mg/Kg/dia	i.p
	6	PFCM 25 mg/Kg/dia	i.p
	7	PFCM 50 mg/Kg/dia	v.o
	8	PFCM 100 mg/Kg/dia	v.o
Animais saudáveis	9	Salina 0,9% (C)	i.p

3.3. Análise morfológica e histopatológica

As análises morfológica e histopatológica foram realizadas a fim de avaliar um possível efeito tóxico causado pela droga de interesse (PFCM). Para a análise histopatológica, foi utilizada a técnica de coloração por hematoxilina/eosina, que permite a visualização de algumas estruturas celulares e, conseqüentemente a identificação de possíveis alterações que estejam ocorrendo na célula.

3.3.1. Procedimento experimental

O tumor e os órgãos fígado, rins e baço foram retirados e armazenados em formol a 10% de concentração. Após essa etapa, os órgãos foram seccionados para preparação das

lâminas. O material foi fixado em formol 10% por um período de 24 horas, em seguida desparafinado em xilol por 15 minutos, e desidratado em concentrações crescentes de álcool até 70%. Em seguida, as lâminas foram lavadas com água destilada até que todo o álcool fosse removido e, seguidamente, coradas com hematoxilina 0,1%.

3.4. Determinação dos parâmetros hematológicos e bioquímicos

A determinação dos parâmetros hematológicos teve por objetivo avaliar possíveis alterações na contagem total e diferencial de leucócitos. A análise bioquímica consistiu em mensurar a concentração sérica das enzimas AST (aspartato aminotransferase), ALT (alanina aminotransferase) e de uréia. Tais enzimas podem ser consideradas como marcadores de danos no fígado, enquanto que a uréia está relacionada à integridade da função renal.

3.4.1. Procedimento experimental

Vinte microlitros (20 μ L) de sangue foram coletados e adicionados a 380 μ L de solução de Turk para contagem de leucócitos em câmara de Neubauer. Para a análise bioquímica foram utilizados kits da LABTEST[®], seguindo-se a metodologia descrita pelo fabricante.

3.5. Análise Estatística

As análises estatísticas empregadas neste trabalho foram realizadas em programa GraphPad PRISM 5.04 for Windows. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM) utilizando ANOVA (Student-Newman-Keuls) para comparações entre grupos distintos.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. *Avaliação do efeito antitumoral de PFCM in vivo no modelo de Sarcoma 180*

As propriedades antitumorais de PFCM foram investigadas *in vitro* e no modelo de Sarcoma 180 *in vivo*. Como demonstrado para outros polissacarídeos (SOUSA *et al*, 2007; LINS *et al*, 2008; GONZAGA *et al*, 2009), PFCM não foi capaz de inibir a proliferação de células cancerosas cultivadas *in vitro* nas concentrações testadas (valores de IC₅₀ superiores a 100 µg/mL). 5-Fluorouracil, usado como controle positivo, mostrou valores de IC₅₀ variando de 0,36 a 12,59 µg/mL para as linhagens HCT-8 e HL-60, respectivamente.

Por outro lado, uma redução significativa no peso do tumor foi observada nos animais tratados com PFCM transplantados com Sarcoma 180 ($p < 0.05$). No oitavo dia de experimento, enquanto o peso médio do tumor nos animais do grupo controle tratados com salina fisiológica foi de $1,37 \pm 0,08$ g, os grupos administrados intraperitonealmente com PFCM (10 e 25 mg/kg) apresentaram inibições de 70,40 e 72,89%, respectivamente (**FIGURA 2.3-A**). A administração oral do polissacarídeo (50 e 100 mg/kg) inibiu o crescimento do tumor em 40,59 and 48,73% (**FIGURA 2.3-B**). Reduções de 67,65% foram observadas para o grupo tratado com 5-FU.

Compostos originados de produtos naturais com potencial citotóxico para vários tipos de tumores podem apresentar mecanismos de ação diferentes podendo interagir diretamente com o DNA, induzindo a apoptose, inibindo enzimas vitais para a célula, dentre outras maneiras (MAYER; GUSTAFSON, 2004). A presença de atividade antitumoral apenas em modelos *in vivo* é bastante comum em polissacarídeos, entretanto existem casos em que o composto também apresenta citotoxicidade *in vitro* (KHAJURE; RATHOD, 2011). Medina *et al* (2008) relataram a atividade citotóxica *in vitro* para o polissacarídeo PSK, um polissacarídeo derivado do fungo *Coriolus versicolor* que apresenta um grande potencial como adjuvante na terapia anticancer, com resultados positivos contra o câncer gástrico, coloretal, de mama e de pulmão (SAKAMOTO *et al*, 2006; UEDA *et al*, 2006).

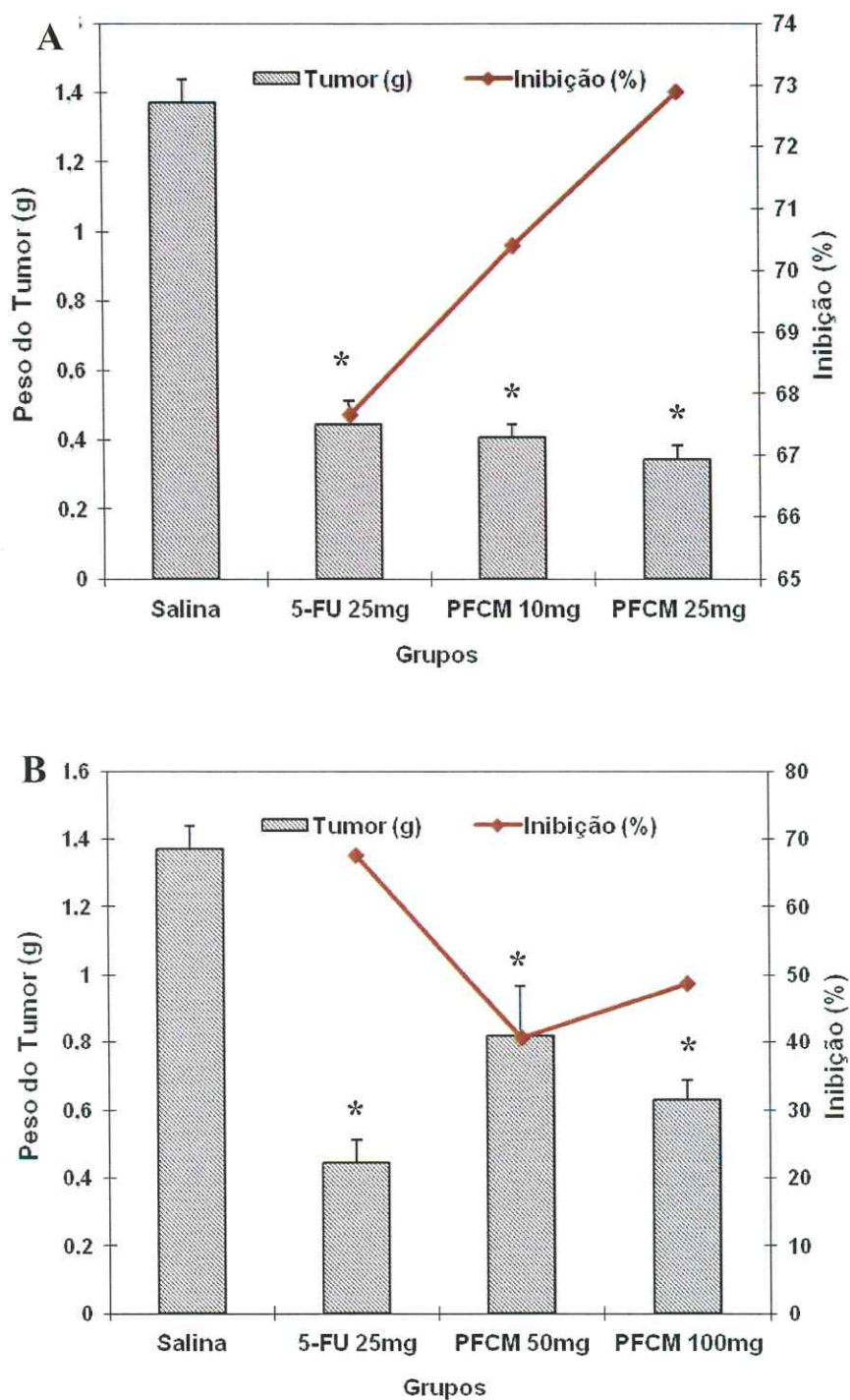


Fig. 2.3 - Efeito dos polissacarídeos isolados de *Passiflora edulis* (PFCM) e 5-FU sobre o desenvolvimento do tumor em animais transplantados com Sarcoma 180. O gráfico mostra o peso do tumor e a inibição do crescimento do tumor. **A**- grupos tratados intraperitonealmente com PFCM (10 e 25 mg/kg/dia). **B**- grupos tratados oralmente com PFCM (50 e 100 mg/kg/dia) Os dados estão apresentados como média \pm E.P.M para grupos de 8 a 16 animais. * $p < 0.05$ comparado ao grupo salina por ANOVA seguido por Student–Newman–Keuls.

O padrão de atividade antitumoral observado em PFCM também foi descrito para outros polissacarídeos como os alginatos de *Sargassum vulgare*, polissacarídeos sulfatados de *Champia feldmannii* e um complexo polissacarídeo-proteína de *Agaricus blazei* (SOUSA *et al*, 2007; LINS *et al*, 2009; GONZAGA *et al*, 2009), além de pectinas e outros tipos de polissacarídeos de plantas (ZHANG *et al*, 2011; SONG; DU, 2010) utilizando o mesmo modelo. Tem sido sugerido que esta atividade está relacionada com a modulação do sistema imune. Assim, os polissacarídeos bioativos são considerados modificadores da resposta biológica, agindo através da ativação direta ou indireta de diferentes componentes do sistema imune como macrófagos, linfócitos T, linfócitos B e células natural killer (LEUNG *et al*, 2006). Os mecanismos envolvidos neste processo não estão completamente esclarecidos, mas as respostas observadas em modelos animais incluem a inibição do crescimento de células cancerosas, da angiogênese e da metástase (LEUNG *et al*, 2006; GLINSKY; RAZ, 2009). Também é importante mencionar que o efeito de PFCM é comparável, ou até mesmo superior, ao observado com outros polissacarídeos usando o modelo de tumor Sarcoma 180 (GAN *et al*, 2004; LIU *et al*, 2006; SOUSA *et al*, 2007; LINS *et al*, 2009; GONZAGA *et al*, 2009) (TABELA 2.3).

Tabela 2.3 - Efeito inibitório do crescimento do tumor (Sarcoma 180) de diferentes polissacarídeos de acordo com a dose utilizada, origem e via de administração

Polissacarídeo	Dose	Origem	Via de administração	Inibição do tumor (S180)	Referência
PFCM	25 mg/Kg	<i>Passiflora edulis</i>	i.p	74,3%	Este trabalho
PFCM	100 mg/Kg	<i>Passiflora edulis</i>	v.o	53,9%	Este trabalho
LBP _{3p}	10 mg/Kg	<i>Lycium barbarum</i>	v.o	43,0%	GAN <i>et al</i> , 2004
Cf-PLS	25 mg/Kg	<i>Champia feldmannii</i>	i.p	48,6%	LINS <i>et al</i> , 2009
- V	3,33 mg/kg	<i>Sargassum vulgare</i>	v.o	74,8%	SOUSA, 2007
+V	3,33 mg/kg	<i>Sargassum vulgare</i>	i.p	46,9%	SOUSA, 2007
+V	3,33 mg/kg	<i>Sargassum vulgare</i>	v.o	88,2%	SOUSA, 2007
AC-OS	100 mg/Kg	<i>Antrodia camphorata</i>	i.p	69,1%	LIU <i>et al</i> , 2004
AC-OS	200 mg/Kg	<i>Antrodia camphorata</i>	v.o	58,8%	LIU <i>et al</i> , 2004
AIOPA	100 mg/kg	<i>Inonotus obliquus</i>	v.o	65,74%	ZHANG <i>et al</i> , 2011
AIOPA	300 mg/kg	<i>Inonotus obliquus</i>	v.o	70,56%	ZHANG <i>et al</i> , 2011

4.2. *Análise dos parâmetros representativos de toxicidade*

Um aspecto importante de tais estudos é o perfil toxicológico desses polissacarídeos. Em geral, o tratamento é bem tolerado e os efeitos secundários observáveis são potencialmente reversíveis (LEUNG *et al*, 2006; SOUSA *et al*, 2007; SOUSA *et al*, 2008; LINS *et al*, 2009; GONZAGA *et al*, 2009). Numa apreciação preliminar nos animais inoculados com Sarcoma 180, alterações morfológicas no fígado, rim e baço foram avaliadas baseado no peso e parâmetros histopatológicos após tratamento com PFCM. Também, alterações metabólicas básicas e hematológicas foram monitoradas incluindo os níveis de ureia, alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST), além dos valores de tipos celulares que possam evidenciar uma possível imunomodulação.

4.2.1. *Peso dos Órgãos*

As análises realizadas não evidenciaram alterações significativas no peso do fígado ou do rim nos animais tratados com PFCM independente da dose ou via de administração em relação ao grupo não inoculado com o tumor. Da mesma forma, os demais grupos inoculados com células de Sarcoma 180, não apresentaram alterações no peso de tais órgãos. Contudo, os pesos do baço foram significativamente aumentados nos animais com tumor transplantado, quando comparados com o grupo saudável ($p < 0,05$). De fato, após o tratamento, o peso do baço nos animais tratados com PFCM mostrou-se significativamente aumentado quando comparado com o grupo controle saudável, bem como quando comparado ao grupo tratado com 5-FU ($p < 0,05$) (TABELA 2.4).

4.2.2. *Avaliação Histopatológica e Hematológica*

A análise histopatológica dos tumores mostrou neoplasia maligna composta por células poligonais exibindo pleomorfismo celular e nuclear, figuras de mitose, células gigantes malignas, invasão muscular e áreas de necrose de coagulação em todos os grupos com Sarcoma 180. No grupo 5-FU observou-se nítida rarefação celular quando comparado com os demais grupos (FIGURA 2.4).

Análises histopatológicas das amostras do fígado dos animais tratados com PFCM mostraram a presença de alterações como desorganização dos cordões de hepatócitos, necrose focal de hepatócitos, hiperplasia das células de Kupffer e degeneração hidrópica de hepatócitos, porém todas possíveis de reversão. Além disso, o tecido intersticial foi

preservado em todos os grupos tratados com a fração polissacarídica (**FIGURA 2.5**), o que é essencial para a regeneração do órgão (CURRAN, 1990). Da mesma forma, a ausência de diferenças significativas nos níveis das enzimas hepáticas AST (aspartato aminotransferase) e ALT (alanina aminotransferase) entre os animais do grupo saudável e do grupo tratado com PFCM, indica que o tratamento com a fração obtida de *P. edulis* amenizou a intensidade dos efeitos do tumor nos animais (**TABELA 2.5**).

Tabela 2.4 - Efeitos da fração polissacarídica (PFCM) isolada de *Passiflora edulis*, e do 5-FU no peso dos órgãos de camundongos injetados com Sarcoma 180 ($2,0 \times 10^6$ células/animal s.c.)

Droga	Dose (mg/kg)	Fígado (g/100g de peso corpóreo)	Baço (g/100g de peso corpóreo)	Rim (g/100g de peso corpóreo)
Camundongos Saudáveis				
Salina	-	4,59 ± 0,190	0,18 ± 0,030	1,46 ± 0,050
Camundongos transplantados com tumor S180				
Salina	-	5,18 ± 0,188	0,63 ± ,071 ^a	1,17 ± 0,025
5-FU	25 (i.p.)	4,86 ± 0,191	0,46 ± 0,039 ^{a,b}	1,19 ± 0,041
PFCM	10 (i.p.)	4,70 ± 0,190	0,66 ± 0,030 ^{a,c}	1,14 ± 0,039
PFCM	25 (i.p.)	4,76 ± 0,328	0,73 ± 0,035 ^{a,c}	1,06 ± 0,240
PFCM	50 (v.o.)	5,30 ± 0,160	0,69 ± 0,039 ^{a,c}	1,08 ± 0,045
PFCM	100 (v.o.)	5,20 ± 0,140	0,60 ± 0,034 ^{a,c}	1,16 ± 0,044

O tratamento foi iniciado um dia após a implantação do tumor, sendo continuado por 7 dias consecutivos. Os dados são representados como média ± E.P.M. de 8 a 16 animais. **a**, ($p < 0.05$) comparado com animais do grupo saudável por (ANOVA) seguido por Student Newman-Keuls. **b**, ($p < 0.05$) comparado com o grupo salina inoculado com S180 por (ANOVA) seguido de Student Newman Keuls. **c**, ($p < 0.05$) comparado com o grupo tratado com 5-FU por (ANOVA) seguido por Student Newman-Keuls.

Por outro lado, os rins retirados dos animais inoculados com o tumor e tratados com PFCM mostraram uma mudança hidrópica discreta e algumas áreas de necrose do epitélio tubular proximal (dose de 25 mg/kg), hemorragia glomerular e tubular (**FIGURA**

2.6). Contudo, a estrutura dos glomérulos manteve-se essencialmente preservada, o que sugere que estas alterações podem ser consideradas potencialmente reversíveis (OLSEN; LEZ, 1994). Estes resultados estão de acordo com os apresentados por Sousa *et al* (2007 e 2008) e por Lins *et al* (2009). Nenhuma mudança significativa foi observada nos níveis de uréia, um dos parâmetros relacionados à integridade da função renal (TABELA 2.5).

Tabela 2.5 - Efeitos da fração polissacarídica (PFCM) isolada de *Passiflora edulis*, e do 5-FU nos parâmetros bioquímicos sanguíneos dos animais inoculados com Sarcoma 180 ($2,0 \times 10^6$ células/animal s.c.)

	Droga	Dose (mg/kg/dia)	AST (UI/L)	ALT (UI/L)	Ureia (mg/dL)
Animais saudáveis	Salina	-	47,8 ± 12,5	14,1 ± 5,7	38,3 ± 4,1
	Salina	-	55,6 ± 10,5	17,3 ± 8,0	45 ± 6,1
S-180	5-FU	25	69,0 ± 14,1	21 ± 14,3	53 ± 10,3
	PFCM	25	49,8 ± 13,8	19,5 ± 7,1	33,7 ± 8,4
	PFCM	50	64,0 ± 12,5	21 ± 6,4	39,0 ± 5,8
	PFCM	100	61,0 ± 15,2	22 ± 9,4	39,6 ± 7,8

O tratamento foi iniciado um dia após a implantação do tumor em grupos de 8 a 16 animais, sendo continuado por 7 dias consecutivos. Os dados são representados como média ± E.P.M. de oito animais.

Em relação ao baço, os animais inoculados com a células tumorais e tratados com PFCM mostraram um aumento da polpa branca e do ninho de megacariócitos (FIGURA 2.7), aliado ao fato de o tratamento com os polissacarídeos ter induzido um aumento significativo no peso do órgão. Esses dados sugerem uma ativação imunológica (LINS *et al*, 2009). Além disso, houve poucas alterações na estrutura celular do baço nos grupos tratados com PFCM, sendo estas, ainda, reversíveis. Essas observações corroboram com os dados da literatura a respeito da inoculação de tumores na experimentação animal caracterizada por aumento na quantidade de granulócitos e esplenomegalia (KODAMA *et al*, 1974; OKAWA *et al*, 1992; SATO *et al*, 2005).

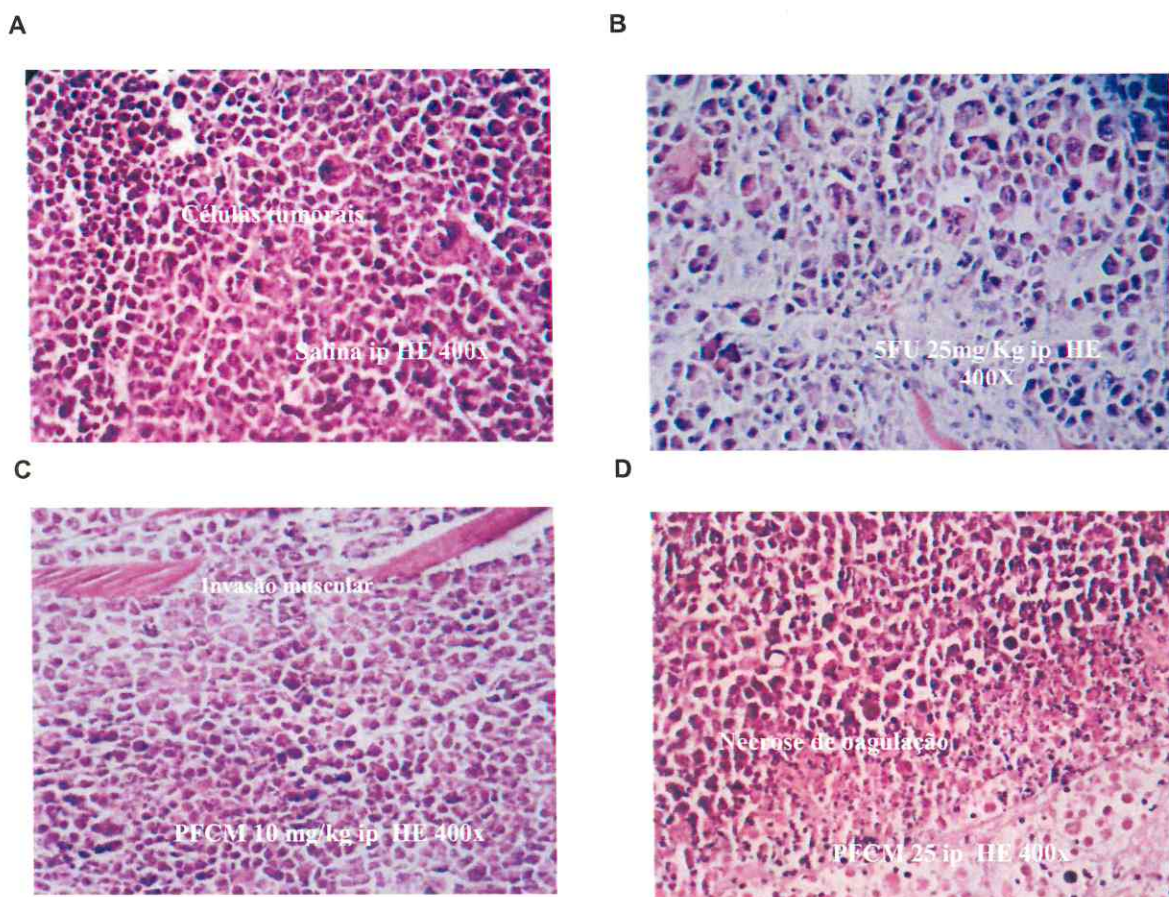


Fig. 2.4- Microfotografias representativas dos cortes histológicos (400x) de tumores de camundongos transplantados com tumor S 180. **A-**Grupo salina i.p e v.o. **B-**5-FU 25 mg/kg/dia. **C-** PFCM 10 mg/kg/dia-i.p. **D-** PFCM 25 mg/kg/dia-i.p. As lâminas foram coradas pela técnica H/E.

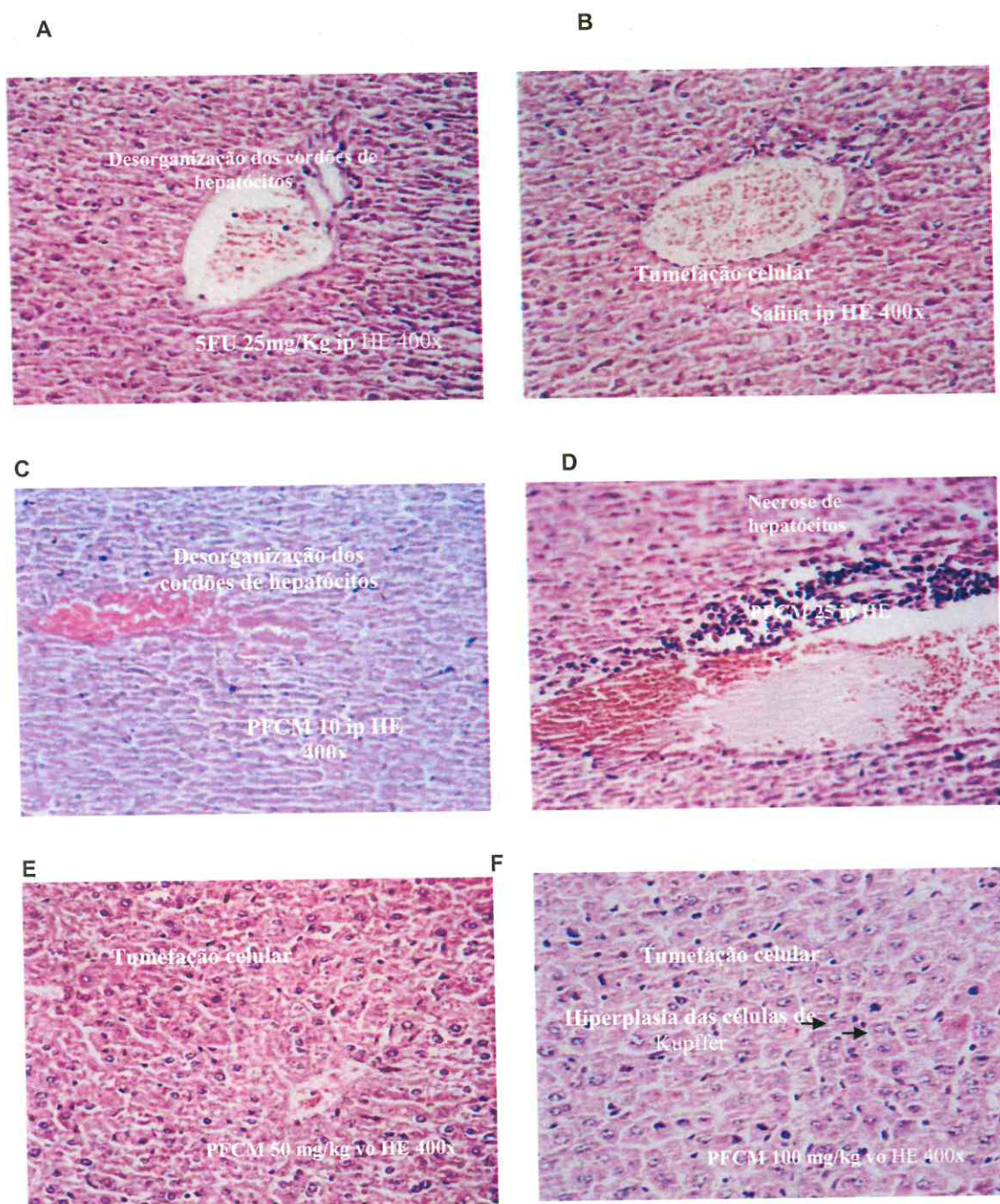
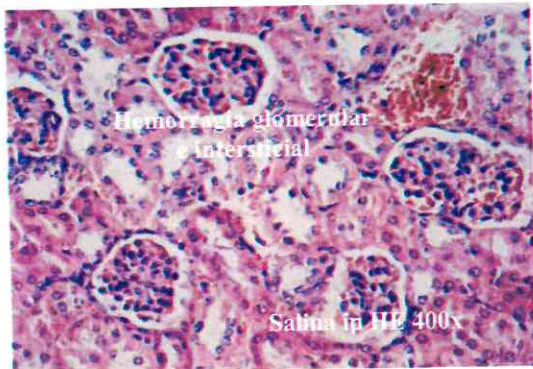
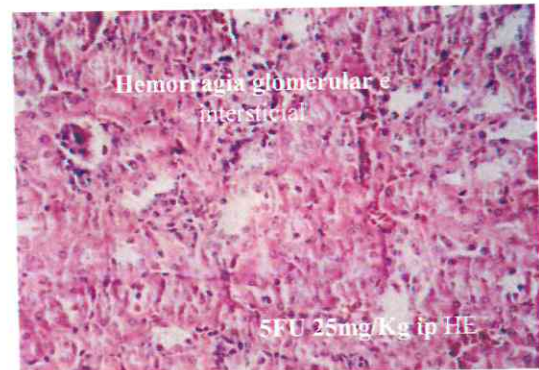


Fig. 2.5- Microfotografias representativas dos cortes histológicos (400x) de fígados de camundongos transplantados com tumor S 180. **A-**Grupo salina. **B-**5-FU 25 mg/kg/dia. **C-** PFCM 10 mg/kg/dia-i.p **D-** PFCM 25 mg/kg/dia-i.p. **E-** PFCM 50 mg/kg/dia-v.o. **F-** PFCM 100 mg/kg/dia-v.o. As lâminas foram coradas pela técnica H/E.

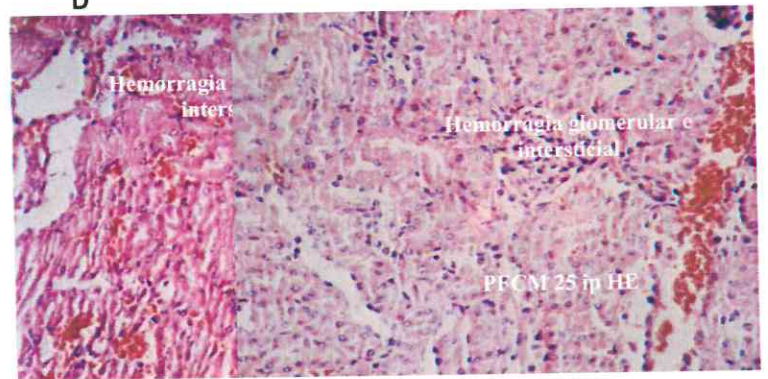
A



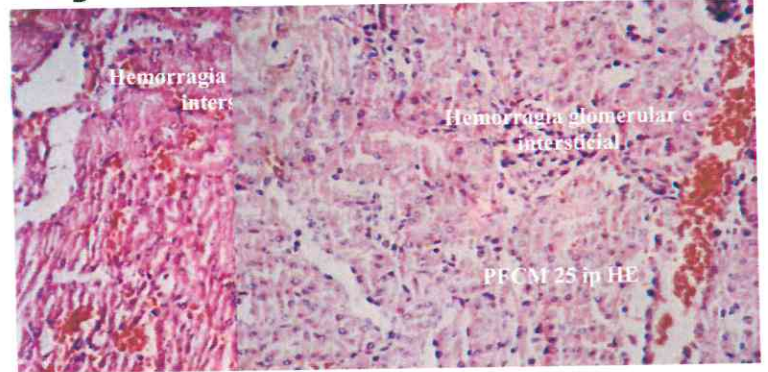
B



C



D



E

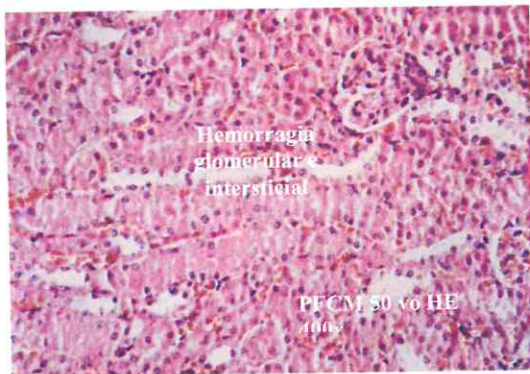


Fig. 2.6- Microfotografias representativas dos cortes histológicos (400x) de rins de camundongos transplantados com tumor S 180. **A-**Grupo salina i.p e v.o. **B-**5-FU 25 mg/kg/dia. **C-** PFCM 10 mg/kg/dia-i.p **D-** PFCM 25 mg/kg/dia-i.p. **E-** PFCM 50 mg/kg/dia-v.o. As lâminas foram coradas pela técnica H/E.

