

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

Paula Eliete Rodrigues Bitencourt

**EFEITO DO EXTRATO AQUOSO E DE NANOPARTÍCULAS
POLIMÉRICAS CONTENDO SEMENTES DE *Syzygium cumini* SOBRE
COMPLICAÇÕES DO DIABETES MELLITUS *IN VITRO* E *IN VIVO***

Santa Maria, RS
2016

Paula Eliete Rodrigues Bitencourt

**EFEITO DO EXTRATO AQUOSO E DE NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS
CONTENDO SEMENTES DE *Syzygium cumini* SOBRE COMPLICAÇÕES DO
DIABETES MELLITUS *IN VITRO* E *IN VIVO***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, área de concentração em Desenvolvimento e Aplicação de Marcadores no Diagnóstico Laboratorial, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM – RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciências Farmacêuticas**.

Orientador (a): Prof^ª. Dr^ª. Maria Beatriz Moretto
Coorientador: Prof. Dr. Sydney Hartz Alves

Santa Maria, RS
2016

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Bitencourt, Paula Eliete Rodrigues
Efeito do extrato aquoso e de nanopartículas
poliméricas contendo sementes de *Syzygium cumini* sobre
complicações do Diabetes Mellitus in vitro e in vivo /
Paula Eliete Rodrigues Bitencourt.- 2016.
169 p.; 30 cm

Orientadora: Maria Beatriz Moretto
Coorientador: Sydney Hartz Alves
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-
Graduação em Ciências Farmacêuticas, RS, 2016

1. Complicações do Diabetes mellitus 2.
Ectonucleotidases 3. Nanotecnologia 4. *S. cumini* 5.
Toxicidade I. Moretto, Maria Beatriz II. Alves, Sydney
Hartz III. Título.

© 2016

Todos os direitos autorais reservados a Paula Eliete Rodrigues Bitencourt. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita mediante a citação da fonte.

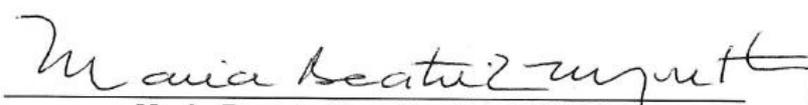
E-mail: bitencourt.paula@yahoo.com.br

Paula Eliete Rodrigues Bitencourt

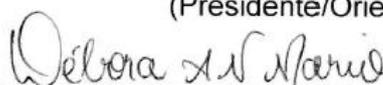
**EFEITO DO EXTRATO AQUOSO E DE NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS
CONTENDO SEMENTES DE *Syzygium cumini* SOBRE COMPLICAÇÕES DO
DIABETES MELLITUS *IN VITRO* E *IN VIVO***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, área de concentração em Desenvolvimento e Aplicação de Marcadores no Diagnóstico Laboratorial, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM – RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciências Farmacêuticas**.

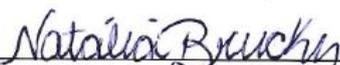
Aprovada em 13 de dezembro de 2016:



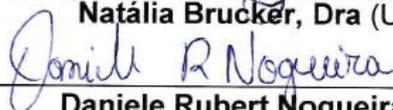
Maria Beatriz Moretto, Dra (UFSM)
(Presidente/Orientadora)



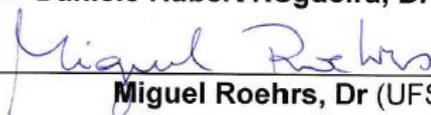
Débora Alves Nunes Mario, Dra (IMED-Passo Fundo)



Natália Brucker, Dra (URI-Santiago)



Daniele Rubert Nogueira, Dra (UFSM)



Miguel Roehrs, Dr (UFSM)

Santa Maria, RS
2016

*"A gratidão é a memória do coração."
Antístenes*

Mãe, Pai, Júnior e Régis... A minha eterna e profunda gratidão!

AGRADECIMENTOS

A Deus, obrigada por simplesmente tudo... Por me guiar e proteger nessa longa caminhada!

Aos meus pais, Catarina e João Alberto pelo amor, carinho e por serem minha maior e melhor referência. Minha eterna gratidão a vocês pelo apoio sem medidas, torcida diante de tantos desafios, pela dedicação em participar do meu dia-a-dia tão cheio de altos e baixos, pela compreensão quando os experimentos falaram alto, pela abdicação de tempo e de tantos projetos pessoais para que eu estivesse aqui hoje diante da realização de mais essa conquista. Vocês são tudo pra mim...

Ao meu irmão Junior por ser o meu "braço forte e mão amiga"... Por me incentivar e acreditar em mim desde sempre! Tu és meu grande orgulho Tenente!!!

Ao meu marido Régis meu agradecimento sincero e infinito! Tu foste meu porto seguro... Onde encontrei a força para continuar, compreensão para chorar meus contratempos, companhia para comemorar os bons momentos e muito carinho e amor ao longo de todos esses anos... É tanta história, tanta vida compartilhada e tantos nós que me faltam palavras para descrever a tua importância em tantos momentos da minha vida! Espero que nesse momento tu estejas tendo tanto orgulho de mim quanto eu tenho de ti! Eu te amo... Mais que ontem e menos que amanhã.

A minha sogra Salete por ter me recebido tão bem na sua casa, nas minhas idas e vinda à Santa Maria, e na sua família!

Aos meus tios, Nara e Paulo, e padrinhos, Alzira e Antônio, pelo carinho e palavras de incentivo durante todos esses anos que, mesmo longe, foram essenciais.

As minhas irmãs de alma Laura, Márcia e Pauline... A nossa cumplicidade, lealdade e união me trazem a paz e alegria de saber que nossa amizade é pra sempre... A certeza de que mesmo longe estaremos sempre perto! Vocês são únicas e são parte do meu coração! Tia Nina, obrigada por todos os posos!

A minha orientadora Maria Beatriz Moretto por todas as oportunidades que me foram concedidas! Foi através delas que pude construir uma ampla base de sólidos conhecimentos que me permitiram chegar até aqui e, talvez, ir além! Muito obrigada pela confiança e disponibilidade em me orientar desde o terceiro semestre da faculdade até o doutorado!

Ao meu coorientador Sydney Hartz Alves, pelas relevantes ideias que contribuíram para um melhor e mais completo desenvolvimento dessa tese e a sua aluna, Laura Denardi, pelo auxílio na parte experimental relacionada a *C. albicans*.

À Profa. Dra. Letícia Cruz, orientadora do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica e a Luana Mota Ferreira, minha colega e amiga, pela preciosa e indispensável ajuda no desenvolvimento das nanopartículas poliméricas utilizadas nesse trabalho. Obrigada por confiarem no meu trabalho, abrirem as portas do laboratório e me permitirem fazer parte desse respeitável grupo de pesquisa! Minha mais sincera gratidão e anseio de um dia poder retribuir, pelo menos um pouco, o tanto que fizeram por mim!

Ao Prof. Dr. Rafael Moresco, orientador do laboratório de Bioquímica Clínica e a Manuela Sangoi, minha grande amiga, por toda ajuda e disponibilidade para as determinações de NO e AOPP. Não tenho palavras para descrever minha gratidão por ter sido tão bem recebida em um laboratório de tanto prestígio! Espero um dia poder retribuir todo o apoio e confiança recebidos!

À Profa. Dra. Marta Duarte pela disponibilidade na determinação das citocinas, que foram imprescindíveis para o norteamento desse trabalho.

A todas as colegas que passaram pelo laboratório: Luziane, Faída, Priscila, Karine e Gabriela. Além de amigas, foram fonte de conhecimento e inspiração. Tive muita sorte de conhecer e conviver com todas vocês!

A Lariane, Carolina e Raphaela por toda ajuda e troca de ideias antes e durante a execução desse trabalho. Saudades da nossa convivência diária, das viagens para os congressos, das conversas que se estendiam do meio científico ao cotidiano... A nossa amizade é pra sempre!

Aos professores Dra. Débora, Dra. Natália, Dra. Daniele e Dr. Miguel, pela disponibilidade em avaliar meu trabalho.

A todos os funcionários do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, muito obrigada por tudo!

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas e a todos os professores que contribuíram para minha formação.

À CAPES, pela bolsa de estudos concedida.

À Universidade Federal de Santa Maria, pelas tantas oportunidades, pela infraestrutura e ensino público de excelência. Para sempre carregarei o orgulho de ser "cria" dessa casa!

RESUMO

EFEITO DO EXTRATO AQUOSO E DE NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS CONTENDO SEMENTES DE *Syzygium cumini* SOBRE COMPLICAÇÕES DO DIABETES MELLITUS *IN VITRO* E *IN VIVO*

AUTORA: Paula Eliete Rodrigues Bitencourt
ORIENTADORA: Prof.^a Dr.^a Maria Beatriz Moretto
COORDENADOR: Prof. Dr. Sydney Hartz Alves

Em longo prazo, pacientes diabéticos apresentam comprometimento do sistema cardiovascular, além de um desbalanço no sistema imunológico, que leva ao aumento na suscetibilidade desses em contrair infecções fúngicas. O diabetes *mellitus* (DM) também pode levar a uma alteração nos níveis de mediadores inflamatórios, como os pertencentes aos sistemas purinérgico e colinérgicos, citocinas e óxido nítrico (NO). *Syzygium cumini* é uma planta medicinal amplamente utilizada pela população na terapêutica do DM, sendo as sementes fonte de altas concentrações de compostos fitoquímicos com relevantes ações farmacológicas. Novos sistemas de administração de fármacos como as nanopartículas poliméricas podem aumentar o índice terapêutico e melhorar a estabilidade de extratos vegetais. Considerando os poucos estudos sobre a inter-relação desses com a infecção fúngica no DM, bem como a utilização de *S. cumini* frente a complicações do DM e na elaboração de novas formas de utilização, o objetivo desse estudo foi utilizar o extrato aquoso de sementes de *S. cumini* (ASc) no desenvolvimento de uma nanopartícula polimérica (NPASc) e avaliar suas atividades farmacológicas frente a parâmetros bioquímicos e inflamatórios em modelos de complicações do DM desenvolvidos *in vitro* e *in vivo*, bem como verificar possíveis efeitos tóxicos de NPASc em comparação com o ASc. O desenvolvimento da NPASc foi realizado com êxito, uma vez que demonstrou características compatíveis com os sistemas nanométricos. ASc e NPASc apresentaram uma alta concentração de compostos fenólicos e flavonoides, além do grande potencial antioxidante nos testes *scavenger* de DPPH, FRAP e contra a oxidação de partículas de LDL, comprovando que a formulação NPASc foi capaz de manter as propriedades do extrato. NPASc melhorou a atividade antifúngica *in vitro* de ASc frente a *Candida guilliermondii* e *C. haemulonii*. Observou-se ausência de toxicidade de ASc, NPASc e NPb nos testes de letalidade com *Artemia salina* e nos parâmetros analisados relacionados à toxicidade aguda em ratos. Foi observado um aumento nos parâmetros bioquímicos e citocinas pró-inflamatórias em soro, urina, atividade sérica e plaquetária das ectonucleotidases e níveis de NO, além de aumento na atividade da ADA, DPP-IV, acetilcolinesterase e níveis de NO em linfócitos nos grupos com DM e DM infectados com *C. albicans*. O mesmo observou-se em relação à atividade da ADA e aos níveis de NO, TBARS e AOPP em tecido renal, hepático e pancreático. Cabe ressaltar que o grupo de animais infectados por *C. albicans* apresentou altos níveis de creatinina sérica e citocinas pró-inflamatórias, além de um aumento na atividade das enzimas purinérgicas. ASc e NPASc foram capazes de atuar em diferentes rotas relacionadas ao sistema inflamatório, como na diminuição das atividades das ectonucleotidases, na regulação dos níveis de citocinas e NO, além de reduzir o estresse oxidativo e atenuar os níveis dos parâmetros bioquímicos nas amostras analisadas. Portanto, é possível concluir que as alterações encontradas em ratos diabéticos durante a infecção fúngica podem estar relacionadas a processos inflamatórios e tanto ASc quanto NPASc podem contribuir para um melhor entendimento e aplicabilidade da utilização dessa planta frente às complicações do DM.

