



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

KARINE MARIA BOLL

**AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA E ANTIOXIDANTE DA  
*Passiflora incarnata* EM RATAS TRATADAS DURANTE A  
GESTAÇÃO E LACTAÇÃO**

KARINE MARIA BOLL

**AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA E ANTIOXIDANTE DA  
*Passiflora incarnata* EM RATAS TRATADAS DURANTE A  
GESTAÇÃO E LACTAÇÃO**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, da Universidade Estadual de Londrina – PR, como requisito para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Estefânia Gastaldello  
Moreira

Co-orientador: Prof. Dr. Décio Sabbatini  
Barbosa

Londrina  
2012

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da  
Universidade Estadual de Londrina**

**Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)**

B691a Boll, Karine Maria.  
Avaliação toxicológica e antioxidante da *Passiflora incarnata* em ratas tratadas durante a gestação e lactação / Karine Maria Boll. – Londrina, 2012.  
71 f. : il.

Orientador: Estefânia Gastaldello Moreira

Co-orientador: Décio Sabbatini Barbosa.  
Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde 2012.  
Inclui bibliografia.

1. *Passiflora incarnata*. – Teses. 2. Toxicidade reprodutiva – Teses. 3. Gestação. – Teses. 4. Lactação – Teses. 5. Estresse oxidativo – Teses. I. Moreira, Estefânia Gastaldello. II. Barbosa, Décio Sabbatini. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. IV. Título.

CDU 615.89618.2

KARINE MARIA BOLL

**AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA E ANTIOXIDANTE DA *Passiflora incarnata* EM RATAS TRATADAS DURANTE A GESTAÇÃO E LACTAÇÃO.**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, da Universidade Estadual de Londrina – PR, como requisito para obtenção do título de Mestre.

**BANCA EXAMINADORA**

Titulares

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Estefânia Gastaldello Moreira  
UEL – Londrina PR

---

Prof. Dr. Décio Sabbatini Barbosa  
UEL – Londrina – PR

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Rúbia Casagrande  
UEL – Londrina – PR

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Daniela Cristina Ceccatto Gerardin  
UEL – Londrina - PR

## Suplentes

---

Prof. Dr. Waldiceu Verri Júnior  
UEL – Londrina – PR

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Gislaine Garcia Pelosi Gomes  
UEL – Londrina - PR

Londrina, 27 de junho de 2012.

***À Irene, Luciano e Marco.  
Luz da minha vida e brilho dos meus olhos.***

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pela luz que clareou meu caminho até aqui.

Aos meus pais, Waldier Francisco Boll e Irene Boll, que me concederam a vida, me ensinaram os valores essenciais e que me mostraram, de um jeito ou de outro, que não se deve esmorecer.

Ao meu irmão, Luciano Carlos Boll, que sempre acreditou em mim e me incentivou em todos os momentos, a qualquer distância.

Ao Marco Antônio, companheiro que a vida me presenteou, parceiro e cúmplice de todos os momentos.

À minha orientadora, Dra. Estefânia Gastaldello Moreira, ou simplesmente Estefânia, que acolheu lindamente uma aluna “desconhecida”, que dedicou seu precioso tempo e muito de sua paciência para me ensinar que competência, ciência e amizade se encaixam perfeitamente.

Ao meu co-orientador, Dr. Décio Sabbatini Barbosa, que me direcionou a este caminho e que com seriedade e sensibilidade me acompanhou até aqui.

À professora Suzana Nixdorf, do departamento de Química, que prontamente abriu seu laboratório e nos acolheu.

Aos alunos de iniciação científica e pós-graduação do LAFT, André Bacchi, Luiz Fernando, Tiago, Bianca e Ana, que dedicaram seu trabalho e sua companhia.

Aos amigos do LPG/CCS, Chiara, Luciana, Kamila, Carine, Denise, que fizeram as tarefas mais leves e divertidas a todo momento.

Aos amigos da Divisão de Farmácia, do Laboratório de Análises Clínicas do HU/UUEL e da Secretaria de Pós-graduação, a todos que incentivaram, apoiaram e vivenciaram cada etapa comigo.

Ao Bruno, meu amigo João, que, talvez sem saber, acendeu a fagulha deste projeto.

A todos que estiveram comigo, que colaboraram direta ou indiretamente com este trabalho, inscritos em cada página, que além de ajudar, incentivaram minha conquista e que souberam entender minha ausência e minha justificativa de busca de sucesso. Pela paciência, pela compreensão e pelo carinho, muito obrigada!

***“A forma mais terrível de naufrágio é não partir.”***

*Amyr Klink*



BOLL, Karine Maria. **Avaliação toxicológica e antioxidante da *Passiflora incarnata* em ratas tratadas durante a gestação e lactação.** 2012. 71 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2012.

## RESUMO

A *Passiflora incarnata* é comercializada em muitos países como um produto fitoterápico. Embora a bula da maioria dos fitoterápicos recomende que eles sejam usados sob supervisão médica, estudos sobre a toxicidade reprodutiva e do desenvolvimento desses produtos são raros e não obrigatórios para fins regulatórios. Neste estudo, realizamos uma avaliação da toxicidade reprodutiva da *P. incarnata* administrada a ratas Wistar (30 ou 300mg/kg, gavagem) durante a gestação e lactação. Além disso, considerando as propriedades antioxidantes que têm sido atribuídas aos flavonoides presentes no gênero *Passiflora*, também foi avaliado o equilíbrio antioxidante/prooxidante no plasma destas fêmeas e conduzido um teste *in vitro* para avaliar o potencial antioxidante. O tratamento com *P. incarnata* não influenciou o peso corporal das fêmeas, bem como indicadores de toxicidade reprodutiva (perdas pós-implantação, número de filhotes vivos e peso da ninhada) e os parâmetros de função hepática (albumina, AST, ALT, GGT). A propriedade antioxidante da *P. incarnata* foi evidenciada tanto *in vivo* (aumento do potencial antioxidante total plasmático) e *in vitro* (diminuição do *burst respiratório* em neutrófilos). Os resultados deste estudo indicam que, nas condições experimentais avaliadas, o tratamento com *P. incarnata* durante a gestação e lactação apresentou efeito antioxidante, na ausência de toxicidade reprodutiva materna.

**Palavras-chaves:** *Passiflora incarnata*. Toxicidade reprodutiva. Gestação. Lactação. Estresse oxidativo.

BOLL, Karine Maria. **Toxicological and antioxidant evaluation of *Passiflora incarnata* in rats treated during gestation and lactation.** 2012. 71 p. Dissertation (Master's Degree Dissertation) – State University of Londrina, Londrina, 2012.

## ABSTRACT

*Passiflora incarnata* is marketed in many countries as a phytomedicine. Even though the physician prescribing directions of most marketed phytomedicines recommend them to be used under medical supervision, reproductive and developmental studies are sparse and not mandatory for regulatory purposes. In this study, we conducted a reproductive toxicity evaluation of *P. incarnata* administered to Wistar rats (30 or 300 mg/kg, gavage) during pregnancy and lactation. Moreover, considering that antioxidant properties have been attributed to flavonoids present in the genus *Passiflora*, we have also evaluated the antioxidant/pro-oxidant balance in the plasma of these dams and conducted an *in vitro* test to evaluate antioxidant potential. *P. incarnata* treatment did not influence dams' body weight as well as reproductive (post-implantation loss, litter size, litter weight) and hepatic function (albumin, AST, ALT, GGT) parameters. The antioxidant property of *P. incarnata* was evidenced both *in vivo* (increase in the total antioxidant plasmatic potential) and *in vitro* (decrease in neutrophil-induced respiratory burst). The results from the present study indicate that under the experimental conditions evaluated, *P. incarnata* treatment during gestation and lactation presented antioxidant effect in the absence of maternal reproductive toxicity.

**Keywords:** *Passiflora incarnate*. Reproductive toxicity. Pregnancy. Lactation. Oxidative stress.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1'** – Arena para realização do teste de campo aberto.....21
- Figura 1** – Weight gain of dams treated with *P. incarnata* during gestation and lactation.....36
- Figura 2** – Activation of human neutrophils by PMA in the absence (control) or presence of *P. incarnata* (5 or 10  $\mu$ L) or base syrup (10  $\mu$ L). Each group was composed by 8-10 replicates. A. Kinetic curves obtained each other minute for 60 minutes. B. Box plot of the peak values from the kinetic curves. Data were analyzed by Kruskal-Wallis complemented with Dunn's test. \*  $p < 0.05$  compared to CON; #  $p < 0.05$  compared to base syrup .....37

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1 –</b>	Reproductive parameters of dams treated with <i>P. incarnata</i> during gestation and lactation .....	38
<b>Tabela 2 –</b>	General activity in the open-field of dams treated with <i>P. incarnata</i> during gestation and lactation.....	38
<b>Tabela 3 –</b>	Plasmatic parameters of hepatic function of dams treated with <i>P. incarnata</i> during gestation and lactation .....	39
<b>Tabela 4 –</b>	Plasmatic oxidative stress parameters in dams treated with <i>P. incarnata</i> during gestation and lactation .....	40

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>ABTS</b>	2,2-azinobis-3-etil-benzotiazolina-6-ácido sulfônico
<b>ALT</b>	alanina aminotransferase
<b>ANCOVA</b>	<i>Analysis of covariance</i> ou análise de covariância
<b>ANOVA</b>	<i>Analysis of variance</i> ou análise de variância
<b>ANVISA</b>	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
<b>AOPP</b>	<i>Advanced oxidation protein products</i> ou produtos avançados de oxidação protéica
<b>AST</b>	aspartato aminotransferase
<b>CCB</b>	Centro de Ciências Biológicas
<b>CCS</b>	Centro de Ciências da Saúde
<b>CEEA</b>	Comitê de Ética em Experimentação Animal
<b>COM</b>	grupo de tratamento controle
<b>DG</b>	dia gestacional
<b>DL</b>	dia lactacional
<b>DNA</b>	ácido desoxirribonucleico
<b>DPPH</b>	2,2'-difetil-1-picrilhidrazilo
<b>ERN</b>	espécie reativa do metabolismo do nitrogênio
<b>ERO</b>	espécie reativa do metabolismo do oxigênio
<b>ICH</b>	<i>International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use</i>
<b>LPG</b>	Laboratório de Pós Graduação
<b>MDA</b>	dialdeído malônico
<b>NO</b>	óxido nítrico
<b>P30</b>	grupo de tratamento com <i>Passiflora incarnata</i> 30mg/kg
<b>P300</b>	grupo de tratamento com <i>Passiflora incarnata</i> 300mg/kg
<b>PBS</b>	<i>phosphate buffered saline</i> ou tampão fosfato-salino
<b>PMA</b>	<i>phorbol miristate acetate</i> ou acetato de forbol miristato
<b>RDC</b>	Resolução da Diretoria Colegiada
<b>RENISUS</b>	Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema Único de Saúde

<b>RMANOVA</b>	<i>Repeated measures analysis of variance</i> ou análise de variância para medidas repetidas
<b>SUS</b>	Sistema Único de Saúde
<b>TGO</b>	transaminase oxaloacética
<b>TGP</b>	transaminase pirúvica
<b>TRAP</b>	potencial antioxidante total
<b>UEL</b>	Universidade Estadual de Londrina

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	14
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	18
2.1	OBJETIVO GERAL .....	18
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	18
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	19
3.1	ANIMAIS, TRATAMENTO E DESENHO EXPERIMENTAL.....	19
3.2	AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA .....	20
3.2.1	Indicadores Gerais de Toxicidade .....	20
3.2.2	Indicadores de Toxicidade Reprodutiva.....	21
3.2.3	Indicadores de Função Hepática .....	21
3.3	AVALIAÇÃO DO BALANÇO ANTIOXIDANTE/PRÓ-OXIDANTE .....	22
3.3.1	Parâmetros Plasmáticos.....	22
3.3.2	Avaliação da Capacidade Antioxidante In Vitro (Burst Respiratório ou Explosão Respiratória) .....	23
3.4	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	24
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO – ARTIGO</b> .....	26
<b>5</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	41
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	42
	<b>ANEXOS</b> .....	46
	<b>ANEXO A</b> - Trap sérico.....	47
	<b>ANEXO B</b> - Determinação de MDA – HPLC .....	51
	<b>ANEXO C</b> - Método de fox .....	57
	<b>ANEXO D</b> - AOPP (advanced oxidation protein products).....	59
	<b>ANEXO E</b> - Determinação de nitratos (óxido nítrico) em microplaca .....	62
	<b>ANEXO F</b> - Burst respiratório – microplac.....	67

## 1 INTRODUÇÃO

Os produtos vegetais têm sido amplamente utilizados no mundo inteiro (Yunes e Calixto, 2001; Buttar e Jones, 2003; Koren et al., 2008). Nos países pobres, eles representam uma alternativa terapêutica economicamente viável; nos países ricos, uma alternativa terapêutica em consonância com o modismo de consumo de substâncias naturais. A maioria dos usuários de produtos vegetais acredita na segurança de tais produtos, uma vez que são naturais (Buttar e Jones, 2003). Essa crença torna esses produtos atraentes para populações consideradas especiais, como crianças, idosos e gestantes.

Em 2006, o governo federal brasileiro publicou o Decreto nº 5813 (de 22 de junho de 2006) aprovando a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos com o objetivo de garantir à população brasileira o acesso seguro e o uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos. Desde então, vários documentos têm sido elaborados para que o objetivo deste programa seja atingido. Entre esses documentos, encontra-se a RENISUS (Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema Único de Saúde), publicada em fevereiro de 2009 pelo Ministério da Saúde (Brasil, 2009). Esta lista compreende 71 espécies ou gêneros vegetais tradicionalmente usados no Brasil com potencial de avançar nas etapas da cadeia produtiva e de gerar produtos de interesse ao Sistema Único de Saúde (SUS). Apesar do Brasil ter sido um dos países pioneiros em estabelecer políticas regulatórias para produtos vegetais sob a classificação de medicamentos e não de suplementos alimentares, as exigências regulatórias para medicamentos alopáticos e fitoterápicos diferem. Por exemplo, para o registro de fitoterápicos não se exigem ensaios pré-clínicos para avaliação de toxicidade reprodutiva e do desenvolvimento, bem como de carcinogênese. Embora a falta de exigência para esses estudos deva-se, em parte, ao elevado custo dos mesmos, a falta de estudos avaliando a segurança de fitoterápicos sobre a reprodução e o desenvolvimento tem sido objeto de preocupação de grupos de pesquisadores em diferentes países (para alguns exemplos, Buttar e Jones, 2003; Jurgens, 2003; Costa et al., 2004; Koren et al., 2008; Veríssimo et al., 2011) devido ao apelo que esses produtos considerados naturais têm para gestantes e lactantes. Entre as espécies listadas na RENISUS, encontra-se a *Passiflora incarnata* (maracujá). O gênero *Passiflora* é composto por mais de 400 espécies popularmente utilizadas na Europa e na América como



ansiolíticas, sedativas e hipnóticas (Ramos et al., 2007). Esses usos populares são comprovados farmacologicamente (Soulimani et al., 1997; Paris et al., 2002) e sabe-se que as espécies do gênero *Passiflora* agem, pelo menos em parte, potencializando a ação do sistema GABAérgico (Zanoli et al., 2000; Grundmann et al., 2008).