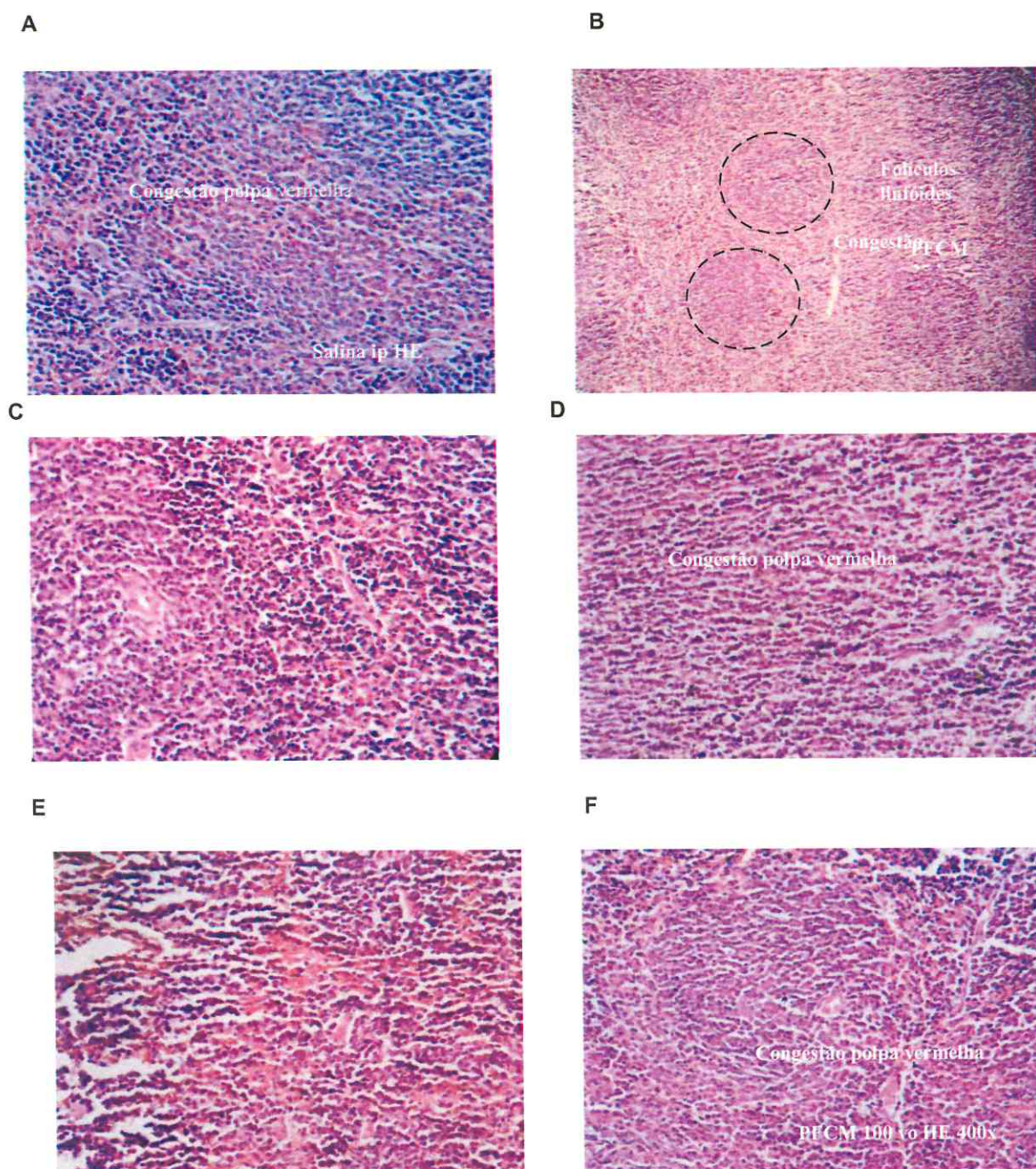


Fig. 2.7- Microfotografias representativas dos cortes histológicos (400x) de baços de camundongos transplantados com tumor S 180. **A-**Grupo salina i.p e v.o. **B-**5-FU 25 mg/kg/dia. **C-** PFCM 10 mg/kg/dia-i.p. **D-** PFCM 25 mg/kg/dia-i.p. **E-** PFCM 50 mg/kg/dia-v.o. **F-** PFCM 100 mg/kg/dia-v.o. As lâminas foram coradas pela técnica H/E.

Segundo Okawa *et al* (1992), a supressão imunitária observada em animais portadores de tumor e também em pacientes com câncer, geralmente é causada pela quimioterapia, como observado no presente trabalho para os animais transplantados com Sarcoma 180 tratados com 5-FU. Os animais transplantados com os tumores de Sarcoma 180 tratados com salina e também os tratados com 5-FU mostraram diminuição significativa ($p < 0,05$) no número total de leucócitos circulantes quando comparados aos animais saudáveis. O tratamento com PFCM influenciou positivamente o aumento do número de leucócitos totais em todas as doses testadas atingindo níveis de normalidade (**TABELA 2.6**). Em outras palavras, PFCM aumentou ainda mais a esplenomegalia induzida pelo tumor, quando comparado aos grupos salina e 5-FU, ao mesmo tempo em que induziu uma elevação no número total de leucócitos circulantes em comparação aos demais grupos transplantados com Sarcoma 180 diminuindo, assim, a leucopenia característica da presença do tumor.

Em relação à contagem diferencial de leucócitos, houve uma diferença significativa ($p < 0,05$) no percentual de linfócitos e neutrófilos periféricos nos animais transplantados com Sarcoma 180 tratados com solução salina, e com 5-FU, quando comparados ao grupo normal saudável. O 5-FU reduziu bastante o número de neutrófilos e monócitos, fazendo com que o percentual linfocitário atingisse 92,9%. Além disso, 5-FU reduziu o número de plaquetas, o qual se manteve inalterado nos grupos tratados com PFCM, independente da dose utilizada e via de administração (**TABELA 2.6**). Apesar de o tratamento com PFCM também ter apresentado diferença significativa em relação ao grupo controle saudável ($p < 0,05$), os grupos tratados intraperitonealmente (25 mg/kg) com os polissacarídeos apresentaram uma diferença menos acentuada no percentual de cada tipo de leucócito quando comparados ao 5-FU, indicando uma melhor resposta do animal tratado com PFCM frente aos efeitos do tumor do que o quimioterápico. Mais ainda, o tratamento com PFCM administrado oralmente (50 e 100 mg/kg) normalizou o percentual de linfócitos periféricos no sangue (**TABELA 2.6**).

Tabela 2.6- Efeitos da fração polissacarídica (PFCM) isolada de *Passiflora edulis*, e do 5-FU nos parâmetros hematológicos periféricos. Os animais foram injetados com Sarcoma 180 (2.0×10^6 células/animal s.c.). O tratamento foi iniciado um dia após a implantação do tumor, sendo continuado por 7 dias consecutivos

Animais	Tratamento	Dose (mg/kg/dia)	Plaquetas (10^3 células/ μ L)	Leucócitos Totais (10^3 células/ μ L)	Contagem Diferencial de Leucócitos (%)			
					Eosinófilos	Linfócitos	Neutrófilos	Monócitos
Animais saudáveis	Salina	-	7,52 \pm 0,39	5,96 \pm 0,27	0,40	66,8	19,60	12,80
	Salina	-	5,94 \pm 0,52	2,8 \pm 0,4 ^a	0,6	55,2 ^a	37,6 ^a	7,0
S-180	5-FU	25	4,13 \pm 0,21 ^a	1,4 \pm 0,20 ^{a,b}	0,0	92,9 ^{a,b}	3,8 ^{a,b}	3,3 ^{a,b}
	PFCM	25	6,1 \pm 0,1 ^c	5,6 \pm 1,1 ^{b,c}	0,0	52,0 ^{a,c}	37,4 ^{a,c}	9,6 ^c
	PFCM	50	7,3 \pm 1,1 ^c	5,9 \pm 1,3 ^{b,c}	0,0	67,6 ^{b,c}	27,4 ^{a,b,c}	5,0 ^{a,b}
	PFCM	100	6,3 \pm 1,0 ^c	4,8 \pm 0,6 ^{b,c}	0,89	68,6 ^{b,c}	26,2 ^{a,c}	4,3 ^{a,b}

Dados estão apresentados como média \pm E.P.M. de 8 a 16 animais. **a.** ($p < 0,05$) comparado com o grupo saudável por (ANOVA) seguido por Student Newman-Keuls. **b.** ($p < 0,05$) comparado com o grupo salina transplantado com tumor Sarcoma 180 (S-180) por (ANOVA) seguido por Student Newman Keuls. **c.** ($p < 0,05$) comparado com grupo tratado com 5-FU por (ANOVA) seguido por Student Newman-Keuls.

Estes resultados indicam que a ação de PFCM está relacionada a um aumento dos tipos celulares envolvidos no mecanismo de defesa preliminar do organismo. Um amplo número de polissacarídeos de plantas têm sido considerados como modificadores da resposta biológica, sendo relatados por proporcionar respostas imunológicas relacionadas à ativação do sistema complemento, proliferação de linfócitos e estimulação de macrófagos (INNGJERDINGEN *et al*, 2007). Dentre essas moléculas biologicamente ativas, os polissacarídeos pécticos constituídos de arabinogalactanas são frequentemente registrados por suas propriedades relacionadas ao sistema imune (PAULSEN, 2001; SAMUELSEN *et al*, 1998; KIM *et al*, 2002; TAGUCHI *et al*, 2004; NERGARD *et al*, 2005; BRECKER *et al*, 2005), todos contendo quantidades significativas de arabinogalactanas.

As arabinogalactanas podem ser divididas em dois tipos estruturais: arabinogalactanas tipo I (AG-I) e arabinogalactanas tipo II (AG-II). AG-I é encontrada como regiões de ramificação em ramnogalacturonanas de pectinas complexas (VINCKEN *et al*, 2003). Pectinas de plantas também têm sido relatadas por seu efeito antitumoral *in vivo* além de proporcionar ativação imunológica (INNGJERDINGEN, *et al*, 2005 e 2007; GLISNKY; RAZ, 2009; AZÉMAR *et al*, 2007), inclusive com perfis de ação semelhantes aos observados para PFCM (ZHANG *et al*, 2011). No capítulo I deste trabalho relatou-se que PFCM é constituída por uma região de ramnogalacturonanas do tipo 1 (RG-1) com ramificações de açúcares neutros representados principalmente, por arabinose e galactose, o que sugere a existência de arabinogalactanas como cadeias laterais do polissacarídeo o que corrobora com os dados apresentados na literatura.

5. CONCLUSÕES

Demonstrou-se que a fração polissacarídica (PFCM) isolada de *Passiflora edulis* não exibiu atividade citotóxica contra linhagens de células tumorais *in vitro*. Contudo, PFCM possui efeitos antitumorais *in vivo*, amenizando sob alguns aspectos os eventos de toxicidade do tumor como observado nas análises histopatológicas que revelaram alterações celulares em alguns órgãos, porém, todas potencialmente reversíveis.

O padrão de ação observado na atividade antitumoral de PFCM é semelhante ao de polissacarídeos obtidos de outras fontes, inclusive substâncias de natureza péctica, através da ativação do sistema imune. Assim, a atividade observada para PFCM pode estar relacionada à propriedades imunoestimulantes.

CAPÍTULO III

Estudo das propriedades hipoglicemiante e hipolipidêmica e da ação anti-inflamatória dos polissacarídeos pécnicos de *Passiflora edulis* fo. *flavicarpa* O. Deg., Passifloraceae em ratos diabéticos

1. REFERENCIAL TEÓRICO

1.1. *Considerações gerais sobre síndrome metabólica e diabetes mellitus*

Devido à crescente incidência nos países ocidentais, a síndrome metabólica, uma desordem metabólica caracterizada por obesidade, hipertensão, dislipidemia e resistência à insulina, é considerada um dos mais importantes problemas de saúde pública no mundo, sendo considerada o maior fator de risco para o desenvolvimento de diabetes tipo 2, doença cardiovascular, e também alguns tipos de câncer (MEIGS, 2003; MEIGS *et al*, 2006; FORD *et al*, 2004).

A patogênese desta síndrome é complexa e ainda não totalmente compreendida. Obesidade e resistência à insulina, acompanhadas de alterações no perfil e concentração de hormônios e citocinas produzidos pelo tecido adiposo têm sido consideradas como possíveis agentes causais (FRAYN, 2000). Nas últimas duas décadas, tem-se considerado que mudanças no estilo de vida podem funcionar como a terapia inicial para a prevenção e tratamento desta patologia. Dentre tais mudanças, as modificações nos hábitos alimentares são muito relevantes (GRUNDY *et al*, 2005). A ingestão de fibras representa uma maneira interessante de tratamento para a síndrome metabólica, a partir de seus diversos efeitos fisiológicos, os quais estão relacionados à sua estrutura e propriedades físicas e químicas (DAVY; MELBY, 2003; DELZENNE; CANI, 2005). A partir dessas características, os diferentes tipos de fibra têm sido relatados por auxiliar no controle do peso corpóreo e na homeostase dos níveis glicêmicos, lipídicos e de sensibilidade à insulina, além da regulação de alguns marcadores e mediadores de inflamação envolvidos no processo de desenvolvimento da síndrome metabólica (QI *et al*, 2006; DIETRICH; JIALAL, 2005; DANDONA *et al*, 1998; KING, 2005).

A busca por novos fármacos mais eficazes para o tratamento do diabetes já proporcionou o isolamento e a caracterização de diversos compostos possuidores de ação hipoglicemiante (WANG; NG, 1999). Interessantemente, as fibras alimentares representam um novo grupo de compostos dotados de atividade hipoglicêmica em potencial. A ação de compostos de natureza glicídica sobre os níveis de glucose sanguíneos tem sido bem relatada (GOMATHY *et al*, 1990; GIACO *et al*, 2000; BENNETT *et al*, 2006).

Os distúrbios no metabolismo decorrentes de doenças endócrinas refletem-se, na maioria das vezes, na carência ou excesso de produção de hormônios e no envolvimento de enzimas e receptores específicos. Assim, a restauração dos níveis hormonais normais e o

estudo da inibição enzimática, representam maneiras de promover a manutenção da homeostase metabólica em caso de patologias desta natureza (OLIVEIRA *et al*, 1997).

O controle da glicemia sanguínea é regulado através da ação de hormônios pancreáticos, dentre os quais o glucagon e insulina, sendo esta o principal hormônio controlador do metabolismo intermediário, reduzindo de maneira aguda os níveis de glucose plasmática. Desse modo, sua secreção diminuída ou uma redução na sensibilidade à sua ação acarretam um aumento nos níveis de glucose (RANG *et al*, 2004).

Células B ou β secretoras de insulina e amilina; células A e D, secretoras de glucagon e somatostatina, respectivamente, e células PP, secretoras do peptídeo pancreático são os quatro tipos principais de células presentes nas ilhotas de Langerhans (RANG *et al*, 2004).

A amilina é um peptídeo responsável por retardar o esvaziamento gástrico e capaz de se opor à ação da insulina por estimular a degradação de glicogênio no músculo estriado. A somatostatina funciona como fator de regulação na liberação de insulina e glucagon, além de inibir a liberação do hormônio de crescimento pela hipófise. A secreção de glucagon é regulada a partir dos níveis de glucose e ácidos graxos, sendo estimulada quando as concentrações dos mesmos estão baixas, enquanto um aumento em seus níveis promove uma redução na liberação de glucagon pelas Células A no pâncreas (RANG *et al*, 2004).

A insulina mostra ações no metabolismo da glucose em diversos tecidos, sobretudo no fígado, onde inibe a degradação do glicogênio (glicogenólise) e a síntese de glucose, a partir de fontes diversas dos carboidratos (gliconeogênese), além de estimular a síntese de glicogênio mantido no fígado. Seus efeitos no músculo e lipídeos representam uma maneira de conservar as fontes energéticas ao favorecer a captação e armazenamento da glucose, dos aminoácidos e dos lipídios, quando ingeridos. Quedas nos níveis de insulina no plasma promovem um aumento na glicemia, causando o *diabetes mellitus*, um distúrbio metabólico crônico caracterizado por níveis elevados de glucose no sangue (RANG *et al*, 2004).

O *diabetes mellitus* é considerado uma síndrome caracterizada por alterar a homeostase do organismo, por distúrbios metabólicos dos carboidratos, e capaz de envolver o metabolismo de proteínas e lipídios (NEGRI, 2005). A doença compreende sintomas tais como sede e fome excessivas, fraqueza muscular, perda de peso e elevação do nível de glucose no sangue (SAID *et al*, 2002; GODOY, 2000; BERNE; GENUTH, 2000; ROBBINS *et al*, 1991). O sintoma da sede intensa, acompanhado por desidratação e ingestão aumentada de líquidos (polidipsia) em diabetes está relacionado à perda de água e metabólitos

intracelulares, que altera o estado normal dos osmorreceptores dos centros da sede no cérebro. O excesso de açúcar não utilizado traz como conseqüência a falta de fornecimento de energia nas células, originando os sintomas de fraqueza e perda de peso (NEGRI, 2005; COTRAN, 1996). Ocorre um aumento na degradação e uma diminuição na síntese de proteínas. A cetoacidose desenvolve-se devido à degradação acelerada das gorduras em acetil-CoA que, na ausência de metabolismo aeróbico de carboidratos, é convertida em acetoacetato e β -hidroxibutirato (provocando acidose) e cetona (RANG *et al*, 2004).

Outras manifestações sintomáticas citadas em referência ao diabetes são parestesias, distúrbios visuais e no aparelho geniturinário, disfunção erétil e diminuição da libido (OLIVEIRA; MILECH, 2004). O diabetes também parece estar associado à alterações na cognição. Estudos examinando a incidência de demência em pessoas com *diabetes mellitus* revelaram um maior grau de representatividade em diabéticos do que em pessoas sem a doença. Este alto risco inclui tanto a doença de Alzheimer quanto casos de demência vascular (BIESELS *et al*, 2006).

A hiperglicemia, um aspecto característico do diabetes, é resultado da destruição das células β nas ilhotas de Langerhans, acarretando à redução parcial ou total da secreção de insulina, ou mesmo devido a uma maior resistência fisiológica à ação deste hormônio (DANEMAN, 2006) e na liberação descontrolada de glucose pelo fígado, além de uma baixa captação do açúcar pelo músculo esquelético e reduzida síntese de glicogênio (RANG *et al*, 2004). A hiperglicemia crônica está associada à lesão, disfunção e falência de vários órgãos, especialmente olhos, rins, nervos, coração e vasos sanguíneos (PEREIRA *et al*, 2006).

Um dos efeitos causados pela ausência de insulina e o conseqüente aumento de glucose no sangue é a alteração nos níveis das lipoproteínas plasmáticas, as quais são dependentes da ação de insulina. No diabetes, a deficiência no controle da hiperglicemia está associada a alterações dos triglicérides, diminuição do HDL e, em alguns casos, aumento no LDL, contribuindo para o desenvolvimento de doenças coronarianas (STONE, 2008). Pacientes diabéticos estão mais sujeitos às doenças cardiovasculares prematuras. O aumento do colesterol está associado ao crescimento do risco de problema vascular, o qual se mostra mais pronunciado em indivíduos diabéticos do que em não diabéticos. A hipertrigliceridemia observada no *diabetes mellitus*, está relacionada aos baixos níveis de HDL decorrentes da hiperglicemia característica da doença (BETTERIDGE, 1996).

1.2. Tipos de diabetes

O diabetes é reconhecido sob dois tipos: tipo 1, também chamado de tipo insulino-dependente ou tipo juvenil, e tipo 2 ou tipo não insulino-dependente. Kuzuya (2002) sugere uma nova classificação baseada na etiologia da doença. Ele utiliza conceitos de estágios clínicos, desde a normalidade, passando a uma diminuição de tolerância à glicose, e glicemia de jejum alterada, até o desenvolvimento e diagnóstico propriamente ditos. Sendo, portanto, eliminados os termos insulino-dependente e insulino-não-dependente. No entanto, utilizar-se-á aqui a primeira proposta de classificação.

O diabetes tipo 1 é condicionado pela destruição das células β no pâncreas, provocando uma deficiência parcial ou mesmo total na liberação de insulina. Representa de 5%-10% dos casos totais. Em geral, os diabéticos tipo 1 são jovens e não-obesos quando na primeira manifestação dos sintomas. Embora menos incidente que o tipo 2, é uma séria desordem crônica com importantes conseqüências a longo prazo. Apresenta um forte componente genético, que torna aumentada a susceptibilidade de alguns indivíduos e uma predisposição hereditária, com incidência 10 vezes maior em parentes de primeiro grau de um caso original (DANEMAN, 2006; RANG *et al*, 2004).

São identificadas duas subformas: tipo 1A, resultante do ataque às células B, mediado por células autoimunes, e o tipo 1B, o qual é menos freqüente, e com causas ainda não esclarecidas, ocorrendo mais comumente em indivíduos asiáticos e descendentes de africanos, os quais mostram variações nos níveis de deficiência de insulina entre episódios esporádicos de cetoacidose (DANEMAN, 2006). Os pacientes acometidos com diabetes tipo 1 fazem uso diário de insulina para manter sob controle os níveis glicêmicos. Em caso da não administração do hormônio, acabam morrendo com cetoacidose diabética (RANG *et al*, 2004). O diabetes tipo 2 representa um grupo heterogêneo de desordens assinaladas pela resistência à insulina e diminuição da secreção do hormônio (REES; ALCOLADO, 2005). Frequentemente, pacientes acometidos pelo tipo 2 são obesos, com um número maior de casos da doença na fase adulta e um aumento progressivo na incidência em relação ao aumento da idade à medida que ocorre um declínio da função das células β (RANG *et al*, 2004).

A hiperglicemia pós-prandial é a primeira anormalidade metabólica em diabéticos tipo 2 e também representa um importante fator na predição do início de complicações macrovascular e microvascular, que contribuem para o progresso dos sintomas no *diabetes mellitus* (RATNER, 2001).

O diagnóstico do diabetes baseia-se nas alterações de glicose plasmática de jejum (8-12 h) ou após uma sobrecarga de 75 g de glicose por via oral, com medições após duas horas (teste oral de tolerância à glicose - TOTG) e nos níveis de glicose plasmática casual (PEREIRA *et al*, 2006). Os valores dos níveis de glicose plasmática de jejum, de tolerância ao açúcar e de medida casual em pessoas normais e diabéticas estão descritos na **Tabela 3.1**. Para indivíduos normais, os níveis de glicose plasmática devem ser mantidos regulados em uma faixa compreendida entre 60 e 110 mg/dL. Valores acima de 126 mg/dL representam riscos da doença e preconizam o início de acompanhamento adequado. A primeira manifestação de intolerância a carboidratos em humanos é uma insuficiência na secreção de insulina com conseqüente deficiência na utilização de glicose. A identificação real nos níveis elevados de glicose plasmática, em combinação com a hemoglobina glicada, é a predição mais acurada de anormalidade metabólica em pacientes com diabetes tipo 2 (RATNER, 2001).

1.3. *Diabetes e Inflamação*

Alguns estudos têm procurado analisar o envolvimento da inflamação em diabetes tipo 1 e tipo 2 e suas complicações vasculares. Discute-se que mediadores da inflamação estão associados com o desenvolvimento da doença, interferindo nos aspectos de resistência à insulina (YUDKIN *et al*, 1999). O fator de necrose tumoral, TNF- α , uma citocina pró-inflamatória, é capaz de influenciar o metabolismo de lipídeos e de glicose, inibindo a ação da insulina e o funcionamento das células beta pancreáticas, disparando os processos de inflamação agudo e crônico (PICKUP, 2004). Relatou-se que pacientes com diagnóstico da doença apresentaram valores significativamente altos de proteínas relacionadas à fase aguda da inflamação, além de agentes pró-inflamatórios, quando comparados com pacientes sadios (TEMELKOVA-KUKTSCHIEV *et al*, 2002). Zozulinsk *et al* (2006) citam um estudo do *Diabetes Control and Complications Trial* (DCCT) em diabetes tipo 1 e do *United Kingdom Prospective Study* (UKPDS) em diabetes tipo 2, os quais mostram claramente, que o intensivo controle da hiperglicemia pode reduzir a emergência e progressão de retinopatias, neuropatias e nefropatias.

Chiarelli *et al* (1999) demonstraram que produtos derivados de glicose a partir de alterações nos padrões de glicosilação, tem um importante envolvimento na resposta inflamatória. Além de aumentar a adesão de leucócitos, geram estresse oxidativo e induzem a expressão de genes inflamatórios, incluindo mRNAs para interleucina-6 (IL-6) e TNF- α ,

podendo iniciar aterosclerose em diabéticos. Esses compostos derivados de glicose também desencadeiam uma intensificação nos efeitos da hiperglicemia no sangue.

A alteração no padrão de glicosilação de proteínas relacionadas à inflamação foi também avaliada por Higai *et al* (2003). Neste trabalho os autores estudaram comparativamente, a glicosilação da glicoproteína α_1 -ácida (AGP), cujos níveis séricos tornam-se bastante elevados em pacientes com inflamação e câncer, em grupos de pacientes normais acometidos por inflamação aguda e em pacientes diabéticos. A alteração da glicana conjugada à AGP sofreu monitoramento através de interações de afinidade com lectinas (proteínas que reconhecem e se ligam reversivelmente a carboidratos e glicoconjugados) visualizada por ensaios imunológicos através do reconhecimento específico da proteína ligante. Os resultados obtidos demonstraram que pacientes diabéticos não exibem alterações no padrão de glicosilação em AGP considerados como específicos à doença. Os autores afirmam que, por ser uma patologia sistêmica, as alterações nas glicanas da glicoproteína em diabéticos são similares aos indivíduos com inflamação aguda.

TABELA 3.1-Valores de glicose plasmática (mg/dL) nos quadros normal e diabético

Categoria	Jejum	TOTG 75g-2h	Casual
Normal	<110	<140	
Glucose plasmática de jejum alterada	≥ 110 e <126		
Tolerância à glicose diminuída	<126	≥ 140 e <200	
<i>Diabetes mellitus</i>	>126	>200	>200 com sintomas

Fonte: PEREIRA *et al*, 2006

Vários marcadores da fase aguda da inflamação têm sido relatados por estarem aumentados em diabetes tipo 1. Mais ainda, mostrou-se que a interleucina-6, uma citocina pró-inflamatória que se mostra elevada em diabetes tipo 2, tem seus níveis aumentados em virtude de eventos de hiperglicemia. A proteína C-reativa é um marcador da fase aguda da inflamação que está associado com inflamação sistêmica sendo relatados aumentos de sua concentração em indivíduos com doença cardiovascular, e valores elevados foram relatados para adultos jovens com diabetes tipo 1 (SNELL-BERGEON *et al*, 2010).

A hiperglicemia pode levar à produção de proteínas pró-inflamatórias como as citocinas, na medida em que provoca danos às células endoteliais. A injúria endotelial causada pelos elevados níveis de açúcar sanguíneo aumenta a formação de radicais livres, provocando uma queda na produção de óxido nítrico, associada a uma disfunção endotelial detectada em pacientes diabéticos (NISHIKAWA *et al*, 2006).

A disfunção endotelial também está relacionada com hipercolesterolemia e obesidade abdominal. Considera-se o excesso de tecido adiposo fator de risco para o desenvolvimento de resistência à insulina (WU; WU, 2006). Sob esse aspecto, tem-se observado um aumento do quadro de obesidade em diabéticos tipo 1 e tipo 2, em especial em adultos jovens, em diversas nações (SNELL-BERGON *et al*, 2010; LIESE *et al*, 2010).

O tecido adiposo tem uma representatividade significativa no processo inflamatório. Em indivíduos obesos, esse tipo de tecido contém macrófagos ativados que juntamente com os adipócitos secretam mediadores de inflamação como o próprio TNF- α , que podem contribuir para a resistência à insulina (GOLDBERG, 2009).

A obesidade está associada a uma resposta inflamatória crônica caracterizada pela produção anormal de adipocinas e ativação de alguns sinalizadores pró-inflamatórios que resultam na indução de vários marcadores de inflamação no diabetes tipo 2 (BASTARD *et al*, 2002; SARTIPY; LOSKUTOFF, 2003). Na última década fortaleceu-se a evidência de que a obesidade e o concomitante desenvolvimento de inflamação são os maiores responsáveis pela resistência à insulina (BASTARD *et al*, 2006). Estudos em humanos obesos e com resistência à insulina revelam uma associação clara entre a ativação crônica de citocinas pró-inflamatórias e a diminuição da sensibilidade a este hormônio. Por exemplo, níveis elevados do fator de necrose tumoral (TNF- α), interleucina-6 e interleucina-8 (IL-8) têm sido todos eles, relatados em vários estados de diabetes e resistência à insulina (STRACZKOWSKI *et al*, 2002; SARTIPY *et al*, 2003; LUCA; OLEFSKY, 2008; SHOELSON *et al*, 2007; KING, 2008).

O processo inflamatório pode, ainda, estar intimamente relacionado aos eventos de diminuição da sensibilidade à insulina em diabéticos (LUCA; OLEFSKY, 2008). A interação direta de sinalização de insulina com vias inflamatórias pode ser observada na **Figura 3.1**. A via PI3K/AKT é referente ao processo de sinalização da insulina sobre o metabolismo de nutrientes, inclusive captação intracelular de glucose. A via Ras/MAPK mediada pela ação do hormônio tem relação com a expressão de genes, mas também, interage com a via PI3/AKT para controlar o crescimento e a diferenciação celular. A ativação do receptor de insulina leva à fosforilação no resíduo de tirosina de IRS1 iniciando desse modo, a

transdução do sinal. Estimulação das vias inflamatórias mediadas pelas proteínas NF κ B e AP-1 resultam da ativação de serinas quinases como I κ kb e Jnk1, as quais reduzem a habilidade de IRS1. Reguladores negativos adicionais das proteínas IRS-1 incluem as proteínas Socs e o óxido nítrico (NO) que são induzidas na inflamação, e promovem a degradação de IRS (LUCA; OLEFSKY, 2008).

1.4. Formas de Tratamento do Diabetes Mellitus

A insulina é considerada essencial para o tratamento do diabetes tipo 1. Este requer injeções diárias do hormônio, com o intuito de prevenir os distúrbios metabólicos causadores de cetoacidose e morte. A insulina, por ser degradada no trato digestório, é administrada de forma parenteral, mais comumente por via subcutânea, embora possa também ser administrada de maneira intravenosa, intranasal (HINCHCLIFFE; ILLUM, 1999), ou até mesmo intramuscular (RANG *et al*, 2004).

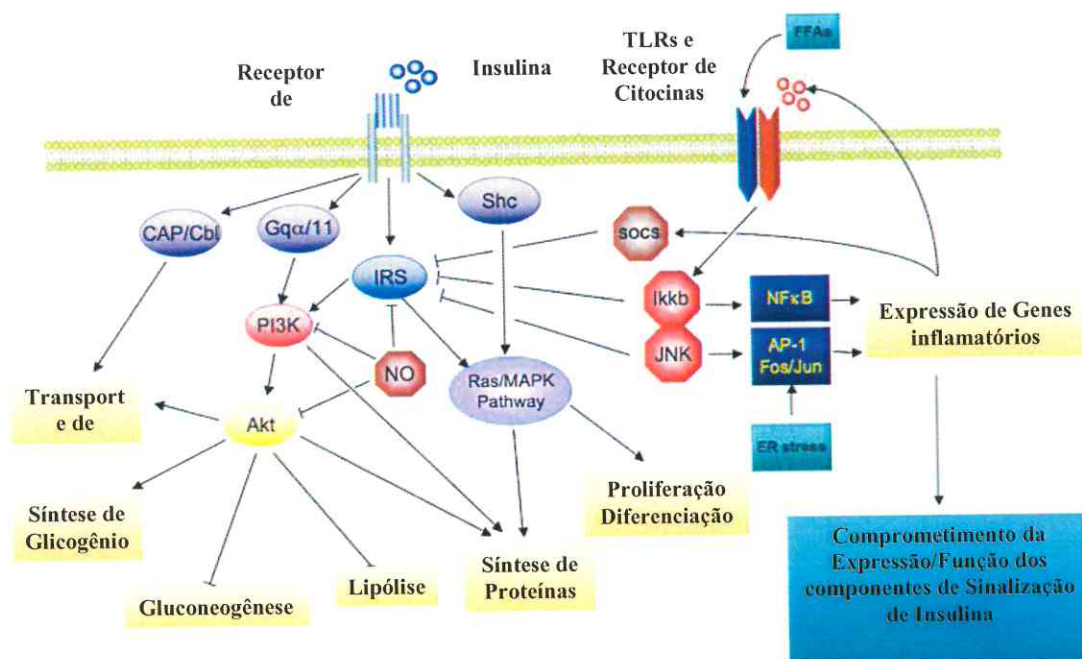


Fig. 3.1. Mecanismos de sinalização da insulina e relação com vias de inflamação (Fonte: LUCA; OLEFSKY, 2008).