Palavras-chave: Complicações do Diabetes *mellitus*. Ectonucleotidases. Nanotecnologia. *S. cumini*. Toxicidade.

ABSTRACT

EFFECT OF AQUEOUS EXTRACT AND CRUDE AND NANOPARTICULATE OF THE SEED *Syzygium cumini* ON PURINERGIC SYSTEM COMPONENTS AND COMPLICATIONS OF DIABETES MELLITUS

AUTHOR: PAULA ELIETE RODRIGUES BITENCOURT
ADVISOR: PROF.^a DR.^a MARIA BEATRIZ MORETTO
CO-ADVISOR: PROF. DR. SYDNEY HARTZ ALVES

In the long term, diabetic patients have impaired cardiovascular system, as well as an imbalance in the immune system, which leads to increased susceptibility of these in contracting fungal infections. Diabetes *mellitus* (DM) may also lead to a change in levels of inflammatory mediators such as those belonging to the purinergic and cholinergic systems, cytokines and nitric oxide (NO). *Syzygium cumini* is a medicinal plant widely used by the population in the treatment of DM, whose seeds are source of high concentrations of phytochemical compounds with relevant pharmacological actions. New drug delivery systems such as polymeric nanoparticles, can enhance the therapeutic index and improving stability of plant extracts. Considering the few studies on the interrelationship of these systems with fungal infection in DM, the use of *S. cumini* against DM complications and the development of new forms of use of this plant, the aim of this study was to use the aqueous seed extract of *S. cumini* (ASc) in the development of a polymeric nanoparticle (NPASc) and to evaluate pharmacological activities of both formulations on biochemical and inflammatory parameters of DM complications developed *in vitro* and *in vivo*, as well as to identify possible toxic effects of NPASc compared with ASc. The development of NPASc was successful, as it demonstrated characteristics compatible with nanometric systems. ASc and NPASc had a high concentration of flavonoids and phenolic compounds, besides the great antioxidant scavenger potential in the DPPH test, FRAP and against the oxidation of LDL particles, proving that the NPASc formulation was able to maintain the properties of the extract. NPASc improved ASc antifungal activity *in vitro* against *Candida guilliermondii* and *C. haemulonii*. No toxicity was observed for ASc, NPASc and NPB in the *Artemia salina* lethality test and in the analyzed parameters related to acute toxicity in mice. An increase in the biochemical parameters and proinflammatory cytokines was observed in serum and urine, in the serum activity of platelet ectonucleotidases and in NO levels, as well in ADA, DPP-IV acetylcholinesterase activities and in NO levels in lymphocytes in the groups with DM and DM followed by *C. albicans* infection. The same was observed compared to the activity of ADA and NO levels, TBARS and AOPP in kidney, liver and pancreatic tissues. It is noteworthy that the group of animals infected with *C. albicans* showed high levels of serum creatinine, pro-inflammatory cytokines and an increase in the activity of purinergic enzymes. ASc and NPASc were able to act on different routes related to the inflammatory system, such as the reduction in ectonucleotidase activities, in regulating the levels of cytokines and NO, in reducing oxidative stress and mitigating the levels of biochemical parameters in the samples. Therefore, we conclude that the changes found in diabetic rats during fungal infection may be related to inflammatory processes and both ASc as NPASc can contribute to a better understanding and applicability in the use of this plant against DM complications.

Keywords: Diabetes *mellitus* complications. Ectonucleotidases. Nanotechnology. *S. cumini*. Toxicity.

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO

Figura 1 – Estimativa do número de pessoas (20-79 anos) com DM em todo o mundo e por região em 2015 e para o ano 2040.....	25
Figura 2 – Mecanismos da oxidação de LDL.....	34
Figura 3 – Levedura e hifa de <i>C. albicans</i>	40
Figura 4 – Componentes da sinalização purinérgica.....	45
Figura 5 – Interação do nucleosídeo Ado com seus receptores presentes na superfície de células do sistema imune e os efeitos modulatórios.....	48
Figura 6 – Vias de síntese, degradação e recaptção de Ado.....	49
Figura 7 – Ectonucleotidases e suas principais características.....	51
Figura 8 – Esquema de indução de DM seguido por infecção em ratos.....	57
Figura 9 – Distribuição dos municípios que possuem ações/serviços com plantas medicinais e fitoterapia nas unidades federais.....	61
Figura 10 – Árvore de <i>S. cumini</i>	63
Figura 11 – Aparência externa e interna do fruto e semente de <i>S. cumini</i>	63
Figura 12 – Mecanismos de ação propostos até o momento sobre a ação hipoglicêmica das principais partes de <i>S. cumini</i>	70
Figura 13 – Representação das técnicas de preparação de NP's.....	74
Figura 14 – Esquema de formação de emulsão múltipla para o método emulsificação/ evaporação solvente.....	75
Figura 15 – Resumo gráfico.....	127

ARTIGO 1

Graphical Abstract.....	83
Figure 1 – HPLC chromatogram obtained from the ASc and NPASc.....	88
Figure 2 – Antioxidant activities of ASc, NPASc and GA.....	89
Supplementary Material Figure 1 – Survival percentage of <i>A. salina</i>	92
Supplementary Material Figure 2 – Macroscopic analysis of structures.....	93

ARTIGO 2

Figure 1 – HPLC chromatogram obtained from the ASc and NPASc.....	98
Figure 2 – Purinergic involvement in serum of the normal and diabetic candidemia groups and treatment with ASc and NPASc.....	99
Figure 3 – Purinergic involvement in platelets of the normal and diabetic candidemia groups and treatment with ASc and NPASc.....	100

LISTA DE TABELAS

INTRODUÇÃO

Tabela 1 – Valores de glicose plasmática (mg/dL) para diagnóstico do DM e estágios pré-clínicos.....	27
Tabela 2 – Compostos fitoquímicos identificados nas diferentes partes de <i>S. cumini</i>	64
Tabela 3 – Ações farmacológicas de diferentes partes da planta <i>S. cumini</i>	65

ARTIGO 1

Table 1 – Physicochemical characteristics of the nanoparticle suspensions.....	87
Table 2 – Minimum inhibitory concentrations ($\mu\text{g/mL}$) of ASc and NPASc against yeast and filamentous fungi	88
Table 3 – Serum biochemical parameters in rats treated with a single dose of ASc, NPb and NPASc... ..	89
Table 4 – Hematological parameters in rats treated with a single dose of ASc, NPb and NPASc.....	89
Table 5 – Lipoperoxidation levels (nmol MDA/mg of protein) in cerebral cortex, spleen, kidney and liver of rats treated with a single dose of ASc, NPb and NPASc.....	90
Supplementary Material Table 1 – Relative weights organs of rats treated with single dose of ASc, NPb and NPASc.	92
Supplementary Material Table 2 – Mean body weight of rats treated with single dose of ASc, NPb and NPASc.....	92

ARTIGO 2

Table 1 – Effects of treatment with ASc and NPASc in serum biochemical and immunological parameters in different rats groups.....	99
Table 2 – Effects of treatment with ASc and NPASc in biochemical parameters in lymphocytes suspension.....	99
Table 3 – Effects of treatment with ASc and NPASc in ADA activity and NOx levels in tissues	100

MANUSCRITO 1

Table 1 – Effects of treatment with ASc and NPASc in serum biochemical and immunological parameters in different rats groups.....	120
Table 2 – Effects of treatment with ASc and NPASc in biochemical parameters in lymphocytes suspension.....	121

LISTA DE ABREVIATURAS

5'NT	- Ecto- 5' Nucleotidase
AAPH	- 2,2'-azobis-2-amidinopropano dicloridrato
ACh	- Acetilcolina
AChE	- Acetilcolinesterase
ADA	- Adenosina desaminase
Ado	- Adenosina
ADP	- Adenosina difosfato
AMP	- Monofosfato de adenosina
AOPP	- Produtos Proteicos de Oxidação Avançada
ASc	- Extrato aquoso de sementes de <i>S. cumini</i>
ATP	- Trifosfato de adenosina
CIM	- Concentração Inibitória Mínima
DM 1	- Diabetes <i>mellitus</i> tipo 1
DM 2	- Diabetes <i>mellitus</i> tipo 2
DM	- Diabetes <i>mellitus</i>
DPP-IV	- Dipeptidil Peptidase IV
FNT α	- Fator de Necrose Tumoral α
FRAP	- Capacidade redutora do ferro
HbA _{1c}	- Hemoglobina glicada
IFN γ	- Interferon γ
IL-1	- Interleucina 1
IL-10	- Interleucina 10
IL-6	- Interleucina 6
LDL	- Lipoproteína de baixa densidade
NAG- N	- acetil- β -D- glucosaminidase
NO	- Óxido Nítrico
NOS	- Óxido Nítrico Sintase
NPASc	- Nanopartículas poliméricas contendo ASc
NPb	- Nanopartículas poliméricas brancas
NP's	- Nanopartículas poliméricas
NTPDase	- Ectonucleosídeo trifosfato difosfoidrolase
OMS	- Organização Mundial da Saúde
PCL	- Poli (ϵ -caprolactona)
RL	- Radicais livres
SBD	- Sociedade Brasileira de DM
STZ	- Estreptozotocina
SUS	- Sistema Único de Saúde
TBARS	- Espécies Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico
TOTG	- Teste oral de tolerância à glicose

