

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: BIOQUÍMICA**

**Propriedades Antioxidantes de Extratos de *Passiflora
alata* Dryander e de *Passiflora edulis* Sims**

Martina Rudnicki

Orientador: Dr. José Cláudio Fonseca Moreira

Co-orientador: Dr. Felipe Dal-Pizzol



Porto Alegre

2005

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: BIOQUÍMICA**

**Propriedades Antioxidantes de Extratos de *Passiflora
alata* Dryander e de *Passiflora edulis* Sims**

Martina Rudnicki

Orientador: Dr. José Cláudio Fonseca Moreira

Co-orientador: Dr. Felipe Dal-Pizzol

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Ciências Biológicas: Bioquímica da
Universidade Federal do Rio Grande
do Sul como requisito para a
obtenção do grau de Mestre em
Ciências Biológicas – Bioquímica



Porto Alegre

2005

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus familiares por todo apoio e confiança em mim depositada, o que tornou possível a realização deste trabalho;

Ao meu orientador Dr. José Cláudio Fonseca Moreira, pela credibilidade, orientação e amizade;

Ao meu co-orientador Dr. Felipe Dal-Pizzol, pelas discussões e esclarecimentos;

Aos colegas do Laboratório 25 Márcio, Marcos, Fernanda, Michael, Amâncio, Matheus, Rodrigo, Evandro, Guilherme, Ramatis, Manuela, Fábio, Daniel, Marinho e Alfeu por toda ajuda e pelos ótimos momentos;

Aos amigos de Departamento Kally, Labareda e Luís;

Ao amigo e ex-orientador Dr. Flávio Henrique Reginatto;

Aos funcionários do Programa de Pós-Graduação-Bioquímica, Cléia e Regina;

À todos os professores do Departamento de Bioquímica que ministraram disciplinas que cursei e contribuíram para minha formação;

Ao CNPq pela ajuda financeira;

Ao Tiago, meu grande amor, pela paciência, amor, apoio, companheirismo e auxílio neste trabalho.

"Aprender é a única coisa de que a mente
nunca se cansa, nunca tem medo
e nunca se arrepende"

(Leonardo da Vinci)

RESUMO

O presente estudo investigou as atividades antioxidantes *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo* dos extratos de folhas *Passiflora alata* e *Passiflora edulis*, plantas usadas na medicina popular e ricas em polifenóis, compostos com reconhecida atividade antioxidante. No modelo experimental *in vitro*, ambos os extratos demonstraram atividade antioxidante e proteção contra dano protéico induzido por glicose. Fatias de fígado de ratos foram utilizadas como modelo *ex vivo*. Tanto o extrato de *P. alata* quanto o extrato de *P. edulis* protegeram de forma significativa o dano protéico e a morte celular induzidos por FeSO₄. Como a *P. alata* é uma droga oficial da Farmacopéia Brasileira, os efeitos antioxidantes deste extrato foram investigados *in vivo*. Ratos machos Wistar receberam tratamento intragástrico de extrato de folhas de *P. alata* (1 e 5 mg/kg), trolox (0,18 mg/kg) ou água (controle) durante 30 dias, seguido de uma dose de CCl₄ (3 ml/kg, i.p.) no 30º dia. O dano hepático e os efeitos antioxidantes do pré-tratamento com extrato de *P. alata* foram avaliados em vários órgãos. Quando comparados ao grupo controle, os ratos pré-tratados com o extrato demonstraram dano hepático menor, evidenciado por um grau menor de necrose, níveis menores de lipoperoxidação e maior atividade das enzimas superóxido dismutase e catalase. Adicionalmente, níveis menores de lipoperoxidação cardíaca foram observados com o pré-tratamento de *P. alata* (5mg/kg). Os resultados obtidos neste estudo indicam que os extratos de *Passiflora* são fontes potenciais de antioxidantes naturais. Estudos adicionais investigando o papel de compostos isolados destes extratos em patologias humanas onde o estresse oxidativo está envolvido são necessários.

ÍNDICE

	Página
RESUMO	iv
LISTA DE TABELAS E FIGURAS.....	viii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	x
1. INTRODUÇÃO	01
1.1. Passiflora.....	01
1.2. <i>P. alata</i> e <i>P. edulis</i> são amplamente utilizadas pela medicina popular.....	01
1.3. Os extratos de folha de <i>P. alata</i> e <i>P. edulis</i> são utilizados pela indústria farmacêutica como matéria-prima para medicamentos.....	02
1.4. Propriedades farmacológicas de extratos de <i>P. alata</i> e <i>P. edulis</i> ...	03
1.5. A administração de doses elevadas dos extratos de folha de <i>P. alata</i> e <i>P. edulis</i> induzem toxicidade.....	04
1.6. Aspectos químicos	05
1.6.1. Os extratos de folha de <i>P. alata</i> e <i>P. edulis</i> apresentam concentrações baixas de alcalóides.....	05
1.6.2. A presença de saponinas é descrita em extratos de folha de <i>P. alata</i> e <i>P. edulis</i>	06
1.6.3. Os estudos químicos demonstram que os polifenóis são os compostos majoritários em extratos de folha de <i>P. alata</i> e <i>P. edulis</i>	07
1.7. Propriedades antioxidantes são atribuídas aos polifenóis	08

1.8. O consumo de antioxidantes naturais pode estar associado a um risco reduzido para certas doenças crônicas.....	10
2. OBJETIVOS	12
2.1 Objetivo geral	12
2.2 Objetivos específicos	12
3. RESULTADOS	13
3.1. Antioxidant and antiglycation properties of <i>Passiflora alata</i> and <i>Passiflora edulis</i> extracts.....	14
3.2 Protective effects of <i>Passiflora alata</i> extract on carbon tetrachloride induced oxidative damage in rats.....	40
4 DISCUSSÃO GERAL.....	64
4.1 Os extratos de folha de <i>P. alata</i> e <i>P. edulis</i> demonstram capacidade antioxidante <i>in vitro</i> em baixas concentrações.....	64
4.2 Os extratos de folha de <i>P. alata</i> e <i>P. edulis</i> protegem contra dano protéico mediado por sulfato ferroso e por glicose.....	66
4.3 A administração de extrato de <i>P. alata</i> demonstrou efeitos protetores contra estresse oxidativo induzido por tetracloreto de carbono em ratos... ..	67
4.4. O pré-tratamento com extrato de folhas de <i>P. alata</i> na dose de 5 mg/kg demonstrou efeitos protetores contra lipoperoxidação cardíaca.....	70
4.5. Por que os efeitos antioxidantes do extrato de folhas de <i>P. alata</i> diferem nos modelos <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> ?.....	71
5. CONCLUSÕES	73
6. PERSPECTIVAS.....	75

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	76
8. ANEXOS.....	87

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

Artigo 1

Tabela 1. Conteúdo fenólico total e capacidade antioxidante dos extratos de <i>Passiflora</i>	34
Figura 1. Correlação entre os valores de TEAC com o conteúdo de fenólicos totais dos extratos de folha de <i>P. alata</i> e <i>P. edulis</i>	35
Figura 2. O efeito dos extratos de folha de <i>P. alata</i> e <i>P. edulis</i> no extravasamento de LDH.....	36
Figura 3. O efeito dos extratos de folha de <i>P. alata</i> e <i>P. edulis</i> nos níveis de TBARS.....	37
Figura 4. O efeito dos extratos de folha de <i>P. alata</i> e <i>P. edulis</i> nos níveis de carbonis protéicos.....	38
Figura 5. . Inibição da glicação de proteínas (formação de AGEs) pelos extratos de <i>Passiflora</i>	39

Artigo 2

Tabela 1. Efeitos do pré-tratamento com extrato de folhas de <i>P. alata</i> na atividade das enzimas séricas AST e ALT e enzimas antioxidantes hepáticas em ratos tratados com CCl ₄	60
Figura 1. Efeitos do pré-tratamento com extrato de folhas de <i>P. alata</i> no dano oxidativo induzido por CCl ₄ em ratos.....	61
Figura 2. Efeitos do pré-tratamento com extrato de folhas de <i>P. alata</i> nos níveis de carbonis protéicos induzido por CCl ₄ no fígado, rins, cérebro e coração de ratos.....	72

Figura 3. Efeitos do pré-tratamento com extrato de folhas de <i>P. alata</i> nos níveis de lipoperoxidação induzido por CCl ₄ no fígado, rins, cérebro e coração de ratos.....	63
--	----

Anexos

Figura 1 Estruturas químicas das classes de polifenóis.....	88
Figura 2 Estruturas químicas de flavonóides.....	89

LISTA DE ABREVIATURAS

AAPH = 2,2'-Azobis (2-methylpropionamidina) diidrocloreto

AST = Aspartato transaminase

ALT = Alanina transaminase

AGEs = Produtos avançados finais de glicação

BSA = Albumina sérica bovina

CAT = Catalase

CCl₄ = Tetracloreto de carbono

COM = Contagens por minuto

DNPH = 2,4-dinitrofenilhidrazina

EROS = Espécies reativas de oxigênio

LDH = Lactato desidrogenase

MDA= Malondialdeído

P. alata = *Passiflora alata* Dryander

P. edulis = *Passiflora edulis* Sims

ROS = Espécies reativas de oxigênio

SOD = Superóxido dismutase

SNC = Sistema Nervoso Central

TAE = Equivalentes de Ácido Tânico

TBARS = Espécies reativas ao ácido Tiobarbitúrico

TEAC = Capacidade Antioxidante Equivalente ao Trolox

TRAP = Potencial Antioxidante Reativo Total

1. INTRODUÇÃO

1.1 Passiflora

O gênero *Passiflora*, originário da América do Sul, compreende cerca de 500 espécies pertencentes à família Passifloraceae (Vanderplank, 1996). As espécies deste gênero, popularmente conhecidas no Brasil como maracujás, distribuem-se em regiões tropicais e temperadas da América do Sul, sendo encontradas também na Ásia, Austrália e África (Dhawan *et al.*, 2004).

Aproximadamente 130 espécies de *Passiflora* são encontradas no Brasil, especialmente na Bacia Amazônica (Killip, 1938). Destas espécies, as principais são a *Passiflora alata* Dryander (*P. alata*) e a *Passiflora edulis* Sims (*P. edulis*).

Enquanto a *P. edulis*, popularmente conhecida como maracujá amarelo, é a espécie mais difundida devido a sua importância na indústria alimentícia, a *P. alata* é amplamente conhecida não somente pelo consumo de seus frutos (maracujá doce) como também pelo valor ornamental de suas flores (Pereira e Vilegas, 2000).

1.2 *P. alata* e *P. edulis* são amplamente utilizadas pela medicina popular

Além do uso da indústria alimentícia, as espécies de *Passiflora* têm um papel importante na medicina popular. Segundo Taylor (1996), o uso popular de

espécies de *Passiflora* para fins terapêuticos foi primeiramente documentado em 1569. No entanto, os primeiros relatos sobre as propriedades farmacológicas de espécies de *Passiflora* foram descritos muitos anos depois demonstrando os efeitos sedativos de extrato de *P. incarnata* (Lutomski e Malek, 1975).

Atualmente, o chá das folhas de espécies de *Passiflora* é amplamente utilizado em países da Europa e da América do Sul. No Brasil, a *P. alata* é uma planta oficial da Farmacopéia Brasileira (1977), e numerosas aplicações terapêuticas do uso de suas folhas são documentadas (Pereira e Vilegas, 2000). Estas incluem o tratamento de irritação do sistema respiratório, ansiedade e insônia.

Na América do Sul, a *P. edulis* é utilizada como sedativo, diurético, antihelmíntico e no tratamento de hipertensão e sintomas da menopausa. Entretanto, o uso de *P. edulis* não é restrito a países sul americanos. De acordo com Jamir *et al.* (1999), as folhas de *P. edulis* são utilizadas na Índia para o tratamento de hipertensão e disenteria, enquanto na Ilha da Madeira os frutos de *P. edulis* são utilizados para o tratamento de tumores gástricos (Watt e Breyer-Brandwijk, 1962).

1.3 Os extratos de folhas de *P. alata* e *P. edulis* são utilizados pela indústria farmacêutica como matéria-prima para medicamentos

A grande utilização das folhas de espécies de *Passiflora* pela medicina popular promoveu o interesse da indústria farmacêutica. Desse modo, as folhas

de espécies de *Passiflora* são empregadas como componente ativo de várias preparações fitoterápicas, na forma de comprimidos, infusões e/ou tinturas. Segundo levantamentos, em 1989 existiam no Brasil 147 produtos registrados no Ministério da Saúde contendo *P. alata*, *P. edulis* e *P. incarnata*, como componente único ou em associação (Ortega *et al.*, 1989)

1.4 Propriedades farmacológicas de extratos de *P. alata* e *P. edulis*

Embora as espécies de *Passiflora* tenham diversas indicações terapêuticas na medicina popular e a constituição química de seus extratos tenha sido extensamente investigada nos últimos anos (como será apresentado a seguir), poucas investigações sobre as propriedades farmacológicas e bioquímicas de *P. alata* e *P. edulis* são encontradas na literatura. De fato, a maioria dos estudos tem investigado apenas as propriedades depressoras do sistema nervoso central (SNC) das espécies de *P. alata* e *P. edulis*.

Os efeitos depressores do SNC causados pelo extrato bruto de folhas de *P. alata* foram primeiramente descritos por Oga *et al.* (1984). Segundo os autores, a administração intraperitoneal de 75 e 150 mg/kg de extrato de folhas de *P. alata* demonstrou efeito anticonvulsivante, redução da atividade motora espontânea e o prolongamento do tempo do sono induzido por pentobarbital em camundongos.

Os efeitos depressores do SNC em roedores e humanos foram também relatados para o extrato aquoso de *P. edulis* (Maluf *et al.*, 1991). Vale e Leite (1983) demonstraram que a administração de extrato aquoso de *P. edulis* é capaz

de prolongar significativamente o sono induzido por barbitúrico e morfina em camundongos, bem como bloquear parcialmente os efeitos estimulantes induzidos por anfetamina.

Mais recentemente, os efeitos ansiolíticos dos extratos hidroalcolico e aquoso de folha de *P. alata* e *P. edulis* foram também demonstrados por Petry *et al.* (2001) e Paris *et al.* (2002), respectivamente.

Em adição, Qureshi *et al.* (1997) relataram a atividade antifúngica do extrato de folhas de *P. edulis* contra *Microsporum gypseum*, *Chrysosporium tropicum* e *Trichophyton terrestre*. Para os extratos de frutos de *P. edulis*, a atividade antioxidante *in vitro* (Murcia *et al.*, 2001) e a capacidade de inibição tanto do citocromo P450 3A (Hidaka *et al.*, 2004) quanto de metaloproteinases (Puricelli *et al.*, 2003) foram também demonstradas.

1.5 A administração de doses elevadas dos extratos de folha de *P. alata* e de *P. edulis* induz toxicidade

Doses elevadas de extrato bruto de folhas de *P. alata* (acima de 400 mg/kg, i.p.) foram relatadas como letais por provocarem depressão profunda do SNC em camundongos (Oga *et al.*, 1984). Segundo estes autores, o valor estimado da DL₅₀ foi de 456 mg/kg.

Adicionalmente, a hepatotoxicidade e efeitos tóxicos no pâncreas foram demonstrados em roedores e em humanos com a administração de extrato aquoso de *P. edulis* (Maluf *et al.*, 1991). Contudo, Amaral *et al.* (2001)

demonstraram ausência de toxicidade reprodutiva em roedores com o tratamento oral de 800 mg/kg tanto para o extrato de folhas de *P. alata* como para o extrato de folhas de *P. edulis*.

1.6 Aspectos químicos

A composição química dos extratos de folha de *P. alata* e *P. edulis* tem sido extensamente estudada e tem revelado a presença de alcalóides (Lutomski e Malek, 1975; Oga *et al.*, 1984), saponinas (Reginatto *et al.*, 2001; Yoshikawa *et al.*, 2000a; Yoshikawa *et al.*, 2000b) e principalmente polifenóis (Ulubelen *et al.*, 1982; Petry *et al.*, 2001; Pereira *et al.*, 2004; Muller *et al.*, 2005).

1.6.1 Os extratos de folhas de *P. alata* e *P. edulis* apresentam concentrações baixas de alcalóides

Tem sido demonstrado nos últimos anos que os extratos de folhas de *P. alata* e *P. edulis* apresentam baixos teores de alcalóides.

Os alcalóides são bases nitrogenadas de alta toxicidade derivadas de aminoácidos, cuja função principal é a defesa da planta contra fitófagos (Simões *et al.*, 2003).

O isolamento de alcalóides do tipo β -carbonílicos derivados do grupo harmano em espécies de *Passiflora* foi primeiramente descrito em folhas de *P.*

incarnata (Poethke *et al.*, 1970). Em 1975, Lutomski e Malek relataram a presença de harmano, harmino, harmalina e harmalol em extrato de folha de *P. edulis*, sendo a concentração de alcalóides totais do grupo harmano de 0,12 mg%. Para o extrato bruto de folhas de *P. alata*, uma concentração de alcalóides totais de 0,217 mg% foi demonstrada por Oga *et al.* (1984).

1.6.2 A presença de saponinas é descrita em extratos de folhas de *P. alata* e *P. edulis*

Vários estudos recentes têm também demonstrado a presença de saponinas em extrato de folhas de *P. alata* e *P. edulis*. De acordo com Simões *et al.* (2003), saponinas são glicosídeos de esteróides ou de triterpenos amplamente distribuídos em vegetais, cuja função é a diminuição da tensão superficial da água, agindo deste modo como detergentes e emulsificantes.

A primeira saponina descrita para o extrato de folhas de *P. edulis* foi denominada passiflorina, a qual é derivada do lanostano [éster do ácido- β -D-glicosil(22R),(24S)-22,31-epoxi-24-metil-1 α ,3 β ,24,31-tetra-hidroxi-9,19-ciclo-9 β -lanostano-28-óico] (Bombardelli *et al.*, 1975). Em estudos recentes, outras dez saponinas triterpênicas (ciclopasiflosídeos) foram isoladas de folhas e caules de *P. edulis* (Yoshikawa *et al.*, 2000a, b). Em adição, Reginatto *et al.* (2001) relataram o isolamento de quatro saponinas triterpênicas e uma saponina esteroide em extrato de folha de *P. alata*.