No diabetes tipo 2 ocorre uma diminuição da sensibilidade dos tecidos-alvo ao efeito da insulina (OLIVEIRA; MILECH, 2004). Esse tipo da doença ocorre mais frequentemente em pessoas com idade a partir de 40 anos e está relacionada à obesidade. Diversos estudos têm sugerido mecanismos de controle do índice glicêmico como meio de reduzir a incidência e severidade das complicações crônicas (SHINKAY, 1999). De forma mais simplificada, dietas e exercícios correspondem ao ponto de partida para o tratamento (IGNARRO *et al*, 2007; GANNON e NUTTALL, 2006). Contudo, os medicamentos hipoglicemiantes tornam-se comumente necessários e a utilização de insulina também é importante, em alguns casos, além de mudanças nos padrões de alimentação e atividade física (KOSKI, 2006).

As quatro principais classes de agentes hipoglicemiantes orais são as sulfoniluréias, as biguanidas, inibidores de α -glucosidase e as tiazolidinodionas, todas avaliadas quanto a seus mecanismos de ação, efeitos sobre lipídeos, interações com fármacos, doses e custos (KOSKI, 2006).

As sulfoniluréias reduzem o nível de glicose plasmática primariamente por aumentarem a liberação de insulina a partir do estímulo às células β do pâncreas. Assim, elevam os níveis plasmáticos de insulina, causando hipoglicemia. Entretanto, não exibem efeito significativo sobre os lipídios (KOSKI, 2006).

A metformina é o único fármaco da classe das biguanidas atualmente disponível. Seu mecanismo primário consiste em uma diminuição dos níveis de glicose, a partir da diminuição da gliconeogênese no fígado, além de aumentar a sensibilidade à insulina em tecidos periféricos e diminuir a absorção de glicose no intestino. A metformina também demonstrou ter efeito sobre os lipídios, diminuindo os níveis de LDL e triglicérides sem, contudo, afetar significativamente os níveis de HDL (KOSKI, 2006).

Os inibidores de α -glucosidase são drogas que interferem na absorção dos carboidratos pelas células intestinais. Seu efeito consiste na redução, primeiramente, dos níveis de glicose pós-prandial no plasma, atuando como competidores e inibidores reversíveis de α -glucosidase e α -amilase impedindo, assim, o fornecimento de glicose, a partir da quebra enzimática de polissacarídeos complexos (KOSKI, 2006).

As tiazolidinodionas aumentam a sensibilidade dos tecidos muscular e adiposo à insulina. Também diminuem a produção de glicose hepática e são potentes e seletivos agonistas dos receptores γ nucleares, que regulam a transcrição de genes envolvidos no controle da produção, transporte e utilização de glicose (KOSKI, 2006).

Outros agentes hipoglicemiantes orais em desenvolvimento para o tratamento de paciente diabéticos tipo 2 incluem drogas inibidoras de certas enzimas responsáveis pela ativação de glucoquinases, promovendo uma redução da glucose pós-prandial (KOSKI, 2006).

Contudo, dos medicamentos correntemente usados na prática clínica, nenhum é capaz de restaurar com sucesso os níveis normais de glicemia em muitos pacientes. Ou, por outro lado, tornam-se falhos no decorrer de algum tempo. Mais ainda, o uso contínuo de drogas sintéticas antidiabéticas pode causar efeitos colaterais e toxicidade (ZHANG *et al.*, 2006). Assim, a busca por drogas antidiabéticas naturais e não-tóxicas faz-se necessária para o tratamento da doença.

1.5. Modelos Animais em Diabetes Mellitus

Modelos animais são, extensivamente, empregados na pesquisa do *diabetes mellitus*. Na década de 1880, a utilização de cães para observar-se a absorção de gordura pelo intestino culminou em uma das mais importantes descobertas para o tratamento e entendimento do diabetes. A remoção do pâncreas do animal ocasionou o desenvolvimento de poliúria e polidipsia e o conseqüente diagnóstico do diabetes. Tais estudos utilizando um cão pancreatectomizado confirmaram o envolvimento central do pâncreas na homeostase da glicemia e possibilitaram a descoberta e purificação da insulina em 1920 (BLISS, 2000 citado por REES; ALCOLADO, 2005).

Uma das maneiras mais diretas de estudar a hiperglicemia em animais é através da remoção parcial ou total do pâncreas. Em geral, ratos e camundongos pancreatectomizados são mais comumente utilizados. No entanto, existe uma maior crítica ao uso desses animais, uma vez que podem não refletir adequadamente a situação em humanos, o que justifica o uso de outros animais como cães, gatos, porcos e primatas (REES; ALCOLADO, 2005). Por outro lado, as influências genéticas em roedores não representam um fator agravante, a exemplo do que ocorre em humanos, nos quais se torna difícil ou até mesmo impossível de se controlar, e são amenizadas pelos estudos nas muitas gerações surgidas em um curto intervalo de tempo (FARIAS, 1997).

Outros métodos que não empregam procedimentos cirúrgicos para a remoção do pâncreas também são amplamente utilizados. Esses modelos incluem a administração de

toxinas como estreptozotocina e aloxano, além de outros agentes conhecidos por produzir diabetes em modelos experimentais (REES; ALCOLADO, 2005).

Ambos, estreptozotocina e o aloxano, são toxinas capazes de destruir as células β do pâncreas, causando hiperglicemia. A administração destas em ratos, coelhos e camundongos é amplamente reconhecida como causadora de um estado similar ao observado nos pacientes diabéticos tipos 1 e 2, os quais apresentam, além de hiperglicemia, polidipsia, polifagia, poliúria, bem como baixos níveis de insulina, sendo capazes de sobreviver por meses (RERUP; TARDING, 1969; LUNDQUIST; RERUP, 1969).

A estreptozotocina é um glicosídeo nitroso isolado de *Streptomyces achromogenes*, com amplo espectro antibiótico e com atividade antineoplásica. É um poderoso agente capaz de interferir na função da proteína de transporte de glucose na membrana celular, na glucoquinase, e na indução de múltiplas quebras no DNA (REES; ALCOLADO, 2005). A estreptozotocina estimula a produção de radicais livres que levam à destruição das células β (NEGRI, 2005). Uma única dose da toxina pode produzir diabetes em roedores, possivelmente como resultado de efeitos tóxicos diretos. Desse modo, utiliza-se a estreptozotocina em pequenas doses durante intervalos de 5 dias, o que induz o início da destruição imune das células β , assim como em humanos com diabetes tipo 1 (REES; ALCOLADO, 2005).

O aloxano é uma toxina derivada da pirimidina, com alta seletividade, podendo lesionar as células β pancreáticas em diversos sítios, incluindo a glucoquinase e o DNA, através da liberação de radicais livres, assim como a estreptozotocina (DUNN; MCLETCHIE, 1943). Uma desvantagem em relação ao uso de aloxano em modelos experimentais de diabetes é sua instabilidade química, metabolismo rápido e fatores como idade e dieta, que dificultam estabelecer uma relação clara entre as doses de aloxano e sua concentração efetiva no pâncreas (NEGRI, 2005).

Outro modelo bastante usado na experimentação do diabetes é o de glicosúria. A florizina é um flavonóide de ocorrência natural capaz de se ligar aos transportadores Na/glucose no túbulo renal proximal, quando injetada por via subcutânea, inibindo a reabsorção de glucose (REES; ALCOLADO, 2005).

1.6. Plantas com Atividade Hipoglicemiante

Dentre as diversas atividades e propriedades biológicas detectadas em componentes de plantas, àquelas de efeito hipoglicemiante são objeto de amplas discussões e análises nos últimos anos. A pressão exercida pelo diabetes, considerado uma entre as dez maiores causas de morte nos países ocidentais (NEGRI, 2005), motivou diversos pesquisadores e organizações de caráter público a investir na procura por novas drogas, mais efetivas, capazes de amenizar os efeitos da doença.

Encontra-se na literatura científica um grande número de compostos originados de plantas em relação às suas atividades hipoglicêmicas. Dentre esses compostos são citados flavonóides, xantonas, triterpenos, alcalóides, glicosídeos, derivados de ácido aminobutírico, guanidinas, polissacarídeos e peptídeos. Outros com atividade hipocolesterolêmica incluem β -carotenos, licopenos, β -sitosterol, sitostanol, saponinas, proteínas, fibras alimentares, propionatos, para citar alguns (WANG; NG, 1999).

A espécie *Agrimonia eupatoria*, uma planta típica da Europa, e utilizada tradicionalmente como antidiabética, teve seus efeitos redutores da hiperglicemia demonstrados por Gray: Flatt (1998), que evidenciaram também a sua capacidade de estimular a secreção de insulina e aumentar a absorção de glucose no músculo.

Viana *et al* (2004) demonstraram a atividade hipoglicemiante de *Cissus sicyoides*, uma planta medicinal popularmente usada no tratamento de diversas doenças. Extratos aquosos das folhas reduziram de forma significativa, os níveis de glucose em ratos diabéticos.

Extratos aquosos e metanólicos de *Bryophyllum pinnatum* e *Hypoxis hemerocallidea* causaram significativa hipoglicemia em ratos e camundongos normais e diabéticos (OJEWOLE, 2006). Extratos metanólicos de *Barleria lupulina* administrados por via oral, exibiram significativa ação hipoglicêmica em ratos (MURUGESAN *et al*, 2005). Efeitos similares foram observados em *Cyperus rotundus* (RAUT; GAIKWAD, 2006), *Ibervillea sonorae* (ALARCON-AGUILAR *et al*, 2005), *Annona squamosa* (GUPTA *et al*, 2005), *Thea sinensis* (MIURA *et al*, 2005), *Psidium guajava* (OH *et al*, 2005), *Murraya koenigii* (KESARI *et al*, 2005) e *Vernonia colorata* (SY *et al*, 2005).

Recentemente, um estudo com três espécies de plantas medicinais (*Murraya koenigii*, *Psidium guajava*, e *Catharanthus roseus*) demonstrou a propriedade antidiabética de extratos das folhas em ratos com diabetes induzido por estreptozotocina. Além de alterar positivamente as manifestações do quadro diabético, os efeitos foram semelhantes ao da droga padrão glibenclamida (PRASAD *et al*, 2009). Wadkar *et al*, (2008) ressaltam que o

isolamento e a identificação dos constituintes ativos de plantas com ação antidiabética são importantes para elucidar o mecanismo da atividade observada.

Muitas espécies de plantas são usadas etnofarmacologicamente e/ou experimentalmente para o tratamento dos sintomas de *diabetes mellitus*. O estudo com essas diferentes espécies de plantas medicinais pode favorecer o desenvolvimento de novas drogas de ação terapêutica contra a doença (BNOUHAM *et al*, 2006).

Na medicina chinesa 82 plantas medicinais têm seu uso na terapia de *diabetes mellitus* (LI *et al*, 2004). Grover *et al* (2002) analisaram um total de 45 espécies de plantas tidas como eficazes no tratamento de diabetes na medicina tradicional da Índia, todas exibindo graus distintos de atividade hipoglicêmica, com destaque para 24 espécies, as quais se mostraram bastante efetivas.

No México, Hernandez-Galicia *et al* (2002) realizaram um estudo sobre plantas da região empregadas no tratamento de *diabetes mellitus*. Segundo esses autores, existem cerca de 269 diferentes espécies de plantas usadas empiricamente no controle da hiperglicemia, sendo Asteraceae e Leguminosae as duas famílias com maior representatividade de espécies, seguidas de Cactaceae, Euphorbiaceae, Rubiaceae, Solonaceae, Cucurbitaceae e Rosaceae.

Alguns trabalhos relatam inclusive, qual, dentre os diversos compostos existentes, é o princípio ativo responsável pela atividade hipoglicemiante detectada. Um diterpeno denominado trans-dehidrocrotonina foi isolado da planta *Croton cajucara* por Silva *et al* (2001). Os autores evidenciaram experimentalmente, a capacidade do composto de reduzir os níveis de glucose sanguínea, bem como os de triglicérides em ratos diabéticos tratados com streptozotocina (STZ), com decréscimos de 56%-61% nos índices glicêmicos num período de 24 a 72 h, enquanto os níveis de triglicérides foram reduzidos em 37%.

Os estudos em plantas com atividades potenciais para o tratamento de distúrbios metabólicos característicos do *diabetes mellitus* abrangem mais de 725 gêneros em 183 famílias (NEGRI, 2005). São pesquisas que demonstram a variedade de componentes de plantas terapêuticamente importantes, como possíveis agentes hipoglicemiantes.

Trabalhos mais recentes relatando a descoberta de novas fontes de biomoléculas com ação terapêutica sobre os sintomas do diabetes mellitus evidenciam a importância e o desenvolvimento da pesquisa em relação a esse aspecto (AHMED *et al*, 2010; AMRANI *et al*, 2009; MOMOH *et al*, 2011; EDEM, 2009; RADHIKA *et al*, 2010)

Outros estudos mostram os efeitos hipoglicêmicos de substâncias de natureza glicídica. Polissacarídeos extraídos das sementes de *Artemisia sphaerocephala* diminuíram os níveis de glucose e triglicérides de ratos diabéticos (ZHANG *et al*, 2006). Polissacarídeos

hidrossolúveis e substâncias pécicas são relatados por sua ação antidiabética em ratos (LI *et al*, 2009; HWANG; YUN, 2010; ZOU *et al*, 2010).

O mecanismo de ação pelo qual os componentes derivados de plantas baixam os níveis de glucose no sangue pode ser representado por alguns fatores como: aumento na liberação de insulina pela estimulação das células β no pâncreas; resistência aos hormônios que aumentam os níveis de glucose; aumento do número e da sensibilidade do sítio receptor de insulina; diminuição da perda de glicogênio; aumento do uso de glucose nos tecidos; eliminação de radicais livres e correção de desordens metabólicas em lipídios e proteínas (NEGRI, 2005).

Outra maneira pela qual os produtos derivados de plantas podem atuar, diminuindo os níveis de glucose e outros parâmetros bioquímicos no sangue, como o próprio colesterol (FUKUSHIMA *et al*, 2001; KIM; SHIN, 1998), é através da redução da absorção desses elementos durante o processo de digestão. É o caso de alguns carboidratos complexos, indigeríveis pelo trato digestório humano, capazes de formar associações com outras moléculas orgânicas, às quais se ligam, dificultando ou mesmo impedindo sua absorção, proporcionando ocasionalmente, efeitos fisiológicos benéficos no organismo (SLAVIN, 2003).

2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito de PFCM sobre os parâmetros bioquímicos do sangue (glucose, triglicérides, colesterol total e das transaminases AST e ALT) em ratos diabéticos;
- Avaliar o efeito de PFCM no edema de pata induzido por carragenina em ratos, e no teste da formalina em camundongos para investigar possível ação anti-inflamatória;
- Avaliar o efeito de PFCM sobre a secreção de Mieloperoxidase (MPO) por neutrófilos humanos *in vitro*;
- Avaliar o efeito de PFCM sobre o processo inflamatório através da detecção por imunohistoquímica dos mediadores TNF-alfa e iNOS em tecidos submetidos à indução de inflamação.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. *Reagentes*

Aloxano monohidratado e carragenina foram obtidos da Sigma Aldrich, St Louis, (U.S.A). Glibenclamida, da Aventis Brasileiro Ltda. (Goiânia, GO), e metformina, da Merck Sharp & Dohme (Campinas, SP). Indometacina foi adquirida da Novafarma (Brasil). Os Kits enzimáticos para determinação dos parâmetros bioquímicos do sangue foram obtidos da Labtest Diagnóstica S.A (Lagoa Santa, MG). Os demais reagentes foram de grau analítico, obtidos comercialmente.

3.2. *Animais*

Foram utilizados ratos machos (180-250 g) albinos da linhagem Wistar, e camundongos Swiss fêmeas (20-30 g) provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará, sendo mantidos sob condições padrão de desenvolvimento (22 ± 1 °C, umidade $60 \pm 5\%$, ciclo de luz de 12 h/12 h), com livre acesso à dieta comercial e água *ad libitum*.

3.3. *Testes bioquímicos do sangue e atividade antidiabética em ratos*

O diabetes foi induzido por administração intravenosa de aloxano (40 mg/kg) após anestesia com éter etílico. Quarenta e oito horas após a aplicação de aloxano os animais foram pesados e submetidos à coleta de 1 mL de sangue pelo plexo orbital. O soro foi separado por centrifugação a 3.500 rpm por 10 min e imediatamente usado para determinação dos parâmetros bioquímicos (glicemia, colesterol total, triglicérides e transaminases hepáticas).

Apenas animais apresentando valores de glicemia iguais ou superiores a 200 mg/dL foram utilizados para o tratamento através da administração oral diária com a solução de polissacarídeos da casca do maracujá (PFCM, doses de 0,5 a 100 mg/kg) ou glibenclamida (Gli 5 mg/kg) ou metformina (Met 50 mg/kg) ou volumes equivalentes de água destilada no grupo controle diabético, durante 5 dias. Cada grupo (6 a 13 ratos) teve o tratamento seguido nas mesmas condições. Uma hora após a última administração, os animais foram novamente pesados e o sangue coletado para novos testes bioquímicos.

Grupos de animais foram utilizados em um teste de modo a avaliar uma possível propriedade preventiva de PFCM ao quadro diabético. Foi empregado um grupo controle (água destilada); um grupo submetido ao teste preventivo, que consistiu no Pré-tratamento com o polissacarídeo (50 mg/kg, v.o.) durante 5 dias antes da injeção intravenosa de aloxano (40 mg/kg); e um grupo submetido ao tratamento convencional com PFCM (sem tratamento prévio). Quarenta e oito horas após a indução do diabetes, os animais tiveram dosados os valores plasmáticos de glucose, triglicérides, colesterol total, ALT e AST, conforme citado anteriormente. A partir desse período, os grupos referentes ao tratamento com PFCM foram submetidos à administração diária da amostra (50 mg/kg, v.o.) durante cinco dias. Ao final deste período, procedeu-se à uma nova determinação dos parâmetros bioquímicos supracitados. A análise estatística consistiu na comparação entre os grupos do teste preventivo (PFCM-Prev) com os grupos de tratamento convencional (PFCM-N) nas mesmas doses (50 mg/kg) antes e ao final do tratamento.

Valores de referência para ratos quanto aos parâmetros analisados estão mostrados na **Tabela 3.2.**

Tabela 3.2-Valores de referência dos parâmetros bioquímicos sanguíneos determinados em ratos normais

Parâmetro	Valor de referência (mg/dL)
Glucose	63,3 – 86,4
Colesterol total	51,1 – 71,5
Triglicérides	42,9 – 64,4
AST	72,6 – 105,8
ALT	19,7 – 31,7

Fonte: Viana *et al*, (2004).

3.3.1. Determinação dos níveis de glucose

A concentração de glucose plasmática foi determinada através de ensaios enzimáticos conforme orientações do fabricante (Labtest Brasil). Sob ação da enzima glucose oxidase, a reação com o substrato da amostra produz peróxido de hidrogênio em presença de oxigênio. Esse radical, na presença de fenol e de 4-aminoantipirina, sofre a ação da peroxidase com a liberação de um composto de cor róseo-avermelhada (quinonimina) com máximo de absorção a 505 nm.

No ensaio, 1 mL do reagente enzimático foi adicionado a 0,01 mL do soro. Após homogeneização, a mistura foi colocada em banho-maria a 37 °C por 15 min. Em seguida, a amostra foi lida em espectrofotômetro a 505 nm.

3.3.2. Determinação dos níveis de triglicérides

A determinação das concentrações de triglicérides (TG) seguiu as mesmas orientações citadas para glucose e colesterol. Neste caso, foi empregada a enzima lipase lipoprotéica para hidrólise dos triglicérides na amostra produzindo glicerol livre, o qual é fosforilado pela glicerol quinase e o produto da reação sofrendo a ação da glicerol-P-oxidase que, na presença de oxigênio produz peróxido de hidrogênio que na presença de fenol e de 4-aminoantipirina, sofre a ação da peroxidase com a liberação de um composto de cor róseo-avermelhada (quinonimina) com máximo de absorção a 500 nm.

No ensaio, 1 mL do reagente de trabalho foi adicionado a 0,01 mL do soro. Após homogeneização, a mistura foi colocada em banho-maria a 37 °C por 10 min. Em seguida, a amostra foi lida em espectrofotômetro a 500 nm.

3.3.3. Determinação dos níveis de colesterol total

As concentrações de colesterol total (CT) plasmático foram determinadas através de ensaios enzimáticos conforme orientações do fabricante (Labtest Brasil).

Ésteres de colesterol da amostra são hidrolisados pela colesterol esterase com a liberação do colesterol livre, o qual na presença da colesterol oxidase e oxigênio produz peróxido de hidrogênio que na presença de fenol e de 4-aminoantipirina, sofre a ação da peroxidase com a liberação de um composto de cor róseo-avermelhada (quinonimina) com máximo de absorção a 500 nm.

No ensaio, 1 mL do reagente de trabalho foi adicionado a 0,01 mL do soro. Após homogeneização, a mistura foi colocada em banho-maria a 37 °C por 10 min. Em seguida, a amostra foi lida em espectrofotômetro a 500 nm.

3.3.4. Determinação dos valores das transaminases (ALT / AST)

As dosagens das transaminases glutâmica pirúvica ou alanina transaminase (ALT) e glutâmica oxalacética ou aspartato transaminase (AST) nas amostras de sangue foram determinadas através de ensaios enzimáticos conforme orientações do fabricante (Labtest Brasil). Essas enzimas catalisam a transferência de grupamentos amina e alfa aminoácidos para alfa acetoácidos.

A AST é produzida pelo fígado e liberada no sangue quando em momentos de lesão hepática. Portanto, sua mensuração no sangue é útil para indicação de hepatotoxicidade. Essa enzima catalisa especificamente, a transferência do grupo amina da alanina para o cetogluturato formando glutamato e piruvato. A concentração deste é proporcional à atividade enzimática, e medida através da formação de suas hidrazonas, intensamente coradas em meio alcalino.

No ensaio, solução de 0,2M de L-alanina, 0,002 M alfa-cetogluturato, tampão fosfato 0,1 M a pH 7,0 foram utilizados como substrato e adicionados a ALT em banho-maria a 37 °C. Em seguida, foi adicionado 0,1 mL de soro homogeneizado e incubado a 37 °C por trinta minutos. Posteriormente, foram adicionados 0,5 mL do reagente de cor (solução de 2,4 dinitrofenilhidrazina 0,001 M), mantidos em repouso por 20 minutos a temperatura ambiente (25-30 °C). As absorvâncias foram lidas a 505 nm.

A mensuração de ALT, do mesmo modo que a AST, é útil na indicação de lesões hepáticas, além de ser liberada na corrente sanguínea quando há injúria em outros órgãos como cérebro e músculos. A ALT catalisa a transferência de grupos amina do aspartato para o cetogluturato, com a formação de glutamato e oxalacetato, o qual tem sua concentração proporcional à atividade enzimática, e medida através da formação de suas hidrazonas, intensamente coradas em meio alcalino.

No ensaio, solução de 0,2 M de L-aspartato, 0,002 M alfa-cetogluturato, tampão fosfato 0,1 M a pH 7,0 foram utilizados como substrato e adicionados a AST em banho-maria a 37 °C. Em seguida, adicionou-se 0,1 mL de soro homogeneizado e incubado a 37 °C por trinta minutos. Posteriormente, foram adicionados 0,5 mL do reagente de cor (solução de 2,4 dinitrofenilhidrazina 0,001 M), mantidos em repouso por 20 min a temperatura ambiente (25-30 °C). Em seguida, foram adicionados 5 mL de solução de hidróxido de sódio 0,4 M. As absorvâncias foram lidas a 505 nm.

3.4. Edema de pata induzido por carragenina em ratos

Devido a relação entre inflamação e diabetes, a avaliação da atividade anitinflamatória de PFCM foi conduzida através de um modelo experimental *in vivo*. O modelo de edema de pata induzido por carragenina (Cg) foi realizado segundo o método descrito por Winter *et al* (1962). As patas direitas traseiras dos animais tiveram seus volumes medidos (mL) por meio de pletismógrafo da Ugo Basile (Itália).

Os animais foram tratados por via oral (v.o) com PFCM (doses de 5 e 10 mg/kg) ou volumes de 10 mL/kg de água destilada nos grupos controle negativo, enquanto o grupo controle positivo foi tratado com 20 mg/Kg (v.o.) de indometacina. Sessenta minutos após administração, os animais receberam uma injeção intraplantar de 0,1 mL de uma solução de Cg a 1% p/v, como agente indutor de uma inflamação aguda. O volume das patas direitas foi medido antes da injeção do agente inflamatório (V_i) e nos períodos de 1, 2, 3 e 4 h após a injeção (V_F). O volume do edema (V_E) foi determinado para todos os grupos, pela diferença entre o volume final (V_F) e o volume inicial (V_i) das patas, nos períodos de tempo determinados.

3.5. Edema de pata induzido por formalina em camundongos

Esse teste foi realizado segundo o método descrito por Dubuisson e Dennis (1977) e modificado por Hunskaar *et al* (1985). Foram utilizados camundongos Swiss fêmeas, pesando entre 20 e 30 g, os quais foram submetidos a uma injeção subplantar de 40 μ L de formalina 1% (v/v), na pata traseira direita. O tempo gasto pelo animal lambendo a pata foi registrado durante dois períodos após a injeção de formalina: 0-5 minutos (fase inicial ou primeira fase) e de 20-25 min (fase tardia ou segunda fase). O teste foi realizado à temperatura de 25 °C na ausência de fatores estressantes, como sons, odores e alta luminosidade.

Os animais foram tratados por via intraperitoneal (i.p) ou por via oral (v.o) com PFCM (doses de 10, 25, 50 e 100 mg/kg) ou volumes de 10 mL/kg de água destilada nos grupos controle negativo, enquanto o grupo controle positivo foi tratado com morfina (5 mg/Kg, i.p.).

3.6. Histologia e análise imunohistoquímica para TNF-alfa e iNOS na pata com edema induzido por carragenina

Cortes histológicos de secções (10 μ m) da pata submetida à indução de inflamação por carragenina foram analisados pela técnica de coloração por hematoxilina e eosina (HE). Os animais foram tratados com água destilada, PFCM (10 mg/kg, v.o.) ou indometacina (10 mg/kg, v.o.). Uma hora após tratamento, foi injetada a solução de carragenina 1% na pata direita traseira. Três horas após, os animais foram sacrificados e as secções do edema foram imersas em formol 10% por 24h, seguida por desidratação em

solução de etanol 70% para impregnação com parafina e secção. Em seguida, as secções foram desparafinizadas, desidratadas em xilol e etanol, e imersas em tampão citrato 0,1M pH 6,0 sob aquecimento em microondas por 18 minutos para recuperação antigênica. Em seguida, os cortes foram mantidos em temperatura ambiente para resfriamento, lavados com solução de tampão fosfato (PBS), seguidos por 15 minutos de bloqueio à peroxidase endógena com solução de peróxido de hidrogênio a 3%. Para detecção do fator de necrose tumoral (TNF-alfa) e óxido sintase induzida (iNOS), as secções foram incubadas overnight a 4 °C com anticorpos primários de coelho (anti-TNF-alfa ou anti-iNOS) com diluições de 1:200 ou 1:400 em PBS com a presença de BSA. No dia seguinte, as secções foram lavadas com PBS e incubadas por 30 minutos com o anticorpo secundário de coelho ligado à biotina (anti-IgG) na diluição de 1:200 em PBS-BSA. Após lavagem em PBS, as secções foram incubadas por 30 minutos com estreptavidina complexada à peroxidase (ABC Vectastain® complex, Vector Laboratórios, Burlingame, CA, USA). Após lavagem com PBS as secções foram coradas com o cromóforo 3, 3' diaminobenzidina peróxido, contra-coradas com hematoxilina, desidratadas e montadas em lâminas de microscopia para análise.

3.7. Efeito de PFCM sobre a secreção de mieloperoxidase (MPO) por neutrófilos humanos in vitro

Seguindo o método de Lucisano e Mantovani (1984), $2,5 \times 10^6$ leucócitos humanos foram suspensos em solução de Hanks equilibrada com cálcio e magnésio. As preparações continham predominantemente, neutrófilos ($85,0 \pm 2,8\%$), e a viabilidade celular, determinada pelo teste do azul de tripan, foi de $97,7 \pm 0,94\%$. As células foram incubadas com PFCM (0.1 a 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) por 15 minutos a 37 °C e, então, estimulada pela adição de acetato forbol miristato (PMA, 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) por 15 minutos a 37 °C. A suspensão foi centrifugada por 10 minutos a $2.000 \times g$ a 4 °C. Aliquotas de 50 μL do sobrenadante foram adicionadas à solução salina tamponada (100 μL), tampão fosfato (50 μL , pH 7.0) e H_2O_2 (0.012 %). Após 5 minutos a 37 °C, 3,3', 5,5'-tetrametilbenzidina (TMB, 1.5 mM, 20 μL) foi adicionado e a reação foi parada com 30 μL de acetato de sódio (1.5 M, pH 3.0). A absorbância foi determinada a 620 nm.

3.8. Análise estatística

As análises estatísticas empregadas neste trabalho foram realizadas em programa GraphPad PRISM 5.04 for Windows. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM) utilizando ANOVA (Student-Newman-Keuls e Dunett's como *post hoc test*) para comparações entre grupos distintos e teste *t* pareado para comparação com o mesmo grupo antes e após tratamentos. A significância foi considerada quando a possibilidade de ocorrência da hipótese nula foi igual ou inferior a 5% ($p \leq 0,05$).

4. RESULTADOS

4.1. Efeitos de PFCM nos parâmetros bioquímicos do sangue (glucose, triglicérides, colesterol total, ALT e AST) em ratos diabéticos.

Amostras do polissacarídeo de *P. edulis* foram testadas para avaliação de seus efeitos sobre os níveis de glucose, colesterol, triglicérides e das transaminases hepáticas aspartato transaminase (AST) e alanina transaminase (ALT) em ratos diabéticos. PFCM foi administrado nas doses de 0,5 a 100 mg/kg (v.o.).

Quarenta e oito horas após a injeção de aloxano e ao final dos cinco dias de tratamento nenhuma alteração nos níveis de glucose plasmática foi observada no grupo controle diabético tratado com água destilada ($351,3 \pm 25,17$ e $375,8 \pm 22,3$ mg/dL, respectivamente). Exceto nos animais tratados com a dose de 0,5 mg/kg, os grupos diabéticos administrados com 2, 10 e 25 mg/kg de PFCM durante cinco dias exibiram uma significativa redução nos níveis séricos de glucose (59, 46 e 65%, respectivamente; D = pós-tratamento) quando comparado ao mesmo grupo antes do tratamento (A) iniciado 48 h após a administração de aloxano (**FIGURA 3.2**). Doses mais elevadas foram empregadas de modo a avaliar a possível relação dose resposta. Foram observadas reduções de 50 e 59% para as doses de 50 e 100 mg/kg, respectivamente. Contudo, nenhuma diferença significativa fora evidenciada entre todas as doses empregadas quando comparados os valores obtidos em cada grupo antes e ao final do quinto dia de administração. Glibenclamida (5 mg/kg) e metformina (50 mg/kg), usadas como drogas de referência, reduziram em 79 e 72% os níveis glicêmicos, respectivamente (**FIGURA 3.2**).