SUMÁRIO

	APRESENTAÇÃO	21
1	INTRODUÇÃO	23
1.1	DIABETES <i>MELLITUS</i>	23
1.1.1	Definição e classificação	23
1.1.2	Epidemiologia	24
1.1.3	Diagnóstico, monitoramento e tratamento	27
1.2	COMPLICAÇÕES DO DM	30
1.2.1	Complicações do DM: o envolvimento do estresse oxidativo	30
1.2.2	Complicações do DM: partículas de LDL e sua oxidação	32
1.2.3	Complicações do DM: o envolvimento do sistema inflamatório	35
1.2.4	Complicações crônicas do DM: infecções por <i>Candida albicans</i>	38
1.3	O ENVOLVIMENTO DO SISTEMA PURINÉRGICO NO DM	44
1.3.1	Enzimas que degradam nucleotídeos e nucleosídeos de adenina	50
1.3.1.1	<i>Ectonucleosídeo trifosfato difosfohidrolase (EC 3.6.1.5, E-NTPDase)</i>	51
1.3.1.2	<i>Ecto-5'- nucleotidase (EC 3.1.3.5, E-5'NT)</i>	52
1.3.1.3	<i>Adenosina deaminase (E.C. 3.5.4.4, ADA)</i>	53
1.4	MODELOS EXPERIMENTAIS DE DM E SUAS COMPLICAÇÕES <i>IN VIVO</i>	55
1.5	PLANTAS MEDICINAIS	57
1.5.1	Plantas medicinais no Brasil	60
1.5.1.1	<i>Plantas medicinais utilizadas no tratamento do DM: <i>Syzygium cumini</i></i>	62
1.6	NANOTECNOLOGIA	70
1.6.1	Nanopartículas poliméricas	72
1.6.2	Métodos de obtenção: emulsificação/ evaporação do solvente	73
1.6.3	Caracterização de sistemas nanoestruturados poliméricos	75
1.6.4	Nanopartículas e a utilização de extratos de plantas medicinais	77
1.6.5	Nanotoxicologia e modelos experimentais de toxicologia	78
2	OBJETIVOS	81
2.1	OBJETIVO GERAL	81
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	81
2.2.1	Em extrato aquoso de sementes de <i>S. cumini</i> (ASc) e em nanopartículas poliméricas contendo o extrato (NPASc)	81
2.2.2	Estimar a toxicidade de ASc, NPb e NPASc	81
2.2.3	Em modelo animal de DM seguido de infecção por <i>C. albicans</i> e tratados com ASc e NPASc, avaliar	82
2.2.3.1	<i>Em soro e urina</i>	82
2.2.3.2	<i>Em células</i>	82
2.2.3.3	<i>Em tecidos</i>	82
3	ARTIGOS	83
3.1	A NEW BIODEGRADABLE POLYMERIC NANOPARTICLE FORMULATION CONTAINING <i>SYZYGIUM CUMINI</i> : PHYTOCHEMICAL PROFILE, ANTIOXIDANT AND ANTIFUNGAL ACTIVITY AND <i>IN VIVO</i> TOXICITY	83
3.2	ANTI-INFLAMMATORY ACTION OF SEED EXTRACT AND POLYMERIC NANOPARTICLES OF <i>SYZYGIUM CUMINI</i> IN DIABETIC RATS INFECTED WITH <i>CANDIDA ALBICANS</i>	94

4	MANUSCRITO	105
4.1	<i>SYZYGIUM CUMINI</i> LOADED POLYMERIC NANOPARTICLES OR SEED EXTRACT AMELIORATE OXIDATIVE STRESS MARKERS AND OTHER BIOCHEMICAL PARAMETERS IN DIABETIC RATS INFECTED WITH <i>CANDIDA ALBICANS</i>	105
5	CONSIDERAÇÕES GERAIS	123
6	CONCLUSÕES	129
	REFERÊNCIAS	131
	ANEXOS	165
	ANEXO A – PERMISSÃO PARA REPRODUÇÃO DO ARTIGO 1	167
	ANEXO B – CARTA DE ACEITE DO ARTIGO 2	168
	ANEXO C – COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DO MANUSCRITO 1 ...	169

APRESENTAÇÃO

O presente trabalho consiste na apresentação dos resultados obtidos até o momento para fins de defesa de tese de Doutorado. Tais resultados são apresentados na forma de um artigo publicado, um artigo aceito e um manuscrito.

Este trabalho encontra-se organizado da seguinte forma: a primeira parte refere-se a INTRODUÇÃO e OBJETIVOS, sendo seguida pelas seções ARTIGOS e MANUSCRITO, onde são apresentados três trabalhos. As seções Materiais e Métodos, Resultados, Discussão e Referências são apresentadas nos próprios artigos ou manuscrito e representam os resultados desse trabalho.

Na sequência, o item CONSIDERAÇÕES GERAIS e CONCLUSÃO apresentam uma síntese dos resultados e comentários gerais sobre os trabalhos apresentados.

Por fim, as REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS utilizadas para as citações dos itens INTRODUÇÃO e CONSIDERAÇÕES GERAIS desse trabalho.

1 INTRODUÇÃO

1.1 DIABETES MELLITUS

1.1.1 Definição e classificação

Diabetes *mellitus* (DM) é um grupo heterogêneo de distúrbios metabólicos que apresenta em comum a hiperglicemia, consequência de defeitos na ação/secreção da insulina. O hormônio insulina é o principal sinal de controle para a conversão da glicose em glicogênio, para armazenamento interno de glicose em células hepáticas e musculares, desempenhando um papel de extrema importância em todas as formas de DM (GROSS et al., 1999; SBD, 2015). A classificação atual do DM considera a etiologia dos distúrbios glicêmicos, definidos de acordo com defeitos ou processos específicos (SBD, 2015; AAD, 2016).

O DM tipo 1 (DM 1) é caracterizado por uma severa ou total destruição autoimune das células β pancreáticas que eventualmente leva à deficiência absoluta de insulina e, conseqüentemente, à hiperglicemia devido à superprodução hepática de glicose pela glicogenólise/gliconeogênese e diminuição celular do consumo de glicose na circulação (SBD, 2015; AAD, 2016). Na ausência de insulina há também aumento na quebra de lipídeos e oxidação de ácidos graxos, resultando em produção excessiva de cetonas, gerando um quadro cetogênico que quando não tratado, conduz progressivamente à depressão do sistema nervoso central, coma e morte (SBD, 2015; AAD, 2016). Esses eventos dão origem aos sintomas clássicos do DM 1 como sede e fome excessiva, fraqueza muscular, hiperglicemia, dislipidemia, hipertensão arterial, anormalidades nas funções hematológicas, disfunção endotelial e cetoacidose (SBD, 2015; AAD, 2016).

Ainda, a taxa de destruição das células β pode ser variável, sendo que a forma lentamente progressiva ocorre em adultos, sendo referida como diabetes autoimune latente do adulto (LADA, acrônimo em inglês de *latent autoimmune diabetes in adults*). Porém, existe uma minoria de casos em que não há evidências de processo autoimune, sendo, portanto, referidos como forma idiopática de DM 1. Os casos de DM 1 compreendem cerca de 10% do total, tendo início abrupto, acometendo principalmente crianças e adolescentes sem excesso de peso. Os marcadores de autoimunidade do DM 1 são os autoanticorpos anti-insulina,

antidescarboxilase do ácido glutâmico, antitirosinafosfatases e antitransportador de zinco (SBD, 2015; AAD, 2016).

O DM tipo 2 (DM 2) é uma alteração metabólica caracterizada por distúrbios na ação e secreção de insulina, com predomínio de um deles, e por um longo período assintomático, sendo a forma presente em cerca de 90% dos casos de DM. No DM 2, ocorre uma incapacidade de absorção de glicose pelas células que acabam não metabolizando a glicose de forma eficiente, caracterizando a resistência insulínica. Fatores genéticos, ambientais e quadros de obesidade podem contribuir para o desenvolvimento do DM 2. A cetoacidose é rara, existindo uma prevalência de anormalidades lipídicas que contribuem para taxas mais elevadas de doença arterial coronariana, infarto agudo do miocárdio e acidente vascular cerebral, os quais constituem as principais causas de morte desses pacientes (SBD, 2015; AAD, 2016).

O DM gestacional é a diminuição da tolerância à glicose, diagnosticada pela primeira vez na gestação podendo ou não persistir após o parto (SBD, 2015). Similar ao DM 2, o DM gestacional associa-se tanto à resistência à insulina quanto à diminuição da função das células β . Devem-se reavaliar as pacientes com DM gestacional 4 a 6 semanas após o parto e reclassificá-las (portadora de DM; glicemia de jejum alterada; tolerância à glicose diminuída ou normoglicêmica), já que em grande parte dos casos, há reversão após a gravidez. Porém, existe de 10-63% de risco de a paciente desenvolver DM 2 dentro de 5-16 anos após o parto (KIM; NEWTON; KNOOP, 2002; JARVELA et al., 2006).

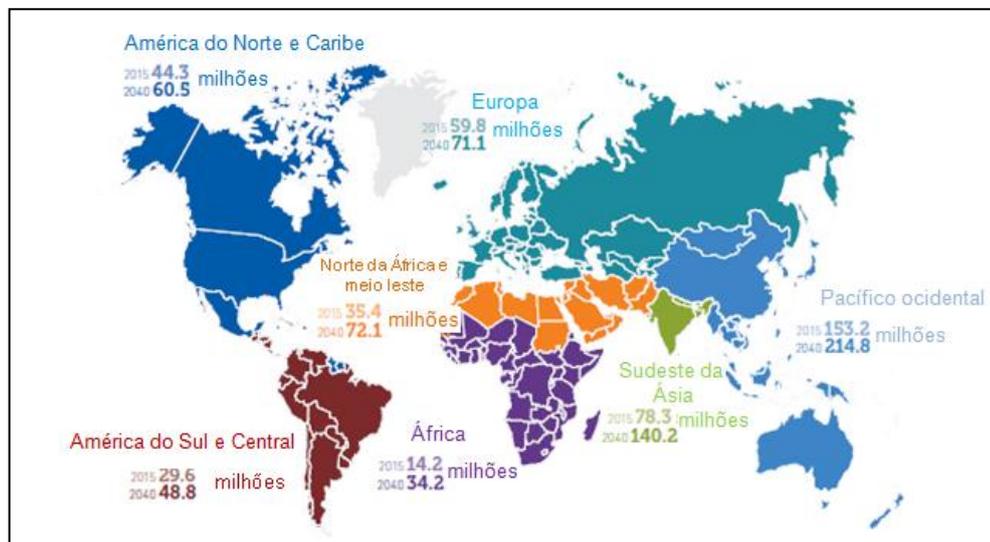
Outros tipos menos frequentes de DM podem ser decorrentes de defeitos genéticos associados à função das células β e à ação da insulina, doenças exócrinas do pâncreas, endocrinopatias ou efeito colateral de medicamentos (AAD, 2016). Ainda, há uma classe intermediária de DM referida como pré-diabetes, que inclui pacientes com os níveis de glicemia de jejum alterado e tolerância à glicose diminuída. Essa classe não é uma entidade clínica, mas são considerados fatores de risco para o desenvolvimento de DM e doenças cardiovasculares (SBD, 2015).