1.6.3 Os estudos químicos demonstram que os polifenóis são os compostos majoritários em extratos de folhas de *P. alata* e *P. edulis*

Primeiramente reconhecidos como pigmentos, os polifenóis formam um grupo complexo de moléculas presente na maioria das frutas e vegetais, estando envolvidos na defesa da planta contra patógenos, animais ou radiação ultravioleta. Segundo Simões *et al* (2003), polifenóis são metabólitos secundários e podem ser classificados de acordo com sua estrutura química em ácidos fenólicos (ácidos hidroxibenzóicos e ácidos hidroxicinâmicos), flavonóides, estilbenos e lignanas (Anexo1).

Dentre as classes de polifenóis, os flavonóides são os compostos mais estudados. Os flavonóides possuem um esqueleto difenilpropano e são divididos em 6 subclasses: flavonols, flavonas, isoflavonas, flavanonas, antocianidinas e flavanols (catequinas e proantocianidinas) (Anexo 2).

Diversos estudos relacionados à composição química dos extratos de folhas de *P. alata* e *P. edulis* indicaram a presença de polifenóis como constituintes majoritários.

Oga *et al* (1984) relataram uma concentração elevada de flavonóides em extrato bruto de folhas de *P. alata* (44,8 mg%). Corroborando com este achado, Petry *et al.* (2001) descreveram um conteúdo de flavonóides totais de 2,9 % e 4,6 % em extratos hidroalcoólico de folhas de *P. alata* e *P. edulis*, respectivamente.

Dentre os polifenóis isolados em extratos de folhas de *P. alata* e *P. edulis*, há uma predominância de flavonóides, particularmente flavonas C-glicosiladas. A presença das flavonas vitexina, isovitexina, orientina e isoorientina foi

demonstrada em extrato de folha de *P. alata* (Ulubelen *et al.*, 1982) e *P. edulis* (de Souza 1997; Mareck *et al.*, 1991). No entanto, estudos posteriores apresentam resultados discordantes em relação à presença destes compostos nos extratos de folha de *P. alata* e *P. edulis*.

Enquanto Petry *et al.* (2001), investigando ambos os extratos de folha de *P. alata* e *P. edulis*, verificaram a presença destas quatro flavonas somente no extrato de *P. edulis*, Pereira *et al.* (2004) identificaram a presença de orientina e isoorientina em ambos os extratos de folha de *P. alata* e *P. edulis*, sendo a presença de isovitexina detectada somente no extrato de folha de *P. alata*.

Contudo, em um estudo mais recente, Muller *et al.* (2005) demonstraram somente a presença de traços de vitexina e isovitexina em *P. alata*.

Fatores ambientais como clima e tipo de solo influenciam o conteúdo de polifenóis (Shahidi e Naczki, 1995), como também a forma de extração dos extratos, poderiam explicar a diferença nos achados sobre a presença dos polifenóis em extratos de folhas de *P. alata* e *P. edulis*.

1.7 Propriedades antioxidantes são atribuídas aos polifenóis

Numerosos estudos têm demonstrado que *in vitro* os polifenóis agem como queladores de metais (Rice-Evans *et al.*, 1996) e seqüestradores de espécies reativas de oxigênio (EROs) e nitrogênio, incluindo radical superóxido (Nakagawa e Yokozawa, 2002; Nanjo *et al.*, 1993), radicais peroxil, peroxinitrito (Haenen *et al.*, 1997; Paquay *et al.*, 2000) e ácido hipoclorídrico (Scott *et al.*, 1993).

Segundo Rice-Evans *et al.* (1996), a habilidade dos polifenóis em agir como antioxidantes *in vitro* deve-se à sua capacidade de doar átomos de hidrogênio e é dependente de suas estruturas químicas.

Muitas definições existem para descrever o termo antioxidante. Halliwell e Gutteridge (1999) definem um antioxidante como “qualquer substância que quando presente em baixas concentrações, comparadas àquelas de um substrato oxidável, diminuem ou impedem significativamente a oxidação deste substrato.”

Os polifenóis podem inibir ainda a formação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio através da inibição de enzimas pró-oxidantes *in vitro* (Frei e Higdon, 2003). Cos *et al.* (1998) relataram que os polifenóis inibem a atividade da xantina oxidase, enzima que catalisa a oxidação de ambas hipoxantina e xantina em ácido úrico, enquanto reduz O_2 a O_2^- e H_2O_2 . Em adição, Chan *et al.* (1997) descreveram a inibição por polifenóis, presentes no chá verde, da atividade da enzima óxido nítrico sintase induzível, em culturas de macrófagos de camundongo. Além disso, a inibição das enzimas lipoxigenase e cicloxigenase também tem sido relatada (Surh *et al.*, 2001).

A incubação de polifenóis em culturas celulares tem demonstrado efeitos inibitórios sobre os fatores de transcrição redox-sensíveis, fator nuclear kappa B (NF κ B) e fator ativador de proteína (AP-1), os quais estão envolvidos em rotas carcinogênicas (Yang *et al.*, 2002).

Embora as propriedades de extratos ricos em polifenóis tenham sido extensamente investigadas, as propriedades antioxidantes de extratos de folha de *P. alata* e *P. edulis* permanecem desconhecidas.

1.8 O consumo de antioxidantes naturais pode estar associado a um risco reduzido para certas doenças crônicas.

O estresse oxidativo tem sido associado com a etiologia e/ou patogênese de várias doenças, incluindo vários tipos de câncer (Dreher e Junod, 1996), doenças neurodegenerativas (Halliwell, 2001) e cardiovasculares (Steinberg *et al.*, 1989). Desse modo, compostos antioxidantes poderiam desempenhar um papel importante na manutenção da saúde e na proteção contra danos induzidos por estresse oxidativo (Halliwell e Gutteridge, 1999).

De fato, estudos epidemiológicos realizados nas últimas décadas indicaram que uma alta ingestão de polifenóis estaria associada com um risco significativamente menor de doenças cardiovasculares e cânceres (Hertog *et al.*, 1995; Arts e Hollman, 2005; Knekt *et al.*, 1996). O exemplo mais citado na literatura é denominado Paradoxo Francês. Na França, embora haja um alto consumo de gorduras saturadas, um fator de risco para doenças cardiovasculares, baixos índices de mortalidade por doenças coronarianas são encontrados. Esse paradoxo tem sido atribuído ao elevado consumo de vinho tinto, bebida rica em polifenóis (Ferrieres, 2004).

Além disso, uma associação inversa entre ingestão de flavonóides e ocorrência subsequente de doenças cardio- e cerebrovasculares, câncer de próstata e pulmão, diabetes tipo 2 e asma foi sugerida por Knekt *et al.* (2002) ao avaliarem 62.440 pessoas de diversas regiões da Finlândia.

Em contraste aos trabalhos sugerindo possíveis efeitos benéficos do consumo de polifenóis, alguns estudos falharam em demonstrar associação entre

a ingestão de polifenóis e o risco para doenças cardio- e cerebrovasculares (Hertog *et al.*, 1997; Knekt *et al.*, 2000). Nesses estudos, é possível que os fatores de confusão, tais como nível socioeconômico da população estudada, tenham mascarado os efeitos benéficos do consumo de polifenóis.

No entanto, uma meta-análise combinando 17 estudos sugere que o consumo diário de três xícaras de chá, bebida rica em polifenóis, poderia promover uma redução total de 11% no risco de doenças cardiovasculares (Peters *et al.*, 2001).

Face ao exposto acima, é razoável supor que a investigação das propriedades antioxidantes dos extratos de folhas de *P. alata* e *P. edulis* pode trazer informações importantes para uma futura aplicação clínica destes extratos.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Uma vez que os extratos hidroalcoólico de folha de *P. alata* Dryander e *P. edulis* Sims são ricos em polifenóis e não há relatos na literatura sobre a atividade antioxidante destes extratos, o objetivo geral deste trabalho foi caracterizar as propriedades antioxidantes dos extratos de folhas de *P. alata* e *P. edulis*.

2.2 Objetivos específicos:

- Avaliar a capacidade antioxidante *in vitro* dos extratos de folhas de *P. alata* e *P. edulis*;
- Avaliar os efeitos antioxidantes de extratos de folhas de *P. alata* e *P. edulis* em um modelo *ex vivo* de fatias de fígado;
- Avaliar a propriedade de antiglicação *in vitro* dos extratos de *P. alata* e *P. edulis*;
- Investigar os efeitos antioxidantes da espécie de *Passiflora* listada oficialmente na Farmacopéia Brasileira (*P. alata*) no fígado, rins, coração e cérebro de ratos em um modelo de estresse oxidativo induzido por tetracloreto de carbono.

3. RESULTADOS

Os objetivos deste trabalho foram desenvolvidos e serão apresentados na forma de dois artigos distintos:

3.1 Antioxidant and antiglycation properties of *Passiflora alata* and *Passiflora edulis* extracts.

3.2 Protective effects of *Passiflora alata* extract on carbon tetrachloride induced oxidative damage in rats

**3.1 Antioxidant and antiglycation properties of *Passiflora alata*
and *Passiflora edulis* extracts.**

Manuscrito submetido à revista Food Chemistry

**Antioxidant and antiglycation properties of *Passiflora alata* and
Passiflora edulis extracts**

Martina Rudnicki ^{*1}, Marcos Roberto de Oliveira ¹, Tiago da Veiga Pereira ¹, Flávio Henrique Reginatto ², Felipe Dal-Pizzol ^{1,3}, José Cláudio Fonseca Moreira ¹.

1. *Centro de Estudos em Estresse Oxidativo, Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.*

2. *Curso de Farmácia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, RS, Brazil.*

3. *Laboratório de Fisiopatologia Experimental, Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma, SC, Brazil.*

Corresponding author:

* Martina Rudnicki

Phone: + 55 51 33165549

Fax: + 55 51 33165535

E-mail: tatakii@yahoo.com.br

Running title: Antioxidant and antiglycation properties of *P. alata* and *P. edulis*

Abstract

The leaves of *Passiflora alata* Dryander and *Passiflora edulis* Sims, traditionally used in American countries to treat both anxiety and nervousness by folk medicine, are rich in polyphenols, which have been reported as natural antioxidants. In this study, the antioxidant activity of *P. edulis* and *P. alata* hydroalcoholic leaf extracts was verified in *in vitro* and *ex vivo* assays. *P. alata* showed a higher total reactive antioxidant potential compared to *P. edulis*. The antioxidant activity of both extracts was significantly correlated to polyphenols content. In addition, both extracts attenuated *ex vivo* iron-induced cell death, quantified by lactate dehydrogenase leakage, and effectively protected against protein damage induced by iron and glucose. These findings demonstrate that the *P. alata* and *P. edulis* leaf extracts have potent *in vitro* and *ex vivo* antioxidant properties and might be considered as possible new sources of natural antioxidants.

Keywords: *Passiflora alata*, *Passiflora edulis*, antioxidant, antiglycation, polyphenols

1. Introduction

Species of the genus *Passiflora* (Passifloraceae), widely distributed throughout Latin America, are present as official drugs in pharmacopoeias of several countries (Parfitt, 1999). *Passiflora alata* Dryander (*P. alata*) is present at the Brazilian Pharmacopoeia (1977) and its leaf extract as well as the leaf extract of *Passiflora edulis* Sims (*P. edulis*), is included as an active component in many phytopharmaceutical preparations. *Passiflora* species are very popular not only because their fruits (passion fruits) but also because the tea of their leaves has been largely used in American and European countries by folk medicine as a sedative, diuretic, tonic and also in the treatment of hypertension and skin diseases (Dhawan, Dhawan & Sharma, 2004). The chemical composition of leaf extracts from *P. alata* and *P. edulis* has been extensively studied over the past few decades showing a predominance of alkaloids (Lutomski & Malek, 1975), saponins (Reginato, Kauffman, Schripsema, Guillaume, Gosmann & Schenkel, 2001; Yoshikawa, Katsuta, Mizumori & Arihara, 2000a; Yoshikawa, Katsuta, Mizumori & Arihara, 2000b) and mainly polyphenols (Pereira, Yariwake, Lancas, Wauters, Tits & Angenot, 2004; Petry et al., 2001; Ulubelen, Oksuz & Mabry, 1982).

A large number of studies have recently demonstrated that polyphenols possess antioxidant properties (Rice-Evans, Miller & Paganga, 1996) and might play a probable role in the prevention of various pathophysiological processes associated with oxidative stress such as cancer, neurodegenerative and cardiovascular diseases (Havsteen 2002; Manach, Scalbert, Morand, Remesy & Jimenez, 2004). Polyphenols may act as antioxidants by scavenging reactive oxygen and nitrogen species and chelating redox-active transition metal ions *in vitro* (Rice-Evans et al., 1996).

Despite of the widespread use of the tea of *P. alata* and *P. edulis* leaves by folk medicine and the intense investigation about the chemical composition of the *P. alata* and *P. edulis* leaf extracts, few data on their pharmacological properties are available. To date, only the central nervous system depressant properties of *P. alata* and *P. edulis* leaf extracts were investigated (Oga, de Freitas, Gomes da Silva & Hanada, 1984; Petry et al., 2001). Since these extracts are enriched in polyphenols and have not been screened for antioxidant activity, the aim of the present study was to investigate the antioxidant properties of *P. alata* and *P. edulis* hydroalcoholic leaf extracts using *in vitro* and *ex vivo* models.

2. Materials and methods

2.1 Chemicals

Thiobarbituric acid, Folin-Ciocalteu reagent, dinitrophenylhydrazine (DNPH) and luminol (3-aminophthalhydrazide) were purchased from Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO). 2,2'-Azobis (2-methylpropionamide) dihydrochloride (AAPH) and 6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (trolox) were purchased from Aldrich Chemical (Milwaukee, WI). Glycine was purchased from Nuclear (Diadema, SP, Brazil).

2.2 Plant material

Leaves of *Passiflora alata* Dryander were collected in Montenegro, Rio Grande do Sul, Brazil and leaves of *Passiflora edulis* Sims were collected in Arroio do Sal, Rio Grande do Sul, Brazil. Voucher specimens are on deposit at the Herbarium of Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, Brazil (RSPF 7232) and Departamento de Botânica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil (ICN 114356), respectively.

2.3 Extracts

P. alata and *P. edulis* leaves were air-dried at 40°C for 7 days. 10 g of dry and powdered leaves were extracted, separately, using 100 ml of ethanol 40% (plant: solvent, 1:10, w/v) under reflux (80° C) during 30 min. After cooled, the extracts were filtered and evaporated under reduced pressure yielding a dry residue.

2.4 Determination of total phenolics

Total phenolic content of the extracts was determined using the Folin-Ciocalteu method (Waterman & Mole, 1994) employing tannic acid as standard. Briefly, a 100 µl aliquot of extracts was assayed with 100 µl Folin reagent and 200 µl sodium carbonate (35%, w:v). The mixture was vortexed and diluted with distilled water to a final volume of 2 ml. The absorbance was read at 725 nm and the total phenolic content was expressed as tannic acid equivalents (TAE µg/mg extract).

2.5 Total reactive antioxidant potential

The *in vitro* antioxidant activity of the *P. edulis* and *P. alata* leaf extracts was estimated by the total reactive antioxidant potential (TRAP) assay as previously described (Polydoro et al., 2004). Briefly, the reaction mixture (4 ml), containing the free radical source (AAPH 10 mM) in glycine buffer (0.1 M) pH 8.6 and luminol (4 mM) as an external probe for monitoring radical production, was incubated at 25° C. The addition of 10µl of trolox (200 nM) as the standard antioxidant, or different concentrations of the extracts (final concentration of 0.1, 1 and 10 µg/ml) decreases the chemiluminescence proportionally to its antioxidant potential and measured in an out-of-coincident mode in a

liquid scintillation counter (Wallac 1409) as counts per minute (CPM). The chemiluminescence emission was monitored for 80 min after the addition of the *Passiflora* leaf extracts or trolox. The antioxidant capacity of 1 µg of these extracts is expressed as trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC, mM).

2.6 *Ex vivo* assay

The antioxidant activity of the *Passiflora* leaf extracts was also evaluated in an *ex vivo* assay using FeSO₄ as oxidative stress inducer. Rat liver slices (300 µm) were incubated for 90 min at 37° C under 95% O₂/ 5% CO₂ in a shaking water bath (60 oscillations/min) in a medium of oxygen-equilibrated Krebs-Ringer phosphate buffer - 10 mM glucose, pH 7.4. Immediately prior to incubation, 0.1 mM FeSO₄, *P. alata* or *P. edulis* leaf extract alone (1 µg/ml), 0.1 mM FeSO₄ plus *P. alata* or *P. edulis* leaf extract (1 µg/ml), or water was added to different liver slice samples. Ferrous sulphate, *P. alata* and *P. edulis* leaf extracts were dissolved in distilled water. After incubation, the rat liver slices were removed and the medium was centrifuged at 12,000 x g for 10 min. The supernatant portion was used to measure lactate dehydrogenase activity using a commercial kit (LDH Liquiform™, Brazil). For lipid peroxidation and carbonyl protein assays, the rat liver slices were homogenized with phosphate buffer, pH 7.0 and kept at -75° C until analysis.

2.7 Protein carbonyl determination

Protein carbonyl determination was assayed as previously described (Levine et al., 1990). Firstly, 600 µl of the liver slices homogenates were centrifuged at 7,000 x g for 15 min and 200 µl of supernatant was mixed with 10 mM 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) in 2N HCl. The mixture was incubated at room temperature for 1 h, followed by the

addition of 100 μ l 20% trichloroacetic acid and centrifugation at 3,000 x g for 3 min. The protein pellets were washed three times with 500 μ l ethanol:ethyl acetate (1:1, v/v) and dissolved in 1 ml 6 M guanidine (pH 2.3). The absorbance was read at 370 nm to quantify protein carbonyls and the data are expressed as nmol of carbonyls/mg protein.

2.8 Lipid peroxidation

Thiobarbituric acid reactive species (TBARS) formation was used to evaluate lipid peroxidation (Draper & Hadley, 1990). Firstly, 600 μ l 10% trichloroacetic acid were added to 300 μ l of the liver slices homogenates and centrifuged at 7,000 x g for 10 min. Then, 400 μ l supernatant was mixed with 400 μ l 0.67% thiobarbituric acid. The reaction mixture was incubated in a boiling water bath for 30 min, cooled to room temperature and the absorbance read at 532 nm. The data are expressed as MDA equivalents (nmol/mg protein).

