

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO HUMANA

ISABELLA DE ARAÚJO ESTEVES DUARTE

EFEITO AGUDO DO CONSUMO DE SUCO DE *PASSIFLORA SETACEA* NA CAPACIDADE  
FAGOCITÁRIA E NA PRODUÇÃO DE CORPÚSCULOS LIPÍDICOS E RADICAIS  
LIVRES POR MONÓCITOS DE VOLUNTÁRIOS COM SOBREPESO

Brasília  
2015

**ISABELLA DE ARAÚJO ESTEVES DUARTE**

**INFLUÊNCIA DO CONSUMO AGUDO DO SUCO DE *PASSIFLORA SETACEA* SOBRE A  
CAPACIDADE FAGOCITÁRIA, PRODUÇÃO DE RADICAIS LIVRES E EXPRESSÃO  
DE CORPÚSCULOS LIPÍDICOS POR MONÓCITOS DE INDIVÍDUOS COM  
SOBREPESO**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Nutrição Humana, da Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Nutrição Humana.

Orientadora: Prof. Dra. Lívya de Lacerda de Oliveira Pineli

Co-orientadora: Dra. Ana Maria Costa

Brasília

2015

**ISABELLA DE ARAÚJO ESTEVES DUARTE**

**INFLUÊNCIA DO CONSUMO AGUDO DO SUCO DE *PASSIFLORA SETACEA* SOBRE A  
CAPACIDADE FAGOCITÁRIA, PRODUÇÃO DE RADICAIS LIVRES E EXPRESSÃO  
DE CORPÚSCULOS LIPÍDICOS POR MONÓCITOS DE INDIVÍDUOS COM  
SOBREPESO**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Nutrição Humana, da Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Nutrição Humana.

Aprovada em:

MEMBROS DA BANCA:

---

Professora Doutora Lívia de Lacerda de Oliveira Pineli  
(Presidente da Banca – Universidade de Brasília)

---

Professora Doutora Nathalia Marcolini Pelucio Pizato  
(Membro Interno – Universidade de Brasília)

---

Professora Doutora Marina Kiyomi Ito  
(Membro Interno – Universidade de Brasília)

---

Professora Doutora Selma Aparecida Souza Kückelhaus  
(Membro Externo – Universidade de Brasília)

Brasília

2015

Duarte, Isabella de Araújo Esteves.

Influência do consumo agudo do suco de *Passiflora setacea* sobre a capacidade fagocitária, produção de radicais livres e expressão de corpúsculos lipídicos por monócitos de indivíduos com sobrepeso/ Isabella de Araújo Esteves Duarte

Dissertação de mestrado/ Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília.

Brasília, 2015.

Área de Concentração: Nutrição Humana

Orientador: Prof. Dra. Lívia de Lacerda de Oliveira Pineli

1. *Passiflora setacea* 2. resposta imune 3. compostos fenólicos 4. consumo agudo 5. monócitos  
6. radicais livres 7. capacidade fagocitária 8. corpúsculos lipídicos

**Para minha mãe e meu pai, meus eternos parceiros na vida.**

## AGRADECIMENTOS

Um ensinamento que aprendi nesses dois anos e meio de pós-graduação foi:  
Não se faz pesquisa sozinho.

“ Se quiser ir rápido, vá sozinho. Mas se quiser ir longe, vá acompanhado.”  
provérbio africano

À minha mãe, minha eterna parceira de todos os dias e todas as horas. É aquela que celebra e sofre comigo. Aquela que me motiva para alcançar meus sonhos e me ensina a pisar firme. Me mostra que, pra ir longe, é necessário um passo de cada vez.

Ao meu pai, meu eterno fã, aquele que sonha comigo, mas que principalmente acredita em mim, na Nutrição e num mundo melhor.

Ao meu irmão Pedro que me mostra que o intelecto e o senso de humor são o segredo da eterna juventude.

Ao meu irmão Fernando que me mostra que o esforço e o engajamento nos estudos são a peça-chave para a realização profissional.

À Dra. Ana Maria Costa, minha co-orientadora e tutora na pesquisa e na vida, por ter me aberto a oportunidade de pesquisar, aprender, quebrar a cabeça, viajar, ser sempre grata às parcerias de estabelecemos no caminho e saber aproveitar cada etapa conquistada. Obrigada por ter apostado e acreditado em mim!

À Prof. Lívia Pineli, minha orientadora, que aceitou me orientar neste projeto. Juntas enfrentamos o desafio da submissão do pré-projeto em tempo recorde junto ao Programa da Pós-graduação em Nutrição Humana, a saga da autorização da pesquisa pelo Comitê de Ética em Pesquisa. Esteve sempre disponível para sanar as minhas dúvidas e os meus anseios sobre o mestrado, obrigada!

À Prof. Imaculada Muniz Junqueira, que abriu as portas do Laboratório de Imunologia Celular para os meus experimentos. Um grande exemplo de eficiência, conhecimento, atenção e principalmente, de amor ao ensino e à pesquisa. Espero que esta etapa realizada seja a primeira de várias!

À Prof. Tatiana Borges, por ter se tornado minha orientadora de experimento e grande amiga e conselheira em tão pouco tempo de convivência. Te agradeço por ter guiado os experimentos e análises de resultados, muitas vezes até de madrugada no laboratório e nos fins de semana ensolarados. Você pra mim é um grande exemplo de mulher, mãe, esposa, professora e pesquisadora.

À Luciana Leite, ao Danilo Corazza e ao Lucas Friaça, que não só me ajudaram em todos os experimentos cansativos até de madrugada, como me fizeram rir e amar cada vez mais a pesquisa e o trabalho em equipe.

A Andréia Cascaes, Kaio Gorgonha, Bruna Ramos, Isadora Selestino, Valesca Trapp, Wallace Cavalcante, Lícia Orlandin, Izabel Lucena, Mariana Veras, Maria do Desterro Pereira e André

Cunha, por terem me ajudado nos experimentos, no trabalho artesanal de colagem de lamínulas, nas leituras de lâminas e na coleta de amostras dos voluntários.

À Rede PASSITEC e à Embrapa Cerrados pelos campos experimentais e Laboratório de Tecnologia de Alimentos e à técnica Daniela Faria que me ajudou nas análises físico-químicas e nas logísticas de coleta e processamento das polpas de *Passiflora setacea*.

Ao Cerrado, que apesar de tanto desmatamento que sofre, é resistente, se regenera, floresce e nos dá esse buquê de flores e frutos ricos em compostos fenólicos, sabor e cultura.

Às Prof. Marie Togashi e Marina Ito pelo suporte na longa saga de submissão e aprovação do projeto ao Comitê de Ética em Pesquisa.

Às Prof. Marina Ito, Nathalia Pizato e Selma Kückelhaus, por terem sido compreensivas e terem aceitado avaliar este trabalho.

Aos doutores Christine Morand e Dragan Milenkovic que, juntamente com a equipe MicroCard, me abriram as portas do centro de pesquisa Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) e me ensinaram muito sobre pesquisa e culinária francesa.

Ao Dr. Artur Rosa, pela paciência e ensinamentos sobre experimentos em bancada de laboratório.

Às Prof. Raquel Botelho e Rita Akutsu por terem me iniciado no cenário da pesquisa ainda na graduação e por terem me incentivado a aceitar o desafio de uma linha de pesquisa totalmente diferente da minha formação.

Ao Arthur Massé, devo a ele todo o suporte emocional que as oscilações da vida nos põe à prova.

Ao Luca Ribeiro, designer top de linha, obrigada pela montagem do infográfico do metabolismo dos polifenóis e por ser meu grande amigo-irmão-companheiro da vida.

Ao meu mestre de capoeira, Dr. Luiz Renato Vieira, pelo exemplo de vida, suporte emocional e pragmatismo que muito me ensina a cada dia. Obrigada pelo despertar para a capoeira que me ensina a cair e a levantar e a vencer os obstáculos sempre com “ um sorriso no rosto, a ginga no corpo e o samba no pé. ”

Ao Thiago Santiago e ao Guilherme Baroni pelas conversas motivadoras nos meus momentos questionadores e desanimadores inerentes ao processo.

Aos meus primos, padrinhos, avós e amigos, minha eterna torcida.

Ao CNPq, à Capes, à Embrapa Cerrados e ao Laboratório de Imunologia Celular pelo suporte financeiro.

**“ There's nothing you can make that can't be made  
No one you can save that can't be saved  
Nothing you can do but you can learn how to be you in time  
It's easy**

**All you need is love  
All you need is love  
All you need is love, love  
Love is all you need ”**

--

*“ Não há nada que você possa fazer que não possa ser feito  
Ninguém que você possa salvar que não possa ser salvo  
Nada que você possa fazer, mas você pode aprender como ser você a tempo  
É fácil*

*Tudo o que você precisa é de amor  
Tudo o que você precisa é de amor  
Tudo o que você precisa é de amor, amor  
Amor é tudo do que você precisa ”*

***John LENNON***

## RESUMO

*Passiflora setacea* (PS) é uma espécie silvestre de maracujá do Cerrado, que recentemente tem sido descoberta ser rica em compostos fenólicos (CF), compostos bioativos encontrados em frutas e hortaliças. Estudos recentes têm mostrado que a polpa de PS também apresenta efeitos antiestresse e na melhora do sono noturno. Existem algumas associações entre uma dieta rica em CF e modulação do estresse oxidativo na prevenção de doenças crônicas não-transmissíveis (DCNT). Apesar de estas associações ainda estarem em estudo, pode-se sugerir que esses efeitos estejam relacionados à modulação pelos CF da superprodução de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, da expressão de corpúsculos lipídicos e da capacidade fagocitária de macrófagos e monócitos ativados. Portanto, o objetivo do presente estudo foi investigar os efeitos imunomodulatórios do consumo de suco de PS por voluntários com sobrepeso. Homens (n=10), de meia-idade foram incluídos em um estudo controlado, randomizado, transversal, duplo-cego para comparar o efeito do consumo de 300mL de suco PS e da bebida placebo (PB) com um período de washout de 4 semanas. Amostras de sangue foram coletadas antes (t0h), em jejum - e 3 h após o consumo (t3h) e as células mononucleares humanas (PBMC) foram isoladas para avaliar a produção de óxido nítrico (NO) e de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), a capacidade fagocitária e expressão de corpúsculos lipídicos (CL) de monócitos. O consumo do suco de PS gerou aumento da capacidade fagocitária, ao aumentar o número de monócitos envolvidos no mecanismo de fagocitose (MO%) por opsoninas (p=0,04). A variação intrapessoal (% delta) causada pelo consumo do suco de PS demonstrou aumento do MO% por opsoninas (p=0,046) e por PAMP (receptores padrões moleculares de patógenos) (p=0,020) quando comparado com a bebida PB, assim como o índice fagocitário (IF) por opsoninas (p=0,04) e por PAMP (p=0,01). O suco de PS não afetou a produção de NO e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, porém, o delta (%) sugeriu uma possível diminuição da produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> após o consumo do suco de PS, em comparação com o PB (p=0,09), que seria possível verificar com o aumento da amostra (n). A expressão de CL também não foi alterada pelo suco de PS. Tem sido verificado o aumento de fagocitose de patógenos e células tumorais na presença de CF, o que pode sugerir que o consumo agudo do suco de PS pode gerar uma maior eficácia do sistema imune inato e adquirido frente a um patógeno. A tendência na diminuição da produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pode corroborar a hipótese de um sistema imune eficaz e com redução de dano celular, dano normalmente causado pela superprodução desse radical livre. Porém, é necessário avaliar outras variáveis de análise para confirmar essa eficácia, como aumentar o n da amostra e avaliar um ponto de análise a mais (t6h).

Palavras-chave: *Passiflora setacea*, resposta imune, compostos fenólicos, consumo agudo, monócitos, radicais livres, capacidade fagocitária, corpúsculos lipídicos.

## ABSTRACT

*Passiflora setacea* (PS) is a wild species of the Cerrado passion fruit, which has recently been found to be rich in phenolic compounds (PC), bioactive compounds found in fruits and vegetables. Recent studies have shown that the pulp of PS has anti-stress effects and also improves nocturnal sleep. There are some associations between a diet rich in PC and modulation of oxidative stress in the prevention of chronic diseases (CDs). Although these associations are still under study, it may be suggested that these effects are related to modulation by PC of the overproduction of reactive oxygen and nitrogen species, of lipid droplets (LD), as well as the expression and phagocytic capacity of activated macrophages and monocytes. Therefore, the aim of this study was to investigate the immunomodulatory effects of PS juice consumption by overweight volunteers. Middle-aged men (n=10) were enrolled in a controlled, randomized, cross, double-blind study to compare the effect of 300mL of PS juice consumption and placebo drink (PB) with a 4-week-washout-period. Blood samples were collected before (t0h) fasting, and 3 hours after (t3h) the consumption and human mononuclear cells (PBMC) were isolated to assess the production of nitric oxide (NO) and hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), the phagocytic capacity and expression of lipid bodies (CL) of monocytes. The PS juice consumption increased phagocytic capacity, by increasing the number of monocytes involved in phagocytosis mechanism (MO%) by opsonins (p=0.04). The personal variation (% delta) caused by the PS juice consumption, demonstrated an increase of MO% by opsonins (p=0.046) and PAMP (molecular pattern receptors of pathogens) (p=0.020) when compared to PB drink, as well as the index phagocyte (IP) by opsonins (p=0.04) and PAMP (p=0.01). The PS juice did not affect the production of NO and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, however, the delta (%) suggested a possible decrease of the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production after PS juice consumption compared with PB (p = 0.09), which would be possible to verify through the increase of the sample (n). LD expression was also not altered by the PS juice. It has been found an increase of phagocytosis of pathogens and tumor cells in the presence of PC, which may suggest that acute use of PS juice can generate a greater effectiveness of the innate and acquired immune system against a pathogen. The trend in decreased production of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> can corroborate the assumption of an efficient immune system with cellular damage reduction, which is usually caused by overproduction of this free radical. However, it is necessary to evaluate other variables of analysis to confirm its effectiveness, as to increase the sample (n) and to add another time period of observation (t6h).

Keywords: *Passiflora setacea*, immune response, phenolic compounds, acute consumption, monocytes, free radicals, phagocytic capacity, lipid droplets

## LISTA DE FIGURAS

### Capítulo 1

Figura 1. Estrutura química básica dos polifenóis .....	24
Figura 2. Fórmula estrutural do ácido 5-CQA e dos ácidos que compõem a classe dos ácidos clorogênicos. .....	25
Figura 3. Estrutura química básica dos flavonoides .....	26
Figura 4. Esquema geral do metabolismo de polifenóis. ....	30
Figura 5. Síntese do NO catalizada pela NOS.....	36
Figura 6. Fluxograma dos experimentos .....	43
Figura 7. Esquema da randomização dos grupos Placebo (PB) vs <i>Passiflora setacea</i> (PS). ....	45
Figura 8. Preparação do suco de <i>Passiflora setacea</i> . ....	46
Figura 9. Sangue com Percoll após centrifugação para separação de células mononucleares (PBMC). ...	47
Figura 10. Placa de 96 escavações para determinação da produção de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> estado basal ou estimulado por PMA em espectrofotômetro. ....	50
Figura 11. Placa de 24 escavações com células aderidas após lavagem com álcool isopropílico e água destilada para posterior análise em microscópio. ....	51
Figura 15. Variação intrapessoal (delta %) do efeito do consumo de suco de <i>Passiflora setacea</i> na produção de peróxido de hidrogênio por monócitos de voluntários com sobrepeso (n=10). Os resultados, analisados pelo teste t não-pareado (teste de Mann-Whitney), mostraram que não houve diferença estatística entre as condições basal (p=0,09) e PMA (p=0,30). Estão representadas medianas e desvios padrão. ....	66
Figura 17. Variação intrapessoal (delta %) do efeito do consumo de suco de <i>Passiflora setacea</i> na expressão de corpúsculos lipídicos em monócitos de voluntários com sobrepeso (n=10). Os resultados, analisados pelo teste t não-pareado (teste de Mann-Whitney), mostraram que não houve diferença estatística entre as condições basal e estimuladas por LPS em nenhum parâmetro analisado (MO%, MCL e IC). Estão representadas medianas e desvios padrão. ....	75
Figura 18. Foto de monócito ativado com 1 (um) corpúsculo lipídico corado de vermelho indicado no citoplasma. ....	76
Figura 19. Foto de monócito ativado fagocitando uma levedura (a), fagocitando duas leveduras (b) e monócito ativo não envolvido na fagocitose (c) e monócito inativo (d).....	78
Figura 21. Variação intrapessoal (delta %) do efeito do consumo de suco de <i>Passiflora setacea</i> na capacidade fagocitária de monócitos de voluntários com sobrepeso (n=10). Os resultados, analisados pelo teste t não-pareado (teste de Mann-Whitney), mostraram que o suco de PS promoveu aumento no percentual de monócitos envolvidos na fagocitose (MO%) por PAMP e por opsoninas (A1) e aumento do índice fagocitário (IF) pelos dois mecanismos (A3). Não foi detectada diferença estatística na média de leveduras fagocitadas (Lev) (A2). Estão representadas medianas e desvios padrão. ....	86

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Informações nutricionais da bebida placebo (100mL) e da polpa de <i>P. setacea</i> (150g).....	56
Tabela 2. Informações adicionais da caracterização físico-química da polpa de <i>Passiflora setacea</i> .....	57
Tabela 3. Medidas antropométricas da avaliação nutricional e nível de atividade física dos voluntários da pesquisa.....	58
Tabela 4. Quantificação do nitrito (NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> ) no sobrenadante das culturas com estímulo basal dos monócitos circulantes dos voluntários após consumo de bebida placebo (PB) e suco <i>Passiflora setacea</i> (PS). .	59
Tabela 5. Quantificação do nitrito (NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> ) no sobrenadante das culturas com estímulo por LPS dos monócitos circulantes dos voluntários após consumo de bebida placebo (PB) e suco <i>Passiflora setacea</i> (PS). .....	59
Tabela 6. Quantificação do peróxido de hidrogênio (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) no sobrenadante das culturas com estímulo basal dos monócitos circulantes dos voluntários após consumo de bebida placebo (PB) e suco de <i>Passiflora setacea</i> (PS). .....	63
Tabela 7. Quantificação do peróxido de hidrogênio (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) no sobrenadante das culturas com estímulo por PMA dos monócitos circulantes dos voluntários após consumo de bebida placebo (PB) e suco de <i>Passiflora setacea</i> (PS). .....	64
Tabela 8. Quantificação da média de monócitos circulantes dos voluntários após consumo de bebida placebo (PB) e suco <i>Passiflora setacea</i> (PS) com CL no citoplasma (MO%) na condição basal. ....	68
Tabela 9. Quantificação da média de monócitos circulantes dos voluntários após consumo de bebida placebo (PB) e suco <i>Passiflora setacea</i> (PS) com CL no citoplasma (MO%) na condição estimulada por LPS. ....	68
Tabela 10. Quantificação da média de CL encontrados no citoplasma de monócitos circulantes dos voluntários após consumo de bebida placebo (PB) e suco <i>Passiflora setacea</i> (PS) com CL no citoplasma (CL) na condição basal. ....	69
Tabela 11. Quantificação da média de CL encontrados no citoplasma de monócitos circulantes dos voluntários após consumo de bebida placebo (PB) e suco <i>Passiflora setacea</i> (PS) com CL no citoplasma (CL) com estímulo de LPS .....	70
Tabela 12. Índice Corpúscular da média de CL encontrados no citoplasma de monócitos circulantes (CL%) dos voluntários após consumo de bebida placebo (PB) e suco <i>Passiflora setacea</i> (PS) com média de macrógrafos envolvidos no processo na condição basal. ....	71
Tabela 13. Índice fagocitário da média de CL encontrados no citoplasma de monócitos circulantes (CL%) dos voluntários após consumo de bebida placebo (PB) e suco <i>Passiflora setacea</i> (PS) com média de macrógrafos envolvidos no processo estimulados por LPS. ....	71
Tabela 14. Valores da produção de óxido nítrico (nitrito) por monócitos de voluntários com sobrepeso (µM). .....	118
Tabela 15. Valores do delta (%) da produção de óxido nítrico (nitrito) por monócitos de voluntários com sobrepeso (µM). .....	119
Tabela 16. Valores da produção de peróxido de hidrogênio (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) por monócitos de voluntários com sobrepeso (µM). .....	119
Tabela 17. Valores do delta (%) da produção de peróxido de hidrogênio (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) por monócitos de voluntários com sobrepeso (µM). .....	120

Tabela 18. Valores da capacidade fagocitária de monócitos de voluntários com sobrepeso em presença de leveduras não sensibilizadas (LNS).....	121
Tabela 19. Valores do delta (%) da capacidade fagocitária de monócitos de voluntários com sobrepeso em presença de leveduras não sensibilizadas (LNS). .....	122
Tabela 20. Valores da capacidade fagocitária de monócitos de voluntários com sobrepeso em presença de leveduras sensibilizadas (LS).....	123
Tabela 21. Valores do delta (%) da capacidade fagocitária de monócitos de voluntários com sobrepeso em presença de leveduras sensibilizadas (LS).....	124
Tabela 22. Valores da expressão de corpúsculos lipídicos de monócitos de voluntários com sobrepeso (condição basal).....	125
Tabela 23. Valores da expressão de corpúsculos lipídicos de monócitos de voluntários com sobrepeso (condição estimulada por LPS).....	126
Tabela 24. Valores do delta (%) da expressão de corpúsculos lipídicos de monócitos de voluntários com sobrepeso (condições basal e estimulado por LPS). .....	127

**LISTA DE ANEXOS**

ANEXO 1 TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – TCLE .....	107
ANEXO 2 DADOS BRUTOS .....	118
ANEXO 3 APROVAÇÃO DO PROJETO DE PESQUISA – CEP (FS) .....	128

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	11
LISTA DE TABELAS.....	12
LISTA DE ANEXOS.....	14
INTRODUÇÃO .....	17
CAPÍTULO 1 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	20
1.1. PASSIFLORAS: BIODIVERSIDADE E COMPOSTOS BIOATIVOS.....	21
1.1.1. Diversidade genética, histórico e estudos de seus efeitos.....	21
1.1.2. <i>Passiflora setacea</i> (BRS Pérola do Cerrado): apresentação e caracterização físico-química comparada a outros frutos.....	21
1.2. ALIMENTOS FUNCIONAIS .....	23
1.2.1. Natureza, histórico, definições e estudos de seus efeitos .....	23
1.2.2. Classes de compostos fenólicos presentes em alimentos funcionais .....	23
1.2.2.1 Ácidos fenólicos .....	24
1.2.2.2 Flavonoides.....	26
1.2.2.3 Ligninas .....	27
1.2.2.4 Estilbenos.....	28
1.2.3. Biodisponibilidade dos polifenóis .....	28
1.3. COMPOSTOS FENÓLICOS NA PREVENÇÃO DE DCNT.....	30
1.3.1. Estudos de compostos fenólicos presentes em sucos de frutas na prevenção de DCNT.....	30
1.3.2. Imunomodulação .....	31
1.3.3. Estresse oxidativo e Inflamação no Sistema Imune.....	32
1.3.3.1 Produção de radicais livres .....	33
1.3.3.1.1 Espécies reativas de oxigênio (ERO).....	33
1.3.3.1.2 Espécies reativas de nitrogênio (ERN) .....	35
1.3.3.1.3 Estudos de compostos fenólicos na produção de ERO e ERN .....	36
1.3.3.2 Capacidade fagocitária de monócitos.....	37
1.3.3.3 Expressão de Corpúsculos Lipídicos (CL).....	38
CAPÍTULO 2 – HIPÓTESE, OBJETIVOS, MATERIAL E MÉTODO DE PESQUISA .....	40
2.1 HIPÓTESE DA PESQUISA .....	40
2.2 OBJETIVOS .....	40
2.2.1 Objetivo geral .....	40
2.2.2 Objetivos específicos .....	40
2.3 MATERIAL E MÉTODOS .....	41
2.3.1 Processamento e caracterização das polpas <i>Passiflora setacea</i> .....	41
2.3.2 Formulação da bebida placebo .....	41
2.3.3 Consumo agudo .....	41
2.3.4 Seleção e critérios de exclusão dos voluntários.....	42
2.3.5 Delineamento experimental .....	43
2.3.5.1 Avaliação nutricional.....	44
2.3.5.2 Randomização dos voluntários .....	44
2.3.5.3 Dieta.....	45
2.3.5.4 Coleta de sangue .....	46

2.3.5.5	Separação das células mononucleares (PBMC) do sangue.....	46
2.3.5.6	Aderência dos monócitos às lâminas .....	48
2.3.5.7	Determinação de Óxido Nítrico .....	48
2.3.5.8	Determinação de Peróxido de Hidrogênio .....	49
2.3.5.9	Quantificação de corpúsculos lipídicos (CL).....	51
2.3.5.10	Teste da capacidade fagocitária .....	52
2.3.6	Estatística .....	54
CAPÍTULO 3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO .....		55
3.1	Caracterização da bebida placebo (PB) vs suco de passiflora (PS).....	56
3.2	Consumo agudo.....	57
3.3	Avaliação nutricional dos voluntários.....	57
3.4	ÓXIDO NÍTRICO.....	59
3.5	PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO .....	63
3.6	Quantificação de Corpúsculos lipídicos (CL) .....	67
3.6.1	Monócitos com corpúsculos lipídicos no citoplasma (MO%) .....	68
3.6.2	Corpúsculos lipídicos expressos no citoplasma dos monócitos (CL) .....	69
3.6.3	Índice corpuscular (IC) .....	70
3.7	TESTE DA CAPACIDADE FAGOCITÁRIA .....	77
3.7.1	Monócitos envolvidos na fagocitose (MO%) .....	78
3.7.2	Leveduras envolvidas na fagocitose (Lev) .....	79
3.7.3	Índice fagocitário (IF).....	81
CONCLUSÃO .....		88
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....		89
ANEXOS .....		115

## INTRODUÇÃO

Uma alimentação rica em frutas, hortaliças e grãos integrais é o pilar de uma alimentação saudável e importante ferramenta na prevenção de doenças crônicas não-transmissíveis (DCNT) (BRASIL, 2008). Existe na atualidade, grande demanda da sociedade brasileira e internacional por esses alimentos saudáveis, nutritivos e que apresentam propriedades benéficas para a saúde, de acordo com a Associação Brasileira das Indústrias da Alimentação (ABIA) (2009). Estima-se que até 2023, haverá crescente interesse por alimentos funcionais, produtos diferenciados, naturais e orgânicos, frutas e hortaliças, carne branca e magra, assim como alimentos processados e semiprontos, segundo levantamento da Rede de Inovação e Prospecção Tecnológica (RIPA) (2008).

Para que a biodiversidade brasileira seja valorizada e se transforme em alimentos e produtos disponíveis para a população urbana, faz-se necessária a geração de tecnologias e informações em diversas áreas do conhecimento (EMBRAPA, 2015). Dentre as espécies silvestres que tem uso popular associado a benefícios à saúde, se destacam as pertencentes ao gênero *Passiflora*. Estima-se que existam nesse gênero, cerca de 450 a 600 espécies de maracujazeiros, sendo 150 originárias do Brasil (FERREIRA, 2005; FALEIRO et al., 2008; BERNACCI et al., 2005). Muitas das espécies são indicadas popularmente como sedativas, diuréticas, analgésicas, vermífugas, anti-tumorais, sendo também usadas no tratamento de dependência química, obesidade, controle de tremores e distúrbios nervosos diversos (DHAWAN; KUMAR; SHARMA, 2003; COSTA; TUPINAMBÁ, 2005; ZERAIK et al. 2010).

Estudos recentes correlacionaram o consumo de passifloras com efeitos anti-hipertensivos (KONTA et al., 2013), anticonvulsivos (ELSAS et al., 2010), ansiolíticos e sedativos em ratos (DENG et al., 2010). Elas são utilizadas também como suplemento alimentar no tratamento de doenças como obesidade (ARAÚJO, 2005), diabetes (JANEIRO, et al. 2008) e colesterolemia (RAMOS et al., 2007). Foi visto também que as sementes do fruto tem ação hipocolesterolêmica ao reduzir triglicerídeos, colesterol total e hepático em hamsters (CHAU; HUANG, 2005). Essa gama de estudos revela que as passifloras podem auxiliar no tratamento e prevenção de doenças, corroborando a crença popular.

As espécies de passiflora são ricas em compostos fenólicos, principalmente da categoria dos ácidos fenólicos e flavonoides, e de acordo com a espécie, também apresentam bons teores

de carotenoides, vitaminas A e C, substâncias conhecidas por seu efeito funcional (CASIMIR et al., 1981, SUNTORNSUK et al., 2002, DHAWAN; DHAWAN; SHARMA, 2004). Sob o ponto de vista nutricional, também apresentam teores adequados de minerais e outras vitaminas (COSTA; TUPINAMBÁ, 2005).

A BRS Pérola do Cerrado (espécie silvestre *Passiflora setacea*), recentemente lançada como primeira cultivar registrada pelo Ministério da Agricultura, tem sua composição rica em compostos fenólicos totais mostrada nos perfis da polpa, casca e semente dos frutos. Além disso, os altos teores de vitamina C na polpa sugerem que este alimento possa apresentar efeitos benéficos ao corpo humano (COSTA et al., 2008).

Os compostos fenólicos são compostos bioativos de proteção encontrados em hortaliças e frutas (ARTS; HOLLMAN, 2005) e compreendem as classes de ácidos fenólicos, flavonoides, taninos e ligninas. Vários efeitos benéficos foram relacionados com o consumo desses compostos, como atividades antioxidante, antiinflamatória, antimicrobiana e anticarcinogênica (GUSMAN; MALONNE; ATASSI, 2001; DELMAS; JANNIN; LATRUFFE, 2005; CANTOS; ESPÍN; TOMÁS-BARBERÁN, 2002; BEER, 2003). Esses compostos podem ter, assim, ação de modular o estresse oxidativo fisiológico.

O estresse oxidativo é caracterizado pelo desequilíbrio entre a superprodução de oxidantes em detrimento à de antioxidantes (SIES, 2000; VALKO et al., 2006), que pode gerar danos a lipídeos, proteínas e DNA (VALKO *et al.*, 2007; STADTMAN; LEVINE, 2003; PIETTA, 2000; WICKENS, 2001). Esses danos desencadeiam o desequilíbrio de citocinas, como a superprodução do fator de necrose tumoral  $\alpha$  (FNT- $\alpha$ ) (RYAN et al., 2004) e espécies reativas de oxigênio e nitrogênio por monócitos e monócitos ativados (CONNER; GRISHAM, 1996; COSTA; GARLID, 2007).

O quadro causado pelo estresse oxidativo quando em nível sistêmico e desenfreado está ligado ao desenvolvimento de DCNT, como doenças neurológicas, inflamações, aterosclerose, carcinogênese e diabetes (BÜYÜKBALCI; NEHIR EL, 2008; HALLIWELL, 2007; RAHMAN et al., 2006; VATTEM; SHETTY, 2005; SCALBERT *et al.*, 2005).

No Brasil, o alto índice de morbimortalidade causado por doenças do aparelho circulatório e câncer atinge principalmente os homens (BRASIL, 2009). O sobrepeso também é um fator de risco para doenças cardiovasculares (DCV), diabetes e alguns cânceres (WHO, 2015).

É sugerido, assim, que os compostos fenólicos presentes no suco de *Passiflora setácea* possuam propriedades imunomoduladoras sobre a produção de radicais livres, a ativação de células imunes e o metabolismo lipídico intracelular dessas células de defesa em homens com sobrepeso. Ademais, não há estudos na literatura sobre o efeito desse fruto da biodiversidade brasileira na prevenção de DCNT causadas pelo estresse oxidativo em seres humanos.

## **CAPÍTULO 1 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

## CAPÍTULO 1 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 1.1. PASSIFLORAS: BIODIVERSIDADE E COMPOSTOS BIOATIVOS

#### 1.1.1. Diversidade genética, histórico e estudos de seus efeitos

A grande diversidade genética existente na flora brasileira resulta em variações tanto morfológicas (tamanho, formato, cor, flores e frutos) (FALEIRO et al., 2008), quanto fitoquímicas (DHAWAN; DHAWAN; SHARMA, 2004; COSTA; TUPINAMBÁ, 2005).

As espécies de passiflora são ricas em compostos fenólicos, principalmente da categoria dos ácidos fenólicos e flavonoides, e de acordo com a espécie, também apresentam teores de carotenoides, vitaminas A e C, substâncias conhecidas por seu efeito funcional (CASIMIR et al., 1981, SUNTORNSUK et al., 2002, DHAWAN; DHAWAN; SHARMA, 2004; SILVA et al., 2014).

Muitas das espécies de passiflora são indicadas popularmente como sedativas, diuréticas, analgésicas, vermífugas, anti-tumorais, sendo também usadas no tratamento de dependência química, obesidade, controle de tremores e distúrbios nervosos diversos (DHAWAN; KUMAR; SHARMA, 2003; COSTA; TUPINAMBÁ, 2005; ZERAIK et al. 2010).

#### 1.1.2. *Passiflora setacea* (BRS Pérola do Cerrado): apresentação e caracterização físico-química comparada a outros frutos

A *P. setacea*, uma das passifloras estudadas na rede PASSITEC, é uma espécie nativa dos biomas Cerrado e Caatinga (OLIVEIRA; RUGGIERO, 2005), comumente conhecida como maracujá-do-sono, maracujá-sururuca ou fluminense. O termo “maracujá-do-sono” vem do saber popular de que as folhas e os frutos apresentariam propriedades tranquilizantes (FALEIRO et al., 2005).

Os frutos, por possuírem aroma adocicado e gosto doce, são utilizados popularmente para fabricação de doces (FALEIRO et al., 2005; SANTOS et al., 2005; CAMPOS, 2010). Seus frutos têm grande potencial para uso industrial por terem alto rendimento de suco, alto teor de sólidos solúveis totais e acidez elevada (SANTOS et al., 2005).

A composição química do maracujá pode variar de acordo com a espécie, variedade, fertilidade do solo, práticas culturais, época de colheita, estágio de desenvolvimento do fruto, grau de maturação, manuseio pós-colheita e condições de armazenamento (EMBRAPA, 2015). Vieira (2013) quantificou em 100g de polpa de *Passiflora setacea* 1551mg de sacarose e 1200 mg de glicose e frutose distribuídos igualmente.

A quantidade de vitamina C encontrada na polpa de *P. setacea* (75 mg/100mg) foi superior à encontrada na polpa de *P. edulis* Sims (20 mg/100mg) por Costa et al. (2008), e à encontrada nas polpas de outros frutos do Cerrado, como araticum, cagaita, ingá, jenipapo, jurubeba e lobeira por Siqueira et al. (2013). Sendo assim, o consumo diário de 100 g da polpa de *P. setacea* supriria a necessidade diária dessa vitamina em um indivíduo saudável (60mg/dia), sugerindo um potencial desse fruto em ser fonte de vitamina C (BRASIL, 1998).