1.1.2 Epidemiologia

O DM está associado a uma enorme carga social e econômica. Os custos diretos com DM variam entre 2,5% e 15% do orçamento anual da saúde de um país,

dependendo de sua prevalência e do grau de complexidade do tratamento disponível. Estima-se que a cada 6 segundos uma pessoa morra por causa do DM (FID, 2015). De acordo com a Fundação Internacional de Diabetes (FID), atualmente existe cerca de 415 milhões de pacientes diabéticos (8,8%), sendo que no ano de 2040 essa patologia afetará 642 milhões de pessoas (10,4%) (Figura 1). Em relação aos países com maior número de pacientes adultos com DM tem-se a China, Índia, EUA, Brasil e Rússia nas cinco primeiras colocações (FID, 2015).

Figura 1 – Estimativa do número de pessoas (20-79 anos) com DM em todo o mundo e por região em 2015 e para o ano 2040



Fonte: Adaptado de FID (2015).

Apesar dos diversos estudos de prevalência dessa patologia, não é possível reportar a proporção exata de DM 1 e DM 2, já que considera-se apenas os valores de referência de glicose para o diagnóstico de DM na amostra de sangue utilizada (FID, 2015). Alguns estudos relatam que em países desenvolvidos, de 87% a 91% são diagnosticados com DM 2, apenas de 7% a 12% são DM 1 e até 3% outros tipos de DM (BRUNO et al., 2005; HOLMAN et al., 2015).

Apesar do DM 1 ser o tipo menos comum, ocorre um aumento de 3% a cada ano, particularmente entre as crianças. Cerca de 90 mil crianças desenvolvem DM 1 a cada ano e quando a insulina não está disponível, a expectativa de vida dessa criança é muito curta (FID, 2015). Dentre os países com maior número de crianças portadoras do DM 1 estão os EUA, seguidos pela Índia e pelo Brasil (FID, 2015).

O Brasil tem o maior número de pessoas com DM na América Latina, chegando a aproximadamente 14 milhões de casos, cerca de 10% da população (FID, 2015; SBD, 2015). O panorama mundial do DM se repete no Brasil, já que persiste um grande número de pacientes não diagnosticados (3 milhões) seguidos por um grande número de mortes causadas por DM (130.700 mil) (FID, 2015).

Um estudo publicado por Filho et al. (2016), demonstrou que a população brasileira possui grau de conhecimento insuficiente, além de alta incidência de pacientes portadores de DM 2 com controle glicêmico inadequado. Faz-se necessário uma melhor abordagem dessa patologia para a população, uma vez que esse mesmo estudo demonstrou que, quando realizada uma intervenção especializada através da prescrição de fármacos hipoglicêmicos, foi possível melhorar o controle glicêmico, reduzir o índice de massa corpórea e a medida da circunferência. Ainda, é proposto que a combinação de diferentes intervenções educativas fornecidas individualmente ou em grupo a pacientes adultos com DM exerce influência na redução de complicações vasculares e, conseqüentemente, mortes associadas a essa patologia (MENEZES et al., 2016).

Em relação a estudos epidemiológicos relacionados ao DM realizados no Brasil, tem-se o estudo ERICA (Estudo de Riscos Cardiovasculares em Adolescentes) com acesso disponível on-line (<http://www.ERICA.ufrj.br/>), o LINDA (*Lifestyle Intervention for Diabetes Prevention After Pregnancy - Brasil*) pesquisa multicêntrica com sede em Pelotas - RS, o ELSA (Estudo Longitudinal de Saúde do Adulto) (LOTUFO, 2013), além do sistema de vigilância de fatores de risco por meio de inquérito telefônico (VIGITEL), implantado desde 2006 em 27 capitais. O VIGITEL realizado em 2014 apontou prevalência de 8,7% de pacientes com DM autorreferido, sendo que 8,1% são homens, 9,1% mulheres e 5,5% são mulheres com DM diagnosticada durante a gravidez (VIGITEL BRASIL, 2015). Em relação ao tratamento, 20,1% desses pacientes faz uso de insulina, 82,7% faz uso de hipoglicemiantes orais e 16,1% faz uso da terapia combinada (insulina+hipoglicemiante oral). Dados mais preocupantes têm sido relatados para subgrupos da população, como os indígenas e de ascendência oriental (devido à predisposição genética) (VIGITEL BRASIL, 2007). Foram registradas 247.500 mil mortes por DM na América do Sul e mais da metade ocorreu no Brasil (FID, 2015). Os números relacionados à morbi-mortalidade por DM são preocupantes devido a seu impacto na saúde da população brasileira.

1.1.3 Diagnóstico, monitoramento e tratamento

De acordo com a Sociedade Brasileira de DM (SBD), devem ser realizados os seguintes testes para diagnóstico de DM: glicose plasmática de jejum, Teste de Tolerância Oral à Glicose (TOTG), medida da glicose casual e do acompanhamento de sintomas clássicos de hiperglicemia (Tabela 1) (SBD, 2015).

O termo pré-diabetes tem sido bastante utilizado para enquadrar indivíduos que não preenchem totalmente os critérios do DM. Porém, destes, uma parcela considerável já apresenta envolvimento de órgãos-alvo, em especial lesões microvasculares características do DM que podem levar à cegueira, à insuficiência renal e a amputações (SBD, 2015).

Tabela 1 – Valores de glicose plasmática (mg/dL) para diagnóstico do DM e estágios pré-clínicos

Categoria	Jejum*	2 h após 75 g de glicose	Casual**
Glicemia normal	<100	<140	
Tolerância à glicose diminuída	>100 a <126	≥140 a <200	
DM	≥126	≥200	≥200***

*O jejum é definido como falta de ingestão calórica por no mínimo oito horas; **Glicemia plasmática casual é aquela realizada a qualquer hora do dia, sem se observar o intervalo desde a última refeição;

***Acompanhado de sintomas clássicos de DM que incluem poliúria, polidipsia e perda não explicada de peso. Nota: o diagnóstico de DM deve ser sempre confirmado pela repetição do teste em outro dia, a menos que haja hiperglicemia inequívoca com descompensação metabólica ou sintomas óbvios de DM (SBD, 2015).

A utilização dos níveis de hemoglobina glicada (HbA1c) foi proposta em 2009 como ferramenta auxiliar no diagnóstico do DM, uma vez que reflete a glicemia média pregressa dos últimos 2 a 4 meses, além de possuir uma boa correlação com lesão microvascular e, em menor proporção, com lesão macrovascular. Atualmente a Associação Americana de Diabetes (2015) recomenda que HbA1c seja utilizada para fins diagnósticos sob os seguintes critérios: diabetes - HbA1c > 6,5% a ser confirmada em outra coleta, sendo dispensável em caso de sintomas ou glicemia > 200 mg/dL; indivíduos com alto risco para o desenvolvimento de DM - HbA1c entre 5,7% e 6,4%. No Brasil, de acordo com a SBD, a HbA1c ainda é recomendada como opção de monitoramento dos níveis de glicemia, devido a estudos que relataram algumas dificuldades para a utilização desse parâmetro, principalmente em relação

as etnias, já que indivíduos afrodescendentes possuem níveis mais elevados de HbA1c do que os caucasoides. Asiáticos também apresentam níveis de HbA1c mais elevados quando comparados a caucasoides com níveis glicêmicos semelhantes (JOHN, 2012). Uma alternativa útil nos casos em que a confiabilidade da dosagem de HbA1c é comprometida por fatores como anemias ou hemoglobinopatias é recomendado a determinação da frutossamina que reflete um período de 2 a 3 semanas do controle glicêmico.

Além da determinação de glicose plasmática/sérica de jejum (preconizada para pacientes com DM 1 e 2), o controle glicêmico pode ser feito diariamente, com o auxílio de glicosímetros portáteis disponíveis no mercado. Nesse contexto, glicemia média estimada, obtida através de cálculo matemático, é um novo conceito na avaliação do controle glicêmico e sua utilização, em conjunto com os resultados da HbA1c, está sendo recomendada por entidades médicas internacionais relacionadas com o diabetes (SBD, 2015). No entanto, sua utilização ainda é bastante debatida no Brasil.

Um exame que ainda não está disponível na rotina clínica, mas é possível que sua relevância clínica cresça ao longo dos anos, é o 1,5 anidroglicitol (1,5-AG), o principal poliálcool circulante, que tem sido proposto como um indicador de hiperglicemia pós-prandial. Sua reabsorção nos túbulos renais é inibida de forma competitiva pela glicose. Dessa forma, conforme aumenta a filtração glomerular de glicose em vigência de hiperglicemia, cai a sua reabsorção tubular, o que provoca elevação de sua excreção renal e queda de seu nível sérico (DUNGAN, 2008).

Um dos grandes avanços na área da tecnologia para monitoramento do DM foi o desenvolvimento da técnica de leitura da glicose intersticial e sua correlação com a glicemia capilar. A monitorização contínua da glicose intersticial fornece informações detalhadas do perfil de glicose identificando as flutuações de glicemias anteriormente não detectadas pela automonitorização convencional. O procedimento requer a introdução de um sensor de glicose no tecido subcutâneo do paciente, que gera medidas contínuas de glicose intersticial. Este método pode ser utilizado para a avaliação das flutuações glicêmicas em pacientes com DM 1 e 2 em terapia com insulina ou medicação oral. Este método de monitorização glicêmica deverá ser cada vez mais utilizado na prática clínica, tanto para avaliação do perfil glicêmico, quanto para ajuste da terapêutica nos pacientes com DM (SBD, 2015).

Uma vez identificado o tipo de DM o qual o paciente é portador, o clínico então faz a indicação do tratamento mais adequado. Quando o paciente é portador

de DM 1, faz uso da insulina exógena injetável por toda a vida, em doses múltiplas (3-4 injeções subcutâneas/dia) ou contínua, nas seguintes apresentações: insulina de ação ultra-rápida (início da ação de até 15 min com duração de até 5 h), insulina de ação rápida (início da ação de até 30 min com duração de até 6 h), insulina de ação intermediária (início da ação de até 4 h com duração de até 18 h) e insulina de ação lenta (início da ação de até 2 h com duração de 24 h), dependendo da necessidade do paciente (SBD, 2015). Atualmente, tem-se discutido o risco da hipoglicemia frequente/noturna no paciente DM 1 e a utilização de bombas de insulina nesses casos (AAD, 2015).