Enquanto nenhuma modificação nos níveis de triglicérides plasmáticos foi observada no grupo diabético não tratado (A = $252,9 \pm 44,3$ e D = $225,8 \pm 17,4$), alterações significativas foram evidenciadas nos grupos tratados com PFCM em todas as doses avaliadas com reduções que variaram de 32 a 46% (0,5 a 25 mg/kg). As doses de 50 e 100 mg/kg de PFCM reduziram significativamente a concentração de triglicérides em 65 e 74%, respectivamente. Ambas as drogas de referência (Gli 5 e Met 50 mg/kg) reduziram os níveis de triglicérides, respectivamente, em 55 e 51% (**FIGURA 3.3**).

Os dados relativos aos valores de colesterol total nos animais diabéticos estão representados na **Figura 3.4**. PFCM não alterou significativamente os níveis plasmáticos nas doses de 0,5, 2, 10 e 25 mg/kg (A = $76,22 \pm 2,8$ e D = $77,93 \pm 5,26$; A = $101,9 \pm 7,1$ e D = $73,67 \pm 13,15$; A = $91,05 \pm 7,7$ e D = $84,6 \pm 6,7$; A = $84,28 \pm 8,57$ e D = $89,65 \pm 8,67$, respectivamente) quando comparado o mesmo grupo antes e após o tratamento. Entretanto,

houve redução nos valores dos grupos diabéticos tratados com as duas maiores doses (50 e 100 mg/kg) com reduções de 25 e 43%, respectivamente. Reduções significativas foram também observadas nos grupos tratados com glibenclamida (44%), mas não com a metformina ($A = 70,57 \pm 11,53$ e $D = 52,34 \pm 3,52$). Não houve alterações significativas nos animais do grupo controle, tratados com água destilada ($A = 78,84 \pm 3,9$ e $D = 73 \pm 2,8$).

Quanto aos níveis das transaminases, exceto para reduções nos níveis de ALT nos grupos tratados com PFCM 10 e 25 mg/kg (53 e 34%, respectivamente), nenhum outro efeito foi demonstrado (**FIGURA 3.5**). Reduções de 21 e 26% foram observadas para os níveis de AST nas mesmas doses. Os níveis de ALT e AST não foram alterados pela administração de PFCM com as doses mais altas (50 mg/kg, $A = 55,67 \pm 3,77$ e $D = 67,66 \pm 6,07$; 100 mg/kg, $A = 66 \pm 12,22$ e $D = 53 \pm 2,9$). Glibenclamida (5 mg/kg) e Metformina (50 mg/kg) diminuíram significativamente os níveis de ALT (45 e 39%, respectivamente), sem, contudo, reduzir os valores de AST (**FIGURA 3.6**).

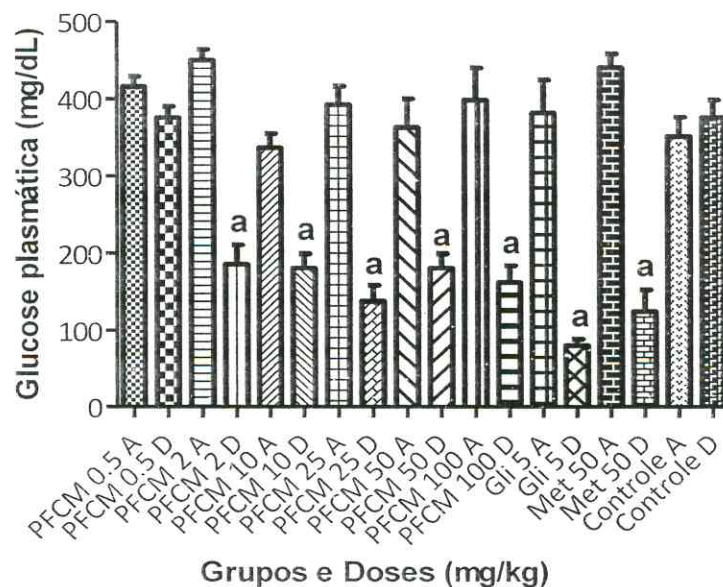


Fig. 3.2. Efeitos da fração polissacarídica (PFCM 0,5, 2, 10, 25, 50 e 100 mg/kg, v.o. administrada diariamente por 5 dias) de *Passiflora edulis* nos níveis de glucose sanguínea em ratos com diabetes induzido por aloxano. Valores são representados por média \pm EPM de 6 a 13 animais por grupo. **a.** diferença significativa quando comparado com o mesmo grupo, 48 h após a injeção de aloxano (A = antes do tratamento) e cinco dias após tratamento (D = depois do tratamento) com PFCM, água destilada (controle diabético), glibenclamida (Gli 5 mg/kg, v.o.) ou metformina (Met 50 mg/kg, v.o.): valores de p variaram de 0,0001 a 0,0005. Teste *t* pareado foi usado para as comparações.

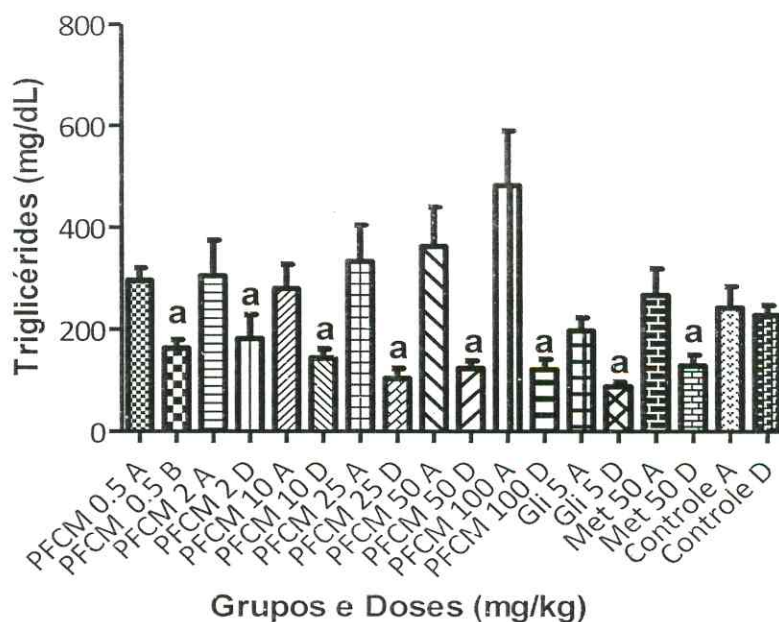


Fig. 3.3. Efeitos da fração polissacarídica (PFCM 0.5, 2, 10, 25, 50 e 100 mg/kg, v.o. administrada diariamente por 5 dias) de *Passiflora edulis* nos níveis de triglicérides em ratos com diabetes induzido por aloxano. Valores são representados por média \pm EPM de 6 a 13 animais por grupo. **a.** diferença significativa quando comparado com o mesmo grupo, 48 h após a injeção de aloxano (A = antes do tratamento) e cinco dias após tratamento (D = depois do tratamento) com PFCM, água destilada (controle diabético), glibenclamida (Gli 5 mg/kg, v.o.) ou metformina (Met 50 mg/kg, v.o.): valores de p variaram de 0,005 a 0,043. Teste *t* pareado foi usado para as comparações.

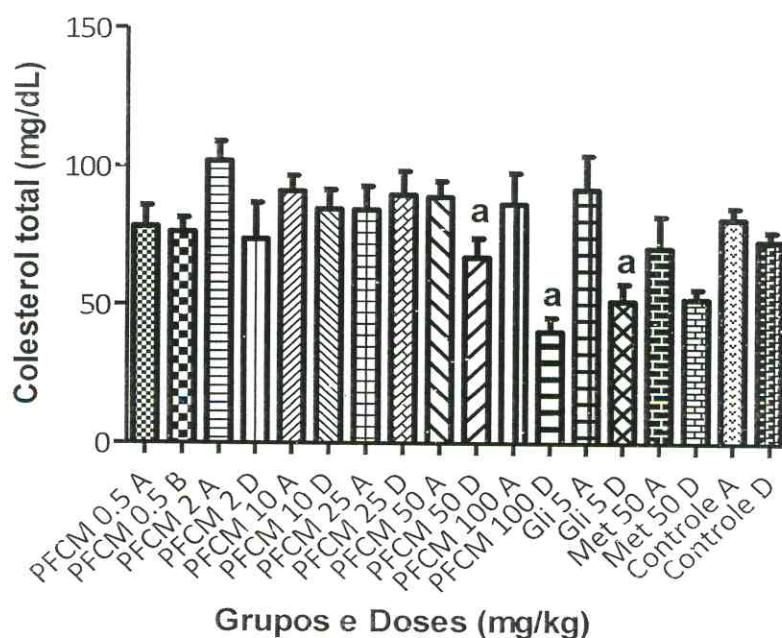


Fig. 3.4. Efeitos da fração polissacarídica (PFCM 0.5, 2, 10, 25, 50 e 100 mg/kg, v.o. administrado diariamente por 5 dias) de *Passiflora edulis* nos níveis de colesterol total em ratos com diabetes induzido por aloxano. Valores são representados por média \pm EPM de 6 a 13 animais por grupo. a. diferença significativa quando comparado com o mesmo grupo, 48 h após a injeção de aloxano (A = antes do tratamento) e cinco dias após tratamento (D = depois do tratamento) com PFCM, água destilada (controle diabético), glibenclamida (Gli 5 mg/kg, v.o.) ou metformina (Met 50 mg/kg, v.o.): valores de $p < 0,007$. Teste *t* pareado foi usado para as comparações.

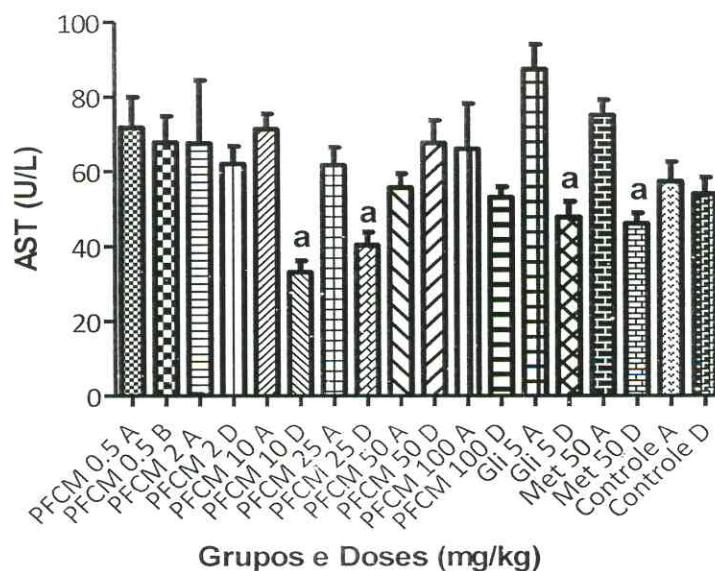


Fig. 3.5. Efeitos da fração polissacarídica (PFCM 0,5, 2, 10, 25, 50 e 100 mg/kg, v.o. administrado diariamente por 5 dias) de *Passiflora edulis* nos níveis de aspartato transferase (AST) em ratos com diabetes induzido por aloxano. Valores são representados por média \pm EPM de 6 a 13 animais por grupo. a. diferença significativa quando comparado com o mesmo grupo, 48 h após a injeção de aloxano (A = antes do tratamento) e cinco dias após tratamento (D = depois do tratamento) com PFCM, água destilada (controle diabético), glibenclamida (Gli 5 mg/kg, v.o.) ou metformina (Met 50 mg/kg, v.o.): valores de p variaram de 0,0001 a 0,01. Teste *t* pareado foi usado para as comparações.

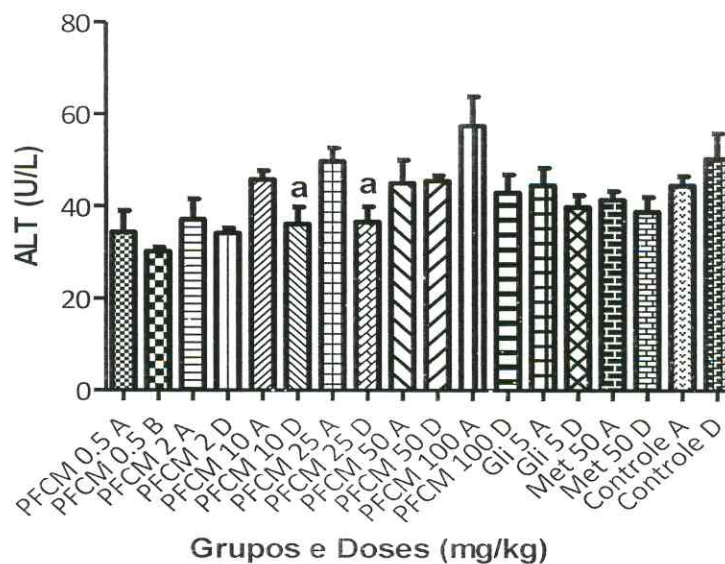


Fig. 3.6. Efeitos da fração polissacarídica (PFCM 0,5, 2, 10, 25, 50 e 100 mg/kg, v.o. administrado diariamente por 5 dias) de *Passiflora edulis* nos níveis de alanina transaminase (ALT) em ratos com diabetes induzido por aloxano. Valores são representados por média ± EPM de 6 a 13 animais por grupo. **a.** diferença significativa quando comparado com o mesmo grupo, 48 h após a injeção de aloxano (A = antes do tratamento) e cinco dias após tratamento (D = depois do tratamento) com PFCM, água destilada (controle diabético), glibenclâmida (Gli 5 mg/kg, v.o.) ou metformina (Met 50 mg/kg, v.o.): valores de p variaram de 0,020 a 0,021. Teste *t* pareado foi usado para as comparações.

Os resultados do teste preventivo com o polissacarídeo (50 mg/kg, v.o.) estão mostrados na **Figura 3.7**. Não houve alteração significativa nos animais do grupo controle quando comparados os valores antes e depois para todos os parâmetros analisados (Glicemia: $369,7 \pm 28,28$ e $390,4 \pm 23,13$; Triglicérides: $302,5 \pm 54,48$ e $284,5 \pm 17,65$; Colesterol total: $80,86 \pm 5,08$ e $71,97 \pm 2,8$). Foram observadas reduções significativas nos níveis de glicemia (47%) para o grupo tratado com PFCM cinco dias antes da injeção de aloxano (PFCM-Prev) quando comparado o mesmo grupo após a indução de diabetes (antes $277,7 \pm 19,39$ e após $147,6 \pm 13,28$). Alterações positivas também foram observadas no grupo sem a administração prévia (PFCM-N) comparando-se os valores antes e após tratamento ($363 \pm 37,03$ e $180,8 \pm 18,76$, respectivamente), evidenciando reduções de 50% na concentração de glucose plasmática. Diferenças significativas foram observadas entre os grupos PFCM-Prev e PFCM-N quando comparados os valores 48 h após a indução de diabetes por aloxano (A) o que demonstra um possível efeito preventivo da amostra estudada em relação ao parâmetro glicemia nos animais diabéticos. Contudo, não houve diferença significativa ($p > 0,05$ - ANOVA e Student-Newman-Keuls como *post hoc* test) quanto aos valores obtidos ao final do quinto dia de tratamento (D) (**FIGURA 3.7-A**).

Os resultados obtidos para os parâmetros triglicérides (TG) e colesterol total (CT) não demonstram um efeito preventivo de PFCM. Não houve diferenças significativas entre os grupos tratado e não-tratado previamente, quando comparados os valores tanto antes quanto após a administração dos polissacarídeos (TG antes: PFCM-Prev $257,1 \pm 48,5$ e PFCM-N $362,9 \pm 78,24$; TG depois: PFCM-Prev $94,61 \pm 11,04$ e PFCM-N $124,1 \pm 14,82$; CT antes: PFCM-Prev $78,68 \pm 6,27$ e PFCM-N $88,93 \pm 5,72$; CT depois: PFCM-Prev $54,25 \pm 4,65$ e PFCM-N $67,13 \pm 6,97$). Foram observadas alterações significativas nas concentrações de TG após tratamento quando comparado o mesmo grupo com reduções de 63 e 65% para PFCM-Prev e PFCM-N, respectivamente. Os níveis de colesterol total sofreram diminuições de 31% (PFCM-Prev) e 25% (PFCM-N) (**FIGURAS 3.7-B e 3.7-C**).

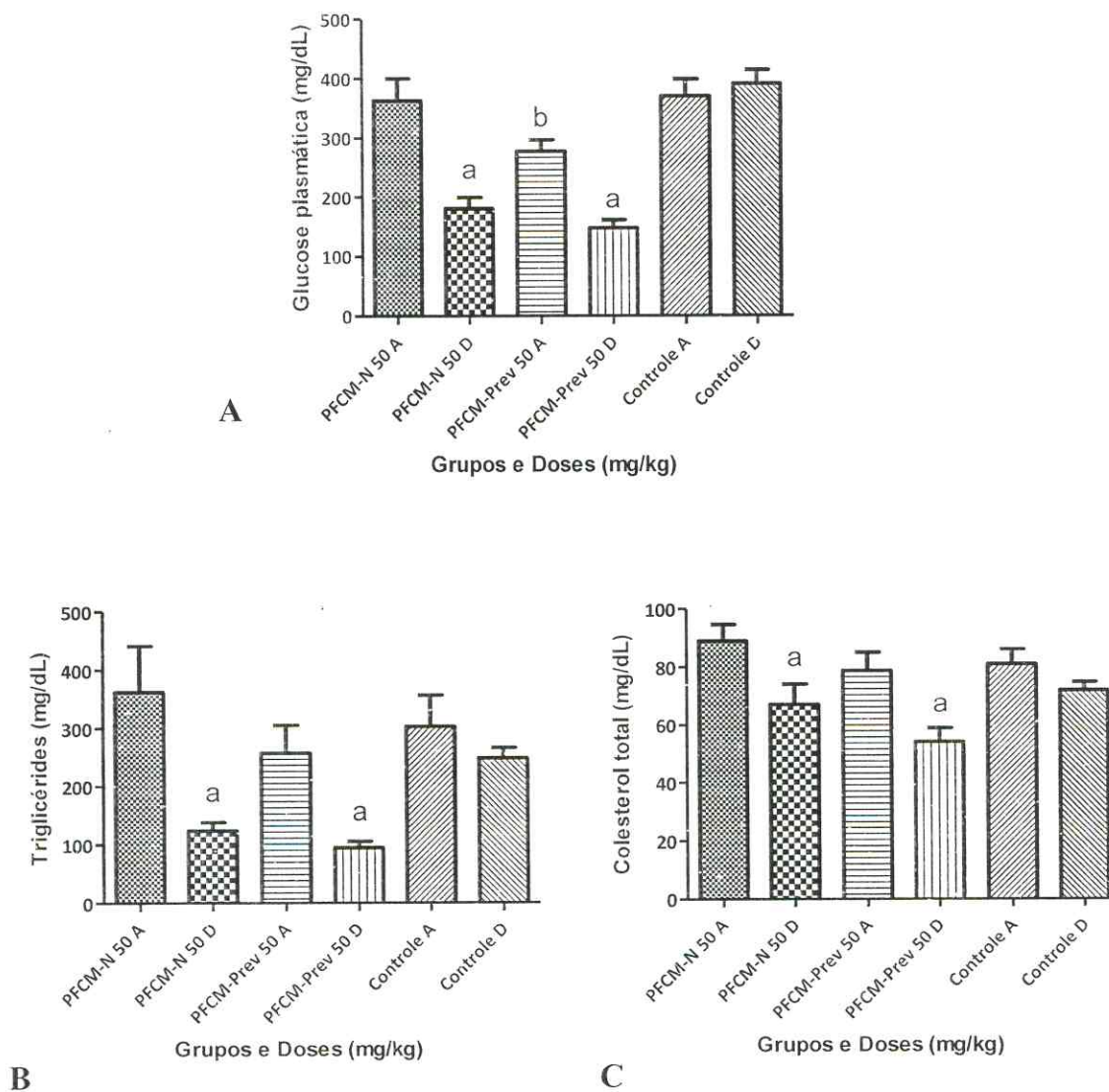


Fig. 3.7. Efeitos de PFCM (50 mg/kg, v.o.) no teste preventivo em ratos diabéticos sobre os níveis dos parâmetros bioquímicos do sangue, glucose (A); triglicérides (B); e colesterol total (C). Valores são representados por média \pm EPM de 6 a 15 animais por grupo. **PFCM-Prev:** grupo tratado previamente por cinco dias antes da indução de diabetes. **PFCM-N:** grupo não submetido a tratamento prévio. **a.** diferença significativa quando comparado com o mesmo grupo, 48 h após a injeção de aloxano (A = antes do tratamento) e cinco dias após tratamento (D = depois do tratamento) com PFCM ou água destilada (controle diabético) Teste *t pareado* **b.** diferença significativa quando comparado ao grupo sem tratamento prévio antes ou após tratamento ANOVA e Student-Newman-Keuls como *post hoc*: valores de *p*: (A) - *p* de 0,0001 a 0,0819; (B) - *p* de 0,001 a 0,3290; (C) - *p* de 0,004 a 0,1310.

4.2. Efeitos do tratamento com PFCM no edema de pata induzido por carragenina em ratos.

Os resultados obtidos com a administração oral de PFCM sobre o edema de pata induzido por carragenina (Cg) em ratos estão mostrados na **Figura 3.8**.

PFCM reduziu de maneira significativa o volume médio do edema na 4.^a h com a dose de 5 mg/kg ($0,85 \pm 0,08$ mL), e da 2.^a a 4.^a h na dose de 10 mg/kg ($0,975 \pm 0,05$; $0,727 \pm 0,06$ e $0,3338 \pm 0,07$ mL, respectivamente) após a injeção intraplantar de Cg a 1%. Esses valores correspondem à inibições de 38% (dose de 5 mg/kg) e de 31, 42 e 76% para a dose de 10 mg/kg, quando comparado ao controle tratado apenas com carragenina. Resultados similares aos da maior dose (10 mg/kg) foram demonstrados no grupo tratado com indometacina (Indo 20 mg/kg, v.o.) com inibições de 41, 49 e 66% na 2.^a, 3.^a e 4.^a horas, respectivamente ($0,842 \pm 0,05$; $0,632 \pm 0,071$; $0,437 \pm 0,07$ mL).

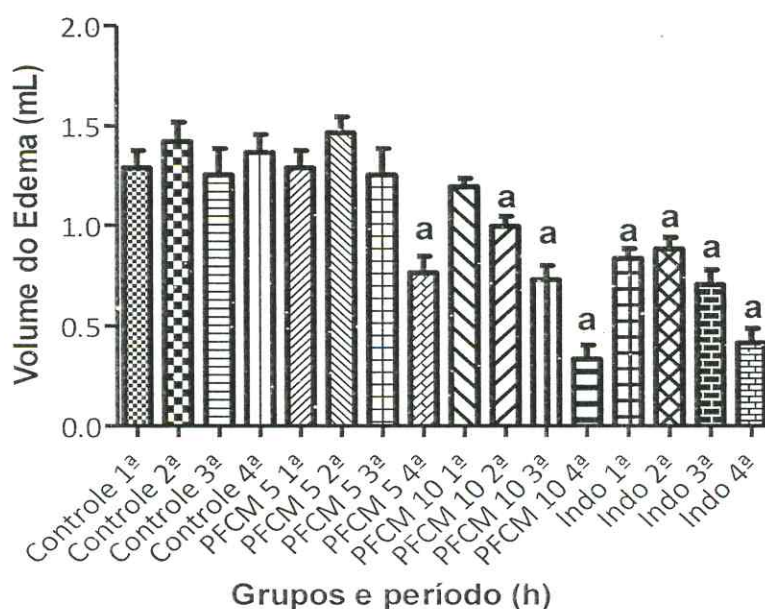


Fig. 3.8. Efeitos da administração aguda de PFCM (5 e 10 mg/kg, v.o.) no edema de pata induzido por carragenina em ratos. Valores estão representados por média ± EPM para grupos de 8 a 10 animais. **a.** diferença significativa quando comparado ao grupo controle (tratado apenas com carragenina) no mesmo período de tempo – valores de *p* variaram de 0,001 a 0,01 (ANOVA e Dunett's como *post hoc* test).

4.3. *Efeitos de PFCM sobre a intensidade inflamatória avaliados como tempo de lambertura da pata em segundos na segunda fase do teste da formalina em camundongos.*

O tratamento com PFCM reduziu de maneira significativa o tempo de lambertura da pata na segunda fase do teste da formalina em camundongos após injeção intraplantar de formalina a 1% por administração intraperitoneal das doses de 25, 50 e 100 mg/kg com reduções significativas de 26, 75 e 89%, respectivamente, sendo o efeito máximo obtido com a dose de 50 mg/kg ($p > 0,05$ quando comparados os grupos de 50 e 100 mg/kg - ANOVA e Student-Newman-Keuls como *post hoc* test). O grupo tratado com morfina (5 mg/kg), utilizada como droga de referência, apresentou redução de 95%. Reduções na primeira fase do teste foram observadas para o grupo tratado com a dose de 100 mg/kg (36%) e morfina (54%) quando comparados à primeira fase do grupo que recebeu água destilada (**FIGURA 3.9**). Por via oral, PFCM nas doses de 25 e 50 mg/kg reduziu em 34 e 28%, respectivamente o tempo de lambertura da pata na segunda fase do teste quando comparado ao controle que recebeu apenas a injeção de formalina ($27,38 \pm 2,8$ s). Não foram observadas alterações significativas na primeira fase em nenhuma das doses testadas (**FIGURA 3.10**).

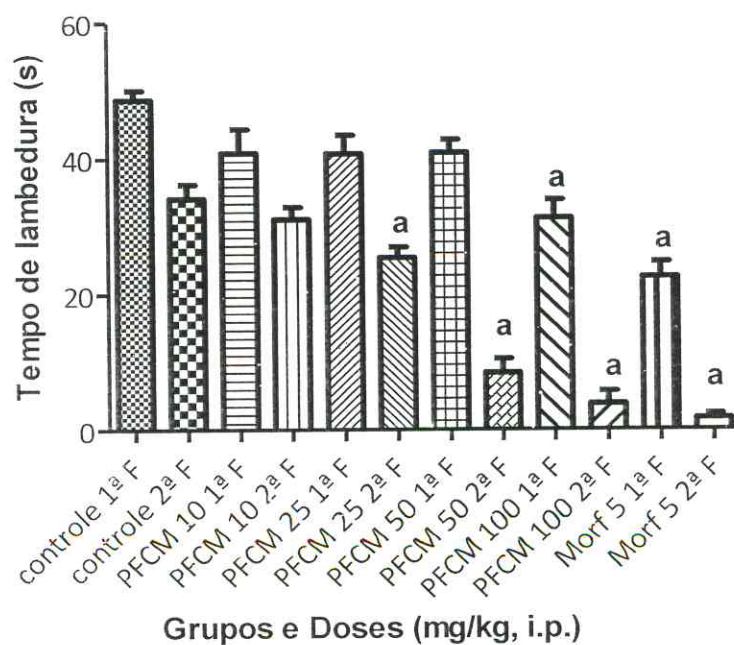


Fig. 3.9. Efeitos da administração aguda de PFCM (1, 25, 50 e 100 mg/kg, i.p.) no edema de pata induzido por formalina em camundongos em relação ao tempo de lambedura de pata em segundos. Valores estão representados por média \pm EPM para grupos de 9 a 15 animais. a. diferença significativa quando comparado ao grupo controle (tratado apenas com formalina) – valores de p variaram de 0,001 a 0,0054 (ANOVA e Dunett's como *post hoc* test).

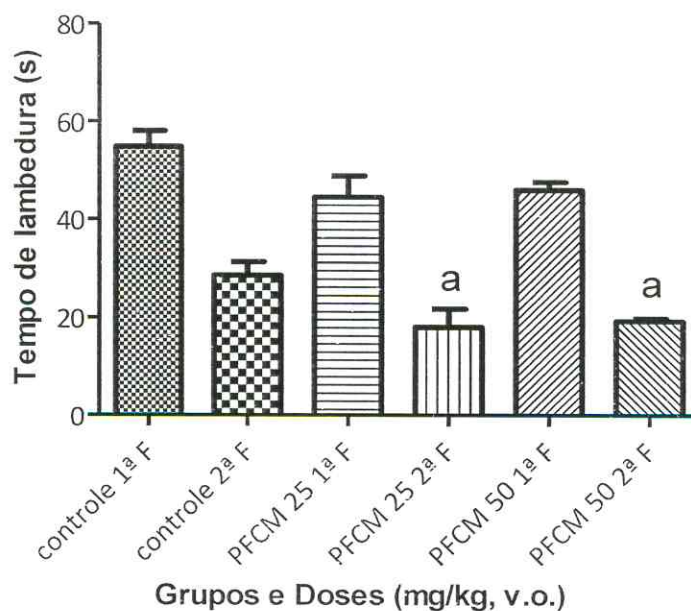


Fig. 3.10. Efeitos da administração aguda de PFCM (25 e 50 mg/kg, v.o.) no edema de pata induzido por formalina em camundongos em relação ao tempo de lambedura da pata em segundos. Valores estão representados por média \pm EPM para grupos de 8 a 13 animais. **a.** diferença significativa quando comparado ao grupo controle (tratado apenas com formalina) – valores de p variaram de 0,0002 a 0,0574 (ANOVA e Dunett's como *post hoc* test).

4.4. Efeitos de PFCM sobre a secreção de mieloperoxidase (MPO) por neutrófilos humanos

Os dados obtidos através de espectrofotometria com os testes de secreção de mieloperoxidase *in vitro* demonstram a propriedade de PFCM de reduzir significativamente a secreção deste importante biomarcador de inflamação por neutrófilos humanos. Enquanto a secreção de MPO aumentou 196% nas células não-tratadas (apenas com o veículo água) em relação ao controle negativo (solução de Hank), PFCM, exceto pela concentração de 0.1 $\mu\text{g/mL}$, inibiu significativamente a secreção da enzima de maneira dose dependente com reduções de 35, 39, 57 e 62% (doses de 1, 10, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente). Os valores observados para as duas maiores concentrações de PFCM (50 e 100 $\mu\text{g/mL}$) foram similares aos encontrados para indometacina (66%, 10 $\mu\text{g/mL}$) usada como droga de referência (FIGURA 3.11).

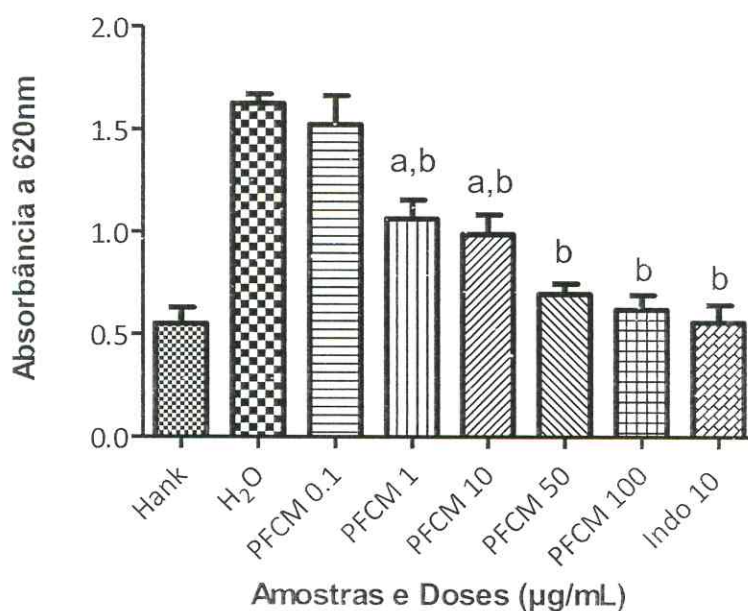


Fig. 3.11. Efeitos de PFCM (0,1 a 100 $\mu\text{g/mL}$) na secreção de Mieloperoxidase por neutrófilos humanos estimulados por acetato de forbol miristato. Os experimentos foram conduzidos com o emprego de 6 a 8 amostras, sendo apresentados como média \pm EPM. **a.** comparado à solução de Hank – p valores de 0,001 a 0,01; **b.** comparado à amostra tratada com água – $p = 0,001$ (ANOVA e Student-Newman-keuls como *post hoc* test).