No quesito micronutrientes, CAMPOS (2010) averiguou que 100g de polpa da *Passiflora setacea* pode fornecer de 34-39% da ingestão diária recomendada (IDR) de ferro, 21-27% de magnésio, 22-32% de fósforo e 23-37% de zinco.

Quanto aos níveis de compostos bioativos, a polpa fresca dessa espécie apresenta valores três vezes mais elevados de compostos fenólicos totais que as polpas do maracujá azedo comercial (*Passiflora edulis* Sims), de cupuaçu e de abacaxi encontrados no estudo de Kuskoski et al. (2006), também superiores às polpas de outros frutos do Cerrado como cajuzinho, ingá, jurubeba, lobeira e mangaba (SIQUEIRA et al., 2013).

Os valores médios de fenólicos totais são de 140 mg/100 g para *Passiflora setacea* (VIEIRA, 2013) e 21 mg/100 g para *P. edulis* Sims (COSTA et al., 2008). A polpa apresenta também níveis de ácidos fenólicos são de 60 a 120 mg/100 g (ácido siríngico, cafeico, p-cumárico, sináptico e ferrúlico) (SOARES, 2011) e 3,7 mg/100 g de flavonoides totais (CAMPOS, 2010). Porém, quando comparados os de teores de flavonoides totais da polpa da *Passiflora setacea* (3,68 mg/100 g), predominantemente as flavonas homoorientina e isovitexina (CAMPOS, 2010), com outros frutos, observou-se similaridade com os teores presentes no maracujá comercial (COHEN et al., 2008) e inferioridade aos encontrados em acerola (LIMA et al., 2000) e pitanga roxa (LIMA et al., 2002).

Os elevados teores de compostos fenólicos encontrados na polpa de PS em comparação com outros frutos do mesmo bioma, podem contribuir para os efeitos na saúde relacionados com essa espécie.

## **1.2. ALIMENTOS FUNCIONAIS**

### **1.2.1. Natureza, histórico, definições e estudos de seus efeitos**

Alimentos funcionais são aqueles que, além de nutrir, promovem benefícios para a manutenção da saúde (BRASIL, 1999, ILSI, 2005). De acordo com a RDC No. 2 da ANVISA (BRASIL, 2002), os compostos fenólicos estão inseridos na categoria de substâncias bioativas. Sendo assim, os alimentos fontes desses compostos são considerados alimentos funcionais.

Além disso, os alimentos funcionais podem ser classificados ora como “alegação de propriedade funcional”, quando a substância atua nos processos fisiológicos normais do organismo humano, ora como “alegação de propriedade de saúde”, quando a substância atua em processos fisiológicos de uma doença. Segundo as Diretrizes Básicas para Avaliação de Risco e Segurança dos Alimentos, para que um alimento seja considerado funcional, é necessária a comprovação dos seus benefícios em humanos por meio de estudos científicos (BRASIL, 1999).

O consumidor norte-americano gasta em média 90 dólares por ano com produtos alimentícios funcionais, gerando um mercado de 27 bilhões de dólares em 2007. O mercado mundial de alimentos funcionais aumentou em 40,5 bilhões de dólares (122%) do ano de 2000 a 2005 (JUSTFOOD, 2006).

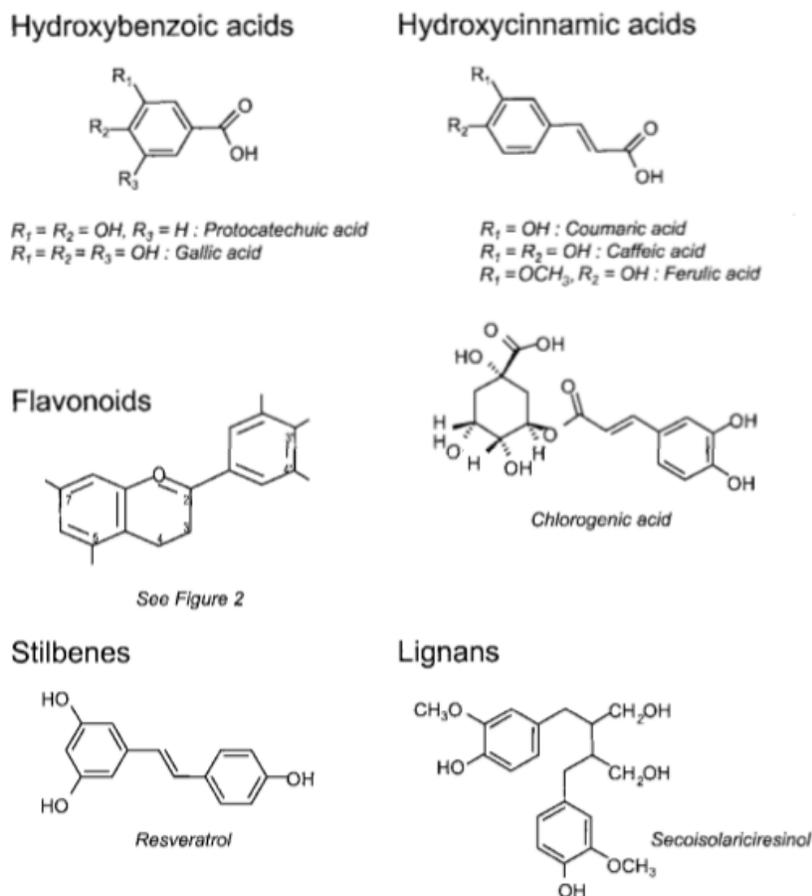
Em geral, um alimento rico em compostos bioativos pode receber a alegação funcional mediante demonstração de eficácia ou se possuir nutrientes ou não nutrientes com funções reconhecidas pela comunidade científica (BRASIL, 1999).

### **1.2.2. Classes de compostos fenólicos presentes em alimentos funcionais**

Os compostos fenólicos são metabólitos secundários sintetizados pelas plantas a partir do aminoácido fenilalanina (CZIHAY; LANGER; ZIEGLER, 1976). Eles atuam nos processos de pigmentação (frutas, flores, sementes e folhas), sinalização (entre plantas, agentes polinizadores e microorganismos) (YAMAGISHI, et. al., 2010), defesa (contra microorganismos) e na proteção contra raios ultravioleta (WINKEL-SHIRLEY, 2001).

Polifenóis representam uma grande variedade de compostos e são classificados em diferentes grupos de acordo com o número de anéis aromáticos e os elementos estruturais que

ligam esses anéis. Eles são, assim, divididos em quatro classes principais: ácidos fenólicos e flavonoides, estilbenos e ligninas, como visto na Figura 1.



**Figura 1.** Estrutura química básica dos polifenóis

Fonte: MANACH et al., 2004.

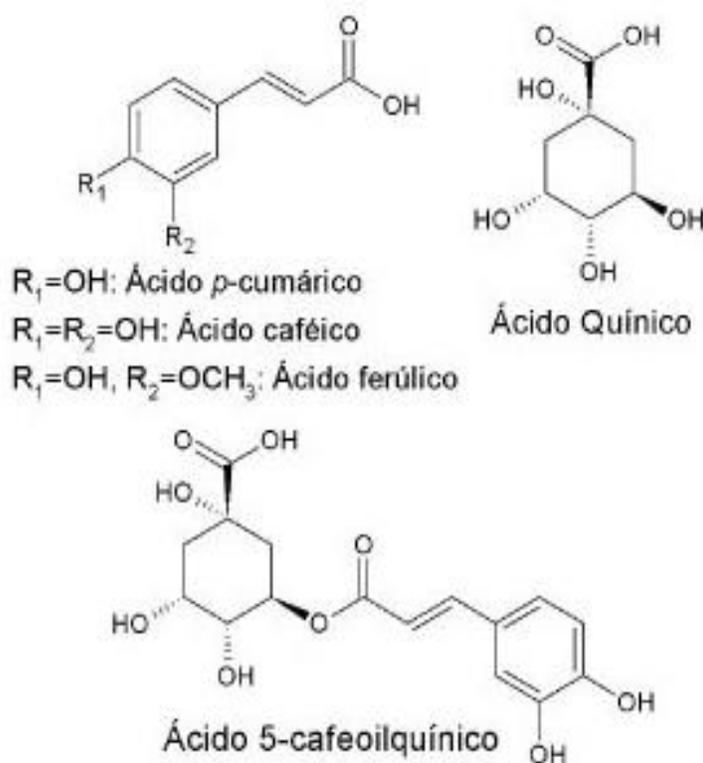
### 1.2.2.1 Ácidos fenólicos

Os ácidos fenólicos são distinguidos pelos derivados de ácido benzoico e de ácido cinâmico. O conteúdo de ácido hidroxibenzoico presente em plantas comestíveis é muito baixo, com exceção de algumas frutas vermelhas, rabanetes pretos e cebolas (SHAHIDI; NACZK, 2000). Folhas de chá (preto ou verde), por exemplo, são excelentes fontes de ácido gálico (TOMAS-BARBERAN; CLIFFORD, 2000) e esses ácidos possuem complexas estruturas como taninos hidrolizáveis (CLIFFORD; SCALBERT, 2000).

Os ácidos hidrocínâmicos são mais facilmente encontrados na natureza em relação aos hidroxibenzoicos, encontrados nas formas de ácidos *p*-cumárico, cafeico, ferúlico e sinápico. Raramente eles são encontrados na forma livre, exceto em alimentos processados que passam por processos de congelamento, esterilização ou fermentação. As formas conjugadas são derivados glicosilados ou ésteres de ácidos quínico, chiquímico e tartárico (MANACH et al., 2004).

Os ácidos cafeico e quínico quando combinados, formam o ácido clorogênico, encontrado em vários tipos de frutas e em altas concentrações no café (CLIFFORD, 1999). O ácido cafeico, encontrado na forma livre e esterificada, é geralmente o ácido fenólico mais abundante encontrado. Ele representa de 75 a 100% de ácidos hidrocínâmicos encontrados nas frutas e suas concentrações são altas na parte mais exterior dos frutos maduros (MANACH et al., 2004).

A Figura 2 mostra a fórmula estrutural do ácido 5-CQA e dos ácidos que compõem a classe dos ácidos clorogênicos.

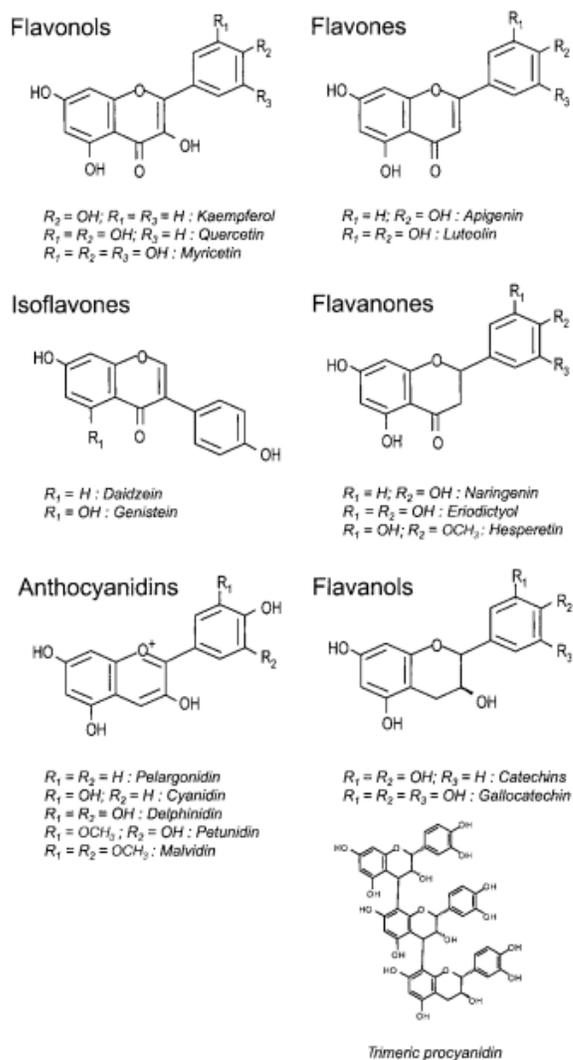


**Figura 2.** Fórmula estrutural do ácido 5-CQA e dos ácidos que compõem a classe dos ácidos clorogênicos.

Fonte: OLIVEIRA; BASTOS, 2011.

### 1.2.2.2 Flavonoides

Os flavonoides, por terem uma estrutura-base de dois anéis aromáticos (A e B) ligados por três átomos de carbono que formam um heterociclo oxigenado (anel C) (esqueleto difenilpropano (C6-C3-C6)), são classificados em seis subclasses: flavonóis, flavonas, isoflavonas, flavanonas, antocianinas e flavanóis (catequinas e proantocianidinas) (MANACH et al., 2004; CLIFFORD, 2001; BEECHER, 2003; FORMICA; REGELSON, 1995; USDA, 2013; WILLIAMS; SPENCER; RICE-EVANS, 2004). As estruturas químicas dos flavonoides possuem ligeiras variações, como demonstrado na Figura 3.



**Figura 3.** Estrutura química básica dos flavonoides

Fonte: Manach et al., 2004

A maioria dos flavonoides existentes na natureza encontra-se na forma de glicosídeos (conjugada a monossacarídeos), os tornando mais solúveis em água. Já as agliconas (forma não-conjugada), apresentam baixa estabilidade (HARBORNE, 1989), sendo encontrada em menor proporção na natureza, o que as fazem serem menos ingeridas na dieta quando comparado com a forma glicosada (WALLE, 2004; YOKOMIZO; MORIWAKI, 2005).

Os mamíferos conseguem ter os flavonoides disponibilizados no metabolismo por meio da dieta, ao se alimentarem de frutas, vegetais, grãos, sementes, chás e vinho. Em humanos adultos saudáveis, estima-se o consumo médio de 1-2g de flavonoides/dia (HAVSTEEN, 2002; HARBORNE; BAXTER, 1999).

### **1.2.2.3. Ligninas**

São formadas por duas unidades de fenilpropano e tem a sua maior fonte na linhaça, contendo secoisolariciresinol e matairesinol. Apesar de serem encontradas também em cereais, grãos, frutas e hortaliças, a concentração presente na linhaça é cerca de mil vezes maior (ADLERCREUTZ; MAZUR, 1997). As ligninas são metabolizadas em enterodiol e enterolactona pela microbiota intestinal. A baixa quantidade consumida de secoisolariciresinol e matairesinol na alimentação não se assemelha às concentrações encontradas no plasma e na urina humana. Infere-se assim, que existem outras ligninas precursoras de enterodiol e enterolactona que ainda não foram identificadas (HEINONEN et al., 2001).

São ainda desconhecidos os mecanismos de ação desses compostos, porém estudos tem levantado evidências científicas que alimentos fonte de ligninas promovem modulações na sinalização de receptores de estrógenos (PENTTINEN-DAMDIMOUPOULOU et al., 2009; PENTTINEN et al., 2007). Sendo assim, uma dieta rica em ligninas pode diminuir risco de câncers sensíveis a hormônios (ADOLPHE et al., 2010).

#### 1.2.2.4 Estilbenos

Eles são encontrados em pequenas quantidades na dieta humana. O mais conhecido é o resveratrol, presente em baixas proporções no vinho tinto e seus efeitos anticarcinogênicos são extensivamente estudados (BERTELLI et al., 1998; BHAT; PEZZUTO, 2002; VITRAC et al., 2002). Pela baixas quantidades encontradas e pelo seu alto efeito protetivo, infere-se que essa molécula tenha um potencial funcional diferenciado (MANACH, et al., 2004).

#### 1.2.3. Biodisponibilidade dos polifenóis

Os fenólicos consumidos na alimentação são absorvidos no trato gastrointestinal (PFORTE; HEMPEL; JACOBASCH, 1999), sendo o esquema geral do processo representado na Figura 4. Uma pequena porção pode ser absorvida no intestino delgado, principalmente as agliconas que são formas menos complexas que as formas glicosiladas (DONOVAN et al., 2002; GONTHIER et al., 2003). Porém, grande parte dos compostos chega intacta no intestino grosso, onde sofre a ação das  $\beta$ -glicosidades, enzimas bacterianas intestinais. Essas enzimas catalisam a hidrólise das ligações beta-glicosídicas (BHATIA; MISHRA; BISARIA, 2002), liberando agliconas que são absorvidas pelos enterócitos, antes de serem transportados para o fígado. Entretanto, existe ainda uma parcela que é degradada pela microbiota intestinal em diversos ácidos aromáticos simples, o que reduz a taxa de absorção dos polifenóis (MORAND et al. 2012).

Após as reações de conjugações intestinais e hepáticas, os polifenóis são encontrados no plasma sob a forma de metabólitos sulfatados, glucuronidados ou metilados (MANACH; DONOVAN, 2004). Salvo exceção das antocianinas que são encontradas na forma de glicosídeos no sangue por conta do seu mecanismo de absorção diferenciado no estômago (PASSAMONTI et al., 2003). Aproximadamente, os compostos fenólicos têm sido detectados no plasma humano entre uma e sete horas após o consumo de alimento-fonte do composto (MANACH et al., 2005).

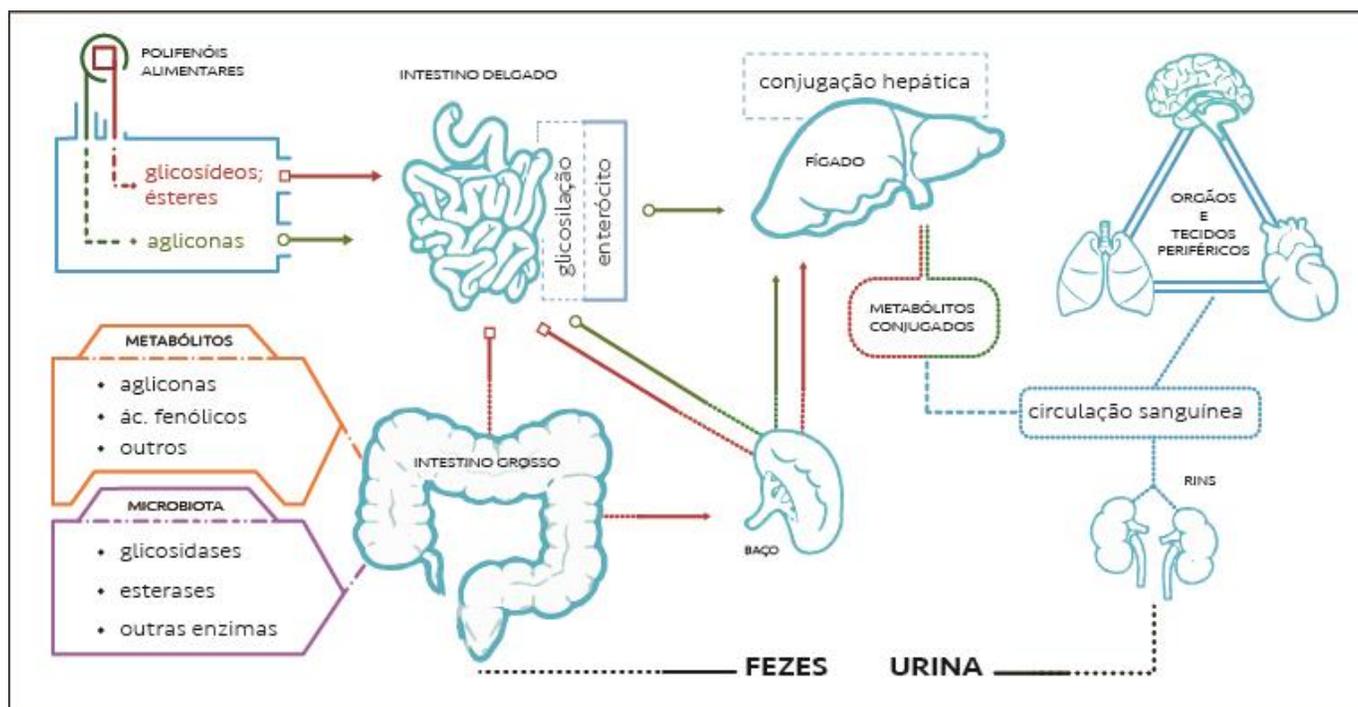
As formas circulantes são então transportadas no sangue ligadas à albumina sérica e liberadas nos tecidos-avos (DANGLES et al., 2001; MANACH et al., 2006). Todavia, não foi observado nenhum tipo de acúmulo de polifenóis nos tecidos, mesmo após exposição prolongada

(MANACH et al., 2006), o que exige uma ingestão regular e contínua de produtos vegetais (MORAND et al., 2012)

A ação das beta-glicosidases no processo de absorção é determinante para a melhor biodisponibilidade e atividade biológica dos fenólicos no metabolismo humano (HEIM; TAGLIAFERRO; BIBILYA, 2002; MAMMA; HATZINIKOLAOU; CHRISTAKOPOULOS, 2004). A molécula de açúcar (glicosídeo) é igualmente imprescindível na eficiência da absorção dos fenólicos pelo intestino (MORAND et al, 2000). Alguns estudos mostraram que glicosídeos de quercetina presentes em cebolas foram absorvidos de forma mais eficaz que na sua forma não-conjugada (aglicona pura) (HOLLMAN; KATAN, 1999; HOLLMAN et al., 1999).

O restante dos compostos não absorvidos é excretado pelas fezes ou em menor proporção pela urina (SPENCER et al., 1999). O que é secretado pela bile, passa pelo duodeno e pode ser eventualmente reabsorvido graças à ação das enzimas bacterianas das partes distais do intestino, prolongando a ação desses compostos no organismo (SETCHELL et al., 2001; MANACH et al., 2003).

A Figura 4 mostra o esquema geral do metabolismo dos polifenóis.



**Figura 4.** Esquema geral do metabolismo de polifenóis.

Fonte: MORAND et al., 2012 (adaptado e traduzido).

### **1.3. COMPOSTOS FENÓLICOS NA PREVENÇÃO DE DCNT**

Uma alimentação rica em compostos fenólicos tem sido associada à redução no risco de desenvolvimento de doenças associadas ao envelhecimento (KURIYAMA et al., 2006), de doenças cardiovasculares (DCV), de câncer e de doenças neurodegenerativas (USDA, 2013), por conta das suas capacidades antioxidantes e antiinflamatórias (SERGENT et al., 2010). Porém, outros estudos viram que a biodisponibilidade de antioxidantes no sangue após a ingestão de um alimento rico no composto é muito baixa para combater os radicais livres (YANG et al., 1998). Essa atividade preventiva e curativa por meio da ingestão desses compostos, demonstra que esses efeitos envolvem múltiplas vias celulares cruciais na patogênese dessas doenças (WILLIAMS; SPENCER; RICE-EVANS, 2004). Assim, investiga-se os reais fatores de proteção ligados a esses alimentos.

#### **1.3.1. Estudos de compostos fenólicos presentes em sucos de frutas na prevenção de DCNT**

Vários trabalhos foram realizados para comprovar a relação entre o consumo de compostos fenólicos e seus efeitos benéficos à saúde. Uma coorte realizada em Boston, EUA, constatou a diminuição em 26% da incidência de diabetes mellitus tipo 2 em indivíduos que consumiam doses de flavonoides diariamente (JACQUES et al., 2013).

Vários efeitos do consumo de sucos de frutas ricos nesses compostos também foram comprovados em estudos recentes. O consumo de suco de romã pode ser tratamento auxiliar da cardiopatia isquêmica (SUMNER et al., 2005) e pode auxiliar no controle de ganho de peso em pacientes obesos (GONZALEZ-ORTIZ et al., 2011). O suco de uva promove melhor perfil lipoproteico, efeitos antioxidantes e antiinflamatórios em pacientes em hemodiálise e em indivíduos saudáveis (CASTILLA et al., 2006; CASTILLA et al., 2008); promove também efeito

antioxidante e proteção de danos aos DNA de linfócitos de indivíduos hipertensivos (PARK et al., 2009).

Suco de *cranberry* proporciona melhora na rigidez arterial em indivíduos com doença arterial coronariana (DOHADWALA et al., 2011) e também pode diminuir a oxidação lipídica e aumentar a capacidade antioxidante do plasma de mulheres com síndrome metabólica (BASU et al., 2011). O suco de laranja pode promover diminuição da pressão sanguínea diastólica e melhora da atividade endotelial em indivíduos com sobrepeso (MORAND et al., 2011), alterar expressão gênica de leucócitos em ingestão crônica (MILENKOVIC et al., 2011) e pode melhorar perfil lipídico em mulheres com sobrepeso praticantes de atividade física (APTEKMANN; CESAR, 2010).

Suco de mirtilo apresentou capacidade de diminuir a proteína C-reativa e algumas interleucinas (KARLSEN et al., 2010), também de diminuir a pressão arterial e a LDL oxidada (BASU; RHONE; LYONS, 2010) apresentando um efeito antiinflamatório em indivíduos com risco aumentado para desenvolvimento de DCV. O consumo de suco de morango pode diminuir níveis de colesterol total, LDL e células de adesão (marcadores de arterosclerose) (BASU et al., 2010). Os dois últimos estudos foram realizados com indivíduos portadores da síndrome metabólica. Suco de amora silvestre apresenta efeitos antioxidantes em indivíduos saudáveis (HASSIMOTO; PINTO; LAJOLO, 2008).

Suco de beterraba consumido uma única vez causou diminuição da pressão arterial sistólica em homens em menos de 24h, quando comparado a uma bebida placebo (COLES; CLIFTON, 2012). O suco de *oroblanco* (ou *sweetie*) tem efeitos antihipertensivos em pacientes hipertensos (RESHEF et al., 2005). Infusão feita a partir do fruto de *Sambucus ebulus* L., uma planta utilizada na região que compreende a Bulgária, Grécia e Turquia, apresentou efeito modulador do perfil lipídico e da capacidade antioxidante sérica em indivíduos saudáveis (IVANOVA; TASINOV; KISELOVA-KANEVA, 2014).

### **1.3.2 Imunomodulação**

Imunomodulação é o ajuste da resposta imune a um nível desejado, tal como imunopotenciação, imunossupressão ou indução de tolerância imunológica (MILLER-KEANE; O'TOOLE, 2005). Diversas plantas produzem substâncias naturais capazes de modular o sistema imunológico promovendo ação antimicrobiana (CORRÊA et al., 2006). A fagocitose de células

mononucleares ativa o metabolismo oxidativo, gerando aumento da produção de espécies reativas no intuito de eliminar patógenos (FRANÇA et al., 2010; CUNICO et al., 2004), sendo estimulada na presença de agentes imunomoduladores (HONORIO-FRANÇA et al., 1997; FRANÇA et al., 2011; FRANÇA et al., 2011). Pesquisas tem sido feitas utilizando compostos de plantas para atuarem como tais, permitindo assim, modificar a função imunológica (AI et al., 2005; WANG et al., 2009).

### 1.3.3. Estresse oxidativo e Inflamação no Sistema Imune

O estresse oxidativo é caracterizado pelo desequilíbrio entre a superprodução de oxidantes em detrimento ao dos antioxidantes e que pode gerar danos (SIES, 2000; VALKO et al., 2006). Essas moléculas oxidantes em altas concentrações, podem ser prejudiciais, induzindo a oxidação de lipídios de membrana, proteínas, enzimas, carboidratos e DNA (VALKO *et al.*, 2007; STADTMAN; LEVINE, 2003; PIETTA, 2000; WICKENS, 2001), comprometendo as funções biológicas normais do corpo (VATTEN; SHETTY, 2005).

O quadro causado pelo estresse oxidativo quando em nível sistêmico e desenfreado está ligado ao desenvolvimento de DCNT, como doenças neurológicas, inflamações, aterosclerose, carcinogênese e diabetes (BÜYÜKBALCI; NEHIR EL, 2008; HALLIWELL, 2007; RAHMAN et al., 2006; VATTEN; SHETTY, 2005; SCALBERT *et al.*, 2005).

Outras fontes adicionais de espécies reativas são os neutrófilos, eosinófilos e macrófagos. No sistema imune inato, a ativação de macrófagos desencadeia a produção de O<sub>2</sub>, NO e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (CONNER; GRISHAM, 1996; COSTA; GARLID, 2007) e citocinas pró-inflamatórias (RYAN et al., 2004). Macrófagos hepáticos induzidos por espécies reativas participam da hepatotoxicidade ao produzirem citocinas inflamatórias (KLAUNIG; KAMENDULIS, 2004), podendo levar à promoção de câncer hepático (ROBERTS et al., 2007).

A inflamação é a reação primária do sistema imune para eliminar patógenos ou reestabelecer o estado normal das células ou restaurar danos teciduais (EMMENDOERFFER, 2000). Porém, contínua inflamação pode gerar dano ou hiperplasia celular (COUSSENS; WERB, 2002) e disfunção crônica do endotélio. Essa disfunção pode estar associada ao aumento da expressão de moléculas pró-inflamatórias, quimiotáticas e de adesão, tendo a aterosclerose a principal causa das DCV (WIDLANSKY et al., 2003; SIMA; STANCU; SIMIONESCU, 2009).

### 1.3.3.1. Produção de radicais livres

Radicais livres podem ser definidos como moléculas ou átomos que contêm um ou mais elétrons desemparelhados centrados nos átomos de oxigênio ou nitrogênio (FINKEL e HOLBROOK, 2000). São bastante instáveis, com meia-vida curta e muito reativos quimicamente, causando danos a qualquer molécula com que entra em contato (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1998).

Esses átomos são produtos do metabolismo celular liberados durante o processo de redução do oxigênio, utilizado na conversão dos nutrientes absorvidos dos alimentos em energia (VALKO *et al.*, 2007). Na realidade, nem todos os agentes reativos patogênicos apresentam elétrons desemparelhados, não sendo ideal o termo “radicais livres” para tais agentes (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

Vale também ressaltar que os radicais livres, tanto espécies reativas de oxigênio, quanto de nitrogênio são produzidas para manter a homeostase celular (DEVASAGAYAM *et al.*, 2004), atuando, dessa forma, no combate a agentes infecciosos, na formação de ATP nas mitocôndrias, na regulação do crescimento celular e na produção de oxigenases, obviamente quando estão em baixas concentrações (VALKO *et al.*, 2007).

#### 1.3.3.1.1. Espécies reativas de oxigênio (ERO)

Apenas 2 a 5% do oxigênio utilizado para produção de energia e oxidação de compostos orgânicos é reduzido a uma variedade de substâncias químicas altamente reativas (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999; DAMASCENO *et al.*, 2002). As espécies reativas de oxigênio (ERO) são produtos do metabolismo aeróbico de várias células onde o oxigênio sofre redução de elétrons, resultando na formação de radicais.

Essas reações são catalizadas por sistemas enzimáticos como a cadeia transportadora de elétrons nas mitocôndrias, as enzimas que metabolizam o ácido araquidônico (lipoxigenases e cicloxigenases), o citocromo p450, a xantina oxidase, as peroxidases e a NADPH oxidase (BABIOR, 1999; CAI, 2005). Exemplos são o peróxido de hidrogênio ( $O_2 + e^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2$ ), o superóxido ( $O_2 + e^- \Rightarrow O_2^-$ ) e a hidroxila ( $H_2O_2 + e^- \Rightarrow OH + OH$ ) (DAMASCENO *et al.*, 2002; ANDRADE JUNIOR *et al.*, 2005).

Peróxido de hidrogênio (  $O_2 + e^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2$  )

O peróxido de hidrogênio é resultante da redução de dois elétrons de oxigênio ou da dismutação do  $O_2^-$ . Mesmo não tendo um elétron desapareado, o  $H_2O_2$  é uma ERO extremamente reativa (FERREIRA & MATSUBARA, 1997; COMHAIR & ERZURUM, 2002), sendo capaz de atravessar camadas lipídicas e reagir com metais de transição. Pode também romper a coluna do DNA, induzir alterações cromossômicas, etc (OLSZEWER, 1995).

A determinação da produção de  $H_2O_2$  por monócitos é feita por meio da microtécnica ph-dependente de oxidação do vermelho fenol na presença de peroxidase (PICK; KEISARI, 1980) que catalisa a oxidação do vermelho de fenol pelo  $H_2O_2$ .

Radical superóxido (  $O_2 + e^- \Rightarrow O_2^-$  )

Esse radical é formado a partir da redução do oxigênio com um elétron (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999) e encontrado em quase todas as células aeróbicas (mitocôndrias, microsomas e peroxissomas) (COMHAIR & ERZURUM, 2002). Ele é produzido durante a ativação máxima dos neutrófilos, monócitos, macrófagos e eosinófilos (FERREIRA & MATSUBARA, 1997). Esse agente oxidante é fraco, porém tem a capacidade de produzir outros radicais altamente citotóxicos (OLSZEWER, 1995).

Radical hidroxila (  $H_2O_2 + e^- \Rightarrow OH + OH$  )

De meia-vida muito curta, o radical hidroxila é o agente mais reativo até hoje estudado, reagindo amplamente com aminoácidos, DNA e RNA, além de iniciar a oxidação dos ácidos graxos poliinsaturados das membranas das células (ANDRADE JUNIOR et al., 2005; VALKO et al., 2007).

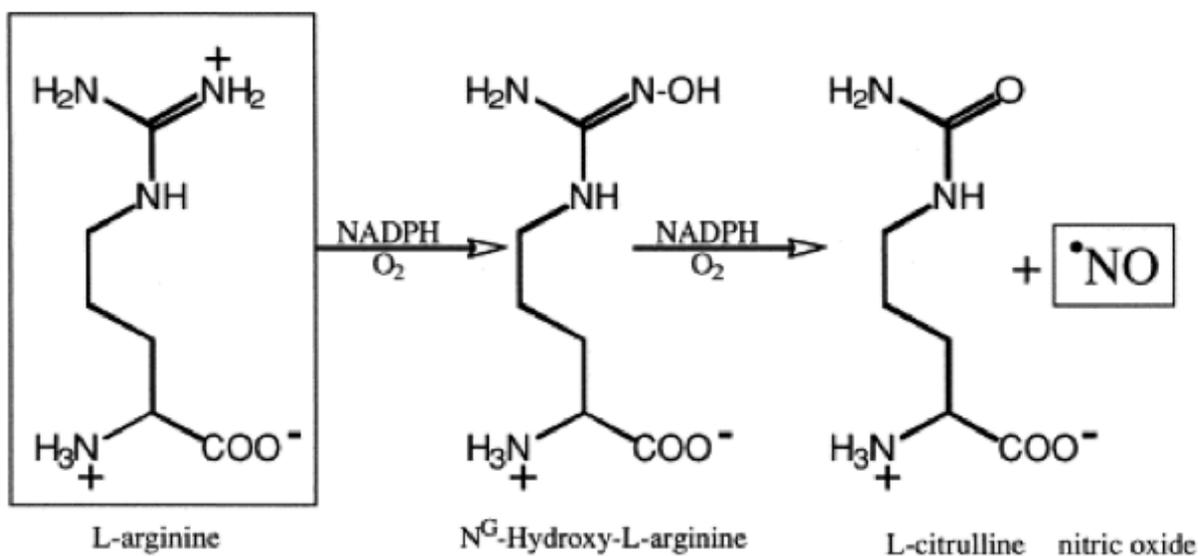
### 1.3.3.1.2. Espécies reativas de nitrogênio (ERN)

As ERNs desempenham papel importante na regulação da pressão arterial, no sistema imune, coagulação e na neurotransmissão (PACHER et al., 2007). O óxido nítrico (NO) é um exemplo de ERN muito importante para o sistema imune, pois é uma molécula mensageira inter e intracelular com inúmeras atividades biológicas (BRUNET, 2001; YOON et al., 2002). A enzima óxido nítrico sintase (NOS) converte o aminoácido não-essencial L-arginina em L-citrulina e NO. O NO tem função importante na homeostase do corpo, como a inibição da ativação de células endoteliais, modulação de expressão de moléculas de adesão (CAMs), ação vasodilatadora e de função plaquetária - inibe a adesão, ativação e agregação das plaquetas (LAROUX et al., 2000; LOSCALZO, 2001; DUSSE et al., 2005). Outras funções importantes para o sistema imune são ação antimicrobiana, inibição da proliferação de células T e B, da adesão e do rolamento de leucócitos no endotélio e da produção de citocinas (BOGDAN, 2001; VAN DER VEEN, 2001). Ao mesmo tempo que a redução da produção endógena de NO está associada à hipertensão (IGNARRO, 2002) devido à ação antiinflamatória e dilatadora vascular desse metabólito (RICART-JANÉ et al., 2002), ela também pode ser potencialmente tóxica, conforme a sua concentração ou depuração tecidual (YAMAGUCHI et al., 2006), ou seja, o tempo que o NO permanece no tecido e fora da circulação (KOMI, 2009 p.379). Essas características do NO justificam a sua mensuração em pesquisas clínicas. Porém, o NO é precursor de diversas espécies mais reativas que reagem com aminoácidos, proteínas íons metálicos e DNA (NEDIANI et al., 2011). O NO, por exemplo, pode reagir com o superóxido ( $O_2^-$ ) para formar o peroxinitrito ( $OONO^-$ ), o qual é responsável pela formação de várias ERNs que, juntamente com as ERO, podem gerar estresse oxidativo e danos às estruturas celulares (MARTÍNEZ e ANDRIANTSITOHAINA, 2009).