A terapia sugerida no estado pré-diabético e início de DM 2 se dá, inicialmente, através de mudanças no estilo de vida, alimentação saudável, redução de peso e atividade física (SBD, 2015). Em um estudo desenvolvido pelo *Diabetes Prevention Program Research Group* (EUA), a tentativa de prevenção farmacológica da doença utilizando o fármaco metformina, trouxe resultados inferiores ao observados com a mudança no estilo de vida (KNOWLER et al., 2002). A prescrição de antidiabéticos orais para pacientes com DM 2 é frequentemente indicada e a escolha considera aspectos individuais dos pacientes como: idade, peso, níveis de glicose sanguínea e aspectos clínicos indicativos de resistência ou deficiência insulínica.

De acordo com o mecanismo de ação, os hipoglicemiantes orais podem ser separados nas seguintes classes: aqueles que incrementam a secreção pancreática de insulina (clorpropamida, glibenclamida, gliclazida, glipizida e glimepirida); os que reduzem a velocidade de absorção de glicídios (acarbose, inibidores das α -glicosidases); os que diminuem a produção hepática de glicose (metformina, biguanidas); e/ou os que aumentam a utilização periférica de glicose (pioglitazona, glitazonas); capazes de aumentar a secreção de insulina quando ocorre aumento da glicemia [ação semelhante do “*glucagon-like peptide-1*” (GLP-1, exenatida e liraglutida)]; inibidores da enzima dipeptidil peptidase 4 (DPP-IV, sitagliptina, linagliptina e vildagliptina) e os inibidores do contratransporte de sódio glicose 2 (SGLT2, dapaglifozina e canaglifozina) (ZAGURY; ZAGURY, 2009; RAHMOUNE et al., 2005; ABDUL-GHANI; DEFRONZO, 2008; AHREN, 2006; DRUCKER; NAUCK, 2006; RISTIC; BATES, 2006, HERMAN et al., 2007). Também, quando o controle glicêmico persiste em continuar de forma inadequada são utilizadas combinações de insulina com hipoglicêmicos orais em pacientes com DM 2.

1.2 COMPLICAÇÕES DO DM

O aumento na sobrevida dos pacientes diabéticos e, conseqüentemente, o aumento no tempo de exposição à hiperglicemia, tem aumentado os casos de desenvolvimento das complicações crônicas do DM. No início do século XXI, estimou-se que 5,2% de todos os óbitos no mundo foram atribuídos ao DM (ROGLIC et al., 2005).

Evidências sugerem que as complicações relacionadas ao DM começam precocemente, ainda na fase de mínimas alterações na glicemia progredindo nos estágios de pré-diabetes e, posteriormente, DM. As complicações crônicas são descritas por apresentarem origens multifatoriais, já que a hiperglicemia crônica está envolvida no desenvolvimento e progressão de muitas doenças. Entre elas estão doenças macrovasculares e microvasculares (GROSS, 1999; QUEIROZ et al., 2011; AAD, 2016). Doenças microvasculares são caracterizadas por enfermidades nos pequenos vasos, associada de forma específica ao DM e que se manifesta como retinopatia (quando associada à hipertensão, causa cegueira) e doença renal diabética (nefropatia diabética). Na macroangiopatia, a hiperglicemia atua na formação de espécies reativas que vão atuar no sistema vascular (coronárias, carótidas e periféricas) e em processos inflamatórios que vão modificar membranas celulares (AAD, 2016). A neuropatia diabética pode se manifestar tanto por lesão em nervos periféricos, levando a amputações das extremidades, como por disfunção autônoma podendo afetar vários sistemas como o cardiovascular, o digestório e o geniturinário (SATO et al., 2006; SBD, 2015; AAD, 2016).

1.2.1 Complicações do DM: o envolvimento do estresse oxidativo

A hiperglicemia pode atuar aumentando intensamente a formação de radicais livres (RL), fazendo com que ocorra um desequilíbrio no estado redox desses pacientes (PFAFFLY, 2001). RL são átomos ou moléculas produzidas continuamente durante os processos metabólicos e atuam como mediadores químicos para a transferência de elétrons em diversas reações bioquímicas (DALLE-DONNE et al., 2006). As principais fontes de RL são organelas citoplasmáticas que metabolizam o oxigênio, nitrogênio e cloro, gerando uma grande quantidade de metabólitos, sendo que seu alvo celular está relacionado com seu sítio de ação (MÉNDEZ FILHO; RODRIGUEZ, 1997). A concentração desses

radicais é mantida pelo balanço entre sua produção e sua depuração por antioxidantes que podem ser enzimáticos e não enzimáticos.

Os mecanismos enzimáticos compreendem enzimas como catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx) e glutathione reductase (GR). Já os mecanismos não enzimáticos são provenientes da dieta (vitamina C, vitamina E, provitamina A, compostos fenólicos e flavonoides). Quando ocorre um desequilíbrio entre os níveis de oxidantes e antioxidantes ocorre o processo denominado estresse oxidativo que pode causar redução na resistência celular e consequente dano oxidativo às proteínas, aos lipídios e à molécula de DNA (MATÉS; SANCHEZ-JIMENEZ, 1999), favorecendo o desenvolvimento de insulino-resistência e a diminuição da secreção de insulina (EVANS et al., 2002). Além disso, estudos têm descrito o papel do estresse oxidativo tanto no desenvolvimento quanto na progressão das complicações do DM (REIS et al., 2008; WANG et al., 2013; BADAWY et al., 2015).

O estresse oxidativo no DM pode ocorrer por diversos mecanismos, como a auto-oxidação da glicose, que pode causar danos a biomoléculas como lipídeos e também destruir as células β -pancreáticas, a glicação proteica não enzimática formando produtos finais de glicação avançada (AGEs) e a ativação da via dos polióis (PFAFFLY, 2001; ZHAO, 2001; REIS et al., 2008). O estresse oxidativo e o processo inflamatório exercem um papel crucial na patogênese das complicações diabéticas tardias, já que o aparecimento de AGEs, que atuam modificando proteínas intracelulares, pode interferir na sinalização celular via receptores específicos multiligantes (RAGEs) e ainda, estimular a produção de citocinas inflamatórias (WAUTIER; GUILLAUSSEAU, 2001; BARBOSA; OLIVEIRA; SEARA, 2008).

Ainda relacionado ao estresse oxidativo, foi descrita uma nova classe de compostos com características físico-químicas muito semelhantes aos AGEs, a qual foi designada como Produtos Proteicos de Oxidação Avançada (AOPP), que estima o grau de modificações oxidativas nas proteínas e também na inflamação (SALAVEJ; SPALTEHOLZ; ARNHOLD, 2006; SELMECI, 2011). AOPP é caracterizado por ser um grupo homogêneo de proteínas oxidadas de baixo peso molecular (albumina oxidada) e alto peso molecular (agregados de albumina formados através de ligações dissulfeto e/ou ligações cruzadas contendo ditirosina), modificadas por cloroaminas, mas principalmente pela ação do ácido hipocloroso (HOCl), que é um agente oxidante gerado pela enzima mieloperoxidase (MPO,

enzima envolvida em eventos inflamatórios) (SALAVEJ; SPALTEHOLZ; ARNHOLD, 2006; PIWOWAR, 2010). Além da albumina, o fibrinogênio também pode participar da formação de AOPP no plasma (SELMECI et al., 2006; PIWOWAR, 2010). Essa nova classe apresenta vantagens em relação a outros marcadores devido a sua rápida formação, grande estabilidade, confiabilidade e meia vida longa (DALLE-DONNE et al., 2003). Estudos demonstram que esses produtos proteicos agem de forma semelhante aos AGES, inclusive interagindo nos mesmos receptores RAGEs (WITKO-SARSAT et al., 1996; WITKO-SARSAT et al., 1998). Essa interação AOPP-RAGE pode vir a promover complicações inflamatórias (estimulando citocinas pró-inflamatórias), levando ao aumento da produção de fatores protrombóticos e proliferação celular mediada por esse receptor (WITKO-SARSAT et al., 1996; WITKO-SARSAT et al., 1998).

Diversas patologias têm sido associadas com o aumento na formação de AOPP, incluindo o DM. A influência dessa molécula no desenvolvimento de complicações inflamatórias crônicas do DM pode estar associada ao fato de que a formação de AOPP pode induzir a expressão de proteína quimiotática de monócitos (MCP-1), através da ativação da via espécies reativas ao oxigênio (EROS)/fator nuclear fator nuclear kappa β (NF- $\kappa\beta$) (WANG et al., 2013).

O aumento nos níveis de AOPP em plasma de ratos com DM induzida experimentalmente por estreptozotocina (STZ) tem sido associado com a hiperglicemia na formação de dano oxidativo de proteínas (LEE et al., 2010; TIWARI et al., 2014; KOROGLU et al., 2015; BADAWY et al., 2015; YILDIRIMTURK et al., 2016; SACAN et al., 2016). Além do plasma, a formação de AOPP em tecidos como pâncreas, rim e fígado, bem como a exposição de células a essas proteínas vêm sendo cada vez mais estudados ao longo dos anos com a intenção de aumentar o conhecimento sobre as possíveis vias de desenvolvimento de complicações do DM (CUMAOGU et al., 2007; ARDESTANI; YAZDANPARAST; JAMSHIDI, 2008; SHI et al., 2008; SEFI et al., 2012; SEFI et al., 2010; WANG et al., 2013; BOCHI et al., 2016).