2.9 Protein determination

Protein concentration in the liver slices homogenates was measured by the Lowry method employing bovine serum albumin as standard (Lowry, Rosebrough, Farr & Randall, 1951).

2.10 Non-Enzymatic Glycation of Protein

According to the method previously described (Vinson & Howard, 1996), bovine serum albumin (BSA, 10 mg/ml) in phosphate buffer (50 mM, pH 7.4) containing 0.02% (w/v) sodium azide was preincubated with the *Passiflora* extracts at final concentrations of 1, 5 and 10 μ g/ml for 30 min at room temperature (25°C). Glucose (25 mM) and fructose

(25 mM) solutions were added to the reaction mixture. After incubating at 37 °C for 3 days, the fluorescent reaction products were assayed on a fluorescence spectrophotometer with an excitation wavelength of 350 nm and an emission wavelength of 450 nm. Results were expressed as percentage inhibition of formation of the glycated protein.

2.11 Statistical analysis

Data are expressed as means \pm standard deviation (SD) of triplicates from 3 independent experiments. Differences between treatments were compared by the one-way ANOVA followed by Tukey's test for approximately normally distributed variables or non-parametric Kruskal-Wallis ANOVA followed by Dunn's procedure for variables with skewed distribution. Pearson's correlation coefficient was used to test correlation between polyphenol content and TEAC. Data analyses were performed using the SPSS 8.0 software package (SPSS Inc, Chicago, IL) and the statistical significance was set at 0.05 level (two-tailed).

3. Results

3.1 Total phenol content (TAE), antioxidant capacity (TEAC) and correlation between TEAC and TAE

The total phenolic content determination showed that *P. alata* leaf extract possesses higher phenolic content in comparison to the *P. edulis* leaf extract (Table 1).

When three different concentrations of each extract (0.1, 1 and 10 $\mu\text{g/ml}$) were used in the TRAP assay to assess the antioxidant activity, we verified that both extracts presented significant antioxidant capacity *in vitro* only at final concentrations of 1 and 10 $\mu\text{g/ml}$. Furthermore, the antioxidant capacity (expressed as TEAC) was proportional to the amount

of extract added and gave a linear response (data not shown). As also shown in Table 1, the *P. alata* leaf extract showed higher antioxidant activity when compared to *P. edulis* leaf extract. As depicted in the Fig. 1, TEAC values of the extracts and their total phenolic contents were well correlated for both *P. alata* ($r = 0.997, p < 0.01$) and *P. edulis* ($r = 0.996, p < 0.01$) leaf extracts, suggesting that the phenolic compounds make a major contribution to the antioxidant capacity of the extracts. Nevertheless, it is worth mentioning that the Folin–Ciocalteu phenol reagent gives only an approximate estimate of the total phenolic content.

3.2 *Ex vivo* assay

In order to evaluate the *ex vivo* antioxidant effects of the *P. alata* and *P. edulis* extracts at lowest concentration found as significant in TRAP assay (1 $\mu\text{g/ml}$), oxidative stress was induced in rat liver slices using iron. Whereas the addition of an oxidative stress inducer (0.1mM FeSO_4) in the incubation medium substantially increased cell death, the co-incubation with *P. alata* or *P. edulis* extracts prevented the iron-induced increase on cell death, evidenced by significantly decreased LDH leakage when compared to control slices (Fig. 2).

To better characterize the protective effects of the *P. alata* and *P. edulis* extracts against iron-induced oxidative damage, the levels of protein carbonyls and TBARS in the rat liver slices were determined. While both *Passiflora* extracts failed to show statistically significant influence on TBARS levels (Fig. 3), the levels of protein carbonyls were significantly lower in the slices co-incubated with *P. alata* or *P. edulis* extracts compared to the control slices (Fig. 4).

3.3 Non-Enzymatic Glycation of Protein

We examined the protective effect of the *Passiflora* extracts on advanced glycation end products (AGEs) formation (Fig. 5). The *P. alata* extract showed a significant inhibition of AGEs formation at concentrations of 5 and 10 $\mu\text{g/ml}$. In contrast, the *P. edulis* extract showed significant inhibition of AGEs formation only at a concentration of 10 $\mu\text{g/ml}$.

4. Discussion

Many studies carried out over the past few years have shown that polyphenols found in dietary and medicinal plants inhibit oxidative stress (Manach et al., 2004; Rice-Evans et al., 1996). The *P. alata* and *P. edulis* leaf extracts are rich in polyphenols, especially C-glycosyl derivatives of apigenin and luteolin such as vitexin, isovitexin, orientin and isoorientin (Pereira et al., 2004; Ulubelen et al., 1982; Petry et al., 2001). In this study we showed, for the first time, both antioxidant and antiglycation properties of *P. alata* and *P. edulis* hydroalcoholic leaf extracts. Similar to other studies evaluating antioxidant activity of leaf extracts from medicinal plants (Zainol, bd-Hamid, Yusof & Muse, 2003) and fruits (Banerjee, Dasgupta & De, 2005), we found a direct linear relationship between the total phenolic content and total antioxidant activity in both the *P. alata* and *P. edulis* leaf extracts, indicating that the phenolics compounds might be the major contributors to the antioxidant activities of these extracts.

Iron is a well-described initiator of free radical oxidations stimulating the lipid peroxidation and inhibiting the function of various membrane proteins *in vitro* (Qian & Buettner, 1999). In our model, the inclusion of iron in the incubation medium of rat liver slices substantially increased cell death, generation of TBARS and protein carbonyl

content. However, the co-incubation with *P. alata* or *P. edulis* leaf extracts at concentration of 1 µg/ml provided significant antioxidant protection to the rat liver slices, as evidenced by decreased LDH leakage. In addition, while several studies investigating the antioxidant activity of extracts rich in polyphenols have focused on protective effects against lipid peroxidation (Polydoro et al., 2004; Zainol et al., 2003), our findings demonstrate that both *P. alata* and *P. edulis* leaf extracts have significant protective effects against carbonyl protein formation. This is of particular importance, since oxidized proteins are often functionally inactive and oxidative stress may affect the activity of enzymes, receptors, and membrane transporters (Stadtman, 2001). Moreover, oxidized proteins are suggested to play a toxic role in the pathogenesis of several diseases, especially on neurodegenerative diseases (Dean, Fu, Stocker & Davies, 1997).

Proteins are also modified by glucose through the glycation reaction resulting in the formation of AGEs (Ulrich & Cerami, 2001). The contribution of AGEs toward diabetes, aging and Alzheimer's disease has received considerable attention in recent years (Chace, Carubelli & Nordquist, 1991; Jakus & Rietbrock, 2004), and free radicals have been shown to participate in AGEs formation (Halliwell, 2001). It has been reported that antioxidants and radical scavengers inhibit these processes (Nakagawa, Yokozawa, Terasawa, Shu & Juneja, 2002). In this study, the *P. alata* and *P. edulis* leaf extracts showed protective effects against glucose-induced protein modifications, significantly inhibiting the AGEs formation. However, there is evidence demonstrating that antioxidant activity might not be the unique mechanism required to protect against early stage glycation for all reactants (Vasan et al., 1996). Thus, the mechanism of inhibition of AGEs formation by *Passiflora* extracts requires further investigation.

In conclusion, the data presented here indicate that the *P. alata* and *P. edulis* hydroalcoholic leaf extracts possess *in vitro* and *ex vivo* antioxidant activity against oxidative proteins damage and should be considered as new sources of natural antioxidants. Further studies are needed to examine the potential use of these extracts in the prevention of pathologies such as diabetes mellitus and neurodegenerative diseases where oxidative stress damage to protein seems to play a major role.

Acknowledgments

This work was performed with financial support by CNPq, CAPES, PROPESQ-UFRGS and FAPERGS - 02/0057.0-PROADE2-RS/BRAZIL.

Abbreviations

AAPH = 2,2'-Azobis (2-methylpropionamidine) dihydrochloride

AGEs = Advanced glycation end products

BSA = Bovine serum albumin

DNPH = 2,4-dinitrophenylhydrazine

LDH = Lactate dehydrogenase

TAE = Tannic acid equivalents

TBARS = Thiobarbituric acid reactive species

TEAC = Trolox equivalent antioxidant capacity

TRAP = Total reactive antioxidant potential

References

(1977). *Farmacopéia Brasileira*. São Paulo: Andrei.

Banerjee, A., Dasgupta, N. & De, B. (2005). In vitro study of antioxidant activity of *Syzygium cumini* fruit. *Food Chemistry*, 90, 727-733.

Chace, K. V., Carubelli, R. & Nordquist, R. E. (1991). The role of nonenzymatic glycosylation, transition metals, and free radicals in the formation of collagen aggregates. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 288, 473-480.

Dean, R. T., Fu, S., Stocker, R. & Davies, M. J. (1997). Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *Biochemical Journal*, 324 (Pt 1), 1-18.

Dhawan, K., Dhawan, S. & Sharma, A. (2004). Passiflora: a review update. *Journal of Ethnopharmacology* 94, 1-23.

Draper, H. H. & Hadley, M. (1990). Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods in Enzymology*, 186, 421-431.

Halliwell, B. (2001). Role of free radicals in the neurodegenerative diseases: therapeutic implications for antioxidant treatment. *Drugs and Aging*, 18, 685-716.

Havsteen, B. H. (2002). The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology and Therapeutics*, 96, 67-202.

Jakus, V. & Rietbrock, N. (2004). Advanced glycation end-products and the progress of diabetic vascular complications. *Physiological Research*, 53, 131-142.

Levine, R. L., Garland, D., Oliver, C. N., Amici, A., Climent, I., Lenz, A. G., Ahn, B. W., Shaltiel, S. & Stadtman, E. R. (1990). Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods in Enzymology*, 186, 464-478.

Lowry, O., Rosebrough, N., Farr, A. & Randall, R. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193, 265-275.

Lutomski, J. & Malek, B. (1975). Pharmacological investigations on the raw material of the genus *Passiflora*. IV: the comparison of contents of alkaloids in some harman raw materials. *Planta Medica*, 27, 381-384.

Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Remesy, C. & Jimenez, L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition*, 79, 727-747.

Nakagawa, T., Yokozawa, T., Terasawa, K., Shu, S. & Juneja, L. R. (2002). Protective activity of green tea against free radical- and glucose-mediated protein damage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 2418-2422.

Oga, S., de Freitas, P. C., Gomes da Silva, A. C. & Hanada, S. (1984). Pharmacological trials of crude extract of *Passiflora alata*. *Planta Medica*, 50, 303-306.

Parfitt, K. (1999). *Martindale - The complete drug reference*. London: Pharmaceutical Press.

Pereira, C. A., Yariwake, J. H., Lancas, F. M., Wauters, J. N., Tits, M. & Angenot, L. (2004). A HPTLC densitometric determination of flavonoids from *Passiflora alata*, P.

edulis, *P. incarnata* and *P. caerulea* and comparison with HPLC method. *Phytochemical Analysis*, 15, 241-248.

Petry, R. D., Reginatto, F., de-Paris, F., Gosmann, G., Salgueiro, J. B., Quevedo, J., Kapczinski, F., Ortega, G. G. & Schenkel, E. P. (2001). Comparative pharmacological study of hydroethanol extracts of *Passiflora alata* and *Passiflora edulis* leaves. *Phytotherapy Research*, 15, 162-164.

Polydoro, M., de Souza, K. C., Andrades, M. E., Da Silva, E. G., Bonatto, F., Heydrich, J., Dal-Pizzol, F., Schapoval, E. E., Bassani, V. L. & Moreira, J. C. (2004). Antioxidant, a pro-oxidant and cytotoxic effects of *Achyrocline satureioides* extracts. *Life Sciences*, 74, 2815-2826.

Qian, S. Y. & Buettner, G. R. (1999). Iron and dioxygen chemistry is an important route to initiation of biological free radical oxidations: an electron paramagnetic resonance spin trapping study. *Free Radical Biology and Medicine*, 26, 1447-1456.

Reginatto, F. H., Kauffman, C., Schripsema, J., Guillaume, D., Gosmann, G. & Schenkel, E. P. (2001). Steroidal and triterpenoidal glucosides from *Passiflora alata*. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 12, 32-36.

Rice-Evans, C. A., Miller, N. J. & Paganga, G. (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine*, 20, 933-956.

Stadtman, E. R. (2001). Protein oxidation in aging and age-related diseases. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 928, 22-38.

Ulrich, P. & Cerami, A. (2001). Protein glycation, diabetes, and aging. *Recent Progress in Hormone Research*, 56, 1-21.

Ulubelen, A., Oksuz, S. & Mabry, T. J. (1982). C-glucosylflavonoids from *Passiflora pittieri*, *P. alata*, *P. ambigua* and *Adenia mannii*. *Journal of Natural Products*, 45, 783.

Vasan, S., Zhang, X., Zhang, X., Kapurniotu, A., Bernhagen, J., Teichberg, S., Basgen, J., Wagle, D., Shih, D., Terlecky, I., Bucala, R., Cerami, A., Egan, J. & Ulrich, P. (1996). An agent cleaving glucose-derived protein crosslinks in vitro and in vivo. *Nature*, 382, 275-278.

Vinson, J. A. & Howard T.B.III (1996). Inhibition of protein glycation and advanced glycation end products by ascorbic acid and other vitamins and nutrients. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 7, 659-663.

Waterman, P. & Mole, S. (1994). *Analysis of phenolic plant metabolites*. Oxford: Blackwell Scientific Publications.

Yoshikawa, K., Katsuta, S., Mizumori, J. & Arihara, S. (2000a). Four cycloartane triterpenoids and six related saponins from *Passiflora edulis*. *Journal of Natural Products*, 63, 1229-1234.

Yoshikawa, K., Katsuta, S., Mizumori, J. & Arihara, S. (2000b). New cycloartane triterpenoids from *Passiflora edulis*. *Journal of Natural Products*, 63, 1377-1380.

Zainol, M. K., bd-Hamid, A., Yusof, S. & Muse, R. (2003). Antioxidative activity and total phenolic compounds of leaf, root and petiole of four accessions of *Centella asiatica* (L.) Urban. *Food Chemistry*, 81, 575-581.

Figure legends

Table 1. The results are expressed as means \pm SD of triplicates from 3 independent experiments.

Fig. 1. Correlation between TEAC values with total phenolic content (TAE) of the *P. alata* and *P. edulis* leaf extracts. Data are representative of at least three independent experiments performed in triplicate \pm SD.

Fig. 2. The effect of the *P. alata* and *P. edulis* leaf extracts on LDH leakage. Results are expressed as average percentage leakage of the enzyme into the incubation medium compared to a homogenized fresh rat liver slice \pm SD of triplicates from 3 independent experiments. * $p < 0.05$ compared to control.

Fig.3. The effect of the *P. alata* and *P. edulis* leaf extracts on TBARS levels. Results are expressed as means \pm SD of triplicates from 3 independent experiments.

Fig. 4. The effect of the *P. alata* and *P. edulis* leaf extracts on protein carbonyls content. Results are expressed as means \pm SD of triplicates from 3 independent experiments. * $p < 0.05$ compared to control.

Fig. 5. Inhibition of protein glycation (AGE formation) by *Passiflora* extracts. Results are expressed as average percentage of inhibition of AGE formation \pm SD of from 3 independent experiments performed in quintuplicate. * $p < 0.05$ compared to control.

Table 1. Total phenolic content and antioxidant capacity of *Passiflora* extracts.

	<i>Extract</i>	
	<i>P. alata</i>	<i>P. edulis</i>
TAE ($\mu\text{g}/\text{mg}$ extract)	170.9 ± 1.6	92.5 ± 2.2
TEAC	0.52 ± 0.012	0.23 ± 0.02