Determina-se o óxido nítrico indiretamente por dosagem plasmática ou urinária de NOx (metabólitos nitrito/nitrato) por conta da sua meia-vida curta do NO (MOSHAGE et al., 1995) e por conta da forte correlação entre a produção endógena de NO e os níveis séricos de NOx (ROMITELLI et al., 2007). A reação de Griess é um dos métodos mais utilizados para a quantificação desses íons (TSIKAS, 2000), devido a simplicidade, baixo custo e rapidez do método (DUSSE et al., 2005)

A biossíntese do NO no organismo ocorre via oxidação da L-arginina, catalisada pela enzima NOS, com o NADPH (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato) na sua forma reduzida

como doador de elétron. Esta síntese é dividida em duas etapas, na primeira, ocorre a hidroxilação da L-arginina, formando NG-hidroxi-L-arginina pela utilização de uma molécula de oxigênio e duas de NADPH. Na segunda, o NG-hidroxi-L-arginina é convertido a L-citrulina e NO por meio de um elétron proveniente do NADPH e outro da molécula de oxigênio, (GIULIVI, 2003) (Figura 5) (NAPOLI; IGNARRO, 2009).



**Figura 5.** Síntese do NO catalizada pela NOS.

Fonte: GIULIVI, 2003.

### 1.3.3.1.3. Estudos de compostos fenólicos na produção de ERO e ERN

O extrato de folha de oliveira rico em fenólicos e o seu composto isolado, oleuropeína teve a capacidade de melhorar a viabilidade celular, diminuir a produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e melhorar a secreção de insulina de células β do pâncreas cultivadas em meio de cultura com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (CUMAUGLU et al., 2011). Extratos de *berries* inibiram produção de ERO por fagócitos ativados por padrões de opsoninas (DENEV et al., 2014).

A quercetina e catequina, em sinergia, inibiram significativamente o recrutamento de plaquetas (concentração-dependente) e da formação de ânion superóxido, além de aumentar a produção de NO pelas plaquetas cultivadas com os polifenóis (PIGNATELLI et al., 2006).

Grassi et al. (2008) verificaram o aumento da dilatação fluxo-mediada da artéria braquial (DILA), relacionada com o aumento da produção de NO, causada pelo consumo de chocolate amargo por voluntários. A DILA também teve seu aumento em voluntários hipercolesterolêmicos 2h e duas semanas após consumo de antocianinas isoladas de *berries* (ZHU et al., 2011).

Como visto na literatura, os CF presentes em frutas e hortaliças podem ter efeitos imunomodulares. Outros parâmetros importantes de análise de efeitos sobre o sistema imune é a capacidade fagocitária e a expressão de corpúsculos lipídicos (CL) pelas células imunes.

### **1.3.3.2. Capacidade fagocitária de monócitos**

A fagocitose por monócitos é um mecanismo não-específico importante para o sistema imune inato, seja imediato ou após várias horas após a exposição ao antígeno. Mas esse processo também é usado como um importante indicador da ativação da função imune (OBERLEY et al., 2004; LEE et al., 2001).

O reconhecimento de partículas a serem fagocitadas depende da interação de moléculas da superfície da partícula com receptores na superfície dos macrófagos (CASTELLANO, 2005). Existem dois mecanismos diferentes na fagocitose de partículas, um por ligação ao anticorpo pelo auxílio do sistema complemento presente na membrana celular dos monócitos (UNDERHILL; OZINSKY, 2002; CASTELLANO, 2005). E outro, por ligação ao PAMP (Pathogen associated molecular pattern) pelo receptor PRR (Pathogen recognition receptor) (PEISER; GORDON, 2001). O processo via sistema complemento, é realizado por proteínas plasmáticas conhecidas como opsoninas, que se ligam aos anticorpos aderidos aos microorganismos para a ativação da fagocitose. Esse sistema é ativado na presença de leveduras sensibilizadas por soro humano, fonte de complemento. Já o processo via PAMP, ocorre na presença das leveduras não-sensibilizadas (ABBAS, 2011).

### 1.3.3.3. Expressão de Corpúsculos lipídicos (CL)

A estrutura desses corpúsculos é formada por uma monocamada exterior de fosfolipídeos e seu núcleo é preenchido por lipídeos neutros e proteínas e são peças-chave no processo de sinalização intracelular e de células do processo inflamatório. As proteínas existentes nos corpúsculos lipídicos estão envolvidas no metabolismo lipídico (colesterol e triglicerídeos) e no transporte do araquidonato e dos ácidos graxos da membrana. Eles estão envolvidos na regulação e formação de eicosanoides, no armazenamento de citonas (FNT- $\alpha$ ) e quimiocinas (Rantes) e na ativação das vias de sinalização intracelular (BOZZA E BANDEIRA-MELO, 2005; WAN et al., 2007; BOZZA; MAGALHÃES; WELLER, 2009).

O aumento da concentração de CL nas células é detectado em tumores, aterosclerose, artrite, dentre outras patologias (MELO; DVORAK, 2012). A liberação de ERO por monócitos e macrófagos ativados busca oxidar moléculas de LDL (ØSTERUD; BJFRKLID, 2003), que são detectadas e fagocitadas por essas células de defesa por meio dos seus receptores *scavenger* (STEINBRECHER, 1999). Esse é um processo fisiológico normal, porém em situações pró-inflamatórias nas quais há elevada concentração de colesterol oxidado na parede endotelial, ocorre um acúmulo de colesterol dentro dos fagócitos, chamados corpúsculos lipídicos (CL). Esse processo transforma os fagócitos em células espumosas, precursoras das lesões ateroscleróticas (SAITO et al., 2002). As modificações de membrana provocadas por tais lesões e intensificadas pelos macrófagos ativados (FORMAN; TORRES, 2002; BASU; RAY, 2005), ativam enzimas ligadas à membrana, especialmente o complexo nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase (NADPH oxidase), um complexo enzimático ligado à membrana e que catalisa a redução o  $O_2$  molecular em ânio superóxido ( $O_2^-$ ) (CHANOCK et al., 1994; GRIENLINK; USHIO-FUKAL, 1998).

A NADPH oxidase está envolvida diretamente na produção de compostos reativos de oxigênio (ROS) que em excesso, promove graves lesões teciduais por conta da reação inflamatória aumentada (BOKOCH, 2005).

Os efeitos imunomodulatórios dos compostos fenólicos presentes no suco de *Passiflora setacea* ainda não são conhecidos. A possível modulação da produção de radicais livres, da ativação de células imunes e do metabolismo lipídico intracelular dessas células de defesa deve ser avaliada para elucidação das possíveis propriedades funcionais desse fruto da biodiversidade brasileira na prevenção de DCNT causadas pelo estresse oxidativo.

## **CAPÍTULO 2 – HIPÓTESE, OBJETIVOS, MATERIAL E MÉTODO DE PESQUISA**

## **CAPÍTULO 2 – HIPÓTESE, OBJETIVOS, MATERIAL E MÉTODO DE PESQUISA**

O presente capítulo tem por objetivo delimitar a hipótese da pesquisa e os objetivos, bem como descrever o material e os métodos utilizados para que estes sejam alcançados. Os protocolos detalhados das análises realizadas são apresentados no final do trabalho, na forma de anexos.

### **2.1 HIPÓTESE DA PESQUISA**

Os compostos fenólicos, presentes no suco de *Passiflora setacea*, BRS Pérola do Cerrado, possuem propriedades imunomoduladoras sobre a produção de radicais livres, a ativação de células imunes e o metabolismo lipídico dentro dessas células de defesa.

### **2.2 OBJETIVOS**

#### **2.2.1 Objetivo geral**

Avaliar o efeito do consumo agudo do suco de *Passiflora setacea* sobre a capacidade fagocitária, produção de radicais livres e expressão de corpúsculos lipídicos por monócitos de indivíduos com sobrepeso do sexo masculino.

#### **2.2.2 Objetivos específicos**

- Quantificar a produção de radicais de oxigênio (peróxido de hidrogênio) e nitrogênio (óxido nítrico) por monócitos
- Quantificar a concentração de corpúsculos lipídicos em monócitos
- Avaliar a capacidade fagocitária de monócitos

## 2.3 MATERIAL E MÉTODOS

O estudo atual é um ensaio clínico de intervenção aguda placebo exploratório controlado duplo-cego, no qual não era revelado qual tratamento estava sendo aplicado, nem para os voluntários, nem para os pesquisadores envolvidos. Objetiva-se determinar a eficácia de uma única intervenção terapêutica (suco *Passiflora setacea*) sobre uma determinada doença ou causa com a presença de um grupo controle (PEREIRA, 2010).

### 2.3.1 Processamento e caracterização das polpas *Passiflora setacea*

Os frutos utilizados nessa pesquisa foram de *Passiflora setacea*, a BRS Pérola do Cerrado provenientes do campo experimental da Embrapa Cerrados. Os frutos maduros foram colhidos do nível 6 de maturação, da safra 2/2015 dos dois sistemas de produção, espaladeira e latada. O critério de maturidade estabelecido foi o mesmo dos estudos iniciais realizados por Lima et al. (2010) na Etapa I da Passitec, com a casca verde e rajadas amareladas.

As polpas foram retiradas dos frutos e mixadas em liquidificador durante 30 segundos, o suficiente para separar as sementes das polpas por peneiração. Elas foram lacradas em sacos de 150mL, vedados hermeticamente e estocadas a -80 °C.

### 2.3.2 Formulação da bebida placebo

A bebida placebo foi formulada para possuir sabor e aroma idênticos ao suco de maracujá (*P. edulis*), e sem nenhuma quantidade da fruta presente. Sendo assim, escolheu-se a bebida isotônica sabor maracujá Gatorade®. A lista de ingredientes na ordem decrescente da bebida isotônica é: água, sacarose, maltodextrina, cloreto de sódio, citrato de sódio, fosfato de potássio monobásico, acidulante ácido cítrico, aromatizante artificial tartrazina e corante artificial amarelo crepúsculo.

### 2.3.3 Consumo agudo

Na avaliação de risco da exposição de uma dada substância química presente em um alimento à saúde, tem-se o risco crônico que estima a ingestão média de um alimento durante um

longo período e o risco agudo que avalia a exposição pelo consumo de uma única refeição ou durante 24 h (WHO, 2009; HAMILTON et al., 2004). Seguindo a mesma lógica para a exposição a substâncias bioativas presentes em alimentos, o consumo de um copo de suco de *Passiflora setacea* uma única vez foi categorizado como consumo agudo.

#### **2.3.4 Seleção e critérios de exclusão dos voluntários**

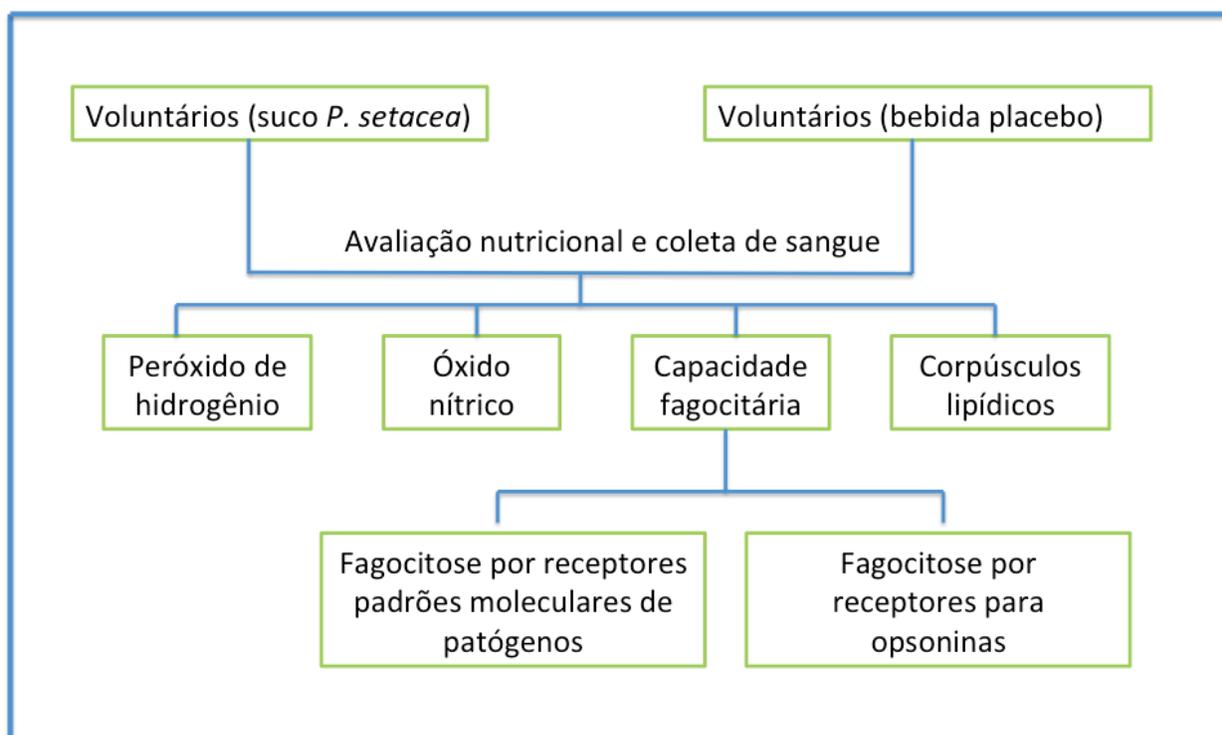
Os voluntários (n=10) foram selecionados por anúncios em meios de comunicação (jornal, site, etc) e foram escolhidos os indivíduos adultos do sexo masculino, com idade entre 40 e 64 anos que preenchessem pelo menos dois dos quatro seguintes critérios: a) sobrepeso ( $25 \leq \text{IMC} \leq 30$  kg/m) (WHO, 2000); b) circunferência abdominal  $\geq 94$ cm (LEAN; HAN; MORRISON, 1995); c) percentual de massa gorda 21 – 38% de acordo com a faixa etária estipulada por Pollock; Wilmore (1993); d) nível de atividade física “sedentário”, de acordo com *International physical activity questionnaire* (IPAQ) (RZEWNICKI; AUWEELE; BOURDEAUDHUIJ, 2002).

Foram escolhidos voluntários do sexo masculino com sobrepeso para o atual estudo, pois é uma população sem doença de base, porém com risco para desenvolvimento de doenças do aparelho circulatório e de câncer (BRASIL, 2009; WHO, 2015). E como o presente estudo é um estudo clínico exploratório de fase 1, se almeja elucidar os mecanismos de ação dos compostos presentes do suco de PS, primeiramente em um grupo pequeno (n) de voluntários eutróficos, sem doença de base. Além disso, a obesidade também altera várias respostas imunes, por conta da inflamação generalizada nesse quadro metabólico (HOTAMISLIGIL; ERBAY, 2008; GOLDFINE et al., 2010; TORRES-LEAL, 2010). Já indivíduos do sexo feminino possuem o ciclo menstrual, um fenômeno biológico que envolvem alterações das concentrações hormonais (GUYTON; HALL, 2000), que podem dificultar a padronização das respostas imunológicas. Este estudo tem a autorização do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Saúde da Universidade de Brasília inscrito sob o CAAE: 36348114.3.0000.0030.

Os critérios de exclusão foram indivíduos fumantes, praticantes de atividade física superior a 5h/semana, alérgicos à maracujá e produtos à base do fruto, usuários de suplementação nos dois meses prévios ao experimento (vitamina C, multivitamínicos, cápsulas antioxidantes, etc.), usuários de medicação para tratamentos crônicos (antihipertensivos,

antihiperlipemiantes, anticolesterol, antidepressivos, soníferos, ansiolíticos, etc.), tratamentos agudos nos 15 dias prévios ao experimento (*antiinflatórios potentes, antibióticos, etc.*) e tratamentos agudos nos dois dias prévios ao experimento (*antiinflatórios aliviadores de dor, como aspirina, paracetamol, etc.*).

### 2.3.5 Delineamento experimental



**Figura 6.** Fluxograma dos experimentos

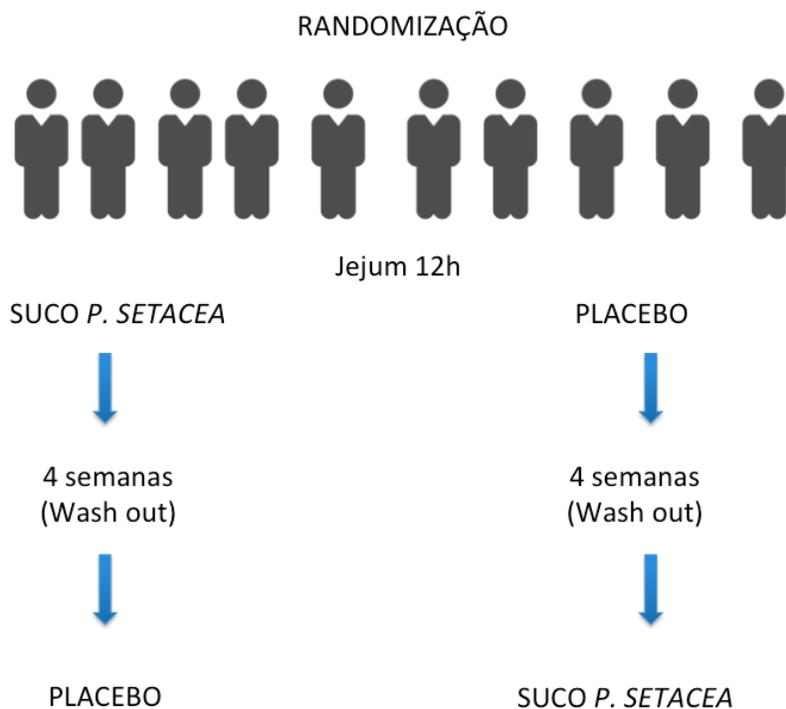
Todos os experimentos e a leitura das lâminas foram realizados no Laboratório de Imunologia Celular do departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília. A captura de imagens foi feita em microscópio confocal, em microscópio eletrônico de varredura, e no microscópio Axiophot.

### **2.3.5.1 Avaliação nutricional**

O percentual de gordura e massa livre de gordura foi estimada a partir de equações com base no IMC e sete dobras cutâneas (CARNAVAL, 2000). A coleta de amostras biológicas dos voluntários foi realizada pela equipe de biomédicos do Laboratório de Imunologia Celular do departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília. e as medidas antropométricas foram realizadas pela equipe de nutricionistas.

### **2.3.5.2 Randomização dos voluntários**

Na primeira fase da pesquisa, os voluntários foram divididos em dois grupos “Placebo (PB)” e “*Passiflora setacea* (PS)” e foram randomizados em cada experimento, ou seja, em um dia de experimento, havia voluntários do grupo PB e do grupo PS para diminuir possíveis vieses de análise. Os voluntários eram enumerados randomicamente no intuito de “cegar” os pesquisadores envolvidos na análise. Na segunda fase, após quatro semanas de *washout*, os voluntários foram trocados de grupo (de PB para os e vice versa) para repetir o experimento, pra avaliação da diferença de resposta intrapessoal (Figura 7). Ou seja, foram comparadas respostas do grupo PB x PS e a variação da resposta individual de cada voluntário na condição PB e na condição PS (delta  $\Delta$ ). Porém, houve perdas no processo. Dos 10 voluntários, 3 (três) não voltaram para a segunda fase, 2 (dois) apenas fizeram a condição PS e 1 (um), a condição PB.



**Figura 7.** Esquema da randomização dos grupos Placebo (PB) vs *Passiflora setacea* (PS).

### 2.3.5.3 Dieta

Os voluntários foram instruídos a consumir uma refeição “branca” na noite anterior ao experimento, ou seja, pobre em micronutrientes, hipolipídica e normoproteica, evitando produtos de origem vegetal ricos em compostos bioativos (hortaliças, frutas e bebidas derivada), chocolate, café e chás. Todas essas informações foram verificadas por aplicação de Recordatório 24 h (FISBERG et al., 2005). O consumo de álcool também foi proibido nas 72h antes do experimento.

O grupo experimental consumiu 150 g de polpa congelada de *Passiflora setacea* diluído ainda congelado em 120 mL de água para totalizar uma bebida de 300 mL. Não houve adição de açúcares ou edulcorantes. As polpas eram retiradas do ultrafreezer instantes antes do seu consumo para diminuir riscos de perdas de compostos bioativos por descongelamento, exposição à luz ou armazenamento à temperatura ambiente (Figura 8). O grupo controle consumiu 300 mL da bebida placebo. As bebidas foram ofertadas em copos escuros com tampa e canudo para os

voluntários e os pesquisadores não detectarem diferenças entre as bebidas. A Figura 8 mostra o preparo do suco de PS, antes de ser servido aos voluntários.



**Figura 8.** Preparação do suco de *Passiflora setacea*.

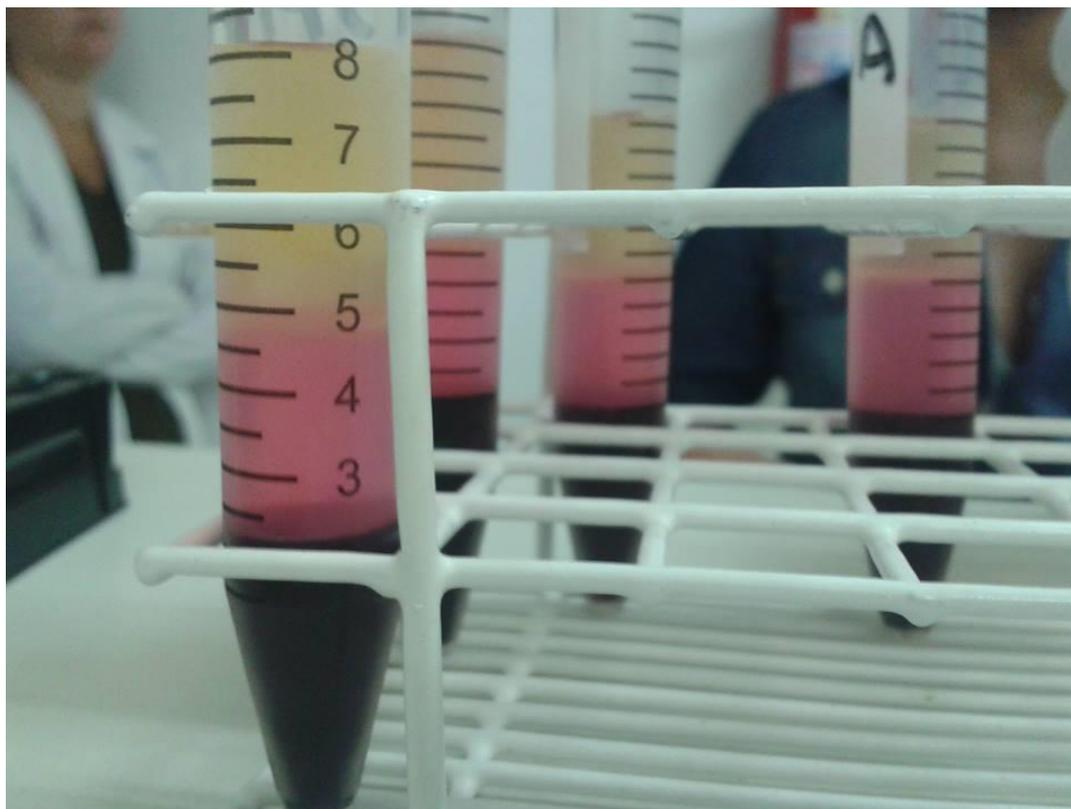
#### **2.3.5.4 Coleta de sangue**

Em jejum, 10 mL de sangue foram coletados em tubo vacutainer com heparina sódica (t0h), após, cada voluntário consumiu um copo de suco com numeração codificada e 10mL de sangue foram coletados 3 h depois (t3h). Foi dedicado uma sala com sofá e televisão para os voluntários durante o período entre as duas coletas. Eles foram instruídos a não realizarem nenhuma atividade física e a consumirem apenas água durante o mesmo período.

#### **2.3.5.5 Separação das células mononucleares (PBMC) do sangue**

Centrifugou-se o sangue a 200 g por 10 minutos a 4°C, separou-se o soro sobrenadante e congelou-se a -80°C. Acrescentou-se o mesmo volume de soro retirado (+/- 3mL) de solução tampão fosfato (STF), pH 7,2, a 4 °C ao precipitado de sangue total, contendo hemácias, leucócitos, plaquetas. Acrescentou-se delicadamente o sangue total sobre o Percoll (densidade 1,077), numa proporção de 3mL de Percoll para 5 mL de sangue. Centrifugou-se a 750 g (3.000 rpm) por 15 minutos a 4°C (Figura 9). Recuperou-se a camada de células mononucleares do sangue PBMC e transferiu-se para outro tubo, ressuspensando em 10mL de STF, pH 7,2, a 4°C e centrifugando a 400 g (2000 rpm) por 10 minutos a 4°C para retirar o Percoll. Desprezou-se, então, o sobrenadante e ressuspensou-se em 10 mL de STF a 4°C e centrifugou-se a 200 g (1000 rpm), por 10 minutos, a 4 °C para retirar as plaquetas. Desprezando-se o sobrenadante,

ressuspendeu-se em 2mL de Meios Roswell Park Memorial Institute RPMI incompleto, ph 7,2 e manteve-se em cuba com gelo até a hora da contagem. Homogeneizou-se delicadamente com pipeta Pasteur, retirou-se 20 $\mu$ L e diluiu-se com 80 $\mu$ L de Nigrosina 0,05% em solução salina tamponada com fosfato (diluição 5) e contou-se em câmara de Neubauer.



**Figura 9.** Sangue com Percoll após centrifugação para separação de células mononucleares (PBMC).

As células totais foram contadas suspendendo as células vivas recuperadas em 2mL de RPMI, de acordo com o seguinte cálculo:

Células totais = média do número de células vivas contadas x volume da suspensão em mL (2) x diluição (5) x 10 (profundidade da câmara de Neubauer) x 1000 (para transformar mm<sup>3</sup> em mL).

Depois calculou-se a porcentagem de recuperação das células (CMN) em relação ao número total de leucócitos no sangue total. Realizou-se um distendido das células separadas em

percoll, fixaram-nas com metanol, coraram-nas com Giemsa 10%, e determinou-se a pureza da preparação.

#### **2.3.5.6 Aderência dos monócitos às lamínulas**

Escolheu-se quantificar monócitos por serem as células de defesa precursoras das outras células fagocíticas, sendo encontradas na circulação (ABBAS, 2011).

O procedimento de aderência foi realizado como passo inicial dos experimentos de quantificação de NO, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, fagocitose e corpúsculos lipídicos.

Nos procedimentos para determinação do NO e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, as células foram colocadas para aderir em placas de cultura de fundo chato com 96 e 24 escavações (TPP – Zellkultur Testplate - Suíça), por 2 horas, a 37°C, em câmara úmida com 5% de CO<sub>2</sub>, e após a lavagem das escavações por 3 vezes com STF estéril, a 37°C, cada protocolo específico foi realizado.

#### **2.3.5.7 Determinação do Óxido Nítrico (NO)**

Como descrito anteriormente, o óxido nítrico é um radical produzido durante a conversão da L-arginina para L-citrulina. A conversão é dada pelo complexo enzimático óxido nítrico sintase (NOS), que se decompõe rapidamente em nitrito e nitrato. A produção do óxido nítrico (NO) pelos monócitos foi avaliada pela quantificação do nitrito no sobrenadante das culturas por meio da reação de Griess (GREEN et al., 1981). Nesta reação, o NO<sub>2</sub><sup>-</sup> reage com a sulfanilamida para produzir um íon diazônio, sendo então ligado ao N-(1-naftil) etilenodiamina, formando um cromóforo com um pico de absorbância em 540 nm (BRYAN; GRISHAM, 2007).

Após o procedimento de adesão descrito no item 2.3.5.6, os fagócitos aderidos foram incubados em triplicata por 24 horas em câmara úmida com 5% de CO<sub>2</sub>, estimulados ou não com 10 ng/mL de lipopolissacarídeo (LPS) em um volume final de 200 µL de RPMI 1640 sem acréscimo de soro fetal bovino, pH 7,2, a 37°C, com 10% de soro fetal bovino contendo 1,5 x 10<sup>5</sup> células para determinação da concentração de nitrito (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) no sobrenadante das culturas dos monócitos circulantes dos voluntários. Para tal, 100 µL do sobrenadante das culturas eram incubados com 100 µL do reagente de Griess (1-N naftiletileno diamina dihidroclorido) a 0,1 %, sulfanilamida a 1% e H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> a 25 % e a reação era lida em espectrofotômetro de placa

(Spectramax plus 384 - Molecular Devices), em 540 nm e os resultados foram expressos como  $\mu\text{M NO}_2$  (MUNIZ- JUNQUEIRA et al., 2005).

O LPS (lipossacarídeo) foi utilizado como estímulo da produção de NO por ser um componente da parede de bactérias gram-negativas (ABBAS, 2011 p. 60), simulando assim, uma infecção bacteriana. O LPS também é ligante dos receptores de fagocitose da resposta imune inata (PEISER; GORDON, 2001; UNDERHILL; GANTNER, 2004).

A curva padrão para análise da produção de óxido nítrico foi elaborada a partir da diluição seriada do nitrito de sódio ( $\text{NaNO}_2$ ) nas diluições de 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, respectivamente, 100  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$ , 25  $\mu\text{M}$ , 12,5  $\mu\text{M}$ , 6,25  $\mu\text{M}$ , 3,12  $\mu\text{M}$  e 1,56  $\mu\text{M}$ , com água destilada, sendo o padrão 0  $\mu\text{M}$  preparado somente com água destilada.

#### **2.3.5.8 Determinação do Peróxido de Hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ )**

Como descrito anteriormente, a produção de peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) foi avaliada pela microtécnica de oxidação do vermelho fenol na presença de peroxidase (PICK; KEISARI, 1980) que catalisa a oxidação do vermelho de fenol pelo  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Esta reação origina um composto de cor amarela que, juntamente com a elevação do pH do meio a 12,5, adquire uma coloração violeta, absorvendo em 620 nm e permitindo, então, determinar a concentração de  $\text{H}_2\text{O}_2$  produzida por macrófagos ativados em cultura de células (ALMEIDA et al., 2005).

Após aderência dos monócitos e lavagem para retirada das células não aderentes (item 2.3.5.6) as células foram incubadas, em triplicata, em câmara úmida com 5% de  $\text{CO}_2$ , a 37°C por 60 min, em 140  $\mu\text{L}$  de uma solução contendo 5,5 mM de dextrose, 0,5 mM de vermelho de fenol (sal de sulfonftaleína de fenol) e 19 U/mL de peroxidase do tipo II RZ 1.3 (HRPO – *Amoracia rusticana* tipo II, sal contendo 148 purpurogalina/mg) (Vasconcelos, 2010). A reação foi interrompida com 10  $\mu\text{L}$  NaOH 1 N, em seguida a leitura foi feita em espectrofotômetro de placa (SpectraMax plus 384 – Molecular Devices) em comprimento de onda de 620 nm, e expressa em  $\mu\text{M H}_2\text{O}_2/1.5 \times 10^5$  macrófagos  $\text{h}^{-1}$ .

Os poços foram testados em duas situações, com ou sem acetato de miristato de forbol (PMA), um ativador da NADPH oxidase que aumenta a produção do radical intracelularmente (KARLSSON; NIXON; MCPHAIL, 2000), na concentração de 1  $\mu\text{g/mL}$  (Figura 10).



**Figura 10.** Placa de 96 escavações para determinação da produção de  $H_2O_2$  estado basal ou estimulado por PMA em espectofotômetro.

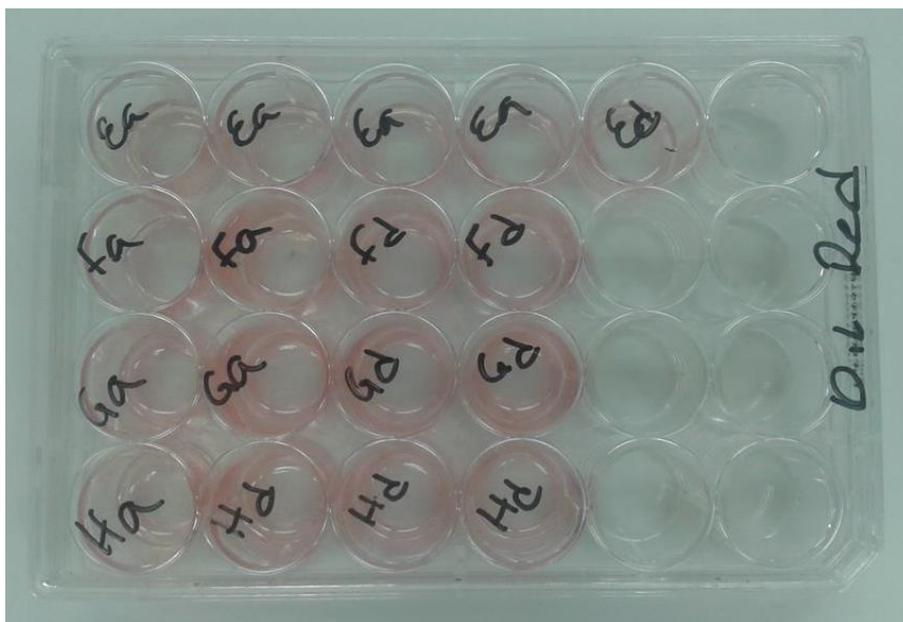
Uma curva padrão para a determinação de peróxido de hidrogênio foi acrescentada na placa, sendo preparada a partir de uma solução estoque de  $H_2O_2$  (Sigma) na concentração de 10 nM diluída seriadamente nas diluições de 1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600, 1:3200 e 1:6400, respectivamente, 100  $\mu M$ , 50  $\mu M$ , 25  $\mu M$ , 12,5  $\mu M$ , 6,25  $\mu M$ , 3,12  $\mu M$  e 1,56  $\mu M$  de vermelho de fenol acrescido de peroxidase tipo II (19 U/mL). O padrão 0  $\mu M$  foi preparado com a mesma solução de vermelho de fenol, porém, sem peroxidase. A curva foi distribuída em triplicata na placa de 96 escavações, logo após a última incubação dos macrófagos e anteriormente ao acréscimo do hidróxido de sódio 1 N.