4.5. *Análise histológica de cortes do edema de pata induzido por carragenina em ratos antes e após tratamento com PFCM*

Enquanto a análise das lâminas (método Hematoxilina/Eosina) com cortes de tecido obtidas a partir de animais do grupo controle negativo revelou a preservação da arquitetura tecidual e a presença de fibras de colágeno e fibroblastos, no grupo submetido à injeção intra-plantar de carragenina 1% observou-se uma intensa formação de edema, representado por largos espaçamentos e desaparecimento das fibras de colágeno. A injeção de carragenina também induziu a migração de leucócitos. No grupo pré-tratado com PFCM (10 mg/kg v.o.), demonstrou-se a redução do edema e preservação do tecido. As fibras de colágeno apresentaram apenas uma destruição parcial após injeção de carragenina. Além disso, houve reduções significativas na infiltração de neutrófilos, bem como a preservação de fibroblastos (**FIGURA 3.12**).

4.6. *Efeitos de PFCM na imunohistoquímica para TNF-alfa e iNOS em cortes do edema de pata induzido por carragenina em ratos*

Os resultados da imunohistoquímica para determinação de TNF-alfa e iNOS em tecidos das patas inflamadas dos animais tratados e não tratados com PFCM (10 mg/kg, v.o.) estão mostrados na **Figura 3.13**.

No grupo controle negativo nenhuma célula marcada foi observada nas amostras que não receberam o anticorpo primário (**FIGURA 3.13-A**), o que valida os resultados obtidos nos testes. Uma intensa mancha, característica de reação imunológica, pode ser percebida no grupo controle positivo para iNOS indicando uma massiva atividade desta citocina nas patas dos ratos tratados com carragenina (**FIGURA 3.13-B**). No grupo pré-tratado com PFCM a concentração de iNOS foi apenas parcialmente reduzida (**FIGURA 3.13-C**), contudo, a migração de neutrófilos foi significativamente diminuída (como também observado na **FIGURA 3.12**). No controle positivo para TNF-alfa foi observada uma alta concentração relacionada à intensidade da mancha de reconhecimento do anticorpo nas patas dos ratos tratados com carragenina (**FIGURA 3.13-D**). O tratamento com PFCM também reduziu apenas parcialmente a concentração de TNF-alfa (**FIGURA 3.13-E**).

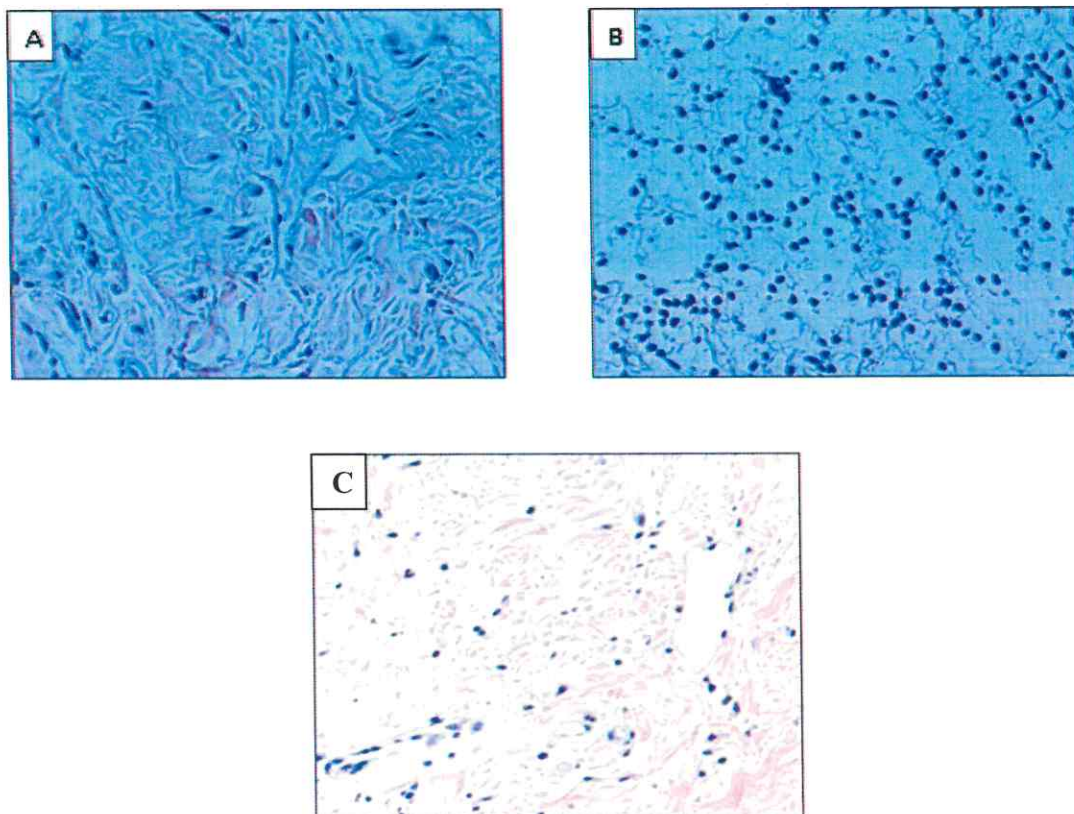


Fig. 3.12. Microfotografias de lâminas coradas com hematoxilina e eosina, representativas de secções de edema de pata induzido por carragenina em ratos. **(A):** Controle negativo mostrando a preservação da arquitetura tecidual com a presença de fibras de colágeno e fibroblastos. **(B):** Controle positivo (tratado com carragenina) mostrando intensa formação de edema, desaparecimento de fibras de colágeno e migração de neutrófilos. **(C):** Grupo pré-tratado com PFCM (10 mg/kg, v.o.) evidenciando redução do edema e preservação do tecido com leve destruição de fibras de colágeno, inibição da migração de neutrófilos e preservação de fibroblastos.

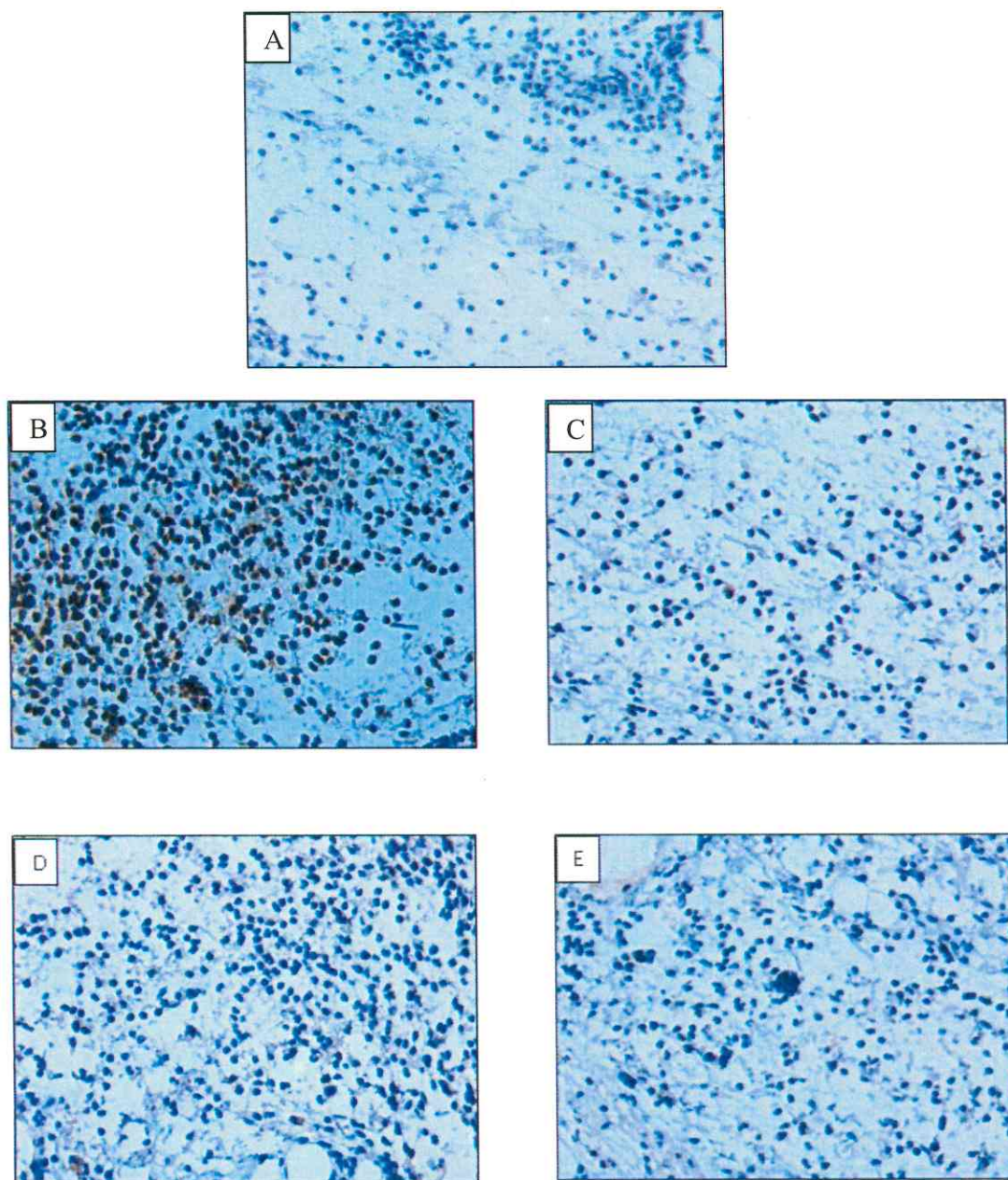


Fig. 3.13. Imunohistoquímica para óxido nítrico sintase induzida (iNOS) e fator de necrose tumoral (TNF- α) em secções de tecidos inflamados das patas de ratos submetidos à injeção de carragenina no modelo de inflamação aguda. *A.* Controle negativo. *B.* Controle inflamação (iNOS). *C.* PFCM 10 mg/kg, v.o. (iNOS). *D.* Controle inflamação (TNF- α). *E.* PFCM 10 mg/kg, v.o. (TNF- α). As células coradas indicam interação dos anticorpos primário e secundário e a consequente presença de iNOS and TNF- α . (400x).

5. DISCUSSÃO

Os efeitos benéficos de fibras alimentares como as pectinas vêm sendo justificados com as evidências de ações antioxidante e antitumoral, alterações positivas na pressão sanguínea, e pela capacidade de reduzir os níveis plasmáticos de lipídeos e glucose (GALISTEO *et al*, 2008; PAPATHANASOPOULOS; CAMILLERI, 2010). Além disso, recentemente, esses compostos têm sido reconhecidos por suas propriedades imunoestimulantes (LEUNG *et al*, 2006; INNGJERDINGEN *et al*, 2007; SALMAN *et al*, 2008; TOGOLA *et al*, 2008; RAMBERG *et al*, 2010).

Sob tal aspecto, a farinha derivada da casca dos frutos do maracujá, sobretudo os da espécie *Passiflora edulis*, é amplamente consumida pela população brasileira em geral para prevenção e tratamento da hiperglicemia e hiperlipidemia (AGRA *et al*, 2007) característicos do diabetes, considerando seu elevado teor de fibra principalmente pectinas (YAPO; KOFFI, 2006).

No presente trabalho, os polissacarídeos pécticos isolados da casca dos frutos de *P. edulis* foram capazes de reduzir os níveis glicêmicos, colesterolêmicos e a concentração de triglicérides em ratos com diabetes induzido por aloxano após tratamento (2 a 100 mg/kg) durante cinco dias por via oral. Na literatura, alguns trabalhos evidenciam as propriedades hipoglicêmica e hipocolesterolêmica da casca do maracujá empregada na suplementação de dietas a pacientes diabéticos (JANEIRO *et al*, 2008, 2010) e também em ratos (QUEIROZ *et al*, 2008; SALGADO *et al*, 2010). Contudo, apenas um trabalho evidenciou o efeito da fibra alimentar propriamente dita, onde a ação hipocolesterolêmica foi observada em ratos suplantados com o polissacarídeo obtido não da casca do fruto, mas sim, a partir das sementes de *P. edulis* (CHAU; HUANG, 2005).

Um teste clínico para avaliar os efeitos da farinha da casca do maracujá em 43 pacientes com diabetes tipo 2 foi conduzido durante 60 dias através da ingestão diária de 30 g do produto. Foram observadas reduções nos níveis de glucose plasmática, bem como nos valores de hemoglobina glicosilada de 26 e 13%, respectivamente (JANEIRO *et al*, 2008). Outros estudos empregando a farinha dos frutos de *P. edulis* em humanos demonstram variações em relação ao parâmetro glicemia, quando o produto foi administrado a indivíduos não-diabéticos, desde uma pequena redução de 5% demonstrada por Medeiros *et al* (2009) após ingestão de 30 g de farinha por dia durante 8 semanas em 36 voluntários, até a ausência de alterações nos níveis de glucose plasmática após 60 dias de ingestão de 30 g diárias de farinha de *P. edulis* em 19 mulheres normoglicêmicas (RAMOS *et al*, 2007).

Esses valores de redução na glicemia são inferiores aos encontrados no presente estudo com diminuições de até 65% na concentração plasmática de glucose em ratos diabéticos após tratamento de cinco dias com PFCM. Por lado, o trabalho realizado por Braga *et al* (2010) com ratos aloxonizados tratados com a farinha da casca de *P. edulis* demonstrou uma redução da glicemia de 58% após 4 horas de terminado o tratamento, que consistiu na administração em dose única por gavagem, com a farinha dissolvida em água; enquanto reduções de 59% na glicemia, e aumentos na concentração de glicogênio hepático de ratos com diabetes induzido por aloxano foram observados por Salgado *et al* (2010) após 30 dias de tratamento com a farinha da casca de *P. edulis* utilizada como suplementação da dieta.

O presente estudo constatou a propriedade de PFCM em prevenir parcialmente a hiperglicemia causada pela injeção de aloxano nos animais submetidos a tratamento prévio de cinco dias (ver resultados, item 4.1). Sob esse aspecto, Zhang *et al* (2004) demonstraram uma prevenção parcial da hiperglicemia em ratos normais, causada pela injeção de glucose (2 g/kg, i.p.), através do pré-tratamento com o carboidrato isolado de *Rehmannia glutinosa* por administração intraperitoneal durante três dias. Os autores demonstraram ainda, que em ratos com hiperglicemia induzida por adrenalectomia, o efeito preventivo do carboidrato foi perdido, sugerindo que o mecanismo regulador da amostra sobre o metabolismo de glucose esteja relacionado ao sistema neuroendócrino. Neste mesmo trabalho, foi também demonstrada a propriedade do carboidrato de reduzir a concentração plasmática de glucose em ratos com diabetes induzida por aloxano após tratamento de 15 dias (100 mg/kg, i.p.), além de aumentar a atividade da enzima glucose-6-fosfatase no fígado, bem como os níveis de insulina plasmática.

Outros trabalhos na literatura demonstram a propriedade de polissacarídeos pécnicos, inclusive derivados de frutos, em reduzir os níveis plasmáticos de glucose em alguns modelos animais (ZHANG *et al*, 2004; RAI *et al*, 2006; ZOU *et al*, 2010; CHEN *et al*, 2011).

A maioria dos trabalhos citados na literatura, alguns destes discutidos aqui, que empregam a farinha da casca de frutos em testes de ação antidiabética, credita a ação hipoglicemiante observada às fibras constituintes, principalmente às pectinas. De fato, considerando os estudos realizados com polissacarídeos, as pectinas são amplamente relatadas como agentes capazes de reduzir os níveis de glucose plasmática (GOMATHY *et al*, 1990; SINGH *et al*, 2005; RAI *et al*, 2006; JENKINS *et al*, 1978; WEICKERT *et al*, 2008; SANCHEZ *et al*, 2008; ZOU *et al*, 2010; KIM, 2005). Pectinas e fibras solúveis são capazes de atenuar a concentração de glucose sanguínea após uma refeição e possibilitar um controle do diabetes como demonstrado em estudos a longo prazo (SANDHU *et al*, 1987), além de

auxiliar no controle da glicemia, amenizar e/ou reduzir eventos de hipoglicemia em diabéticos tipo 1 (GIACCO *et al*, 2000).

Os efeitos das fibras solúveis estão relacionados à sua capacidade de aumentar a viscosidade do meio intestinal e diminuir o tempo de esvaziamento gástrico em indivíduos normais (JENKINS *et al*, 2008). Contudo, sabe-se que alguns tipos de fibras como a goma guar não alteram o tempo de esvaziamento gástrico em pacientes diabéticos, porém reduzem a concentração de glucose pós-prandial (UUSITAPA *et al*, 1984). Desse modo, o mecanismo molecular pelo qual essas moléculas atuam, ainda permanece pouco entendido, embora seus comprovados efeitos benéficos aliados à uma baixa toxicidade, sugiram sua utilização como tratamento alternativo do diabetes e síndrome metabólica (CHAO; LIU, 2008).

A síndrome metabólica é descrita como uma série de anormalidades metabólicas ocorrentes simultaneamente em um indivíduo e consideradas como fatores de risco independentes para doença cardiovascular, estando fortemente associada ao diabetes tipo 2 (GALISTEO *et al*, 2008). Os principais fatores de risco associados ao desenvolvimento desta patologia são obesidade, baixas concentrações de HDL, níveis elevados de triglicérides, hipertensão e hiperglicemia, juntamente com resistência à insulina (ECKEL *et al*, 2005).

É conhecido que a ingestão de fibras solúveis, particularmente as derivadas de grãos e frutas, desempenham efeito protetor no desenvolvimento de síndrome metabólica, como observado em pacientes com diabetes tipo 2 (STEEMBURGO *et al*, 2009). Um número significativo de estudos em seres humanos e em modelos experimentais tem comprovado a eficácia da fibra alimentar na regulação do peso corpóreo, metabolismo de carboidratos, sensibilidade à insulina e fatores de risco para doença cardiovascular como alterações no perfil lipídico, hipertensão arterial sistêmica e marcadores de inflamação (DAVY *et al*, 2003; VENN *et al*, 2004). Além disso, outros estudos têm descrito os efeitos positivos da ingestão de alimentos ricos em fibras sobre a obesidade, doença cardiovascular ou diabetes tipo 2 (GALISTEO *et al*, 2008).

Estudos clínicos de intervenção controlada têm mostrado que algumas fibras solúveis, incluindo pectinas efetivamente diminuem os níveis de LDL sem, contudo, afetar a concentração de HDL ou de triacilgliceróis (THEUWISSEN; MENSINK, 2008). Alguns trabalhos com a farinha da casca do maracujá sobre os níveis colesterolêmicos têm corroborado com esses dados, na medida em que se observam reduções nos níveis de LDL enquanto os valores de HDL permanecem inalterados (MEDEIROS *et al*, 2009; QUEIROZ *et al*, 2008). Ramos *et al* (2007) em um estudo clínico piloto com mulheres normoglicêmicas e com dislipidemia, observaram que 30 g diários da farinha da casca de *P. edulis* por sessenta

dias reduziu os níveis de colesterol total e LDL. Reduções na concentração de triglicérides também foram observadas após administração da farinha de *P. edulis* em pacientes diabéticos tipo 2 (JANEIRO *et al*, 2008).

Aqui, evidenciaram-se reduções significativas nos níveis de triglicérides em ratos diabéticos tratados com PFCM (0,5 a 100 mg/kg), além de diminuições na concentração de colesterol total com a administração das duas maiores doses (50 e 100 mg/kg). É sabido que casos não controlados de diabetes tipo 2 são acompanhados de aumentos nos níveis de colesterol total, LDL e triglicérides, quando há diminuições nos níveis de HDL (ARAVIND *et al*, 2002). Altas concentrações de lipídeos são mais comuns em diabetes tipo 2 do que no tipo 1 e a mais comum anormalidade é a hipertrigliceridemia, o que representa riscos potenciais para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares em pacientes diabéticos (BETTERIDGE, 1996). Assim, compostos que são capazes de proporcionar reduções significativas nos níveis glicêmicos e lipídicos tornam-se importantes como fontes de novas alternativas para o tratamento da doença.

O tratamento com PFCM também influenciou os níveis das transaminases hepáticas. No presente estudo, reduções nos níveis de ALT e AST nos grupos diabéticos tratados com os polissacarídeos (10 e 25 mg/kg) foram observados. ALT e AST são membros da família de enzimas transaminases. Enquanto AST é encontrada em muitos tecidos, incluindo músculo, rins, cérebro e pulmões, ALT é encontrada em maior quantidade no fígado e é um melhor biomarcador para doenças hepáticas. Concentrações sanguíneas muito elevadas de transaminases são sinais comuns de toxicidade ou doenças hepáticas, sendo frequentemente observadas em pacientes diabéticos. Elevações de ALT são consideradas um marcador substituto de doenças hepáticas não alcoólicas, e prediz o desenvolvimento de diabetes e síndrome metabólica em adultos (DI BONITO *et al*, 2009). Em diabéticos, a atividade das enzimas hepáticas está associada às complicações da doença como retinopatias e neuropatias (ARKKILA *et al*, 2001). Mais ainda, a atividade dessas enzimas é usada como indicadores de toxicidade tecidual em diabetes experimental, uma vez que seus altos níveis em ratos diabéticos mostram relação com os efeitos tóxicos de estreptozotocina por um período superior a 50 dias (MORI *et al*, 2003).

De fato, diabetes e síndrome metabólica são reconhecidas como patologias caracterizadas pela expressão de vários aspectos de ordem sistêmica com a presença de diferentes tipos de marcadores de natureza enzimática que evidenciam possíveis anormalidades teciduais. Nesse aspecto, tem-se mostrado que alguns mediadores ou marcadores da inflamação estão associados com o desenvolvimento de diabetes, interferindo

fortemente no processo de resistência à insulina (YUDKIN *et al*, 1999). Indivíduos com síndrome metabólica e diabetes tipo 2 apresentam níveis elevados de marcadores de inflamação e citocinas pró-inflamatórias o que evidencia uma etapa do processo inflamatório. Dentre esses marcadores de fase aguda, a interleucina 6 (IL-6), a proteína C-reativa (PCR) e o fator de necrose tumoral (TNF-alfa) estão diretamente relacionados com a maioria dos aspectos característicos de diabetes tipo 2 como obesidade e resistência à insulina, dislipidemia, hipertensão e arteriosclerose, por exemplo (PICKUP *et al*, 1997; SONNENBERG *et al*, 2004). Estudos têm mostrado que os níveis plasmáticos de muitos marcadores inflamatórios predizem um estado diabético futuro, sugerindo fortemente um envolvimento da inflamação na etiologia do diabetes tipo 2 (CHEN, 2006).

Diversos estudos têm evidenciado uma importante relação entre obesidade e inflamação. O tecido adiposo é de fato, considerado como um órgão endócrino que secreta um grande número de proteínas, como o próprio fator de necrose tumoral, chamadas adipocinas, capazes de promover a regulação do metabolismo (KERSHAW; FLIER, 2004). Contudo, a produção anormal de hormônios e citocinas nesse tecido, como a IL-6 e o TNF-alfa, e a baixa secreção de adiponectina, uma molécula que exerce efeitos anti-inflamatórios, antiaterogênicos e antidiabéticos, pode conduzir ao diabetes tipo 2 (KADOWAKI *et al*, 2006). Mais ainda, a inflamação no tecido adiposo branco pode ser uma etapa fundamental que contribui para o estabelecimento de aspectos característicos de síndrome metabólica e que resultam em diabetes tipo 2 e arteriosclerose (WISSE, 2004). Recentemente, observou-se que indivíduos obesos apresentam aumento na infiltração de macrófagos no tecido adiposo, bem como elevação no número de macrófagos ativados. Estas células têm sido identificadas como fontes de muitas moléculas inflamatórias circulantes detectadas no estado de obesidade e são consideradas como a causa da resistência à insulina e progressão de diabetes tipo 2 e doença cardiovascular (HEILBRONN; CAMPBELL, 2008; SHAH *et al*, 2008).

Desse modo, devido à relação entre diabetes e processo inflamatório, e considerando os poucos relatos na literatura sobre efeito anti-inflamatório de espécies de *Passiflora*, foram estudados os efeitos de PFCM em modelos experimentais de inflamação. Os resultados mostraram que a administração dos polissacarídeos exibiu pronunciada ação anti-inflamatória, caracterizada pela redução do edema de pata induzido por carragenina de modo similar à indometacina, utilizada como droga de referência; pela capacidade em diminuir o tempo de lambertura da pata na segunda fase, considerada a fase inflamatória, do teste da formalina; por diminuir a secreção de mieloperoxidase (MPO) por neutrófilos humanos *in vitro*. Além disso, PFCM reduziu o número de células TNF-alfa e iNOS-positivas

e a secreção de neutrófilos *in vivo* como avaliado e testes imunohistoquímicos para estas duas citocinas pró-inflamatórias realizados em tecidos de patas de ratos submetidos a edema de pata por carragenina.

A carragenina (Cg) é um agente indutor da inflamação muito empregado na avaliação de drogas anti-inflamatórias por depender de um estímulo local, não produzir efeitos sistêmicos, ser altamente reprodutível e sua ação inflamatória ser inibida por drogas esteroidais e não-esteroidais (WINTER *et al*, 1962). A ação inflamatória de Cg envolve uma série de mediadores, com a liberação inicial de histamina, serotonina e bradicinina, seguida pelo aumento nos níveis de prostaglandinas que coincide, por sua vez com a migração de leucócitos, os quais amplificam a resposta inflamatória na medida em que desencadeiam a produção de outros mediadores (NANTEL *et al*, 1999).

O efeito anti-inflamatório de PFCM sobre o edema de pata induzido por carragenina foi evidenciado durante os períodos da segunda a quarta horas (dose de 10 mg/kg) o que nos leva a sugerir que sua ação pode estar relacionada com a inibição da síntese e liberação de mediadores como cininas e prostaglandinas, bem como na redução do infiltrado de leucócitos para o local da inflamação, visto que tais fenômenos, nos períodos de tempo da 2ª à 4ª hora, são muito expressivos (FANTONE; WARD, 1982).

Também foram observados os efeitos de PFCM no tempo de lambertura da pata pelo teste da formalina, com reduções de até 89% na segunda fase. Neste teste, os animais exibem uma resposta comportamental bifásica envolvendo mecanismos diferentes. A primeira fase é caracterizada por uma dor neurogênica, com início imediato à aplicação de formalina, e duração de 3 a 5 minutos causada, provavelmente, pela estimulação direta de nociceptores. A segunda fase decorre do desenvolvimento de um processo inflamatório, iniciada 10 a 20 minutos após a injeção de formalina e tem duração de 20 a 40 minutos, possivelmente relacionada com o recrutamento de células inflamatórias (HUNSKAAR *et al*, 1985).

Demonstrou-se também que PFCM reduziu significativamente a secreção de mieloperoxidase (MPO) em suspensões de neutrófilos humanos. O ensaio para mieloperoxidase pode ser empregado como um marcador da ativação de neutrófilos no sítio do processo inflamatório (FRODE; MEDEIROS, 2001). Essa enzima é secretada por neutrófilos e macrófagos no fluido extracelular durante o processo inflamatório, sendo conhecida por desempenhar um importante papel no processo de iniciação, progressão e complicações em arterosclerose. A observação que mieloperoxidase está envolvida no estresse oxidativo e inflamação tem levado a considerar essa enzima como um possível marcador para uso clínico em pacientes com doença cardiovascular (LORIA *et al*, 2008).

Mais ainda, recentemente mostrou-se que os níveis de MPO são mais altos em pacientes com diabetes tipo 2 quando comparados a indivíduos sem a doença (PARAMASH *et al*, 2011; JORNAYVAZ *et al*, 2008). Esse aumento pode contribuir para acelerar a progressão de arterosclerose em diabéticos (WIERSMA *et al*, 2008) como demonstrado também em ratos (ZHANG *et al*, 2004), onde níveis aumentados da enzima podem exacerbar o processo inflamatório através de injúria endotelial. Níveis aumentados de mieloperoxidase favorecem a produção de moléculas pró-inflamatórias e o desenvolvimento de doença cardiovascular em diabéticos (GUERCI *et al*, 2001).

Dentre o reduzido número de trabalhos que tratam sobre ação antiinflamatória de espécies do gênero *Passiflora*, Montanher *et al* (2007) empregaram extratos brutos das folhas de *P. edulis* no modelo de pleurite induzida por carragenina em camundongos. A amostra foi mais eficiente do que a droga dexametasona usada como padrão, em reduzir a secreção de mieloperoxidase na cavidade pleural, com diminuições de 64% em relação ao grupo não tratado. Vargas *et al* (2007) utilizando também o modelo de pleurite induzida por carragenina, avaliaram o perfil anti-inflamatório de extratos das folhas de *P. edulis* e *P. alata*. Ambas as amostras diminuíram significativamente a atividade de mieloperoxidase no fluido da cavidade pleural dos animais em 49% e 61%, respectivamente. No presente estudo, o pré-tratamento de neutrófilos humanos incubados com PFCM resultou em reduções de até 62% na secreção de MPO, valores equivalentes aos obtidos para o tratamento com a droga padrão indometacina (69%). Os baixos níveis de MPO observados podem sugerir a propriedade de inibição do influxo celular (FRODE; MEDEIROS, 2001). Desse modo, é possível que o tratamento com PFCM promova uma diminuição na migração de neutrófilos para o sítio de inflamação.

Nesse contexto, através da avaliação das secções das patas dos animais com inflamação devido à injeção de carragenina, e corados pela técnica H/E, evidenciou-se que o tratamento com PFCM reduziu significativamente a migração de neutrófilos para os tecidos submetidos à injúria. Essa informação é condizente com os dados obtidos com os extratos de *P. edulis* e *P. alata* no modelo de inflamação da pleurite induzida por carragenina que apresentaram a propriedade de inibir a infiltração celular e reduzir os níveis de exsudação (MONTANHER *et al*, 2007; VARGAS *et al*, 2007), e corroborada pelos resultados obtidos no teste de edema de pata induzido por carragenina, e a redução no tempo de lambertura da pata no teste da formalina.

A inibição na infiltração celular pode ser atribuída a uma inibição da secreção de citocinas pró-inflamatórias como TNF-alfa e interleucinas, substâncias pró-inflamatórias importantes no processo de secreção de outros mediadores pró-inflamatórios que, por sua vez,

estão associados à quimiotaxia e adesão de leucócitos no processo inflamatório (SANTOS *et al*, 2003).

Não há trabalhos na literatura que tratem de efeitos anti-inflamatórios de polissacarídeos de espécies do gênero *Passiflora*, contudo isso tem sido relatado para pectinas de outras fontes (POPOV *et al*, 2007). A ação dessas moléculas parece estar relacionada a uma possível imunomodulação (LEUNG *et al*, 2006), embora seu mecanismo ainda seja desconhecido (YE; LIM, 2010). Um estudo sobre o efeito da pectina de *Citrus* na produção de citocinas por macrófagos humanos mostrou a propriedade do polissacarídeo em inibir a secreção de interleucinas (IL-1 e IL-06), contudo não alterou a secreção de TNF-alfa (SALMAN *et al*, 2008).

Recentemente, mostrou-se que algumas pectinas são capazes de reduzir a secreção de interleucinas pró-inflamatórias e também de TNF-alfa regulando a resposta inflamatória por moderar a produção de citocinas e imunoglobulinas (YE; LIM, 2010). Há evidências que mediadores pró-inflamatórios como o próprio TNF-alfa e algumas interleucinas ajudam a aumentar a extensão do local ou o processo inflamatório sistêmico (MIZGERD *et al*, 2001). Em modelos animais TNF-alfa é um dos iniciadores do processo de desenvolvimento de artrite em espécies como ratos, camundongos e coelhos (BOMBINI *et al*, 2004; CANETTI *et al*, 2001; PRINCE *et al*, 2004).