Fig. 1

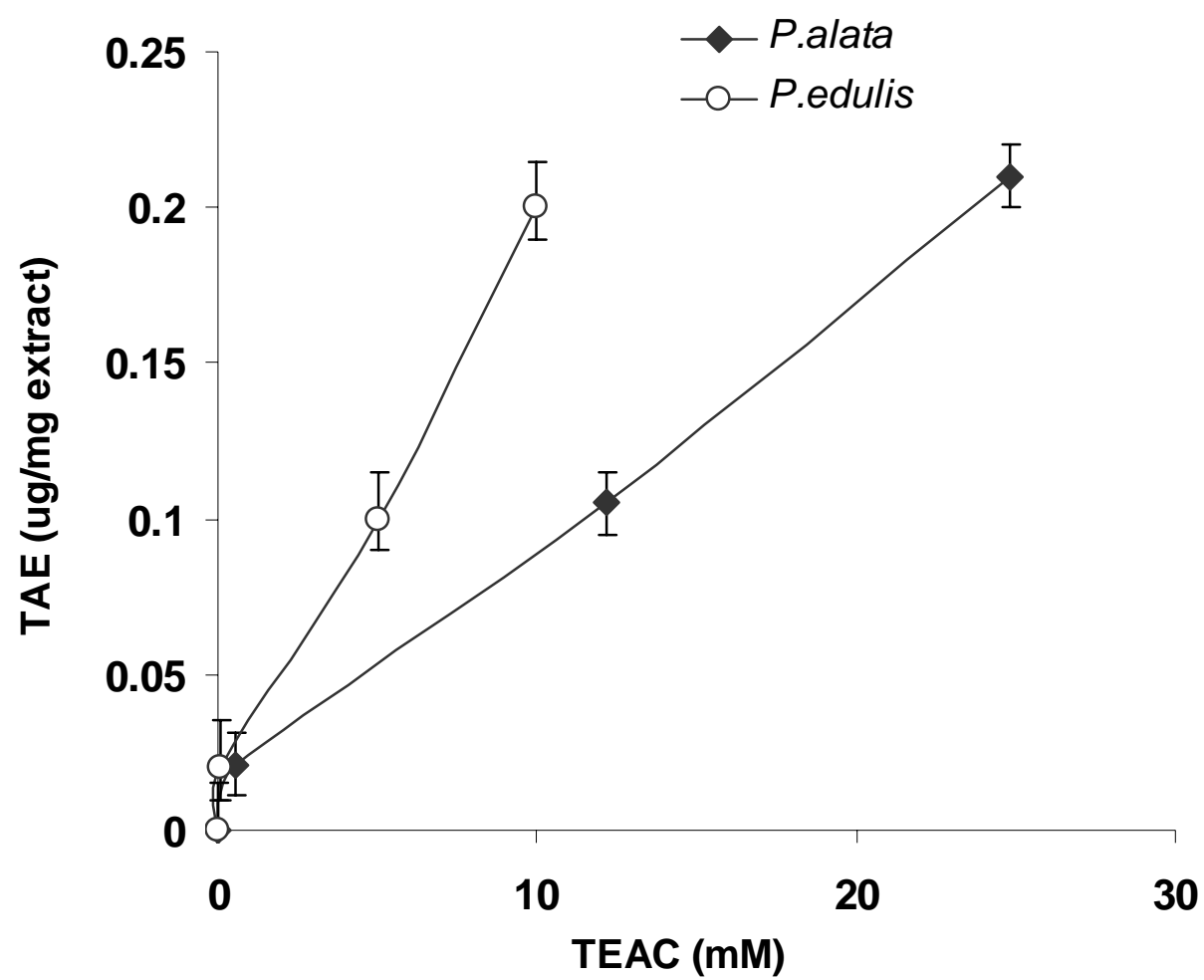


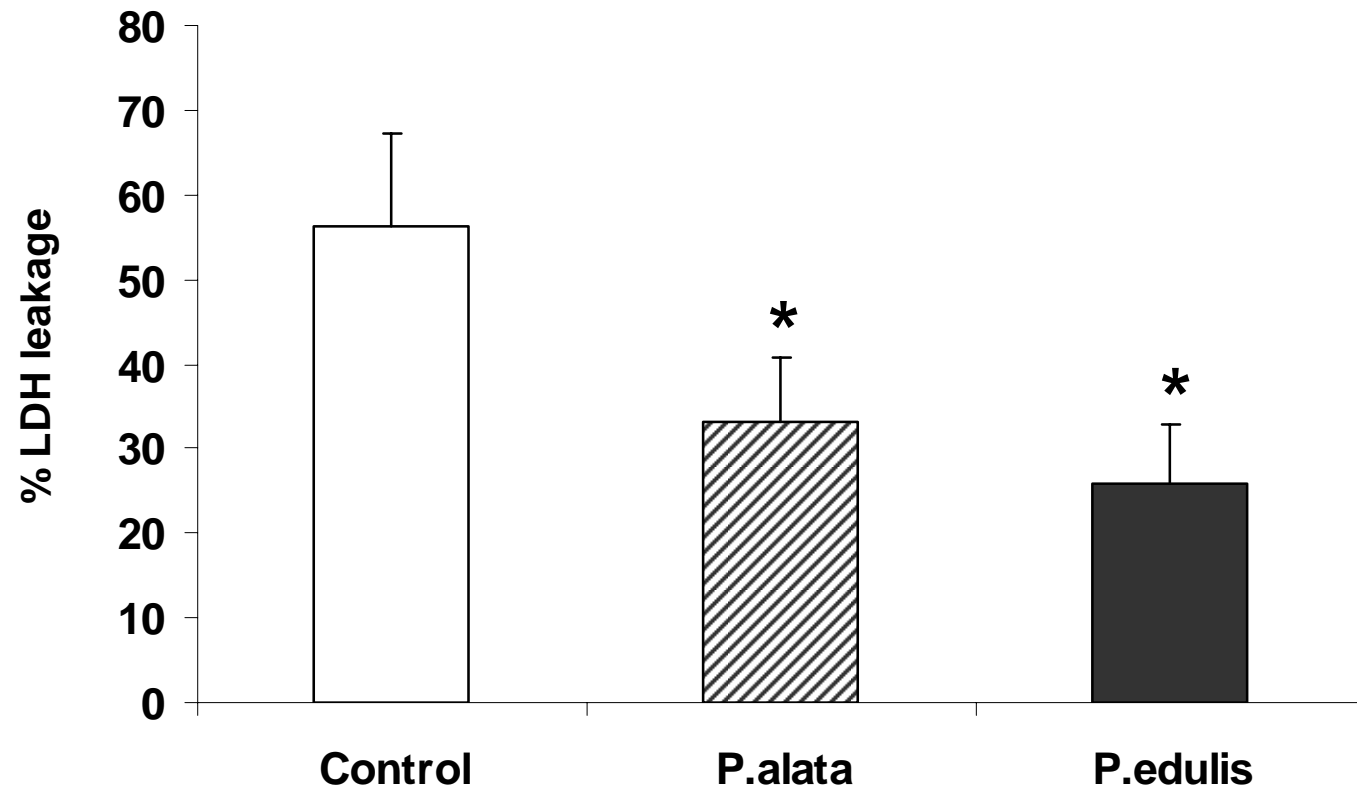
Fig. 2

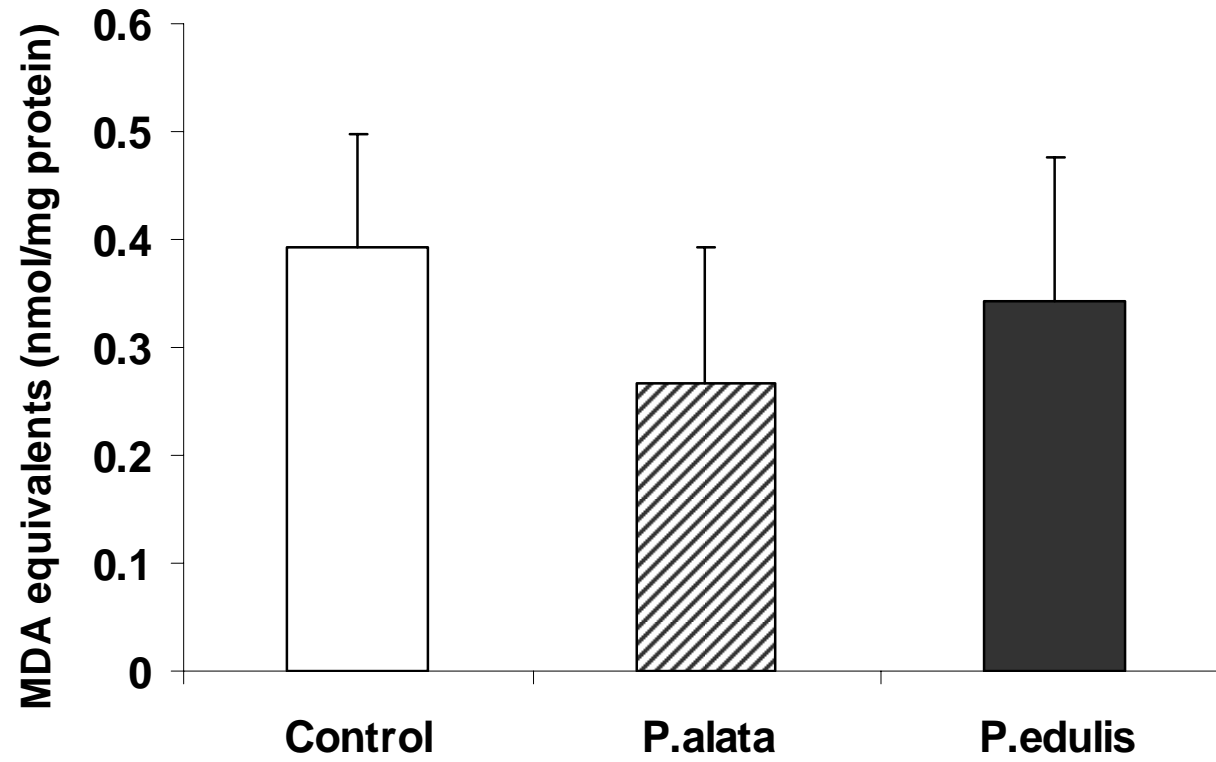
Fig. 3

Fig. 4

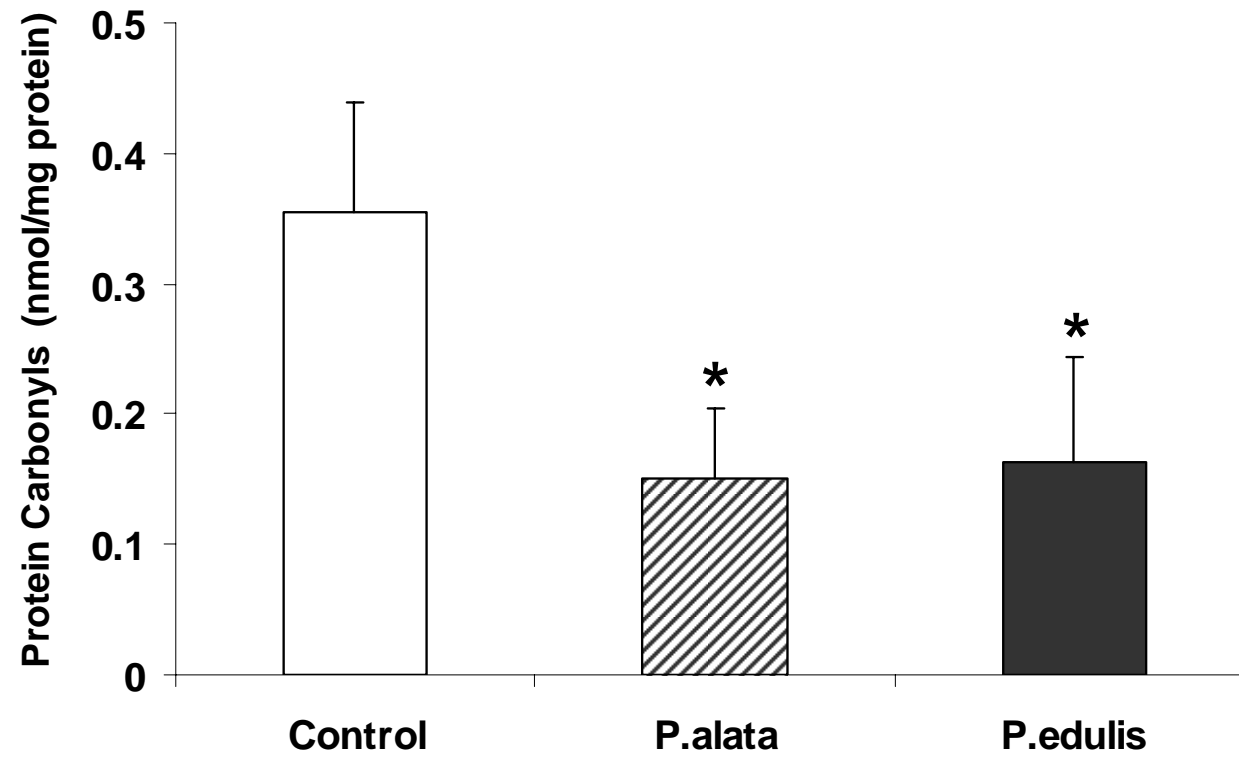
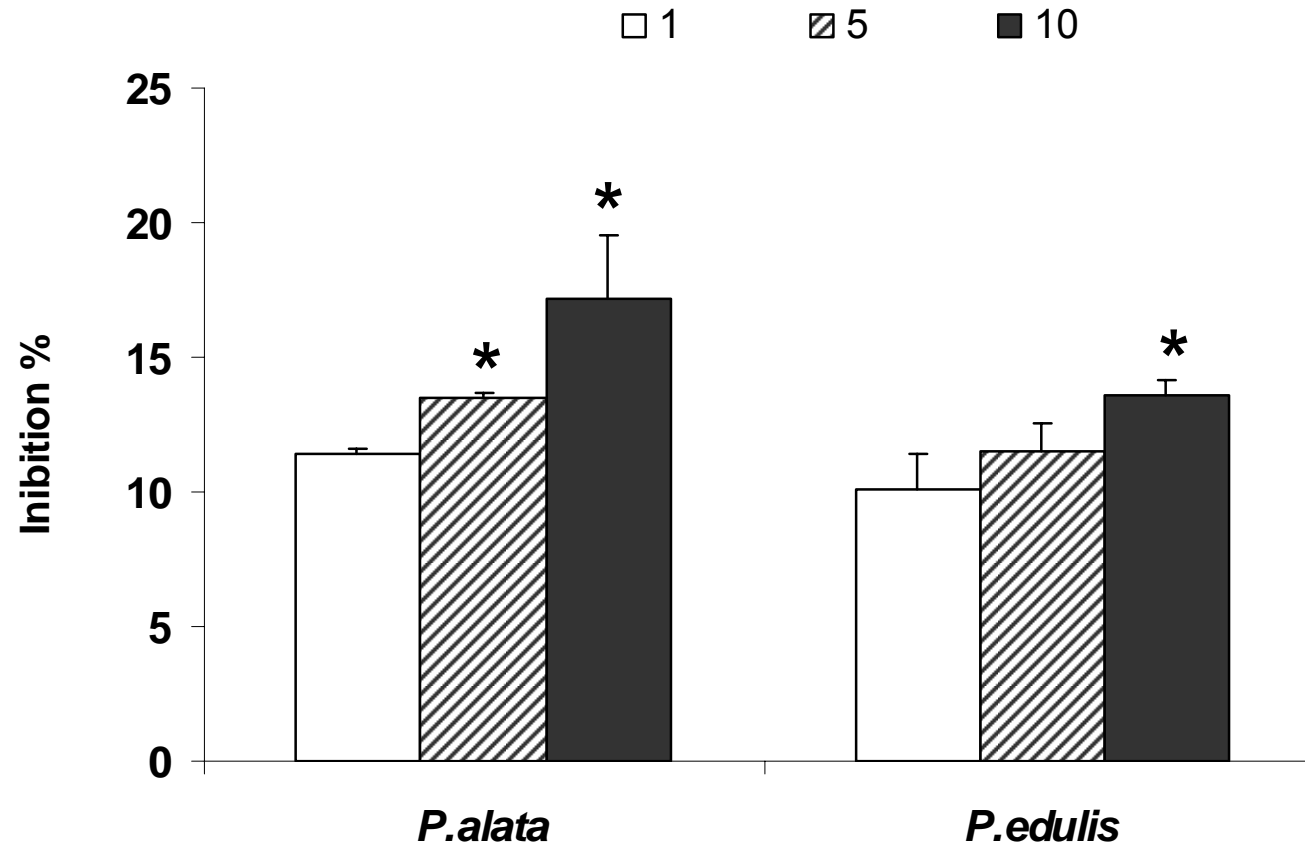


Fig. 5



3.2 Protective effects of *Passiflora alata* extract on carbon tetrachloride induced oxidative damage in rats

Manuscrito submetido à revista Food and Chemical Toxicology

**Protective effects of *Passiflora alata* extract on carbon tetrachloride
induced oxidative damage in rats**

Martina Rudnicki^{*,1}, Márcio Martins Silveira¹, Tiago da Veiga Pereira¹, Marcos Roberto de
Oliveira¹, Flávio Henrique Reginatto², Felipe Dal-Pizzol^{1,3}, José Cláudio Fonseca
Moreira¹.

1. *Centro de Estudos em Estresse Oxidativo, Departamento de Bioquímica, Instituto de
Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS,
Brazil.*

2. *Curso de Farmácia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Passo Fundo,
Passo Fundo, RS, Brazil.*

3. *Laboratório de Fisiopatologia Experimental, Universidade do Extremo Sul Catarinense,
Criciúma, SC, Brazil.*

Corresponding author:

* Martina Rudnicki

Phone: + 55 51 33165549

Fax: + 55 51 33165535

E-mail: tatakii@yahoo.com.br

Running title: Protective effects of *P. alata* extract against oxidative damage

ABSTRACT

The leaf extract of *Passiflora alata* Dryander (*P. alata*) has been demonstrated to possess antioxidant activity *in vitro*. The aim of this study was to investigate the effects of *P. alata* leaf extract in carbon tetrachloride-treated rats. Male Wistar rats were randomly allocated into four groups: group 1 (control - vehicle), group 2 and 3 (*P. alata* extract - 1 and 5 mg/kg, respectively) and group 4 (trolox – 0.18 mg/kg). Rats received daily treatment by oral gavage for 30 days followed by a single dose of CCl₄ (3 ml/kg i.p. in vegetal oil) on the 30th day and were killed after 6 hours. The pretreatment with the *P. alata* extract provided significant protection to liver, evidenced by lower degree of necrosis, decreased lipid peroxidation (TBARS) and higher catalase and superoxide dismutase activities. Additionally, pretreated-rats with *P. alata* (5 mg/kg) showed significantly decreased cardiac TBARS levels. Our results indicate that low oral dose of *P. alata* extract has both hepato and cardioprotective effects in rats treated with CCl₄.

Keywords: *Passiflora alata*, antioxidant, carbon tetrachloride

INTRODUCTION

Epidemiological studies have suggested an inverse relation between the consumption of polyphenol-rich foods and beverages and the risk of degenerative diseases, particularly cancers and cardiovascular diseases (Arts and Hollman, 2005; Peters et al., 2001). In this regard, there has been a great deal of interest in the screening and characterization of novel potentially therapeutic compounds of polyphenol-rich extracts from foods and medicinal plants (Banerjee et al., 2005; Zainol et al., 2003). The antioxidant properties of polyphenols and their ability to modulate the activity of various enzymes have been demonstrated in *in vitro* studies and are believed to be a primary mechanism for their biological effects (Middleton et al., 2000). However, the question remains of whether these properties demonstrated in *in vitro* studies are relevant to protect against oxidative damage *in vivo*, where polyphenols are at a very low concentrations depending on bioavailability and metabolism.

Leaf extract of *Passiflora alata* Dryander (*P. alata*) is a rich source of polyphenols, particularly flavones C-glycosides such as vitexin, isovitexin, orientin and isoorientin (Muller et al., 2005; Pereira et al., 2004; Ulubelen et al., 1982). *P. alata* is a medicinal plant (Passifloraceae) and the tea of its leaves has been widely used in folk medicine throughout Latin America for numerous applications including as an anxiolytic, sedative, diuretic and analgesic (Dhawan et al., 2004). Moreover, *P. alata* leaf extract is used as active component in many phytopharmaceutical preparations. We previously demonstrated that the high phenolic content might be the major contributor to the antioxidant activity of the hydroalcoholic extract from *P. alata* leaves *in vitro* and *ex vivo* models (Rudnicki et al., 2004). However, the *in vivo* antioxidant activity of *P. alata* leaf extract is unknown.

Therefore, the aim of the present study was to investigate the effects of the oral administration of the *P. alata* leaf extract at doses equivalent to that in 1-5 cups of *P. alata* leaves tea in humans against oxidative damage using the well-established rat model of carbon tetrachloride.

MATERIAL AND METHODS

Plant material

Leaves of *P. alata* Dryander were collected in Montenegro, Rio Grande do Sul, Brazil. Voucher specimen is on deposit at the Herbarium of Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, Brazil (RSPF 7232).