A *P. incarnata* é comercializada em muitos países, incluindo o Brasil, como medicamento fitoterápico (Soulimani et al., 1997; Zanoli et al., 2000). Em 2008, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) publicou a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 95, de 11 de dezembro, regulamentando o texto da bula de 13 medicamentos fitoterápicos visando à uniformização da informação que diferentes registrantes trazem quanto às indicações terapêuticas, informações farmacológicas (farmacocinéticas e farmacodinâmicas), contraindicações, reações adversas e interações medicamentosas. A bula aprovada para a *P. incarnata* indica que o uso durante a gravidez e/ou amamentação pode ser realizado sob orientação do médico ou do cirurgião dentista. Esta restrição está baseada em um único estudo existente na literatura conduzido em 1940 e que sugeriu atividade uterotônica desta planta detectada em um experimento realizado *in vitro* (Ruggy e Smith, 1940).

Frente ao acima exposto, o primeiro objetivo desse trabalho foi conduzir um estudo experimental para avaliar, em ratos, a toxicidade materna e reprodutiva da *P. incarnata*. O delineamento desse estudo seguiu orientações contidas no guia S5(R2) da *International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use* (ICH, 2005), uma agência internacional que publica guias para a condução de estudos pré-clínicos farmacológicos e toxicológicos com fármacos.

Além da ação no Sistema Nervoso Central, atividade antioxidante também tem sido descrita para o gênero *Passiflora*.

O termo estresse oxidativo refere-se ao desequilíbrio entre a produção de radicais livres e a atividade do sistema antioxidante dos organismos. Um radical livre é qualquer espécie capaz de existir independentemente com um ou mais elétrons de sua última camada eletrônica desemparelhados. Altamente reativos, os radicais livres estão envolvidos na produção de energia (metabolismo respiratório), na fagocitose, na regulação do crescimento celular, na sinalização intercelular (Barreiros et al. 2006). No entanto, produção elevada destas moléculas sem a compensação do sistema antioxidante resulta em danos celulares, provocando a

peroxidação de lipídios das membranas, inativando proteínas e carboidratos, bem como alterando bases nos ácidos nucleicos.

Sob um determinado ponto de vista, o termo radical livre não seria ideal para designar todos os agentes reativos patogênicos, pois alguns deles não apresentam elétrons desemparelhados em sua última camada. Como em sua maioria são derivados do metabolismo do oxigênio e do nitrogênio, podemos usar os termos espécies reativas do metabolismo do oxigênio (EROs) ou do nitrogênio (ERNs) (Ferreira et al., 1997).

O sistema de defesa antioxidante é formado por agentes que previnem a ação nociva dos EROs ou ERNs. Estes podem ser enzimas como superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase ou substâncias de baixo peso molecular como glutathione,  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E) e ácido ascórbico (vitamina C) (Prior e Cao, 1999). A ação antioxidante ocorre pelo impedimento de formação das espécies reativas, pela interceptação das já formadas e pelo reparo das lesões causadas pelas mesmas. Ainda, vale mencionar que frente a um aumento na concentração de espécies reativas, o organismo é capaz, ainda que de maneira limitada, de se adaptar a essa agressão e aumentar a disponibilidade das substâncias antioxidantes ativas.

A atividade antioxidante das espécies do gênero *Passiflora* é atribuída aos flavonoides (Masteikova et al., 2008; Elsas et al., 2010). Na espécie *P. incarnata*, os flavonoides são os fitoconstituintes mais abundantes (Raffaelli et al., 1997) e Masteikova et al. (2008) descreveram atividade antioxidante dos extratos aquoso e alcoólico de *P. incarnata in vitro* frente ao 2,2'-difeníl-1-picrilhidrazilo (DPPH) e ao 2,2-azinobis-3-etil-benzotiazolina-6-ácido sulfônico (ABTS).

Flavonoides são substâncias fenólicas, derivadas do metabolismo de plantas (Camargo et al., 2006) que estabilizam e deslocam um elétron desemparelhado dentro de seu anel aromático e são capazes de reduzir a formação de radicais livres ou de sequestrá-los. Ainda, os flavonoides são capazes de quelar íons metálicos que podem catalisar reações de lipoperoxidação (Bravo, 1998). Com essas ações, os flavonoides agem como protetores de células contra EROs e ERNs (Knekt et al., 2002). Entre as substâncias isoladas dos extratos etanólico e aquoso da *P. incarnata* estão a isovitexina, quercitina, luteolina, vicenina, rutina, hiperosídeo, ácido caféico, ácido clorogênico, hiperosídeo, orientina, escutelarina e vitexina (Masteikova et al., 2008). Estudos vêm sendo realizados para se determinar o perfil

de flavonoides de várias espécies do gênero *Passiflora* (Freitas et al., 2007, Chabariberi et al., 2009, De Souza e González-Ortega, 1997, Pereira e Villegas, 2000) e uma dificuldade comumente encontrada tem sido a padronização das concentrações dos flavonoides pois as mesmas podem variar bastante de acordo com a região de plantio, o clima durante a maturação e a parte da planta coletada.

Frente ao acima exposto e considerando a ausência de estudos investigando o efeito antioxidante da *P. incarnata in vivo*, o segundo objetivo desse trabalho foi avaliar a atividade antioxidante dessa espécie. Essa avaliação foi feita no plasma das fêmeas utilizadas no estudo de toxicidade reprodutiva bem como em um estudo *in vitro* realizado com neutrófilos humanos.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a toxicidade reprodutiva e a atividade antioxidante da *P. incarnata*.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

a) Avaliar indicadores gerais de toxicidade (ganho de peso, bem-estar geral, atividade geral) e função hepática (albumina, proteínas totais, gama-glutamil-transferase, aspartato aminotransferase e alanina aminotransferase) em ratas tratadas com *P. incarnata* durante a gestação e lactação.

b) Avaliar indicadores de toxicidade reprodutiva (duração da gestação, número de filhotes vivos e mortos, perda pós-implantação uterina) em ratas tratadas com *P. incarnata* durante a gestação e lactação.

c) Avaliar indicadores de atividade antioxidante (capacidade antioxidante total plasmática) e pró-oxidante (dialdeído malônico, hidroperóxidos lipídicos, óxido nítrico, e produtos avançados de oxidação protéica) no plasma de ratas tratadas com *P. incarnata* durante a gestação e lactação.

d) Avaliar a atividade antioxidante *in vitro* da *P. incarnata* no teste de *burst* respiratório em neutrófilos humanos.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado de acordo com o item 4.1.2 do guia S5 (R2) da ICH, que padroniza os procedimentos para a avaliação da toxicidade reprodutiva e do desenvolvimento de fármacos/medicamentos (ICH, 2005).

Os procedimentos experimentais realizados neste trabalho foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual de Londrina (CEEAA-UEL 16/2010).

#### 3.1 ANIMAIS, TRATAMENTO E DESENHO EXPERIMENTAL

Ratos e ratas Wistar (75-90 dias) fornecidos pelo Biotério Central da UEL foram mantidos no biotério do Departamento de Ciências Fisiológicas, Centro de Ciências Biológicas (CCB), com temperatura controlada  $21 \pm 2^\circ \text{C}$ , ciclo claro-escuro de 12 horas (luzes ligadas às 07:00) e livre acesso à água e ração (Nuvital<sup>®</sup>).

Os animais foram acasalados durante a noite e, para isso, foi colocado um macho em cada gaiola contendo 2 ou 3 fêmeas. No dia em que se detectou a presença de espermatozoides e células queratinizadas indicativas da fase estro no esfregaço vaginal foi considerado dia gestacional zero (DG 0). As ratas foram alojadas individualmente e separadas aleatoriamente entre os grupos controle (CON) ou tratados com *P. incarnata*. O tratamento ocorreu diariamente por gavagem e se estendeu do DG 0 ao dia lactacional (DL) 21. Como fonte de *P. incarnata* foi utilizado o xarope Passiene<sup>®</sup> do laboratório Herbarium<sup>®</sup>, cuja padronização é realizada pela concentração do flavonoide vitexina (0,19%). As fêmeas pertencentes ao grupo CON (n = 15) receberam água. As fêmeas pertencentes aos grupos tratados com *P. incarnata* receberam 30 mg/kg/dia (P30, n = 17) ou 300 mg/kg/dia (P300, n = 14). Em humanos, a dose diária recomendada de *P. incarnata* é de 20 a 30 mg/kg/dia. As ratas foram pesadas diariamente e a dose ajustada de acordo com o peso corpóreo.

No dia do parto (DL 0), o número de filhotes vivos e mortos foi contabilizado e as ninhadas, pesadas. No DL 21, as ratas foram avaliadas no teste de campo aberto e seus filhotes, desmamados. No dia seguinte, elas foram pesadas, anestesiadas com éter etílico e sangue foi coletado por punção cardíaca em seringa heparinizada. Logo em seguida, realizou-se a retirada do fígado para

pesagem e do útero para quantificação dos sítios de implantação uterina. As amostras sanguíneas foram centrifugadas a 3.000 rpm ou 1.000 x g durante 15 minutos. O plasma foi aliquoteado em criotubos e armazenado em freezer -70°C para posteriores análises laboratoriais.

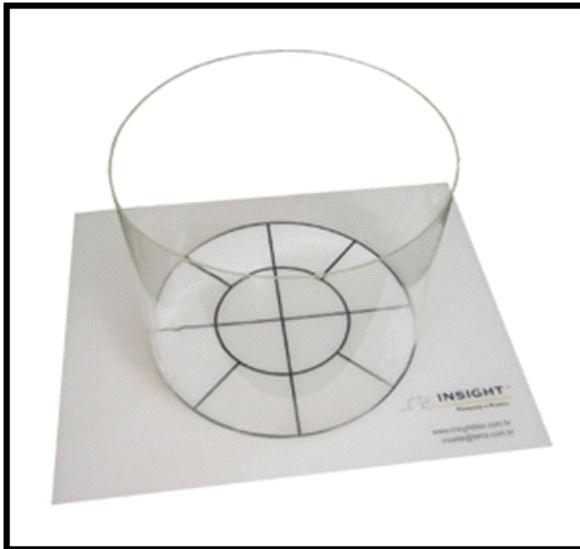
## 3.2 AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA

### 3.2.1 Indicadores Gerais de Toxicidade

Durante todo o período de tratamento, diariamente foi mensurado o peso materno e avaliados parâmetros de bem-estar geral dos animais pela observação da ocorrência de piloereção, lacrimejamento, estereotípias, convulsões, bem como alteração do padrão respiratório, equilíbrio e postura. Subtraindo-se o peso da fêmea no DG 0 do peso no DL 0 obteve-se o ganho de peso materno real, ou seja, sem influência da ninhada.

No DL 21 as fêmeas foram submetidas ao teste comportamental de campo aberto para análise da atividade geral das mesmas (Broadhurst, 1960). A arena do campo aberto consistiu de uma superfície circular de madeira com 60 cm de diâmetro circundada por uma parede de acrílico. A superfície era branca e dividida em partes semelhantes por círculos concêntricos e segmentos de retas (Figura 1'). Para a realização do teste, os animais foram aclimatados na Sala de Análise do Comportamento por um período de 24 horas. No dia do teste, cada fêmea foi colocada na arena e filmada por 3 minutos. Foram quantificados os comportamentos de locomoção (número de divisões adentradas pelo animal com as quatro patas), levantar (número de vezes que o animal se colocou sob as patas traseiras) e limpeza (tempo, em segundos, que o animal gastou se limpando).

**Figura 1'** - Arena para realização do teste de campo aberto.



**Fonte:** <http://insightltda.com.br/insight-equipamento-cientifico-257-Open%20Field%20Acr%C3%83%C2%ADlico%20Rato>.

### 3.2.2 Indicadores de Toxicidade Reprodutiva

Como parâmetros reprodutivos, foram observados o número de filhotes nascidos vivos e mortos, peso dos filhotes nascidos vivos e o número de sítios de implantações uterinos. Calculou-se a perda pós-implantação através da fórmula abaixo:

$$\frac{(\text{n}^\circ \text{ sítios de implantação} - \text{n}^\circ \text{ filhotes nascidos vivos}) \times 100}{\text{n}^\circ \text{ de sítios de implantação}}$$

### 3.2.3 Indicadores de Função Hepática

O dano hepático induzido por medicamentos pode ser hepatocelular, o que se traduzirá pelo aumento da atividade enzimática das transaminases oxaloacética e pirúvica (TGO ou AST e TGP ou ALT), ou colestático, o que levará ao aumento de bilirrubinas (particularmente da direta, da fosfatase alcalina e da gama-glutamil transferase) (Bertolami, 2005). Em razão do volume reduzido de amostras e com o objetivo de pesquisar tanto dano hepático celular quanto colestático, as análises bioquímicas plasmáticas escolhidas para determinação da função hepática foram: albumina, gama-glutamil transferase (GGT), aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT).

Os testes de GGT, AST e ALT foram realizados por metodologia cinética-UV no equipamento Dimension RxL® (Siemens®, EUA) e os testes de albumina e proteínas totais foram realizados manualmente, por colorimetria (verde de bromocresol e biureto), com kits comerciais (Ebram®, Brasil).

### 3.3 AVALIAÇÃO DO BALANÇO ANTIOXIDANTE/PRÓ-OXIDANTE

Essa etapa foi realizada no Laboratório de Pós Graduação do Centro de Ciências da Saúde (LPG, CCS) da UEL sob a supervisão do Prof. Dr. Décio Sabbatini Barbosa.

#### 3.3.1 Parâmetros Plasmáticos

As amostras de plasma armazenadas a  $-70^{\circ}\text{C}$  foram descongeladas para a realização das seguintes análises:

- Potencial antioxidante total plasmático (TRAP): antioxidantes hidro e/ou lipossolúveis presentes no plasma foram mensurados por quimiluminescência (cintilador Beckman LS 6000SC® - Fullerton, Califórnia, EUA), utilizando um modo de contagem de 25 minutos e uma gama de resposta entre 300 e 620 nm, através de uma adaptação do método descrito por Repetto et al. (1996). O sistema foi calibrado com um análogo de vitamina E (Trolox). A comparação entre o tempo de indução depois da adição de concentrações conhecidas de Trolox e plasma fornece os resultados expressos em  $\mu\text{mol}$  de Trolox.
- Dialdeído Malônico (MDA): a formação de MDA ocorre pela decomposição dos hidroperóxidos lipídicos e sua concentração tem sido utilizada para estimar a intensidade da peroxidação lipídica em sistemas biológicos. A concentração plasmática de MDA foi quantificada através de cromatografia líquida de alta performance através da técnica descrita por Bastos et al. (2012) e os resultados estão expressos em nM/mg de proteína.
- Hidroperóxidos lipídicos (LOOH): o método baseia-se na oxidação de íons ferrosos para íons férricos sob condições ácidas, que reagem com o corante indicador (xilenol *Orange* – reativo de FOX) e se ligam ao íon férrico para produzir um complexo colorido (Jiang et al., 1991). O sistema foi calibrado



com um padrão de 1,1,3,3-tetraetoxipropano e a leitura realizada em espectrofotômetro a 560 nm. Os resultados estão expressos em mM.