1.2.2 Complicações do DM: partículas de LDL e sua oxidação

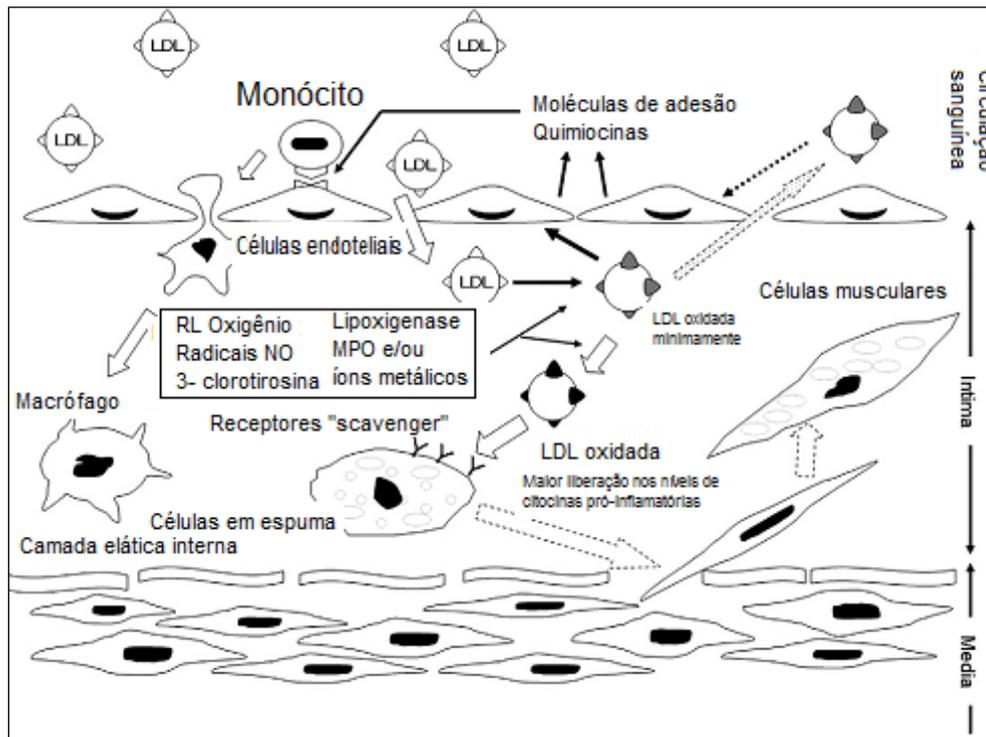
O DM é um importante fator de risco independente para doenças cardiovasculares, acidente vascular cerebral e doença arterial periférica, mesmo

quando ajustado para idade, hipertensão, tabagismo, hipercolesterolemia e hipertrofia de ventrículo esquerdo (COLWELL et al., 2003; SBD, 2015).

Sabe-se que o aumento da concentração de partículas de proteínas de baixa densidade (*Low Density Lipoprotein*, LDL) está relacionado ao desenvolvimento da aterosclerose e de um complexo processo inflamatório (LUSIS, 2000; YOUNIS et al., 2009). A LDL apresenta uma camada externa composta por uma monocamada de fosfolípidios contendo colesterol não esterificados livres. Já a parte interna é formada por um núcleo apolar composto basicamente por ésteres de colesterol e em menor quantidade por triglicérides e alguns colesterol não esterificados (PRASSL; LAGNER, 2009). A apolipoproteína B (ApoB-100), além de estabilizar a estrutura, tem como sua principal função controlar o metabolismo da lipoproteína ligando-se a receptores de membrana específicos (YOUNIS et al., 2009). Associado a monocamada fosfolipídica da partícula de LDL estão presentes os antioxidantes associados como o α -tocoferol (mais abundante), β -caroteno e licopeno (BATLOUNI, 1997).

O evento inicial da aterosclerose é o acúmulo de LDL na matrix subendotelial (Figura 2). O acúmulo da LDL na parede das artérias apresenta lugares preferenciais devido à variação de fluxo sanguíneo. A LDL difunde passivamente através das junções de células endoteliais, e a retenção na parede do vaso ocorre devido a interações entre a ApoB-100 e a matrix proteoglicana (LUSIS, 2000). Em lesões iniciais, uma das modificações mais importantes na partícula de LDL é a oxidação lipídica devido à exposição a resíduos oxidativos de células vasculares (PARASASSI et al., 2001). Devido ao acúmulo de lipoproteínas na íntima das artérias, os monócitos passam a aderir à superfície do endotélio e posteriormente os monócitos migram através da monocamada endotelial para a íntima, se proliferando e diferenciando-se em macrófagos que consomem as lipoproteínas formando as células espumosas (*foam cells*). As placas podem tornar-se cada vez mais complexas com o surgimento de calcificação, ulceração na superfície luminal e hemorragia dos pequenos vasos que crescem no sentido da lesão. As lesões mais avançadas crescem o suficiente para bloquear o fluxo de sangue, formando trombos ou coágulos de sangue resultando em infarto do miocárdio (YOSHIDA; KISUGI, 2010).

Figura 2 – Mecanismos da oxidação de LDL



Fonte: Yoshida e Kisugi, (2010).

Estudos mostraram que a LDL oxidada (LDL-ox) é mais aterogênica que a LDL em seu estado nativo (ESTERBAUER et al., 1989; STOCKER; KEANEY, 2004; ITABE, 2009). A modificação da partícula de LDL *in vivo* envolve espécies reativas de oxigênio produzidas por células endoteliais e macrófagos e algumas enzimas tais como MPO (DAUGHERTY et al., 1994), lipoxigenases (YLÄ-HERTTUALA et al., 1989) e hemeoxigenases I (WANG, et al., 1996) presentes na íntima da artéria que podem promover um processo de modificação da LDL (SICCHIERI, 2012). Visando uma melhor compreensão e controle desse processo, a oxidação da LDL *in vitro* vem sendo extensivamente estudada em associação com o DM, porque além da glicação de lipoproteínas facilitar a oxidação dessa partícula, aumentando o poder de agressão ao endotélio, há formação de outros produtos finais de glicação, que acabam por promover a disfunção endotelial generalizada (LAAKSO, 1999; MELO, 2014).

Uma das maneiras de se oxidar a lipoproteína *in vitro* é feita através de íons metálicos, como ferro e cobre (ESTERBAUER et al., 1989; CHATTERJEE et al., 2004), os quais funcionam como catalisadores da decomposição de lipoperóxidos. Outra maneira é através da utilização do agente oxidante 2-amidinopropano

dihidroclorido (AAPH), um azo composto hidrossolúvel que, durante o processo de decomposição dependente de temperatura, produz radicais peroxila (NIKI, 1990; CELEDON et al., 2001). O AAPH tem uma taxa constante de geração de radicais peroxil ($1,36 \times 10^{-6}$ AAPH mol/litro/segundo) durante as primeiras horas em solução, apresentando meia-vida de 175 horas em pH neutro (NIKI, 1990). Durante as três primeiras horas do processo de decomposição, tem-se uma redução da concentração do AAPH inferior a 3% por hora (STEFEEK et al., 2005), promovendo a oxidação da lipoproteína de forma semelhante aos eventos fisiológicos (KRISKO; KVEDER; PIFAT, 2005).

1.2.3 Complicações do DM: o envolvimento do sistema inflamatório

Reações inflamatórias estão associadas a um complexo padrão de respostas citotóxicas e imunológicas que envolvem citocinas e quimiocinas que se ligam a receptores celulares e iniciam a ativação da sinalização celular e mobilização de células ao local da lesão (WANG et al., 2012). Entre as moléculas envolvidas nas respostas inflamatórias têm-se as interleucinas (IL) 1, 2, 6, 7, fator de necrose tumoral- α (FNT- α) e interferon- γ (IFN- γ) que possuem ação pró-inflamatórias (Th1) e as IL-4, IL-10, IL-13 e o fator transformador de crescimento β (FTC- β) com ações anti-inflamatórias (Th2). As respostas geradas por essas citocinas podem ser suprimidas por linfócitos T regulatórios (Treg, que além de supressão, têm ação na produção ou na função dessas células reguladoras) (TEIXEIRA-SALUM et al., 2010). Células T auxiliares (Th0) são capazes de secretar citocinas tanto Th1 como Th2.

A família da IL-1 é composta por duas proteínas homólogas: IL-1 α , IL-1 β . Essas proteínas são secretadas por todas as células nucleadas, principalmente por macrófagos, mas também por monócitos, fibroblastos, células sinoviais, endotélio, neutrófilos, linfócitos dentre outras. Essas citocinas estimulam a liberação de FNT- α , e ainda são capazes de aumentar as moléculas de adesão, promovendo a quimiotaxia de leucócitos para o sítio de inflamação (DINARELLO, 2011). Estudos sugerem o envolvimento dessa interleucina na destruição das células β pancreáticas, inclusive a anulação genética ou farmacológica da ação da IL-1 foi capaz de reduzir a incidência do DM 1 em modelos animais, podendo ser um potencial alvo de intervenção nesse tipo de DM (MANDRUP-POULSEN et al., 2010). Já a IL-6 é sintetizada por monócitos, células endoteliais, fibroblastos, sendo que a

hiperglicemia tem relação com a sua síntese imediata. Pacientes com DM 1 com proteinúria evidente, quando em comparação com aqueles com microalbuminúria, apresentam altos níveis dessa interleucina (KATHERINE et al., 2002).

A IL-10 foi identificada pela sua habilidade em antagonizar a imunidade celular, é produzida por monócitos, macrófagos e linfócitos (DE WAAL et al., 1991; MOORE et al., 1993; MOSMANN et al., 1994; ABBAS et al., 2008). Inibe as citocinas pró-inflamatórias, principalmente FNT, IL-1 e IL-6, estimulando a produção endógena de citocinas anti-inflamatórias (CURFS; MEIS; HOOGKAMP-KORSTANJ, 1997; ZHANG, 2007).

O FNT- α é sintetizado por neutrófilos, macrófagos, linfócitos T e B, células natural killer (NK), monócitos, células endoteliais, células musculares cardíacas, fibroblastos, osteoclastos entre outras, através de estímulo via INF- γ , IL-1 e IL-2. O FNT- α tem a capacidade de induzir a liberação de outras citocinas, como a IL-1 β , a produção de moléculas de adesão e a quimiotaxia celular para o tecido lesado. Além disso, promove a ativação do NF- κ B, que, por sua vez, induz novamente a síntese e a liberação de vários mediadores pró-inflamatórios, atuando em várias cascatas de sinalização, perpetuando o processo inflamatório (BRADLEY, 2008). Já o IFN- γ é a principal citocina ativadora de macrófagos e exerce funções críticas na imunidade inata e na imunidade adaptativa mediada por células (ABBAS et al., 2008). O IFN- γ ativa os neutrófilos e provoca a ação citotóxica das células NK (ABBAS et al., 2008).

Pacientes com DM 1 possuem altos níveis de citocinas pró-inflamatórias, já que, além de ser uma doença autoimune, caracterizada por uma infiltração linfocítica levando à insulite, a hiperglicemia conduz a um constante estado inflamatório (SARIKONDA et al., 2014). Vários estudos têm demonstrado que pacientes diabéticos possuem altos níveis de citocinas pró-inflamatórias, e evidências científicas destacam a importância da hiperglicemia associada à inflamação tanto na iniciação, quanto na progressão das complicações do DM (NISHIKAWA; EDELSTEIN; BROWNLEE, 2000; ESPOSITO et al., 2002; ROSENZWAJG et al., 2014; LONGO et al., 2014; URURAHY et al., 2015).