### 2.3.5.9 Quantificação dos corpúsculos lipídicos (CL)

A presença de corpúsculos lipídicos foi avaliada no citoplasma dos monócitos por marcação citoquímica com óleo vermelho O (Oil- Red-O). Além do estado basal, os monócitos foram estimulados por LPS - o procedimento de preparo e suspensão de leveduras é descrito no item “2.3.5.10”.

Após o passo de adesão e lavagem (item 2.3.5.6) as células foram fixadas com paraformaldeído a 4% por 30 minutos e lavadas 2 vezes com STF, pH 7,2 e uma vez com álcool isopropílico a 60%. Em seguida, as células foram coradas por 15 minutos com uma solução de óleo vermelho filtrada 3 vezes em filtro 0,22  $\mu\text{m}$  e preparada no momento do uso a partir de uma solução estoque de 0,5% (2 partes da solução estoque para 3 partes de água destilada).

O excesso de corante foi retirado e as escavações foram lavadas uma vez com 1 mL de álcool isopropílico a 60% e depois duas vezes com 1 mL de água destilada (Figura 11). Os núcleos celulares foram corados com hematoxilina de Mayer por 5 minutos, lavadas novamente com água destilada e as lamínulas foram montadas sobre lâminas de vidro com uma fina camada de meio de montagem contendo 10 g de gelatina, 60 mL de água destilada, 70 mL de glicerol e 0,25 g de fenol.



**Figura 11.** Placa de 24 escavações com células aderidas após lavagem com álcool isopropílico e água destilada para posterior análise em microscópio.

O procedimento de coloração dos corpúsculos lipídicos com óleo vermelho foi realizado em duplicata para cada voluntário. Para cada lamínula contada, foram estabelecidas a quantidade média de corpúsculos dentro dos monócitos (MCL), a porcentagem de macrófagos apresentando corpúsculos lipídicos no citoplasma (MØ%) e o índice corpuscular (IC) que é a expressão da MCL multiplicada pelo MØ% :

$$\text{IC} = \text{média de corpúsculos dentro dos monócitos (MCL)} \\ \times \\ \text{Monócitos com corpúsculos lipídicos no citoplasma (MØ \%)}$$

#### **2.3.5.10 Teste da capacidade fagocitária**

Para o preparo das leveduras, 200 µL de leveduras foram obtidos do estoque em um eppendorf, lavaram-se por centrifugação a 3.000 rpm por 10 minutos 3 vezes em microcentrífuga, ou seja, descartou-se o sobrenadante e acrescentou-se 1mL de STF a cada vez. Ressuspendeu-se o decantado em 500 µL de Hanks Triz. Colocaram-se 20 µL em 980 µL de STF (diluição 1:50) para contagem em câmara de Neubauer nos 4 quadrados da periferia e no quadrado central da área destinada a contagem de eritrócitos (central).

O número (n) de leveduras presentes na suspensão de 500 µL foi calculado da seguinte maneira:

$$n = \text{soma do n}^\circ \text{ de leveduras contadas nos 5 quadrados} \times 5 \times \text{volume (em mL)} \times \text{diluição} \times 10 \times \\ 1000. \text{ (contado no retículo para eritrócitos).}$$

As suspensões contendo 62500 leveduras / 20 µL e 250 000 leveduras / 20 µL foram então preparadas. Para as leveduras sensibilizadas (Sens), após a ressuspensão das leveduras em 500 µL de Hanks Triz, incubou-se previamente 250 µL da suspensão de leveduras com o pool de soro humano a 20% por 30 minutos em banho Maria a 37°C e lavou-se a suspensão três vezes em microcentrífuga .

As PBMC dos voluntários foram obtidas por centrifugação por meio de uma almofada de Percoll (Pharmacia, Uppsala, Suécia), densidade de 1,077, a 750 g durante 10 min a 4 °C, seguido por duas lavagens em 400 e 200 g, e suspensas em meio RPMI 1640 frio (Sigma, St. Louis, MO), pH 7,2, suplementado com HEPES a 20 mM (Sigma), glutamina 2 mM (Sigma), e 2,5 mg / dL de gentamicina. A viabilidade foi avaliada com solução nigrosina 0,05% em 0,15 M de STF, pH 7,2, e foi sempre superior a 97%.

A fagocitose de *Saccharomyces cerevisiae* foi testada individualmente em duplicata para cada indivíduo por um método adaptado, como descrito por MUNIZ-JUNQUEIRA, SANTOS-NETO & TOSTA (2001). Resumidamente,  $2 \times 10^5$  células/500 µL foram colocadas em lamínulas de vidro redondas de 13 mm de diâmetro em placas de 24 escavações e foram incubadas com  $10^6$  de *S. cerevisiae* por escavação e suspensas em RPMI 1640 (Sigma), pH 7,2 a 4 °C suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado (Gibco) durante 30 minutos a 37 °C em 5% de CO<sub>2</sub> em ar.

As lamínulas foram então lavadas três vezes com STF a 37 °C para eliminar *S. cerevisiae* não fagocitadas, adicionou-se 400 µL de RPMI 1640, pH 7,2 (Gibco) com 20% de SFB e depois, secas com ar quente. Após, elas foram fixadas com metanol absoluto e coradas com solução de Giemsa tamponada a 10%. O número de *S. cerevisiae* que estavam aderidas às lamínulas ou que foram ingeridas por 200 monócitos nas preparações individuais, em duplicata para cada amostra, foi avaliado por microscopia óptica e a fonte da preparação foi revelada no final da avaliação. Campos microscópicos foram aleatoriamente selecionados de todo o slide e todos os monócitos em cada campo microscópico especial foram examinados.

O estudo foi realizado em duplicata. O índice fagocitário (IF) foi calculado como o número médio de partículas de *S. cerevisiae* aderidas ou ingeridas por fagócito multiplicado pela porcentagem destas células envolvidas na fagocitose (MUNIZ-JUNQUEIRA; SANTOS-NETO; TOSTA, 2001) :

$$\text{IF} = \text{média leveduras fagocitadas (Lev)} \times \text{monócitos envolvidos na fagocitose (MØ \%)}$$

### 2.3.6 Estatística

Os dados foram analisados previamente para normalidade das amostras pelos testes Kolmogorov-Smirnov e D'Agostino e Pearson. Os valores *outliers* foram calculados por teste de Tukey e excluídos das análises. Para dois grupos independentes foram aplicados o teste t-student pareado para amostras que tiveram distribuição normal e teste t-student de Wilcoxon para as que não tiveram distribuição normal. Os valores descritivos foram expressos em média  $\pm$  DP corrigido.

As diferenças entre as variáveis comparadas foram consideradas estatisticamente significantes quando a probabilidade bi-caudal da sua ocorrência devida ao acaso (erro tipo I) foi menor que 5% ( $p < 0,05$ ). As análises e os gráficos foram realizados empregando-se o software Graphpad Prism 6 para Mac (GraphPad Software – San Diego, EUA).

### **CAPÍTULO 3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO**

## CAPÍTULO 3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1 Caracterização da bebida placebo (PB) vs suco de passiflora (PS)

A bebida placebo (PB) foi selecionada para ter a cor, aroma e sabor de suco de maracujá, porém sem conter nenhum fruto na sua lista de ingredientes, além de ter a quantidade de carboidratos similar com o suco PS, pelo fato de ser o macronutriente predominante no suco de frutas (NEPA, 2011). Para isso, foi utilizada a bebida isotônica Gatorade® sabor maracujá em diluição de 1/3 em água.

A Tabela 1 apresenta as informações nutricionais presentes em 100mL na bebida placebo (fornecidas pelo fabricante na embalagem) comparadas com 150g de polpa de *P. setacea*.

**Tabela 1.** Informações nutricionais da bebida placebo (100mL) e da polpa de *P. setacea* (150g).

	Polpa fresca de		Bebida placebo	
	<i>Passiflora setacea</i> (150g)	FONTE	(100mL)	FONTE
<b>Carboidratos</b>	4,13 g	VIEIRA (2013)	6,00	Fabricante
<b>Açúcares</b>	4,13g	VIEIRA (2013)	3,50	Fabricante
<b>Potássio</b>	1898,36 mg	VIEIRA (2010)	14,00	Fabricante
<b>Sódio</b>	5,24	VIEIRA (2010)	49,50	Fabricante
<b>Fibras totais</b>	2,25 g	CPAC (2013)	**	Fabricante

\*\* Valores não significativos

A Tabela 2 informa os valores de fenólicos totais, vitamina C e atividade antioxidante por DPPH das polpas do lote utilizado no atual experimento. Esses valores são dados pessoais da Embrapa Cerrados (2015) ainda não publicados.

**Tabela 2.** Informações adicionais da caracterização físico-química da polpa de *Passiflora setacea*

<b>Análises</b>	<b>mg /100g de polpa</b>	<b>mg /150g de polpa</b>
Fenólicos totais	95,00	142,50
Vitamina C	66,32	99,48
Atividade antioxidante (DPPH) – <b>mg de trolox</b>	18,55	27,83

Dados pessoais. EMBRAPA CERRADOS (2015).

### 3.2 Consumo agudo

O período de avaliação de 3 h entre as duas coletas foi assim determinado, pois compostos fenólicos têm sido detectados no plasma humano em uma a sete horas após o consumo do fruto rico no composto, aproximadamente (MANACH et al., 2005). Em experimentos observacionais da Rede PASSITEC, Embrapa Cerrados, foi relatado efeito *antistress* e sono em indivíduos diagnosticados com stress 1h30 após consumo de três frutos de *Passiflora setacea* (cerca de 50g). Também em um estudo experimental, foi verificado a diminuição da adesão de monócitos a células endoteliais estimuladas pelo soro de voluntários (n=3) coletado 3 h após consumo de 150g de polpa de *Passiflora setacea* em jejum (dados não publicados).

### 3.3 Avaliação nutricional dos voluntários

A Tabela 3 mostra as medidas antropométricas realizado com os voluntários e informação de nível de atividade física. Nota-se que 10% da amostra está eutrófica, 80% com em sobrepeso, e 10% com obesidade grau I, de acordo com a classificação de IMC (WHO, 2000). Quanto ao percentual de massa gorda, a distribuição foi uniforme em todas as classificações: 10% “bom”, 20% “acima da média”, 20% “média”, 20% “acima da média”, 20% “ruim e 10% “muito ruim”. Mais da metade da amostra (60%) está com o risco de desenvolver DCV (circunferência abdominal >94cm), de acordo com Lean, Han, Morrison (1995). Apenas 20% são ativos A, ou seja, cumprem as recomendações de 3 dias de atividade física vigorosa ou 5 dias de atividade física moderada, de acordo com a classificação do IPAQ (RZEWNICKI; AUWEELE; BOURDEAUDHUIJ, 2002).

**Tabela 3.** Medidas antropométricas da avaliação nutricional e nível de atividade física dos voluntários da pesquisa.

Voluntário	Idade	Altura	Peso	IMC (kg/m <sup>2</sup> )	Classificação (WHO, 2000)	% massa gorda	Classificação (POLLOCK & WILMORE, 1993)	Circ. Abdm.	Nível de atividade física (IPAQ)
1	54	1,67	72,1	25,9	sobrepeso	26,32	Abaixo da média	88	Sedentário
2	47	1,74	76,9	25,4	sobrepeso	20,86	Bom	95	Sedentário
3	41	1,735	83,5	27,7	sobrepeso	27,83	Ruim	100,5	Sedentário
4	45	1,72	88	29,7	sobrepeso	32,35	Muito ruim	94,7	Sedentário
5	54	1,73	80,4	26,9	sobrepeso	30,06	Ruim	90	Ativo
6	62	1,75	82,7	27	sobrepeso	24,66	Média	96,5	Sedentário
7	53	1,745	80,6	26,5	sobrepeso	29,85	Ruim	94,8	Sedentário
8	42	1,68	87	30,8	obesidade grau I	23,36	Média	99,5	Sedentário
9	52	1,705	72	24,8	eutrófico	23,34	Acima da média	92,5	Sedentário
10	49	1,7	80	27,7	sobrepeso	22,63	Abaixo da média	89	Ativo
<b>média</b>	<b>49,45</b>	<b>1,72</b>	<b>80,32</b>	<b>27,40</b>	<b>sobrepeso</b>	<b>26,11</b>	<b>Acima da média</b>	<b>94,72</b>	<b>Sedentário</b>
<b>DP (±)</b>	<b>6,62</b>	<b>0,03</b>	<b>5,46</b>	<b>1,91</b>	<b>-</b>	<b>4,01</b>	<b>-</b>	<b>3,86</b>	<b>-</b>

### 3.4 ÓXIDO NÍTRICO

A produção de óxido nítrico (NO) por monócitos de indivíduos com sobrepeso, incubados por 24 horas, estimulados ou não por LPS, foi avaliada no sobrenadante de cultivos utilizando-se o reagente de Greiss. As Tabelas 4 e 5 mostram os valores de média, desvio-padrão, mediana, mínimo e máximo e valor de p da produção de  $\text{NO}_2^-$  ( $\mu\text{M}$ ) em cada grupo (PB e PS) e condição (Basal e LPS) antes (t0h) e após (t3h) o consumo do suco de PS e placebo (PB).

**Tabela 4.** Quantificação do nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) no sobrenadante das culturas com estímulo basal dos monócitos circulantes dos voluntários após consumo de bebida placebo (PB) e suco *Passiflora setacea* (PS).

Grupos	Nitrito ( $\mu\text{M NO}_2^-$ ) –			
	Condição Basal			
	n	Média (DP)	Mediana	Extremos
PB 0h	8	21,48 (5,67)	21,35	6,27 – 37,06
PB 3h	8	26,88 (8,91)	21,66	5,96 – 76,50
PS 0h	9	28,01 (5,56)	35,95	5,49 - 44,96
PS 3h	9	27,64 (4,60)	37,53	6,33 – 40,58

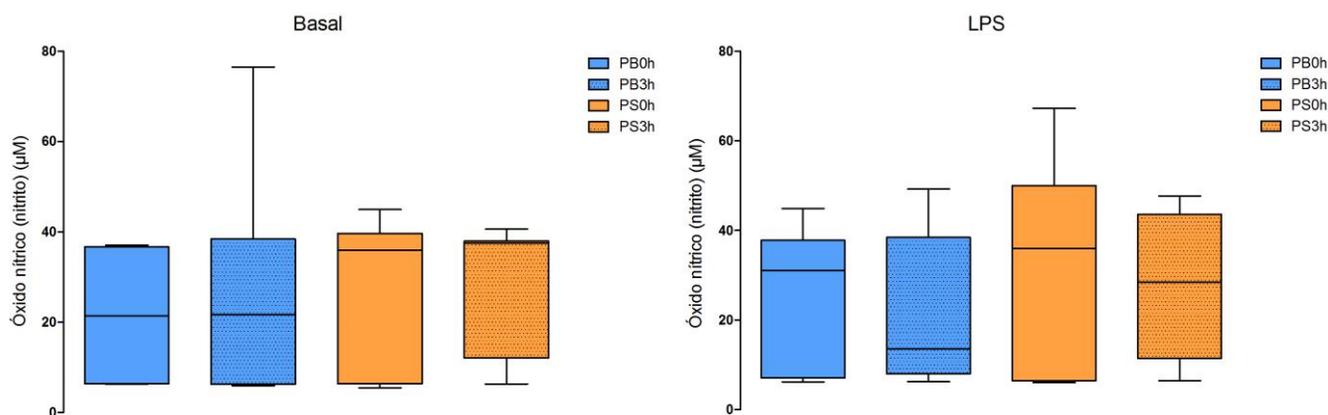
A quantificação foi feita em espectrofotômetro de placa (Spectramax plus 384 - Molecular Devices), em 540 nm. Segundo o teste t pareado não-paramétrico: PB0h-PB3h:  $p=0,31$ ; PS0h-PS3h:  $p=0,65$ ; PB0h-PS0h:  $p= 0,48$ ; PB3h-PS3h:  $p=0,61$ . Não houve diferença estatística.

**Tabela 5.** Quantificação do nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) no sobrenadante das culturas com estímulo por LPS dos monócitos circulantes dos voluntários após consumo de bebida placebo (PB) e suco *Passiflora setacea* (PS).

Grupos	Nitrito ( $\mu\text{M NO}_2^-$ ) –			
	Estimulo por LPS			
	n	Média (DP)	Mediana	Extremos
PB 0h	8	25,42 (5,62)	31,05	6,17 – 44,86
PB 3h	7	23,39 (6,69)	13,55	6,22 – 49,19
PS 0h	9	30,64 (7,85)	35,97	6,04 – 67,23
PS 3h	9	27,63 (5,87)	28,39	6,44 – 47,72

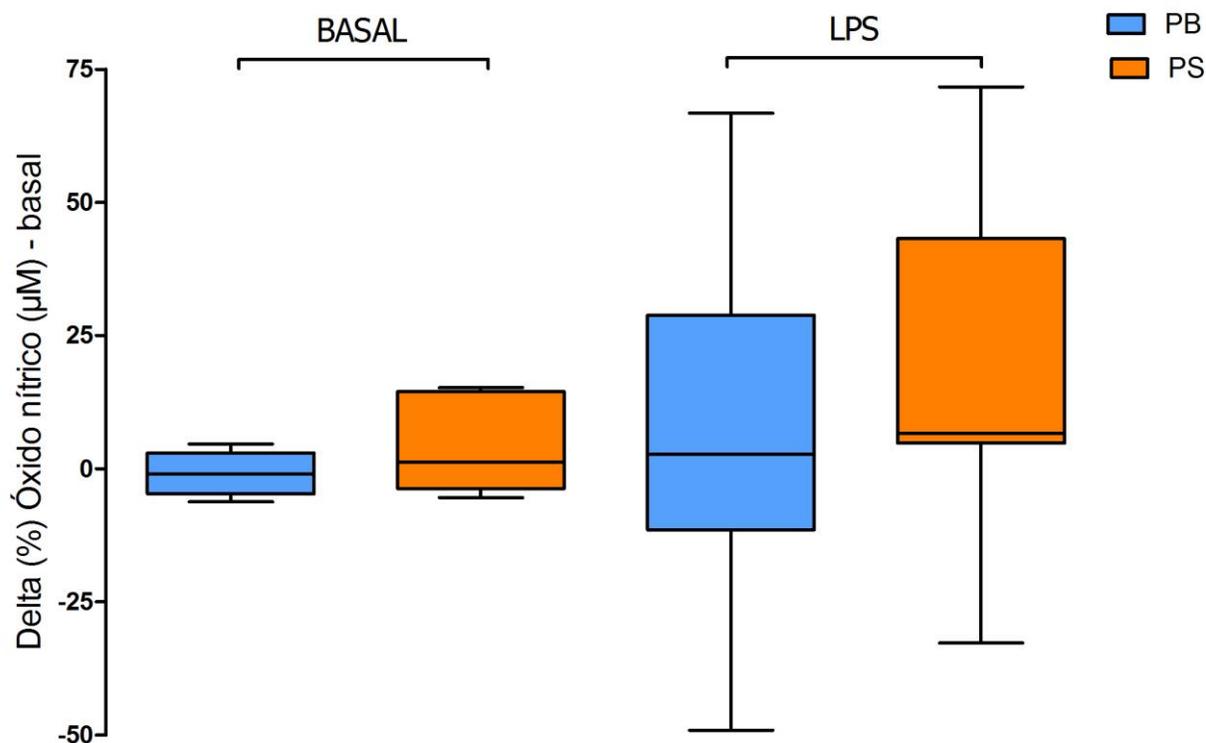
A quantificação foi feita em espectrofotômetro de placa (Spectramax plus 384 - Molecular Devices), em 540 nm. Segundo o teste t pareado paramétrico: PB0h-PB3h:  $p=0,80$ ; PS0h-PS3h:  $p=0,79$ ; PB0h-PS0h:  $p=0,60$ ; PB3h-PS3h:  $p=0,64$ . Não houve diferença estatística.

Na condição basal (Tabela 4), os valores não apresentaram distribuição normal. Foi detectado um aumento não significativo da mediana na produção de NO nos monócitos dos indivíduos após o consumo de suco de PS, diferentemente da produção após o consumo do PB, que se manteve praticamente inalterada. Já na condição estimulada por LPS, que simula uma infecção bacteriana (Tabela 5), os valores apresentam uma distribuição normal e observou-se uma diminuição não-significativa da produção de NO após o suco de PS e o PB. Ou seja, o suco de PS manteve a produção de  $\text{NO}_2^-$  no indivíduo durante as 3 h, assim como a bebida placebo (Basal  $p=0,31$ ; LPS  $p=0,64$ ). Isso indica também que o placebo está atuando como tal, pois não afetou a produção de NO em nenhuma condição, como visto na Figura 12.



**Figura 12.** Efeito agudo do consumo de suco de *Passiflora setacea* na produção de óxido nítrico (nitrito) por monócitos de voluntários com sobrepeso ( $n=10$ ). 100  $\mu\text{L}$  do sobrenadante de monócitos obtidos por aderência ( $1,5 \times 10^5$  células/escavação) foram incubados por 24h com 100  $\mu\text{L}$  do reagente de Griess estimulados ou não com 10 ng/mL de lipopolissacarídeo (LPS). A reação foi lida em espectrofotômetro de placa (Spectramax plus 384 - Molecular Devices), em 540 nm e os resultados foram expressos como  $\mu\text{M NO}_2$ . Os resultados, analisados pelo teste t pareado não-paramétrico (teste de Wilcoxon), mostraram que não houve diferença estatística entre os grupos PS e PB e as condições basal e estímulo por LPS ( $p>0,05$ ). Estão representadas medianas e desvios padrão.

Quanto ao percentual de variação da resposta intrapessoal (% delta) da produção de NO, houve aumento da média tanto na situação basal (PB = -0,88; PS = 3,90), quanto na estimulada por LPS (PB = 6,71; PS = 17,68). Porém, também não foi detectada diferença estatística (Figura 13).



**Figura 13.** Variação intrapessoal (delta %) do efeito do consumo de suco de *Passiflora setacea* na produção de óxido nítrico (nitrito) por monócitos de voluntários com sobrepeso (n=10). Os resultados, analisados pelo teste t não-pareado (teste de Mann-Whitney), mostraram que não houve diferença estatística nos tratamentos basal (p=0,59) e LPS (p=0,40). Estão representadas medianas e desvios padrão.

O NO é uma ERN importante na homeostase do corpo devido à sua ação vasodilatadora, inibidora da ativação de células endoteliais, dentre outras (DUSSE et al., 2005), mas que ao mesmo tempo, pode ser tóxica por ser precursora de várias espécies reativas que podem gerar estresse oxidativo e danos às estruturas celulares (MARTÍNEZ e ANDRIANTSITOHAINA, 2009).

A falta de variação da produção de NO entre as 3 h pode ser explicada pela diferença de resposta em cada indivíduo. Por exemplo, o voluntário 3 teve a produção basal de  $\text{NO}_2^-$  diminuída de 6,35  $\mu\text{M}$

(t0h) para 5,96  $\mu\text{M}$  (t3h) após o consumo do suco de PS. Em contrapartida, a produção basal do voluntário 8 no início do experimento estava em 36,12  $\mu\text{M}$  (t0h) e aumentou para 76,50  $\mu\text{M}$  (t3h) após o suco de PS (Anexo 2). Essa grande variação de valores iniciais e finais torna muito difícil achar algum tipo de distribuição normal, sendo necessário um n amostral maior.

Para a produção efetiva de NO, são necessários modulações das etapas prévias da via metabólica desse radical, como fosforilação de proteínas, expressão/atividade de NOS (óxido nítrico sintase), inibição da expressão/atividade de NOX (óxidos de nitrogênio) e modulação de enzimas e receptores associados à produção de NO (GALLEANO; PECHANOVA; FRAGA, 2010).

O extrato de folha de groselha, ativou a fosforilação de proteínas relacionadas com o aumento da atividade da enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS). Porém, o extrato não causou mudança no teste de interação plaquetária com as células endoteliais da veia umbilical humana (HUVEC), que seria possível com o aumento efetivo da produção de NO (LUZAK et al., 2014).

Assim sendo, seria necessário acrescentar mais um nível na variável tempo (t6h, por exemplo) para avaliar se o suco de PS afetou alguma etapa prévia da via metabólica da produção desse radical. O estudo de Coles & Clifton (2012) corrobora a hipótese, quando o suco de beterraba, rico em nitrito ( $\text{NO}_3^-$ ), consumido uma única vez, causou diminuição da pressão arterial sistólica em homens 6 h após o seu consumo, quando comparado a uma bebida placebo.

Ou então, avaliar o consumo crônico do suco de PS possa gerar mais evidências científicas, como na coorte de um ano com 200 voluntários com alto risco cardiovascular que consumiram dieta mediterrânea rica em compostos fenólicos e verificaram o aumento de NO plasmático em comparação ao grupo placebo (MEDINA-REMÓN et al., 2015).

Outros estudos têm demonstrado a ação dos compostos fenólicos na produção direta ou indireta de NO em células, como a epigalocatequina-3-galato (EGCG) e a curcumina que diminuíram a produção de NO após serem expostas diretamente a células estaminais mesenquimais humanas (hMSCs) (YAGI; TAN; TUAN, 2013) e outros compostos que geraram aumento da expressão/atividade de eNOS em células expostas (WALLERATH et al., 2002; LEIKERT et al., 2002; WALLERATH et al., 2003; NDIAYE et al., 2005; NICHOLSON; TUCKER; BRAMELD, 2008; EDIRISINGHE et al., 2011). A limitação é que resultados de estudos *in vitro* nos quais se expõem células aos compostos puros

encontrados nos frutos não se assemelham às respostas em condições fisiológicas *in vivo*, como no presente estudo.

### 3.5 PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO

A produção de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) por monócitos de indivíduos com sobrepeso, incubados por uma hora, estimulados ou não por acetato de forbol miristato (PMA), foi avaliada no sobrenadante de cultivos utilizando-se a microtécnica de oxidação de vermelho de fenol. As Tabelas 6 e 7 mostram os valores de média, desvio-padrão, mediana, mínimo e máximo e valor de p da produção de  $H_2O_2$  ( $\mu M$ ) em cada grupo (PB e PS) e condição (Basal e PMA) antes (t0h) e após (t3h) o consumo do suco de PS e placebo (PB).

**Tabela 6.** Quantificação do peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) no sobrenadante das culturas com estímulo basal dos monócitos circulantes dos voluntários após consumo de bebida placebo (PB) e suco de *Passiflora setacea* (PS).

Peróxido de hidrogênio ( $\mu M H_2O_2$ ) –				
Condição Basal				
Grupos	n	Média (DP)	Mediana	Extremos
PB 0h	7	1,41 (0,13)	1,22	1,12 – 1,94
PB 3h	7	1,75 (0,32)	1,17	1,12 – 3,15
PS 0h	8	1,43 (0,14)	1,20	1,12 – 2,04
PS 3h	7	1,30 (0,09)	1,17	1,09 – 1,73

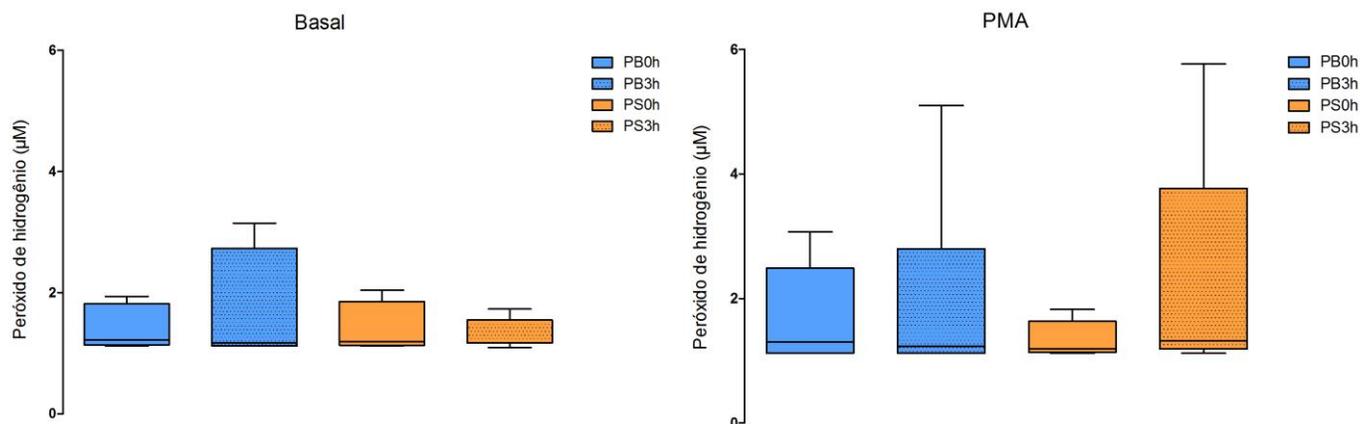
A quantificação foi feita em espectrofotômetro de placa (Spectramax plus 384 - Molecular Devices), em 620 nm. Segundo o teste t pareado não-paramétrico: PB0h-PB3h:  $p=0,22$ ; PS0h-PS3h:  $p=0,34$ ; PB0h-PS0h:  $p=0,95$ ; PB3h-PS3h:  $p=0,70$ . Não houve diferença estatística.

**Tabela 7.** Quantificação do peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) no sobrenadante das culturas com estímulo por PMA dos monócitos circulantes dos voluntários após consumo de bebida placebo (PB) e suco de *Passiflora setacea* (PS).

Grupos	Peróxido de hidrogênio ( $\mu M H_2O_2$ ) –			
	Estímulo por PMA			
	n	Média (DP)	Mediana	Extremos
PB 0h	8	1,67 (0,29)	1,31	1,12 – 3,07
PB 3h	8	1,96 (0,52)	1,23	1,12 – 5,10
PS 0h	8	1,36 (0,10)	1,19	1,12 - 1,82
PS 3h	9	2,32 (0,65)	1,32	1,12 – 5,76

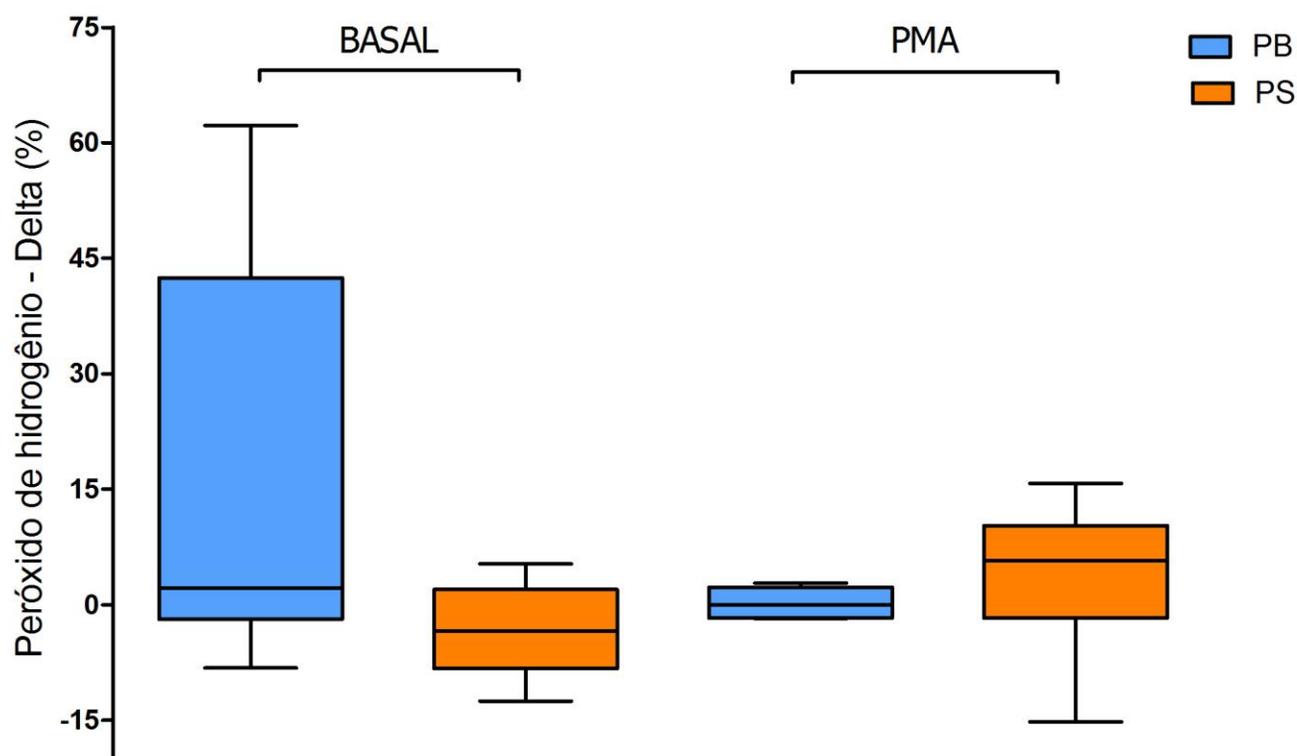
A quantificação foi feita em espectrofotômetro de placa (Spectramax plus 384 - Molecular Devices), em 620 nm. Segundo o teste t pareado não-paramétrico: PB0h-PB3h:  $p=0,63$ ; PS0h-PS3h:  $p=0,51$ ; PB0h-PS0h:  $p=0,81$ ; PB3h-PS3h:  $p=0,67$ . Não houve diferença estatística.

Na condição basal (Tabela 6), os valores do efeito agudo (análise pareada) não apresentaram distribuição normal. A mediana da produção de  $H_2O_2$  diminuiu de forma igual após o consumo do suco de PS e o PB, sem diferenças estatísticas. A mediana na condição estimulada por PMA diminuiu após o consumo do PB e aumentou após o suco de PS, porém, em ambas, não foi detectada diferença estatística (Figura 14). Sendo assim, o suco de PS manteve a produção de  $H_2O_2$  no indivíduo durante as 3 h (Basal  $p=0,34$ ; PMA  $p=0,51$ ), assim como a bebida placebo (Basal  $p=0,22$ ; PMA  $p=0,63$ ).