- Produtos avançados de oxidação protéica (AOPP): albumina oxidada e resíduos de aminoácidos contendo tirosina oxidados foram estimados por espectrofotometria a 340 nm através do método descrito por Witko-Sarsat et al. (1998). Os resultados estão expressos em  $\mu\text{M}$ .
- Óxido nítrico (NO): foi mensurado indiretamente através da determinação da concentração de nitritos plasmáticos, utilizando uma adaptação da técnica descrita por Navarro-Gonzalez et al. (1998). Foi utilizada a leitora de microplacas Asys Expert Plus (Biochrom<sup>®</sup>, Holliston, EUA). Os resultados estão expressos em  $\mu\text{M/L}$ .

As descrições completas das técnicas, incluindo os reagentes utilizados, encontram-se na seção de Anexos.

### 3.3.2 Avaliação da Capacidade Antioxidante *in vitro* (Burst Respiratório ou Explosão Respiratória)

A quantificação da produção de EROs por neutrófilos, conhecida como explosão (*burst*) respiratória foi realizada por quimioluminescência, com o aparelho Victor X3, Perkin Elmer, (EUA), modelo 2030 Multilabel Reader em uma adaptação das técnicas descritas por Freitas et al. (2008) e Huber et al. (2006). Neutrófilos humanos isolados a partir de sangue total foram estimulados com acetato de forbol miristato (PMA). Como ativador foi utilizada uma solução de luminol e a amplificação do sinal foi medida por quimioluminescência minuto a minuto (cpm) durante 60 minutos.

Utilizamos 4 grupos experimentais. Na reação controle, a quimioluminescência emitida pelas espécies reativas no meio com neutrófilos em PBS (*phosphate buffered saline* ou tampão fosfato-salino) estimulados com PMA foi determinada. Nas reações-teste, adicionamos aos neutrófilos 5 ou 10  $\mu\text{L}$  do xarope de *P. incarnata* ou 10  $\mu\text{L}$  de um xarope base com formulação semelhante à do Passiene<sup>®</sup>. Cada grupo experimental foi constituído de 8-10 repetições.

A descrição das técnicas de isolamento de neutrófilos humanos e da reação de *burst* respiratório e os reagentes utilizados encontram-se na seção de Anexos.

### 3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Inicialmente, uma análise exploratória foi conduzida para avaliar se as variáveis apresentavam distribuição normal (teste de Shapiro-Wilk) e se havia homogeneidade de variância entre os grupos (teste de Levene). Para as variáveis que apresentaram distribuição normal e homogeneidade de variância, testes estatísticos paramétricos foram conduzidos.

Devido à quantidade de ratas utilizadas neste estudo, as fêmeas prenhes não puderam ser tratadas de uma só vez e foram divididas em 2 acasalamentos realizados em momentos diferentes gerando 2 conjuntos de ninhadas. Contudo, todos os três grupos de tratamento (CON, P30 e P300) foram distribuídos equilibradamente nos 2 acasalamentos. Frente a essa situação, a ninhada foi adicionada como um fator nas análises estatísticas. Os testes paramétricos utilizados neste estudo foram:

- ANOVA fatorial (fatores: ninhada e tratamento) complementada com teste de Bonferroni: ganho de peso materno real, número de filhotes, peso da ninhada, perdas pós-implantação, comportamento no campo aberto (locomoção, levantar), parâmetros de função hepática (exceto AST), parâmetros plasmáticos antioxidantes e pró-oxidantes;
- ANOVA fatorial (fatores: ninhada e tratamento) para medidas repetidas (RMANOVA) complementada com Bonferroni: ganho de peso das ratas;
- Análise de covariância (ANCOVA) complementada com Bonferroni: peso do fígado utilizando o peso corporal no DL 21 como covariável.

O comportamento de limpeza, AST e a comparação das curvas do *burst* respiratório não apresentaram distribuição normal e/ou homogeneidade de variância e foram analisadas pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis complementado com o teste de Dunn.

Para o estabelecimento das conclusões, foram consideradas significantes as diferenças que apresentaram um  $p < 0,05$ .

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO – ARTIGO CIENTÍFICO

### ***Passiflora incarnata* treatment during gestation and lactation: toxicity and antioxidant evaluation in Wistar dams**

Karine Maria Boll<sup>1a</sup>, Chiara Cristina Bortolasci<sup>2b</sup>, Luiz Fernando Veríssimo<sup>3d</sup>, Tiago Zaminelli<sup>3</sup>, André Demambre Bacchi<sup>3</sup>, Luciana Higachi<sup>2</sup>, Décio Sabbatini Barbosa<sup>4c</sup>, Estefânia Gastaldello Moreira<sup>3\*</sup>

#### **ABSTRACT**

*Passiflora incarnata* is marketed in many countries as a phytomedicine. Even though the physician prescribing directions of most marketed phytomedicines recommend them to be used under medical supervision, reproductive and developmental studies are sparse and not mandatory for regulatory purposes. In this study, we conducted a reproductive toxicity evaluation of *P. incarnata* administered to Wistar rats (30 or 300 mg/kg, gavage) during pregnancy and lactation. Moreover, considering that antioxidant properties have been attributed to flavonoids present in the genus *Passiflora*, we have also evaluated the antioxidant/pro-oxidant balance in the plasma of these dams and conducted an *in vitro* test to evaluate antioxidant potential. *P. incarnata* treatment did not influence dams' body weight as well as reproductive (post-implantation loss, litter size, litter weight) and hepatic function (albumin, AST, ALT, GGT) parameters. The antioxidant property of *P. incarnata* was evidenced both *in vivo* (increase in the total antioxidant plasmatic potential) and *in vitro* (decrease in neutrophil-induced respiratory burst). The results from the present study indicate that under the experimental conditions evaluated, *P. incarnata* treatment during gestation and lactation presented antioxidant activity in the absence of maternal reproductive toxicity.

**Keywords:** *Passiflora incarnate*. Reproductive toxicity. Pregnancy. Lactation. Oxidative stress.

---

<sup>1</sup> Pharmacy Division, University Hospital

<sup>2</sup> Research Laboratory, Health Sciences Center

<sup>3</sup> Department of Physiological Sciences, Biological Sciences Center, State University of Londrina (UEL), 86051-980, Londrina, Parana, Brazil.

<sup>4</sup> Department of Pathology, Clinical and Toxicological Analyses, Health Sciences Center

\* Corresponding author:

Departamento de Ciências Fisiológicas, CCB

UEL - Campus Universitário

86051-980 - Londrina-PR-Brasil

Phone: +55 43 3371 4307

Fax: +55 43 3371 4254

E-mail: [egmoreira@uel.br](mailto:egmoreira@uel.br)

## INTRODUCTION

Herbal medicine products (HMP) have been used worldwide (Yunes and Calixto, 2001; Buttar and Jones, 2003; Koren et al., 2008). The propagated belief on the safety of natural products (Buttar and Jones, 2003) makes HMPs appealing for special population groups including children, pregnant women and the elderly.

*Passiflora incarnata* is marketed in many countries as an anxiolytic and sedative phytomedicine (Soulimani et al., 1997; Zanolli et al., 2000) and its mechanism of action involves potentiation of the gabaergic system (Zanolli et al., 2000; Grundmann et al., 2008). As observed for many HMP used by the population, information regarding the safety of *P. incarnata* use during pregnancy and/or lactation is sparse (Veríssimo et al., 2011). We were able to retrieve only one study that suggested, *in vitro*, an uterotonic action of this plant (Ruggy and Smith, 1940). Based on this study, the label of the *P. incarnata*-based phytomedicines marketed in Brazil indicates that its use during pregnancy and/or breastfeeding needs physician or dentist supervision (Brasil, 2008). However, advising without scientific support certainly is not an easy task for these professionals.

In this study, we conducted a reproductive toxicity study with *P. incarnata* administered to Wistar rats during pregnancy and lactation in order to evaluate maternal toxicity. Moreover, considering that antioxidant properties have been attributed to flavonoids present in the genus *Passiflora* (Rudnicki et al., 2007; Masteikova et al., 2008), we have also evaluated the antioxidant/pro-oxidant balance in the plasma of these dams and conducted an *in vitro* evaluation of its antioxidant potential.

## MATERIAL AND METHODS

### *Animals and Treatment*

Male and female Wistar rats (75-90 days) from the colony of the State University of Londrina (UEL) were mated (2 or 3 females and 1 male per cage) overnight and gestational day (GD) 0 was considered if there were sperm and estrus phase cells in vaginal smears.

Pregnant rats were housed singly and randomly divided into control- or *P. incarnata*-treated dams. Control dams (CON: 15 dams) were gavaged daily with

tap water whereas *P. incarnata* were gavaged with 30 (P30: 17 dams) or 300 (P300: 14 dams) mg/kg. Treatment lasted from GD 0 to lactational day (LD) 21 and doses were adjusted daily according to weight. A pharmaceutical product marketed in Brazil (Passiene™, Herbarium Laboratories) was employed as the source of *P. incarnata*. This syrup is standardized in 0.19% of vitexin. In humans, the dose of 20-30 mg/kg/day is usually recommended.

All animals had free access to water and regular lab chow (Nuvital™). They were maintained in the vivarium of the Department of Physiological Sciences at 21±2 °C on a 12:12 h light-dark cycle (on at 0700). All animals procedures were approved by the UEL Ethics Committee for Animal Research (CEEA 16/2010).

#### *Maternal toxicity and reproductive performance of dams*

Maternal body weight was measured daily during gestation and lactation. Furthermore, the corrected maternal body weight gain was estimated subtracting the weight on GD 0 from the weight on LD 0. On LD 0, the number of pups in each litter was determined as well as the litter weight. On LD 21, dams were submitted to an open-field in order to evaluate general activity (Bacchi et al., 2011). They were euthanized with diethyl ether and their livers were removed and weighed. The uterine horns were also removed and the numbers of implantation sites were counted to determine the rate of postimplantation loss [(number of implantations–number of live fetuses/number of implantations)x100]. Blood was collected through cardiac puncture and plasma separated for biochemical analysis. Blood samples were centrifuged at 1000 g for 15 minutes, plasma was aliquoted and stored at -70°C for subsequent laboratory testing. Hepatic function was evaluated through the determination of gamma-glutamyl transferase (GGT), aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), albumin and total proteins. GGT, ALT and AST were analyzed using UV-kinetic methods in an automated biochemical system (Dimension® RXL, Deerfield, IL, USA). Albumin and total protein were measured manually through the use of colorimetric commercial kits (Ebram™, Brazil).

#### *Antioxidant/pro-oxidant balance in the plasma of the dams*

Total serum antioxidant potential (TRAP) was determined by chemiluminescence using an adaptation from the method described by Repetto et al.

(1996). This experiment was conducted in a Beckman  $\beta$  counter, model LS 6000 (Fullerton, CA, USA) in a non-coincident counting mode for 25 minutes and with a response range between 300 and 620 nm. The system was calibrated with vitamin E analogue (Trolox). A comparison of the induction time after the addition of known concentrations of Trolox and plasma allows obtaining TRAP values of Trolox equivalents.

Pro-oxidant markers evaluated in this work were lipid hydroperoxides, malondialdehyde (MDA), products of advanced protein oxidation (AOPP) and nitric oxide (NO).

Lipid hydroperoxides were measured by spectrophotometry (FOX) using an adaptation of the technique described by Jiang et al. (1991). The method is based on the oxidation of ferrous to ferric ions by peroxides under acidic conditions, which react with the indicator dye (xylenol orange) and produce a colored complex. The system was calibrated with a standard solution of 1,1,3,3-tetraethoxypropane. The reading was performed in a spectrophotometer (Helios  $\alpha$  ThermoSpectronic™, Waltham, MA, USA) at a wavelength of 560 nm and the results are expressed in mM.

MDA, which results from the decomposition of hydroperoxides, was quantified by high performance liquid chromatography using an adaptation of the technique described by Bastos et al. (2012). Results are expressed in nM/mg of protein.

AOPP was quantified by the method described by Witko-Sarsat et al. (1998). The method is based on the reaction of oxidized proteins with potassium iodide in acid conditions. The calibration curve was obtained from a stock solution of 1 mM chloramine and the absorbance of the reaction was determined spectrophotometrically (Helios  $\alpha$  ThermoSpectronic®, Waltham, MA, USA) at 340 nm. AOPP concentrations are expressed in  $\mu$ M/L equivalent of chloramine.

NO levels were assessed indirectly by determining the plasma concentration of nitrite, using an adaptation of the technique described by Navarro-Gonzalez et al. (1998). The quantification of nitric oxide was made in a microplate reader (Biochrom ASYS Expert Plus™, Holliston, MA, USA) at a wavelength of 550 nm. The results are expressed in  $\mu$ M/L.

#### *In vitro evaluation of antioxidant activity*

The reactive oxygen species (ROS) production by neutrophils (respiratory burst) was evaluated by chemiluminescence according to an adaptation to

the method described by Freitas et al. (2008) and Huber et al. (2006) in a Victor X3, Perkin Elmer, (USA), model 2030 Multilabel Reader. Human neutrophils were isolated from whole blood through gradient density centrifugation. Neutrophil burst was induced by phorbol myristate acetate (PMA) in the presence of 5 or 10  $\mu\text{L}$  of *P. incarnata* syrup (75 mg/mL) or vehicle (base syrup). The detection probe was luminol amplified chemiluminescence. Kinetic readings were initiated immediately after cell stimulation and measured each other minute for 60 minutes. Effects are expressed as chemiluminescence arbitrary units (cpm). In each experimental group, 8-10 replicates were conducted. For statistical analysis, the peak value of each curve was used, independently of the time it occurred.

### *Statistical analysis*

Initially, an exploratory analysis was conducted to evaluate normal distribution (Shapiro-Wilk test) and homogeneity of variance (Levene test) of each variable. For variables that presented normal distribution and homogeneity of variance, parametric analysis were conducted. Due to the high number of dams employed in this study, they could not be treated all at once and our sample is composed from animals belonging to two different cohorts. Because of this, cohort was added as a factor in the statistical analysis. The parametric statistical tests employed in this study were:

- Two-way ANOVA (factors: cohort, treatment) complemented with Bonferroni: corrected maternal body weight gain, litter size, litter weight, post-implantation loss, liver weight, open-field behaviors (ambulation, rearing), biochemical parameters (except AST);
- Two-way Repeated Measures ANOVA (RMANOVA) complemented with Bonferroni: weight gain of dams;
- Two-way ANCOVA complemented with Bonferroni: liver weight. Weight on LD 21 was the covariate.

Grooming behavior evaluated in the open-field, AST and result from respiratory burst did not present normal distribution and/or homogeneity of variance and were analyzed through the non-parametric test of Kruskal-Wallis complemented with Dunn. Differences were considered significant if  $p < 0.05$ .



## RESULTS

### *Maternal toxicity and reproductive performance of dams*

No clinical signs of toxicity were observed during the daily treatment with *Passiflora*. RMANOVA indicated an effect of the day on dams' weight [F(3,111)=651.9,  $p < 0.0001$ ] reflecting the fluctuations that occur during pregnancy and lactation. *P. incarnata* treatment did not influence ( $p > 0.05$ ) weight gain (Figure 1) as well as the corrected weight gain of dams (weight in LD 0 – weight in GD 0). Means and SEM, in grams, were Con=32.7±4.2 (n=15); P30=25.9±3.2 (n=17); P300=22.6±2.8 (n=14). Two-way ANOVA showed that *P. incarnata* treatment did not influence ( $p > 0.05$ ) the number of uterine implantation sites, post-implantation loss, number of pups per litter and weight of pups at birth (Table 1). Dead pups at birth were observed in 2 Con litters and in 2 P300 litters. No macroscopic alteration was observed during necropsy.