***P. alata* leaves extract**

P. alata leaves were air-dried at 40°C for 7 days. 10 g of dry and powdered leaves were extracted, using 100 ml of ethanol 40% (plant:solvent, 1:10, w/v) under reflux (Murcia et al., 2001) during 30 min. After cooled, the extracts were filtered and evaporated under reduced pressure yielding a dry residue.

Animals

Male Wistar rats (250 - 330 g) from our breeding colony were used in these experiments. The animals were handled under standard laboratory conditions of a 12-h light/dark cycle and fixed temperature (25 ± 2 °C). Food and water were available *ad libitum*. All experimental procedures were performed in accordance with the NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals with the approval of the local ethics committee.

Treatment

The animals were randomly allocated into one of four experimental groups (n = 6) and were allowed to acclimate for a week prior to experimentation. Group 1 served as control and received vehicle (water), groups 2 and 3 were given *P. alata* leaf extract (1 and 5 mg/kg, respectively) and group 4 was given trolox (water-soluble vitamin E analogue - 0.18 mg/kg). The doses of the extract were determined by calculating the amount of extract that would be consumed in a cup (group 2) or five cups (group 3) of the tea of *P. alata* leaves by a 70 kg male, prepared with 2 fresh leaves as recommended by Brazilian folk medicine (Matos et al., 2001). The amount of extract was reduced to the body size of the rats (~270 g), being administered 0.25 and 1.25 mg of extract/day, respectively. The dose of trolox was based in Recommended Dietary Allowance of vitamin E for a 70 kg male (15 mg) and was also reduced to the body size of the rats, being administered 0.05 mg of trolox/d. *P. alata* extract and trolox dissolved in water were administered daily by oral gavage for 30 days. On the 30th day a single i.p. dose of CCl₄ (3 ml/kg in vegetal oil, chosen dose in a pilot experiment) was injected into the animals which were killed 6 h later by decapitation. Blood was collected and liver, heart, kidney and brain were excised, washed with ice-cold 0.9% NaCl (w/v) to remove the blood, homogenized in phosphate buffer pH 7.0 and immediately stored at -70°C until analysis. An extra sample of liver was excised and fixed in 4% formalin solution for histopathologic analysis.

Determination of serum aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT) activities

The serum activities of ALT and AST were measured to assess the hepatotoxicity. The serum ALT and AST activities were measured using commercial kits (Labtest, Brazil) and were expressed as units/L.

Histological examinations

For histopathologic analysis after fixation, excised liver tissues were embedded in paraffin and then routinely stained with hematoxylin and eosin. A blinded experienced pathologist performed histopathologic analyses. Inflammation and necrosis were graded as none, mild, moderate, or severe.

Antioxidant enzyme activities

Superoxide oxidase (SOD) activity (E.C. 1.15.1.1) was measured spectrophotometrically by the inhibition rate of autocatalytic adrenochrome formation in a reaction buffer containing 1 mM adrenaline/50 mM glycine-NaOH (pH 10.2) as previously described (Boveris, 1984). The method of Aebi (Aebi, 1984) was used to analyze catalase (CAT) activity (E.C. 1.11.1.6). Homogenates were sonicated in 50 mM phosphate buffer (pH 7.0) and the resulting suspension was centrifuged at $3000 \times g$ for 10 min. The supernatant was used for enzyme assay. CAT activity was assayed by measuring the rate of decrease in H_2O_2 absorbance at 240 nm. Enzyme activities were reported as units/mg of protein.

Oxidative stress variables

Oxidative damage to proteins was quantified by carbonyl protein assay based on the reaction with dinitrophenylhydrazine (Sigma Chemical) as previously described (Levine et

al., 1990). Briefly, proteins were precipitated by the addition of 20% trichloroacetic acid and redissolved in dinitrophenylhydrazine, and the absorbance was read at 370 nm. The data are expressed as nmol of carbonyls/mg protein.

Thiobarbituric acid reactive species (TBARS) formation was used to evaluate lipid peroxidation as described by Draper and Hadley (Draper and Hadley, 1990) Firstly, 600 μ l 10% trichloroacetic acid were added to 300 μ l of the homogenates and centrifuged at 7,000 x g for 10 min. Then, 400 μ l of the supernatant was mixed with 400 μ l 0.67% thiobarbituric acid and incubated in a boiling water bath for 30 min, cooled to room temperature and the absorbance was read at 532 nm using 1,1,3,3-tetramethoxypropane (Sigma Chemical) as an external standard. The data are expressed as malondialdehyde (MDA) equivalents (nmol/mg protein).

Protein content of the homogenates was measured by the Lowry method employing bovine serum albumin as standard (Lowry et al., 1951) .

Statistical analysis

Data are expressed as means \pm standard deviation (S.D.). Differences between treatments were compared by the one-way ANOVA followed by Tukey's test. Data analyses were performed using the SPSS 8.0 software package (SPSS Inc, Chicago, IL) and the statistical significance was set at 0.05 level (two-tailed).

RESULTS

Effects of the *P. alata* pretreatment on CCl₄-induced hepatotoxicity

The serum activities of AST and ALT were used as the biochemical markers for the early acute hepatic damage. As shown in Table 1, the groups pretreated with both doses of

the *P. alata* leaf extract showed significantly lower activities of AST and ALT than did the control group. The group pretreated with trolox also demonstrated significant lower serum activities of both enzymes in comparison to the control group.

Liver histopathology after CCl₄ administration revealed lobular disarray, ballooning degeneration, fatty degeneration, moderate inflammatory cell infiltration, and severe necrosis of hepatocytes (Fig. 1A). Our data suggest that there was a severe liver failure in our model. The pretreatment with the *P. alata* leaf extract prevented the hepatohistological changes induced by CCl₄ in a dose-dependent manner. Whereas mild hepatocellular necrosis and moderate inflammatory cell infiltration were observed in the liver of *P. alata* pretreated-rats at 1 mg/kg (Fig. 1B), the pretreatment with the 5 mg/kg of *P. alata* extract demonstrated mild hepatocellular necrosis and mild inflammatory cell infiltration (Fig. 1C). The group pretreated with trolox demonstrated hepatohistological changes similar to the pretreated with 1 mg/kg of *P. alata* leaf extract (Fig. 1D).

Hepatic antioxidant enzyme activities

The hepatic antioxidant enzymes activities were decreased with a single dose of CCl₄ (3 ml/kg i.p., data not shown). However, SOD and CAT activities were observed to be significantly higher with the pretreatment with *P. alata* in both doses when compared to control group. The pretreated-rats with trolox demonstrated only higher CAT activity.

Oxidative variables

In order to evaluate the effects of the pretreatment with *P. alata* leaf extract on CCl₄-induced oxidative damage, TBARS and carbonyl protein levels were determined. Due to the fact that CCl₄ is also distributed and deposited in organs such as heart, kidney

and brain (Ahmad et al., 1987), we measured the oxidative variables in these organs. No significant effect on CCl₄-induced carbonyl proteins formation was detected with the *P. alata* leaf extract and trolox pretreatment in any tested organ (Fig. 2). Similarly, no significant effects on TBARS levels of kidney and brain were detected with the *P. alata* leaf extract and trolox pretreatment (Fig. 3). In contrast, the pretreatment with the *P. alata* leaf extract was able to significantly prevent oxidative damage to lipids in the liver at both doses and in the heart at 5 mg/kg pretreatment (Fig. 3). The rats pretreated with trolox showed similar TBARS levels in both liver and heart when compared to *P. alata* pretreated groups (Fig. 3).

DISCUSSION

Since it was demonstrated that polyphenols, which are widely distributed in plants, may play a probable role in the prevention of various diseases associated with oxidative stress, polyphenol-rich extracts or even isolated polyphenols have been extensively studied (Banerjee et al., 2005; Chidambara Murthy et al., 2002b; Chidambara Murthy et al., 2002a; Rudnicki et al., 2004; Zainol et al., 2003). However, much of the evidence supporting an antioxidant function for medicinal plants rich in polyphenols has been derived from *in vitro* and animal experiments, which are often performed with doses much higher than those to which humans are exposed through the diet. In our previous study, we demonstrated that the hydroalcoholic extract from *P. alata* leaves could be considered as a new source of natural antioxidant due to its high antioxidant activity *in vitro* correlated to phenolic content (Rudnicki et al., 2004). In this study we investigated the *in vivo* antioxidant effects of the *P. alata* leaf extract in the rat model of CCl₄-induced toxicity. The main finding of this investigation is that the significant protection of the liver and the

heart against oxidative damage resulted from the daily oral administration of *P. alata* leaf extract in doses equivalent to consumption of *P. alata* leaves extract in 1-5 cups of *P. alata* leaves tea by an average adult human male (~70 kg body mass).

CCl₄-induced toxicity is a well-characterized murine model for the oxidative damage *in vivo*. The toxicity of CCl₄ results from its reductive dehalogenation by the cytochrome P450 enzyme system into trichloromethyl free radical, which readily interacts with molecular oxygen to form the trichloromethyl peroxy radical (Williams and Burk, 1990). Both radicals are capable of binding to proteins or lipids, or of abstracting a hydrogen atom from an unsaturated lipid, leading to membrane lipid peroxidation and finally cell necrosis (Brattin et al., 1985; Recknagel et al., 1989). Thus, the antioxidant activity and/or the inhibition of free radicals generation might be an important mechanism involved in the protection against CCl₄-induced damage. Indeed, a considerable body of literature has reported that several antioxidant agents, such as vitamin E (Sodergren et al., 2001), *Gingko biloba* (Ozenirler et al., 1997) and black tea extracts (Fadhel and Amran, 2002) reduce CCl₄-induced toxic effects by prevention of lipid peroxidation. In the present study, we found that pretreatment with the *P. alata* leaf extract markedly inhibits acute CCl₄-induced damage as evidenced by decreased serum activities of AST and ALT, reduced hepatic lipid peroxidation and histological observation.

The decrease in antioxidant enzymes activities induced by CCl₄ administration may be also resulting from inactivation caused by lipid peroxides or enhanced free radical concentration in oxidative stress conditions (Szymonik-Lesiuk et al., 2003). The results of the present study indicate that the pretreatment with *P. alata* leaf extract is capable of enhancing/maintaining the activity of hepatic enzymes which are involved in combating reactive oxygen species (ROS). This result is in agreement with previous studies that have

demonstrated that pretreatment with polyphenols-rich extracts may preserve antioxidant enzyme activities due to the free radical scavenging activity, and/or induction of defense enzyme expression (Chidambara Murthy et al., 2002b; Chidambara Murthy et al., 2002a). For example, the pretreatment with grape pomace extracts for 14 days showed to preserve the catalase, glutathione peroxidase and SOD activities (Chidambara Murthy et al., 2002b). Therefore, our findings suggest that at least part of the protective effects of the pretreatment of the *P. alata* leaf extract might be attributable to its antioxidant activity.

Several studies have demonstrated that liver is not the only target organ of CCl₄. CCl₄ has been reported to cause lipid peroxidation in other organs such as kidneys, heart and brain (Ahmad et al., 1987; Szymonik-Lesiuk et al., 2003). In the present study, TBARS and carbonyl proteins levels were measured in these organs to examine the antioxidant activity with the *P. alata* leaf extract pretreatment. Our results indicate that the pretreatment with the *P. alata* leaf extract failed to show protective effects to kidneys and brain. These findings are consistent with previous study (Fadhel and Amran, 2002), showing that the pretreatment with the black tea extract for 3, 6, 9 and 12 months did not provide significant protection to kidneys against CCl₄ toxicity.

On the other hand, with regard to cardiac biomarkers of oxidative stress, the pretreatment with the *P. alata* leaf extract at 5 mg/kg significantly prevented lipid peroxidation. Numerous dietary intervention studies with experimental animals and humans indicate that polyphenol-rich foods and beverages could exert cardioprotective effects (Kaplan et al., 2001; Vinson et al., 2004). Furthermore, epidemiological studies suggest a significant inverse correlation between polyphenol consumption and cardiovascular risk (Arts and Hollman, 2005; Peters et al., 2001). On the basis of several *in vitro* studies, it can be speculated that mechanisms contributing to the biological effects of

polyphenols may include their antioxidant effects, their ability to modulate certain cell signaling pathways and gene expression, and their capacity to influence cell membrane properties and receptor function (Middleton et al., 2000).

In conclusion, we have demonstrated in an animal model that daily oral intake of *P. alata* extract at doses equivalent to drinking 1-5 cups of the *P. alata* leaves tea by an average adult human male may provide significant protection to liver and heart against oxidative damage. Since its efficacy was similar to the water-soluble vitamin E analogue, it is conceivable that the protective effects observed by the pretreatment with the *P. alata* extract are related to its antioxidant activity. However, further studies to elucidate the active principles and the underlying mechanism responsible for the protective effects are warranted.

Acknowledgments

This work was performed with financial support by CNPq, CAPES, PROPESQ-UFRGS and FAPERGS - 02/0057.0-PROADE2-RS/BRAZIL.

Abbreviations

AST = aspartate aminotransferase

ALT = alanine aminotransferase

BSA = Bovine serum albumin

CAT = catalase

CCl₄ = carbon tetrachloride

MDA= malondialdehyde

ROS = reactive oxygen species

SOD = superoxide dismutase

TBARS = Thiobarbituric acid reactive species

Reference List

Aebi, H., 1984. Catalase in vitro. *Methods in Enzymology* 105, 121-126.

Ahmad, F.F., Cowan, D.L., and Sun, A.Y., 1987. Detection of free radical formation in various tissues after acute carbon tetrachloride administration in gerbil. *Life Sciences* 41, 2469-2475.

Arts, I.C. and Hollman, P.C., 2005. Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. *American Journal of Clinical Nutrition* 81, 317S-325S.

Banerjee, A., Dasgupta, N., and De, B., 2005. In vitro study of antioxidant activity of *Syzygium cumini* fruit. *Food Chemistry* 90, 727-733.

Boveris, A., 1984. Determination of the production of superoxide radicals and hydrogen peroxide in mitochondria. *Methods in Enzymology* 105, 429-435.

Brattin, W.J., Glende, E.A., Jr., and Recknagel, R.O., 1985. Pathological mechanisms in carbon tetrachloride hepatotoxicity. *Free Radical Biology and Medicine* 1, 27-38.

Chidambara Murthy, K.N., Jayaprakasha, G.K., and Singh, R.P., 2002a. Studies on antioxidant activity of pomegranate (*Punica granatum*) peel extract using in vivo models. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50, 4791-4795.

Chidambara Murthy, K.N., Singh, R.P., and Jayaprakasha, G.K., 2002b. Antioxidant activities of grape (*Vitis vinifera*) pomace extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50, 5909-5914.

Dhawan, K., Dhawan, S., and Sharma, A., 2004. Passiflora: a review update. *Journal of Ethnopharmacology* 94, 1-23.

Draper, H.H. and Hadley, M., 1990. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods in Enzymology* 186, 421-431.

Fadhel, Z.A. and Amran, S., 2002. Effects of black tea extract on carbon tetrachloride-induced lipid peroxidation in liver, kidneys, and testes of rats. *Phytotherapy Research* 16 Suppl 1, S28-S32.

Kaplan, M., Hayek, T., Raz, A., Coleman, R., Dornfeld, L., Vaya, J., and Aviram, M., 2001. Pomegranate juice supplementation to atherosclerotic mice reduces macrophage lipid peroxidation, cellular cholesterol accumulation and development of atherosclerosis. *Journal of Nutrition* 131, 2082-2089.

Levine, R.L., Garland, D., Oliver, C.N., Amici, A., Climent, I., Lenz, A.G., Ahn, B.W., Shaltiel, S., and Stadtman, E.R., 1990. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods in Enzymology* 186, 464-478.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193, 265-275.

Matos, F.J.A., Viana, G.B., and Bandeira, M.A., 2001. *Guia Fitoterápico*. Secretaria de Saúde do Estado do Ceará, Fortaleza.

Middleton, E., Kandaswami, C., and Theoharides, T.C., 2000. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: Implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacological Reviews* 52, 673-751.

Muller, S.D., Vasconcelos, S.B., Coelho, M., and Biavatti, M.W., 2005. LC and UV determination of flavonoids from *Passiflora alata* medicinal extracts and leaves. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 37, 399-403.

Murcia, M.A., Jimenez, A.M., and Martinez-Tome, M., 2001. Evaluation of the antioxidant properties of Mediterranean and tropical fruits compared with common food additives. *Journal of Food Protection* 64, 2037-2046.

Ozenirler, S., Dincer, S., Akyol, G., Ozogul, C., and Oz, E., 1997. The protective effect of *Ginkgo biloba* extract on CCl₄-induced hepatic damage. *Acta Physiologica Hungarica* 85, 277-285.

Pereira, C.A., Yariwake, J.H., Lancas, F.M., Wauters, J.N., Tits, M., and Angenot, L., 2004. A HPTLC densitometric determination of flavonoids from *Passiflora alata*, *P. edulis*, *P. incarnata* and *P. caerulea* and comparison with HPLC method. *Phytochemical Analysis* 15, 241-248.

Peters, U., Poole, C., and Arab, L., 2001. Does tea affect cardiovascular disease? A meta-analysis. *American Journal of Epidemiology* 154, 495-503.

Recknagel, R.O., Glende, E.A., Jr., Dolak, J.A., and Waller, R.L., 1989. Mechanisms of carbon tetrachloride toxicity. *Pharmacology and Therapeutics*. 43, 139-154.

Rudnicki, M., Oliveira, M.R., Reginatto, F.H., Dal-Pizzol, F., and Moreira, J.C.F., 2004. In vitro antioxidant evaluation of *Passiflora alata* and *Passiflora edulis* extracts. *Free Radical Biology and Medicine* 36, S131-S132.

Sodergren, E., Cederberg, J., Vessby, B., and Basu, S., 2001. Vitamin E reduces lipid peroxidation in experimental hepatotoxicity in rats. *European Journal of Nutrition* 40, 10-16.

Szymonik-Lesiuk, S., Czechowska, G., Stryjecka-Zimmer, M., Slomka, M., Madro, A., Celinski, K., and Wielosz, M., 2003. Catalase, superoxide dismutase, and glutathione peroxidase activities in various rat tissues after carbon tetrachloride intoxication. *Journal of Hepato-biliary-pancreatic Surgery*. 10, 309-315.