**Figura 14.** Efeito agudo do consumo de suco de *Passiflora setacea* na produção de peróxido de hidrogênio por monócitos de voluntários com sobrepeso (n=10). As células foram incubadas com ou sem PMA (miristato de forbol), em câmara úmida com 5% de  $CO_2$ , a 37°C por 60 min, em 140  $\mu L$  de uma solução contendo 5,5 mM de dextrose, 0,5 mM de vermelho de fenol (sal de sulfonftaleína de fenol) e 19 U/mL de peroxidase do tipo II RZ 1.3 (HRPO – Amoracia rusticana tipo II, sal contendo 148 purpurogalina/mg). A reação foi interrompida com 10  $\mu L$  NaOH 1N, em seguida, lida em espectrofotômetro de placa (SpectraMax plus 384 – Molecular Devices), em 620 nm e os resultados foram expressos em  $\mu M$   $H_2O_2/1.5 \times 10^5$  macrófagos  $h^{-1}$ . Os resultados, analisados pelo teste t pareado não-paramétrico (teste de Wilcoxon), mostraram que não houve diferença estatística entre as condições e os tratamentos ( $p > 0,05$ ). Estão representadas medianas e desvios padrão.

A Figura 15, representando a variação intrapessoal dos indivíduos (delta %) da produção de  $H_2O_2$ , mostra que houve diminuição da média na situação basal (PB = 15,49; PS = -3,46), apresentando um valor de  $p=0,07$ . Já na condição estimulada por PMA, houve aumento da mediana (PB = 0,89; PS = 6,25), porém, sem diferença estatística detectada. Assim, apesar do gráfico apresentar uma tendência de diminuição da produção de  $H_2O_2$  com as células na condição basal (sem estímulos) após o consumo de suco de PS, não houve diferença estatística para sustentar o dado.



**Figura 15.** Variação intrapessoal (delta %) do efeito do consumo de suco de *Passiflora setacea* na produção de peróxido de hidrogênio por monócitos de voluntários com sobrepeso (n=10). Os resultados, analisados pelo teste t não-pareado (teste de Mann-Whitney), mostraram que não houve diferença estatística entre as condições basal (p=0,09) e PMA (p=0,30). Estão representadas medianas e desvios padrão.

O peróxido de hidrogênio é um radical livre de oxigênio extremamente reativo (FERREIRA & MATSUBARA, 1997; COMHAIR & ERZURUM, 2002) capaz de atravessar camadas lipídicas, romper a coluna do DNA, induzir alterações cromossômicas (OLSZEWER, 1995) e sua produção desequilibrada pode gerar desenvolvimento de DCNT. A tendência detectada na diminuição do delta (%) da produção de  $H_2O_2$  (situação basal) após o consumo do suco de PS (p=0,07) pode sugerir uma possível ação redutora de danos celulares em indivíduos pró-inflamatórios. Porém, seria necessário um n amostral maior para confirmação.

Estudos como este, que avaliam a ação de CF na produção de  $H_2O_2$  *in vivo* são escassos. Estudos *in vitro* tem mostrado correlações entre a ação dos CF na diminuição da produção desse radical, como a epigallocatequina-3-galato (EGCG) e a curcumina em células estaminais mesenquimais humanas

(hMSCs) (YAGI; TAN; TUAN, 2013) e o extrato de folha de oliveira e seu composto isolado, oleuropeína, em células  $\beta$  do pâncreas (CUMAOGU et al., 2011).

Outros estudos também *in vitro*, detectaram o aumento benéfico do peróxido de hidrogênio em células causado por CF, como a EGCG em células tumorais (LIN et al., 1999; ROY et al., 2003; YANG et al., 2000; ZHU et al., 2000; HONG et al., 2002) e o extrato de suco de maçã em células de adenocarcinoma de cólon humano (*HT-29*) (BELLION et al., 2009).

Foi visto que os CF presentes em frutos podem diminuir a produção de  $H_2O_2$  em células saudáveis, mas que também podem estimular a sua produção em células cancerígenas induzindo a citotoxicidade e a apoptose nessas células. A maioria dos estudos *in vitro* utiliza as formas puras encontradas em frutos e expõe as células a altas concentrações desses compostos, gerando efeitos e resultados não-fisiológicos. São escassos os estudos sobre o efeito dos CF sobre a produção do radical  $H_2O_2$  em seres humanos, como o atual estudo. Foi possível detectar uma possível tendência do efeito do suco PS na diminuição da produção de peróxido de hidrogênio em voluntários com sobrepeso após uma única intervenção aguda. Porém, um n amostral maior, um segundo ponto temporal de análise (t6h, por exemplo) e um consumo crônico são variáveis necessárias para comprovar o efeito do suco *in vivo*.

### **3.6 Quantificação de Corpúsculos lipídicos (CL)**

A presença de CL foi avaliada no citoplasma dos monócitos por marcação citoquímica com óleo vermelho O (Oil- Red-O), na condição basal e estimulada por LPS. Por essa metodologia, os corpúsculos lipídicos se apresentam como estruturas circulares que se coram em vermelho no citoplasma dos monócitos, como visto na Figura 18 (p. 76).

Avaliou-se a proporção de monócitos com CL no citoplasma (MO%), a média de CL presentes nos citoplasma dos monócitos (MCL) e o índice corpuscular (IC) obtido pelo cálculo  $MO\% \times CL$ .

### 3.6.1 Monócitos com corpúsculos lipídicos no citoplasma (MO%)

As Tabelas 8 e 9 mostram os valores de média, desvio-padrão, mediana, mínimo e máximo e valor de p de monócitos expressando CL no citoplasma em cada grupo (PB e PS) e condição (Basal e LPS) antes (t0h) e após (t3h) o consumo do suco de PS e placebo (PB).

**Tabela 8.** Quantificação da média de monócitos circulantes dos voluntários após consumo de bebida placebo (PB) e suco *Passiflora setacea* (PS) com CL no citoplasma (MO%) na condição basal.

Grupos	Monócitos com corpúsculos lipídicos no citoplasma (MO%) – Condição basal			
	n	Média (DP)	Mediana	Extremos
PB 0h	8	19,50 (3,51)	19,66	4,25 – 34,04
PB 3h	7	16,08 (3,77)	16,29	2,43 – 35,00
PS 0h	8	19,18 (4,66)	17,81	1,62 – 39,04
PS 3h	9	16,08 (2,72)	12,50	4,08 – 28,91

A contagem foi feita em microscopia óptica com campos aleatoriamente selecionados de todo o slide. Segundo o teste t pareado paramétrico: PB0h-PB3h:  $p=0,42$ ; PS0h-PS3h:  $p=0,72$ ; PB0h-PS0h:  $p=1,00$ ; PB3h-PS3h:  $p=0,96$ . Não houve diferença estatística.

**Tabela 9.** Quantificação da média de monócitos circulantes dos voluntários após consumo de bebida placebo (PB) e suco *Passiflora setacea* (PS) com CL no citoplasma (MO%) na condição estimulada por LPS.

Grupos	Monócitos com corpúsculos lipídicos no citoplasma (MO%) – Estímulo por LPS			
	n	Média (DP)	Mediana	Extremos
PB 0h	8	22,12 (5,99)	12,63	8,17 – 49,75
PB 3h	8	24,76 (10,69)	12,81	1,06 – 81,50
PS 0h	8	11,94 (1,19)	11,99	7,04 – 18,38
PS 3h	9	16,78 (4,34)	15,75	0,00 – 39,00

A contagem foi feita em microscopia óptica com campos aleatoriamente selecionados de todo o slide. Segundo o teste t pareado paramétrico e não-paramétrico: PB0h-PB3h:  $p=0,95$ ; PS0h-PS3h:  $p=0,63$ ; PB0h-PS0h:  $p=0,57$ ; PB3h-PS3h:  $p=0,96$ . Não houve diferença estatística.

Na condição basal (Tabela 8), os valores apresentaram distribuição normal em ambos os grupos (PB e PS) e foi observado um aumento da média, em comparação ao t0h, porém, sem diferenças estatísticas (PB  $p=0,42$ ; PS  $p=0,72$ ). Na condição em que as células foram estimuladas por LPS, os valores do grupo PB apresentaram distribuição normal, com aumento não significativo da média após o consumo da bebida PB ( $p=0,95$ ). Já os valores do grupo PS não apresentaram distribuição normal e apresentaram um aumento também não significativo da mediana ( $p=0,63$ ) (Tabela 9).

### 3.6.2 Corpúsculos lipídicos expressos no citoplasma dos monócitos (CL)

As Tabelas 10 e 11 mostram os valores de média, desvio-padrão, mediana, mínimo e máximo e valor de p de CL expressos no citoplasma de monócitos em cada grupo (PB e PS) e condição (Basal e LPS) antes (t0h) e após (t3h) o consumo do suco de PS e placebo (PB).

**Tabela 10.** Quantificação do média de CL encontrados no citoplasma de monócitos circulantes dos voluntários após consumo de bebida placebo (PB) e suco *Passiflora setacea* (PS) com CL no citoplasma (CL) na condição basal.

Grupos	Corpúsculos lipídicos encontrados no citoplasma de monócitos (CL%)			
	Condição basal			
	n	Média (DP)	Mediana	Extremos
PB 0h	7	1,26 (0,07)	1,22	1,06 – 1,61
PB 3h	7	1,24 (0,07)	1,25	1,03 – 1,54
PS 0h	8	1,15 (0,08)	1,16	0,75 – 1,43
PS 3h	9	1,31 (0,10)	1,26	1,00 – 1,82

A contagem foi feita em microscopia óptica com campos aleatoriamente selecionados de todo o slide. Segundo o teste t pareado paramétrico: PB0h-PB3h:  $p=0,81$ ; PS0h-PS3h:  $p=0,17$ ; PB0h-PS0h:  $p=0,40$ ; PB3h-PS3h:  $p=0,79$ . Não houve diferença estatística.

**Tabela 11.** Quantificação do média de CL encontrados no citoplasma de monócitos circulantes dos voluntários após consumo de bebida placebo (PB) e suco *Passiflora setacea* (PS) com CL no citoplasma (CL) com estímulo de LPS.

<b>Corpúsculos lipídicos encontrados no citoplasma de monócitos (CL%)</b>				
<b>Estímulo por LPS</b>				
<b>Grupos</b>	<b>n</b>	<b>Média (DP)</b>	<b>Mediana</b>	<b>Extremos</b>
<b>PB 0h</b>	6	1,23 (0,08)	1,21	1,00 – 1,50
<b>PB 3h</b>	6	1,55 (0,37)	1,13	0,50 – 3,77
<b>PS 0h</b>	8	1,24 (0,04)	1,25	1,07 – 1,39
<b>PS 3h</b>	8	1,13 (0,15)	1,25	0,00 – 1,46

A contagem foi feita em microscopia óptica com campos aleatoriamente selecionados de todo o slide. Segundo o teste t pareado paramétrico e não-paramétrico: PB0h-PB3h:  $p=0,40$ ; PS0h-PS3h:  $p=0,74$ ; PB0h-PS0h:  $p=0,70$ ; PB3h-PS3h:  $p=0,96$ . Não houve diferença estatística.

Na condição basal (Tabela 16), os valores apresentaram distribuição normal no grupo PS e PB e foi observado um ligeiro aumento da média de CL após o consumo do suco de PS, porém, sem diferença estatística ( $p=0,17$ ). Na condição onde as células foram estimuladas por LPS, os valores do grupo PB apresentaram distribuição normal, com aumento não significativo da média de CL após o consumo da bebida PB ( $p=0,40$ ). Já os valores do grupo PS não apresentaram distribuição normal e se mantiveram inalterados após o consumo do suco de PS ( $p=0,74$ ) (Tabela 17).

### 3.6.3 Índice corpuscular (IC)

As Tabelas 12 e 13 mostram os valores de média, desvio-padrão, mediana, mínimo e máximo e valor de p do Índice Corpuscular (IC) em cada grupo (PB e PS) e condição (Basal e LPS) antes (t0h) e após (t3h) o consumo do suco de PS e placebo (PB).

**Tabela 12.** Índice Corpuscular da média de CL encontrados no citoplasma de monócitos circulantes (CL%) dos voluntários após consumo de bebida placebo (PB) e suco *Passiflora setacea* (PS) com média de macrógrafos envolvidos no processo na condição basal.

Grupos	Índice Corpuscular (IC) –			
	Condição basal			
	n	Média (DP)	Mediana	Extremos
PB 0h	7	23,15 (4,54)	25,84	5,25 – 41,29
PB 3h	8	23,09 (6,40)	17,81	2,89 – 53,18
PS 0h	8	25,40 (6,16)	23,00	1,62 – 45,00
PS 3h	9	23,08 (4,55)	19,50	4,08 – 41,90

O cálculo feito para obtenção do IF foi a multiplicação da média de monócitos com CL no citoplasma (MO%) pela média de CL encontrado (CL%). Segundo o teste t pareado paramétrico: PB0h-PB3h:  $p=0,66$ ; PS0h-PS3h:  $p=0,90$ ; PB0h-PS0h:  $p=0,78$ ; PB3h-PS3h:  $p=0,85$ . Não houve diferença estatística.

**Tabela 13.** Índice fagocitário da média de CL encontrados no citoplasma de monócitos circulantes (CL%) dos voluntários após consumo de bebida placebo (PB) e suco *Passiflora setacea* (PS) com média de macrógrafos envolvidos no processo estimulados por LPS.

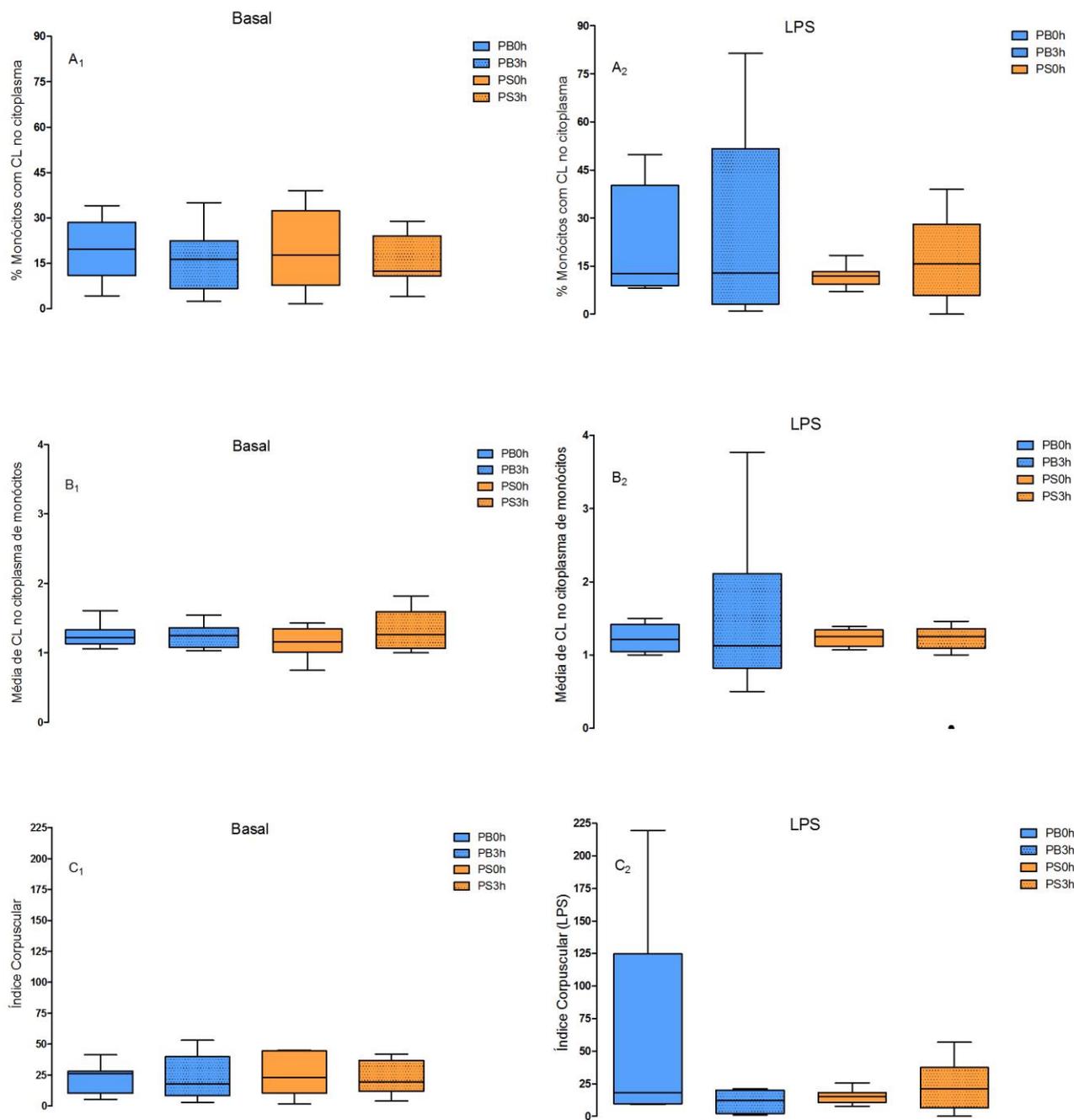
Grupos	Índice Corpuscular (IC) –			
	Estímulo por LPS			
	n	Média (DP)	Mediana	Extremos
PB 0h	8	61,41 (28,02)	18,25	9,00 – 219,40
PB 3h	6	11,42 (3,59)	12,10	1,06 – 20,97
PS 0h	8	15,37 (1,94)	15,00	7,85 – 25,53
PS 3h	9	22,76 (6,26)	21,25	0,00 – 57,00

O cálculo feito para obtenção do IF foi a multiplicação da média de monócitos com CL no citoplasma (MO%) pela média de CL encontrado (CL%). Segundo o teste t pareado paramétrico e não-paramétrico: PB0h-PB3h:  $p=0,22$ ; PS0h-PS3h:  $p=0,61$ ; PB0h-PS0h:  $p=0,40$ ; PB3h-PS3h:  $p=0,22$ . Não houve diferença estatística.

Na condição basal (Tabela 12), os valores apresentaram distribuição normal no grupo PS e PB e foi observado uma diminuição do IC após o consumo do suco de PS, porém, sem diferença estatística ( $p=0,90$ ). A média do grupo PB se manteve inalterada. Na condição onde as células foram estimuladas

por LPS, os valores do grupo PB não apresentaram distribuição normal, com diminuição não significativa da mediana do IC após o consumo da bebida PB ( $p=0,22$ ). Já os valores do grupo PS apresentaram distribuição normal e a média do IC aumentou de forma não significativa após o consumo do suco de PS ( $p=0,61$ ) (Tabela 13).

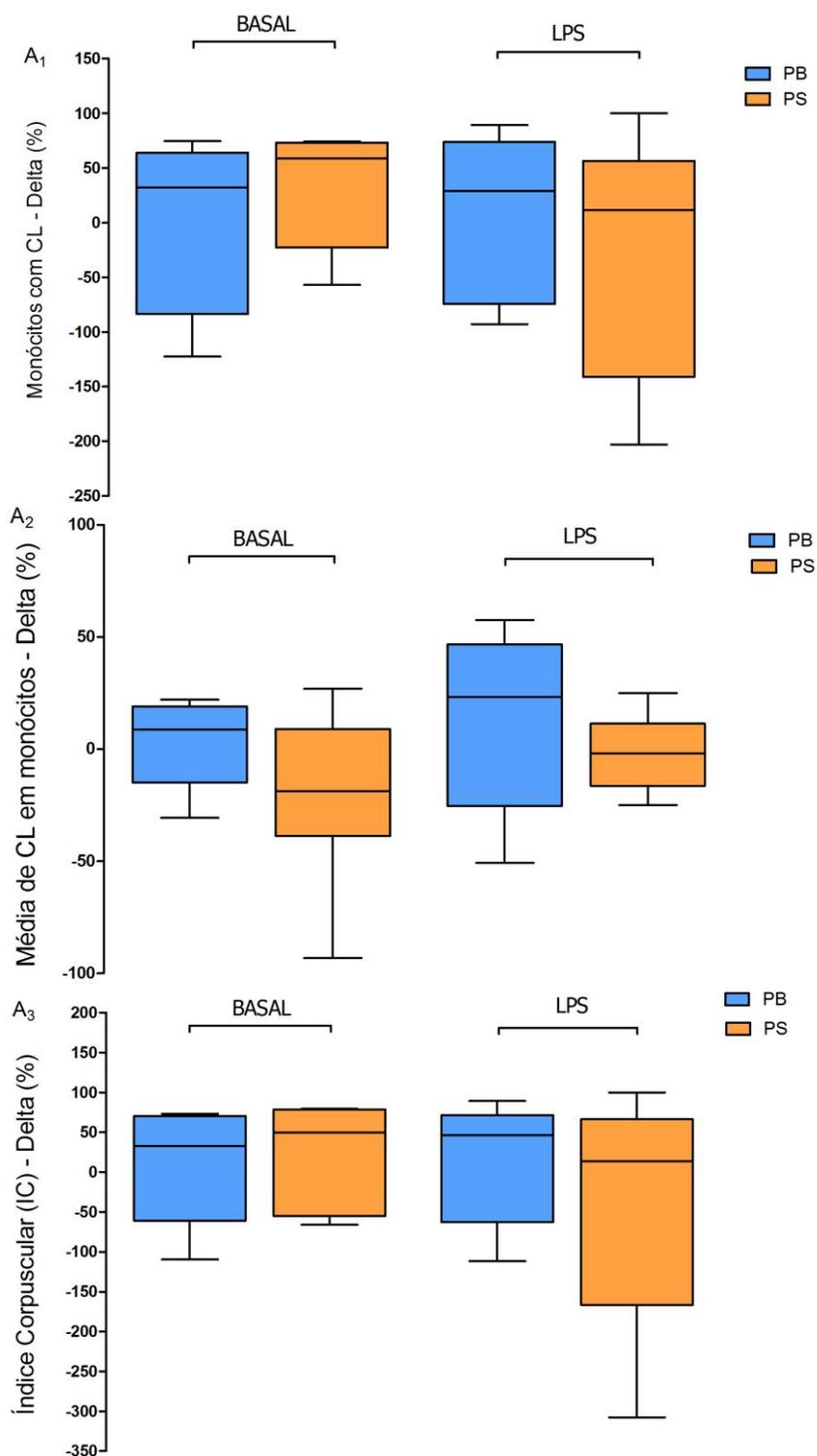
A Figura 16 resume os achados da análise pareada da expressão de CL por monócitos dos indivíduos que consumiram o suco de PS em comparação com a bebida PB.



**Figura 16.** Efeito agudo do consumo de suco de *Passiflora setacea* na expressão de corpúsculos lipídicos por monócitos de voluntários com sobrepeso (n=10). As células foram incubadas com ou sem LPS (lipossacarídeos) e fixadas com paraformaldeído a 4% por 30 minutos e lavadas com STF e álcool isopropílico 60%. Em seguida, as células foram coradas por 15 minutos com uma solução de óleo vermelho (Oil Red) filtrada. O excesso de corante foi retirado e as escavações foram lavadas com álcool isopropílico 60% e água destilada. Os núcleos celulares foram corados com hematoxilina de Mayer por 5 minutos, lavadas com água destilada. Foram estabelecidas a porcentagem de monócitos

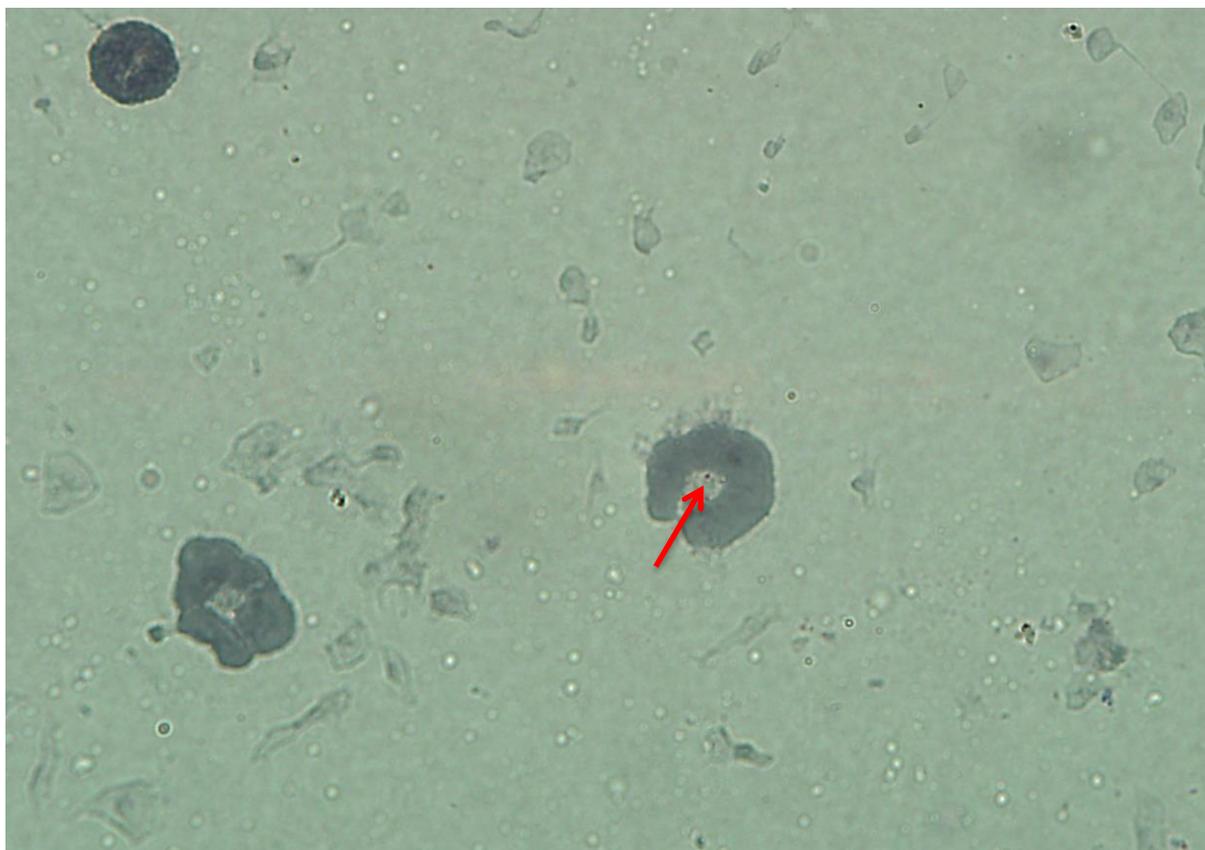
expressando CL no citoplasma (MØ%) (A1 e A2), a quantidade média de CL dentro dos monócitos (MCL) (B1 e B2) e o índice corpuscular (IC) (C1 e C2). A contagem foi feita em microscopia óptica com campos aleatoriamente selecionados de todo o slide. Os resultados, analisados pelo teste t pareado paramétrico e não-paramétrico (teste de Wilcoxon), mostraram que não houve diferença estatística entre as condições e os tratamentos ( $p > 0,05$ ). Estão representadas medianas e desvios padrão.

A Figura 17 representa a variação intrapessoal (delta %) da expressão de CL pelos monócitos dos indivíduos. A1 mostra que houve aumento da média de MO% na situação basal após o consumo do suco de PS, quando comparado ao placebo ( $p=0,57$ ) e de forma invertida, houve redução dessa média no grupo PS em comparação ao PB na situação estimulada com LPS ( $p=0,51$ ). A2 mostra diminuição não da média de MCL após o consumo do suco de PS, tanto na situação basal ( $p=0,20$ ), quanto na estimulada por LPS ( $p=0,61$ ). A3 mostra aumento da média do IC na situação basal após o consumo do suco de PS, quando comparado ao placebo ( $p=0,58$ ) e de forma invertida, mostra redução dessa média após o consumo do suco de PS na situação estimulada com LPS ( $p=0,33$ ). Em nenhuma variável foi detectada diferença estatística.



**Figura 17.** Variação intrapessoal (delta %) do efeito do consumo de suco de *Passiflora setacea* na expressão de corpúsculos lipídicos em monócitos de voluntários com sobrepeso (n=10). Os resultados, analisados pelo teste t não-pareado (teste de Mann-Whitney), mostraram que não houve diferença estatística entre as condições basal e estimuladas por LPS em nenhum parâmetro analisado (MO%, MCL e IC). Estão representadas medianas e desvios padrão.

A avaliação da expressão de CL é importante, pois são as principais organelas produtoras de eicosanoides e são peças-chave na sinalização intracelular e nas células do processo inflamatório (MELO; DVORAK, 2012). A estrutura desses corpúsculos é formada por uma monocamada exterior de fosfolipídeos e seu núcleo é preenchido por lipídeos neutros e proteínas (Figura 18). Tem sido utilizado a expressão de CL como parâmetro no desenvolvimento de câncer colorretal (TIRINATO et al., 2015), câncer de mama (ABRAMCZYK et al., 2015) e outras doenças inflamatórias (BOZZA; VIOLA, 2010).



**Figura 18.** Foto de monócito ativado com 1 (um) corpúsculo lipídico corado de vermelho indicado no citoplasma.

Milenkovic et al. (2011) verificaram a modulação da expressão de genes relacionados ao metabolismo lipídico em voluntários após quatro semanas de consumo de suco de laranja e de hesperidina isolada (principal flavonoide presente no suco). Foi detectada a supressão da expressão de LDLR, receptor responsável pelo ligamento e internalização do LDL nos monócitos; e a supressão da expressão de ACAT (colesterol aciltransferase), enzima que converte o LDL internalizado em éster de colesterol, facilitando a formação de CL. Outro estudo também avaliou a inibição da atividade de

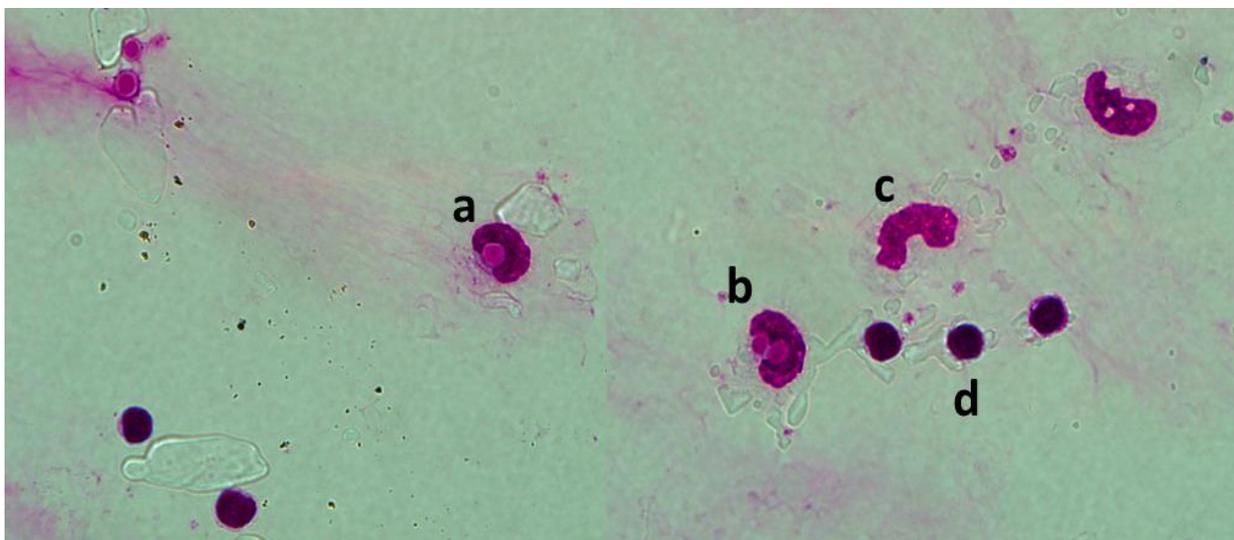
ACAT2 pela naringenina, flavonoide da toranja (*grapefruit*) (Nahmias et al., 2008). Ainda no estudo de Milenkovic et al. (2011), tanto o suco de laranja quanto a hesperidina estimularam a expressão do gene ABC2, responsável pelo transporte reverso de colesterol dos monócitos, diminuindo assim, a concentração de CL dentro das células imunes (PENNINGGS et al., 2006).

Kim et al. (2013) avaliaram a diminuição de CL dentro de células vasculares endoteliais pelo mecanismo de autofagia de fagossomas estimulado pela presença da EGCG no meio de cultura durante 2 h. BAUR et al. (2006) observaram a diminuição da concentração de CL no tecido hepático camundongos de meia-idade suplementados com resveratrol em uma dieta hiperlipídica durante seis semanas.

É visto que existem poucos estudos na literatura que avaliam a ação de CF no metabolismo lipídico dentro de monócitos na prevenção de desenvolvimento de DCNT. Também foi verificado que é necessário um tempo maior de tratamento suco de PS para modulação da formação de CL ou avaliação da expressão de genes relacionados com o metabolismo lipídico em células imunes.

### **3.7 TESTE DA CAPACIDADE FAGOCITÁRIA**

A capacidade fagocitária dos monócitos foi avaliada na presença de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* sensibilizadas (LS) ou não (LNS) por soro humano. A quantidade de leveduras fagocitadas por 200 monócitos ativados foi quantificada por microscopia óptica (Figura 19). Avaliou-se a quantidade de monócitos envolvidos na fagocitose (MO%), média de leveduras fagocitadas (Lev) e o Índice Fagocitário (IF).



**Figura 19.** Foto de monócito ativado fagocitando uma levedura (a), fagocitando duas leveduras (b) e monócito ativo não envolvido na fagocitose (c) e monócito inativo (d).

### 3.7.1 Monócitos envolvidos na fagocitose (MO%)

As Tabelas 14 e 15 mostram os valores de média, desvio-padrão, mediana, mínimo e máximo e valor de p do percentual de monócitos envolvidos na fagocitose (MO%) em cada grupo (PB e PS) e condição (LS e LNS) antes (t0h) e após (t3h) o consumo do suco de PS e placebo (PB).

**Tabela 8.** Quantificação do média de monócitos circulantes dos voluntários após consumo de bebida placebo (PB) e suco *Passiflora setacea* (PS) envolvidos na fagocitose (MO%) de leveduras não sensibilizadas por soro humano.

Grupos	Monócitos envolvidos na fagocitose (MO%) – Leveduras não sensibilizadas			
	n	Média (DP)	Mediana	Extremos
PB 0h	8	45,06 (6,79)	51,94	13,93 – 66,25
PB 3h	8	28,69 (9,69)	15,80	7,62 – 75,00
PS 0h	9	23,79 (8,05)	16,74	1,74 – 62,71
PS 3h	9	33,75 (10,19)	19,84	5,48 – 80,06

A contagem foi feita em microscopia óptica com campos aleatoriamente selecionados de todo o slide. Segundo o teste t pareado paramétrico e não-paramétrico: PB0h-PB3h:  $p=0,11$ ; PS0h-PS3h:  $p=0,06$ ; PB0h-PS0h:  $p=0,09$ ; PB3h-PS3h:  $p=0,89$ . Não houve diferença estatística.