*P. incarnata* treatment did not influence ( $p > 0.05$ ) any of the behaviors evaluated in the open-field (Table 2) as well as biochemical markers of hepatic function (Table 3) and the liver weight in grams (Con=14.39 ± 0.35; P30=13.81 ± 0.28, P300=14.67 ± 1.24).

### *In vivo evaluation of the antioxidant activity*

Data from the antioxidant/pro-oxidant plasmatic balance in dams are presented in Table 4. Two-way ANOVA indicated that *P. incarnata* treatment influenced TRAP levels [F(2,42)=5.1,  $p < 0.05$ ]. Bonferroni post-hoc test revealed that, compared to CON, P30 tended ( $p = 0.06$ ) to increase TRAP and P300 significantly increased it ( $p < 0.05$ ). Even though total plasmatic antioxidant capacity was increased in *P. incarnata*-treated dams, a significant difference in the levels of the pro-oxidant markers evaluated (lipid hydroperoxides, MDA, AOPP and NO) have not been detected (Two-way ANOVA,  $p > 0.05$ ).

### *In vitro evaluation of the antioxidant activity*

Figure 2A presents the chemiluminescence produced by PMA-stimulated neutrophils in the absence (Control) or presence of 5 and 10  $\mu\text{L}$  of *P. incarnata* syrup (75mg/mL) or vehicle (10  $\mu\text{L}$  of base syrup). Each curve is the mean of 8-10 replicates.

Kruskall-Wallis indicated a significant difference in the peak values of the kinetic curves (KW=30.1,  $p < 0.0001$ ). Dunn's test revealed that the peak values obtained with both volumes of *P. incarnata* syrup (5 and 10  $\mu\text{L}$ ) were different from control and vehicle (Figure 2B).

## DISCUSSION

In reproductive and developmental toxicity studies, evaluation of maternal toxicity is critical. This study was conducted according to recommendations from the International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH, 2005). The *P. incarnata* regimen of treatment adopted in the present study did not result in maternal toxicity as evidenced by parameters of overt general toxicity (clinical signs, weight gain, general activity), hepatic function and reproductive performance. Literature lacks toxicological studies conducted in animals treated repeatedly with *P. incarnata* and none of the available monographs of *P. incarnata* mention results from these types of studies.

In this work, the antioxidant property of *P. incarnata* was evidenced both *in vivo* and *in vitro*. *In vivo*, there was a dose-dependent increase in the total antioxidant plasmatic potential (TRAP) which reflects both hydro and liposoluble antioxidant substances (Repetto et al., 1996). *In vitro*, there was a decrease in PMA-induced respiratory burst in neutrophils, suggesting a scavenger activity of the syrup. *In vitro* antioxidant activity has also been described for aqueous and ethanolic extracts of *P. incarnata* in the DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazide) and ABTS (Azino-bis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) methods (Masteikova et al., 2008). Flavonoids have been shown to be the main phytoconstituents of *P. incarnata* (Raffaelli et al., 1997) and the antioxidant activity of this species has been attributed to them (Masteikova et al., 2008). Flavonoids are phenolic substances that can stabilize and delocalize the unpaired electron within its aromatic ring and are able to reduce free radical formation and to scavenge free radicals. Among the flavonoids that have been described to be present in *P. incarnata*, vicenin, isovitexin and orentin have been shown to play a major role in the *in vitro* antiradical activity of this species (Masteikova et al., 2008). Moreover, in an *in vivo* study conducted with Wistar rats

gavaged with vitexin and isovitexin an increase in the total antioxidant capacity has been described (Cao et al., 2011).

Although total plasmatic antioxidant potential was found to be increased in the dams treated with *P. incarnata*, it was not observed a significant decrease in the evaluated plasmatic markers of oxidation, i.e., lipid hydroperoxides, MDA, AOPP and NO. We cannot offer a definitive explanation to this observation but it could be hypothesized that the increased antioxidant capacity would be valuable in protecting macromolecules from oxidation in the presence of oxidative stressors and not in baseline conditions. Similar observation, i.e., increased TRAP in normal subjects in the absence of alterations in the levels of lipid hydroperoxides, has also been described in a study from our group designed to evaluate the impact of green tea consumption in normal and dyslipidemic humans (Camargo et al., 2006).

It is interesting to point out that, to our knowledge, this is the first study to describe *in vivo* antioxidant activity for *P. incarnata*. In the literature, decreased markers of oxidation have been described with other species from the *Passiflora* genus. *P. edulis* juice decreased levels of TBARS in the blood (reduced lipid peroxidation) in male rats treated for 28 days with 1,000 mg/kg of the juice (De Souza et al., 2012) and *P. alata* leaf extract (1 and 5 mg/kg, gavage, 30 days) prevented the increase of hepatic TBARS after a challenge with carbon tetrachloride in male rats (Rudnick et al., 2007).

In conclusion, the results from the present study indicate that *P. incarnata* treatment during gestation and lactation present antioxidant activity in the absence of maternal reproductive toxicity. In order to fully understand *P. incarnata* safety profile, different studies are necessary to evaluate other reproductive endpoints (e.g., pre-implantation loss, pre-natal development) as well as post-natal development of the pups.

## **Acknowledgements**

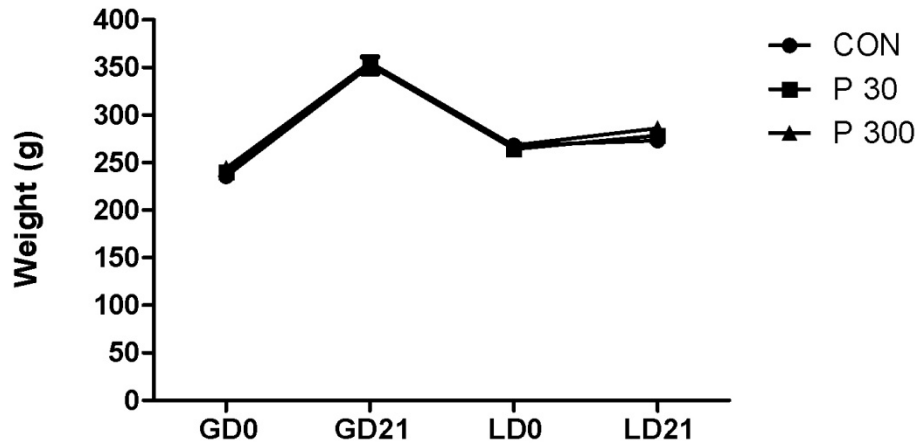
This work was supported by CNPq (fellowship to TZ and LH), Fundação Araucária (fellowship to LFV) and CAPES (fellowship to CCB and ADB). We also thank Herbarium for the Passiene™ donation.

## REFERENCES

- Bacchi, A.D., Ponte, B., Vieira, M., de Paula, J.C.C., Mesquita, S.F.P., Gerardin, D.C.C., Moreira, E.G., 2011. Developmental exposure to *Passiflora incarnata* induces behavioral alterations in the male progeny. *Reprod. Fert. Develop.* Submitted.
- Bastos, A.S., Loureiro, A.P.M., Oliveira, T.F. Corbi, S.C.T., Caminaga, R.M.S., Rossa Jr, C., Orrico, S.R.P., 2012. Quantitation of malondialdehyde in gingival crevicular fluid by a high-performance liquid chromatography- based method. *Anal. Biochem.* 423, 141-146.
- BRASIL. Ministério da Saúde, 2008. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução de Diretoria Colegiada nº 95, de 11 de dezembro de 2008. Regulamenta o texto de bulas de medicamentos fitoterápicos. [http://189.28.128.100/dab/docs/legislacao/resolucao95\\_11\\_12\\_08.pdf](http://189.28.128.100/dab/docs/legislacao/resolucao95_11_12_08.pdf), accessed in September 2011.
- Buttar, H.S., Jones, K.L., 2003. What do we know about the reproductive and developmental risks of herbal and alternate remedies? *Birth Defects Res. B.* 68, 492–493.
- Camargo, A., Daguer, D., Barbosa, D.S., 2006. Green tea exerts antioxidant action in vitro and its consumption increases total serum antioxidant potential in normal and dyslipidemic subjects. *Nutr. Res.* 26, 626-631.
- Cao, D., Li, H., Jingjing, Z., Che, H., Cao, J., Yang, L., Zhu, C., Jiang, W., 2011. Antioxidant properties of the mung bean flavonoids on alleviating heat stress. *PLoS ONE.* 6: e21071.
- De Souza, M.S.S., Barbalho, S.M., Damasceno, D.C., Rudge, M.V.C., De Campos, K.E., Madi, A.C.G., Coelho, B.R., Oliveira, R.C., De Melo, R.C., Donda, V.C., 2012. Effects of *Passiflora edulis* (Yellow Passion) on serum lipids and oxidative stress status of Wistar rats. *J. Med. Food* 15, 78-82.
- Freitas, M., Porto, G., Lima, J.L.F.C., Fernandes, E., 2008. Isolation and activation of human neutrophils *in vitro*. The importance of the anticoagulant used during blood collection. *Clin. Biochem.* 41, 570-575.
- Grundmann, O., Wang, J., McGregor, G.P., Butterweck, V., 2008. Anxiolytic activity of a phytochemically characterized *Passiflora incarnata* extract is mediated via the GABAergic system. *Planta Med.* 74, 1769-1773.
- Huber, K., Krötz-Fahning, M., Hock, B., 2006. Respiratory burst as a biomarker for stress responses. *Protoplasma* 229, 221-224.
- ICH (International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use), 2005. Detection of toxicity to reproduction for medicinal products & toxicity to male fertility S5(R2).

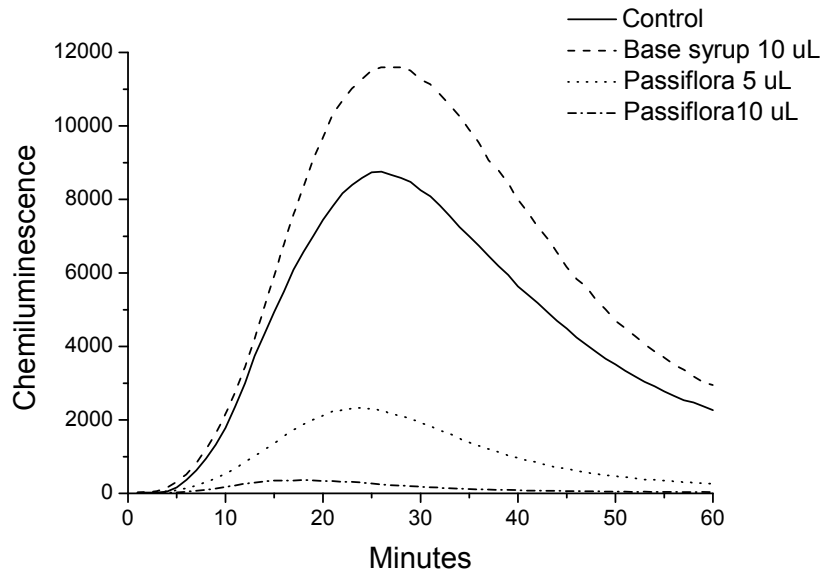
- Jiang, Z.Y., Woollard, A.C.S., Wolff, S.P., 1991. Lipid hydroperoxide measurement by oxidation of  $\text{Fe}^{2+}$  in the presence of xylene orange. Comparison with the TBA assay and the iodometric method. *Lipids* 26, 853-856.
- Koren, G., Dugoua, J.J., Magee, L., Vohra, S., Matsui, D., Bérard, A., Johnson, B., Moretti, M., Einarson, A., 2008. Mother Nature: establishing a Canadian research network for natural health products (NHPs) during pregnancy and lactation. *J. Altern. Complement. Med.* 14, 369–372.
- Masteikova, R., Bernatoniene, J., Bernatoniene, R., Velziene, S., 2008. Antiradical activities of the extract of *Passiflora incarnata*. *Acta Pol. Pharm.* 65, 577-583.
- Navarro-González, J.A., Garcia-Benayas, C., Arenas, J., 1998. Semiautomated measurement of nitrate in biological fluids. *Clin. Chem.* 44, 679-681.
- Raffaelli, A., Moneti, G., Toja, E., 1997. Mass spectrometric characterization of flavonoids in extracts from *Passiflora incarnata*. *J. Chromatogr A.* 777, 223-231.
- Repetto, M., Reides, C., Carretero, M.L.G., Costa, M., Griemberg, G., Llesuy, S., 1996. Oxidative stress in blood of HIV infected patients. *Clin. Chim. Acta* 255, 107-117.
- Rudnicki, M., Silveira, M.M., Pereira, T.V., Oliveira, M.R., Reginatto, F.H., Dal-Pizzol, F., Moreira, J.C.F., 2007. Protective effects of *Passiflora alata* extract pretreatment on carbon tetrachloride induced oxidative damage in rats. *Food Chem. Toxicol.* 45, 656-661.
- Ruggy, G.H., Smith, C.S., 1940. A pharmacological study of the active principle of *Passiflora incarnata*. *J. Am. Pharm. Assoc.* 29, 245-249.
- Soulimani, R., Younos, C., Jarmouni, S., Bousta, D., Misslin, R., Mortier, F., 1997. Behavioral effects of *P. incarnata* L. and its indole alkaloid and flavonoid derivatives and maltol in the mouse. *J. Ethnopharmacol.* 57, 11–20.
- Veríssimo, L.F., Bacchi, A.D., Zaminelli, T., De Paula, G.H.O., Moreira, E.G., 2011. Herbs of interest to the Brazilian Federal Government: female reproductive and developmental toxicity studies. *Rev. Bras. Farmacogn.* 21, 1163-1171.
- Witko-Sarsat, V., Friedlander, M., Khoa, T.N., Capeillère-Blandin, C., Nguyen, A., T., Canteloup, S., Dayer, J.M., Jungers, P., Drüeke, T., Descamps-Latscha, B., 1998. Advanced oxidation protein products as novel mediators of inflammation and monocyte activation in chronic renal failure. *J. Immunol.* 161, 2524-2532.
- Yunes, R.A., Calixto, J.B., 2001. Plantas medicinais: sob a ótica da química medicinal moderna. Argos Editora Universitária.
- Zanoli, P., Avallone, R., Baraldi, M., 2000. Behavioral characterization of the flavonoids apigenin and chrysin. *Fitoterapia.* 71, 117-123.

**Figure 1** - Weight gain of dams treated with *P. incarnata* during gestation and lactation. Data are means  $\pm$  SEM of 14-17 dams in each group. RMANOVA indicated only a main effect of day, reflecting the fluctuations in weight that occur during pregnancy and lactation. CON: distilled water; P 30: *P. incarnata* 30 mg/kg; P 300: *P. incarnata* 300 mg/kg; GD: gestational day; LD: lactational day.