Ulubelen, A., Oksuz, S., and Mabry, T.J., 1982. C-glucoylflavonoids from *Passiflora pittieri*, *P. alata*, *P. ambigua* and *Adenia mannii*. *Journal of Natural Products* 45, 783.

Vinson, J.A., Teufel, K., and Wu, N., 2004. Green and black teas inhibit atherosclerosis by lipid, antioxidant, and fibrinolytic mechanisms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52, 3661-3665.

Williams, A.T. and Burk, R.F., 1990. Carbon tetrachloride hepatotoxicity: an example of free radical-mediated injury. *Seminars in liver disease*. 10, 279-284.

Zainol, M.K., bd-Hamid, A., Yusof, S., and Muse, R., 2003. Antioxidative activity and total phenolic compounds of leaf, root and petiole of four accessions of *Centella asiatica* (L.) Urban. *Food Chemistry* 81, 575-581.

Figure legends

Table 1. Values are expressed as mean \pm S.D. * $p < 0.05$ compared to control group.

Fig. 1. Effects of the *P. alata* leaf extract pretreatment on CCl₄-induced oxidative damage in rats. Rats were pretreated with water (control), *P. alata* leaf extract (1 and 5 mg/kg, ig) or trolox (0.18 mg/kg) once daily for 30 consecutive days. On the 30th day, rats received a single dose of CCl₄ and were after 6 hours. (A) Liver from control rats; (B) liver from rats pretreated with *P. alata* leaf extract (1 mg/kg); (C) liver from rats pretreated with *P. alata* leaf extract (5 mg/kg); (D) liver from rats pretreated with trolox (0.18 mg/kg). Representative illustrations (Hematoxylin and eosin x 400.)

Fig. 2. Effects of the *P. alata* leaf extract on CCl₄ induced protein carbonil levels in rat liver, kidney, brain and heart. Values are expressed as mean \pm S.D. and compared to control group.

Fig. 3. Effects of the *P. alata* leaf extract on CCl₄ induced lipid peroxidation in rat liver, kidney, brain and heart. Values are expressed as mean \pm S.D. * $p < 0.05$ compared to control group.

Table 1. Effects of pretreatment with the *P. alata* leaf extract on serum activities of AST and ALT and hepatic antioxidant enzymes in rats treated with CCl₄.

Enzyme	Control (n=6)	1 mg/kg (n=6)	5 mg/kg (n=6)	Trolox (n=6)
AST (units/L)	453.66 ± 40.05	211.66 ± 11.85*	263.33 ± 45.35*	292.33 ± 28.36*
ALT (units/L)	132.33 ± 24.54	88.66 ± 9.50*	54.33 ± 4.04*	92.33 ± 12.50*
SOD (units/mg protein)	18.65 ± 5.50	29.38 ± 6.54*	28.32 ± 7.23*	23.33 ± 3.39
CAT (units/mg protein)	23.51 ± 14.21	45.00 ± 12.96*	50.41 ± 9.33*	51.58 ± 6.11*

Fig 1

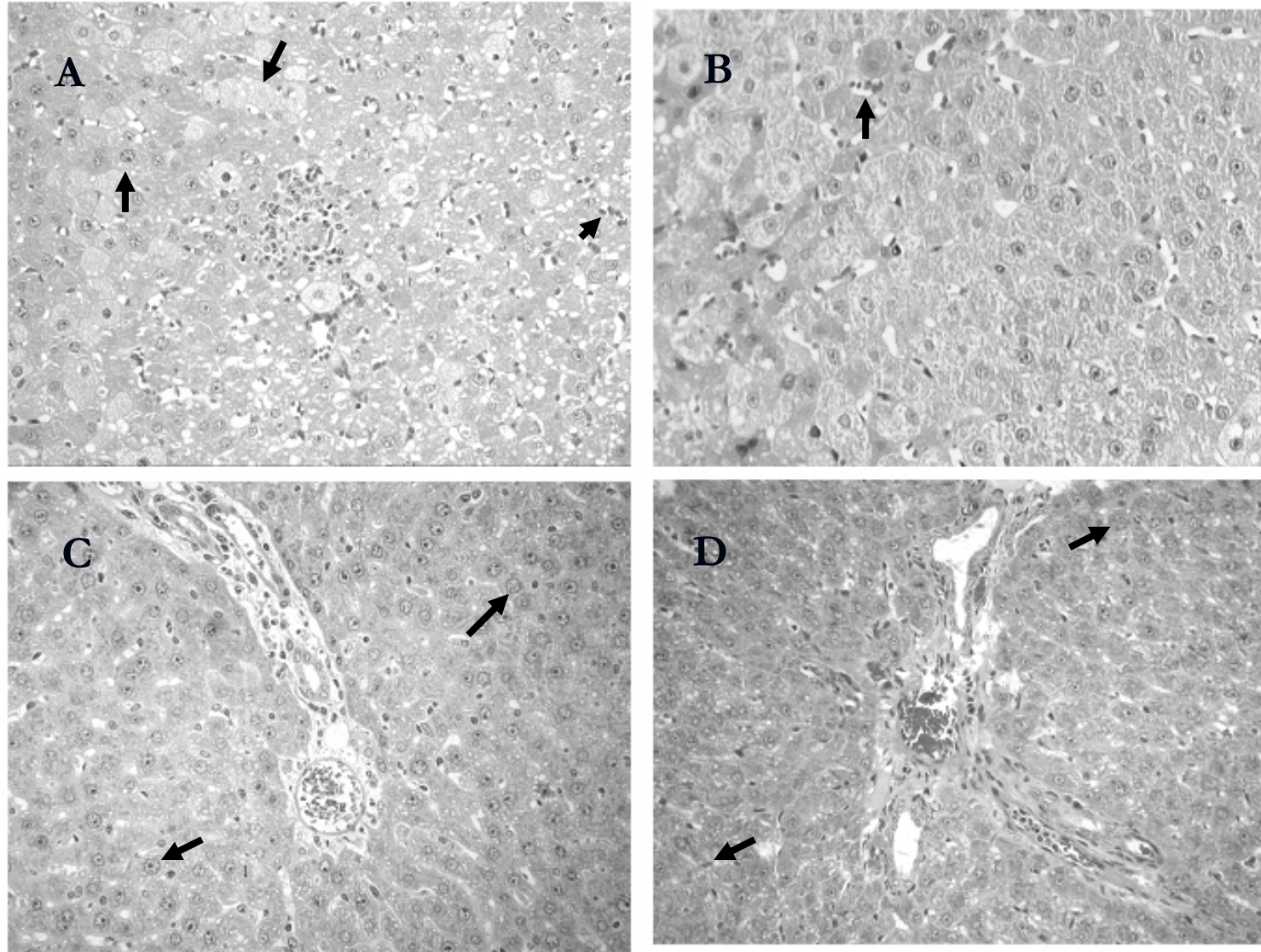


Fig. 2

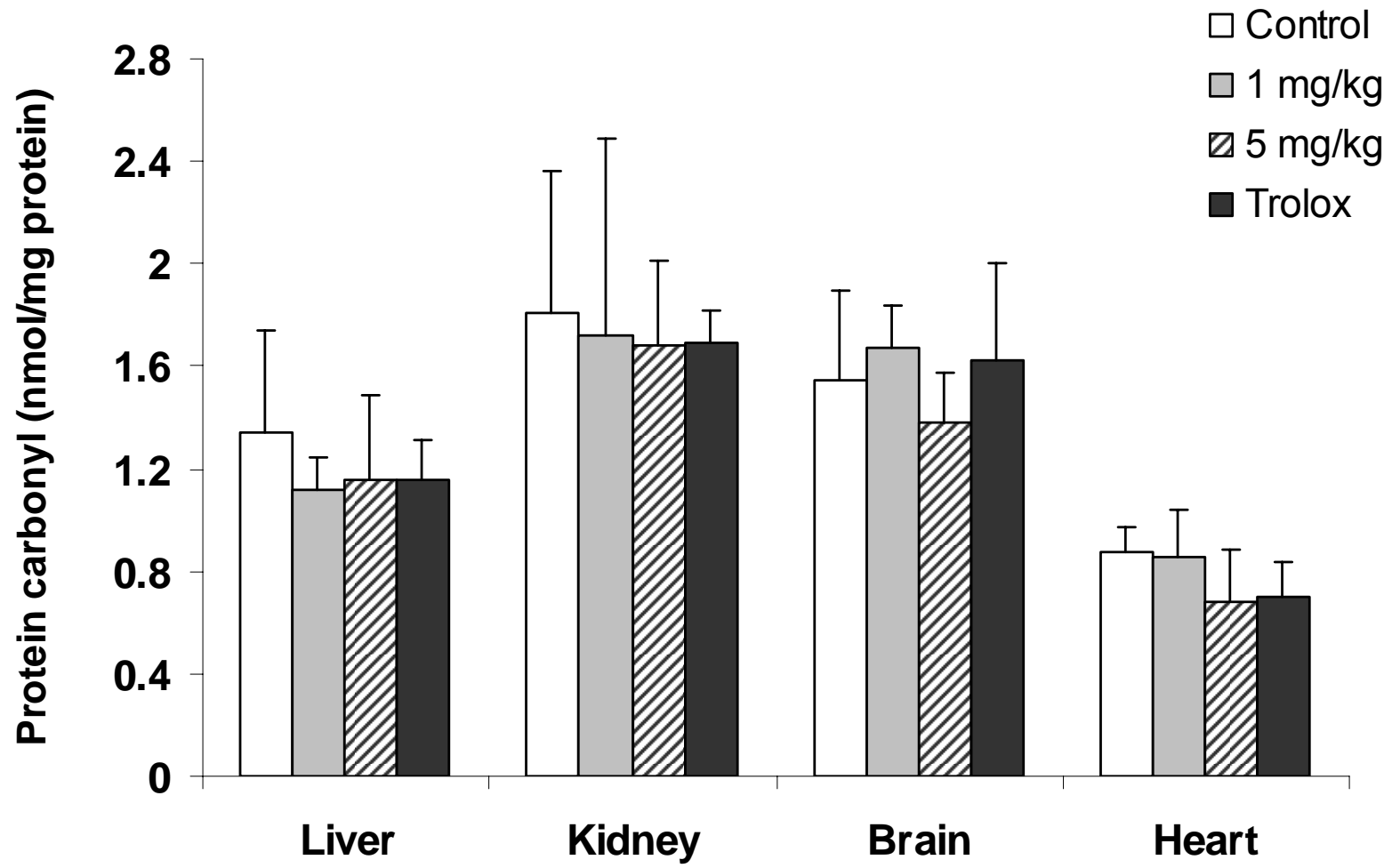
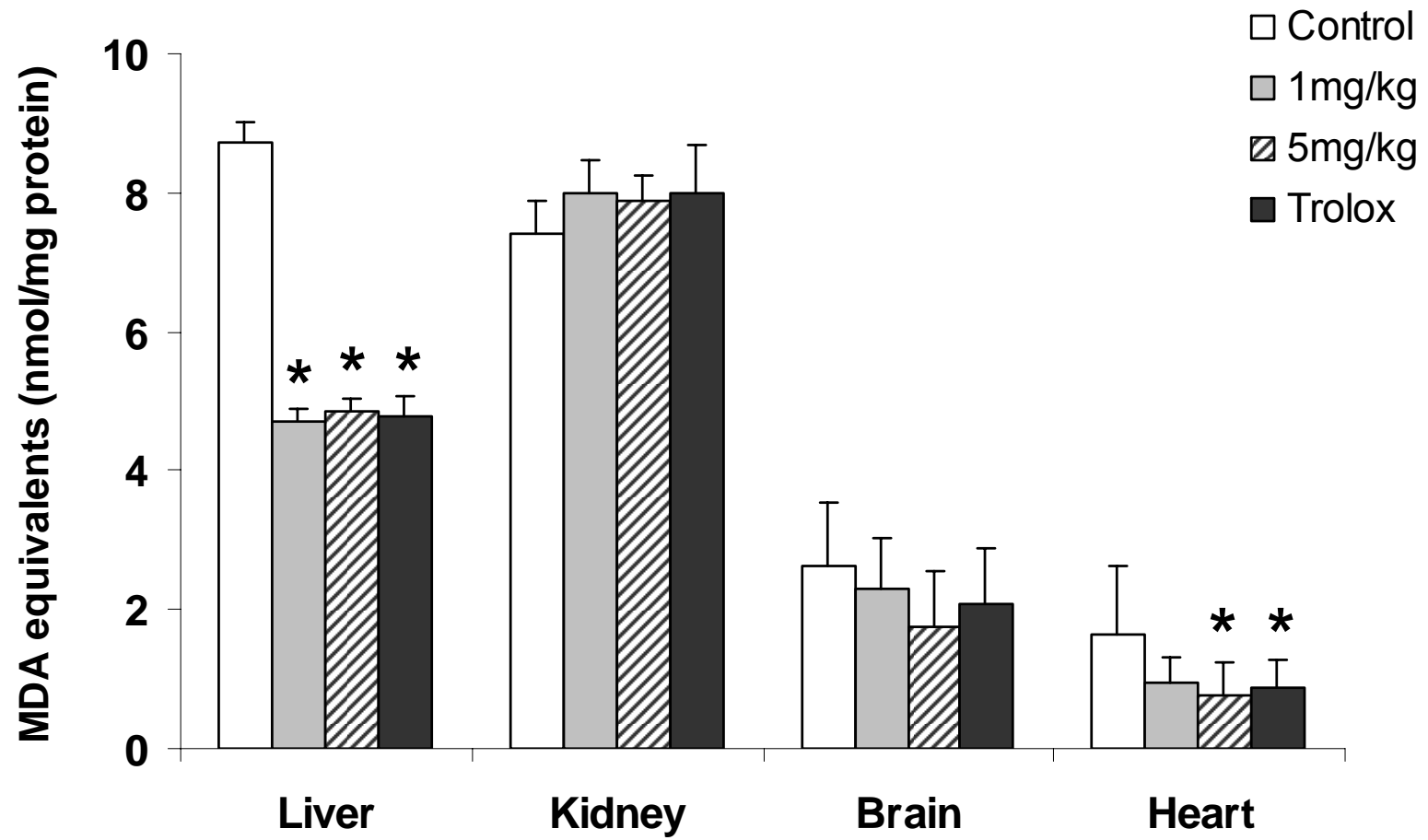


Fig. 3



4. DISCUSSÃO GERAL

4.1 Os extratos de folha de *P. alata* e *P. edulis* demonstram capacidade antioxidante *in vitro* em baixas concentrações

A investigação das propriedades antioxidantes de extratos de frutas e plantas medicinais ricos em polifenóis vem ganhando grande interesse da comunidade científica (Chidambara Murthy *et al.*, 2002a; Chidambara Murthy *et al.*, 2002b; Zainol *et al.*, 2003; Banerjee *et al.*, 2005). A principal razão é proveniente dos resultados de estudos epidemiológicos que sugerem uma associação entre o consumo de polifenóis, compostos reconhecidamente antioxidantes, e o risco reduzido de doenças associadas ao estresse oxidativo (Arts e Hollman, 2005; Hertog *et al.*, 1995; Knekt *et al.*, 2002).

As espécies de *Passiflora* são amplamente utilizadas na medicina popular de vários países (Dhawan *et al.*, 2004). Em adição, a investigação da composição química dos extratos de *Passiflora* tem demonstrado que os polifenóis são constituintes majoritários dos extratos de folha de *P. alata* e *P. edulis* (Oga *et al.*, 1984; Paris *et al.*, 2002; Pereira *et al.*, 2004; Petry *et al.*, 2001; Ulubelen *et al.*, 1982). Portanto, no presente estudo as capacidades antioxidantes dos extratos de folha de *P. alata* e *P. edulis* foram investigadas. Os resultados encontrados demonstram que ambos os extratos de folha de *P. alata* e *P. edulis* apresentam propriedades antioxidantes *in vitro*.

Baixas concentrações plasmáticas de polifenóis são detectadas após a ingestão de uma refeição rica em polifenóis (Kroon *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 1995).

Segundo Kroon *et al.* (2004), as concentrações plasmáticas de polifenóis se encontram na faixa de 0,1-10 $\mu\text{mol/L}$ após a ingestão de 50 mg de polifenóis. Desse modo, as propriedades antioxidantes de extratos ricos em polifenóis testadas em altas concentrações *in vitro* poderiam superestimar o potencial antioxidante *in vivo*. No presente estudo, as capacidades antioxidantes dos extratos de folha de *P. alata* e *P. edulis* foram investigadas em baixas concentrações, representando um cenário mais realístico das concentrações atingidas *in vivo* e fornecendo suporte para aplicabilidade dos resultados aqui apresentados.

Em adição, uma relação linear entre a capacidade antioxidante e o conteúdo de polifenóis totais dos extratos de folha de *P. alata* e *P. edulis* foi observada. A correlação demonstrada no presente estudo foi similar à encontrada para outros extratos ricos em polifenóis (Banerjee *et al.*, 2005; Zainol *et al.*, 2003), sugerindo que o conteúdo de polifenóis poderia ser o responsável por uma parte dos efeitos antioxidantes nesses extratos. No entanto, por se tratar de um extrato bruto de folha de *P. alata* e *P. edulis*, as propriedades antioxidantes encontradas podem ser resultantes do sinergismo dos constituintes presentes em ambos os extratos.

4.2 Os extratos de folha de *P. alata* e *P. edulis* protegem contra dano protéico mediado por sulfato ferroso e por glicose

Vários estudos têm demonstrado que os polifenóis conferem proteção contra dano oxidativo de lipídios (Polydoro *et al.*, 2004), proteínas (Nakagawa *et al.*, 2002) e ácidos nucléicos (Harper *et al.*, 1999) *in vitro*.

Segundo Stadtman (2001), proteínas modificadas podem estar diretamente envolvidas na patogênese de várias doenças. Neste sentido, os radicais livres podem induzir modificações protéicas incluindo perda de função, tais como atividades de enzimas, receptores e transportadores de membrana, resultando em disfunções biológicas (Stadtman, 2001). No entanto, poucos estudos sobre os efeitos protetores dos polifenóis contra dano oxidativo de proteínas estão disponíveis na literatura. No presente estudo, as fatias de fígado de ratos incubadas com extrato de folha de *P. alata* ou *P. edulis* demonstraram níveis estatisticamente menores de carbonis protéicos quando submetidas a um indutor de dano oxidativo (FeSO₄) e comparados ao grupo controle.