O presente trabalho, demonstrou a propriedade de PFCM em reduzir parcialmente a secreção de TNF-alfa e iNOS como confirmado pelos testes de imunohistoquímica, o que evidencia o efeito anti-inflamatório da fração polissacarídica. Mais ainda, esses resultados corroboram com os obtidos a partir de extratos das folhas de *P. edulis* com inibições de citocinas pró-inflamatórias TNF-alfa, interleucinas e óxido nítrico (NO) (MONTANHER *et al*, 2007). Uma superprodução de NO devido à expressão de iNOS, aliada à ação dos compostos reativos de oxigênio, desencadeia importantes eventos em vários modelos de inflamação (MONCADA *et al*, 1991; NATHAN, 1996). Inibidores farmacológicos de NO e também da ativação do gene para iNOS são relatados por reduzir o desenvolvimento da resposta inflamatória (SALVEMINI *et al*, 1996).

Resultados similares aos obtidos com o tratamento com PFCM foram divulgados por Alarcon-Aguilar *et al* (2010) a partir da utilização de um polissacarídeo isolado de *Psacalium peltatum*. A amostra, dotada de ação hipoglicemiante quando administrada a ratos diabéticos, reduziu significativamente a presença de TNF-alfa. Segundo os autores, essa propriedade está relacionada com o aumento na concentração de interleucina-10 (IL-10), um agente anti-inflamatório natural e um indicativo de efeitos benéficos ao sistema imune.

Relacionando o quadro diabético ao processo inflamatório em diabetes tipo 2, a depressão na secreção ou ação da insulina implica em uma hiperglicemia crônica gerando glucototoxicidade, que aumenta a produção de espécies reativas de oxigênio, as quais atuam elevando a secreção de citocinas pró-inflamatórias como o próprio TNF-alfa (WRIGHT *et al*, 2006). A ativação destas citocinas pró-inflamatórias causa uma inflamação crônica por desequilibrar a produção de agentes anti-inflamatórios naturais (GUERRE-MILLO, 2004).

Tem sido proposto que o TNF-alfa e a enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS) estão envolvidos na patogênese de resistência à insulina relacionada à obesidade em diabetes tipo 2. A expressão dessas citocinas pró-inflamatórias é pouco regulada em modelos de diabetes tipo 2 (MOLLER, 2000).

O TNF-alfa foi a primeira citocina reconhecidamente associada com a resistência à insulina (MOLLER, 2000). Essa molécula possui a habilidade de amplificar a fosforilação em resíduos de treonina ou serina no receptor de insulina. Esta mudança no padrão de fosforilação causa resistência à insulina (EVANS, 2007; STEINBERG, 2007). Da mesma forma, iNOS é considerada uma das prováveis moléculas capazes de mediar a resistência à insulina estando relacionada à inflamação (FUJIMOTO *et al*, 2005). Produtos de vias que são reguladas pela iNOS têm implicação em vários eventos da cascata de inflamação incluindo exsudação do plasma e migração celular (CUZZOCREA *et al*, 2000). Além disso, as tiazolidinodionas, uma classe de sensibilizadores à insulina, suprimem a expressão de iNOS *in vivo* e *in vitro* (MAGGI *et al*, 2000). Assim, tem-se proposto que a inibição da expressão desta enzima esteja relacionada ao mecanismo de ação dos sensibilizadores de insulina (DAROS *et al*, 2004; PILON *et al*, 2004).

6. CONCLUSÕES

A fração de polissacarídeos isolada da casca dos frutos de *Passiflora edulis* (PFCM) foi capaz de reduzir significativamente os níveis séricos de glucose, colesterol total e triglicérides, além de reduzir as quantidades plasmáticas de aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT) em ratos com diabetes induzido por aloxano após tratamento por via oral durante cinco dias.

A fração obtida é dotada de atividade anti-inflamatória como evidenciado pelos testes de edema de pata induzido por carragenina em ratos e edema de pata induzido por formalina em camundongos, onde PFCM foi eficiente em reduzir o volume dos edemas, da segunda a quarta horas, em animais previamente tratados com a fração e que receberam injeção intraplantar de carragena a 1%. A amostra também reduziu significativamente o tempo de lambedura da pata na segunda fase do teste da formalina. Além disso, através da utilização de testes imunohistoquímicos em secções das patas dos animais tratados com carragenina, observou-se redução significativa do fator de necrose tumoral (TNF- α) e da mieloperoxidase (MPO), duas importantes citocinas pró-inflamatórias relacionadas aos processos de mediação da inflamação. PFCM também foi capaz de inibir a secreção de neutrófilos *in vitro*.

Os resultados obtidos a partir do tratamento com a fração de polissacarídeos isolada da casca dos frutos de *Passiflora edulis* (PFCM) em ratos com diabetes induzido por aloxano sugerem que o consumo diário da farinha das cascas do fruto de *P. edulis* pode ajudar a manter o controle glicêmico e a diminuir os níveis de colesterol total e de triglicérides, sugerindo esta espécie como uma opção de tratamento alternativo para o *diabetes mellitus* tipo 2. É possível que o mecanismo de ação da fração isolada sobre o quadro diabético apresentado pelos animais esteja relacionado a um aumento na sensibilidade à insulina.

A fração de polissacarídeos pécnicos isolada é responsável pelas propriedades hipoglicemiantes e hipolipidêmicas observadas no modelo animal de diabetes. Além disso, a significativa ação anti-inflamatória detectada pode sugerir PFCM como um novo candidato terapêutico com um espectro de atividade similar a anti-inflamatórios não-esteroidais como a indometacina, e, certamente capaz de exercer um envolvimento importante no efeito anti-diabético observado.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

- ✓ Os dados analíticos e espectroscópicos determinados para PFCM, obtida da casca dos frutos de *Passiflora edulis* na ausência de condições ácidas e sob aquecimento, evidenciam um heteropolissacarídeo de natureza péctica com estrutura química composta predominantemente por Ramnogalacturonanas do tipo I.
- ✓ A fração polissacarídica apresentou valores de massa molar e um baixo percentual de esterificação condizentes com os encontrados em outras pectinas extraídas de *P. edulis* sob diferentes condições de pH e temperatura.
- ✓ A fração polissacarídica obtida de *Passiflora edulis* não exibiu atividade citotóxica contra linhagens de células tumorais *in vitro*. Contudo, PFCM possui efeitos antitumorais *in vivo* sem toxicidade expressiva como observado nas análises histopatológicas, que revelaram alterações celulares em alguns órgãos, porém todas potencialmente reversíveis.
- ✓ O padrão de ação observado na atividade antitumoral de PFCM é semelhante ao de polissacarídeos obtidos de outras fontes, inclusive substâncias de natureza péctica, através da ativação do sistema imune. Assim, a atividade observada para PFCM pode estar relacionada às propriedades imunoestimulantes.
- ✓ Os resultados obtidos a partir do tratamento com PFCM em ratos com diabetes induzido por aloxano sugerem que o consumo diário da farinha das cascas do fruto de *P. edulis* pode ajudar a manter o controle glicêmico e a diminuir os níveis de colesterol total e de triglicerídeos, sugerindo esta espécie como uma opção de tratamento alternativo para o *diabetes mellitus* tipo 2.
- ✓ Os polissacarídeos pécticos obtidos são responsáveis pelas propriedades hipoglicemiantes e hipolipidêmicas observadas no modelo animal de diabetes. Além disso, a significativa ação anti-inflamatória detectada pode sugerir PFCM como um novo candidato terapêutico com um espectro de atividade similar a anti-inflamatórios não-esteroidais como a indometacina, e com envolvimento importante no efeito anti-diabético observado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, A., LICHTMAN, A. H., PILLAI, S. *Imunologia celular e molecular*. 6^a edição. Rio de Janeiro: Elsevier editora, 2008.
- AGRA, M. F.; FRANÇA, P. F.; BARBOSA-FILHO, J. M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, p. 40 - 114, 2007.
- AGRAWALA, S. K.; CHATTERJEE, S.; MISRA, S. K. Immune potentiation activity of a polyherbal formulation 'Immu-21' (research name). **Phytomedica**, v. 2, p. 1 - 22, 2001.
- AHMED, M. F.; KAZIM, S.; GHORI, S. S.; SUGHRAMEHJABEEN, S.; AHMED, S. R.; ALI S.; IBRAHIM M. Antidiabetic Activity of *Vinca rosea* Extracts in Alloxan-Induced Diabetic Rats. **International Journal of Endocrinology**, v. 2010, p. 1 - 6, 2010.
- ALARCON-AGUILAR, F. J.; CALZADA-BERMEJO, F.; HERNANDEZ-GALICIA, E.; RUIZ-ANGELES, C.; ROMAN-RAMOS, R. Acute and chronic hypoglycemic effect of *Ibervillea sonora* root extracts – II. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 97, p. 447 - 452, 2005.
- ALARCON-AGUILAR, F. J.; FORTIS-BARRERAB, A.; ANGELES-MEJIAB, S.; BANDERAS-DORANTES, T. R.; JASSO-VILLAGOMEZA, E. I.; ALMANZA-PEREZA, J. C.; BLANCAS-FLORES, G.; ZAMILPAD, C. A.; DIAZ-FLORESE, M.; ROMAN-RAMOS, R. Anti-inflammatory and antioxidant effects of a hypoglycemic fructan fraction from *Psacalium peltatum* (H.B.K.) Cass. in streptozotocin-induced diabetes mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 132, p. 400 - 407, 2010.
- ALMEIDA, V. L.; LEITÃO, A.; REINA, L. C.; MONTANARI, C. A.; DONNICI, C. L. Câncer e agentes neoplásicos coeli-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Química Nova**, v. 28, p. 118 - 129, 2005.
- AMERICAN ASSOCIATION OF CEREAL CHEMISTS (A.A.C.C.). **The Definition of Dietary Fiber**. v. 46 (3), 2001.
- AMRANI, F. E.; RHALLAB, A.; ALAOUI, T.; BADAOU, K. E.; CHAKIR, S. Hypoglycaemic effect of *Thymelaea hirsuta* in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. **Journal of Medicinal Plants**, v. 3 (9), p. 625 - 629, 2009.
- ANESINI, C.; PEREZ, C. "Screening of plants used in Argentine folk medicine for antimicrobial activity". **Journal of Ethnopharmacology**, v. 39, p. 119 - 128, 1993.
- APLIN, A. E.; HOWE, A.; ALAHARI, S. K.; JULIANO, R. L. Signal transduction and signal modulation by cell adhesion receptors: the role of integrins, cadherins, immunoglobulin-cell adhesion molecules, and selectins. **Pharmacological Reviews**, v. 50, p. 197 - 263, 1998.
- APRIKIAN, O.; DUCLOS, V.; GUYOT, S.; BESSON, C.; MANACH, C.; BERNALIER, A.; MORAND, C.; RÉMÉSY, C.; DEMIGNÉ, C. Apple Pectin and a Polyphenol-Rich Apple

Concentrate Are More Effective Together Than Separately on Cecal Fermentations and Plasma Lipids in Rats. **Journal of Nutrition**, v. 133, p. 1860 - 1865, 2003.

ARAVIND, K., R. PRADEEPA AND R. DEEPA: Diabetes and coronary artery disease. **Indian Journal Medical Research.**, v. 116, p. 163 - 176, 2002.

ARKKILA, P. E.T.; KOSKINEN, P.J.; KANTOLA, I.M.; RONNEMAA, T.; SEPPANEN, E.; VIIKARI, J.S. Diabetic complications are associated with liver enzyme activities in people with type 1 diabetes. **Diabetes Research and Clinical Practice.** v. 52, p. 113 - 118, 2001.

ARMSTRONG, B. K.; BROWN, J. B.; CLARKE, H. T. Diet and reproductive hormones: a study of vegetarian and non vegetarian postmenopausal women. **Journal of the National Cancer Institute.** v. 67, p. 761 - 767, 1981.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTRY (A.O.A.C). **Official methods of analysis of the association of official analytical chemistry.** 15^a ed. Arlington: Virginia, 1990. 1115p.

AZÉMAR, M.; HILDENBRAND, B.; HAERING, B.; HEIM, M. E.; UNGER, C. Clinical Benefit in Patients with Advanced Solid Tumors Treated with Modified Citrus Pectin: A Prospective Pilot Study. **Clinical Medicine: Oncology**, v. 1, p. 73 - 80, 2007.

BALUNAS, A. M. J.; JONESA W. P.; CHIN Y.; MIA, Q.; FARNSWORTH, N. R.; SOEJARTOA, D. D.; CORDELLA, G. A.; SWANSONA, S. M.; PEZZUTOA, J. M.; CHAI, H.-B.; KINGHORN, A. D. Relationships between Inhibitory Activity against a Cancer Cell Line Panel, Profiles of Plants Collected, and Compound Classes Isolated in an Anticancer: Drug Discovery Project. **Chemistry & Biodiversity**, v. 3, 897 - 915, 2006.

BARRETT, A. J.; NORTHCOT, D. H. Apple fruit pectic substances. **Biochemical Journal**, v. 94, p. 617 - 627, 1965.

BASTARD, J.; MAACHI, M.; LAGATHU, C.; KIM, M. J.; CARON, M.; VIDAL, H.; CAPEAU, J.; FEVE, B. Recent advances in the relationship between obesity, inflammation and insulin resistance. **European Cytokine Network**, v. 17 (1), p. 4 - 12, 2006.

BASTARD, J.P; MAACHI, M.; TRAN VAN NHIEU, J., JARDEL, C.; BRUCKERT, E.; GRIMALDI, A.; ROBERT, J.J.; CAPEAU, J.; HAINQUE, B. Adipose tissue IL-6 content correlates with resistance to insulin activation of glucose uptake both in vivo and in vitro. **Journal Clinical Endocrinology Metabolism.** v. 87, p. 2084-2089, 2002.

BEAUMONT, D. M.; MARK, T. M.; J.R.; HILLS, R.; DIXON, P.; VEIT, B.; GARRETT, N. The effects of chrysin, a *Passiflora incarnata* extract, on natural killer cell activity in male Sprague-Dawley rats undergoing abdominal surgery. **Journal American Association of Nurse Anesthetists**, v. 76 (2), p.113 - 117, 2008.

BENNETT, N.; GRECO D. S.; PETERSON, M. E.; KIRK C.; MATHES, M.; FETTMAN, M. J. Comparison of a low carbohydrate-low fiber diet and a moderate carbohydrate-high fiber diet in the management of feline diabetes mellitus. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 8, p. 73 - 84, 2006.

BERNE, R. M.; GENUTH, S. M. **Fisiologia**. 4ª ed. Rio de Janeiro; Guanabara Koogan, 2000, p. 190.

BERTRAM J. S. The molecular biology of cancer. **Molecular aspects of medicine** v. 21, p. 167 - 223, 2001.

BETTERIDGE, D. J. Lipids and atherogenesis in diabetes mellitus. **Atherosclerosis**, v. 124, p. 43 - 47, 1996.

BIESSELS, G., J.; STAEKENBORG, S.; BRUNNER, E.; BRAYNE, C.; SCHELTENS, P. Risk of dementia in diabetes mellitus: a systematic review. **Lancet Neurology**, v. 5, p. 64 - 74, 2006.

BLASCHEK, W.; KASBAUER, J.; KRAUS, J.; FRANZ, G. *Pythium aphanidermatum*: culture, cell-wall composition, and isolation and structure of antitumor storage and solubilised cell-wall (1-3), (1-6)-beta-D-glucans. **Carbohydrate Research**, v. 231, p. 293 - 307, 1992.

BLISS, M. **The Discovery of Insulin**. Chicagos. University of Chicago. Press, 2000. Citado por REES; ALCOLADO, 2005.

BLUMENRANTZ, N.; ASBOE-HANSEN, G. New method form quantitative determination of uronic acids, **Analytical Biochemistry**, v. 54, p. 484 - 489, 1973.

BNOUHAM, M.; ZIYYAT, A.; MEKHFI, H.; TAHRI, A.; LEGSSYER, A. Medicinal plants with potential antidiabetic activity - A review of ten years of herbal medicine research (1990-2000). **International Journal of Diabetes and Metabolism**, v.14, p.1 - 25, 2006.

BOMBINI, G.; CANETTI, C.; ROCHA, F.A.; CUNHA, F.Q. Tumour necrosis factor-alpha mediates neutrophil migration to the knee synovial cavity during immune inflammation. **European Journal of Pharmacology**, v. 496, p. 197 - 204, 2004.

BOS, J. L. ras Oncogenes in human cancer: a review. **Cancer research**, v. 49, p. 4682 -4689, 1989.

BOUCK, N.; STELLMACH, V.; HSU, S. C. How tumors become angiogenic. **Advances in Cancer Research**, v. 69, p. 135 - 174, 1996.

BRAGA, A.; MEDEIROS, T. P.; ARAÚJO, B. V. Investigação da atividade antihiperlipidemiante da farinha da casca de *Passiflora edulis* Sims, Passifloraceae, em ratos diabéticos induzidos por aloxano. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20 (2), p. 186 - 191, 2010.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. Estimativa 2010: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer. - Rio de Janeiro: INCA, 2009.

BRECKER, L.; WICKLEIN, D.; MOLL, H.; FUCHS, E.C.; BECKER, W.M.; PETERSEN, A. Structural and immunological properties of arabinogalactan polysaccharides from pollen of timothy grass (*Phleum pratense* L.). **Carbohydrate Research**, v. 340, p. 657 - 663, 2005.

- BROADHURST, C. L.; POLANSKY, M. M.; ANDERSON, R. A. Insulin-like biological activity of culinary and medicinal plant aqueous extracts in vitro. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 48, p. 849 - 852, 2000.
- BRUCE, A.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Biologia Molecular da Célula**, 4ª edição, Artmed, 2002.
- BRYAN, T. M.; CECH, T. R. Telomerase and the maintenance of chromosomes ends. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 11, p. 318 - 324, 1999.
- BUCKERIDGE, M. S.; TINÉ, M. A. S. Composição polissacarídica: estrutura da parede celular e fibra alimentar. **Instituto de Botânica de São Paulo**, 2000.
- CANETTI, C.; SILVA, J.S.; FERREIRA, S.H.; CUNHA, F.Q. Tumour necrosis factor alpha and leukotriene B(4) mediate the neutrophil migration in immune inflammation. **British Journal of Pharmacology**, v. 134, p. 1619 - 1628, 2001.
- CAPASSO, A.; SORRENTINO, L. Pharmacological studies on the sedative and hypnotic effect of *Kava kava* and *Passiflora* extracts combination. **Phytomedicine**, v. 12, p. 39 - 45, 2005.
- CAPEL, F.; NICOLAI, T.; DURAND, D.; BOULENGUER, P.; LANGENDORFF, V. Calcium and acid induced gelation of (amidated) low methoxyl pectin. **Food Hydrocolloids**, v. 20 (6), p. 901 - 907, 2006.
- CATOIRE, L.; PIERRON, M.; MORVAN, C.; HERVE´ DU PENHOAT, C.; GOLDBERG, R. Investigation of the action patterns of pectin methylesterase isoforms through kinetic analysis and NMR spectroscopy. Implications in cell wall expansion. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273 (50), p. 33150 - 33156, 1998.
- CHAU, C. F.; HUANG, Y. L. Effects of the insoluble fiber derived from *Passiflora edulis* seed on plasma and hepatic lipids and fecal output. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 49, p. 786 - 790, 2005.
- CHEN, H. Cellular inflammatory responses: Novel insights for obesity and insulin resistance. **Pharmacological Research**, v. 53, p. 469 - 477, 2006.
- CHEN, W. H.; LI, X. Y. Extraction of pectin from apple peel by salting method. **Food Science**, v. 4, p. 22 - 25, 1994.
- CHEN, X.; JIN, J.; TANG, J.; WANG, Z.; WANG, J.; JIN L.; LU, J. Extraction, purification, characterization and hypoglycemic activity of a polysaccharide isolated from the root of *Ophiopogon japonicus*. **Carbohydrate Polymers**, v. 83, p. 749 - 754, 2011.
- CHENG, H.; LI, Y.; GAO, X.; HAO, M.; WANG, J.; ZHANG, X.; TAI, G.; ZHOU, Y. Comparative studies of the antiproliferative effects of ginseng polysaccharides on HT-29 human colon cancer cells. **Medical Oncology**, v. 28 (1), p. 175 - 181, 2010.
- CHIARELLI, F.; MARTINO, M.; MEZZETTI, A.; CATINO, M.; MORGESE G.; CUCCURULLO, F.; VERROTTI, A. Advanced glycation end products in children and

adolescents with diabetes: Relation to glycemic control and early microvascular complications. **The Journal of Pediatrics**, v.134 (4), p. 486 - 491, 1999.

CHIHARA, G.; HAMURO, J.; ARIA, Y.; FUKUOKA, F. Fractionation and purification of polysaccharides with marked antitumour activity, especially Lentinan from *Lentinus edodes* (Bark) sing, an edible mushroom. **Cancer Research**, v. 30, p. 2776 - 2781, 1970.

CHOPRA, R.N.; NAYAR, S.L.; CHOPRA, I.C. Glossary of Indian medicinal plants. **Council of Scientific and Industrial Research**, New Delhi, 1956.

CÓRDOVA, K. R. V.; GAMA, T. M. M. T. B.; WINTER, C. M. G.; NETO G. K.; FREITAS, R. J. S. Características físico-químicas da casca do maracujá amarelo (*Passiflora edulis* Flavicarpa Degener) obtida por Secagem. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, Curitiba, v. 23 (2), p. 221 - 230, 2005.

CORONA, M.; DÍAZ, A.; PÁEZ, G.; FERRER, J.; MÁRMOL, Z.; RAMONES, E. Extracción y caracterización de pectina de la corteza de parchita. **Revista de La Facultad de Agronomía – LUZ**, v. 13, p.785 - 791, 1996.

COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S. L. **Patologia estrutural e Funcional**. 5ª ed., Guanabara, p. 1277, 1996.

COUNTER, C. M.; AVLION, A. A.; LEFEUVRE, C. E.; STEWART, N. G.; GREIDER, C. W.; HARLEY, C. B.; BACCHETTI, S. Telomere shortening associated with chromosome instability is arrested in immortal cells which express telomerase activity. **EMBO Journal**, v. 11, p. 1921 - 1929, 1992.

COZZOLINO, R.; MALVAGNA, P.; SPINA, E.; GIORI, A.; FUZZATI, N.; ANELLI, A.; GAROZZO, D.; IMPALLOMENI, G. Structural analysis of the polysaccharide from *Echinacea angustifolia* radix. **Carbohydrate Polymers**, v. 65, p. 263 - 272, 2006.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Plants as a source of anti-cancer agents. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, p. 72 - 79, 2005.

CRAVEIRO, A. A.; CRAVEIRO, A. C.; QUEIROZ, D. C. Quitosana: a fibra do futuro. Fortaleza: **PADETEC**, p. 122, 1999.

CURRAN, R. C. Colon atlas of histopathology, 3ª ed. Oxford University Press, New York, 1990.

CUZZOCREA, S.; MAZZON, E.; CALABRO, G.; DUGO, L.; DE SARRO, A.; VAN DE LOO, F. A.; CAPUTI, A.P.; Inducible nitric oxide synthase-knockout mice exhibit resistance to pleurisy and lung injury caused by carrageenan. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 162 (5), p. 1859 - 1866, 2000.

D'ADDOSIO R, PAEZ G, MARIN M, MARMOL Z, FERRER J. Obtención y caracterización de pectina a partir de la cascara de parchita (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Degener). **Faculty of Agronomy Journal (LUZ)**, v. 22, p. 240 - 249, 2004.

- DA ROS, R.; ASSALONI, R.; CERIELLO, A. The preventive anti-oxidant action of thiazolidinediones: a new therapeutic prospect in diabetes and insulin resistance. **Diabetic Medicine**, v. 21, p. 1249 - 1252, 2004.
- DANDONA, P.; WEINSTOCK, R.; THUSU, K.; ABDEL-RAHMAN, E.; ALJADA, A.; WADDEN, T. Tumor necrosis factor-alpha in sera of obese patients: fall with weight loss. **Journal of Clinical Endocrinology Metabolism**, v. 83, p. 2907 - 2910, 1998.
- DANEMAN, D. Type 1 diabetes. **Lancet**, v. 58, p. 367 - 847, 2006.
- DANSB. **Functional Foods for Health**, 1998.
- DARVILL, A. G.; McNEILL, M.; ALBERSHEIM, P. The structure of plant cell walls: VIII. A new pectic polysaccharide. **Plant Physiology**, v. 62, p. 418 - 422, 1978.
- DAVY, B. M.; MELBY, C.L. The effect of fiber-rich carbohydrates on features of syndrome X. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 103, p. 86 - 96, 2003.
- De VRIES, J. A. Repeating units in the structure of pectin. In: PHILIPS, G. O.; WEDLOCK, D. J.; WILLIAMS, P. A. (Eds.). **Gums and stabilisers from the food industry**. Oxford: IRL Press, v. 4, p. 25-29, 1988.
- DELZENNE, N. M.; CANI, P. D. A place for dietary fibre in the management of the metabolic syndrome. **Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care**, v. 8, p. 636 - 640, 2005.
- DEVARAJ, S.; CHEUNG, A. T.; JIALAL, I.; GRIFFEN, S. C.; NGUYEN, D.; GLASER, N.; AOKI, T. Evidence of increased inflammation and microcirculatory abnormalities in patients with type 1 diabetes and their role in microvascular complications. **Diabetes**, v. 56, p. 2790 - 2796, 2008.
- DHAWAN, K.; DHAWAN, S.; SHARMA, A. *Passiflora*: a review update. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 94, p. 1 - 23, 2004.
- DI BONITO, P.; SANGUIGNO, E.; DI FRAIA, T.; FORZINATO, C.; BOCCIA, G.; SAIITA, F.; IARDINO M. R.; CAPALDO, B. Association of elevated serum alanine aminotransferase with metabolic factors in obese children: sex-related analysis. **Metabolism**, v. 58 (3), p. 368 - 372, 2009.
- DI STASI, L. C.; HIRUMA, C. A.; GUIMARÃES, E. M. Medicinal plants populary used in Brazilian Amazon. **Fitoterapia**, v. 65 (6), p. 529 - 540, 1994.
- DIETRICH, M.; JIALA, I. The Effect of Weight Loss on a Stable Biomarker of Inflammation, C-Reactive Protein. **Nutrition Reviews**, v.63, p. 22 - 28, 2005.
- DOMER, J.; ELKINS, K.; ENNIST, D.; BAKER, P. Modulation of immune responses by surface polysaccharides of *Candida albicans*. **Reviews of infectious diseases**, v. 10 (2), p. 419 - 422, 1998.

- DOYAMA, J. T.; RODRIGUES, H. G.; NOVELLI, E. L. B.; CEREDA, E.; VILEGAS, W. Chemical investigation and effects of the tea of *Passiflora alata* on biochemical parameters in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 96, p. 371 - 374, 2005.
- DUBUISSON, D.; DENNIS, S. G. The formalin test: a quantitative study of the analgesic affects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats. **Pain**, v. 21, p. 161 - 174, 1977. Citado por ANDRADE, 2006.
- DUNN, J. S.; MCLETCHE, N. G. B. Experimental alloxan diabetes in the rat. **Lancet**, v. 2, p. 384, 1943.
- EBRINGEROVA, A.; KARDOSOVÁ, A.; HROMÁDKOVÁ, Z.; HRÍBALOVÁ, V. Mitogenic and comitogenic activities of polysaccharides from some European herbaceous plants. **Fitoterapia**, v. 74, p. 52 - 61, 2003.
- ECKEL, R.; GRUNDY, H. S. M.; ZIMMET, P. Z. The metabolic syndrome. **The Lancet**, v. 365, p. 1415 - 1428, 2005.
- EDEM, D. O. Hypoglycemic Effects of Ethanolic Extracts of Alligator Pear Seed (*Persea Americana Mill*) in Rats. **European Journal of Scientific Research**, v. 33 (4), p. 669 - 678, 2009.
- EDWIN, E.; SHEEJA, E.; DHANABAL, S. P.; SURESH, B. Antihyperglycemic activity of *Passiflora mollissima* Boiley. **Indian Journal Pharmacology Science**, v. 64, p. 570 - 571, 2007.
- EVANS, L. J. Antioxidants: do they have a role in the treatment of insulin resistance? **Indian Journal of Medical Research**, v. 125, p. 355 - 372, 2007.
- FANTONE, J. C.; WARD, P. A. Role of oxygen-derived free radicals and metabolites in leukocyte-dependent inflammatory reactions. **American Journal of Pathology**, v. 107, p. 395 - 418, 1982.
- FARIAS, R. A. F. **Efeitos hipoglicemiante e hipolipidêmico do *Croton cajucara* Benth em ratos**. 1997. 102f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará.
- FERRARI C. K. B.; TORRES E. A. F. S. Novos compostos dietéticos com propriedades anticarcinogênicas. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 48 (3), p. 375 - 382, 2002.
- FORD, E. S.; GILES, W. H.; MOKDAD, A. H. Increasing Prevalence of the Metabolic Syndrome Among U.S. Adults. **Diabetes Care**, v. 27, p. 2444 - 2449, 2004.
- FRAYN, K. N. Visceral fat and insulin resistance – causative or correlative? **Brazilian Journal Nutrition**, v. 83 (1), p.71 - 77, 2000.
- FRODE, T. S.; VARGAS, A. J.; GEREMIAS, D. S.; PROVENSÍ, G.; FORNARI, P. E.; REGINATTO, F. H.; GOSMANN, G.; SCHENKEL, E. P. *Passiflora alata* and *Passiflora edulis* spray-dried aqueous extracts inhibit inflammation in mouse model of pleurisy. **Fitoterapia**, v. 78 (2), p. 112 - 119, 2007.

FRÖDE, T.S.; MEDEIROS, Y.S. Myeloperoxidase and adenosine-deaminase levels in the pleural fluid leakage induced by carrageenan in the mouse model of pleurisy, **Mediators Inflammation**, v. 10, p. 223 - 227, 2001.

FUJIMOTO, M.; SHIMIZU, N.; KUNII, K.; MARTYN, J.A. J.; UEKI, K.; KANEKI, M. A Role for iNOS in Fasting Hyperglycemia and Impaired Insulin Signaling in the Liver of Obese Diabetic Mice. **Diabetes**, v. 54, p. 1340 - 1348, 2005.

FUKUSHIMA M.; OHASHI, T.; FUJIWARA, Y.; SONOYAMA, K.; NAKANO, M. Cholesterol-Lowering Effects of Maitake (*Grifola frondosa*) Fiber, Shiitake (*Lentinus edodes*) Fiber, and Enokitake (*Flammulina velutipes*) Fiber in Rats. **Experimental Biology and Medicine**, v. 226 (8), p. 758 - 765, 2001.

GALISTEO, M.; DUARTE, J.; ZARZUELO, A. Effects of dietary fibers on disturbances clustered in the metabolic syndrome. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 19, p. 71 - 84, 2008.

GAN, L.; ZHANG, S. H.; YANG, X. L.; XU, H. B. Immunomodulation and antitumor activity by a polysaccharide-protein complex from *Lycium barbarum*. **International Immunopharmacology**, v. 4, p. 563 - 569, 2004.

GANNON, M. C.; NUTTALL, F. Q. Control of blood glucose in type 2 diabetes without weight loss by modification of diet composition. **Nutrition & Metabolism**, v. 3 (16), p. 1 - 8, 2006.

GARNER, R. E.; HUDSON, J. A. Intravenous injection of Candida-derived mannan results in elevated tumor necrosis factor alpha levels in serum. **Infection and Immunity**, v. 64, p. 4561 - 4566, 1996.