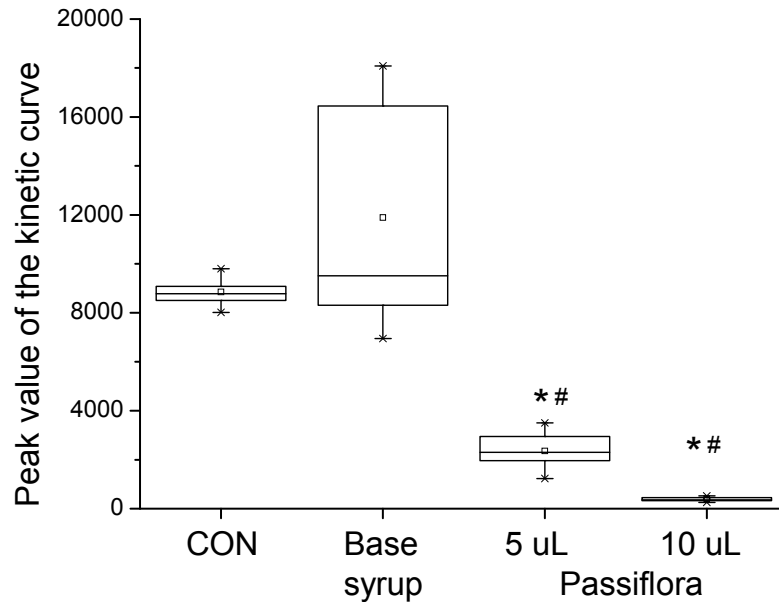


**Figure 2** -Activation of human neutrophils by PMA in the absence (control) or presence of *P. incarnata* (5 or 10  $\mu$ L) or base syrup (10  $\mu$ L). Each group was composed by 8-10 replicates. A. Kinetic curves obtained each other minute for 60 minutes. B. Box plot of the peak values from the kinetic curves. Data were analyzed by Kruskal-Wallis complemented with Dunn's test. \*  $p < 0.05$  compared to CON; #  $p < 0.05$  compared to base syrup

A



B



**Table 1** -Reproductive parameters of dams treated with *P. incarnata* during gestation and lactation.

	Con (n = 15)	P 30 (n = 17)	P 300 (n = 14)
Live pups (count)	11.60 ± 0.40	11.23 ± 0.85	11.43 ± 0.62
Implantation sites (count)	12.30 ± 0.43	11.70 ± 0.84	12.57 ± 0.34
Post-implantation loss (%) <sup>a</sup>	6.10 ± 1.90	4.2 ± 1.8	10.0 ± 3.8
Mean pups weight (g) <sup>b</sup>	5.83 ± 0.12	6.14 ± 0.17	6.12 ± 0.20

Data are means ± SEM and were analyzed by two-way ANOVA ( $p > 0.05$ ). Con: distilled water; P 30: *P. incarnata* 30 mg/kg; P 300: *P. incarnata* 300 mg/kg. <sup>a</sup> (Number of implantations – number of live fetuses/number of implantations) x 100. <sup>b</sup> Total weight of the litter divided by the total number of the pups on LD 0.

**Table 2** -General activity in the open-field of dams treated with *P. incarnata* during gestation and lactation.

	Con (n = 15)	P 30 (n = 17)	P 300 (n = 14)
Ambulation (count)	40.9 ± 2.7	44.0 ± 2.2	39.9 ± 2.4
Rearing (count)	22.9 ± 2.0	21.7 ± 1.5	18.9 ± 2.3
Grooming (seconds)	8.4 (5.0–13.9)	8.5 (4.2-30.0)	17.4 (0.9-40.1) <sup>#</sup>

Ambulation and rearing are presented as means ± SEM and were analyzed by two-way ANOVA. Grooming is presented as median (minimum-maximum) and was analyzed by the non-parametric test of Kruskal-Wallis complemented with Dunn. <sup>#</sup>  $p < 0.05$  compared to P30. Con: distilled water; P 30: *P. incarnata* 30 mg/kg; P 300: *P. incarnata* 300 mg/kg.



**Table 3** -Plasmatic parameters of hepatic function of dams treated with *P. incarnata* during gestation and lactation.

	Con	P 30	P 300
Total proteins (g/dL)	6.00 ± 0.15 (n = 15)	5.78 ± 0.18 (n = 17)	5.79 ± 0.13 (n = 14)
Albumin (g/dL)	2.89 ± 0.09 (n = 15)	2.97 ± 0.08 (n = 16)	3.06 ± 0.09 (n = 13)
GGT (IU/L)	3.27 ± 0.25 (n = 15)	2.63 ± 0.35 (n = 16)	2.50 ± 0.42 (n = 12)
ALT (IU/L)	159.60 ± 6.66 (n = 15)	148.81 ± 7.43 (n = 16)	152.17 ± 10.82 (n = 12)
AST (IU/L)	140.0 (104.0–165.0) (n = 15)	130.0 (105.0-215.0) (n = 16)	127.0 (110.0-143.0) (n = 12)

Total proteins, albumin, GGT and ALT are presented as means ± SEM and were analyzed by two-way ANOVA. AST is presented as median (minimum-maximum) and was analyzed by the non-parametric test of Kruskal-Wallis. Con: distilled water; P 30: *P. incarnata* 30 mg/kg; P 300: *P. incarnata* 300 mg/kg.

**Table 4** -Plasmatic oxidative stress parameters in dams treated with *P. incarnata* during gestation and lactation.

	Con	P 30	P 300
AOPP ( $\mu$ moles/L equivalent of chloramine)	144.91 $\pm$ 9.51 (n = 15)	149.70 $\pm$ 9.30 (n = 17)	154.14 $\pm$ 10.93 (n = 14)
LOOH (mM)	0.83 $\pm$ 0.05 (n = 15)	0.81 $\pm$ 0.05 (n = 17)	0.74 $\pm$ 0.07 (n = 14)
MDA (ng/mg of protein)	69.20 $\pm$ 4.09 (n = 13)	76.20 $\pm$ 5.07 (n = 15)	75.80 $\pm$ 5.01 (n = 13)
NO ( $\mu$ M/L)	4.04 $\pm$ 0.83 (n = 15)	3.87 $\pm$ 0.49 (n = 16)	5.10 $\pm$ 0.69 (n = 13)
TRAP (Trolox equivalents)	381.39 $\pm$ 12.90 (n = 14)	436.43 $\pm$ 16.04 <sup>&amp;</sup> (n = 15)	450.94 $\pm$ 18.97* (n = 14)

The results are presented as means  $\pm$  SEM. \*  $p < 0.05$  and <sup>&</sup>  $p = 0.06$  compared to Con, two-way ANOVA complemented with Bonferroni. Con: distilled water; P 30: *P. incarnata* 30 mg/kg; P 300: *P. incarnata* 300 mg/kg.

## 5 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos nesse estudo sugerem que o tratamento de ratas com *P. incarnata* durante os períodos de gestação e lactação não induz toxicidade materna e aumenta o potencial antioxidante plasmático total. Ainda, foi observada atividade antioxidante *in vitro* dessa espécie.

## REFERÊNCIAS

- Bacchi, A.D., Ponte, B., Vieira, M., de Paula, J.C.C., Mesquita, S.F.P., Gerardin, D.C.C., Moreira, E.G., 2011. Developmental exposure to *Passiflora incarnata* induces behavioral alterations in the male progeny. *Reprod. Fert. Develop.* Submitted.
- Barreiros, A.L.B.S., David, J.M., David, J.P., 2006. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Química Nova* 29, 113-123.
- Bastos, A.S., Loureiro, A.P.M., Oliveira, T.F., Corbi, S.C.T., Caminaga, R.M.S., Rossa Jr, C., Orrico, S.R.P., 2012. Quantitation of malondialdehyde in gingival crevicular fluid by a high-performance liquid chromatography- based method. *Anal. Biochem.* 423, 141-146.
- Bertolami, M.C., 2005. Mecanismos de hepatotoxicidade. *Arq. Bras. Cardiol.* 85, 25-27.
- Brasil. Ministério da Saúde, 2008. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução de Diretoria Colegiada nº 95, de 11 de dezembro de 2008. Regulamenta o texto de bulas de medicamentos fitoterápicos. [http://189.28.128.100/dab/docs/legislacao/resolucao95\\_11\\_12\\_08.pdf](http://189.28.128.100/dab/docs/legislacao/resolucao95_11_12_08.pdf), acessado em Setembro/2011.
- Brasil. Ministério da Saúde, 2009. Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema Único de Saúde. Disponível em <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/RENISUS.pdf>. Acesso em 12 de janeiro de 2011.
- Brasil. Presidência da República – Casa Civil. Decreto no 5.813, de 22 de junho de 2006. Disponível em: [http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/Decreto\\_Fito.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/Decreto_Fito.pdf). Acesso em janeiro de 2011.
- Bravo, L., 1998. Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance. *Nutr. Rev.* 56, 317-333.
- Broadhurst, P.L., 1960. Experiments in psychogenetics. In: Eysenk, H.J. *Experiments in personality*. Rutledge and Kegan Paul. London. 31-61.
- Buttar, H.S., Jones, K.L., 2003. What do we know about the reproductive and developmental risks of herbal and alternate remedies? *Birth Defects Res. B.* 68, 492–493.
- Camargo, A., Daguer, D., Barbosa, D.S., 2006. Green tea exerts antioxidant action in vitro and its consumption increases total serum antioxidant potential in normal and dyslipidemic subjects. *Nutr Res.* 26, 626-631.
- Cao, D., Li, H., Jingjing, Z., Che, H., Cao, J., Yang, L., Zhu, C., Jiang, W., 2011. Antioxidant properties of the mung bean flavonoids on alleviating heat stress. *PLoS ONE.* 6: e21071.
- Chabariberi, R.A.O., Pozzi, A.C.S., Zeraik, M.L., Yariwake, J.H., 2009. Determinação espectrométrica dos flavonóides das folhas de *Maytenus (Celastraceae)* e de

*Passiflora* (Passifloraceae) e comparação com método CLAE-UV. Rev. Bras. Farmacogn. 19, 860-864.

Costa, L.G., Steardo, L., Cuomo, V., 2004. Structural effects and neurofunctional sequelae of developmental exposure to psychotherapeutic drugs: experimental and clinical aspects. Pharmacol. Rev. 56, 103-147.

De Souza, K.C.B., González-Ortega, G., 1997. Padronização e estudo preliminar da padronização e estudo preliminar da estabilidade de estratos hidroalcoólicos de *Passiflora edulis* SIMS (Maracujá). Cad. Farm. 12, 147-148.

De Souza, M.S.S., Barbalho, S.M., Damasceno, D.C., Rudge, M.V.C., De Campos, K.E., Madi, A.C.G., Coelho, B.R., Oliveira, R.C., De Melo, R.C., Donda, V.C., 2012. Effects of *Passiflora edulis* (yellow passion) on serum lipids and oxidative stress status of Wistar rats. J. Med. Food. 15, 78-82.

Elsas, S.M., Rossi, D.J., Raber, J. White, G., Seeley, C.A., Gregory, L., Mohr, C., Pfankuch, T., Soumyanath, A., 2010. *Passiflora incarnate* L. (Passionflower) extracts elicit GABA currents in hippocampal neurons in vitro, and show anxiogenic and anticonvulsivant effects in vivo, varying with extraction method. Phytomedicine. 17, 940-949.

Ferreira, A.L.A., Matsubara, L.S., 1997. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. Rev. Assoc. Méd. Bras. 43, 61-68.

Freitas, M., Porto, G., Lima, J.L.F.C., Fernandes, E., 2008. Isolation and activation of human neutrophils *in vitro*. The importance of the anticoagulant used during blood collection. Clin. Biochem. 41, 570-575.

Freitas, M.S.M., Monnerat, P.H., Vieira, I.J.C., De Carvalho, A.C., 2007. Flavonóides e composição mineral de folhas de maracujazeiro amarelo em função da posição da folha no ramo. Cienc. Rural. 37, 1634-1639.

Grundmann, O., Wang, J., McGregor, G.P., Butterweck, V., 2008. Anxiolytic activity of a phytochemically characterized *Passiflora incarnata* extract is mediated via the GABAergic system. Planta Med. 74, 1769-73.

Huber, K., Krötz-Fahning, M., Hock, B., 2006. Respiratory burst as a biomarker for stress responses. Protoplasma. 229, 221-224.

ICH (International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use), 2005. Detection of toxicity to reproduction for medicinal products & toxicity to male fertility S5(R2).

Jiang, Z.Y., Woollard, A.C.S., Wolff, S.P., 1991. Lipid hydroperoxide measurement by oxidation of Fe<sup>2+</sup> in the presence of xylenol orange. Comparison with the TBA assay and the iodometric method. Lipids. 26, 853-856.

Jurgens, T.M., 2003. Potential toxicities of herbal therapies in the developing fetus. Birth Defects Res. B. 68, 496-498.

- Knekt, P., Kumpulainen, J., Järvinen, R., Rissanen, H., Heilövaara, M., Reunanen, A., Hakulinen, T., Aromaa, A., 2002. Flavonoid intake and risk of chronic diseases. *Am. J. Clin. Nutr.* 76, 560-568.
- 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., 2007. Uso de *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* na redução do colesterol. *Rev. Bras. Farmacogn.* 17, 592-597.
- Koren, G., Dugoua, J.J., Magee, L., Vohra, S., Matsui, D., Bérard, A., Johnson, B., Moretti, M., Einarson, A., 2008. Mother Nature: establishing a Canadian research network for natural health products (NHPs) during pregnancy and lactation. *J. Altern. Complement. Med.* 14, 369–372.
- Masteikova, R., Bernatoniene, J., Bernatoniene, R., Velziene, S., 2008. Antiradical activities of the extract of *Passiflora incarnata*. *Acta Pol. Pharm.* 65, 577-583.
- Navarro-González, J.A., Garcia-Benayas, C., Arenas, J., 1998. Semiautomated measurement of nitrate in biological fluids. *Clin. Chem.* 44, 679-681.
- Paris, F., Petry, R.D., Reginatto, F.H., Gosmann, G., Quevedo, J., Salgueiro, J.B., Kapczinski, F., González-Ortega, G., Schenkel, E.P., 2002. Pharmacochemical study of aqueous extracts of *Passiflora alata* Dryander and *Passiflora edulis* Sims. *Acta Farm. Bonaer.* 21, 5-8.
- Pereira, C.A.M., Villegas, J.H.Y., 2000. Chemical and pharmacological constituents of *Passiflora alata* Dryander, *Passiflora edulis* Sims and *Passiflora incarnata* L. *Rev. Bras. Plantas Med.* 3, 1-12
- Prior R.L., Cao G., 1999. Antioxidant capacity and polyphenolic components of teas: implications for altering in vivo antioxidant status. *Proc Soc Exp Biol Med.* 220, 255 - 261.
- Raffaelli, A., Moneti, G., Toja, E., 1997. Mass spectrometric characterization of flavonoids in extracts from *Passiflora incarnata*. *J. Chromatogr A.* 777, 223-231.
- Repetto, M., Reides, C., Carretero, M.L.G., Costa, M., Griemberg, G., Llesuy, S., 1996. Oxidative stress in blood of HIV infected patients. *Clin. Chim. Acta.* 255, 107-117.
- Rudnicki, M., Silveira, M.M., Pereira, T.V., Oliveira, M.R., Reginatto, F.H., Dal-Pizzol, F., Moreira, J.C.F., 2007. Protective effects of *Passiflora alata* extract pretreatment on carbon tetrachloride induced oxidative damage in rats. *Food Chem. Toxicol.* 45, 656-661.
- Ruggy, G.H., Smith, C.S., 1940. A pharmacological study of the active principle of *Passiflora incarnata*. *J. Am. Pharm. Assoc.* 29, 245-249.
- Soulimani, R., Younos, C., Jarmouni, S., Bousta, D., Misslin, R., Mortier, F., 1997. Behavioral effects of *Passiflora incarnata* L. and its indole alkaloid and flavonoid derivatives and maltol in the mouse. *J. Ethnopharmacol.* 57, 11-20.
- Veríssimo, L.F., Bacchi, A.D., Zaminelli, T., De Paula, G.H.O., Moreira, E.G., 2011. Herbs of interest to the Brazilian Federal Government: female reproductive and developmental toxicity studies. *Rev. Bras. Farmacogn.* 21, 1163-1171.