**Tabela 9.** Quantificação do média de monócitos circulantes dos voluntários após consumo de bebida placebo (PB) e suco *Passiflora setacea* (PS) envolvidos na fagocitose (MO%) de leveduras sensibilizadas por soro humano.

Grupos	Monócitos envolvidos na fagocitose (MO%) – Leveduras sensibilizadas			
	n	Média (DP)	Mediana	Extremos
PB 0h	8	33,02 (5,41)	31,14	10,73 – 54,30
PB 3h	8	27,44 (5,85)	25,96	10,25 – 58,53
PS 0h	9	21,14 (6,53)	10,93	5,70 – 63,17
PS 3h	9	26,95 (6,00)	25,77	6,31 – 63,50

A contagem foi feita em microscopia óptica com campos aleatoriamente selecionados de todo o slide. Segundo o teste t pareado paramétrico e não-paramétrico: PB0h-PB3h:  $p=0,26$ ; PS0h-PS3h:  $p=0,04^*$ ; PB0h-PS0h:  $p=0,11$ ; PB3h-PS3h:  $p=0,82$ . Houve diferença estatística no percentual de monócitos envolvidos na fagocitose na presença de leveduras sensibilizadas após o consumo de suco de PS.

Na presença de leveduras não sensibilizadas (LNS) (Tabela 14), os valores de MO% do grupo PB não apresentaram distribuição normal com redução não significativa da mediana ( $p=0,11$ ). O grupo PS apresentou distribuição normal e teve a média do MO% aumentada de forma quase significativa após o consumo do suco de PS ( $p=0,06$ ). Na presença de LS, o grupo PB apresentou distribuição normal e também com redução não significativa da média ( $p=0,26$ ) e o grupo PS, cuja distribuição não foi normal, teve aumento significativo da mediana do MO% ( $p=0,04$ ) (Tabela 15).

### 3.7.2 Leveduras envolvidas na fagocitose (Lev)

As Tabelas 16 e 17 mostram os valores de média, desvio-padrão, mediana, mínimo e máximo e valor de p da média de leveduras fagocitadas (Lev) em cada grupo (PB e PS) e condição (LS e LNS) antes (t0h) e após (t3h) o consumo do suco de PS e placebo (PB).

**Tabela 10.** Quantificação do média de leveduras não sensibilizadas envolvidas na fagocitose (Lev) após consumo de bebida placebo (PB) e suco *Passiflora setacea* (PS).

Grupos	Leveduras envolvidas na fagocitose (Lev) –			
	Leveduras não sensibilizadas			
	n	Média (DP)	Mediana	Extremos
PB 0h	7	2,19 (0,11)	2,14	1,90 – 2,77
PB 3h	8	1,66 (0,25)	1,74	0,52 – 2,61
PS 0h	9	1,71 (0,18)	1,61	1,10 – 2,66
PS 3h	9	1,93 (0,26)	1,75	0,54 – 3,35

A contagem foi feita em microscopia óptica com campos aleatoriamente selecionados de todo o slide. Segundo o teste t pareado paramétrico: PB0h-PB3h:  $p=0,30$ ; PS0h-PS3h:  $p=0,13$ ; PB0h-PS0h:  $p=0,06$ ; PB3h-PS3h:  $p=0,56$ . Os pontos iniciais PB 0h e PS 0h apresentaram diferença estatística.

**Tabela 11.** Quantificação do média de leveduras não sensibilizadas envolvidas na fagocitose (Lev) após consumo de bebida placebo (PB) e suco *Passiflora setacea* (PS).

Grupos	Leveduras envolvidas na fagocitose (Lev) –			
	Leveduras sensibilizadas			
	n	Média (DP)	Mediana	Extremos
PB 0h	7	1,98 (0,05)	1,95	1,82 – 2,14
PB 3h	6	1,91 (0,09)	1,92	1,59 – 2,19
PS 0h	9	1,92 (0,12)	1,95	1,40 – 2,47
PS 3h	9	1,77 (0,10)	1,81	1,38 – 2,35

A contagem foi feita em microscopia óptica com campos aleatoriamente selecionados de todo o slide. Segundo o teste t pareado paramétrico: PB0h-PB3h:  $p=0,70$ ; PS0h-PS3h:  $p=0,26$ ; PB0h-PS0h:  $p=0,63$ ; PB3h-PS3h:  $p=0,27$ . Não houve diferença estatística.

Na presença de leveduras não sensibilizadas (LNS) (Tabela 16), os valores de Lev de ambos os grupos tiveram distribuição normal com a diminuição não significativa da média de leveduras fagocitadas após o consumo do PB ( $p=0,30$ ) e o aumento não significativo da mesma após o consumo do

suco de PS ( $p=0,13$ ). Na presença de LS, os grupos PB e PS também tiveram distribuição normal, com redução não significativa da média de leveduras fagocitadas (Tabela 17).

### 3.7.3 Índice fagocitário (IF)

As Tabelas 18 e 19 mostram os valores de média, desvio-padrão, mediana, mínimo e máximo e valor de  $p$  do Índice Fagocitário (IF) em cada grupo (PB e PS) e condição (LS e LNS) antes (t0h) e após (t3h) o consumo do suco de PS e placebo (PB).

**Tabela 12.** Índice fagocitário (IF) do teste de fagocitose de leveduras não sensibilizadas por monócitos circulantes dos voluntários após consumo de bebida placebo (PB) e suco *Passiflora setacea* (PS).

Grupos	Índice Fagocitário (IF) – Leveduras não sensibilizadas			
	n	Média (DP)	Mediana	Extremos
PB 0h	8	99,97 (17,35)	110,5	29,85 – 159,5
PB 3h	8	61,46 (26,24)	27,93	4,19 – 196,5
PS 0h	9	51,08 (20,45)	29,01	2,61 – 165,20
PS 3h	9	80,82 (30,84)	19,29	8,68 – 236,8

O cálculo feito para obtenção do IF foi a multiplicação da média de monócitos envolvidos na fagocitose (MO%) pela média de leveduras fagocitadas (Lev). Segundo o teste t pareado não-paramétrico: PB0h-PB3h:  $p=0,11$ ; PS0h-PS3h:  $p=0,05$ ; PB0h-PS0h:  $p=0,09$ ; PB3h-PS3h:  $p=0,74$ . Não houve diferença estatística.

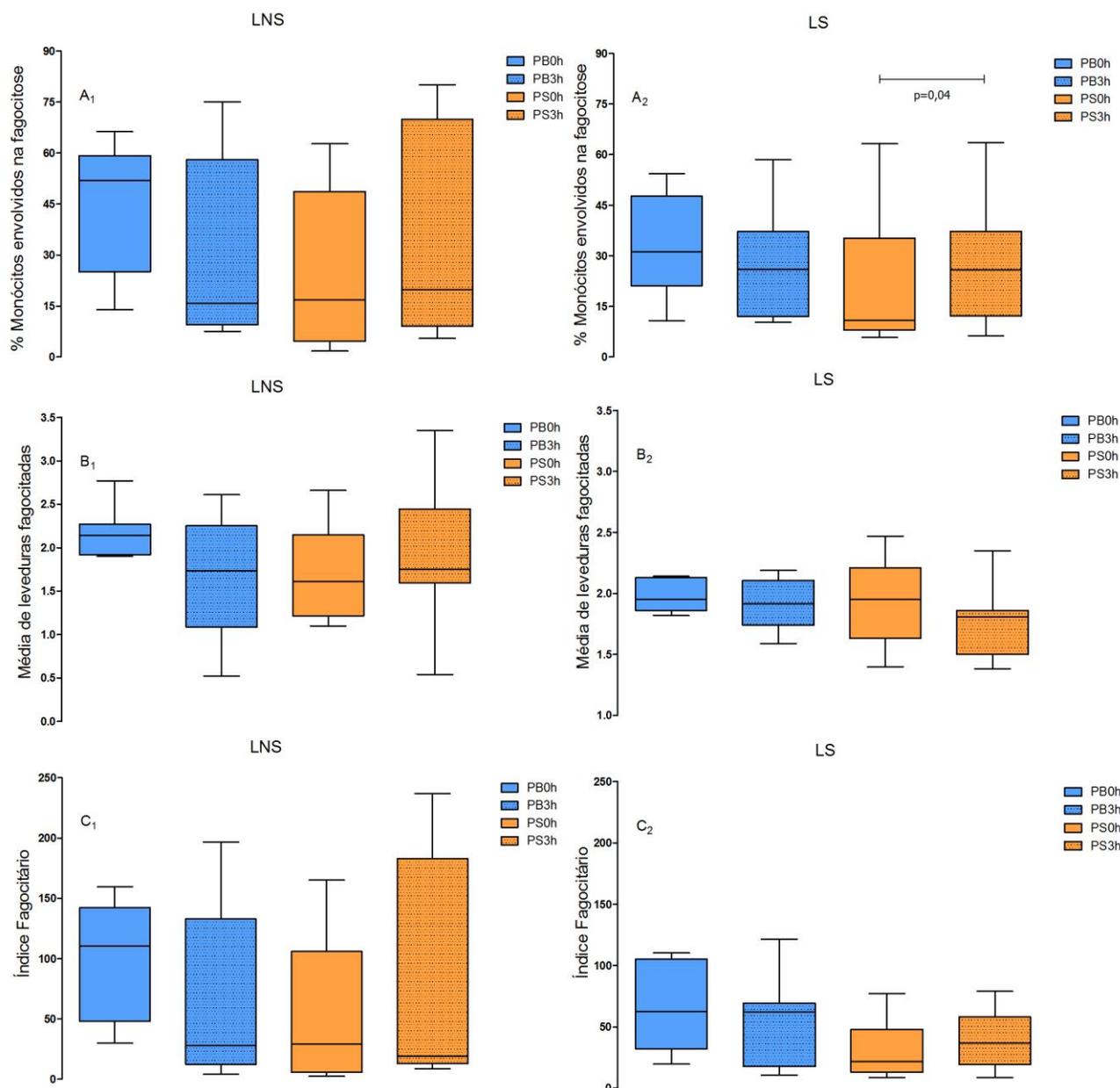
**Tabela 13.** Índice fagocitário (IF) do teste de fagocitose de leveduras sensibilizadas por monócitos circulantes dos voluntários após consumo de bebida placebo (PB) e suco *Passiflora setacea* (PS).

Grupos	Índice Fagocitário (IF) – Leveduras sensibilizadas			
	n	Média (DP)	Mediana	Extremos
PB 0h	8	66,47 (12,60)	62,55	19,51 – 110,30
PB 3h	8	53,93 (12,92)	62,22	10,77 – 121,60
PS 0h	8	29,59 (8,51)	21,90	8,86 – 77,08
PS 3h	8	39,90 (8,38)	36,86	8,74 – 78,89

O cálculo feito para obtenção do IF foi a multiplicação da média de monócitos envolvidos na fagocitose (MO%) pela média de leveduras fagocitadas (Lev). Segundo o teste t pareado paramétrico e não-paramétrico: PB0h-PB3h:  $p=0,20$ ; PS0h-PS3h:  $p=0,08$ ; PB0h-PS0h:  $p=0,02^*$ ; PB3h-PS3h:  $p=0,27$ . Os pontos iniciais PB 0h e PS 0h apresentaram diferença estatística.

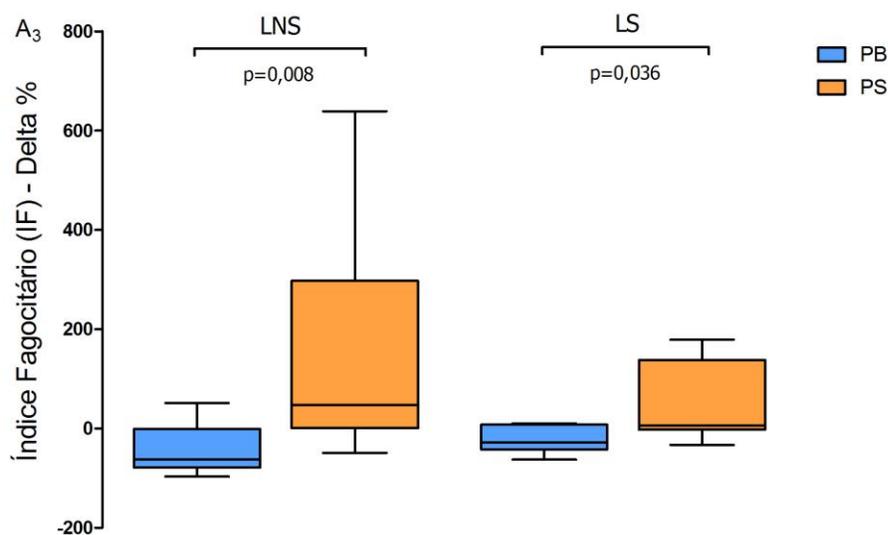
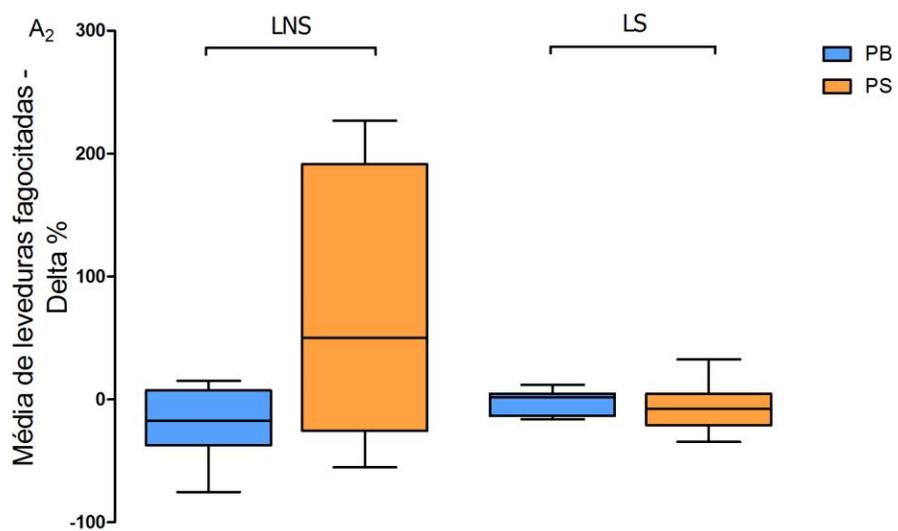
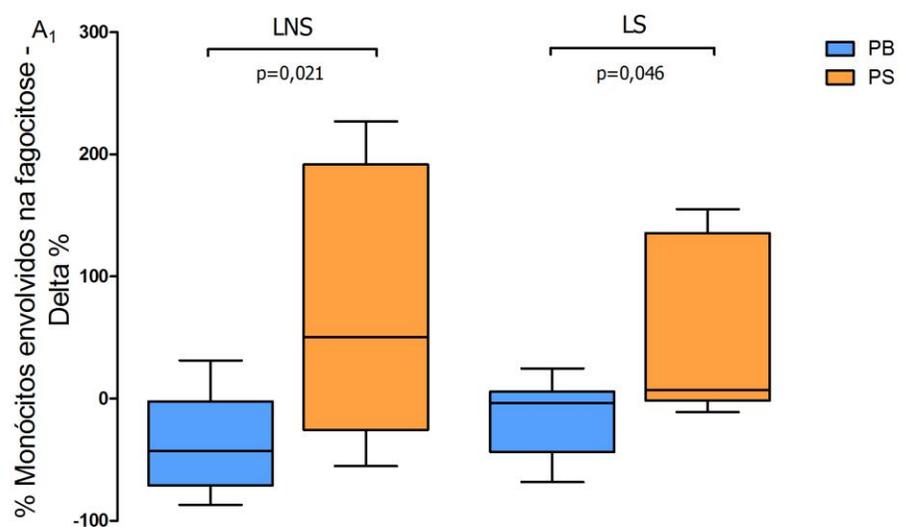
Na presença de leveduras não sensibilizadas (LNS) (Tabela 18), os valores de IF de ambos os grupos não tiveram distribuição normal com a diminuição não significativa da mediana do IF após o consumo do PB ( $p=0,11$ ) e com tendência da diminuição da mediana após o consumo do suco de PS ( $p=0,05$ ). Na presença de LS, o grupo PB apresentou distribuição normal com a mediana do IF inalterada ( $p=0,20$ ) e o grupo PS que apresentou distribuição normal, apresentou um aumento não significativo da média do IF ( $p=0,08$ ) (Tabela 19).

A Figura 20 resume os achados da análise pareada da capacidade fagocitária dos monócitos dos indivíduos que consumiram o suco de PS em comparação com a bebida PB. O suco de PS gerou aumento no recrutamento de monócitos envolvidos na fagocitose (MO%) por opsoninas (LS) ( $p=0,04$ ) e gerou uma tendência no aumento de MO% por PAMP (LNS) ( $p=0,06$ ). Não houve diferença estatística na média de leveduras fagocitadas ou no índice fagocitário nas análises pareadas.



**Figura 20.** Efeito agudo do consumo de suco de *Passiflora setacea* na capacidade fagocitária de monócitos de voluntários com sobrepeso (n=10). Monócitos obtidos por aderência ( $2,0 \times 10^5$  células/escavação) foram incubados por 2h. Depois foram incubadas com  $10^6$  de *S. cerevisiae*/escavação sensibilizadas por soro humano (LS) ou não (LNS) e suspensas em RPMI 1640 (Sigma), pH 7,2 a 4 °C suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado (Gibco) durante 30 minutos a 37 °C em 5% de CO<sub>2</sub> em ar. Em A, o percentual de monócitos envolvidos na fagocitose (MO%), em B, média de leveduras fagocitadas e em C, índice fagocitário (IF). Os resultados avaliados por microscopia óptica e analisados pelo teste t pareado, mostraram que o consumo do suco de PS aumentou a captação de monócitos para fagocitose por opsoninas (A2). Os demais parâmetros não foram alterados (p>0,05). Estão representadas médias e desvios padrão.

A Figura 21 representa a variação intrapessoal dos indivíduos (delta %) da capacidade fagocitária de monócitos. A1 mostra que o suco de PS promoveu aumento da média do percentual de monócitos envolvidos na fagocitose (MO%) por PAMP (LNS) ( $p=0,021$ ); e aumento da mediana ( $p=0,046$ ) por opsoninas (LS), quando comparado com o placebo. A2 mostra que o grupo PS teve aumento não significativo da média de leveduras fagocitadas (Lev) por PAMP (LNS) ( $p=0,088$ ); e redução não significativa dessa média por opsoninas (LS) ( $p=0,787$ ). A3 mostra aumento da mediana do IF tanto por PAMP (LNS) ( $p=0,008$ ), quanto por opsoninas (LS) ( $p=0,036$ ).



**Figura 21.** Variação intrapessoal (delta %) do efeito do consumo de suco de *Passiflora setacea* na capacidade fagocitária de monócitos de voluntários com sobrepeso (n=10). Os resultados, analisados pelo teste t não-pareado (teste de Mann-Whitney), mostraram que o suco de PS promoveu aumento no percentual de monócitos envolvidos na fagocitose (MO%) por PAMP e por opsoninas (A1) e aumento do índice fagocitário (IF) pelos dois mecanismos (A3). Não foi detectada diferença estatística na média de leveduras fagocitadas (Lev) (A2). Estão representadas medianas e desvios padrão.

Em suma, foi verificado o efeito agudo do suco de PS no aumento do percentual de monócitos recrutados para a fagocitose (MO%) por opsoninas (LS) e também foi verificado na variação intrapessoal (delta %) que o suco de PS promoveu aumento do MO% e do IF tanto por opsoninas (LS) quanto por PAMP (LNS), quando comparado a um placebo. Não foi detectada alteração significativa da média de leveduras fagocitadas.

As opsoninas, parte do Sistema Imune Inato, são proteínas plasmáticas que se ligam aos anticorpos aderidos aos microorganismos para a ativação da fagocitose via sistema complemento. Esse mecanismo é ativado na presença de leveduras sensibilizadas por soro humano (LS), pois este ser fonte de sistema complemento (ABBAS, 2011). Os PAMP (padrões moleculares associados a patógenos) também faz parte do Sistema Imune Inato, porém, não tem um anticorpo como intermediário no reconhecimento.

Possivelmente, o consumo do suco de PS estimula a fagocitose, tanto por PAMP (LNS) quanto por sistema complemento (LS). O aumento do número de células imunes mobilizadas para a fagocitose de leveduras sensibilizadas e não sensibilizadas, revela um possível efeito do suco PS de promover a ativação e a quimiotaxia dessas células imunes.

A fagocitose por monócitos é um mecanismo importante do sistema imune inato e ela é utilizada como um importante indicador da ativação da função imune (OBERLEY et al., 2004; LEE et al., 2001). O alvo dos fagócitos ativados são patógenos ou então partículas presentes em excesso na circulação, como o LDL oxidado. Há alguns estudos que, assim como neste, também demonstraram o aumento da fagocitose na presença de compostos fenólicos. Monobe et al. (2010) observaram aumento da fagocitose de células cancerígenas cultivadas com polifenóis do chá verde. Resveratrol aumentou a fagocitose de *Candida albicans* (fungo) por monócitos humanos (BERTELLI et al., 1999).

Em contrapartida, outros estudos demonstraram o contrário, como o de Iyori et al. (2008) que verificou inibição da fagocitose de *E. coli* (bactéria) em monócitos cultivados com resveratrol, por meio da diminuição da expressão de receptores de fagocitose e da atividade do NF-kB. O resveratrol também inibiu a fagocitose de *Kluyveromyces lactis* (fungo) por monócitos (LEIRO et al., 2002).

Pode-se inferir que compostos fenólicos podem ter ação ambígua na fagocitose, o que vai depender do tipo de patógeno ou célula apresentado para a sua ativação ou inibição – envolvendo diferentes tipos de receptores. Sendo assim, o impacto do suco de PS no aumento da fagocitose pode caracterizar um aumento da efetividade do sistema imune inato frente a um patógeno. Porém, é necessário avaliar outras variáveis para confirmar essa efetividade, como a quantidade de leveduras efetivamente mortas e não apenas fagocitadas.

## CONCLUSÃO

O consumo de um copo (300mL) de suco de *Passiflora setacea* (PS) por voluntários com sobrepeso apresentou ação imunomodulatória na capacidade fagocitária de monócitos após um período de 3 h, quando comparado a uma bebida placebo. A ativação da fagocitose causada pelo suco de PS pode ter caracterizado um aumento na efetividade do sistema imune inato desses voluntários por ser um mecanismo importante na destruição de patógenos e apoptose de células tumorais.

Os resultados da produção de peróxido de hidrogênio com as células na condição basal pode sugerir uma ação do suco de PS na diminuição desse radical. Porém, seria necessário um n amostral maior e um nível a mais na variável tempo (t6h).

Não houve alterações na produção de óxido nítrico (NO) em nenhuma das condições. Foi discutido que o consumo agudo de um alimento rico em compostos fenólicos pode alterar a expressão/atividade de enzimas relacionadas com a produção desse ERN (eNOS, por exemplo). Porém, para um aumento efetivo da produção de NO pelas células de defesa, é necessário acrescentar mais uma observação temporal (t6h) ou avaliar após um período de consumo crônico do suco de PS. Avaliar a expressão de genes relacionados com a atividade enzimática (NOS) pode ser importante para detectar possíveis alterações em alguma etapa prévia da via metabólica de produção do NO.

A expressão de corpúsculos lipídicos também não foi alterada pelo consumo do suco de PS, o que pode ser explicado que apenas consumos crônicos podem gerar alterações na modulação de CL ou na transcrição de genes relacionados com o metabolismo lipídico intracelular.

Apesar de serem resultados interessantes, é necessário avaliar outras variáveis para confirmar a efetividade do sistema imune evidenciada pelo aumento da fagocitose. Quantificar o número de leveduras efetivamente mortas, aumentar o n amostral, acrescentar outro ponto temporal de análise (t6h, por exemplo) e realizar testes com o consumo crônico do suco de PS são atividades importantes para a melhor elucidação em próximos estudos.

Recomenda-se o consumo de suco de *Passiflora setacea* como ferramenta terapêutica no fortalecimento do sistema imune em indivíduos com estado pró-inflamatório, ou seja, com sobrepeso e sedentários.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, Abul K. *Imunologia celular e molecular* / Abul K. Abbas, Andrew H. Lichtman, Shiv Pillai ; ilustrações de David L. Baker ; [tradução de Tatiana Ferreira Robaina ... et al]. - Rio de Janeiro : Elsevier, 2011.

ABRAMCZYK, H.; SURMACKI, J.; KOPEĆ, M.; OLEJNIK, A.K. et al. The role of lipid droplets and adipocytes in cancer. Raman imaging of cell cultures: MCF10A, MCF7, and MDA-MB-231 compared to adipocytes in cancerous human breast tissue. *Analyst*, v. 140, p. 2224-2235, 2015.

ADLERCREUTZ, H; MAZUR, W. Phyto-oestrogens and Western diseases. *Ann Med*, 29:95–120, 1997.

ADOLPHE, J.L.; WHITING, S.J.; JUURLINK, B.H.J.; THORPE, L.U.; ALCORN, J. Health effects with consumption of the flax lignan secoisolariciresinol diglucoside. *British Journal of Nutrition*, n. 103, p. 929–938, 2010.

AI, H.; PINK, J. J.; SHUAI, X. T.; BOOTHMAN, D. A. & GAO, J. M. Interactions between self-assembled polyelectrolyte shells and tumor cells. - *J. Biomed. Mater. Res.* v. 73A, p. 303, 2005.

ALMEIDA de, E.T.; MAURO, A.E.; SANTANA, A.M.; NETTO, A.V. de G.; CARLOS, I.Z. Activation of mice peritoneal macrophages by palladium(II) organometallic mononuclear compounds. *Quím. Nova* vol.28 no.3 São Paulo May/June 2005.

ANDRADE JÚNIOR, D.R. et al. Os radicais livres de oxigênio e as doenças pulmonares. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, v.31, n.1, p.60-68, 2005. Disponível em: . Acesso em: 03 de fev. 2010. doi: 10.1590/S1806-37132005000100011.

APTEKMANN, N.P.; CESAR, T.B. Orange juice improved lipid profile and blood lactate of overweight middle-aged women subjected to aerobic training. *Maturitas*, 2010. doi:10.1016/j.maturitas.2010.07.009.

ARAÚJO, L. Sistema brasileiro de resposta técnica CETEC, Ministério da Ciência e Tecnologia, 5p, (<http://sbirt.ibict.br/upload/sbirt413-1.html>) 2005.

ARTS, I.C.W.; HOLLMAN, P.C.H. Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. *Am J Clin Nutr* 81, 317s-325s, 2005.

Associação Brasileira das Indústrias da Alimentação (ABIA). O mercado de alimentos funcionais. 2009. Disponível em >><http://www.abia.org.br/vst/12.asp><< Acesso em maio de 2013.

BABIOR, B.M. NADPH oxidase: an update. *Blood*. 93: 1464-1476, 1999.

BASU, A.; BETTS, N.M.; SIMMONS, B.; WU, M.; LYONS, T.J. Low-energy cranberry juice decreases lipid oxidation and increases plasma antioxidant capacity in women with metabolic syndrome. *Nutr Res*, v. 31, n. 3, p. 190-196, 2011.

BASU, A.; FU, D.X.; WILKINSON, M.; SIMMONS, B. et al. Strawberries decrease atherosclerotic markers in subjects with metabolic syndrome. *Nutr Rev*, v. 30, n. 7, p. 462-469, 2010.

BASU, A.; RHONE, M.; LYONS, T.J. Berries: emerging impact on cardiovascular health. *Nutr Rev*, v. 68, n. 3, p. 168-177, 2010.

BASU, M.K.; RAY, M.I. Macrophage and Leishmania: an unacceptable coexistence. *Critical Reviews in Microbiology* 31: 145-154, 2005.

BAUR, J.A.; PEARSON, K.J.; PRICE, N.L.; JAMIESON, H.A. et al. Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. *Nature*, v. 444, pg. 337-342, 2006.

BEECHER, G.R. Overview of Dietary Flavonoids: Nomenclature, Occurrence and Intake. *J. Nutr.* 133: 3248S-3254S, 2003.

BEER D. Et al. Antioxidant activity of South African red and white cultivar wines: Free radical scavenging. *J. Agric. Food Chem.*, v.51, p.902-909, 2003.

BELLION, P.; OLK, M.; WILL, F.; DIETRICH, H. et al. Formation of hydrogen peroxide in cell culture media by apple polyphenols and its effect on antioxidant biomarkers in the colon cell line HT-29. *Mol Nutr Food Res*, v. 53, no. 10, pg. 1226-36, 2009.

BERNACCI, L.C.; MELETTI, L.M.M.; SOARES-SCOTT, M.D.; PASSOS, I.R.S. Espécies de maracujá: caracterização e conservação da biodiversidade. In FALEIRO, F.G. JUNQUEIRA, N.T.V.; BRAGA, M.F. (eds) *Maracujá: germoplasma e melhoramento genético*. Embrapa Cerrados, Planaltina, p. 559-586.

BERTELLI, A. A.; FERRARA, F.; DIANA, G.; FULGENZI, A. Resveratrol, a natural stilbene in grapes and wine, enhances intraphagocytosis in human promonocytes: a co-factor in antiinflammatory and anticancer chemopreventive activity. *Int. J. Tissue React*. 21:93–104, 1999.

BERTELLI, A.; BERTELLI, A.A.E.; GOZZINI, A.; GIOVANNINI, L. Plasma and tissue resveratrol concentrations and pharmacological activity. *Drugs Exp Clin Res*, 24:133– 8, 1998.

BHAT, K.P; PEZZUTO, J.M. Cancer chemopreventive activity of resveratrol. *Ann N Y Acad Sci*, n. 957, p. 210 – 229, 2002.

BHATIA, Y.; MISHRA, S.; BISARIA, V. S. Microbial  $\beta$ -glucosidases: cloning, properties and applications. *Critical Reviews in Biotechnology*, Philadelphia, v. 22, p. 375-407, 2002.

BOGDAN, C. Nitric oxide and immune response. *Nat Immunol*, 2: 907-916, 2001.

BOKOCH, G.M. Regulation of innate immunity by Rho GTPases. *Trends in Cell Biology* 15: 163-171, 2005.

BOZZA, P.T.; BANDEIRA-MELO, C. Mechanisms of leukocyte lipid body formation and function in inflammation. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 100: 113-120, 2005.

BOZZA, P.T.; MAGALHÃES, K.G.; WELLER, P.F. Leukocyte lipid bodies - biogenesis and functions in inflammation. *Biochim Biophys Acta*, 1791: 540-551, 2009.

BOZZA, P.T.; VIOLA, J.P. Lipid droplets in inflammation and cancer. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.*, v.82, p.243-250, 2010.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) [Internet]. Resolução nº 19 de 30 de abril de 1999. Aprova o Regulamento Técnico de procedimentos para registro de alimento com alegação de propriedades funcionais e ou de saúde em sua rotulagem. Disponível em >> [http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/727a7f004745792d8641d63fbc4c6735/RESOLUCAO\\_19\\_1999.pdf?MOD=AJPERES](http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/727a7f004745792d8641d63fbc4c6735/RESOLUCAO_19_1999.pdf?MOD=AJPERES)<< acesso em 30.novembro.2015.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) [Internet]. Resolução RDC nº 2, de 07 de janeiro de 2002. Aprova o Regulamento Técnico de Substâncias Bioativas e Probióticos Isolados com Alegação de Propriedades Funcional e ou de Saúde. Disponível em >> [http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/1c77370047457bcc8888dc3fbc4c6735/RDC\\_02\\_2002.pdf?MOD=AJPERES](http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/1c77370047457bcc8888dc3fbc4c6735/RDC_02_2002.pdf?MOD=AJPERES)<< acesso em 30.novembro.2015.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuário e Abastecimento [Internet]. Decreto nº 3.510, de 16 de junho de 2000. Altera dispositivos do Regulamento aprovado pelo Decreto nº 2.314, de 4 de setembro de 1997, que dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas. Disponível em >><http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=1012><< acesso em 29.setembro.2014

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuário e Abastecimento. Tabela de valores de IDR pelo Ministério da Saúde. Portaria MS nº 33, de 13 de janeiro de 1998. Disponível em >>[http://www.agricultura.gov.br/arq\\_editor/file/vegetal/RegistroAutorizacoes/Tabela\\_Valores\\_IDR\\_MinSaude.pdf](http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/vegetal/RegistroAutorizacoes/Tabela_Valores_IDR_MinSaude.pdf)<< acesso em 07.janeiro.2014

BRASIL. Ministério da Saúde (MS) [Internet]. Portaria No 1.944, de 27 de agosto de 2009. *Política Nacional de Atenção Integral à Saúde do Homem*. Disponível em >> [http://bvms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2009/prt1944\\_27\\_08\\_2009.html](http://bvms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2009/prt1944_27_08_2009.html) << acesso em 28.dezembro.2015.

BRUNET, L.R. Nitric oxide in parasitic infections. *Int Immunoph*, 1: 1457-1467, 2001.

BRYAN, N.S.; GRISHAM, M.B. Methods to detect nitric oxide and its metabolites in biological samples. *Free Radic Biol Med*, v. 43, p. 645-657, 2007.

BÜYÜKBALCI, A.; NEHIR EL, S. Determination of *In vitro* Antidiabetic Effects, Antioxidant Activities and Phenol Contents of Some Herbal Teas. *Plant Foods in Human Nutrition*, 63, 27–33, 2008.

CAI H. NAD(P)H oxidase-dependent self-propagation of hydrogen peroxide and vascular disease. *Circ Res*, 96: 818-822, 2005.

CAMPOS, A.V.S. Características físico-químicas e composição nutricional da polpa de *Passiflora setacea* / Angélica Vieira Sousa Campos; Orientação: Jean Kleber de Abreu Mattos; Coorientação: Ana Maria Barros – Brasília, 2010. 76 p. Dissertação de mestrado (M) – Universidade de Brasília / Faculdade de Agronomia e Veterinária, 2010.

CANTOS, E., ESPÍN, J.C., TOMÁS-BARBERÁN, F.A. Varietal differences among the polyphenol profiles of seven table grape cultivars studied by LC-DAD-MS-MS. *J. Agric. Food Chem.*, v.50, p.5691-5696, 2002.

CARNAVAL, P.E. Medidas e avaliação em ciências do esporte. 4. ed. Rio de Janeiro: Sprint, 2000.

CASIMIR, D.; KEFFOR, J.; WHITFIELD, F. Technology and flavor, chemistry of passion fruit juices and concentrates. *Advances in Food Research*, v. 27, p. 243-295, 1981.

CASTELLANO, L.R.C. Resposta imune anti-Leishmania e mecanismos de evasão Anti-Leishmania immune response and evasion mechanisms. *Bioline international*.101 VITAE Academia Biomédica Digital, 2005. Disponible in: [HTTP://www.bioline.org.br/request?va05017](http://www.bioline.org.br/request?va05017).