GIACCO, R.; PARILLO, M.; RIVELLESE, A. A.; LASORELLA, G.; GIACCO, A.; D'EPISCOPO, L.; RICCARDI, G. Long-term dietary treatment with increased amounts of fiber-rich low-glycemic index natural foods improves blood glucose control and reduces the number of hypoglycemic events in type 1 diabetic patients. **Diabetes care**, v. 23 (10), p. 1461 - 1466, 2000.

GIUNTINI F.; NISTRI, D.; CHITI, G.; FANTETTI, L.; JORI, G.; RONCUCCI G. Synthesis of trimethylammoniumphenylthio-substituted phthalocyanines with different pattern of substitution. **Tetrahedron Letters**, v. 44 (3), p. 515 - 517, 2003.

GLINSKY, V. V.; RAZ, A. Modified citrus pectin anti-metastatic properties: one bullet, multiple targets. **Carbohydrate Research**, v. 344, p. 1788 - 1791, 2009.

GODOY, P. Pâncreas Endócrino. In: **BOGLIOLO, L. Patologia**. 6^a. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 1004 - 1008, 2000. Citado por NEGRI, G. (2005).

GOLDBERG, R. B. Cytokine and Cytokine-Like Inflammation Markers, Endothelial Dysfunction, and Imbalanced Coagulation in Development of Diabetes and Its Complications. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 94, p. 3171 - 3182, 2009.

- GOMATHY, R.; VIJAYALEKSHMI, N. R.; KURUP, P. A. Hypoglycemic action of the pectin present in the juice of the inflorescence stalk of plantain (*Musa sapientum*)-Mechanism of action. **Journal of Biosciences**, v. 15 (4), p. 297 - 303, 1990.
- GONÇALVES FILHO, A.; TORRES, O. J. M.; CAMPOS, A. C. L.; TÂMBARA FILHO, R.; ROCHA, L. C. A.; THIEDE, A.; LUNEDO, S. M. C.; BARBOSA, R. E. A.; BERNHARDT, J. A.; VASCONCELOS, P. R. L. Effect of *Passiflora edulis* (passion fruit) extract on rats bladder wound healing: morphological study. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 21 (2), p. 3 - 8, 2006.
- GONDIM, J. A. M.; MOURA, M. F. V.; DANTAS, A. S.; MEDEIROS, R. L. S.; SANTOS, K. M. Composição centesimal e de minerais em cascas de frutas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 25 (4), p. 825 - 827, 2005.
- GONZAGA, M. L.C.; BEZERRA, D.P.; ALVES, A.P.N.N.; ALENCAR, N.M.N.; MESQUITA, R.O.M.W.L.; SOARES, S. A.; PESSOA, C.; MORAES, M.O.; COSTA-LOTUFO, L.V. In vivo growth-inhibition of Sarcoma 180 by an α -(1 \rightarrow 4)-glucan- β -(1 \rightarrow 6)-glucan-protein complex polysaccharide obtained from *Agaricus blazei* Murill. **Journal of Natural Medicine**, v. 63, p.32-40, 2009.
- GOTTLIEB, O.; KAPLAN, M. A. Das plantas medicinais aos fármacos naturais. **Ciência Hoje**, v. 15, p. 51 - 54, 1993.
- GRASDALEN, H.; BAKOI, O. E.; LARSEN, B. Determination of the degree of esterification and the distribution of methylated and free carboxyl groups in pectins by $^1\text{H-NMR}$ spectroscopy. **Carbohydrate Research**, v. 184, p. 183 - 191, 1988.
- GRAY, A.M; FLATT, P.R. Actions of the traditional antidiabetic plant, *Agrimonia eupatoria* (agrimony): effects on hyperglycaemia, cellular glucose metabolism and insulin secretion. **Brazilian Journal Nutrition**, v. 80, p. 109 - 114, 1998.
- GROVER, J. K.; YADAV, S.; VATS, V. J. Medicinal plants of India with anti-diabetic potential. *Ethnopharmacology*, v. 81 (1), p. 81 - 100, 2002.
- GRUNDY, S. M.; CLEEMAN, J.I.; DANIELS, S.R.; DONATO, K. A.; ECKEL, R.H.; FRANKLIN, B.A.; GORDON, D.J.; KRAUSS, R.M.; SAVAGE, P.J.; SMITH, S.C.; SPERTUS, J.A.; COSTA, F. Diagnosis and Management of the Metabolic Syndrome. **Circulation**, v. 112, p. 2735 - 2752, 2005.
- GUERCI, B.; BOHME, P.; KEARNEY-SCHWARTZ, A.; ZANNAD, F.; DROUIN, P. Endothelial dysfunction and type 2 diabetes. II. Altered endothelial function and the effects of treatments in type 2 diabetes mellitus. **Diabetes Metabolism**, v. 27, p. 436 - 447, 2001.
- GUERRE-MILLO, M. Adipose tissue and adipokines: for better or worse. **Diabetes and Metabolism**, v. 30, p. 13 - 19, 2004.
- GUILLON, F.; CHAMP, M. Structural and physical properties of dietary fibres, and consequences of processing on human physiology. **Food Research International**, v. 33, p. 233 - 245, 2000.

- GUO, Y.; MATSUMOTO, T.; KIKUCHI, Y.; IKEJIMA, T.; WANG, B.; YAMADA, H. Effects of a pectic polysaccharide from a medicinal herb, the roots of *Bupleurum falcatum* L. on interleukin 6 production of murine B cells and B cell lines. **Immunopharmacology**, v. 49, p. 307 - 316, 2000.
- GUPTA, R. K.; KESARI, A. N.; WATAL, G.; MURTHY, P. S.; RAMESH, C. M. K.; TANDON, V. Nutritional and hypoglycemic effect of fruit pulp of *Annona squamosa* in normal healthy and alloxan-induced diabetic rabbits. **Annals of Nutrition and Metabolism**, v. 49 (6), p. 407 - 413, 2005.
- HANAHAHAN, D.; FOLKMAN, J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. **Cell**, v. 86, p. 353 - 364, 1996.
- HANAHAHAN, D.; WEINBERG R., A. The Hallmarks of cancer. **Cell**, v. 100, p. 57 - 70. 2000.
- HARRIS, C. C. p53 tumor suppressor gene: from the basic research laboratory to the clinic-an abridged historical perspective. **Carcinogenesis**, v. 17, p. 1187 - 1198, 1996.
- HEILBRONN, L. K.; CAMPBELL, L. V.; Adipose tissue macrophages, low grade inflammation and insulin resistance in human obesity, **Current Pharmaceutical Design**, v. 14 (12), p. 1225 - 1230, 2008.
- HERNANDEZ-GALICIA, E.; AGUILAR-CONTRERAS, A.; AGUILAR-SANTAMARIA, L.; ROMAN-RAMOS, R.; CHAVEZ-MIRANDA, A.; GARCIA-VEGA, L. M.; FLORES-SAENZ, J. L.; ALARCON-AGUILAR, F. J. Studies on Hypoglycemic Activity of Mexican Medicinal Plants. **Proceedings of the Western Pharmacology Society**, v. 45, p. 118 - 124, 2002.
- HICKEY, M.; KING, C. 100 Families of Flowering Plants. **The New Royal Horticultural Society Dictionary of Gardening**, v. 3, 1988.
- HIGAI, K.; AZUMA, Y.; MATSUMOTO, K. Altered glycosylation of α -acid glycoprotein in patients with inflammation and diabetes mellitus. **Clinica Chimica Acta**, v. 329, p. 117 - 125, 2003.
- HINCHCLIFFE, M., ILLUM, L. Intranasal insulin delivery and therapy. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 35, p.199-234, 1999.
- HUNSKAAR, S.; FASMER, O. B.; HOLE, K. Formalin test in mice a useful technique for evaluating mild analgesics. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 14, p. 69 - 76, 1985.
- HWANG, H. S.; YUN, J. W. Hypoglycemic Effect of Polysaccharides Produced by Submerged Mycelial Culture of *Laetiporus sulphureus* on Streptozotocin induced Diabetic Rats. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 15, p. 173 - 181, 2010.
- IAGHER, F.; REICHER, F.; GANTER, J. L. M. Structural and rheological properties of polysaccharides from mango (*Mangifera indica* L.) pulp. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 31, p. 9 - 17, 2002.
- ICHIMURA, T.; YAMANACA, A.; ICHIBA, T.; TOYOKAWA, T.; KAMADA, Y.; TAMAMURA, T.; MARUYAMA, S. Antihypertensive Effect of on Extract of *Passiflora*

edulis Rind in Spontaneously Hipertensive Rats. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 70 (3), p. 718 - 721, 2006.

IGNARRO, L. J.; BALESTRIERI, M. L.; NAPOLI, C. Nutrition, physical activity, and cardiovascular disease: An update. **Cardiovascular Research**, v. 73, p. 326 - 340, 2007.

INNGJERDINGEN, K. T.; DEBES, S. C.; INNGJERDINGEN, M.; HOKPUTSA, S.; HARDING, S. E.; ROLSTAD, B.; MICHAELSEN, T. E.; DIALLO, D.; PAULSEN, B. S. Bioactive pectic polysaccharides from *Glinus oppositifolius* (L.) Aug. DC., a Malian medicinal plant, isolation and partial characterization. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 101, p. 204 - 214, 2005.

INNGJERDINGEN, K. T.; KIYOHARA, H.; MATSUMOTO, T.; PETERSEN, D.; MICHAELSEN, T. E.; DIALLO, D.; INNGJERDINGEN, M.; YAMADA, H.; PAULSEN, B. S. An immunomodulating pectic polymer from *Glinus oppositifolius*. **Phytochemistry**, v. 68, p. 1046 - 1058, 2007.

INSTITUTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS (I.T.A.L.). Maracujá: da cultura ao processamento e comercialização. São Paulo: Secretaria de Agricultura de São Paulo, (Série Frutas Tropicais), 206p, 1980.

ITOKAWA, H.; NATSCHKE, S. L. M.; AKIYAMAN, T.; LEE, K, H. Plant-derived natural product research aimed at new drugs discovery. **Journal of Natural Medicine**, v. 62, p. 263 - 280, 2008.

JACKSON, C. L.; DREADEN, T. M.; THEOBALD, L. K.; TRAN, N. M.; BEAL, T. L.; EID, M.; GAO, M. Y.; SHIRLE, R. B.; STOFFEL, M. T.; KUMAR, M. V.; MOHNEN, D. Pectin induces apoptosis in human prostate cancer cells: correlation of apoptotic function with pectin structure. **Glycobiology**, v. 17 (8), p. 805 - 819, 2007.

JAMIR, T. T.; SHARMA H. K.; DOLUI A. K. Folklore medicinal plants of Nagaland, India. **Fitoterapia**, v. 70 (4), p. 395 - 401, 1999.

JANEBRO, D. I.; QUEIROZ, M. S. R.; RAMOS, A. T.; SABAA-SRUR, A. U. O.; CUNHA, M. A. L.; DINIZ, M. F. F. M. Efeito da farinha da casca do maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg.) nos níveis glicêmicos e lipídicos de pacientes diabéticos tipo 2. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 724 - 732, 2008.

JANEBRO, D. I.; QUEIROZ, M. S. R.; SABAA-SRUR, A. U. O.; CUNHA, M. A. L.; DINIZ, M. F. F. M. Análise dos componentes da síndrome metabólica antes e após a suplementação alimentar com farinha da casca do maracujá, em pacientes diabéticos. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, vol. 42 (3), p. 217 - 222, 2010.

JENKINS, A. L.; JENKINS, D. J. A.; WOLEVER, T. M. S.; ROGOVIK, A. L.; JOVANOVSKI, E.; BOŽIKOV, V.; RAHELIC, D.; VUKSAN, V. Comparable Postprandial Glucose Reductions with Viscous Fiber Blend Enriched Biscuits in Healthy Subjects and Patients with Diabetes Mellitus: Acute Randomized Controlled Clinical Trial. **Croatian Medical Journal**, v. 49 (6), p. 772 - 782, 2008.

JENKINS, D. J. A.; WOLEVER, T. M. S.; LEEDS, A. R.; GASSULL, M. A.; HAISMAN, P.; DILAWARI, J.; GOFF, D. V.; METZ, G. L.; ALBERTI, K. G. M. M. Dietary fibres, fibre analogues, and glucose tolerance: importance of viscosity. **British Medical Journal**, v. 1, p. 1392 - 1394, 1978.

JORNAYVAZ, F. R.; BRULHART-MEYNET, M. C.; JAMES, R. W. Myeloperoxidase and paraoxonase-1 in type 2 diabetic patients. **Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases**, v. 19, p. 613 - 619, 2009.

JOYE, D. D.; LUZIO, G. A. Process for selective extraction of pectins from plant material by differential pH. **Carbohydrate Polymers**, v. 43, p. 337 - 342, 2000.

KADOWAKI, T.; YAMAUCHI, T.; KUBOTA, N.; HARA, K.; UEKI, K.; TOBE, K. Adiponectin and adiponectin receptors in insulin resistance, diabetes, and the metabolic syndrome. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 116 (7), p. 1784 - 1792, 2006.

KALAPATHY, U.; PROCTOR, A. KAYODE, J.; SOLA, A.; ADELANI, A.; ADEYINKA, A.; KOLAWOLE, O.; BASHIRU, O. The Role of Carbohydrate in Diabetic Nutrition: A Review. **The Internet Journal of Laboratory Medicine**, v. 3 (2), 2009.

KER, J. F. R., WYLLIE, A. H.; CURRIE, A. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **Brazilian Journal of Cancer**. v. 24, p. 239-275, 1972.

KERSHAW, E.E; FLIER, J.S. Adipose tissue as an endocrine organ. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**. v. 89, p. 2548 - 2556, 2004.

KESARI, A. N.; GUPTA, R. K.; WATAL, G. Hypoglycemic effects of *Murraya koenigii* on normal and alloxan-diabetic rabbits. **Journal of Ethno-Pharmacology**, v. 97, p. 247 - 251, 2005.

KHAJURE, P.; RATHOD, J.L.P. Potential Anticancer Activity of *Acanthus ilicifolius* Extracted From the Mangroves Forest of Karwar, West Coast of India. **World Journal of Science and Technology**, v. 1(1), p. 1 - 6, 2011.

KHATTAK, M. M. A. K. Physiological Effects of Dietary Complex Carbohydrates and its Metabolites Role in Certain Diseases. **Pakistan Journal of Nutrition**, v. 1 (4), p. 161 - 168, 2002.

KIM, J. Y.; YOON, Y. D.; AHN, J. M.; KANG, J. S.; PARK, S. K.; LEE, K.; SONG, K. B.; KIM, H. M.; HAN, S. B. Agelan isolated from *Angélica gigas* Nakai induces dendritic cell maturation through toll like receptor 4. **International Immunopharmacology**, v. 7, p. 78 - 87, 2007.

KIM, L.S.; WATERS, R.F.; BURKHOLDER, P.M. Immunological activity of larch arabinogalactan and Echinacea: a preliminary, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. **Alternative Medicine Review**, v. 7, p. 138 - 149, 2002.

KIM, M. High-methoxyl pectin has greater enhancing effect on glucose uptake in intestinal perfused rats. **Nutrition**, v. 21, p. 372-377, 2005.

KIM, M.; SHIN, H. K. The Water-Soluble Extract of Chicory Influences Serum and Liver Lipid Concentrations, Cecal Short-Chain Fatty Acid Concentrations and Fecal Lipid Excretion in Rats. **The Journal of Nutrition**, v. 128 (10), p. 1731 - 1736, 1998.

KING, D. E. Dietary Fiber, Inflammation, and Cardiovascular Disease. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 49, p. 594 - 600, 2005.

KING, G. L. The Role of Inflammatory Cytokines in Diabetes and Its Complications. **Journal of Periodontology**, v. 79 (8), p. 1527 - 1534, 2008.

KIRTIKAR, K.P.; BASU, B.D. Indian medicinal plants. **Jayyed Press, New Delhi**, 2^a ed., 4 v., 1975.

KLIEMANN, E.; SIMAS, K. N.; AMANTE, E. R.; PRUDÊNCIO, E. S.; TEÓFILO, R. F.; FERREIRA, M. M. C.; AMBONI, R. D. M. C. Optimisation of pectin acid extraction from passion fruit peel (*Passiflora edulis flavicarpa*) using response surface methodology. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 44, p. 476 - 483, 2009.

KODAMA, T.; SENDO, F.; KOBAYASHI, H. Leukemoid Reaction in BALB/c Mice Bearing Transplanted Tumors. **Cancer Research**, v. 34, p. 176 - 180, 1974.

KOSKI, R. R. Practical Review of Oral Antihyperglycemic Agents for Type 2 Diabetes Mellitus. **Pharmacy update**, v. 32 (6), p. 869 - 877, 2006.

KULKARNI, S.G.; VIJAYANAND, P. Effect of extraction conditions on the quality characteristics of pectin from passion fruit peel (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* L.). **Food Science and Technology**, v. 43, p. 1026 - 1031, 2010.

KUZUYA, T.; NAKAGAWA, S.; SATOH, J.; KANAZAWA, Y.; IWAMOTO, Y.; KOBAYASHI, M. Report of the Committee on the classification and diagnostic criteria of diabetes mellitus. **Diabetes Research Clinical Practice**, v. 55 (1), p. 65 - 85, 2002.

LEHNINGER, L. A.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica**. 4^a ed, São Paulo: SARVIER, 2006.

LEUNG, M. Y. K.; LIU, C.; KOON, J. C. M.; FUNG, K. P. Polysaccharide biological response modifiers. **Immunology Letters**, v. 105, p. 101 - 114, 2006.

LEVIGNE, S.; RALET, M.C.; THIBAUT, J.F. Characterisation of pectins extracted from fresh sugar beet under different conditions using an experimental design. **Carbohydrate Polymers**, v. 49, p. 145 - 153, 2002.

LI, F.; LI, Q.; GAO, D.; PENG, Y.; FENG, C. Preparation and antidiabetic activity of polysaccharide from *Portulaca oleracea* L. **African Journal of Biotechnology**, v. 8 (4), p. 569 - 573, 2009.

LI, J.; LI, Q.; FENG, T.; ZHANG, T.; LI, K.; ZHAO, R.; HAN, Z.; GAO, D. Antitumor activity of crude polysaccharides isolated from *Solanum nigrum* Linne on U14 cervical carcinoma bearing mice. **Phytotherapy research**, v. 21, p. 832 - 840, 2007.

LI, W.; YAJIMA, T.; SAITO, K.; NISHIMURA, H.; FUSHIMI, T.; OHSHIMA, Y.; TSUKAMOTO, Y.; YOSHIKAY, Y. Immunostimulating properties of intragastrically administered *Acetobacter*-derived soluble branched (1,4)- β -D-glucans decrease murine susceptibility to *Listeria monocytogenes*. **Infection and Immunity**, v. 72, p. 7005 - 7011, 2004.

LIESE, A. D.; LAWSON, A.; SONG, H.-R.; HIBBERT, J. D.; PORTER, D. E.; NICHOLS, M.; LAMICHHANE, A. P.; DABELEA, D.; MAYER-DAVIS, E. J.; STANDIFORD, D.; LIU, L.; HAMMAND, R. F.; D'AGOSTINO JR., R. B. Evaluating geographic variation in type1 and type2 diabetes mellitus incidence in youth in four US regions. **Health & Place**, v. 16, p. 547 - 556, 2010.

LIMA, M. S.; PAIVA, E. P.; ANDRADE, S. A. C.; PAIXÃO, J. A. Fruit pectins – A suitable tool for screening gelling properties using infrared spectroscopy. **Food Hydrocolloids**, v. 24, p. 1 - 7, 2010.

LIN, Y. L.; JUAN, I. M.; CHEN, Y. L.; LIANG, Y. C.; LIN, J. K., Composition of polyphenols in fresh tea leaves and associations of their oxygen-radial absorbing capacity with antiproliferative actions in fibroblast cells. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, p. 1387 - 1394, 1996.

LINS, K. O. A.; BEZERRA, D. P.; ALVES, A. P. N. N.; ALENCAR, N. M. N.; LIMA, M. W.; TORRES, V. M.; FARIAS, W. R. L.; PESSOA, C.; MORAES, M. O.; LOTUFO, L. V. C. Antitumor properties of a sulfated polysaccharide from the red seaweed *Champia feldmannii* (Diaz Pifferer). **Journal of Applied Toxicology**, v. 29, p. 20 - 26, 2009.

LIU, C.; LEUNG, M. Y. K.; KOON, J. C. M.; ZHU, L. F.; HUI, Y. Z.; YU, B.; FUNG, K. P. Macrophage activation by polysaccharide biological response modifier isolated from *Aloe vera* L. var. *chinensis* (Haw.) Berg. **International Immunopharmacology**, v. 6, p. 1634 - 1641, 2006.

LORIA, V.; DATO, I.; GRAZIANI, F.; BIASUCCI, L. M. Myeloperoxidase: A New Biomarker of Inflammation in Ischemic Heart Disease and Acute Coronary Syndromes. **Mediators of Inflammation**, v. 2008, p. 1 - 4, 2008.

LUCA, C.; OLEFSKY, J. M. Inflammation and insulin resistance. **FEBS Letters**, v. 582, p. 97 - 105, 2008.

LUCISANO, Y. M.; MANTOVANI, B. Lysosomal enzyme release from polymorphonuclear leukocytes induced by immune complexes of IgM and of IgG. **The Journal of Immunology**, v. 132, p. 2015 - 2020, 1984.

LUNDQUIST, I.; RERUP, C. On the development of alloxan diabetes in mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 7, p. 89 - 96, 1969.

LYON, M. R.; REICHERT, R. G. The effect of a Novel Viscous Polysaccharide along with Lifestyle Changes on Short-Term Weight Loss and Associated Risk Factors in Overweight and Obese Adults: An Observational Retrospective Clinical Program Analysis. **Alternative Medicine Review**, v. 15 (1), p. 68 - 75, 2010.

- MADHAV, A.; PUSHPALATHA, P. B. Quality Degradation of Jellies Prepared Using Pectin Extracted from Fruit Wastes. **Journal of Tropical Agriculture**, v. 40, p. 31 - 34, 2002.
- MADHURI, S.; PANDEY G. Some anticancer medicinal plants of foreign origin. **Current Science**, v. 96 (6), p. 779 - 783, 2009.
- MADHURI, S.; PANDEY, G. Some dietary agricultural plants with anticancer properties. **Plant Arch**, v. 8, p. 13 - 16, 2008.
- MAGGI, L. B. JR.; SADEGHI, H.; WEIGAND, C.; SCARIM, A. L.; HEITMEIER, M. R.; CORBETT, J. A. Anti-inflammatory actions of 15-deoxy-12,14-prostaglandin J2 and troglitazone: evidence for heat shock-dependent and - independent inhibition of cytokine-induced inducible nitric oxide synthase expression. **Diabetes**, v. 49, p. 346 - 355, 2000.
- MARRIQUE, G. D.; LAJOLO, F. M. FT-IR spectroscopy as a toll for measuring degree of methyl esterification in pectins isolated from ripening papaya fruit. **Postharvest Biology and Technology**, v. 25, p. 99 - 107, 2002.
- MASTEIKOVA, R.; BERNATONIENE, J.; BERNATONIENE, R.; VELZIENE, S. Antiradical activities of the extract of *Passiflora incarnata*. **Acta Poloniae Pharmaceutica**, v. 65 (5), p. 577 - 583, 2008.
- MATSUMOTO, L., OTAGAKI, M., Pectin Content in Dried Peel of Passion Fruit. **Journal of Food Science**, v. 18, p. 132 - 137, 1990.
- MAYER, S. A.; GUSTAFSON, R K. Marine pharmacology in 2001-2: antitumor and cytotoxic compounds. **European Journal of Cancer**, v. 40, p. 2676 - 2704, 2004.
- MCGUIRE, C. M. *Passiflora incarnata* (Passifloreaceae): a new fruit crop. **Economic Botany**, v. 53, p. 161 - 176, 1999.
- MEDEIROS, J. S.; DINIZ, M. F. F. M.; SRUR, A. U. O. S.; PESSOA, M. B. Avaliação das atividades hipoglicemiantes e hipolipemiantes da casca do maracujá amarelo (*Passiflora edulis*, f. flavicarpa). **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 41 (2), p. 99 - 101, 2009.
- MEDINA, J. C. Cultura. In: GARCIA, J. L. M.; LARA, J. C. C.; TOCCHINI, R. P.; HASHIZUME, T.; MORETTI, V. A.; CANTO, W. L. Maracujá; da cultura ao processamento e comercialização. **Campinas: ITAL**, cap. 1, p. 5 - 105, 1980. (Série Frutas Tropicais, 9).
- MEIGS, J. B. The Metabolic Syndrome. **BMJ**, v. 327, p. 61 - 62, 2003.
- MEIGS, J. B.; WILSON, P. W. F.; FOX, C. S.; VASAN, R. S.; NATHAN, D. M.; SULLIVAN, L. M.; D'AGOSTINO, R. B. Body mass index, metabolic syndrome, and risk of type 2 diabetes or cardiovascular disease. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 91(8), p. 2906 - 2912, 2006.
- MELLO, V. D.; LAAKSONEN, D. E. Fibras na dieta: tendências atuais e benefícios à saúde na síndrome metabólica e no diabetes melito tipo 2. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 53 (5), p. 509 - 518, 2009.

- MIURA, T.; KOIKE, T.; ISHIDA, T. Antidiabetic Activity of Green Tea (*Thea sinensis* L.) in Genetically Type 2 Diabetic Mice. **Journal of Health Science**, v. 51, p. 708 - 710, 2005.
- MIZGERD, J. P.; SPIEKER, M. R.; DOERSCHUK, C. M. Early response cytokines and innate immunity: essential roles for TNFR1 and IL1R1 during *Escherichia coli* pneumonia in mice. **The Journal of Immunology**, v. 166, p. 4042 - 4048, 2001.
- MOLLER, D. E. Potential role of TNF- α in the pathogenesis of insulin resistance and type 2 diabetes. **Trends Endocrinology Metabolism**, v. 11, p. 212 - 217, 2000.
- MOMOH, S.; YUSUF, O. W.; ADAMU, M. M.; AGWU, C. O. C.; ATANU, F. O. Evaluation of the Phytochemical Composition and Hypoglycaemic Activity of Methanolic Leaves Extract of *Costus afer* in Albino Rats. **British Journal of Pharmaceutical Research**, v. 1 (1), p. 1 - 8, 2011.
- MONCADA, S.; PALMER, R. M.; HIGGS, E. A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. **Pharmacological Reviews**, v. 43, p. 109 - 142, 1991.
- MONTANHER A. B.; ZUCOLOTTI, S. M.; SCHENKEL, E. P.; FRÖDE, T. S. Evidence of anti-inflammatory effects of *Passiflora edulis* in an inflammation model. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 109, p. 281 - 288, 2007.
- MOONGKARNDI, P.; KOSEM, N.; LUANRATANA, O.; JONGSOMBOONKUSOL, S.; PONGPAN, N. Antiproliferative activity of Thai medicinal plant extracts on human breast adenocarcinoma cell line. **Fitoterapia**, v. 75, p. 375 - 377, 2004.
- MORI, D. M.; BAVIERA, A. M.; OLIVEIRA, R. L. T.; VENDRAMINI, R. C.; BRUNETTI, I. L.; PEPATO, M. T. Temporal response pattern of biochemical analytes in experimental diabetes. **Biotechnology and Applied Biochemistry, San Diego**, v.38, p.183 - 191, 2003.
- MORREY, D. B. The Nervous System. Passion flower (*Passiflora incarnata*). **Herbal Tonic Therapies**, p. 159 - 165, 1993.
- MORRISH, N. J.; WANG, S. L.; STEVENS, L. K.; FULLER, J. K.; KEEN H. Mortality and causes of death in the WHO multinational study of vascular disease in diabetes. **Diabetologia**, v. 44 (2), p. 14 - 21, 2001.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal Immunological Methods**, v. 65, p. 55 - 63, 1983.
- MOXON, E. R.; KROLL, J. S. The role of bacterial polysaccharide capsules as virulence factors. **Currents topics in microbiology and immunology**, v. 150, p. 65 - 85, 1990.
- MURUGESAN, G. S.; SATHISHKUMAR, M.; SWAMINATHAN, K. Supplementation of waste tea fungal biomass as a dietary ingredient for broiler chicks. **Bioresource Technology**, v. 96 (16), p. 1743 - 1748, 2005.

NANGIA-MAKKER P.; CONKLIN J.; HOGAN V.; RAZ A. Carbohydrate-binding proteins in cancer, and their ligands as therapeutic agents. **TRENDS in Molecular Medicine**, v.8 (4), p. 187 - 192, 2002.

NANTEL, F.; DENNIS, D.; GORDON, R.; NORTHEY, A.; CIRINO, M.; METTERS, K.M.; CHAN, C.C; Distribution and regulation of cyclooxygenases-2 in carrageenan-induced inflammation. **British Journal Pharmacology**, v. 128, p. 853 - 850, 1999.

NATHAN, C. Nitric Oxide as a Secretory Product of Mammalian Cells. **The FASEB Journal**, v.6, p. 3051 - 3064, 1996.

NEGRI, G. Diabetes Melito: Plantas e princípios ativos naturais hipoglicemiantes. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41 (2), 121 - 142, 2005.

NERGARD, C. S.; KIYOHARA, H.; REYNOLDS, J. C.; THOMAS-OATES, J. E.; MATSUMOTO, T., YAMADA, H.; MICHAELSEN, T. E.; DIALLO, D.; PAULSEN, B. S. Structure-immunomodulating activity relationships of a pectic arabinogalactan from *Vernonia kotschyana* Sch. Bip. ex Walp. **Carbohydrate Research**, v. 340, p. 1789 - 1801, 2005.

NISHIKAWA T.; EDELSTEIN D.; DU, X. L. Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. **Nature**, v. 404, p. 787 - 790, 2006.

NOWELL, P. C. The clonal evolution of tumor cell populations. **Science**, v. 194, p. 23 - 28, 1976.

NWOSU, M. O. Herbs for mental disorders. **Fitoterapia**, v. 70 (1), p. 58 - 63, 1999.

NYSTROM, T. C-reactive protein: a marker or a player? **Clinical Science**, v. 113 (2), p. 79 - 81, 2007.

OGA, S.; FREITAS, P. C.; SILVA, A. C. G.; HANADAS, S. Pharmacological trials of crude extract of *Passiflora alata*. **Planta Medica**, v. 50, p. 303 - 306, 1984.

OH, W. K.; LEE, C. H.; LEE, M. S.; BAE, E. Y.; SOHN, C. B.; OH, H.; KIM, B. Y.; AHN, J. S. Antidiabetic effects of extracts from *Psidium guajava*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 96, p. 411 - 415, 2005.

OJEWOLE, J. A. O. Antinociceptive, anti-inflammatory and antidiabetic properties of *Hypoxis hemerocallidea* Fisch. & C.A. Mey. (*Hypoxidaceae*) corm [‘African Potato’] aqueous extract in mice and rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 103, p. 126 - 134, 2006.

OKAWA, Y.; MURATA, Y.; KOBAYASHI, M.; SUZUKI, M.; SUZUKI, S. Augmentation of host resistance to *Candida albicans* infection in ascites tumor-bearing mice. **Microbiology and Immunology**, v.36, p. 517 - 521, 1992.

OLIVEIRA, E. P.; MARTINS, L. P. G.; UYEMMA, S. A.; PEDRAZZI, A. H. P. Diabetes mellitus – uma revisão. Parte II: Características clínicas, gerenciamento das dislipidemias em

pacientes com IDDM, diagnósticos e achados laboratoriais. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 29, p. 62 - 68, 1997. Citado por FARIAS, 1997.

OLIVEIRA, J. E. P.; MILECH, A. Diabete Mellitus: clinica, diagnóstico, tratamento multidisciplinar. **Ed. Atheneu**, São Paulo, 2004, 362 p., 2004.

OLSEN, S.; SOLEZ, K. Acute tubular necrosis and toxic renal injury. In **Renal Pathology: With Clinical and Functional Correlations**, 2nd ed. (C. C. Tisher and B. M. Brenner, eds.), p. 769 - 809, 1994.