As proteínas podem também ser modificadas através de reações de glicação (Ulrich e Cerami, 2001). A reação de grupos amino de proteínas com açúcares redutores leva a formação de bases de Schiff e produtos de Amadori (Maillard e Gautier, 1912). Esses produtos iniciais sofrem vários arranjos posteriores, gerando produtos avançados finais de glicação (AGES) (Ulrich e Cerami, 2001). Evidências sugerem que os AGES estariam envolvidos em várias condições patológicas, incluindo complicações diabéticas, envelhecimento e na doença de Alzheimer (Chace *et al.*, 1991; Jakus e Rietbrock, 2004). Neste estudo,

ambos os extratos de folha de *P. alata* e *P. edulis* demonstraram inibir significativamente a formação de AGEs.

A participação de radicais livres, tais como radical superóxido, oxigênio singleto e peróxido de hidrogênio, tem sido descrita na formação de AGEs (Halliwell, 2001). Em adição, antioxidantes e seqüestradores de radicais livres poderiam inibir estes processos (Nakagawa *et al.*, 2002). Portanto, é tentador especular que a capacidade antioxidante dos extratos de folha de *P. alata* e *P. edulis* pode contribuir para a inibição da formação de AGEs demonstrada por estes extratos. No entanto, a formação de AGEs pode ser também afetada por desidratação, ciclização e oxidação (Vasan *et al.*, 1996). Desse modo, o mecanismo de inibição da formação de AGEs dos extratos das espécies de *Passiflora* requer investigações adicionais.

4.3 A administração de extrato de folha de *P. alata* demonstrou efeitos protetores contra estresse oxidativo induzido por tetracloreto de carbono em ratos

Devido ao fato da *P. alata* ser uma planta oficial da Farmacopéia Brasileira e demonstrar um potencial antioxidante reativo total maior quando comparado ao extrato de folhas de *P. edulis* (como apresentado no manuscrito 1), os efeitos antioxidantes *in vivo* foram investigados somente para o extrato de folha de *P. alata*.

As doses de extrato de folha de *P. alata* testadas, corrigidas para o peso médio dos ratos tratados, foram determinadas pelo cálculo da quantidade de extrato que seria equivalente a uma ou cinco xícaras de chá de folhas de *P. alata* consumidas por um homem de 70 kg, preparado com duas folhas frescas de *P. alata* como recomendado pela medicina popular brasileira (Matos *et al.*, 2001).

A toxicidade induzida por CCl₄ é um modelo bem estabelecido para dano oxidativo *in vivo*. A toxicidade resultante da administração de CCl₄ é proveniente de sua desalogenação em radicais triclorometil através do sistema de enzimas citocromo P450. Os radicais triclorometil rapidamente interagem com oxigênio molecular, formando radical peroxitriclorometil. (Williams e Burk, 1990). Estes dois radicais são capazes de interagir com proteínas e lipídios, ou ainda abstrair um átomo de hidrogênio de lipídios insaturados, levando à lipoperoxidação de membrana e finalmente a necrose celular (Brattin *et al.*, 1985; Recknagel *et al.*, 1989). Desse modo, as propriedades antioxidantes e/ou a inibição da geração de radicais livres poderiam ser mecanismos importantes envolvidos na proteção contra dano induzido por CCl₄. De fato, várias evidências sugerem que agentes antioxidantes, tais como vitamina E (Sodergren *et al.*, 2001), extratos de *Gingko biloba* (Ozenirler *et al.*, 1997) e chá preto (Fadhel e Amran, 2002) reduzem os efeitos tóxicos induzidos por CCl₄ através da inibição da lipoperoxidação. No presente estudo, demonstrou-se que o pré-tratamento com extrato de folhas de *P. alata* foi capaz de inibir significativamente o dano induzido por CCl₄ evidenciado por um grau menor de necrose. Essa proteção conferida pelo pré-tratamento com o extrato de folhas de *P. alata* foi demonstrada por atividades menores de

enzimas séricas de dano hepático (AST e ALT), níveis mais baixos de lipoperoxidação hepática e observação histológica.

Segundo Szymonik-Lesiuk *et al.* (2003), a toxicidade induzida pela administração de CCl₄ é também caracterizada por atividades enzimáticas reduzidas das enzimas hepáticas envolvidas no combate de radicais livres. A inibição da atividade das enzimas catalase, superóxido dismutase e glutathione peroxidase poderia ser resultante da inativação causada pelos peróxidos de lipídios e/ou pela produção exacerbada de radicais livres em condições de estresse oxidativo (Szymonik-Lesiuk *et al.*, 2003). No presente estudo, somente as atividades enzimáticas das enzimas superóxido dismutase e catalase foram avaliadas. Os achados demonstram que as atividades enzimáticas de ambas as enzimas superóxido dismutase e catalase foram significativamente maiores nos grupos pré-tratados com extrato de folha de *P. alata* comparado ao grupo controle. A preservação da atividade para essas duas enzimas foi anteriormente descrita por outros estudos demonstrando que o pré-tratamento com extratos ricos em polifenóis poderia impedir a inibição enzimática através do seqüestramento de radicais livres ou ainda induzir a expressão destas enzimas (Chidambara Murthy *et al.*, 2002a; Chidambara Murthy *et al.*, 2002b). Portanto, face ao exposto acima o presente estudo sugere que os efeitos hepatoprotetores demonstrados pelo pré-tratamento com extrato de folhas de *P. alata* podem ser atribuídos à capacidade antioxidante do extrato, anteriormente demonstrada.

4.4 O pré-tratamento com extrato de folhas de *P. alata* na dose de 5 mg/kg demonstrou efeitos protetores contra lipoperoxidação cardíaca

Embora a administração de CCl₄ seja utilizada como modelo de toxicidade hepática, os estudos sobre o metabolismo de CCl₄ demonstram que seus metabólitos são encontrados em diversos órgãos tais como rim, cérebro e coração (Szymonik-Lesiuk *et al.*, 2003; Ahmad *et al.*, 1987). Os compostos derivados do metabolismo de CCl₄ podem causar dano oxidativo nestes órgãos evidenciados por níveis aumentados de produtos de lipoperoxidação e carbonilação protéica (Szymonik-Lesiuk *et al.*, 2003).

No presente estudo, os efeitos do pré-tratamento com extrato de folha de *P. alata* foram avaliados no rim, cérebro e coração. O pré-tratamento com extrato de folhas de *P. alata* falhou em demonstrar efeitos protetores significativos contra lipoperoxidação e carbonilação protéica nos rins e no cérebro. Os resultados do presente estudo são similares aos encontrados em um estudo prévio que demonstra que o pré-tratamento com extrato de chá preto, bebida rica em polifenóis, durante 3, 6, 9 e 12 meses não conferiu efeitos protetores contra lipoperoxidação renal induzida pela administração de CCl₄ (Fadhel e Amran, 2002).

No entanto, enquanto nenhum efeito significativo na carbonilação protéica cardíaca foi constatada, níveis de TBARS significativamente mais baixos foram encontrados com o pré-tratamento com extrato de folhas de *P. alata* na dose de 5 mg/kg. Numerosos estudos de intervenção com animais ou humanos demonstram que bebidas e alimentos ricos em polifenóis poderiam exercer efeitos

cardioprotetores (Kaplan *et al.*, 2001; Vinson *et al.*, 2004). Além disso, estudos epidemiológicos recentes sugerem uma correlação inversa entre o consumo de polifenóis e risco para doenças cardiovasculares (Arts e Hollman, 2005; Hertog *et al.*, 1995; Knekt *et al.*, 2002). Segundo Nijveldt *et al.* (2001), várias propriedades químicas e efeitos biológicos dos polifenóis poderiam estar envolvidos na proteção contra risco cardiovascular. A hipótese mais plausível sobre o mecanismo dos efeitos benéficos dos polifenóis seria a de que as propriedades antioxidantes dos polifenóis poderiam proteger contra as conseqüências deletérias do estresse oxidativo associadas a muitos, senão todos, os fatores para o risco cardiovascular.

4.5 Por que os efeitos antioxidantes do extrato de folha de *P. alata* diferem nos modelos *in vitro* e *in vivo*?

No presente estudo, a investigação *in vitro* dos efeitos antioxidantes do extrato de folha de *P. alata* demonstrou que enquanto a incubação de fatias de fígado de rato com extrato de *P. alata* falhou em demonstrar influência significativa nos níveis dos produtos de lipoperoxidação, os níveis de carbonis protéicos foram significativamente menores quando submetidas a um indutor de dano oxidativo (FeSO₄). Em adição, o extrato de folhas de *P. alata* demonstrou proteger proteínas contra dano induzido por glicose *in vitro*.

Interessantemente, quando os efeitos antioxidantes do extrato de folha de *P. alata* foram avaliados em um modelo de dano oxidativo induzido por CCl₄ em

ratos, o pré-tratamento com o extrato em ambas as doses de 1 e 5 mg/kg demonstrou níveis estatisticamente menores de produtos de lipoperoxidação quando comparados ao grupo controle. No entanto, nenhum efeito do pré-tratamento com extrato de folha de *P. alata* nos níveis de carbonis protéicos no fígado, rim, cérebro e coração foi observado. Essa discordância nos efeitos antioxidantes observados em modelos *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo*, poderia ser atribuída ao metabolismo dos polifenóis.

De fato, estudos de intervenção com polifenóis em animais e humanos demonstram que os efeitos antioxidantes *in vivo* dos polifenóis dependem de sua ingestão e de sua biodisponibilidade (Kaplan *et al.*, 2001; Vinson *et al.*, 2004). Segundo Manach *et al.* (2004), a biodisponibilidade dos polifenóis pode ser influenciada pela estrutura dos compostos, absorção intestinal, interação com outros alimentos e metabolismo intestinal e hepático. Desse modo, os metabólitos presentes no plasma geralmente diferem dos compostos nativos. Juntas essas evidências sugerem que os efeitos observados *in vitro* não necessariamente predizem os efeitos *in vivo*.

A partir dos resultados discutidos acima, estudos adicionais investigando os efeitos do extrato de folha de *P. alata* em humanos são necessários. Finalmente, o isolamento de compostos específicos dos extratos de *P. alata* e o entendimento de como eles protegem biomoléculas contra dano oxidativo é um objetivo para estudos futuros.

5. CONCLUSÕES

No presente estudo, a atividade antioxidante dos extratos hidroalcoólico de folha de *Passiflora alata* Dryander e *Passiflora edulis* Sims foi investigada. A análise e discussão dos resultados apresentados neste trabalho permitem as seguintes conclusões:

- Baixas concentrações dos extratos hidroalcoólico de folha de *P. alata* e *P. edulis* apresentam capacidade antioxidante;
- Os polifenóis presentes nos extratos podem ser os compostos responsáveis pela capacidade antioxidante dos extratos;
- Extratos de folhas de *P. alata* e *P. edulis* protegem contra dano protéico induzido por sulfato ferroso e glicose *in vitro*;

Em adição, os resultados obtidos com o pré-tratamento de ratos com 1 e 5 mg/kg de extrato de folhas de *P. alata* em um modelo de dano oxidativo induzido por CCl₄ sugerem as seguintes conclusões:

- Mudanças hepatohistológicas induzidas por CCl₄ foram atenuadas com o pré-tratamento de extrato de folha de *P. alata* de maneira dose-dependente;
- As atividades séricas de AST e ALT foram significativamente menores em ratos pré-tratados com extrato de folhas de *P. alata*;
- Níveis de TBARS hepáticos foram significativamente menores em ratos pré-tratados com extrato de folha de *P. alata* em ambas as doses;

- Ratos pré-tratados com extrato de folha de *P. alata* apresentam atividades enzimáticas de catalase e superóxido dismutase significativamente maiores quando comparadas ao grupo controle;
- Níveis de TBARS cardíacos foram significativamente menores em ratos pré-tratados com extrato de folha de *P. alata* (5 mg/kg);
- É concebível que os efeitos protetores encontrados com o pré-tratamento de ratos seja atribuído a capacidade antioxidante do extrato de folha de *P. alata*.

6. PERSPECTIVAS

Como perspectivas da continuidade deste trabalho, pretende-se:

- Avaliar os efeitos antioxidantes *in vivo* do extrato de folha de *P. edulis* em ratos;
- Explorar efeitos cardioprotetores do extrato de folha de *P. alata* em modelo específico de dano cardíaco;
- Isolar os compostos responsáveis pelos efeitos antioxidantes;
- Determinar os mecanismos responsáveis pelos efeitos antioxidantes;
- Realizar um ensaio clínico em humanos com o extrato de folhas de *P. alata*.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1977. Farmacopéia Brasileira. São Paulo: Andrei. 1213 p.

Ahmad FF, Cowan DL, Sun AY. 1987. Detection of free radical formation in various tissues after acute carbon tetrachloride administration in gerbil. *Life Sci* 41:2469-2475.

Amaral KM, Schenkel EP, Langeloh A. 2001. Avaliação da Toxicidade Reprodutiva dos Extratos Aquosos Liofilizados de *Passiflora alata* Dryander e *Passiflora edulis* Sims em ratas Wistar. *Acta Farm. Bonaerense* 20:215-220.

Arts IC, Hollman PC. 2005. Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. *Am J Clin Nutr* 81:317S-325S.

Banerjee A, Dasgupta N, De B. 2005. In vitro study of antioxidant activity of *Syzygium cumini* fruit. *Food Chem.* 90:727-733.

Bombardelli E, Bonati A, Gabetta B, Martinelli EM, Mustich G, Danieli B. 1975. Passiflorine, A New Glycoside from *Passiflora-Edulis*. *Phytochemistry* 14:2661-2665.

Brattin WJ, Glende EA, Jr., Recknagel RO. 1985. Pathological mechanisms in carbon tetrachloride hepatotoxicity. *J Free Radic Biol Med* 1:27-38.

Chace KV, Carubelli R, Nordquist RE. 1991. The role of nonenzymatic glycosylation, transition metals, and free radicals in the formation of collagen aggregates. *Arch Biochem Biophys* 288:473-480.

Chan MM, Fong D, Ho CT, Huang HI. 1997. Inhibition of inducible nitric oxide synthase gene expression and enzyme activity by epigallocatechin gallate, a natural product from green tea. *Biochem Pharmacol* 54:1281-1286.

Chidambara Murthy KN, Jayaprakasha GK, Singh RP. 2002a. Studies on antioxidant activity of pomegranate (*Punica granatum*) peel extract using in vivo models. *J Agric Food Chem* 50:4791-4795.

Chidambara Murthy KN, Singh RP, Jayaprakasha GK. 2002b. Antioxidant activities of grape (*Vitis vinifera*) pomace extracts. *J Agric Food Chem* 50:5909-5914.

Cos P, Ying L, Calomme M, Hu JP, Cimanga K, Van PB, Pieters L, Vlietinck AJ, Vanden BD. 1998. Structure-activity relationship and classification of flavonoids as inhibitors of xanthine oxidase and superoxide scavengers. *J Nat Prod* 61:71-76.

de Souza, K. C. B. Desenvolvimento de metodologias analíticas e tecnológicas na obtenção de extratos secos nebulizados de *Passiflora edulis* forma *flavicarpa*. - 149. 1997. Porto Alegre, Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Dissertação

Dhawan K, Dhawan S, Sharma A. 2004. *Passiflora*: a review update. *J Ethnopharmacol* 94:1-23.

Dreher D, Junod AF. 1996. Role of oxygen free radicals in cancer development. *Eur J Cancer* 32A:30-38.

Fadhel ZA, Amran S. 2002. Effects of black tea extract on carbon tetrachloride-induced lipid peroxidation in liver, kidneys, and testes of rats. *Phytother Res* 16 Suppl 1:S28-S32.

Ferrieres J. 2004. The French paradox: lessons for other countries. *Heart* 90:107-111.

Frei B, Higdon JV. 2003. Antioxidant Activity of Tea Polyphenols In Vivo: Evidence from Animal Studies. *J Nutr* 133:3275S-33284.

Haenen GR, Paquay JB, Korthouwer RE, Bast A. 1997. Peroxynitrite scavenging by flavonoids. *Biochem Biophys Res Commun* 236:591-593.

Halliwell B. 2001. Role of free radicals in the neurodegenerative diseases: therapeutic implications for antioxidant treatment. *Drugs Aging* 18:685-716.

Halliwell B, Gutteridge JMC. 1999. *Free radicals in Biology and Medicine*. New York: Oxford University Press.

Harper A, Kerr DJ, Gescher A, Chipman JK. 1999. Antioxidant effects of isoflavonoids and lignans, and protection against DNA oxidation. *Free Radic Res* 31:149-160.

Hertog MG, Kromhout D, Aravanis C, Blackburn H, Buzina R, Fidanza F, Giampaoli S, Jansen A, Menotti A, Nedeljkovic S, . 1995. Flavonoid intake and long-term risk of coronary heart disease and cancer in the seven countries study. *Arch Intern Med* 155:381-386.

Hertog MGL, Sweetman PM, Fehily AM, Elwood PC, Kromhout D. 1997. Antioxidant flavonols and ischemic heart disease in a Welsh population of men: The Caerphilly Study. *Am J Clin Nutr* 65:1489-1494.

Hidaka M, Fujita K, Ogikubo T, Yamasaki K, Iwakiri T, Okumura M, Kodama H, Arimori K. 2004. Potent inhibition by star fruit of human cytochrome P450 3A (CYP3A) activity. *Drug Metab Dispos* 32:581-583.

Jakus V, Rietbrock N. 2004. Advanced glycation end-products and the progress of diabetic vascular complications. *Physiol Res* 53:131-142.

Jamir TT, Sharma HK, Dolui AK. 1999. Folklore medicinal plants of Nagaland, India. *Fitoterapia* 70:395-401.

Kaplan M, Hayek T, Raz A, Coleman R, Dornfeld L, Vaya J, Aviram M. 2001. Pomegranate juice supplementation to atherosclerotic mice reduces macrophage lipid peroxidation, cellular cholesterol accumulation and development of atherosclerosis. *J Nutr* 131:2082-2089.

Killip EP. 1938. *The American species of Passifloraceae*. Chicago: Field Museum of Natural History. 613 p.

Knekt P, Isotupa S, Rissanen H, Heliovaara M, Jarvinen R, Hakkinen S, Aromaa A, Reunanen A. 2000. Quercetin intake and the incidence of cerebrovascular disease. *Eur. J. Clin. Nutr.* 54:415-417.