Juntamente com as ILs, o NO pode ser considerado umas das mais importantes moléculas reguladoras do sistema inflamatório (MOILANEN; VAPPATALO, 1995; YOON et al., 2002). O NO é um RL gasoso, lipofílico e bastante reativo, liberado principalmente por células endoteliais, neutrófilos e macrófagos, agindo como uma molécula mensageira, mediando diversos eventos fisiológicos

relacionados ao sistema vascular como: inflamação, agregação e inibição plaquetária, funções neuronais, apoptose e contração de vias aéreas e vasos sanguíneos. Derivado da L-arginina, NO é produzido através de enzimas denominadas NO sintases: constitutivas (cNOS) e induzidas (iNOS, expressa em tecidos inflamados, como em ilhotas pancreáticas no DM) (AVOGARO et al., 2006). O NO é amplamente estudado com relação a regulação do tônus vascular e fluxo sanguíneo, no entanto, evidências propõem um papel essencial do NO diretamente na função de células imunes como os linfócitos, podendo atuar como um modulador bifuncional capaz de estimular ou inibir a apoptose. Como descrito anteriormente, no DM são encontrados altos níveis de citocinas pró-inflamatórias e RL que levam a ativação da via NF- κ B que, conseqüentemente, acaba por regular a expressão de NOS II (isoforma descoberta de citocinas e macrófagos induzidos- iNOS), levando ao aumento na produção de NO provocando apoptose de células β e tendo como desfecho o desenvolvimento do DM 1 (FLORA FILHO; ZILBERSTEIN, 2000).

Além dos vários componentes desse complexo conjunto, as células imunes também possuem um sistema colinérgico completo consistindo de acetilcolina (ACh) receptores nicotínicos e muscarínicos, acetiltransferase de colina e a acetilcolinesterase (AChE) (KAWASHIMA; FUJII, 2000). Estudos têm demonstrado que os linfócitos possuem a maioria dos componentes necessários para a constituição de um sistema colinérgico não neuronal independente que está envolvido na regulação do sistema imune (KAWASHIMA; FUJII, 2003). A via colinérgica anti-inflamatória é mediada pela ACh, que é sintetizada e liberada pelos linfócitos exercendo sua função imunomoduladora nos receptores nicotínicos e muscarínicos. Quando liberada pelos linfócitos, a ACh é capaz de inibir a produção das citocinas pró-inflamatórias, como o FNT e IL-1 (KAWASHIMA; FUJII, 2003).

Os níveis de ACh no espaço extracelular são regulados pelas colinesterases, que são divididas em pelo menos duas famílias principais: AChE (EC 3.1.1.7) e butirilcolinesterases (EC 3.1.1.8, BuChE) (SOREQ; SEIDMAN, 2001). A AChE hidrolisa ésteres do grupamento acetil (como a ACh), sendo preferencialmente encontrada no cérebro, junção neuromuscular, linfócitos e eritrócitos (TAYEBATI et al., 2002). Nos tecidos linfoides, a AChE regula a quantidade de ACh das células de acordo com as demandas imunológicas, contribuindo de forma importante para o controle de processos inflamatórios. Além disso, tem sido demonstrado que inibidores de AChE reduzem a proliferação de linfócitos e a secreção de citocinas e

podem atenuar a inflamação por aumentar a concentração de ACh no espaço extracelular (NIZRI; HAMRA-AMITAY, 2006).

Sabe-se que para o desenvolvimento do DM 1, macrófagos são estimulados por IFN- γ e liberam outras citocinas como IL-1 β , TNF- α e radicais livres, tóxicos para células β pancreáticas, levando-as à apoptose, sem prejudicar os demais componentes da ilhota (KUKREJA; MACLAREN, 1999; ICHINOSE; KAWASAKI; EGUCHI, 2007; MAHON; SOSENKO; RAFKIN-MERVIS, 2009). De fato, estudos utilizando camundongos "*Non-obese diabetic*" (NOD) têm demonstrado que o perfil de secreção de citocinas durante o desenvolvimento do DM 1 é de padrão Th1, onde se tem como principal constituinte a IL-2, o FNT- α e o INF- γ , além de uma diminuição nos níveis de IL-10 (SESTERHEIM; SAITOVITCH; STAUB, 2007). A participação dos RL produzidos especialmente sob a influência de citocinas pró-inflamatórias nas células β , como o NO, também é um aspecto importante, já que esse radical está presente nos macrófagos e no tecido pancreático de camundongos NOD (RABINOVITCH, 1996).

Sabe-se que tanto o DM 1 quanto o 2 podem exibir semelhantes condições inflamatórias e autoimunes (PIETROPAOLO et al., 2000; WINER et al., 2011; BROOKS-WORRELL; NARLA; PALMER, 2013). Recentemente, foi relatado que células T CD4+ autorreativas podem ser encontradas em ambos pacientes portadores dessa doença. Altos níveis plasmáticos de IL-6, IL-12, IL-10 e IL-17 são encontrados em pacientes com DM 1 quando comparados com pacientes DM 2 (SARIKONDA et al., 2014). Recentemente, tanto a dislipidemia quanto a lipoperoxidação podem estar associadas com o aumento no status inflamatório encontrado em pacientes diabéticos (BASTOS et al., 2016). O sistema colinérgico tem sido mais explorado quando relacionado a danos cerebrais causados pelo DM em modelos animais, como o déficit cognitivo (KUHAD; CHOPRA, 2007; KUHAD; SETHI; CHOPRA, 2008) e estresse oxidativo (EL- AKABAWY; EL- KHOLY, 2014).

1.2.4 Complicações crônicas do DM: infecções por *Candida albicans*

O excesso de glicose pode causar danos ao sistema imunológico, já que a hiperglicemia pode promover uma diminuição da função de células do sistema imune como aderência, quimiotaxia, fagocitose e capacidade bactericida intracelular, sendo que estudos demonstram uma relação inversa entre este último mecanismo

imunitário e os níveis de HbA_{1c}, principalmente no DM 1 (MULLER, 2005; FRAGA-SILVA et al., 2015). Sendo assim, com essas funções diminuídas, ocorre uma diminuição na formação de espécies reativas de nitrogênio (ERN), EROS e fluxos catiônicos, formados diretamente pelas células do sistema imunitário durante uma infecção microbiana para auxiliar na eliminação do agente patogênico, conseqüentemente, esta via de eliminação do patógeno fica prejudicada em DM (Miramón et al., 2012). Além disso, também foi reportado que a hiperglicemia provoca uma estimulação permanente dessas células e, portanto, tem uma resposta celular menos pronunciada a um estímulo infeccioso (DELAMAIRE et al., 1997; BUCHTA et al., 2013). Esses fatos estão associados com o aumento da susceptibilidade dos pacientes com DM a uma variedade de infecções sistêmicas e superficiais (VALERIUS et al., 1982; DELMAIRE et al., 1997; GEERLINGS; HOPELMAN, 1999; DOOLEY; CHAISSON, 2009). No entanto, é sabido que se o paciente faz o controle glicêmico e mantém um tratamento adequado, ocorre uma melhora na imunidade celular controlada (SBD, 2015).

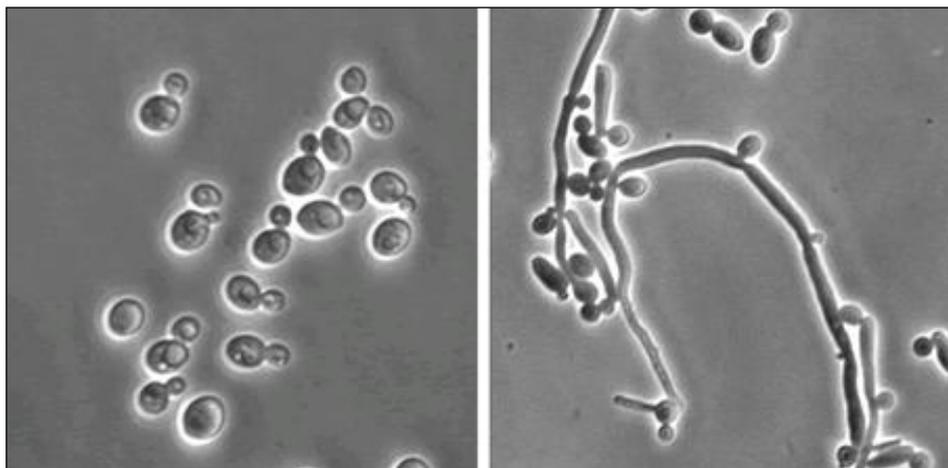
O aumento da susceptibilidade em pacientes com DM pode favorecer infecções por cocos Gram-positivos, enterobactérias, micobactérias, vírus e fungos no trato respiratório inferior, trato urinário, pele e mucosas (JOSHI et al., 1999; DONDEERS, 2002; MULLER et al., 2005; PELEG et al., 2007; AHMED; REID; KHARDORI, 2008; BADER, 2008; JEON; MURRAY, 2008; LETH et al., 2011; GREENE et al., 2012).

A candidíase ou candidose é uma micose oportunista, endógena ou exógena, causada por leveduras do gênero *Candida*. Espécies do gênero *Candida* são classificadas da seguinte forma, segundo a taxonomia: Reino Fungi, Filo Ascomycota, Classe Saccharomycetes, Ordem Saccharomycetales, Família Saccharomycetaceae (GUARRO; GENÉ; STCHIGEL, 1999). As espécies do gênero *Candida* são microrganismos Gram-positivos, leveduriformes, aeróbios, sendo capazes de crescer em anaerobiose (PETTINATI, 1980; DAHLE; OLSEN, 1991). Esse fungo forma colônias brancas ou branco-amareladas, úmidas, cremosas e com odor característico (MEYER et al., 1984).

É um fungo que pode crescer sob duas diferentes formas e ambas são de grande importância na patogênese. Na forma de levedura, apresenta-se como célula globosa, ovalada ou alongada e pode formar hifas verdadeiras, e na forma de micélio suas células apresentam-se como pseudo-hifas, podendo também formar

hifas verdadeiras. A mudança na morfologia de fase leveduriforme para filamentososa pode ser induzida por uma variedade de condições ambientais, como variação de temperatura, pH e, apesar disso, não é considerado um fungo dimórfico já que as duas formas podem coexistir (Figura 3) (CANNON et al., 1995; MEYER et al., 1984).

Figura 3 – Levedura e hifa de *C. albicans*



Fonte: Adaptado de Farias (2014).

Espécies de *Candida* residem como comensais, fazendo parte da microbiota normal dos indivíduos saudáveis. As formas clínicas podem ser divididas em superficial, cutâneo-mucosas (orofaríngea, esofágica, vulvovaginal), profunda, invasiva e sistêmicas/disseminadas (BUZZINI; MARTINI, 2001; SIDRIM; ROCHA, 2004). A patogênese da candidíase é facilitada por vários fatores de virulência, sendo que nenhum é dominante, podendo ser dependente da predisposição do hospedeiro (imunodepressão) e virulência fúngica.

Todavia, quando há uma ruptura no balanço normal da microbiota ou o sistema imune do hospedeiro encontra-se comprometido, como ocorre no DM, as espécies do gênero *Candida* tendem a manifestações agressivas, tornando-se patogênicas. Entre os diversos tipos de fungos frequentemente isolados de pacientes portadores de DM, estão as seguintes espécies: *Candida dubliniensis*, *C. haemulonii*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* e *C. albicans* (ERBEN et al., 2013).