OU, S.; KWOK, K.; LI Y.; FU L. In Vitro Study of Possible Role of Dietary Fiber in Lowering Postprandial Serum Glucose. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 1026 - 1029, 2001.

OVODOV, I. Polysaccharide of flower plants: structure and physiology activity. **Bioorg Khim**, v. 24, p. 483 - 501, 1998.

PANDEY, G.; MADHURI, S. Medicinal plants: better remedy for neoplasm. **Indian Drugs**, v. 43, p. 869 - 874, 2006.

PAPATHANASOPOULOS, A.; CAMILLERI, M. Dietary Fiber Supplements: Effects in Obesity and Metabolic Syndrome and Relationship to Gastrointestinal Functions. **Gastroenterology**, v. 138 (1), p. 65 - 72, 2010.

PARAMESH, S.; MAHESH, B.; SUCHETHA, K.; VIJAY, R.; PUSHPALATHA, K. C. A study on lipid profile and myeloperoxidase level in Type II diabetes mellitus with respect to age and gender. **Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences**, v. 2 (1), p. 335 - 341, 2011.

PARKS, E. J. Effect of Dietary Carbohydrate on Triglyceride Metabolism in Humans. **Journal of Nutrition**, v. 131, p. 2772 - 2774, 2001.

PAULSEN, B.S. Plant Polysaccharides with Immunostimulatory Activities. **Current Organic Chemistry**. 5, 939 - 950, 2001.

PEREIRA, G. R.; GASPARETTO, A.; GAIO, A. Análise Comparativa dos Níveis de Glicose Capilar x Glicose Venosa. **NewsLab**, ed. 79, p. 104 - 108, 2006.

PÉREZ, S.; MAZEAU, K.; du PENHOAT, C. H. The three-dimensional structures of the pectic polysaccharides. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 38, p. 37 - 55, 2000.

PERRONE, P.; HEWAG, H. C.; THOMSON, H. R.; BAILEY, K.; SADLER, I. H.; Fry, S. C. Patterns of methyl and O-acetyl esterification in spinach pectins: a new complexity. **Phytochemistry**, v. 60, p. 67-77, 2002.

PICKUP, J. C. Inflammation and Activated Innate Immunity in the Pathogenesis of Type 2 Diabetes. **Diabetes Care**, v. 27, p.813 - 823, 2004.

PICKUP, J.C.; MATTOCK, M.B.; CHUSNEY, G.D.; BURT, D. NIDDM as a disease of the innate immune system: association of acute-phase reactants and interleukin-6 with metabolic syndrome X. **Diabetologia**, v. 40, p.1286 - 1292, 1997.

PILON, G.; DALLAIRE, P.; MARETTE, A. Inhibition of inducible nitric-oxide synthase by activators of AMP-activated protein kinase: a new mechanism of action of insulin- sensitizing drugs. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279, p. 20767 - 20774, 2004.

PINHEIRO, E. R.; SILVA, I. M. D.A.; GONZAGA, L. V.; AMANTE, E. R.; TEÓFILO, R. F.; FERREIRA, M. M. C.; AMBONI, R. D. M. C. Optimization of extraction of high-ester Pectin From Passion Fruit Peel (*Passiflora edulis* Flavicarpa) with citric acid by using response surface methodology. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 5561 - 5566, 2008.

POPOV, S. V.; POPOVA, G. Y.; PADERIN, N. M.; KOVAL, A. O.; OVODOVA, R. G.; OVODOV, Y. S. Preventive antiinflammatory effect of potamogetonan, a pectin from the common pondweed *Potamogeton natans* L. **Phytotherapy Research**, v. 21, p. 609 - 614, 2007.

PRASAD, S. K.; KULSHRESHTHA, A.; QURESHI, T. N. Antidiabetic Activity of Some Herbal Plants in Streptozotocin Induced Diabetic Albino Rats. **Pakistan Journal of Nutrition**, v. 8 (5), p. 551 - 557, 2009.

PRESTWICH, R. J.; ERRINGTON, F.; HATFIELD, P.; MERRICK, A. E.; ILETT, E. J.; SELBY, P. J.; MELCHER, A. A. The immune system-is it relevant to cancer development, progression and treatment? **Clinical Oncology**, v. 20, p. 101 - 112, 2008.

PRINCE, L. R.; ALLEN, L.; JONES, E. C.; HELLEWELL, P. G.; DOWER, S. K.; WHYTE, M. K.; SABROE, I. The role of interleukin-1beta in direct and toll-like receptor 4-mediated neutrophil activation and survival. **American Journal of Pathology**, v. 165, p. 1819 - 1826, 2004.

PROSKI, L. When is dietary fiber considered a functional food?. **Biofactors**, v. 12, p. 289 - 297, 2000.

QI, L. U.; MEIGS, J. B.; LIU, S.; MANSON, J. E.; MANTZOROS, C.; HU, F. B. Dietary Fibers and Glycemic Load, Obesity, and Plasma Adiponectin Levels in Women With Type 2 Diabetes. **Diabetes Care**, v. 29, p. 1501 - 1505, 2006.

QUEIROZ, R. F.; MAXIMIANO, F. P.; NUNES, T. D. E. S.; MOREIRA, D. A. C.; AZEVEDO, L.; SILVA, L. B. C. Avaliação do perfil lipídico, glicêmico, conteúdo de glicogênio hepático e cardíaco em ratos diabéticos suplementados com farinha de casca de Maracujá (*Passiflora edulis*). **Revista Brasileira de Nutrição Clínica**, v. 23 (3), p. 173 - 177, 2008.

RADHIKA, T.; MAHENDAR, A.; VENKATESHAM, A. R. N.; REDDY, Y.; REDDY, N.; SADANANDAM, A.; CHRISTOPHER, T. Hypoglycemic Activity of Red Kino Tree in Normal and Streptozotocin Induced Diabetic Rats. **International Journal of Pharmacology**, v. 6 (3), p. 301 - 305, 2010.

- RAI, P. K.; SINGH, S. K.; KESARI, A. N.; WATAL, G. Glycaemic evaluation of *Psidium guajava* in rats. **Indian Journal of Medical Research**, v. 126, p. 224 - 227, 2007.
- RAMBERG, J. E.; NELSON, E. D.; SINNOTT, R. A. Immunomodulatory dietary polysaccharides: a systematic review of the literature. **Nutrition Journal**, v. 9 (54), 1 - 22, 2010.
- RAMOS, A. T.; CUNHA, M. A.; SABAA-SRUR, A. U.; PIRES, V. C.; CARDOSO, M. A.; DINIZ, M. F.; MEDEIROS, C. C. Uso de *Passiflora edulis* f. flavicarpa na redução do colesterol. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, p. 592 - 597, 2007.
- RAMOS, S.; MOULAY, L.; GRANADO-SERRANO, A. B.; VILANOVA, O.; MUGUERZA, B.; GOYA, L.; BRAVO, L. Hypolipidemic Effect in Cholesterol-Fed Rats of a Soluble Fiber-Rich Product Obtained from Cocoa Husks. **Journal Agricultural Food Chemistry**, v. 56, p. 6985 - 6993, 2008.
- RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; MOORE, P. K. **Farmacologia**, 5^a ed., Rio de Janeiro: Elsevier, v. 904 p. 2004.
- RATES, S. M. K. Plants as source of drugs. **Toxicon**, v. 39, p. 603 - 613, 2001.
- RATNER, E. R. Controlling Postprandial Hyperglycemia. **American Journal of Cardiology**, v. 88 (1), p. 26 - 31, 2001.
- RAUT, A. N.; GAIKWAD, N. J. Antidiabetic activity of hydro-ethanolic extract of *Cyperus rotundus* in alloxan induced diabetes in rats. **Fitoterapia**, v. 77, p. 585 - 588, 2006.
- RAVEN, P.H.; EVERT, R.F.; EICHHORN, S.E. 2007. **Biologia Vegetal**, 7^a ed. Coord. Trad. J.E.Kraus. Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.
- REES, S. A.; ALCOLADO, J. C. Animal models of diabetes mellitus. **Diabetic Medicine**, v. 22, p. 359 - 370, 2005.
- RERUP, C.; TARDING, F. Streptozotocin and alloxan diabetes in mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 7, p. 89 - 96, 1969.
- ROBBINS, S. L.; COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; TARANTO, G. **Patologia estrutural e funcional**. 4^aed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 817 - 826, 1991.
- ROWE, C. A.; NANTZ, M. P.; DENIERA, C.; GREEN, K.; TALCOTT, S. T.; PERCIVAL, S. S. Inhibition of Neoplastic Transformation of Benzo[α]pyrene-Treated BALB/c 3T3 Murine Cells by a Phytochemical Extract of Passionfruit Juice. **Journal of Medicinal Food**, v. 7 (4), p. 402 - 407, 2004.
- SAID, O.; KHALIL, K.; FULDER, S.; AZAIZEH, H. Ethnopharmacological survey of medicinal herbs in Israel, the Golan Heights and the West Bank Region. **Journal Ethnopharmacology**, v. 83, p. 251 - 265, 2002.
- SAKAMOTO, J.; MORITA, S.; OBA, K.; MATSUI, T.; KOBAYASHI, M.; NAKAZATO, H.; OHASHI, Y. Meta-analysis group of the japanese society for câncer of the colon rectum.

Efficacy of the adjuvant immunochemotherapy with polysaccharide K for patients with curatively resected colorectal cancer: a meta-analysis of centrally randomized controlled clinical trials. **Cancer Immunology, Immunotherapy**, v. 55, p. 404 - 411, 2006.

SALGADO, J. M.; BOMBARDE, T. A. D.; MANSI, D. N.; PIEDADE, S. M. S.; MELETTI, L. M. M. Estudo dos efeitos de diferentes concentrações de casca de maracujá (*Passiflora edulis*) no controle da glicemia de ratos diabéticos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30 (3), p. 784 - 789, 2010.

SALMAN, H.; BERGMAN, M.; DJALDETTI, M.; ORLIN, J.; BESSLER, H. Citrus pectin affects cytokine production by human peripheral blood mononuclear cells. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 62 (9), p. 579 - 582, 2008.

SALVEMINI, D.; WANG, Z. Q.; WYATT, D. M.; BOURDON, M. H.; MARINO, P. T. Nitric oxide: a key mediator in the early and late phase of carrageenan-induced rat paw inflammation. **British Journal of Pharmacology**, v. 118, p. 829 - 838, 1996.

SAMUELSEN, A. B.; PAULSEN, B. S.; WOLD, J. K.; KNUTSEN, S. H.; YAMADA, H. Characterization of a biologically active arabinogalactan from the leaves of *Plantago major* L. **Carbohydrate Polymers**, v. 35, p. 145 - 153, 1998.

SÁNCHEZ, D.; MUGUERZA, B.; MOULAY, L.; HERNÁNDEZ, R.; MIGUEL, M.; ALEIXANDRE, A. Highly Methoxylated Pectin Improves Insulin Resistance and Other Cardiometabolic Risk Factors in Zucker Fatty Rats. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, 3574 - 3581, 2008.

SANDHU, K. S.; EL SAMAHI, M. M.; MENA, I.; DOOLEY, C. P.; VALENZUELA, J. E. Effect of pectin on gastric emptying and gastroduodenal motility in normal subjects. **Gastroenterology**, v. 92 (2), p. 86 - 92, 1987.

SANTOS, W. B.; MESQUITA, E. T.; VIEIRA, R. M. R.; OLEJ, B.; COUTINHO, M.; AVEZUM, A. Proteína-C-Reativa e Doença Cardiovascular. As Bases da Evidência Científica. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 80 (4), p. 452 - 456, 2003.

SARTIPY, P.; LOSKUTOFF, D. J. Monocyte chemoattractant protein 1 in obesity and insulin resistance. **PNAS**, v. 100, p. 7265 - 7270, 2003.

SARTIPY, P.; LOSKUTOFF, D. J. Monocyte chemoattractant protein 1 in obesity and insulin resistance. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, p. 7265 - 7270, 2003.

SCHEPETKIN I. A.; QUIN M. K. T. Botanical polysaccharides: Macrophage immunomodulation and therapeutic potential. **International Immunopharmacology**, v. 6, p. 317 - 333, 2006.

SHAH, A.; METHTA, N.; REILLY, M. P. Adipose inflammation, insulin resistance, and cardiovascular disease. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, v. 32, p. 638 - 644, 2008.

SHERENESHEVA, N. I.; FIN'KO, V. E.; BLANKO, F. F.; ALIEVA, T. A.; BEDRIÑA, E. N.; GOGOLEVA, I. A. Anticarcinogenic effect of palustran on development of tumors

induced by 3-(1-alpha-L-arabinopyranosyl)-1-methyl-1-nitrosourea (AMNU) in rats. **Bulleten' eksperimental' noi biologii i meditsiny**, v. 125, p. 566 - 568, 1998.

SHINKAY, H. Recent developments in oral hypoglycemic agents. **Therapeutic focus**, v. 4, p. 283 - 288, 1999.

SHINOMIYA, K.; INOUE, T.; UTSU, Y.; TOKUNAGA, S.; MASUOKA, T.; OHMORI, A.; KAMEI, C. Hypnotic Activities of Chamomile and *Passiflora* Extracts in Sleep-Disturbed Rats. **Biological Pharmaceutical Bulletin**, v. 28 (5), p. 808 - 810, 2005.

SHOELSON, S. E.; HERRERO, L.; NAAZ, A. Obesity, Inflammation, and Insulin Resistance. **Gastroenterology**, v. 132, p. 2169 - 218, 2007.

SILVA, R. M.; SANTOS, F. A.; RAO, V. S. N.; MACIEL, M. A.; PINTO, A. C. Blood glucose and triglyceride-lowering effect of transdehydrocrotonin, a diterpene from *Croton cajucara* Benth., in rats. **Diabetes, Obesity and Metabolism**, v. 3, p. 452 - 456, 2001.

SILVA, S. R.; MERCADANTE, A. Z. Composição de carotenóides de maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* Flavicarpa) in natura. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 22 (3), p. 254 - 258, 2002.

SINGH, N.; KAMATH V.; RAJINI, P. S. Attenuation of hyperglycemia and associated biochemical parameters in STZ-induced diabetic rats by dietary supplementation of potato peel powder. **Clinica Chimica Acta**, v. 353, p. 165 - 175, 2005.

SINGH, R. K.; GUTMAN, M.; BUCANA, C. D.; SANCHEZ, R.; LLANSA, N.; FIDLER, I. J. Interferons alpha and beta down-regulate the expression of basic fibroblast growth factor in human carcinomas. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 92, p. 4562 - 4566, 1995.

SLAVIN, J. Impact of the proposed definition of dietary fiber on nutrient databases. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 16, p. 287 - 291, 2003.

SNELL-BERGEON, J.K.; WEST, N.A.; MAYER-DAVIS, E.J.; LIESE, A.D.; MARCOVINA, SANTICA, M.; D'AGOSTINO, R.B.; HAMMAN, R.F.; DABELEA, D. Inflammatory Markers Are Increased in Youth with Type 1 Diabetes: The SEARCH Case-Control Study. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 95(6), p. 2868-2876, 2010.

SONG, G.; DU, Q. Isolation of a polysaccharide with anticancer activity from *Auricularia polytricha* using high-speed countercurrent chromatography with an aqueous two-phase system. **Journal of Chromatography**, v. 1217, p. 5930 - 5934, 2010.

SONNENBERG, G. E.; KRAKOWER, G. R.; KISSEBAH, A. H. A novel pathway to the manifestations of metabolic syndrome. **Obesity Research**, v. 12, p. 180 - 186, 2004.

SOUSA, A. P. A.; BARBOSA, P. S. F.; TORRES, M. R.; MARTINS, A. M. C.; MARTINS, R. D.; ALVES, R. S.; SOUSA, D. F.; ALVES, C. D.; COSTA-LOTUFO, L. V.; MONTEIRO, H. S. A. The renal effects of alginates isolated from brown seaweed *Sargassum vulgare*. **Journal of Applied Toxicology**, v. 28, p. 364 - 369, 2008.

- SOUSA, A. P. A.; TORRES, M. R.; PESSOA, C.; MORAES, M. O.; FILHO, F. D. R.; ALVES, A. P. N. N.; COSTA-LOTUFO, L. V. *In vivo* growth-inhibition of Sarcoma 180 tumor by alginates from brown seaweed *Sargassum vulgare*. **Carbohydrate Polymers**, v. 69, p. 7 - 13, 2007.
- SOUZA, J. R. R.; CARVALHO, J. I. X.; TREVISAN, M. T.; DE PAULA, R. C. M.; RICARDO, N. M. P. S.; FEITOSA, J. P. A. Chitosan-coated pectin beads: characterization and *in vitro* release of mangiferin. **Food Hydrocolloids**, v. 23, p. 2278 - 2286, 2009.
- SPORN, M. B. The war on cancer. **Lancet**, v. 347, p. 1377 - 1381, 1996.
- SRIVASTAV, V.; NEGI, A. S.; KUMAR, J. K.; GUPTA, M.; KHANUJA, S. P. S. Plant-based anticancer molecules: A chemical and biological profile of some important leads. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 13, p. 5892 - 5908, 2005.
- STEMBURGO, T.; DALL'ALBA, V.; ALMEIDA, J. C.; ZELMANOVITZ, T.; GROSS, J. L.; AZEVEDO, M. J. Intake of soluble fibers has a protective role for the presence of metabolic syndrome in patients with type 2 diabetes. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 63, p. 127 - 33, 2009.
- STEINBERG, G. R. Inflammation in obesity is the common link between defects in fatty acid metabolism and insulin resistance, **Cell Cycle**, v. 6, p. 888 - 894, 2007.
- STEVENSON, T. T.; DARVILL, A. G.; ALBERSHEIM, P. 3-Deoxy-D-lyxo-2- heptulosaric acid, a component of the plant cell wall. **Journal of Plant Physiology**, v. 46, p. 739 - 744, 1988.
- STONE, N. J. Nonpharmacologic Management of Mixed Dyslipidemia Associated with Diabetes Mellitus and the Metabolic Syndrome: A Review of the Evidence. **American Journal of Cardiology**, v. 102 (12^a), p. 14L - 18L, 2008.
- STRACZKOWSKI, M.; DZIENIS-STRACZKOWSKA, S.; STEPIEN, A.; KOWALSKA, I.; SZELACHOWSKA, M.; KINALSKA, I. Plasma interleukin-8 concentrations are increased in obese subjects and related to fat mass and tumor necrosis factor- α system. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 87, p. 4602 - 4606, 2002.
- SY, G. Y.; CISSÉ, A.; NONGONIERMA, R. B.; SARR, M.; MBODJ, N. A.; FAYE, B. Hypoglycaemic and antidiabetic activity of acetonic extract of *Vernonia colorata* leaves in normoglycaemic and alloxan-induced diabetic rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 98, p. 171 - 175, 2005.
- TABACH, R.; RODRIGUES, E.; CARLINI, E. A. Preclinical toxicological assessment of a phytotherapeutic product – CPV (based on dry extracts of *Crataegus oxyacantha* L., *Passiflora incarnata* L., and *Valeriana officinalis* L.) **Phytotherapy Research**, v. 23, p. 33 - 40, 2009.
- TAGUCHI, I.; KIYOHARA, H.; MATSUMOTO, T.; YAMADA, H. Structure of oligosaccharide side chains of an intestinal immune system modulating arabinogalactan isolated from rhizomes of *Atractylodes lancea* DC. **Carbohydrate Research**, v. 339, p. 763 - 770, 2004.

TAKAHASHI, T.; KARITA, S.; OGAWA, N.; GOTO, M. Crystalline Cellulose Reduces Plasma Glucose Concentrations and Stimulates Water Absorption by Increasing the Digesta Viscosity in Rats. **The Journal of Nutrition**, v. 135 (10), p. 2405 - 2410, 2005.

TALCOTT, S. T.; PERCIVAL, S. S.; PITTET-MOORE, J.; CELORIA, C. Phytochemical composition and antioxidant stability of fortified yellow passion fruit (*Passiflora edulis*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 935 - 941, 2003.

TAMAKI, Y.; KONISHI, T.; FUKUTA, M.; TAKO, M. Isolation and structural characterisation of pectin from endocarp of *Citrus depressa*. **Food Chemistry**, v. 107, p. 352 - 361, 2008.

TAYLOR, R. C.; CULLEN, S. P.; MARTIN, S. J. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. **Nature reviews molecular cell biology**, v. 9, p. 231 - 241, 2008.

TEMELKOVA-KURKTSCHIEV, T.; HENKEL, E.; KOEHLER, C.; KARREI, K.; HANEFIELD, M. Subclinical inflammation in newly detected type II diabetes and impaired glucose tolerance. **Diabetologia**, v. 45, p. 151, 2002.

THEUWISSEN, E.; MENSINK, R. P. Water-soluble dietary fibers and cardiovascular disease. **Physiology Behavior**, v. 94, p. 285 - 292, 2008.

TOGOLA, A.; INNGJERDINGEN, M.; DIALLO, D.; BARSETT, H.; ROLSTAD, B.; MICHAELSEN, T. E.; PAULSEN, B. S. Polysaccharides with complement fixing and macrophage stimulation activity from *Opilia celtidifolia*, isolation and partial characterisation. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 115, p. 423 - 431, 2008.

TOMMONARO, G.; RODRIGUEZ, C. S.; SANTILLANA, M.; IMMIRZI, B.; DE PRISCO, R.; NICOLAUS, B.; POLI, A. Chemical Composition and Biotechnological Properties of a Polysaccharide from the Peels and Antioxidative Content from the Pulp of *Passiflora ligularis* Fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 7427 - 7433, 2007.

TZIANABOS, A. O. Polysaccharide immunomodulators as therapeutic agents: structural aspects and biologic function. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 13 (4), p. 523 - 533, 2000.

UEDA, Y.; FUJIMARA, T.; KINAMA, S.; HIRONO, Y.; YAMAGUCHI, A.; NAITOH, H.; TANI, T.; KAJI, M.; YAMAGISHI, H.; MIWA, K.; HOKURIKU, KINK. Immunochemotherapy study group- gastric cancer (HKIT-GC). A randomized phase III trial of postoperative adjuvant therapy with S-1 alone versus S-1 plus PSK for stage II/III A gastric cancer. **Japanese Journal of Clinical Oncology**, v. 36, p. 519 - 522, 2006.

UUSITAPA, M.; TUOMILEHTO, J.; KARTTUNEN, P.; WOLF, E. Long term effects of guar gum on metabolic control, serum cholesterol and blood pressure levels in type 2 (non-insulin-dependent) diabetic patients with high blood pressure. **Annals of Clinical Research**, v. 16 (43), p. 126 - 31, 1984.

VANDERHOOF, J. A. Immunonutrition: the role of carbohydrates. **Nutrition Research**, v.14, p. 595 - 598, 1998.

- VARGAS, A. J.; GEREMIAS, D. S.; PROVENSÍ, G.; FORNARI, P. E.; REGINATTO, F. H.; GOSMANN, G.; SCHENKEL, E. P.; FRODE, T. S. *Passiflora alata* and *Passiflora edulis* spray-dried aqueous extract inhibit inflammation in mouse model of pleurisy. **Fitoterapia**, v. 78, p. 112 - 119, 2007.
- VASCO, C.; RUALES, J.; KAMAL-ELDIN, A. Total phenolic compounds and antioxidant capacities of major fruits from Ecuador. **Food Chemistry**, v. 111, p. 816 - 823, 2008.
- VENN, B. J.; MANN, J. I. Cereal grains, legumes and diabetes. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 58, p. 1443 - 1461, 2004.
- VIANA, G. S. B.; MEDEIROS, A. C. C.; LACERDA, A. M. R.; LEAL, L. K. A. M.; VALE, T. G.; MATOS, F.J. A. Hypoglycemic and anti-lipemic effects of the aqueous extract from *Cissus sicyoides*. **BMC Pharmacology**, v. 4, p. 1 - 7, 2004.
- VILLANUEVA, M. J.; YOKOYAMA, W. H.; HONG, Y. J.; BARTTLEY, G. E.; RUPÉREZ, P. Effect of high-fat diets supplemented with okara soybean by-product on lipid profiles of plasma, liver and faeces in Syrian hamsters. **Food Chemistry**, v. 124, p. 72 - 79, 2011.
- VOLPERT, O. V.; DAMERON, K. M.; BOUCK, N. Sequential development of an angiogenic phenotype by human fibroblast progressing to tumorigenicity. **Oncogene**, v. 14, p. 1495 - 1502, 1997.
- WADKAR, K.A.; MAGDUM, C. S.; PATIL, S. S.; NAIKWADE, N. S. Anti-Diabetic Potential and Indian Medicinal Plants. **Journal of Herbal Medicine and Toxicology**, v. 2 (1), p. 45 - 50, 2008.
- WALL, M.E.; WANI, M. C.; COOK, C. E.; PALMER, K. H.; McPHAIL, A. T.; SIM, G. A. Plant antitumor agents. The isolation and structure of camptothecin, a novel alkaloidal leukemia and tumor inhibitor from *Camptotheca acuminata*. **Journal of the American Chemical Society**, v. 88, p. 3888 - 3890, 1966.
- WANG, H. X.; NG, T. B. Natural products with hypoglycemic, hypotensive, hypocholesterolemic, antithrombotic and antithrombotic activities. **Life Sciences**, v. 65, p. 2663 - 2677, 1999.
- WANG, S. Y.; HSU, M. L.; HSU, H. C.; TZENG, C. H.; LEE, S. S.; SHIAO, M. S.; HO, C. K. The antitumor effect of *Ganoderma lucidum* is mediated by cytokines released from activated macrophages and T lymphocytes. **International Journal of Cancer**, v. 70, p. 699 - 705, 1997.
- WATT, J. M.; BREYER-BRANDWIJK, M. G. The medicinal and poisonous plants of southern and eastern Africa. **Livingstone**, 2nded., 1962.
- WEICKERT, M. O.; PFEIFFER, A. F. H. Metabolic Effects of Dietary Fiber Consumption and Prevention of Diabetes. **The Journal of Nutrition**, v. 138, p. 439 - 442, 2008.

- WEINTRAUB, S. J.; CHOW, K. N.; LUO, R. X.; ZHANG, S. H.; HE, S.; DEAN, D. C. Mechanism of active transcriptional repression by the retinoblastoma protein. **Nature**, v. 375 (6534), p. 812 - 815, 1995.
- WIERSMA, J. J.; MEUWESE, M. C.; VAN MIERT, J. N.; KASTELEIN, A.; TIJSSEN, J. G.; PIEK, J. J.; TRIP, M. D. Diabetes mellitus type 2 is associated with higher levels of myeloperoxidase. **Medical Science Monitor**, v. 14, p. 406 - 410, 2008.
- WILD, S.; ROGLIC, G.; GREEN, A.; SICREE, R.; KING, H. Global Prevalence of Diabetes: Estimates for the year 2000 and projections for 2030. **Diabetes Care**, v. 27, p. 1047 - 1053, 2004.
- WILLATS, W. G. T.; KNOX, J. P.; MIKKELSEN, J. D. Pectin: new insights into an old polymer are starting to gel. **Trends in Food Science & Technology**, v. 17, p. 97 - 104, 2006.
- WINNING, H.; VIERECK, N.; NORGAARD, L.; LARSEN, J.; ENGELSEN, S. B. Quantification of the degree of blockiness in pectins using ^1H NMR spectroscopy and chemometrics, **Food Hydrocolloids**, v. 21, p. 256 - 266, 2007.
- WINTER, C. A.; RISELY, E. A.; NUSS, G. W. Carrageenan-induced edema in the hind paw of the rat as an assay for anti-inflammatory drugs. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 111, p. 544 - 547, 1962.
- WISSE, B. E. The inflammatory syndrome: the role of adipose tissue cytokines in metabolic disorders linked to obesity. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 15, 2792 - 2800, 2004.
- WOLFRAM, T.; ISMAIL-BEIGI, F. Efficacy of High-Fiber Diets in The Management of Type 2 Diabetes Mellitus. **Endocrine Practice**, v. 17 (1), p. 132 - 142, 2011.
- WRIGHT JR, E.; SCISM-BACON, J. L.; GLASS, L. C. Oxidative stress in type 2 diabetes: the role of fasting and postprandial glycaemia. **International Journal of Clinical Practice**, v. 60 (3) 308 - 314, 2006.
- WU, J. T.; WU, L. L. Linking inflammation and atherogenesis: Soluble markers identified for the detection of risk factors and for early risk assessment. **Clinica Chimica Acta**, v. 366, p. 74 - 80, 2006.
- YANEVA, M. P.; BOTUSHANOVA, A. D.; GRIGOROV, L. A.; KOKOV, J. L.; TODOROVA, E. P.; KRACHANOVA, M, G. Evaluation of the immunomodulatory activity of Aronia in combination with apple pectin in patients with breast cancer undergoing postoperative radiation therapy. **Folia Medica**, v. 44, p. 22 - 5, 2002.
- YAPO, B. M. Biochemical Characteristics and Gelling Capacity of Pectin from Yellow Passion Fruit Rind as Affected by Acid Extractant Nature. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 1572 - 1578, 2009.
- YAPO, B. M.; KOFFI, K. L. Dietary Fiber Components in Yellow Passion Fruit Rind - A Potential Fiber Source. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 5880 - 5883, 2008.

- YAPO, B. M.; KOFFI, K. L. Yellow passion fruit rind-a potential source of low methoxyl pectin. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 2738 - 2744, 2006.
- YE, M. B.; LIM, B. O. Dietary Pectin Regulates the Levels of Inflammatory Cytokines and Immunoglobulins in Interleukin-10 Knockout Mice. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 58 (21), p. 11281 - 11286, 2010.
- YINHUA, W.; HUIFANG, W. Study on technology of extracting pectin from Kiwi fruit peel. **Food Science and Technology**, v. 1, p. 85 - 86, 2003.
- YU, A. N.; VALLE, M. Precipitation and characterization of mango peel pectin. **Uttar Pradesh Home - Economics Journal**, v. 7, p. 17 - 23, 1979.
- YUDKIN, J.S.; STEHOUWER, C. D. A.; EMEIS, J. J.; COPPACK, S. W. C-reactive protein in healthy subjects: association with obesity, insulin resistance, and endothelial dysfunction: a potential role for cytokines originating from the adipose tissue? **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 19, p. 972 - 978, 1999.
- ZHANG, C.; LIU, Z. W. Studies on the conditions for precipitation of extracted pectin in pomelo peel. **Science and Technology of Food Industry**, v. 21(6), p. 29 - 31, 2000.
- ZHANG, C.; YANG, J.; JENNINGS, L. K. Leukocyte-Derived Myeloperoxidase Amplifies High-Glucose-Induced Endothelial Dysfunction Through Interaction With High-Glucose-Stimulated, Vascular Non-Leukocyte-Derived Reactive Oxygen Species. **Diabetes**, v. 53 (11), p. 2950 - 2959, 2004.
- ZHANG, L.; FAN, C.; LIU, S.; ZANG, Z.; JIAO, L.; ZHANG, L. Chemical composition and antitumor activity of polysaccharide from *Inonotus obliquus*. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 5(7), p. 1251 - 1260, 2011.
- ZHANG, R.; ZHOUB, J.; JIA, Z.; ZHANG, Y.; GUB, G. Hypoglycemic effect of *Rehmannia glutinosa* oligosaccharide in hyperglycemic and alloxan-induced diabetic rats and its mechanism. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 90, p. 39 - 43, 2004.
- ZOU, S.; ZHANG, X.; YAO, W.; NIU, Y.; GAO, X. Structure characterization and hypoglycemic activity of a polysaccharide isolated from the fruit of *Lycium barbarum* L. **Carbohydrate Polymers**, v. 80, p. 1161 - 1167, 2010.
- ZOZULINSKA, D.; WIERUSZ-WYSOCKA, B. Type 2 diabetes mellitus as inflammatory disease. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 74S, p S12 - S16, 2006.