Witko-Sarsat, V., Friedlander, M., Khoa, T.N., Capeillère-Blandin, C., Nguyen, A.T., Canteloup, S., Dayer, J.M., Jungers, P., Drüeke, T., Descamps-Latscha, B., 1998. Advanced oxidation protein products as novel mediators of inflammation and monocyte activation in chronic renal failure. *J. Immunology*. 161, 2524-2532.

Yunes, R.A., Calixto, J.B., 2001. Plantas medicinais: sob a ótica da química medicinal moderna. Argos Editora Universitária.

Zanoli, P., Avallone, R., Baraldi, M., 2000. Behavioral characterization of the flavonoids apigenin and chrysin. *Fitoterapia* 71, 117-123.

## **ANEXOS**



**ANEXO A**

## Trap sérico

(Repetto, M. Oxidative stress in blood of HIV infected patients.  
Clin Chim Acta, 107-117, 1996)

**REAGENTES****1. ABAP** (azobis, PM = 271,2) 200mM

Pesar 54,24mg de ABAP e dissolver em 1mL H<sub>2</sub>O destilada em tubo de ensaio de 8mL

Agitar no vórtex e preparar no dia de uso.

Proteger o tubo com papel alumínio

Manter no gelo

**2. Luminol** (PM = 199,1) – **Solução mãe**

Pesar 3,98mg de Luminol e dissolver em 10mL H<sub>2</sub>O destilada em tubo de ensaio de 8mL

Agitar em vórtex

Forma corpo de fundo

Proteger o tubo com papel alumínio

Conservar em geladeira

**3. Luminol – Solução de trabalho**

Preparar no dia do uso

A partir da Solução Mãe, agitar o tubo e pipetar 100µL LUMINOL – SOL. MÃE e diluir com 900µL de H<sub>2</sub>O destilada

Proteger o tubo com alumínio

Agitar em vórtex

**4. TROLOX** (PM = 250,29) - **Solução mãe** (20µM)

Pesar 5mg e dissolver em 10mL Tampão Glicina pH=8,6 em tubo de ensaio de 8mL

Proteger com papel alumínio

Agitar em vórtex

Conservar em geladeira

**5. TROLOX - Solução de trabalho – PREPARO NO DIA DE USO**

Agitar e pipetar 4µL TROLOX SOL. MÃE e diluir com 796µL de Tampão Glicina pH = 8,6

Manter no gelo

## 6. Tampão glicina

Pesar 3,75g de glicina dissolver com  $\pm 400$ mL H<sub>2</sub>O destilada em béquer de vidro

Acertar pH em 8,6 com KOH 1M

Transferir o tampão para balão volumétrico de 500mL e completar o volume

Transferir o tampão para frasco de vidro identificado e conservar em geladeira

## PROCEDIMENTO

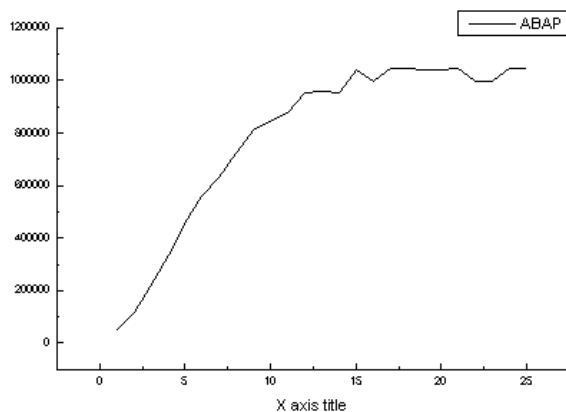
- ✓ Antes de iniciar as reações com soro, fazer as curvas ABAP e com TROLOX

### Curva ABAP

Tampão Glicina \_\_\_\_\_ 1,8mL

Luminol \_\_\_\_\_ 0,1mL

ABAP \_\_\_\_\_ 0,1mL



### Curva Trolox

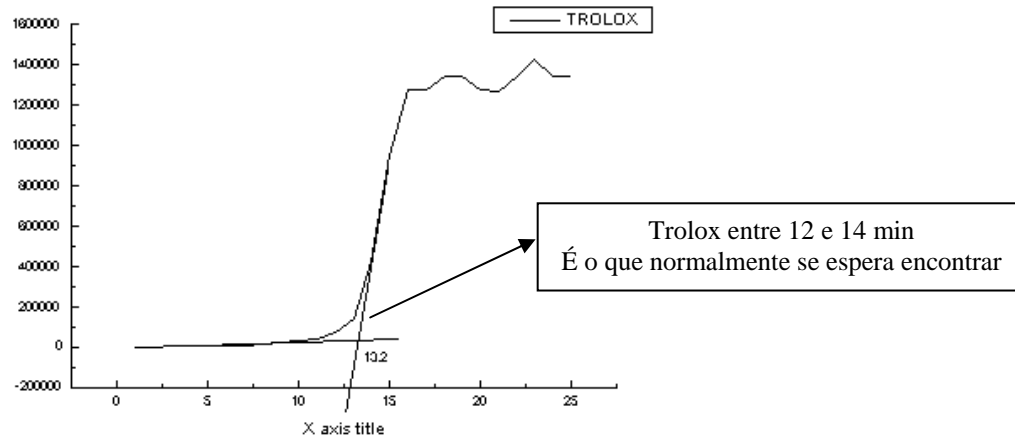
Tampão Glicina \_\_\_\_\_ 1,8mL

Luminol \_\_\_\_\_ 0,1mL

Trolox \_\_\_\_\_ 0,1 mL

ABAP \_\_\_\_\_ 0,1mL

Tempo da curva Trolox entre 12 e 14 min



### **Reação com Soro**

Tampão Glicina \_\_\_\_\_ 1,8mL  
 Luminol \_\_\_\_\_ 0,1mL  
 Soro \_\_\_\_\_ 5 uL  
 ABAP \_\_\_\_\_ 0,1mL

### **PROGRAMAÇÃO DO APARELHO**

- ✓ Main Menu – sel review and edit user program
- ✓ Review/Edit – sel luminescencia
- ✓ Review/Edit – sel counting time:25min
  - Edit Other Parameters
- ✓ Edit Other Parameters – sel data calculation
- ✓ Data calculation – sel number of data points: 25
  - sel count time/data point: 0,10
  - sel count sample set: 1
  - sel factor: 0,01
- ✓ Voltar ao menu principal: sel count single rack
- ✓ Count single rack: sel select user program
- ✓ User selection: sel luminescencia
- ✓ Count single rack: sel count with program user: 1
- ✓ Count single rack: sel [START]

*Selecionar previamente os passos acima e deixar a tela start até que a rack contendo o frasco esteja na posição*

### **CÁLCULO**

$$\text{TRAP} = 401 \times \frac{\text{Tempo da amostra}}{\text{Tempo de trolox}} = \text{cpm}$$

## ANEXO B

### Determinação de MDA – HPLC

(Bastos, *et al.*, 2012. Quantitation of malonaldehyde in gingival crevicular fluid by a high-performance liquid-chromatography-based method)

#### Programação do equipamento – Waters

- ✓ Ligar detector
- ✓ Checar o volume das fases – se estiver baixo, completar.

*Sempre que o equipamento está ligado tem um fluxo baixo de água correndo. Para completar a água, reduzir o fluxo para 0.00, acrescentar água e aumentar o fluxo novamente. Usar água Milli-Q e deixar no ultrassom por 10 minutos.*

- ✓ Colocar as amostras no carrossel
- ✓ Abrir Empower
- ✓ LOGIN: lapa / SENHA: lapadia
- ✓ *Para ver os dados de análises realizadas: BROWSE*  
*Para fazer novas análises: RUN SAMPLE*
- ✓ Run Sample → MDA (Método) + HPLC\_PAD (Sistema) → Ok
- ✓ Load sample → Ok
- Abrir o protocolo
- Precisa SEMPRE conter:
  - Wet prime
  - Purge inject
  - Equilibrate
- Deletar as corridas do dia anterior
- Adicionar as corridas do dia
  - **VIAL:** Posição correta do vial no carrossel
  - **µL INJ VOL:** 20 µL
  - **SAMPLE NAME:** identificação da amostra
  - **FUNCTION:** inject standard (padrão) ou inject sample (amostras)
  - **RUN TIME:** 8 minutos
  - **LABEL e LEVEL:** para padrões só. Colocar 1, 2, 3\*\*\*
- Depois de adicionar padrão/amostra, colocar o método LIMPEZA\_MS (Equilibrate)
- RUN
- Save (salva o sample set method que acabou de ser criado)

**\*\*\* Para fazer o cálculo da curva de calibração utilizando o Empower:** Quando colocar os padrões precisa clicar em Amounts e preencher a tabela:

COMPONENT: colocar um nome (ex. MDA)

VALUE (STANDARD): concentração do ponto...

VALUE (STANDARD): concentração do próximo ponto e assim pra todos os pontos

UNITS: µM<

Save preference

- ✓ Para alterar a sequencia de corridas quando as análises já começaram: *alter running sample* (botão direito) → faz as alterações desejadas → Clica em Run
- ✓ Para abortar todas as leituras → Clica no botão vermelho

## Tratamento da curva/amostras

### Curva (Pode ser feito no excel também)

- ✓ Browse Project → Abrir método (MDA) → Abrir a pasta

*Na aba CHANNEL, tem as leituras em varredura (utilizado para tratar as amostras) e tem as leituras no  $\lambda$  determinado (utilizado para visualizar todos os pontos da curva juntos)*

- Seleciona todos os pontos da curva (na opção de varredura)
- Clica com o botão direito → Review
- Extrair em 532nm → Extract Chromatogram
- Clicar em Processing Method Wizard
  - Create → Ok
  - Nessa tela, mantém essa tela do jeito que está → Ok
  - Seleciona o pico de interesse pela base → Avançar
  - Threshold: Seleciona uma parte da linha de base (onde não tem pico) → Avançar
  - Nessa tela, seleciona o trecho que quer q integre os picos → avançar
  - Nessa tela, mantém essa tela do jeito que está → Ok
  - Sim
  - Coloca nome no pico (ex. MDA) → avançar
  - Avançar até chegar na tela PDA SPECTRAL CONTRAST → Tira a seleção do Max Plot e seleciona o pico → Avançar
  - Dá um nome pra curva (ex. curva 27/01) → Concluir
- Confere todos os pontos da curva → Quando aparecer 2 picos → delete um e clica em Calibrate
- Clica em Calibrate Curve → Mostra curva de calibração com o r e a equação da reta
- Save all

### Amostras

- ✓ Ainda em CHANNEL
  - Seleciona as amostras na varredura
  - Clica em Review (botão direito)
  - Extrai em 532nm
  - Clica em File → Open → Processing method
  - Seleciona a curva anterior, que acabou de ser tratada (ex. Curva 27/01)
  - Nas amostras, o programa não integra sozinho (como faz na curva), então clica em INTEGRATE → QUANTITATE

*Se a curva estiver nas mesmas condições da amostra, o resultado já sai na própria tabela. Caso contrário, é só calcular utilizando a equação da reta*

- Save
- ✓ Na aba RESULTS (Para exportar resultados)
  - Abrir a amostra de interesse → Já aparecerá tratada
    - Seleciona o que deseja exportar (Gráfico, cromatograma, resultados) → Clica em Report Publisher → Mantem na opção Use a report preview → Save → Sai um laudo em PDF

## Preparo dos Reagentes

\*\*\* Para todas as soluções, usar água Milli-Q!

### **BHT 0,2% (sol. Etanol)**

Pesar 0,1g de BHT e diluir em 50mL de etanol. Armazenar em um tubo falcon a temperatura ambiente

### **TCA 7,2% + KI 1% (sol. Água)**

Pesar 1g de KI e 7,2g de TCA e diluir em 100mL de água. Armazenar ao abrigo da luz e na geladeira.

### **TBA 0,6% (sol. Água)**

Pesar 0,6g de TBA e diluir em 100mL de água. Esquentar para dissolução!!! 60°C + peixinho no agitador.

### **NaOH 10N**

Pesar 1,2g de NaOH e diluir em 3 mL de Água MiliQ – validade de 1 semana. Armazenar na geladeira.

### **H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1%**

2 ml Ác. Conc. + 198 mL de Água MiliQ

### **Tampão fosfato (Fase móvel)**

Pesar 5,3g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> e 10,62 de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, dissolver em 2 L de Água Milli-Q.

Acertar o pH = 7,0.

Filtrar o tampão.

Colocar no ultrassom por 10 min. Armazenar em geladeira.

## Preparo da Curva de Calibração

### Solução padrão de MDA:

Diluir 22 $\mu$ L de MDA em 10mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1% em um balão de 10 mL.

Deixar em temperatura ambiente e ao abrigo da luz por 2 horas.

Após, armazenar ao abrigo da luz, em geladeira.

### Solução de MDA diluída (300x):

Em um eppendorf, diluir 5  $\mu$ L da solução diluída de MDA em 1495  $\mu$ L de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1%. Armazenar ao abrigo da luz, em geladeira.

### Leitura da solução diluída em espectrofotômetro:

Fazer a leitura da solução diluída em 245nm com cubeta de quartzo. Usar H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1% como branco.

A D.O. da solução deve estar entre 0,6-0,7

(Variação aceitável de um dia para outro  $\rightarrow$  15%)

Utilizar a D.O. obtida para calcular a concentração real de MDA na solução:

$$C = A / \xi \quad (\text{sendo } C = [\text{MDA}], A = \text{absorbância e } \xi = 13700)$$

Obtida a concentração real da solução diluída de MDA, calcular as diluições necessárias para obter as concentrações de 0,05; 0,25; 0,50; 1,00; 1,5; 2,00. Manter o volume final de 250 $\mu$ L.

*Os pontos da curva de calibração devem ser preparados a partir da SOLUÇÃO DILUÍDA DE MDA e devem ser diluídos em um pool de plasma de 6 indivíduos saudáveis.*

Fazer um branco contendo 250 $\mu$ L de pool de plasma.