Knekt P, Jarvinen R, Reunanen A, Maatela J. 1996. Flavonoid intake and coronary mortality in Finland: a cohort study. *BMJ* 312:478-481.

Knekt P, Kumpulainen J, Jarvinen R, Rissanen H, Heliövaara M, Reunanen A, Hakulinen T, Aromaa A. 2002. Flavonoid intake and risk of chronic diseases. *Am J Clin Nutr* 76:560-568.

Kroon PA, Clifford MN, Crozier A, Day AJ, Donovan JL, Manach C, Williamson G. 2004. How should we assess the effects of exposure to dietary polyphenols in vitro? *Am J Clin Nutr* 80:15-21.

Lee MJ, Wang ZY, Li H, Chen L, Sun Y, Gobbo S, Balentine DA, Yang CS. 1995. Analysis of plasma and urinary tea polyphenols in human subjects. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 4:393-399.

Lutomski J, Malek B. 1975. Pharmacological investigations on the raw material of the genus *Passiflora*. IV: the comparison of contents of alkaloids in some harman raw materials. *Planta Med* 27:381-384.

Maillard L, Gautier MA. 1912. Action des acides amines sur les sucres: formation des melanoidines par voie methodique. *C R Seances Acad Sci III* 154:66-68.

Maluf E, Barros HMT, Frochtengarten ML, Benti R, Leite JR. 1991. Assessment of the Hypnotic Sedative Effects and Toxicity of *Passiflora-Edulis* Aqueous Extract in Rodents and Humans. *Phytother Res* 5:262-266.

Manach C, Scalbert A, Morand C, Remesy C, Jimenez L. 2004. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr* 79:727-747.

Mareck U, Herrmann K, Galensa R, Wray V. 1991. The 6-C-Chinovoside and 6-C-Fucoside of Luteolin from *Passiflora-Edulis*. *Phytochemistry* 30:3486-3487.

Matos FJA, Viana GB, Bandeira MA. 2001. Guia Fitoterápico. Fortaleza: Secretaria de Saúde do Estado do Ceará. 151 p.

Muller SD, Vasconcelos SB, Coelho M, Biavatti MW. 2005. LC and UV determination of flavonoids from *Passiflora alata* medicinal extracts and leaves. *J Pharm Biomed Anal* 37:399-403.

Murcia MA, Jimenez AM, Martinez-Tome M. 2001. Evaluation of the antioxidant properties of Mediterranean and tropical fruits compared with common food additives. *J Food Protect* 64:2037-2046.

Nakagawa T, Yokozawa T. 2002. Direct scavenging of nitric oxide and superoxide by green tea. *Food Chem Toxicol* 40:1745-1750.

Nakagawa T, Yokozawa T, Terasawa K, Shu S, Juneja LR. 2002. Protective activity of green tea against free radical- and glucose-mediated protein damage. *J Agric Food Chem* 50:2418-2422.

Nanjo F, Honda M, Okushio K, Matsumoto N, Ishigaki F, Ishigami T, Hara Y. 1993. Effects of dietary tea catechins on alpha-tocopherol levels, lipid peroxidation, and erythrocyte deformability in rats fed on high palm oil and perilla oil diets. *Biol Pharm Bull* 16:1156-1159.

Nijveldt RJ, van NE, van Hoorn DE, Boelens PG, van NK, van Leeuwen PA. 2001. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *Am J Clin Nutr* 74:418-425.

Oga S, de Freitas PC, Gomes da Silva AC, Hanada S. 1984. Pharmacological trials of crude extract of *Passiflora alata*. *Planta Med* 50:303-306.

Ortega GG, Schenkel EP, Athayde ML, Mentz LA. 1989. Brasilianische Phytotherapeutika. *Deutsche Apotheker Zeitung* 129:1847-1848.

Ozenirler S, Dincer S, Akyol G, Ozogul C, Oz E. 1997. The protective effect of *Ginkgo biloba* extract on CCl₄-induced hepatic damage. *Acta Physiol Hung* 85:277-285.

Paquay JB, Haenen GR, Stender G, Wiseman SA, Tijburg LB, Bast A. 2000. Protection against nitric oxide toxicity by tea. *J Agric Food Chem* 48:5768-5772.

Paris F, Petry RD, Reginatto F, Gosmann G, Quevedo J, Salgueiro JB, Kapczinski F, Ortega GG, Schenkel EP. 2002. Pharmacochemical Study of Aqueous Extracts of *Passiflora alata* Dryander and *Passiflora edulis* Sims. *Acta Farm Bonaerense* 21:5-8.

Pereira CA, Vilegas JHY. 2000. Constituintes químicos e farmacologia do gênero *Passiflora* com ênfase a *P.alata*, *P.edulis* e *P.incarnata*: revisão da literatura. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais* 3:1-12.

Pereira CA, Yariwake JH, Lancas FM, Wauters JN, Tits M, Angenot L. 2004. A HPTLC densitometric determination of flavonoids from *Passiflora alata*, *P. edulis*, *P. incarnata* and *P. caerulea* and comparison with HPLC method. *Phytochem Anal* 15:241-248.

Peters U, Poole C, Arab L. 2001. Does tea affect cardiovascular disease? A meta-analysis. *Am J Epidemiol* 154:495-503.

Petry RD, Reginatto F, de-Paris F, Gosmann G, Salgueiro JB, Quevedo J, Kapczinski F, Ortega GG, Schenkel EP. 2001. Comparative pharmacological study of hydroethanol extracts of *Passiflora alata* and *Passiflora edulis* leaves. *Phytother Res* 15:162-164.

Poethke VW, Schwarz C, Gerlach H. 1970. Substances of *Passiflora incarnata* L. *Planta Med* 18:303-314.

Polydoro M, de Souza KC, Andrades ME, Da Silva EG, Bonatto F, Heydrich J, Dal-Pizzol F, Schapoval EE, Bassani VL, Moreira JC. 2004. Antioxidant, a pro-oxidant and cytotoxic effects of *Achyrocline satureioides* extracts. *Life Sci* 74:2815-2826.

Puricelli L, Dell'Aica I, Sartor L, Garbisa S, Caniato R. 2003. Preliminary evaluation of inhibition of matrix-metalloprotease MMP-2 and MMP-9 by *Passiflora edulis* and *P foetida* aqueous extracts. *Fitoterapia* 74:302-304.

Qureshi S, Rai MK, Agrawal SC. 1997. In vitro evaluation of inhibitory nature of extracts of 18-plant species of Chhindwara against 3-keratinophilic fungi. *Hindustan Antibiot Bull* 39:56-60.

Recknagel RO, Glende EA, Jr., Dolak JA, Waller RL. 1989. Mechanisms of carbon tetrachloride toxicity. *Pharmacol Ther* 43:139-154.

Reginatto FH, Kauffman C, Schripsema J, Guillaume D, Gosmann G, Schenkel EP. 2001. Steroidal and triterpenoidal glucosides from *Passiflora alata*. *J Braz Chem Soc* 12:32-36.

Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G. 1996. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic Biol Med* 20:933-956.

Scott BC, Butler J, Halliwell B, Aruoma OI. 1993. Evaluation of the antioxidant actions of ferulic acid and catechins. *Free Radic Res Commun* 19:241-253.

Shahidi F, Naczki M. 1995. Food phenolics, sources, chemistry, effects, applications. Lancaster: Technomic Publishing Co Inc.

Simões CMO, Schenkel EP, Gosmann G, de Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR. 2003. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. Porto Alegre: Ed da UFRGS. 1102 p.

Sodergren E, Cederberg J, Vessby B, Basu S. 2001. Vitamin E reduces lipid peroxidation in experimental hepatotoxicity in rats. *Eur J Nutr* 40:10-16.

Stadtman ER. 2001. Protein oxidation in aging and age-related diseases. *Ann N Y Acad Sci* 928:22-38.

Steinberg D, Parthasarathy S, Carew TE, Khoo JC, Witztum JL. 1989. Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N Engl J Med* 320:915-924.

Surh YJ, Chun KS, Cha HH, Han SS, Keum YS, Park KK, Lee SS. 2001. Molecular mechanisms underlying chemopreventive activities of anti-inflammatory

phytochemicals: down-regulation of COX-2 and iNOS through suppression of NF-kappa B activation. *Mutat Res* 480-481:243-68.:243-268.

Szymonik-Lesiuk S, Czechowska G, Stryjecka-Zimmer M, Slomka M, Madro A, Celinski K, Wielosz M. 2003. Catalase, superoxide dismutase, and glutathione peroxidase activities in various rat tissues after carbon tetrachloride intoxication. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 10:309-315.

Taylor L. 1996. *Maracuja, Herbal Secrets of the Rainforest*. Austin: Prime Publishing Inc.

Ulrich P, Cerami A. 2001. Protein glycation, diabetes, and aging. *Recent Prog Horm Res* 56:1-21.

Ulubelen A, Oksuz S, Mabry TJ. 1982. C-glycosylflavonoids from *Passiflora pittieri*, *P. alata*, *P. ambigua* and *Adenia mannii*. *J Nat Prod* 45:783.

Vale NB, Leite JR. 1983. Efeitos psicofarmacológicos de preparações de *Passiflora edulis* (maracujá). *Ciência e Cultura* 35:11-24.

Vanderplank J. 1996. *Passion flowers*. Cambridge: MIT Press. 224 p.

Vasan S, Zhang X, Zhang X, Kapurniotu A, Bernhagen J, Teichberg S, Basgen J, Wagle D, Shih D, Terlecky I, Bucala R, Cerami A, Egan J, Ulrich P. 1996. An agent cleaving glucose-derived protein crosslinks in vitro and in vivo. *Nature* 382:275-278.

Vinson JA, Teufel K, Wu N. 2004. Green and black teas inhibit atherosclerosis by lipid, antioxidant, and fibrinolytic mechanisms. *J Agr Food Chem* 52:3661-3665.

Watt JM, Breyer-Brandwijk MG. 1962. The medicinal and poisonous plants of Southern and Eastern Africa. Edinburgh: E. & S. Livinstone Ltd.

Williams AT, Burk RF. 1990. Carbon tetrachloride hepatotoxicity: an example of free radical-mediated injury. *Semin Liver Dis* 10:279-284.

Yang CS, Maliakal P, Meng X. 2002. Inhibition of carcinogenesis by tea. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 42:25-54.:25-54.

Yoshikawa K, Katsuta S, Mizumori J, Arihara S. 2000a. Four cycloartane triterpenoids and six related saponins from *Passiflora edulis*. *J Nat Prod* 63:1229-1234.

Yoshikawa K, Katsuta S, Mizumori J, Arihara S. 2000b. New cycloartane triterpenoids from *Passiflora edulis*. *J Nat Prod* 63:1377-1380.

Zainol MK, bd-Hamid A, Yusof S, Muse R. 2003. Antioxidative activity and total phenolic compounds of leaf, root and petiole of four accessions of *Centella asiatica* (L.) Urban. *Food Chem* 81:575-581.

8. ANEXOS

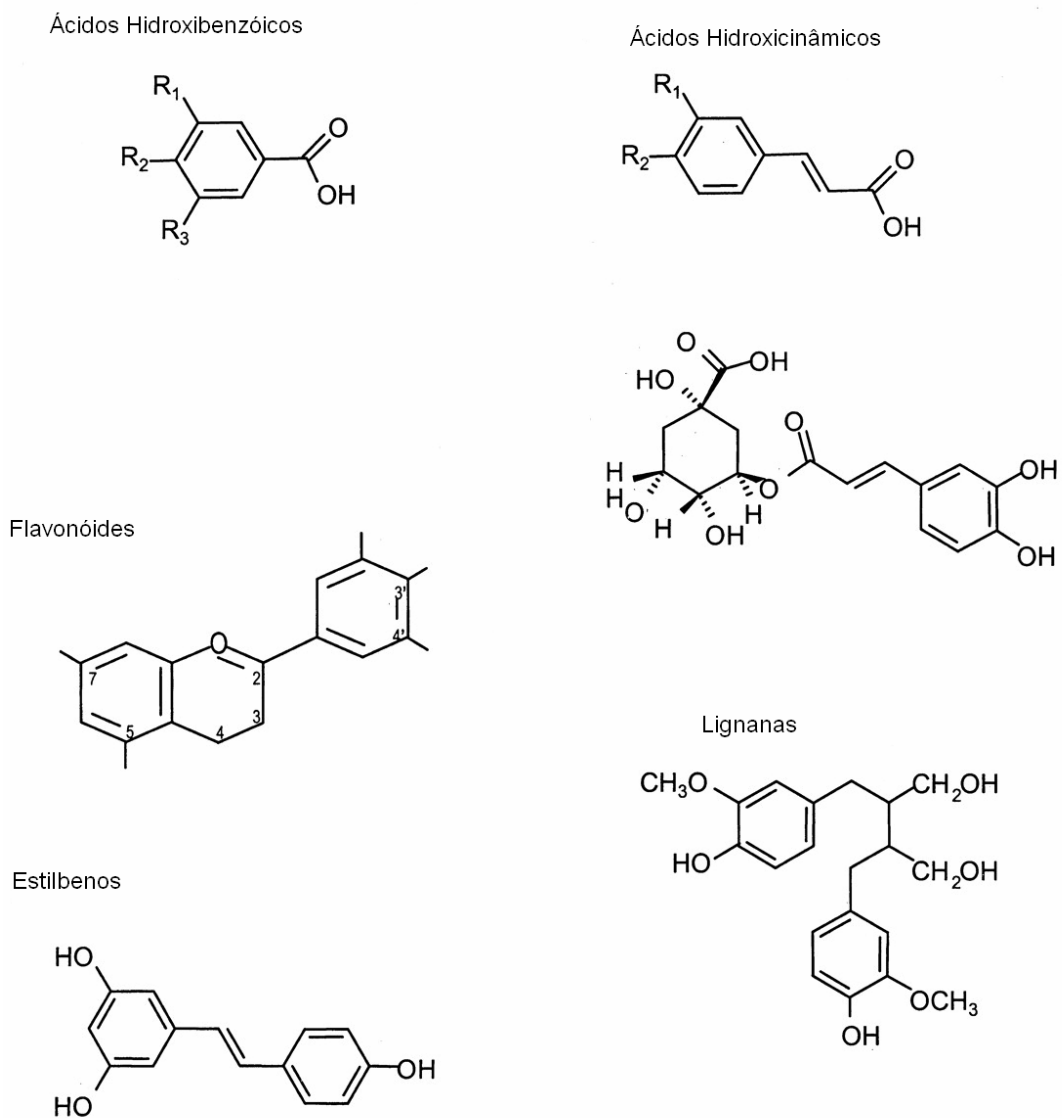


Fig 1. Estruturas químicas das classes de Polifenóis

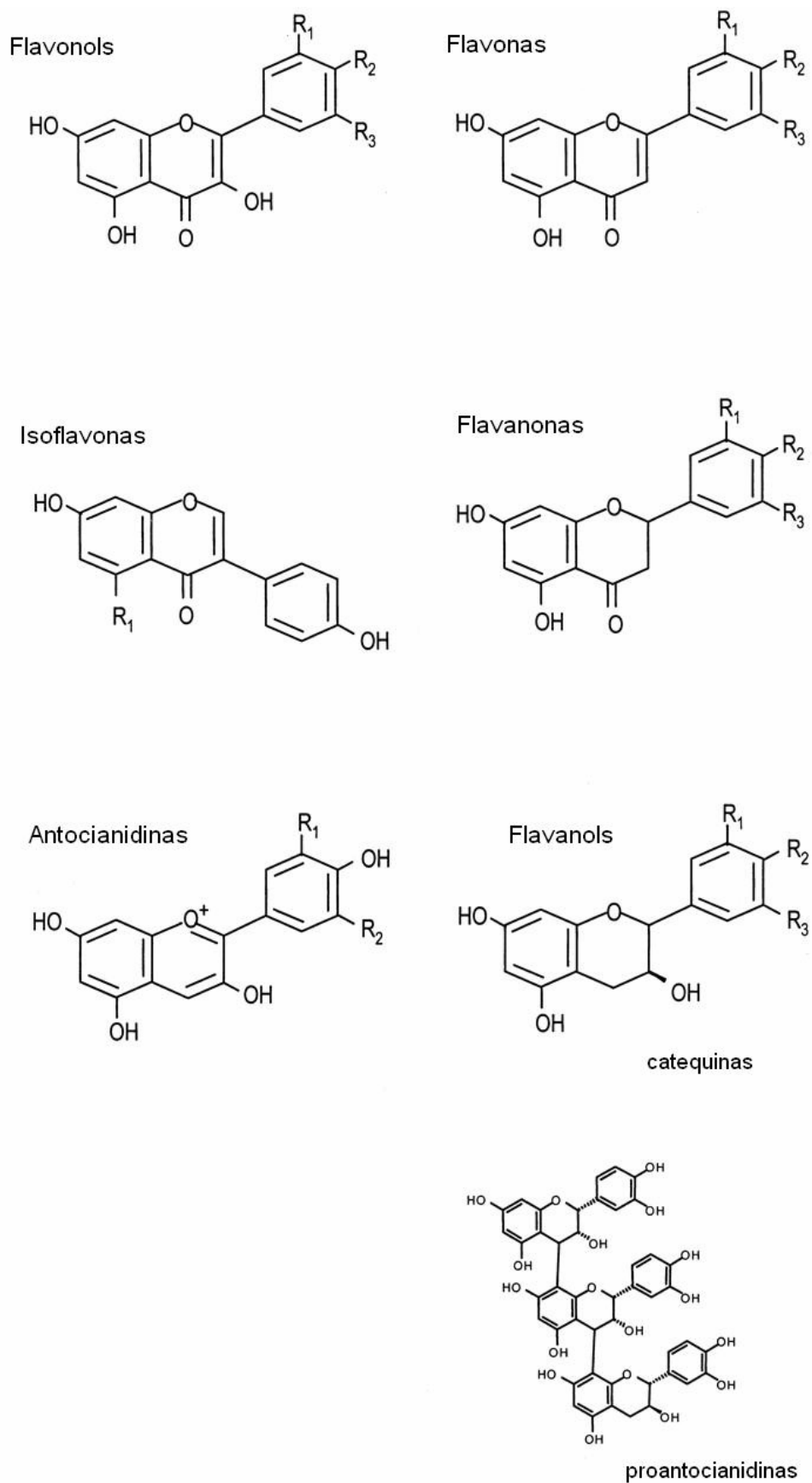


Fig. 2 Estruturas químicas de flavonóides