CASTILLA, P; ECHARRI, R.; DÁVALOS, A.; CERRATO, F. Concentrated red grape juice exerts antioxidant, hypolipidemic, and antiinflammatory effects in both hemodialysis patients and healthy subjects. *Am J Clin Nutr*, v. 84, n. 1, p. 252-262, 2006.

CASTILLA, P.; DÁVALOS, A.; TERUEL, J.L.; CERRATO, F. Comparative effects of dietary supplementation with red grape juice and vitamin E on production of superoxide by circulating neutrophil NADPH oxidase in hemodialysis patients. *Am J Clin Nutr*, v. 87, n. 4, p. 1053-1061, 2008.

CHANOCK, S.J.; BENNA, J.E.; SMITH, R.M.; BABIOR B. The respiratory burst oxidase. *The Journal of Biological Chemistry* 269: 24519-24522, 1994.

CHAU, C.F., HUANG, Y.L. Effects of the insoluble fiber derived from *Passiflora edulis* seed on plasma and hepatic lipids and fecal output. *Mol Nutr Food Res* 49: 786-790, 2005.

CLIFFORD, M.N. A nomenclature for phenols with special reference to tea. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 41(Suppl.): 393-397, 2001.

CLIFFORD, M.N. Chlorogenic acids and other cinnamates—nature, occurrence and dietary burden. *J Sci Food Agric* 1999;79:362–72.

CLIFFORD, M.N.; SCALBERT, A. Ellagitannins—occurrence in food, bioavailability and cancer prevention. *J Food Sci Agric* 2000;80:1118 –25.

COHEN, K.O. TUPINAMBÁ, D.D.; COSTA, A.M.; JUNQUEIRA, N.T.V.; FALEIRO, F.G.; SOUSA, H.N. BAIOCCHI, M.V. Compostos fenólicos e vitamina C na polpa do híbrido de maracujazeiro azedo BRS Ouro Vermelho. Comunicado Técnico 156, 5p. Embrapa Cerrados, Planaltina-DF, 2008.

COLES, L.T.; CLIFTON, P.M. Effect of beetroot juice on lowering blood pressure in free-living, disease-free adults: a randomized, placebo-controlled trial. *Nutrition Journal* 2012, 11:106

COMHAIR, S.A.A.; ERZURUM, S.C. Antioxidant responses to oxidant-mediated lung diseases. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*, v.283, p.L246-L255, 2002. Disponível em: >> <http://ajplung.physiology.org/content/ajplung/283/2/L246.full.pdf> <<. Acesso em: 07 de jul. 2015. doi: 10.1152/ajplung.00491.2001.

CONNER, E.M.; GRISHAM, M.B. Inflammation, free radicals, and antioxidants. *Nutrition* 1996; 12(4): 274-277.

CORRÊA, V. S. C.; MAYNIÊ, J. C.; FRANÇA, E. L.; HONÓRIO-FRANÇA, A. C. Atividade funcional de fagócitos na presença do fitoterápico “Mais Vida”. *Rev. Bras. Pl. Med.* n. 8, p. 26, 2006.

COSTA, A. M.; TUPINAMBÁ, D. D. O maracujá e suas propriedades medicinais – estado da arte. In: Faleiro, F. G.; Junqueira, N. T. V.; Braga, M. F. (Eds.) *Maracujá: germoplasma e melhoramento genético*. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2005. p. 475-506.

COSTA, A.D.; GARLID, K.D. Intramitochondrial signaling: interactions among mitoKATP, PKC epsilon, ROS and MPT. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 294: 874-882, 2007.

COSTA, A.M.; CAMPOS, A. V. S.; COHEN, K.O.; TUPINAMBÁ, D.D.; PAES, N.S.; SOUSA, H.N. E; SANTOS, A.L. DE B.S.; SILVA, K.N. DA; FARIA, D.A.; JUNQUEIRA, N.T.V.; FALEIRO, F.G. Características físico-química-funcional da polpa de *Passiflora setacea* recém processada e congelada. In: IX Simpósio Nacional do Cerrado e II Simpósio Internacional Savanas Tropicais: Desafio e estratégias para o equilíbrio entre a sociedade, agronegócio e recursos naturais. Resumos. 2008.

COUSSENS, L.M.; WERB, Z. Inflammation and cancer. *Nature*, 420: 860-867, 2002.

CUMAOGU, A.; RACHOVA, L.; STEFEK, M.; KARTAL, M.; MAECHLER, P.; KARASU, Ç. Effects of olive leaf polyphenols against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> toxicity in insulin secreting β-cells. *Acta Biochimica Polonica*, vol. 58 No. 1, pg. 45-50, 2011.

CUNICO, M. M.; CARVALHO, J. L. S.; KERBER, V. A.; HIGASKINO, C. E. K. Atividade antimicrobiana do extrato bruto etanólico de raízes e partes aéreas de *Ottonia martiana* Miq. (Piperaceae). *Rev. bras. farmacogn.* v.14, n.2, p. 97-103, 2004.

CZIHAY, G.; LANGER, H.; ZIEGLER, H. r, H. Flavonoid Biosynthesis. Berlin, Heidelberg, New York: Springer Verlag, 1976.

DAMASCENO, D.C. et al. Radicais livres, estresse oxidativo e diabete. *Diabetes Clínica*, v.5, n.5, p.355-361, 2002.

DANGLES, O.; DUFOUR, C. ; MANACH, C. ; MORAND, C. ; REMESY, C. Binding of flavonoids to plasma proteins. *Methods Enzymol*, No. 335, Pg. 319-333, 2001.

DELMAS, D., JANNIN, B., LATRUFFE, N. Resveratrol: Preventing properties against vascular alterations and ageing. *Mol. Nutr. Food Res.*, v.49, p. 377-395, 2005.

DENEV, P.; KRATCHANOVA, M.; CIZ, M. Biological activities of selected polyphenol-rich fruits related to immunity and gastrointestinal health. *Food Chem.* vol,157, pg. 37-44, 2014.

DENG, J.; ZHOU, Y.; BAI, M.; LI, H.; LI, L. Anxiolytic and sedative activities of *Passiflora edulis flavicarpa*. *Journal of Ethnopharmacology* 128, 2010.

DEVASAGAYAM, T.P.A; TILAK, J.C.; BOLOOR, K.K.; SANE, K.S.; GHASKADBI, S.S.; LELE, R.D. Free radical and antioxidant in human health: current status and future prospects. *Journal of the Association of Physicians of India*, v. 52, 2004.

DHAWAN, K. ; DHAWAN, S.; SHARMA, A. *Passiflora*: a review update. *Journal of Ethnopharmacology* 94, 1-23, 2004.

DHAWAN, K., KUMAR, S., SHARMA, A. Anti-asthmatic activity evaluation of methanol extract of leaves of *P. incarnata*. *Phytotherapy Research* 17, 821–822. 2003.

DOHADWALA, M.M.; HOLBROOK, M.; HAMBURG, N.M.; SHENOUDA, S.M. Effects of cranberry juice consumption on vascular function in patients with coronary artery disease. *Am J Clin Nutr*, v. 93, n. 5, p. 934-940, 2011.

DONOVAN, J.L.; MANACH, C.; RIOS, L. ; MORAND, C.; SCALBERT, A.; REMESY, C. Procyanidins are not bioavailable in rats fed a single meal containing a grapeseed extract or the procyanidin dimer B3. *Br J Nutr*, N. 87, pg 299-306, 2002.

DUSSE, L.M.S.A.; SILVA, R.M.M.; VIEIRA, L.M. et al. Does plasma nitrite determination by the Griess reaction reflect nitric oxide synthesis? *Clin Chim Acta*, v. 362, p. 195-197, 2005.

EDIRISINGHE, I; BANASZEWSKI, K.; CAPPOZZO, J.; MCCARTHY, D.; BURTON-FREEMAN, B.M. Effect of black currant anthocyanins on the activation of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) *in vitro* in human endothelial cells. *J Agric Food Chem* 59:8616–8624, 2011.

ELSAS, S.M.; ROSSI, D.J.; RABER, J.; WHITE, G.; SEELEY, C.A.; GREGOGY, W.L.; MOHR, C.; PFANKUCH, T.; SOUMYANATH, A. *Passiflora incarnate* L. (passionflower) extracts elicit GABA current in hippocampal neurons *in vitro*, and show anxiogenic and aticonvulsant effects *in vivo*, varying with extraction method. *Phytomedicine*. 2010 October; 17(12):940-949.

EMBRAPA CERRADOS. REDE PASSITEC ETAPA II DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO PARA USO FUNCIONAL DAS *PASSIFLORAS* SILVESTRES. Disponível em: <http://www.cpac.embrapa.br/passitec/revisaodeliteraturacompleta/>. Acesso em: 30 de nov. 2015.

EMMENDOERFFER, A.; HECHT, M.; BOEKER, T.; MUELLER, M.; HEINRICH, U. Role of inflammation in chemical-induced lung cancer. *Toxicol Lett*, 112-113: 185-191, 2000.

FALEIRO, FG; OLIVEIRA, EJ; ANDRADE, SEM; COSTA, AM; JUNQUEIRA, NTV. Biotecnologia aplicada à cultura do maracujazeiro. IN.: 2012 FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; FÁVERO, A. P.; LOPES, M. A. Pré-melhoramento de Plantas: experiências de sucesso. In: FALEIRO, F. G.; FARIAS NETO, A. L.; RIBEIRO JUNIOR, W. Q. (Eds). Pré-melhoramento, melhoramento e pós-melhoramento: estratégias e desafios. Planaltina: Embrapa Cerrados; Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2008. p. 45-62.

FERREIRA, A.L.; MATSUBARA, L.S. Free radicals: concepts, associated diseases, defense system and oxidative stress. *Rev Assoc Med Bras*, 43: 61-68, 1997. FINKEL, F.; HOLBROOK, N.J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*, v. 408, p. 239-247, 2000.

FERREIRA, F. R. Recursos Genéticos de *Passiflora*. In: FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F. (Eds). Maracujá: germoplasma e melhoramentogenético. Planaltina: EmbrapaCerrados, 2005. p. 41-51.

FISBERG, R.M.; SLATER, B.; MARCHIONI, D.M.L.; MARTINI, L.A. (Ed.) **Inquéritos alimentares: métodos e bases científicos**. Barueri: Manole, 2005. 334 p.

FORMAN, H.J.; TORRES, M. Reactive oxygen species and cell signaling. *The American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 166: S4-S8, 2002.

FORMICA, J.V.; REGELSON, W. Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. *Food Chem. Toxicol*, Oxford, v. 33, n.12, p. 1061-1080, 1995.

FRANÇA, E. L.; MAYNIÉ, J. C., CORREA, V. C.; PEREIRA, U. C. R.; BATALINI, C.; FERRARI, C. K B.; HONORIO-FRANÇA, A. C. Immunomodulatory effects of herbal plants plus melatonin on human blood phagocytes. *Int. J. Phytomed.*, n. 2, p. 354, 2010.

FRANÇA, E.L.; BITENCOURT, R.V.; FUJIMORI, M.; DE MORAIS, T.C. et al. Human colostrum phagocytes eliminate enterotoxigenic *Escherichia coli* opsonized by colostrum supernatant. *J Microbiol Immunol Infect.* v. 44, n. 1, p. 1-7, 2011.

FRANÇA, E.L.; MORCELI, G.; FAGUNDES, D.L.; RUDGE, M.V.C. Secretory IgA–Fc $\alpha$  receptor interaction modulating phagocytosis and microbicidal activity by phagocytes in human colostrum of diabetics. *V.* 119, n. 10, p. 710-719, 2011.

GOLDFINE, A.B.; FONSECA, V.; JABLONSKI, K.A.; PYLE, L.; STATEN, M.A.; SHOELSON, S.E. The effects of salsalate on glycemic control in patients with type 2 diabetes: a randomized trial. *Ann. Intern. Med.*, v.152, n.6, p.346-357, 2010.

GALLEANO, M.; PECHANOVA, O.; FRAGA, C.G. Hypertension, Nitric Oxide, Oxidants, and Dietary Plant Polyphenols. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, Vol. 11, Pg. 837-848, 2010.

GIULIVI, C. Characterization and function of mitochondrial nitric-oxide synthase. *Free Radic Biol Med*, v. 34, p. 397-408, 2003.

GONTHIER, M.P.; CHEYNIER, V. DONOVAN, J.L. et al. Microbial aromatic acid metabolites formed in the gut account for a major fraction of the polyphenols excreted in urine of rats fed red wine polyphenols. *J Nutr*, No. 133, pg 461-467, 2003.

GONZALEZ-ORTIZ, M.; MARTINEZ-ABUNDIS, E.; ESPINEL-BERMUDEZ, M.C.; PEREZ-RUBIO, K.G. Effect of pomegranate juice on insulin secretion and sensitivity in patients with obesity. *Anna Nutr Metab*, No.: 58, Pg.: 220-223, 2011.

GRASSI, D.; DESIDERI, G.; NECOZIONE, S.; LIPPI, C.; CASALE, R.; PROPERZI, G.; BLUMBERG, J.B.; FERRI, C. Blood Pressure Is Reduced and Insulin Sensitivity Increased in Glucose-Intolerant, Hypertensive Subjects after 15 Days of Consuming High-Polyphenol Dark Chocolate. *J Nutr*. Vol. 138, Pg. 1671–1676, 2008.

GREEN, L.C.; DE LUZURIAGA, K.R.; WAGNER, D.A.; RANT, W. et al. Nitrate biosynthesis in man. *Proc Natl Acad Sci USA*, 78: 7764-7768, 1981.

GRIENDLINK, K.K.; USHIO-FUKAL, M. Redox control of vascular smooth muscle proliferation. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 132: 9 – 15, 1998.

GUSMAN, J., MALONNE, H., ATASSI, G. A reapraisal of the potential chemopreventive and chemotherapeutic properties of resveratrol. *Carcinogenesis*, v.22, n.8, p. 1111-1117, 2001.

GUYTON, A.C.; HALL, J.E. *Textbook of Medical Physiology*. 10th. Philadelphia: Saunders, 2000.

HALLIWELL, B. Oxidative stress and cancer: have we moved forward? *Journal of Biochemistry*, 401, 1–11, 2007.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. In: *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford University Press: Oxford, U.K., 1998.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Lipid peroxidation: a radical chain reaction. In: \_\_\_\_\_. *Free radical in biology an medicine*. New York: Oxford University, 1999. p.189- 276.

HAMILTON, D.; AMBRUS, A.; DIETERLE, R.; FELSOT, A. et al. Pesticide residues in food - acude dietary exposure. *Pest Manag Sci* 60:311-339 DOI: 10.1002/PS.865, 2004.

HARBORNE, J.B. *Methods in Plant Biochemistry*. Em: Dey, P.M., Harborne, J.B. (eds) General

procedures and measurement of total phenolics, Academic Press, London, pp 1-28, 1989.

HARBORNE, J.B.; BAXTER, H. *The Handbook of Natural Flavonoids*; Wiley: West Sussex, UK, 1999; Volume 2.

HASSIMOTO, N.M.A.; PINTO, M.D.S.; LAJOLO, F.M. Antioxidant status in humans after consumption of blackberry (*Rubusfruticosus* L.) juices with and without defatted milk. *J. Agric. Food Chem.* 2008, 56, 11727-11733.

HAVSTEEN, B.H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacol. Ther.* 96: 67-2002, 2002.

HEIM, K. E.; TAGLIAFERRO, A. R.; BIBILYA, D. J. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *Journal of Nutritional Biochemistry*, New York, v. 13, p. 572-584, 2002.

HEINONEN, S.; NURMI, T.; LIUKKONEN, K. et al. *In vitro* metabolism of plant lignans: new precursors of mammalian lignans enterolactone and enterodiol. *J Agric Food Chem* 2001;49:3178 – 86.

HOLLMAN, P. C.; BIJSMAN, M. N.; VAN GAMEREN, Y.; CNOSSEN, E. P.; DE VRIES, J. H.; KATAN, M. B. The sugar moiety is a major determinant of the absorption of dietary flavonoid glucosides in man. *Free Radic Res* 31, 569-573, 1999.

HOLLMAN, P. C.; KATAN, M. B. Health effects and bioavailability of dietary flavonols. *Free Radic Res* 31(suppl.), S75-S-80, 1999.

HONG, J.; LU, H.; MENG, X.; RYU, J.H.; HARA, Y.; YANG, C.S. Stability, cellular uptake, biotransformation and efflux of tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3- gallate in HT-29 human colon adenocarcinoma cells. *Cancer Res* 62:7241–7246, 2002.

HONORIO-FRANÇA, A.C.; CARVALHO, M.P.; ISAAC, L.; TRABULSI, L.R.; CARNEIRO-SAMPAIO, M.M. Colostral mononuclear phagocytes are able to kill enteropathogenic *Escherichia coli* opsonized with colostral IgA. *Scand J Immunol.* v. 46, n. 1, p. 59-66, 1997.

HOTAMISLIGIL, G.S.; ERBAY, E. Nutrient sensing and inflammation in metabolic diseases. *Nat. Rev. Immunol.*, v.8, n.12, p.923-934, 2008.

IGNARRO, L.G. Nitric oxide as a unique signaling molecule in the vascular system: a historical overview. *J Physiol Pharmacol* 2002, 53:503–514.

International Life Sciences Institute North America Food Component Reports. Annual Report 2005 / North American Branch of the International Life Sciences Institute. One Thomas Circle, NW Ninth Floor Washington, DC 20005.5802. Disponível em: >> <http://www.ilsa.org/NorthAmerica/Documents/ABOUT%20US/2005%20Annual%20Report.pdf> <<  
Acesso em nov /2015

IORI, M.; KATAOKA, H.; SHAMSUL, H.M.; KIURA, K.; YASUDA, M. et al. Resveratrol Modulates Phagocytosis of Bacteria through an NF- $\kappa$ B-Dependent Gene Program. *Antimicrob Agents Chemother*, 52(1): 121–127, 2008.

IVANOVA, D.; TASINOV, O.; KISELOVA-KANEVA, Y. Improved lipid profile and increased serum antioxidant capacity in healthy volunteers after *Sambucus ebulus* L. fruit infusion consumption. *Int J Food Sci Nutr*, v. 65, n. 6, p. 740-744, 2014.

JACQUES, P.F.; AEDIN, C.; GAIL, R.; PETERSON, J.J. ; MEIGS, J.B. ; DWYER, J.T. Higher dietary flavonol intake is associated with lower incidence of type 2 diabetes. *American Society for Nutrition* 2013.

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

JUSTFOOD. Global Market review of functional foods – forecasts to 2012. Worcestereshire: Aroq, 2006. 84p.

KARLSEN, A.; PAUR, I.; BOHN, S.K.; SAKHI, A.K. et al. Blueberry juice modulates plasma concentration of NF-kappaB related inflammatory markers in subjects at increased risk of CVD.

European Journal of Nutrition, v.49, n.6, p.345-355, 2010.

KARLSSON, A.; NIXON, J.B.; MCPHAIL, L.C. Phorbol myristate acetate induces neutrophil NADPH-oxidase activity by two separate signal transduction pathways: dependent or independent of phosphatidylinositol 3-kinase. *Journal of Leukocyte Biology* Volume 67, March 2000.

KIM, H.; MONTANA, V.; JANG, H.; PARPURA, V.; KIM, J. Epigallocatechin Gallate (EGCG) Stimulates Autophagy in Vascular Endothelial Cells *A POTENTIAL ROLE FOR REDUCING LIPID ACCUMULATION. The Journal of Biological Chemistry*, v. 288, no. 31, pg. 22693 – 22705, 2013.

KLAUNIG, J.E.; KAMENDULIS, L.M. The role of oxidative stress in carcinogenesis. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2004; 44: 239-267.

KOMI, P.V. Força e potência no esporte. Ed. Artmed, 2009.

KONTA, E.M.; ALMEIDA, M.R.; AMARAL, C.L.; DARIN, J.D.C.; ROSSO V.V.; MERCADANTE, A.Z.; ANTUNES, L.M.G.; BIANCHI, M.L.P. Evaluation of the antihypertensive properties of yellow passion fruit pulp (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg.) in spontaneously hypertensive rats. *Phytotherapy Research, Phytother, Res*, 2013.

KURIYAMA, S.; HOZAMA, A.; OHMORI, K. ; SHIMAZU, T. ; MATSUI, T. ; EBIHARA, S., et al. Green tea consumption and cognitive function: a cross-sectional study from the Tsurugaya Project 1. *Am J Clin Nutr*, No.: 83, Pg.: 355-361, 2006.

KUSKOSKI, E.M; ASUERO, A.G; ,ORALES, M.T.; FETT, R. Frutos tropicais silvestres e polpas congeladas: atividade antioxidante, polifenóis e antocianinas. *Ciência Rural*, v.36, n.4, p.1283-1287, 2006.

LAROUX, F.S.; LEFER, D.J.; KAWACHI, S.; SCALIA, R. et al. Role of nitric oxide in the regulation of acute and chronic inflammation. *Antioxid Redox Signal*. 2000; 2: 391-396.

LEAN, M.E.J.; HAN, T.S.; MORRISON, C.E. Waist circumference as a measure for indicating need for weight management. *BMJ*. 1995; 311: 158-61.

LEE, J.N.; LEE, D.Y.; JI, I.H.; KIM, G.E. et al. Purification of soluble beta-glucan with immune-enhancing activity from the cell wall of yeast. *Biosci Biotechnol Biochem* 65:837–841, 2001.

LEIKERT, J.F.; RATHIEL, T.R.; WOHLFART, P. et al. Red wine polyphenols enhance endothelial nitric oxide synthase expression and subsequent nitric oxide release from endothelial cells. *Circulation* Vol. 106, Pg. 1614–1617, 2002.

LEIRO, J.; ALVAREZ, E.; GARCIA, D.; ORALLO, F. Resveratrol modulates rat macrophage functions. *Int. Immunopharmacol.* 2:767–774, 2002.

LIMA, H. C. de; CHAGAS, G. S. DAS; OLIVEIRA, L. T.; COSTA, A. M.; CELESTINO, S. M. C.; COHEN, K. de O.; TERÁN-ORTIZ, G. P.; MALAQUIAS, J. V.; FARIA, D. A. Indicadores de maturação para definição de ponto de colheita do maracujá selvagem (*Passiflora tenuifila*) cultivado na região de cerrado. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 21., 2010, Natal. Frutas: saúde, inovação e responsabilidade. Natal: SBF, 2010. 1 CD-ROM

LIMA, V.L.A.G.; MELO, E.A.; LIMA, D.E.S. Fenólicos e carotenóides totais em pitanga. *Scientia Agricola*, Piracicaba, v. 59, n.3, 2002.

LIMA, V.L.A.G.; MELO, E.A.; LIMA, L.S.; NASCIMENTO, P.P. Flavonoides em seleções de acerelo (*Malpighia* sp l.). 1- Teor de antocianinas e flavonoides totais. *Cienc. Rural*, Santa Maria, v.30, n.6, Dec. 2000.

LIN, J.K.; LIANG, Y.C.; LIN-SHIAU, S.Y. Cancer chemoprevention by tea poly-phenols through mitotic signal transduction blockade. *Biochem Pharmacol* 58: 911–915, 1999.

LOSCALZO, J. Nitric oxide insufficiency, platelet activation, and arterial thrombosis. *Circ Res.* 2001; 88: 756-762.

LUDEWIG, B.; ZINKERNAGEL, R.M.; HENGARTNER, H. Arterial inflammation and atherosclerosis. *Trends Cardiovasc Med*, 12:154 – 9, 2002.

LUZAK, B.; BONCLER, M.; RYWANIAK, J.; DUDZINSKA, D. et al. Extract from *Ribes nigrum* leaves *in vitro* activates nitric oxide synthase (eNOS) and increases CD39 expression in human endothelial cells. *J Physiol Biochem*, 70:1007–1019, 2014.

MAMMA, D.; HATZINIKOLAOU, D. G.; CHRISTAKOPOULOS, P. Biochemical and catalytic properties of two intracellular  $\beta$ -glucosides from the fungus *Penicillium decumbens* active on flavonoid glucosides. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, Amsterdam, v. 27, p. 183-190, 2004.

MANACH, C. ; SCALBERT, A. ; RÉMÉSY, C. ; MORAND, C. Polyphénols: consommation et biodisponibilité des polyphénols. *In : P S-M, V C (eds), Les polyphénols en agroalimentaire*. Paris, Éditions Tec & Doc Lavoisiers, Pg. 361-390, 2006.

MANACH, C.; DONOVAN, J.L. Pharmacokinetics and metabolism of dietary flavonoids in humans. *Free Radic Res*, No.: 38, pg.: 771-785, 2004.

MANACH, C.; MORAND, C. ; GIL-IZQUIERDO, A.; BOUTELOUP-DEMANGE, C. ; REMESY, C. Bioavailability in humans of the flavonones hesperidin and narirutin after the ingestion of two doses of orange juice. *Eur J Clin Nutr*, No. 57, Pg. 235-242, 2003.

MANACH, C.; WILLIAMSON, G.; MORAND, C.; SCALBERT, A.; RÉMÉSY, C. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *Am J Clin Nutr*, Jan;81(1 Suppl):230S-242S, 2005.

MARTÍNEZ, M.C.; ANDRIANTSITOHAINA, R. Reactive nitrogen species: molecular mechanism and potential significance in health and disease. *Antioxid Redox Signal*, v. 11, p. 669-702, 2009.

MEDINA-REMÓN, A.; TRESSERRA-RIMBAU, A.; PONS, A.; TUR, J.A. Effects of total dietary polyphenols on plasma nitric oxide and blood pressure in a high cardiovascular risk cohort. The PREDIMED randomized trial. *Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases*, v. 25, no. 60 - 67, 2015.

MELO, R.C.; DVORAK, A.M. Lipid body-phagosome interaction in macrophages during infectious diseases: host defense or pathogen survival strategy? *PLoS Pathog*, v. 8: e1002729, 2012.

MILENKOVIC, D.; DEVA, C.; DUBRAY, C.; MAZUR, A.; MORAND, C. Hesperidin displays relevant role in the nutrigenomic effect of orange juice on blood leukocytes in human volunteers: A randomized controlled cross-over study. *PLoS ONE* 6(11): e26669, 2011.

MILLER-KEANE; O'TOOLE, M. *Encyclopedia and Dictionary of Medicine, Nursing, and Allied Health*. 8<sup>a</sup> ed. ©, Saunders, impresso por Elsevier, Inc, 2005.

MONOBE, M.; EMA, K.; TOKUDA, Y.; MAEDA-YAMAMOTO, M. Enhancement of phagocytic activity of macrophage-like cells by pyrogallol-type green tea polyphenols through caspase signaling pathway. *Cytotechnology* Vol. 62, Pg. 201–203, 2010.

MORAND, C.; DUBRAY, C.; MILENKOVIC, D.; LIOGER, D.; MARTIN, J.F.; SCALBERT, A.; MAZUR, A. Hesperidin contributes to the vascular protective effects of orange juice: a randomized crossover study in healthy volunteers. *Am J. Clin Nutr* 2011;93:73-80. American Society for Nutrition. 2011.

MORAND, C. ; RABOT, S. ; THOMAS, M. ; SIESS, M. ; BOREL, P. AMIOT, M.J.; COXAM, V.; STRIGLER, F. Capítulo 5 : Biodisponibilité et métabolisme des phytomicronutriments. *In : Les phytomicronutriments*. Paris, Éditions Tec & Doc Lavoisiers, Pg. 49-65, 2012.

MORAND, C.; MANACH, C.; CRESPIY, V.; REMESY, C. Quercetin 3-O-beta-glucoside is better absorbed than other quercetin forms and is not present in rat plasma. *Free Radic Res*, No. 33, pg. 667-676, 2000.

MOSHAGE, H.; KOK, B.; HUIZENGA, J.R. et al. Nitrite and nitrate determinations in plasma: a critical evaluation. *Clin Chem*, v. 41, n. 6, p. 892-896, 1995.

MUNIZ-JUNQUEIRA, M.I.; SANTOS-NETO, L.L.; TOSTA, C.E. Influence of tumor necrosis factor- $\alpha$  on the ability of monocytes and lymphocytes to destroy intra-erythrocyte *Plasmodium falciparum* in vitro. *Cellular Immunology*. 208:73-79, 2001.

MUNIZ-JUNQUEIRA, M.I.; SILVA, F.O.; DE PAULA-JÚNIOR, M.R.; TOSTA, C.E. Thalidomide influences the function of macrophages and increases the survival of *Plasmodium berghei*-infected CBA mice. *Acta Trop*, 94: 128-138, 2005.

NAHMIA, Y.; GOLDWASSER, J.; CASALI, M.; VAN POLL, D.; WAKITA, T. et al. Apolipoprotein B-dependent hepatitis C virus secretion is inhibited by the grapefruit flavonoid naringenin. *Hepatology* 47: 1437–45, 2008.

NAPOLI, C.; IGNARRO, L.J. Nitric oxide and pathogenic mechanisms involved in the development of vascular diseases. *Arch Pharm Res*, v. 32, n. 8, p. 1103-1108, 2009.

NDIAYE, M.; CHATAIGNEAU, M.; LOBYSHEVA, I.; CHATAIGNEAU, T.; SCHINKERTH, V.B. Red wine polyphenol-induced, endothelium-dependent NO-mediated relaxation is due to the redox-sensitive PI3-kinase/Akt-dependent phosphorylation of endothelial NO-synthase in the isolated porcine coronary artery. *FASEB J* 19:455–457, 2005.

NEDIANI, C.; RAIMONDI, L.; BORCHI, E. et al. Nitric oxide/reactive oxygen species generation and nitroso/redox imbalance in heart failure: from molecular mechanism to therapeutic implication. *Antioxid Redox Signal*, v. 15, p. 289-331, 2011.

NICHOLSON, S.K.; TUCKER, G.A.; BRAMELD, J.M. Effects of dietary polyphenols on gene expression in human vascular endothelial cells. *Proc Nutr Soc Vol.* 67, Pg. 42–47, 2008.

NÚCLEO DE ESTUDOS E PESQUISAS EM ALIMENTAÇÃO (NEPA). Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TACO). 4<sup>a</sup> ed. Campinas: NEPA – UNICAMP, 2011. 40 p.

OBERLEY, R.E.; AULT, K.A.; NEFF, T.L.; KHUBCHANDANI, K.R. et al. Surfactant proteins A and D enhance the phagocytosis of Chlamydia into THP-1 cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 287:L296–L306, 2004.

OLIVEIRA, J.C.; RUGGIERO, C. Espécies de Maracujá com potencial agrônômico. In FALEIRO, F.G. JUNQUEIRA, N.T.V.; BRAGA, M.F. (eds) Maracujá: germoplasma e melhoramento genético. Embrapa Cerrados, Planaltina, p. 141-158.

OLIVEIRA, L. F.; NASCIMENTO, M. R. F.; BORGES, S. V.; RIBEIRO, P. C. N.; RUBACK, V.R. Aproveitamento alternativo da casca do maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* F. Flavicarpa) para produção de doce em calda. Ciênc. Tecnol. Aliment. vol.22 no.3 Campinas Sept./Dec. 2002.

OLSZEWER, E. Radicais livres em medicina. São Paulo: BYK, 1995. 204p.

ØSTERUD, B.; BJFRKLID, E. Role of monocytes in atherogenesis. *Physiol Rev* 2003;83:1069–112.

PACHER, P.; BECKMAN, J.S.; LIAUDET, L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev*, v. 87, p. 315-324, 2007.

PARK, Y.K.; SEE, S.H.; PARK, E.; KIM, J.S.; KANG, M.H. Changes in antioxidant status, blood pressure, and lymphocyte DNA damage from grape juice supplementation. *Ann N Y Acad Sci*, n. 1171, p.385-390, 2009.

PASSAMONTI, S.; VRHOVSEK, U. ; VANZO, A. ; MATTIVI, F. The stomach as a site for anthocyanins absorption from food. *FEBS Lett*, No. 544, Pg. 210-213, 2003.

PEISER, L.; GORDON, S. The function of scavenger receptors expressed by macrophages and their role in the regulation of inflammation. *Microbes Infect* Vol. 3, Pg. 149–159, 2001.

PENNINGS, M.; MEURS, I.; YE, D.; OUT, R.; HOEKSTRA, M. et al. (2006) Regulation of cholesterol homeostasis in macrophages and consequences for atherosclerotic lesion development. *FEBS Lett* 580: 5588–96.

PENTTINEN P; JAEHRLING, J.; DAMDIMOPOULOS A.E. et al. Dietderived polyphenol metabolite enterolactone is a tissue-specific estrogen receptor activator. *Endocrinology*, n. 148, p. 4875–4886, 2007.

PENTTINEN-DAMDIMOPOULOU, P.E.; POWER K.A.; HURMERINTA, T.T. et al. Dietary sources of lignans and isoflavones modulate responses to estradiol in estrogen reporter mice. *Mol Nutr Food Res* n. 53, p. 996–1006, 2009.

PEREIRA, M.G. Epidemiologia Teoria e Prática. Rio de Janeiro: Guanarabara Koogan, p.273, 2010.

PFORTE, H.; HEMPEL, J.; JACOBASCH, G. Distribution pattern of a flavonoid extract in the gastrointestinal lumen and all of rats. *Nahrung*, n.43, p.205-208, 1999.

PICK, E.; KEISARI, Y. A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture. *J Immunol Meth*, 38: 161-170, 1980.

PIETTA, P.G. Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Products*, v. 63, p. 1035- 1042, 2000.

PIGNATELLI, P.; SI SANTO, S.; BUCHETTI, B.; SANGUIGNI, V.; BRUNELLI, A.; VIOLI, F. Polyphenols enhance platelet nitric oxide by inhibiting protein kinase C-dependent NADPH oxidase activation: effect on platelet recruitment. *FASEB J. V. 20*, Pg. 1082–1089, 2006.

POLLOCK, M.L., WILMORE, J.H. Exercícios na Saúde e na Doença : Avaliação e Prescrição para Prevenção e Reabilitação. MEDSI Editora Médica e Científica Ltda., 233-362, 1993.

RAHMAN, I.; BISWAS, S.K.; KIRKHAM, P.A. Regulation of inflammation and redox signaling by dietary Polyphenols. *Biochemical Pharmacology*, 72, 1439-1452, 2006.

RAMOS, A.T.; CUNHA, M.A.L; SABAA-SRUR, A.U.O. PIRES, V.C.F.; CARDOSO, M.A.A.; DINIZ, M.F.M. MEDEIROS, C.C.M. Uso de *Passiflora edulis* f. flavicarpa na redução do colesterol. *Revista Brasileira de Farmacognosia, Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 17(4): 592-597- Out/Dez. 2007.

Rede de Inovação e Prospecção Tecnológica (RIPA). Estruturação de plataforma em C,T&I: segurança, qualidade e tecnologia de alimentos para o consumidor. Embrapa Agroindústrias de Alimentos, 2008.

RESHEF, N.; HAYARI, Y.; GOREN, C.; BOAZ, M. et al. Antihypertensive effect of sweetie fruit in patients with stage I hypertension, *American Journal Hypertension*, v.18, n.10, p.1360-1363, 2005.