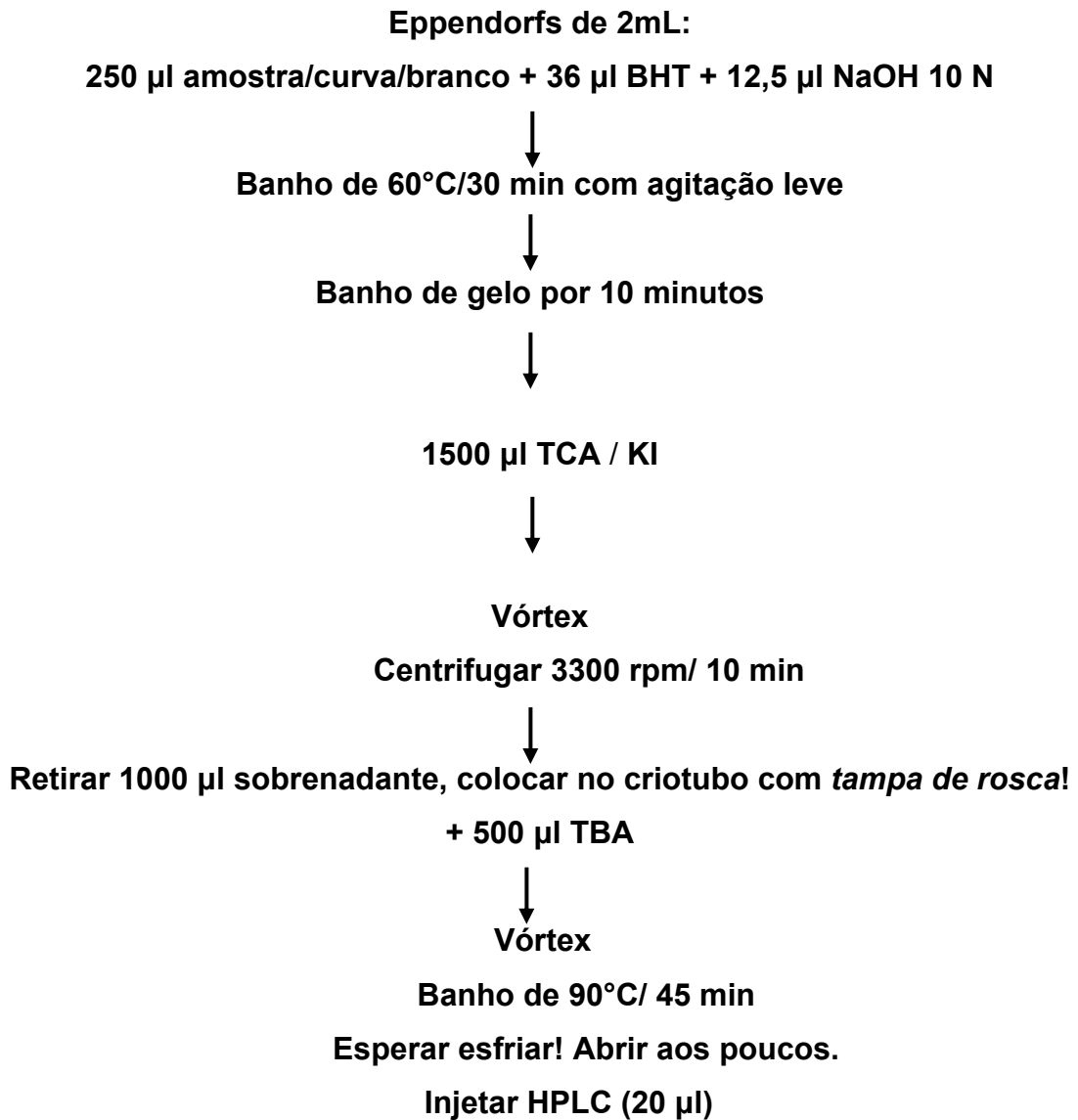
Seguir os passos para o preparo de amostras também para a curva de calibração e para o branco.



## Preparo das Amostras/Curva de Calibração

\*\*\*Para não ocorrer interferência devido à presença de fibrina, é preciso centrifugar as amostras antes de qualquer etapa! (10000 rpm/5 min)

\*\*\*As amostras podem ser preparadas no dia anterior à injeção no HPLC (armazenar em geladeira)



## Preparo da Fase Móvel

**Tampão fosfato 50 nM pH 7,0 (65%) + metanol grau HPLC (35%)**

na coluna de HPLC: 1,0 ml de fase móvel por minuto (**1 ml/min**)

(x2 p/ contar o necessário para a coluna antes e depois das amostras)

**Coluna: C18 com 250 mm de comprimento**

**Temperatura da coluna: 30° C**

**Tempo de corrida: 10 minutos**

## ANEXO C

### Método de Fox

(Jiang, Z.Y.; Hunt, J.V.; Wolff, S.P. Ferrous ion oxidation in the presence of xylenol orange for detection of lipid hydroperoxides in low density lipoproteins. Anal Biochem, 1991, 2002:384-389)

**Obs.:** Não utilizar plasma colhido com EDTA!!!

### REAGENTES

- H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 250mM (PM: 98)

Em um balão de 10mL colocar um pouco de água (em torno de 2mL). Adicionar 245µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e completar o resto do balão com de água.

(PM: 220,3gr)

- Padrão: 1,1,3,3 tetraethoxypropane (TEP) 4mM

Em um balão de 50mL colocar um pouco de água (em torno de 20mL). Adicionar 48µL de TEP e completar o resto do balão com de água.

90mL de metanol puro

- Reagente de FOX:

10mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 250mM

88mg de BHT

7,6mg de xylenol orange

9,8mg de sulfato de ferro amoníaco hexahidratado

Em um frasco que comporte 100mL iremos adicionar os reagentes acima **na ordem correta**. Primeiro colocaremos 90mL metanol puro e adicionaremos em seguida 10mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 250mM (preparado conforme item acima). Após esta fase colocaremos o 88mg BHT seguido de 7,6mg de xylenol orange. Para terminar o reagente adicionamos 9,8mg de sulfato de ferro amoníaco hexahidratado.

## CURVA DE CALIBRAÇÃO

Reagentes	P1	P2	P3	P4	P5
Concentração (mM)	4,0	2,0	1,0	0,500	0,250
H <sub>2</sub> O Dest (µL)	-	100	100	100	100
Padrão (µL)	100	100P1	100P2	100P3	100P4

Para a realização da curva padrão iremos selecionar 5 tubo de ensaio em marcar cada uma com um P(P1, P2, P3, P4 e P5). Após todos os tubos estarem nomeados colocaremos 100µL de água destilada nos tubos P2, P3, P4 e P5. Adicionaremos ao tubo P2 100µL de padrão TEPmM, conforme descrito acima, e este estará pronto. Para o preparo do P3 teremos que adicionar 100µL da reação já pronta do P2. Para o preparo do P4 teremos que adicionar 100µL da reação já pronta do P3 e para o preparo do P5 teremos que adicionar 100µL da reação já pronta do P4. Após estes procedimentos os tubos P3, P4 e P5 também estarão prontos. Por fim prepararemos o P1 que consiste apenas em colocar 100µL de TEP 4mM e finalizaremos a curva padrão.

## PROCEDIMENTO

Reagentes	Branco	Padrão	Amostra
Padrão (µL)	-	100	-
Amostra (µL)	-	-	100
Reagente de FOX (µL)	900	900	900

Para a realização do procedimento iremos selecionar tubos de ensaio em quantidade apropriada para realizamos a técnica. Após todos os tubos estarem nomeados colocaremos 900µL do reagente de FOX, preparado conforme descrito acima, em todos os tubos de ensaio. O tubo branco já estará pronto para uso. Para preparar os tubos padrão (P1, P2, P3, P4 e P5) adicionaremos 100µL dos padrões, preparados acima, aos 900µL do reagente de FOX. Para preparar as amostras adicionaremos 100µL das amostras (plasma) aos 900µL do reagente de FOX (este procedimento causará desproteinização). Em função do reagente possuir ferro em sua constituição, não usar plasma com E.D.T.A. Após este procedimento agitaremos todos os tubos e deixaremos em repouso durante 30 minutos. Em seguida, os tubos serão centrifugados por 10 minutos a 3000 rpm. Ao final do tempo estabelecido vamos ler o resultado em um aparelho espectrofotômetro, acertando o comprimento de onda em 560nm, zerando o aparelho com o branco. A cor é estável durante uma noite.

## ANEXO D

### AOPP (*advanced oxidation protein products*)

(WITKO-SARSAT, V.; FRIEDLANDER, M.; CAPELLERE-BLANDIN, C.; NGUYEN-KHOA, T.; NGUYEN, A. T.; et al. Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia. *Kidney International*, v. 49, p. 1304-13, 1996.)

### REAGENTES

- **KI (Iodeto de Potássio) 1,16M** – preparar a quantidade de uso, não tem definido a validade após preparado.
  - 1- Pesar reagente  
0,962g \_\_\_\_\_ 5mL de H<sub>2</sub>O destilada
  - 2- Colocar reagente em tubo de vidro (10 mL)
  - 3- Adicionar 5 mL de H<sub>2</sub>O destilada
  - 4- Tampar tubo com parafilm e agitar
  
- **Padrão Estoque Cloramina T - 1mM (PM = 281,69)** – validade: até 3 meses em 4°C
  - 1- Pesar o padrão  
28,17mg \_\_\_\_\_ 100mL H<sub>2</sub>O destilada
  - 2- Colocar o padrão em balão volumétrico de 100 mL
  - 3- Adicionar 80 mL de H<sub>2</sub>O destilada
  - 4- Dissolver o padrão
  - 5- Completar o volume para 100 mL
  
- **Ácido Acético PA**  
Usar o reagente comercial.

### AMOSTRAS

- Plasma diluído 1:5 com PBS
  - 1- em tubos diluir as amostras da seguinte maneira:  
200 uL de plasma + 800 uL de PBS

## PROCEDIMENTO

- Diluição Padrão:
  - 1- Em tubos de vidro de 10 mL, fazer a diluição dos padrões antes de adicionar qualquer reagente.
  - 2- Identificar 5 tubos, de P1 ate P5
  - 3- No tubo P1:
    - P1 - 500 $\mu$ L Padrão Estoque + 4,5mL PBS
  - 4 – No tubo P2:
    - P2 – 1mL P1 + 1mL PBS
  - 4- No tubo P3:
    - P3 – 1mL P2 + 1mL PBS
  - 5- No tubo P4:
    - P4 – 1mL P3 + 1mL PBS
  - 6- No tubo P5:
    - P5 – 1mL P4 + 1mL PBS
  - 7- Para a reação seguir o esquema abaixo, identificando os tubos e adicionando os reagentes na ordem

	<b>BRANCO</b>	<b>P1</b>	<b>P2</b>	<b>P3</b>	<b>P4</b>	<b>P5</b>	<b>AMOSTRA</b>
<b>[ ] <math>\mu</math>M</b>		100	50	25	12,5	6,25	
<b>PBS (<math>\mu</math>L)</b>	1000						
<b>PADRÃO (<math>\mu</math>L)</b>		1000	1000	1000	1000	1000	
<b>AMOSTRA (<math>\mu</math>L)</b>							1000
<b>Ác Acético PA (<math>\mu</math>L)</b>	100	100	100	100	100	100	100
<b>KI (<math>\mu</math>L)</b>	50	50	50	50	50	50	50

- Leitura em 340nm
- Ler imediatamente

**Calculo do fator:**

$$\text{FATOR} = \frac{\text{CONCENTRAÇÃO DO PADRÃO}}{\text{LEITURA DO ESPECTROFOTOMETRO}}$$

**Calculo da concentração da amostra:**

CONCENTRAÇÃO = FATOR X LEITURA DA AMOSTRA x 5 (diluição da amostra)

[ Concentração ] AOPP –  $\mu\text{moles/L}$  de equivalente de cloramina T

*Obs.: Fator +/- 50*

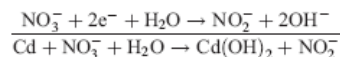
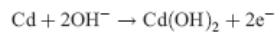
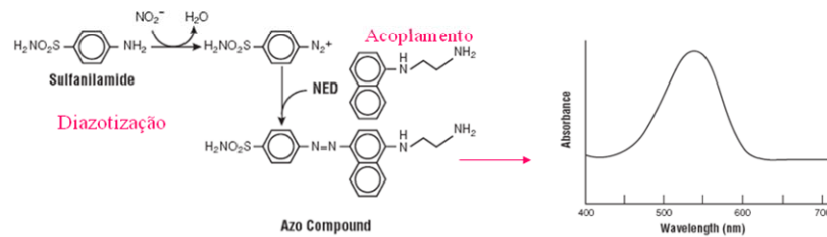
## ANEXO E

### Determinação de nitratos (óxido nítrico) em microplaca

(Adptado da técnica de NAVARRO-GONZÁLVEZ, J. A.; GARCÍA-BENAYAS, C.; ARENAS, J. Semiautomated Measurement of Nitrate in Biological Fluids. Clin Chem., v. 44, p. 679-681, 1998.)

A estimativa da concentração de NO nas amostras foi realizada pela técnica descrita por Navarro-González e colaboradores (1998) adaptada. O método baseia-se na redução de nitrato a nitrito mediada por reações de óxi-redução ocorridas entre o nitrato presente na amostra e o sistema cádmio-cobre dos reagentes, com posterior diazotação e detecção colorimétrica do azocomposto formado pela adição do reagente de Griess a 550 nm (GRIESS, 1879), conforme mostra a figura abaixo:

**Figura 2** –Esquema global das reações envolvidas na determinação de nitrito plasmático empregando-se o método de Cádmio-Cobre seguido da reação de Griess.



## REAGENTES

### 1- Sulfato de Zinco (ZnSO<sub>4</sub>) 75mmol/L

2,156g \_\_\_\_\_ 100mL H<sub>2</sub>O destilada

Pesar 2,156g de Sulfato de Zinco, adicionar em balão volumétrico de 100mL, dissolver com um pouco de água destilada e completar o volume para 100mL.

Armazenar em geladeira.



**2- Hidróxido de Sódio (NaOH) 55mmol/L**

220mg \_\_\_\_\_ 100mL H<sub>2</sub>O destilada

Pesar 220mg de Hidróxido de Sódio, adicionar em balão volumétrico de 100mL, dissolver com um pouco de água destilada e completar o volume para 100mL.

Armazenar em geladeira.

**3- Tampão Glicina (45g/L, pH 9,7)**

4,5g \_\_\_\_\_ 100mL H<sub>2</sub>O destilada

Pesar 4,5g de tampão glicina, adicionar em balão volumétrico de 100mL, dissolver com um pouco de água destilada e completar o volume para 100mL.

Armazenar em geladeira.

**4- Tampão Glicina-NaOH (15g/L, pH 9,7)**

1,5g \_\_\_\_\_ 100mL H<sub>2</sub>O destilada

Pesar 1,5g de tampão glicina, adicionar em balão volumétrico de 100mL, dissolver com um pouco de água destilada e completar o volume para 100mL. Acertar o pH em 9,7 utilizando NaOH.

Armazenar em geladeira.

**5- Sulfato de cobre (CuSO<sub>4</sub>) 5mmol/L em Tampão Glicina-NaOH (15g/L, pH 9,7)**

62,42mg \_\_\_\_\_ 50mL de tampão Glicina-NaOH

Pesar 62,42mg de Sulfato de cobre, adicionar em balão volumétrico de 50mL, dissolver com um pouco de tampão glicina 15g/L e completar o volume para 50mL.