RICART-JANÉ, D.; LLOBERA, M.; LÓPEZ-TEJERO, M.D. Anticoagulants and other preanalytical factors interfere in plasma nitrate/nitrite quantification by the Griess method. *Nitric Oxide*,

v. 6, n. 2, p. 178-185, 2002.

ROBERTS, R.A.; GARY, P.E.; JU, C. *et al.* Role of the Kupffer cell in mediating hepatic toxicity and arcinogenesis. *Toxicol Sci* 2007; 96: 2-15.

ROMITELLI, F.; SANTINI, S.A. CHIERIEI, E. *et al.* Comparison of nitrite/nitrate concentration in human plasma and sérum samples measured by the enzymatic batch Griess assay, ion-pairing HPLC and ion-trap GC-MS: the importance of a correct removal of proteins in the Griess assay. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, v. 851, p. 257-267, 2007.

ROY, M.; CHAKRABARTY, S.; SINHA, D.; BHATTACHARYA, R.K.; SIDDIQI, M. Anticlas- togenic, antigenotoxic and apoptotic activity of epigallocatechin gallate: a green tea polyphenol. *Mutat Res* 523–524:33–41, 2003.

RYAN, K.A.; SMITH, M.F. JR; SANDERS, M.K.; ERNST, P.B. Reactive oxygen and nitrogen species differentially regulate Toll-like receptor 4- mediated activation of NF kappaB and interleukin-8 expression. *Infect Immun* 2004; 72: 2123-2130.

RZEWNICKI, R.; AUWEELE, Y.V.; BOURDEAUDHUIJ, I.D. Addressing overreporting on the International Physical Activity Questionnaire (IPAQ) telephone survey with IGNARRO, L.G. Nitric oxide as a unique signaling molecule in the vascular system: a historical overview. *J Physiol Pharmacol*, v. 53, p. 503–514, 2002.

SAITO, Y.; SHIRAI, K.; SASAKI, N.; SHINIMIYA, M.; YOSHIDA, S. Prognosis of hypercholesterolemic patients taking pravastatin for five years: the Chiba Lipid Intervention Program (CLIP) study. *J Atheroscler Thromb*, v. 9, p. 99–108, 2002.

SANTOS, F.C.; RAMOS, J.D.; LIMA, L.C.O.; JUNQUEIRA, K.P.; REZENDE, J.C. Características físico-químicas do maracujazeiro silvestre *Passiflora setacea*. In: REUNIÃO TÉCNICA DE PESQUISAS EM MARACUJAZEIRO, 4, 2005, Planaltina. Trabalhos apresentados., Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2005. P. 143-146

SCALBERT, A.; MANACH, C.; MORAND, C.; RÉMÉSY, C. Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Critical Review in Food Science and Nutrition*, v.45, p. 287-306, 2005.

SERGEANT et al., 2010.

SETCHELL, K.D.; BROWN, N.M.; DESAI, P. et al. Bioavailability of pure isoflavones in healthy humans and analysis of commercial soy isoflavone supplements. *J Nutr*, No. 131, Pg. 1362S-1375S, 2001.

SHAHIDI, F.; NACZK, M. Food phenolics, sources, chemistry, effects, applications. Lancaster, PA: Technomic Publishing Co Inc, 1995.

SILVA, L.M.R.; FIGUEIREDO, E.A.T.; RICARDO, N.M.P.S.; VIEIRA, I.G.P.V.; FIGUEIREDO, R.W.; BRASIL, I.M.; GOMES, C.L. Quantification of bioactive compounds in pulps and by-products of tropical fruits from Brazil. *Food Chemistry*, No.: 143, Pg.: 398-404, 2014.

SIQUEIRA, E.M.D.A.; ROSA, F.R.; FUSTINONI, A.M.; DE SANT'ANA, L.P.; ARRUDA, S.F. Brazilian Savanna Fruits Contain Higher Bioactive Compounds Content and Higher Antioxidant Activity Relative to the Conventional Red Delicious Apple. *PLoS ONE* 8(8): e72826, 2013. doi:10.1371/journal.pone.0072826

SOARES, A. G. Antioxidantes, fenólicos, flavonoides e voláteis. Palestra In: II Workshop da Rede Passitec – Avanço tecnológico para uso funcional de *Passifloras* comerciais e silvestres, 18 a 20/05/2011. 8p. 2011.

SPENCER, J. P.; CHOWRIMOOTO, G.; CHOUDHURY, R.; DEBNAM, E. S.; SRAI, S. K.; RICE-EVANS, C. The small intestine can both absorb and glucuronidate luminal flavonoids. *FEBS Lett* 458, 224-230, 1999.

STADTMAN E.R.; LEVINE, R.L. Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. *Amino Acids*, 25, 207–218, 2003.

STEINBRECHER, U.P. Receptors for oxidized low density lipoprotein. *Biochim Biophys Acta* 1999;1436:279–98.

SUNTORNUSUK, L.; GRITSANAPUN, W.; NILKAMHANK, S.; PAOCHOM, A. Quantitation of vitamin C content in herbal juice using direct titration. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 28, p. 849-855, 2002.

TIRINATO, L.; LIBERALE, C.; FRANCO, S.D.; CANDELORO, P. et al. Lipid Droplets: A New Player in Colorectal Cancer Stem Cells Unveiled by Spectroscopic Imaging. *STEM CELLS*, n. 33, p. 35–44, 2015.

TOMAS-BARBERAN, F.A.; CLIFFORD, M.N. Dietary hydroxybenzoic acid derivatives and their possible role in health protection. *J Sci Food Agric* 2000;80:1024 –32.

TORRES-LEAL, F.L.; FONSECA-ALANIZ, M.H.; ROGERO, M.M.; TIRAPEGUI, J. The role of inflamed adipose tissue in the insulin resistance. *Cell. Biochem. Funct.*, v.28, n.8, p.623-631, 2010.

TSIKAS, D. Simultaneous derivatization and quantification of the nitric oxide metabolites nitrite and nitrate in biological fluids by gas chromatography/mass spectrometry. *Anal Chem*, v. 72, p. 4064-4072, 2000.

U.S. Department of Agriculture (USDA). *USDA Database for the Flavonoid Content of Selected Foods—2013*. 2013; Disponível em: [http://www.ars.usda.gov/SP2UserFiles/Place/80400525/Data/Flav/Flav\\_R03-1.pdf](http://www.ars.usda.gov/SP2UserFiles/Place/80400525/Data/Flav/Flav_R03-1.pdf) (Acesso em 14 de junho 2015).

UNDERHILL DM, OZINSKY A. Phagocytosis of microbes: complexity in action. *Ann Rev Immunol*, 20:825–52, 2002.

UNDERHILL, D.M.; GANTNER, B. Integration of Toll-like receptor and phagocytic signaling for tailored immunity. *Microbes Infect* Vol. 6, Pg. 1368–1373, 2004.

VALKO, M. et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, v.39, p.44-84, 2007.

VALKO, M.; RHODES, C.J.; MONCOL, J.; IZAKOVIC, M.; MAZUR, M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact* 2006; 160(1): 1-40.

VAN DER VEEN, R.C. Nitric oxide and T helper cell immunity. *Int Immunopharmacol*. 2001; 1: 1491-1500.

VATTEM D.A.; SHETTY K. Biological functionality of ellagic acid: a review. *Journal of Food*

Biochemistry, 29, 234–266, 2005.

VIEIRA, G.P. Compostos fenólicos, capacidade antioxidante e alcaloides em folhas e frutos (pericarpo, polpa e sementes) de *Passifloras* spp. [Dissertação de Mestrado]. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Área de Bromatologia. Universidade de São Paulo. São Paulo, 2013.

VITRAC, X.; MONI, J.P.; VERCAUTEREN, J.; DEFFIEUX, G.; MÉRILLON, J.M. Direct liquid chromatography analysis of resveratrol derivatives and flavanonols in wines with absorbance and fluorescence detection. *Anal Chim Acta*, 458:103–110, 2002.

WALLE, T. Absorption and metabolism of flavonoids. *Free Radic. Biol. Med.* 36: 829-837, 2004.

WALLERATH, T.; DECKERT, G.; TERNES, T. et al. Resveratrol, a polyphenolic phytoalexin present in red wine, enhances expression and activity of endothelial nitric oxide synthase. *Circulation* Vol. 106, Pg. 1652–1658, 2002.

WALLERATH, T.; POLEO, D.; LI, H. et al. Red wine increases the expression of human endothelial nitric oxide synthase: a mechanism that may contribute to its beneficial cardiovascular effects. *J Am Coll Cardiol* Vol. 41, Pg. 471–478, 2003.

WAN, H.C.; MELO, R.C.N.; JIN, Z.; DVORAK, A.M.; WELLER, P.F. Roles and origins of leukocyte lipid bodies: proteomic and ultrastructural studies. *FASEB J.* 2007; 21: 167-178.

WANG, X. Q.; WENK, E.; ZHANG, Z. H.; MENNEL, L.; VUNJAK-NOVAKOVIC, G. & KAPLA, D. L. Growth factor gradients via microsphere delivery in biopolymer scaffolds for osteochondral tissue engineering. *J. Control Rel.*, v. 134, p. 81-90, 2009.

WICKENS, A.P. Ageing and the free radical theory. *Respir Physiol* 2001; 128(3): 379-391.

WILLIAMS, R.J.; SPENCER, J.P.; RICE-EVANS, C. Flavonoids: antioxidants or signalling molecules? *Free Radicals Biol Med*, v.36, n.7, p.838-849, 2004.

WINKEL-SHIRLEY, B. Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology and biotechnology. *Plant Physiol.*, v.126, p.485-493, 2001.

World Health Organization (WHO). Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO Consultation. WHO Technical Report Series 894. Geneva: World Health Organization, 2000.

World Health Organization (WHO). Principles and Methods for the Risk assessment of Chemical in Food, Chapter 6 Dietary Exposure Assessment of Chemicals in Food, Report of a FAO/WHO Consultation. Disponível em: >> [http://whqlibdoc.who.int/ehc/WHO\\_EHC\\_240\\_9\\_eng\\_Chapter6.pdf](http://whqlibdoc.who.int/ehc/WHO_EHC_240_9_eng_Chapter6.pdf) << Geneva, Switzerland, 2009.

World Health Organization (WHO). Obesity and overweight. 2015. Disponível em: >> <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/> << Acesso em 28.dezembro.2015.

YAGI, H.; TAN, J.; TUAN, R.S. Polyphenols suppress hydrogen peroxide-induced oxidative stress in human bone-marrow derived mesenchymal stem cells. Journal of Cellular Biochemistry, v. 114, no. 5, 2013.

YAMAGISHI, M.; SHIMOYAMADA, Y.; NAKATSUKA, T.; MASUDA, K..Two R2R3-MYB genes, homologs of Petunia AN2, regulate anthocyanin biosyntheses in flower Tepals, tepal spots and leaves of asiatic hybrid lily. *Plant Cell Physiol.* 2010 Mar;51(3):463-74. Epub 2010 Jan 28. PMID: 20118109 [PubMed - indexed for MEDLINE]

YAMAGUCHI, Y.; YOSHIKAWA, N.; KAGOTA, S. et al. Elevated circulating levels of markers of oxidative-nitrative stress and inflammation in a genetic rat model of metabolic syndrome. *Nitric Oxide*, v. 15, p. 380-386, 2006.

YANG CS, CHEN L, LEE MJ, BALENTINE D, KUO MC, SCHANTZ SP (1998) Blood and urine levels of tea catechins after ingestion of different amounts of green tea by human volunteers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 7:351-354

YANG, G.Y.; LIAO, J.; LI, C.; CHUNG, J. et al. Effect of black and green tea polyphenols on c-jun phosphorylation and H(2)O(2) production in transformed and non-transformed human bronchial cell lines: possible mechanisms of cell growth inhibition and apoptosis induction. *Carcinogenesis* 21:2035–2039, 2000.

YOKOMIZO, A.; MORIWAKI, M. Myricitrin degraded by simulated digestion inhibits oxidation of human low-density lipoprotein. *Biosci Biotechnol. Biochem.* 69: 693-699, 2005.

YOON, S.; MOON, J.; SHIN, C. et al. Smoking status-dependent association of the 27-bp repeat polymorphism in intron 4 of endothelial nitric oxide synthase gene with plasma nitric oxide concentrations. *Clin Chim Acta*, v. 324, p. 113-120, 2002.

ZERAIK, M.L. Estudo analítico dos flavonoides dos frutos do maracujá (*Passiflora edulis* Sims f. *Flavicarpa* Degener). Instituto de Química de São Carlos. Tese de Doutorado. São Carlos, 2010.

ZHU, N.; HUANG, T.C.; YU, Y.; LAVOIE, E.J. et al. Identification of oxidation products of (–)-epigallocatechin gallate and (–)-epigallocatechin with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *J Agric Food Chem* 48:979–981, 2000.

ZHU, Y.; XIA, M. YANG, Y.; LIU, F.; ZHONGXIA, L. Et al. Purified anthocyanin supplementation improves endothelial function via NO-cGMP activation in hypercholesterolemic individuals. *Clin Chem.* Vol. 57, Pg.1524–1533, 2011.

## ANEXO 1 TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – TCLE

### *Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE*

Você está sendo convidado(a) a participar desta pesquisa. A sua participação é voluntária. Para participar, é necessário ler atentamente este documento e ouvir nossas explicações. Este documento será elaborado em *duas vias* e deverá ser rubricado em todas as páginas, e assinado no fim por você e pelo pesquisador responsável, caso opte por participar da pesquisa. Uma via é sua e a outra é do pesquisador responsável, como prevê a Resolução CNS No 466 de 2012.

**Nome da Pesquisa:** “Avaliação do efeito ateroprotetor do consumo do suco de *Passiflora setacea* por indivíduos saudáveis: uma abordagem *ex vivo*”

### **Descrição da Pesquisa**

- **Introdução:** Alimentos funcionais são aqueles que, além de nutrir o corpo, promovem outros benefícios para a saúde, como combate ao envelhecimento precoce e ao desenvolvimento de doenças. Essas ações podem ser explicadas pela presença de antioxidantes nesses alimentos, compostos que protegem as células contra danos e inflamações.

- **Objeto:** A *Passiflora setacea*, conhecida como BRS Pérola do Cerrado é uma espécie de maracujá silvestre do Cerrado e ela é rica em antioxidantes.

- **Objetivo:** Avaliar os benefícios do consumo de suco de *Passiflora setacea* no metabolismo vascular de homens saudáveis.

- **Forma de participação:** A sua participação se dará por meio de 1 (um) encontro, de duração de 3h15 no Laboratório de Imunologia Celular, Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Campus Darcy Ribeiro.

Você deverá chegar no Laboratório às 7h em jejum de 12h, serão coletadas 2 (duas) amostras de sangue pela equipe biomédica do laboratório. Imediatamente após, você deverá consumir 250mL do suco de *Passiflora setacea* e esperar durante 3 h onde desejar, sem fazer esforço físico ou atividades estressantes. Após esse tempo de espera, serão coletadas novamente 2 (duas) amostras de sangue. Ao fim do processo, uma café-da-manhã completo será disponibilizado a você.

### **Amostras**

Todas as análises serão feitas igualmente ANTES e APÓS o consumo do suco de *Passiflora setacea*, isso servirá para responder possíveis ações e alterações no corpo causadas pelo consumo do fruto.

- **Sangue:** Avaliar a presença e a produção de moléculas e compostos responsáveis pelas inflamações nas veias e artérias e formação de placas de gordura.

**Exclusividade:** As amostras e dados biológicos colhidos serão utilizados unicamente para as atividades descritas neste documento, tendo prazo para finalizar no ano de 2017. Após esse período, as amostras serão destruídas. Só será possível o uso dos dados para outros fins caso haja consentimento prévio do participante de pesquisa juntamente com a elaboração de um novo projeto de pesquisa para ser avaliado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, conforme prevê o Item III.12 da Res. CNS No 340 de 2004.

**Benefícios:** o benefício de sua participação nessa pesquisa é que o consumo do fruto pode ter propriedades calmantes e antiestresse, já demonstrado em estudos pilotos anteriores. Além disso, você contribuirá na descoberta dos efeitos do consumo desse fruto silvestre na saúde do ser humano, o que poderá ser caracterizado como um alimento funcional, um excelente aliado para compor a dieta da população do Cerrado e do Brasil.

**Riscos:** A polpa de *P. setacea* passou por testes de segurança e toxicidade feitos por pesquisadores da Embrapa. Porém, como haverá coleta de sangue, você poderá sentir tontura ou sentir desconforto no braço. Para isso, você terá a assistência da equipe biomédica do laboratório no local caso sinta algum mal-estar ou desconforto durante todo o procedimento da pesquisa.

Você terá garantia de indenização caso ocorra algum problema com a sua saúde, assim como o direito à assistência integral, gratuita devido a danos diretos/indiretos e imediatos/tardios, pelo tempo que for necessário ao participante da pesquisa.

**Sigilo:** Todas as amostras e resultados serão codificados, mantendo rigoroso sigilo através da omissão total de quaisquer informações que permitam identificá-lo(a), como prevê o item II.22 da Resolução CNS No 466 de 2012.

Informamos que você pode se recusar a responder (ou participar de qualquer procedimento) qualquer questão que lhe traga constrangimento, podendo desistir de participar da pesquisa em qualquer momento sem nenhum prejuízo para você.

**Divulgação de resultados:** Os resultados da pesquisa serão divulgados na Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília podendo ser publicados posteriormente. Os dados e materiais utilizados na pesquisa ficarão sob a guarda do pesquisador. O participante de pesquisa terá acesso a todos os resultados de exame se solicitados, de acordo com o item III.2.i da Res. CNS No 251 de 1997.

Se for o caso, o participante de pesquisa será encaminhado para um serviço de endocrinologia ou nutrição, caso sejam encontrados resultados que mereçam atenção nesse sentido, sem gerar custos ao participante, conforme prevê o item V.1.c da Res. CNS No 340 de 2004.

Se você tiver qualquer dúvida em relação à pesquisa ou à assinatura do TCLE, por favor entre em contato com Isabella Duarte (end.: SQS 107 Bl. H Ap. 407; tel.: 61 9996-8004), ou no CEP/FS-UnB (end.: Faculdade Ciências da Saude - Campus Darcy Ribeiro - Universidade de Brasília; tel.: 61 3107-1947, e-mail: cepfs@unb.br e horário de atendimento ao público de segunda-feira à sexta-feira das 10:00hs às 12:00hs e das 13:30hs às 15:30hs).

O CEP (Comité de Ética em Pesquisa) é um colegiado multi e transdisciplinar, independente, que existe para garantir a integridade e dignidade de participantes de pesquisas científicas e também para contribuir no desenvolvimento da pesquisa dentro de padrões éticos (Resolução nº 466/12 Conselho Nacional de Saúde).

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília. A pesquisadora responsável declara cumprir todas as exigências da Res. CNS 466 de 2012.

Brasília, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_.

---

Nome / assinatura Participante de Pesquisa

---

Pesquisador Responsável  
Isabella de Araújo Esteves Duarte

## ANEXO 2 DADOS BRUTOS

**Tabela 14.** Valores da produção de óxido nítrico (nitrito) por monócitos de voluntários com sobrepeso ( $\mu\text{M}$ ).

Nome	Placebo				Passiflora			
	Basal		LPS		Basal		LPS	
	0h	3h	0h	3h	0h	3h	0h	3h
<b>01</b>	6,46	7,62	9,05	8,01	39,90	37,74	62,83	107,88
<b>02</b>	6,86	6,57	26,61	13,55	35,95	37,53	36,44	47,72
<b>03</b>	6,35	5,96	6,45	10,76	39,29	38,06	67,23	45,25
<b>04</b>	6,27	6,18	6,17	6,22	35,52	40,58	37,11	38,66
<b>05</b>	35,85	35,71	38,18	49,19	44,96	26,72	17,24	18,39
<b>06</b>	37,06	37,94	35,49	38,42	5,49	6,33	6,04	6,44
<b>07</b>	36,85	38,55	36,58	37,57	6,37	14,49	6,26	16,37
<b>08</b>	36,12	76,50	44,86	522,00	-	-	-	-
<b>09</b>	-	-	-	-	38,31	37,59	35,97	38,39
<b>10</b>	-	-	-	-	6,33	9,71	6,68	9,83

**Tabela 15.** Valores do delta (%) da produção de óxido nítrico (nitrito) por monócitos de voluntários com sobrepeso ( $\mu\text{M}$ ).

Nome	Placebo		Passiflora	
	BASAL	LPS	BASAL	LPS
<b>01</b>	18,03	-11,45	-5,41	71,71
<b>02</b>	-4,13	-49,09	4,39	30,97
<b>03</b>	-6,20	66,79	-3,14	-32,70
<b>04</b>	-1,50	0,94	14,25	4,16
<b>05</b>	-0,40	28,84	-40,57	6,65
<b>06</b>	2,37	8,25	15,22	6,61
<b>07</b>	4,62	2,69	127,60	161,44
<b>08</b>	111,79	1063,51	-	-
<b>09</b>	-	-	-1,88	6,74
<b>10</b>	-	-	53,33	47,30

**Tabela 16.** Valores da produção de peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) por monócitos de voluntários com sobrepeso ( $\mu\text{M}$ ).

Nome	Placebo				Passiflora			
	Basal		PMA		Basal		PMA	
	0h	3h	0h	3h	0h	3h	0h	3h
<b>01</b>	8,643	8,479	3,071	5,099	1,17	1,17	1,12	1,19
<b>02</b>	1,939	3,146	2,842	3,245	1,22	1,17	1,24	1,22
<b>03</b>	1,815	2,731	1,419	1,293	1,14	1,17	1,14	1,32
<b>04</b>	1,490	1,767	1,419	1,459	1,13	1,19	1,13	1,19
<b>05</b>	1,170	1,170	1,120	1,140	2,04	3,92	1,64	5,76
<b>06</b>	1,120	1,170	1,120	1,120	1,88	1,73	1,60	1,78
<b>07</b>	1,140	1,120	1,140	1,120	1,77	1,55	1,82	1,55
<b>08</b>	1,220	1,120	1,190	1,170	-	-	-	-
<b>09</b>	-	-	-	-	1,12	1,09	1,14	1,12
<b>10</b>	-	-	-	-	10,66	9,77	5,30	5,75

**Tabela 17.** Valores do delta (%) da produção de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) por monócitos de voluntários com sobrepeso (μM).

<b>Nome</b>	<b>Placebo</b>		<b>Passiflora</b>	
	Basal	PMA	Basal	PMA
<b>01</b>	-1,90	66,04	0,00	6,25
<b>02</b>	62,25	14,18	-4,10	-1,61
<b>03</b>	50,47	-8,88	2,63	15,79
<b>04</b>	18,59	2,82	5,31	5,31
<b>05</b>	0,00	1,79	92,35	250,82
<b>06</b>	4,46	0,00	-7,99	10,87
<b>07</b>	-1,75	-1,75	-12,51	-15,19
<b>08</b>	-8,20	-1,68	-	-
<b>09</b>	-	-	-2,68	-1,75
<b>10</b>	-	-	-8,36	8,61

**Tabela 18.** Valores da capacidade fagocitária de monócitos de voluntários com sobrepeso em presença de leveduras não sensibilizadas (LNS).

voluntário	Placebo						Passiflora					
	0h			3h			0h			3h		
	MO%	Lev	IF	MO%	Lev	IF	MO%	Lev	IF	MO%	Lev	IF
<b>01</b>	46,75	1,90	91,00	15,00	1,61	24,00	8,70	1,10	9,58	28,16	1,75	54,74
<b>02</b>	38,34	1,92	73,44	23,00	2,08	48,00	35,20	2,14	75,20	68,93	2,44	167,96
<b>03</b>	13,93	2,14	29,85	7,62	1,31	11,53	6,07	1,14	7,16	19,84	0,54	10,56
<b>04</b>	57,67	2,77	159,53	16,08	1,86	31,86	62,17	2,66	165,23	71,00	3,35	236,75
<b>05</b>	20,67	1,25	39,50	15,51	1,01	14,63	17,63	1,61	30,07	7,88	1,95	15,27
<b>06</b>	57,13	2,27	129,97	75,00	2,61	196,50	3,17	1,29	4,07	5,48	1,58	8,68
<b>07</b>	66,25	2,21	146,25	69,62	2,31	161,00	1,74	1,50	2,61	12,12	1,61	19,29
<b>08</b>	59,75	2,13	130,25	7,71	0,52	4,19	-	-	-	-	-	-
<b>09</b>	-	-	-	-	-	-	62,71	2,16	136,82	80,06	2,45	197,35
<b>10</b>	-	-	-	-	-	-	16,74	1,77	29,01	10,25	1,66	16,75

**Tabela 19.** Valores do delta (%) da capacidade fagocitária de monócitos de voluntários com sobrepeso em presença de leveduras não sensibilizadas (LNS).

<b>voluntário</b>	<b>Placebo</b>			<b>Passiflora</b>		
	MO%	Lev	IF	MO%	Lev	IF
<b>01</b>	-67,91	-15,32	-73,63	223,76	59,69	471,35
<b>02</b>	-40,01	8,37	-34,64	95,83	14,05	123,35
<b>03</b>	-45,30	-38,75	-61,39	226,97	-52,89	47,51
<b>04</b>	-72,12	-32,81	-80,03	14,20	25,79	43,28
<b>05</b>	-24,96	-19,41	-62,96	-55,28	21,39	-49,21
<b>06</b>	31,28	15,24	51,19	72,99	23,15	113,04
<b>07</b>	5,08	4,64	10,08	596,85	7,18	639,29
<b>08</b>	-87,10	-75,39	-96,79	-	-	-
<b>09</b>	-	-	-	27,66	13,71	44,24
<b>10</b>	-	-	-	-38,78	-6,37	-42,26

**Tabela 20.** Valores da capacidade fagocitária de monócitos de voluntários com sobrepeso em presença de leveduras sensibilizadas (LS).

voluntário	Placebo						Passiflora					
	0h			3h			0h			3h		
	MO%	Lev	IF	MO%	Lev	IF	MO%	Lev	IF	MO%	Lev	IF
<b>01</b>	30,54	1,86	64,97	38,11	1,89	71,26	10,72	2,47	25,50	25,77	1,62	41,33
<b>02</b>	31,73	1,90	60,12	31,53	1,94	60,98	13,39	2,04	25,90	30,93	1,85	57,22
<b>03</b>	21,57	1,95	42,16	10,88	2,19	23,97	9,34	1,40	12,75	17,37	1,86	32,39
<b>04</b>	10,73	1,82	19,51	10,25	1,59	15,50	39,80	1,95	77,08	42,60	1,81	78,89
<b>05</b>	20,91	1,39	28,72	20,38	0,53	10,77	10,93	1,70	18,29	9,72	1,80	17,45
<b>06</b>	54,30	2,03	110,25	58,53	2,08	121,59	6,55	2,00	13,10	6,31	1,38	8,74
<b>07</b>	46,30	2,13	98,64	34,58	1,79	63,45	5,70	1,56	8,86	14,53	1,38	24,69
<b>08</b>	48,04	2,14	107,40	15,24	4,20	63,89	-	-	-	-	-	-
<b>09</b>	-	-	-	-	-	-	63,17	2,38	150,19	63,50	2,35	149,25
<b>10</b>	-	-	-	-	-	-	30,67	1,81	55,27	31,82	1,86	58,52

**Tabela 21.** Valores do delta (%) da capacidade fagocitária de monócitos de voluntários com sobrepeso em presença de leveduras sensibilizadas (LS).

voluntário	Placebo			Passiflora		
	MO%	Lev	IF	MO%	Lev	IF
<b>01</b>	24,78	1,69	9,68	140,30	-34,51	62,06
<b>02</b>	-0,62	2,04	1,43	130,93	-9,44	120,94
<b>03</b>	-49,55	11,92	-43,14	85,97	32,66	154,08
<b>04</b>	-4,49	-12,42	-20,56	7,05	-7,54	2,35
<b>05</b>	-2,51	-61,93	-62,51	-11,03	6,09	-4,61
<b>06</b>	7,79	2,56	10,28	-3,62	-30,77	-33,27
<b>07</b>	-25,31	-16,02	-35,67	155,10	-11,13	178,62
<b>08</b>	-68,28	96,24	-40,51	-	-	-
<b>09</b>	-	-	-	0,52	-1,34	-0,62
<b>10</b>	-	-	-	3,75	2,99	5,87

**Tabela 22.** Valores da expressão de corpúsculos lipídicos de monócitos de voluntários com sobrepeso (condição basal).

voluntário	Placebo						Passiflora					
	0h			3h			0h			3h		
	MO%	CL	IC	MO%	CL	IC	MO%	CL	IC	MO%	CL	IC
<b>01</b>	30,46	2,73	125,9	20,75	2,18	41,75	1,62	1,00	1,62	26,14	1,26	33,62
			7									
<b>02</b>	34,04	1,18	41,29	23	1,54	34	15,87	1,37	19,74	4,08	1	4,08
<b>03</b>	20,25	1,29	26,00	20,00	1,11	22,25	35,00	1,19	45,00	9,50	1,02	9,75
<b>04</b>	22,67	1,22	28,17	5,88	1,29	7,56	6,67	0,75	10,00	28,91	1,45	41,90
<b>05</b>	4,25	1,13	5,25	9,00	1,08	9,75	19,75	1,27	26,25	22,00	1,82	39,75
<b>06</b>	19,06	1,33	25,84	12,58	1,03	13,36	11,00	1,05	11,75	17,25	1,13	19,50
<b>07</b>	15,73	1,61	25,39	35,00	1,36	53,18	-	-	-	12,17	1,12	14,17
<b>08</b>	9,51	1,06	10,13	2,43	1,25	2,89	-	-	-	-	-	-
<b>09</b>	-	-	-	-	-	-	39,04	1,12	44,30	12,13	1,29	14,91
<b>10</b>	-	-	-	-	-	-	24,50	1,43	44,50	12,50	1,74	30,00

**Tabela 23.** Valores da expressão de corpúsculos lipídicos de monócitos de voluntários com sobrepeso (condição estimulada por LPS).

voluntário	Placebo						Passiflora					
	0h			3h			0h			3h		
	MO%	CL	IC	MO%	CL	IC	MO%	CL	IC	MO%	CL	IC
<b>01</b>	49,75	2,83	146,25	81,50	3,77	310,00	11,72	1,20	13,83	28,93	1,22	35,22
<b>02</b>	32,55	5,17	219,39	62,75	2,2	138	13,32	1,25	15,9	0	0	0
<b>03</b>	11,50	1,50	17,25	7,50	1,04	7,75	7,04	1,07	7,85	15,75	1,25	21,25
<b>04</b>	13,75	1,23	19,25	10,50	1,85	19,75	18,38	1,25	25,53	19,74	1,36	26,96
<b>05</b>	8,50	1,06	9,00	15,11	1,08	16,45	-	-	-	39,00	1,46	57,00
<b>06</b>	10,00	1,00	10,00	1,06	0,50	1,06	9,00	1,09	9,75	27,25	1,36	39,75
<b>07</b>	42,73	1,39	60,60	17,98	1,17	20,97	12,25	1,39	17,25	8,52	1,33	11,54
<b>08</b>	8,17	1,19	9,50	1,69	0,75	2,54	-	-	-	-	-	-
<b>09</b>	-	-	-	-	-	-	10,53	1,33	14,10	4,08	1,00	4,08
<b>10</b>	-	-	-	-	-	-	13,25	1,35	18,75	7,75	1,19	9,00

**Tabela 24.** Valores do delta (%) da expressão de corpúsculos lipídicos de monócitos de voluntários com sobrepeso (condições basal e estimulado por LPS).

voluntário	Placebo						Passiflora					
	MO%	BASAL CL	IC	MO%	LPS CL	IC	MO%	BASAL CL	IC	MO%	LPS CL	IC
<b>01</b>	31,88	20,26	66,86	-63,82	-33,19	-111,97	-1515,33	-25,72	-	-	-1,81	-154,58
<b>02</b>	32,43	-30,51	17,66	-92,78	57,45	37,10	74,29	27,01	1977,67	146,81	100,00	100,00
<b>03</b>	1,23	13,45	14,42	34,78	30,56	55,07	72,86	14,29	78,33	-	-16,42	-170,69
<b>04</b>	74,05	-5,39	73,15	23,64	-50,76	-2,60	-333,62	-93,12	-318,97	-7,40	-8,89	-5,60
<b>05</b>	-111,76	3,89	-85,71	-77,76	-1,55	-82,77	-11,39	-42,96	-51,43	-	-	-
<b>06</b>	33,98	22,15	48,30	89,36	50,00	89,36	-56,82	-7,06	-65,96	-	-24,96	-307,69
<b>07</b>	-122,48	15,36	-109,47	57,93	16,03	65,40	-	-	-	30,45	4,45	33,09
<b>08</b>	74,50	-18,00	71,48	79,25	36,87	73,24	-	-	-	-	-	-
<b>09</b>	-	-	-	-	-	-	68,92	-15,04	66,34	61,26	25,00	71,08
<b>10</b>	-	-	-	-	-	-	48,98	-22,39	32,58	41,51	11,42	52,00



Universidade de Brasília  
Faculdade de Ciências da Saúde  
Comitê de Ética em Pesquisa – CEP/FS

**PROCESSO DE ANÁLISE DE PROJETO DE PESQUISA**

**TÍTULO DO PROJETO:** “RESPOSTA DE EXPRESSÃO GÊNICA DE LEUCÓCITOS, DE ADESÃO MONOCITÁRIA, RESPOSTA NEURONAL E EXCREÇÃO DE METABÓLITOS EM INDIVÍDUOS SAUDÁVEIS APÓS CONSUMO DE POLPA DE PASSIFLORA SETACEA: UMA ABORDAGEM NUTRIGENÔMICA, METABOLÔMICA E IN VITRO.”

**PESQUISADORA RESPONSÁVEL:** ISABELLA DE ARAÚJO ESTEVES DUARTE

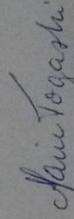
**DATA DE ENTRADA:** 03/09/2015

**CAAE:** 36348114.3.0000.0030

Com base na Resolução 466/12, do CNS/MS, que regulamenta a ética em pesquisa com seres humanos, o Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília, após análise dos aspectos éticos e do contexto técnico-científico, resolveu **APROVAR** o projeto intitulado “RESPOSTA DE EXPRESSÃO GÊNICA DE LEUCÓCITOS, DE ADESÃO MONOCITÁRIA, RESPOSTA NEURONAL E EXCREÇÃO DE METABÓLITOS EM INDIVÍDUOS SAUDÁVEIS APÓS CONSUMO DE POLPA DE PASSIFLORA SETACEA: UMA ABORDAGEM NUTRIGENÔMICA, METABOLÔMICA E IN VITRO.” Parecer nº 1.227.332, em 14 de setembro de 2015.

Notifica-se o(a) pesquisador(a) responsável da obrigatoriedade da apresentação de um relatório semestral e relatório final sobre o desenvolvimento do projeto, no prazo de 1 (um) ano a contar da data de aprovação.

Brasília, 16 de outubro de 2015.

  
Prof. Dra. Marie Togashi  
Coordenador do CEP-FS/UnB