Preparado no dia de uso.

**6- Ácido Sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 100mmol/L**

1,4mL H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> \_\_\_\_\_ 250mL H<sub>2</sub>O destilada

Adicionar um pouco de água destilada em um balão volumétrico de 250mL, pipetar 1,4mL de Ácido sulfúrico e completar o volume para 250mL.

Preparar o reagente em capela.

Armazenar em temperatura ambiente.

**7- Sol. Estoque Padrão NaNO<sub>2</sub> 100mM PM=69,00**

69,00mg \_\_\_\_\_ 10mL H<sub>2</sub>O destilada

Pesar 69mg de NaNO<sub>2</sub> e adicionar em um tubo de vidro. Adicionar 10 mL de água destilada. Tampar tudo com parafilm e verter para dissolver.

Armazenar em geladeira e ao abrigo da luz.

**8- Reagente 1 – Sulfanilamida**

2,0g Sulfanilamida \_\_\_\_\_ 100mL de Ácido Fosfórico 5%

Pesar 2g de Sulfanilamida, adicionar em balão volumétrico de 100mL, dissolver com um pouco de ácido fosfórico 5% e completar o volume para 100mL. Armazenar em geladeira e ao abrigo da luz.

**9- Reagente 2 – N-naphthylethylenediamine dihydrochloride(NEDD)**

200mg NEDD \_\_\_\_\_ 100mL H<sub>2</sub>O destilada

Pesar 200mg de NEDD, adicionar em balão volumétrico de 100mL, dissolver com um pouco de água destilada e completar o volume para 100mL.

Armazenar em geladeira e ao abrigo da luz.

**DESPROTEINIZAÇÃO**

- ✓ Adicionar, em eppendorf, em triplicata, 60µL de amostra + 60µL de 75mmol/L ZnSO<sub>4</sub>;
- ✓ Agitar 30sec no vórtex;
- ✓ Centrifugar por 2min a 10000rpm a temperatura ambiente;
- ✓ Após centrifugar, adicionar 70µL de 55mmol/L NaOH;
- ✓ Agitar 30sec no vórtex (não precisa quebrar o sedimento)
- ✓ Centrifugar por 5min a 10000rpm a temperatura ambiente;
- ✓ Transferir 150µL do sobrenadante para tubo de ensaio de vidro pequeno (sobrenadante não deve estar turvo);
- ✓ Adicionar 50µL de tampão glicina (45g/L, pH 9,7).

**ATIVAÇÃO DOS GRÂNULOS DE CÁDMIO**

*Para esta técnica utiliza-se 2 grânulos pequenos.*

- ✓ Grânulos ficam estocados em H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 100 mmol/L
- ✓ Em capela, lavar os grânulos que serão utilizados com H<sub>2</sub>O destilada 3 vezes (com auxílio de um béquero e uma peneira)
- ✓ Colocar a solução de CuSO<sub>4</sub> 5mmol/L em um pote e adicionar os grânulos previamente lavados. São então, deixados em contato por 5min.
- ✓ Os grânulos ativados devem então ser usados dentro de 10min.
- ✓ Retirar os grânulos da solução e adicionar a quantidade necessária em cada vial.
- ✓ Após o uso, os grânulos são lavados e estocados em 100mmol/L de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.
- ✓ Os grânulos que ficarem pretos mesmo após serem lavados com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> devem ser descartados.

## REDUÇÃO DO NITRATO A NITRITO

- ✓ 2 grânulos são adicionados ao tubo de ensaio contendo a amostra e o tampão glicina.  
*Procurar utilizar os grânulos com tamanhos próximos!*
- ✓ Deixar em agitação contínua por 10min em agitador tipo Kline;
- ✓ Transferir 100µL de cada amostra para a microplaca para a determinação de nitritos.

## CURVA DE CALIBRAÇÃO (triplicata)

*Fazer a diluição dos padrões na própria microplaca antes de adicionar qualquer reagente.*

1. Preparar a Solução de Uso  $\text{NaNO}_2$  125µmol/L (P5): Em um balão volumétrico de 100mL dissolver 125µL de Solução Estoque Padrão  $\text{NaNO}_2$  100mM
2. Adicionar 100µL de água destilada nos poços A1, A2, A3 (brancos)
3. Adicionar 100µL Solução de Uso  $\text{NaNO}_2$  125µmol/L no poço B1, B2, B3 (primeiro ponto)
4. Adicionar 100µL de água destilada nos poços C1, C2, C3, D1, D2, D3, E1, E2, E3, F1, F2, F3
5. Adicionar 100µL Solução de Uso  $\text{NaNO}_2$  125µmol/L no poço C1 e homogeneizar com a própria pipeta.
6. Transferir 100µL da solução C1 para o poço D1 e homogeneizar com a própria pipeta.
7. Transferir 100µL da solução D1 para o poço E1 e homogeneizar com a própria pipeta.
8. Transferir 100µL da solução E1 para o poço F1 e homogeneizar com a própria pipeta.
9. Retirar 100µL do poço F1 e descartar.
10. Repetir o mesmo procedimento (a partir do passo 5) para as outras duas curvas de calibração (Coluna 2 e 3)

## QUANTIFICAÇÃO DO TEOR DE NITRITOS

- Após a adição das amostras e da diluição seriada do padrão na microplaca, adiciona-se 50 µL do Reagente 1 e 50 µL do Reagente 2 a cada poço
- Incubar por 10min a temperatura ambiente;
- Leitura em leitor de microplaca – 550nm

- **IMPORTANTE:** Toda solução que entrou em contato com o cádmio deve ser descartada como resíduo tóxico (armazenar em potes de plástico para descarte adequado)

**CÁLCULO DO FATOR:**

$$\text{Fator} = \frac{\text{Concentração do padrão}}{\text{Leitura do espectrofotômetro}}$$

**CÁLCULO DA CONCENTRAÇÃO DA AMOSTRA:**

$$\text{Concentração} = \text{fator} \times \text{leitura da amostra}$$

*Concentração de Óxido Nítrico –  $\mu\text{mol/L}$*

*Obs.: Fator +/- 65.*

## ANEXO F

### Burst respiratório - microplaca

(Modificado de: Huber, K; Krötz-Fahning, M.; Hock, B. Respiratory Burst as a biomarker for stress responses. *Protoplasma* (2006) 229: 221-224;

(FREITAS, M.; PORTO, G.; LIMA, J. L. F. C.; FERNANDES, E. Isolation and activation of human neutrophils in vitro. The importance of the anticoagulant used during blood collection. *Clin Biochem*, v. 41, p. 570–575, 2008)

#### REAGENTES

✓ **PBS**

8,0g NaCl  
0,2g KCl  
0,62g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
1,14g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
800mL água destilada  
20mL de glicose 10%  
20mL de albumina 5%  
qsp 1L de água destilada  
pH: 7,3

✓ **Preparo da Solução de PMA – SOLUÇÃO ESTOQUE (5mM)**

(Phorbol 12-Myristate 13-Acetate; C<sub>36</sub>H<sub>56</sub>O<sub>8</sub> = 616,84)

1mg de PMA em 325µL de DMSO

\*Estocado à -80°C, em eppendorfs contendo 10µL

✓ **Preparo da Solução de PMA – SOLUÇÃO USO (5µM)**

10µL da Solução Estoque em 10mL de PBS

\*Pode ser estocado a -80°C

✓ **Preparo do Luminol – SOLUÇÃO ESTOQUE (200mM)**

3,98mg de luminol em 10mL de água destilada (utilizar sonicador)

\*Armazenar em geladeira ao abrigo da luz

\*Pode ser diluído em DMSO e armazenado à -80°C

✓ **Preparo do Luminol – SOLUÇÃO USO (20mM) – Preparar**

50µL de luminol + 450µL de água destilada

\*Armazenar ao abrigo da luz

\*Calcular o volume necessário de acordo com a quantidade de reações a serem realizadas

## SEPARAÇÃO DOS NEUTRÓFILOS

- ✓ Colher sangue de um doador normal e iniciar o procedimento de separação de células imediatamente. Utiliza-se EDTA como anticoagulante.

\* *O tipo sanguíneo (ABO e Rh não interfere).*

- ✓ Em um tubo cônico graduado colocar 2,0mL de Histopaque 1119 com auxílio de uma pipeta Pasteur. Em seguida, lentamente pela parede do tubo, adicionar 2,0mL de Histopaque 1077 (deve formar duas camadas distintas).

\**Os reagentes devem estar à temperatura ambiente!*

\**Utilizar tubos cônicos de plástico e pipeta Pasteur estéreis.*

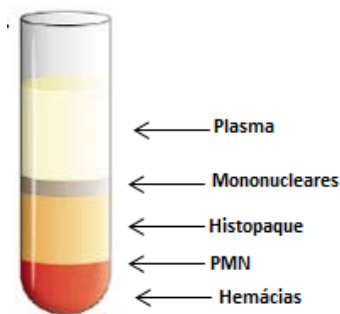
- ✓ Adicionar 3-6mL de sangue total lentamente pelas paredes do tubo com uma pipeta Pasteur.

\**Não demorar muito para adicionar a amostra para evitar que o sangue se misture com o Histopaque.*

- ✓ Centrifugar durante 30 minutos a 1000 rpm (temperatura da centrifuga em torno de 22°C)

\* *Após a centrifugação, retirar o tubo da centrífuga com cuidado para não desfazer as camadas que se formarão.*

- ✓ Retirar a interface dos neutrófilos com uma Pipeta Pasteur e colocar em um tubo cônico limpo (de acordo com a figura abaixo)



- ✓ Adicionar o dobro do volume de PBS com glicose e albumina e misturar lentamente. Centrifugar por 10 minutos à 1000 rpm

- ✓ Desprezar o sobrenadante. Adicionar de 3-5 mL de PBS, misturar e centrifugar por 1 minuto à 1000 rpm

\* *Retirada de plaquetas.*

- ✓ Desprezar o sobrenadante. Acrescentar água destilada e agitar lentamente por inversão durante aproximadamente 30 segundos. Adicionar cerca de 3 mL de PBS e centrifugar por 1 minuto à 1000 rpm.

\* *Lise de hemácias*

- ✓ Desprezar o sobrenadante. Re-suspender o pellet em 1 mL de PBS.

## VIABILIDADE CELULAR

- ✓ Em um tubo de ensaio, adicionar 240µL de Tripán blue 0,5% e 10µL de neutrófilos. Preencher a câmara de Neubauer e focar em microscópio na objetiva de 40x. A viabilidade celular é avaliada em toda a câmara. A contagem celular é realizada no quadrante central, contando apenas as células viáveis.

## CÁLCULO DA CONCENTRAÇÃO

Nº de células contadas: **y**

$$\frac{y}{x} = \frac{\text{_____} 10\mu\text{L}}{\text{_____} 1000\mu\text{L}}$$

$x = z$

$$z \times 25 \text{ (diluição)} = w \text{ cls/mL}$$

*\*Para a reação de quimiluminescência, ajusta-se a concentração das células para  $1,25 \times 10^6 \text{ cls/mL}$*

$$\frac{w \text{ cls/mL}}{1,25 \times 10^6 \text{ cls/mL}} = \frac{\text{_____} 1000\mu\text{L}}{\text{_____} x}$$

$x$  = volume necessário de células para uma concentração de  $1,25 \times 10^6 \text{ cls/mL}$

$1000 - x$  = volume de PBS necessário para volume final de 1mL

### \*\*\*Cálculos:

$$\begin{array}{l} 1 \text{ mol PMA} \text{ _____ } 616,84\text{g} \\ 1\text{mM} \text{ _____ } 616,84\text{mg} \\ 5\text{mM} \text{ _____ } 3084,2\text{mg} \end{array}$$

$$\frac{3084,2\text{mg de PMA}}{1\text{mg}} = \frac{\text{_____} 1000\text{mL}}{x}$$

$X = 325\mu\text{L}$  de DMSO para 1 mg de PMA (**SOLUÇÃO ESTOQUE – 5mM**)

$$\begin{array}{l} C_1V_1=C_2V_2 \\ 5. V_1= 0,005.10 \\ V_1= 0,01\text{mL} \end{array}$$

10 µL da Solução Estoque para 10mL de PBS (**SOLUÇÃO USO - 5µM**)

### Albumina 5%

$$\frac{25\text{mL}}{X} = \frac{\text{_____} 20\%}{\text{_____} 5\%}$$

$X = 6,25 \text{ mL}$  de albumina para 25

mL de água destilada

\*Cuidado para não formar muita espuma!!!

### **Glicose 10%**

10g \_\_\_\_\_ 100mL

X \_\_\_\_\_ 25mL

X = 2,5g de glicose para 25mL de água destilada

### **PROGRAMAÇÃO DO APARELHO - VICTOR® - PERKIN ELMER**

- ✓ Ligar estabilizador/computador
- ✓ Ligar equipamento (ligar antes de abrir o programa para não entrar no modo DEMO) – Botão atrás do dispenser!
- ✓ Abrir o WORKSTATION
- ✓ Ajustar temperatura para 30°C
  - Clicar na aba “temperature” → Clicar em “ON” → Ajustar para 30° → Clicar em “apply”
- ✓ Colocar a placa OptiPlate 96 (branca) dentro do aparelho e esperar a temperatura estabilizar
- ✓ Abrir o WORKOUT
- ✓ Na aba “Shortcuts”, clicar em “Protocols”
- ✓ Selecionar “Burst respiratório”
- ✓ No protocolo que abrirá, clicar em “edit protocol” → Microplate layout → edit
  - Clicar no ! vermelho para limpar a placa
  - Selecionar com o mouse em cima da placa os poços que serão utilizados na leitura (devem ficar marcados em verde)
  - Clicar em “save and close”
  - *Obs.: O protocolo está estruturado para a leitura de 8 poços de cada vez. Caso altere o número de poços é necessário calcular e alterar o delay between repeats na aba “readings”*
- ✓ Clicar em “OK” (deve voltar para a tela inicial do protocolo)
  
- ✓ Retirar a placa do equipamento e montar a reação
  - 200µL de células ( $1,25 \times 10^6$  cls/mL)**
  - 50µL de luminol 1mM**
  - 50µL de PMA 5µM**

**\*Colocar nesta ordem!**



- ✓ Colocar a placa no equipamento e clicar em “Start measurement”
  - ✓ Retirar a placa do equipamento ao final da leitura
  - ✓ Para fazer uma nova leitura, abrir novamente o protocolo Burst respiratório e refazer os passos ou,
  - ✓ Fechar o Worstation e o Workout
  - ✓ Desligar o aparelho
  - ✓ Desligar o computador/estabilizador
- 
- ✓ Lavar a placa 3x com água destilada e deixar secando em um papel absorvente

### **PARA EXPORTAR OS RESULTADOS**

- ✓ No WORKSTATION
  - Clicar em “explore protocols and results”
  - Abrir o assay desejado
  - Clicar em “export”
  - Definir local a ser salvo e nome do arquivo (salvar sempre como excel)
  - Abrir o arquivo do excel salvo
  - Clicar na aba “list; plate 1-1”
  - Ir em “Dados” → “Classificar” → Classificar por well/Ordem de A-Z
  - Copiar os valores para o Origin
  - Plotar o gráfico normalmente