Mulheres e crianças portadoras de DM tipo 1 apresentam maior colonização por *C. albicans* (RAYFIELD et al., 1982; WILSON; TOMLINSON; REEVES, 1987; BOHANNON, 1998; KOWALEWSKA et al., 2016). Uma possível explicação seria a diferença na duração da infecção: mulheres com DM são susceptíveis à infecção por

C. albicans, no entanto, aquelas portadoras do DM 1 teriam uma função limitada nos neutrófilos, inclusive na capacidade desses em fagocitar esses fungos (WILLIAMS et al., 1975; RAYFIELD et al., 1982; WILSON; TOMLINSON; REEVES, 1987).

C. albicans é a espécie mais frequentemente isolada de infecções superficiais e invasivas, e também é a espécie da qual se tem maior conhecimento sobre patogenicidade, devido à diversidade de fatores de virulência descobertos. Habitualmente, se considera que o sítio de origem de *C. albicans* causadora de infecções seja a microbiota do trato digestório humano (organismo comensal), porém diversos casos têm sido relatados de forma horizontal. *C. albicans* foi o primeiro fungo zoopatogênico que teve o seu genoma sequenciado, o que possibilita uma variedade de experimentos e, por conseguinte, um grande avanço nos estudos relacionados a esse fungo (BARBEDO; SGARBI, 2010).

Com relação a sua biologia, a identificação da atividade da enzima N-acetil- β -D-glucosaminidase (E.C. 3.2.1.30, NAG) em *C. albicans* pode auxiliar nos estudos sobre a virulência dessa levedura em específico, já que não é encontrada em outras espécies de *Candida* (JENKINSON; SHEPHERD, 1987; KAMIYAMA et al., 1989). Essa enzima pode não ter uma função essencial, mas pode possibilitar para *C. albicans* uma vantagem para seu crescimento e colonização de células hospedeiras, já que opera em coordenação com quitinases promovendo a hidrólise de quitina, que é essencial para o metabolismo fúngico (JENKINSON; SHEPHERD, 1987; NIIMI et al., 1997; MUNRO et al., 2001).

Pacientes portadores de DM apresentam função renal bastante comprometida em longo prazo e a atividade dessa enzima, além de ser detectada quando há danos profundos nesse órgão, já que está presente em altas concentrações nas células tubulares proximais do rim e níveis aumentados da excreção urinária dessa enzima estão associados com complicações micro e macrovasculares, pode facilitar a patogenicidade de *C. albicans* no organismo desses pacientes com o sistema imune já tão debilitado (HONG et al., 2000; NORDBERG et al., 2009).

O sistema imune desenvolve uma resposta após a infecção com o intuito de controlar os agentes patogênicos. Os neutrófilos e macrófagos podem eliminar o fungo via fagocitose, e a ativação de macrófagos leva à liberação de vários mediadores como as citocinas e NO. Em modelos animais de vaginite ocasionada por *C. albicans*, foi relatado um aumento na produção de IL-1 β pelas células epiteliais, promovendo um recrutamento de células PMN para a vagina, produzindo

uma intensa resposta inflamatória (YANO et al., 2012; NASH et al., 2016). Sabe-se que citocinas produzidas por respostas do tipo Th1 têm um papel crucial na proteção anticandida, já que IFN- γ (ação de estimular os macrófagos a destruir os microrganismos fagocitados) e FNT- α (principal mediador da resposta inflamatória aguda induzida por microrganismos infecciosos) promovem a ativação de fagócitos que auxiliam na geração de uma resposta protetora. No entanto, as produzidas por Th2, como IL-4 e IL-10, agravam a doença por inibir respostas do tipo Th1, já que têm a propriedade de desativar as células efetoras da ação fungicida. A resistência do paciente à candidíase disseminada exige uma ação coordenada das defesas imune inata e adaptativa, uma ação harmonizada entre as várias citocinas e demais moléculas envolvidas.

Com relação ao NO, como descrito anteriormente, esse é produzido por enzimas que podem ser classificadas como cNOS e iNOS. A iNOS é liberada por macrófagos, células endoteliais, células da musculatura lisa após estímulos causados por bactérias ou por citocinas pró-inflamatórias e catalisa a conversão de arginina em citrulina, liberando NO difundível, que pode combinar-se rapidamente com radicais como peróxido (H_2O_2), para produzir radicais peroxinitritos ($ONOO^-$) altamente reativos, que podem auxiliar na eliminação de agentes patogênicos (BECKMAN; KOPPENOL, 1996). No entanto, o papel exato do NO em combate a patógenos através de PMNs, tanto pela via de formação de RL quanto pela liberação de mediadores pró-inflamatórios, ainda não é completamente elucidado (KORCHAK et al., 1984; KUMAR et al., 2015).

Além disso, o NO está envolvido com a sinalização purinérgica, no qual após ligação de nucleosídeos e nucleotídeos com seus respectivos receptores, atua como segundo mensageiro intracelular (BURNSTOCK, 2007). O sistema purinérgico, que será mais bem abordado nos subitens a seguir, é formado por nucleosídeos (adenosina trifosfato- ATP; adenosina difosfato- ADP, adenosina monofosfato- AMP) e nucleotídeo (adenosina- Ado) de adenina que são importantes moléculas sinalizadoras em vários tecidos, sendo que ATP e Ado têm importância na regulação do sistema imune, uma vez que, além de apresentarem ações antagônicas, atuam sobre a liberação de citocinas (BOURS et al., 2006). O controle dos níveis extracelulares desses substratos é regulado por várias enzimas ancoradas à superfície celular, dentre elas a enzima 5' nucleotidase (5'NT) que já teve sua

atividade evidenciada na membrana plasmática de leveduras e micélios de *C. albicans* (MARRIOT, 1975).

Recentemente, outro sistema enzimático demonstrou possibilidade de envolvimento na patogenicidade das infecções por *C. albicans*. A ACh demonstrou ser capaz de inibir a formação de biofilme *in vitro* e *in vivo*, além de reduzir a inflamação de órgãos em modelo desenvolvido em *Galleria mellonella*, modelo alternativo para estudos sobre biofilme (RAJENDRAN et al., 2015; NETT, 2016).

Para a identificação e isolamento desse agente patogênico em amostras, é feita a cultura em ágar Sabouraud, meio de Nickerson, Pagano-Levine e Chromagar, onde a amostra biológica é utilizada para isolamento do agente etiológico e observação da macromorfologia. Para tanto, deverá ser semeada sobre a superfície do meio de cultura sólido, podendo ser em tubos ou placas de Petri, que deverá apresentar colônias características da espécie (LARONE, 2002). Técnicas de biologia molecular como a reação em cadeia da polimerase (PCR) e a amplificação dos genes 14- α -DM, também têm sido bastante utilizadas.

Para o tratamento da candidíase, é recomendado a retirada dos fatores predisponentes e o restabelecimento da imunidade, combinados com medicamentos e pomadas antimicóticos de derivados de azólicos (fenticonazol, cetoconazol, miconazol, fluconazol, isoconazol, itraconazol, tioconazol, voriconazol, ravucozanol, posaconazol, albaconazol), poliênicos (nistatina, anfotericina B) e equinocandinas (caspofungina, micafungina e anidulafungina). A escolha do tipo de tratamento e da via de aplicação depende da espécie de *Candida* identificada, bem como forma e local da infecção (RANG; DALE, 2012).

Vários grupos de pesquisa têm se dedicado ao estudo de desenvolvimento de novos fármacos com ação antifúngica, uma vez que o tratamento convencional possui diversos efeitos adversos como: redução da função hepática e renal, náuseas, alterações sanguíneas, além das limitações na via de administração devido à toxicidade de alguns desses fármacos (BERGOLD; GEORGIADIS, 2004). Nesse sentido, compostos de origem natural vêm recebendo uma maior atenção atualmente. Dentre os vários testes para avaliar a suscetibilidade dos microrganismos frente a esses novos compostos, a determinação da concentração inibitória mínima (CIM), correspondente a menor concentração da substância em estudo capaz de inibir o desenvolvimento do microrganismo, tem sido bastante utilizada para testes piloto para identificação de uma possível ação farmacológica.

1.3 O ENVOLVIMENTO DO SISTEMA PURINÉRGICO NO DM

O sistema purinérgico é caracterizado por ser uma via de sinalização importante para diferentes tecidos, sendo capaz de desencadear múltiplos efeitos celulares como resposta imune, inflamação, dor, agregação plaquetária, vasodilatação mediada pelo endotélio, proliferação e morte celular, além de mecanismos neuronais e não neuronais. Três componentes principais fazem parte do sistema purinérgico: nucleotídeos e nucleosídeos extracelulares, seus receptores e as ectoenzimas responsáveis pela regulação dos níveis dessas moléculas (YEGUTKIN, 2008). Os nucleotídeos ATP, ADP e o nucleosídeo Ado são considerados importantes moléculas sinalizadoras (ILLES; RIBEIRO, 2004; BURNSTOCK, 2007). Distúrbios no metabolismo celular provocados pelo DM podem levar a alterações nas concentrações desses nucleotídeos e nucleosídeos intra- e extracelulares (LUNKES et al., 2008; RÜCKER et al., 2010; SCHMATZ et al., 2013; KREFT et al., 2016).

Os nucleotídeos e o nucleosídeos podem exercer seus efeitos através da ativação de receptores purinérgicos subdivididos em dois grandes grupos: P1 e P2 (Figura 4). Os purinoreceptores do tipo P1 são mais eficientemente ativados por Ado e quatro diferentes subtipos foram clonados e caracterizados: A_1 , A_{2A} , A_{2B} e A_3 , todos membros da superfamília de receptores ligados à proteína G. Os receptores para adenosina P1 estão presentes em várias espécies animais e em vários tecidos. No entanto, a distribuição destes receptores é bastante irregular entre as espécies e principalmente entre os tecidos (FREDHOLM et al., 2011). Os receptores A_1 e A_{2A} são ativados por concentrações de Ado na faixa de nanomolar, já os subtipos A_{2B} e A_3 tornam-se ativos somente quando os níveis extracelulares de Ado se elevam na faixa de micromolar, como durante períodos de inflamação, hipóxia ou isquemia (OLAH; STILES, 1995; BARALDI; BOREA, 2000). Recentemente foi descrito que a Ado, ao promover a estimulação de receptores A_{2a} através de um agonista em modelo animal de DM, é capaz de prevenir a proteinúria e reduzir o dano glomerular, além de reduzir as vias inflamatórias alteradas por essa patologia (PERSSON et al., 2016).

Já os purinoreceptores P2 são ativados por ATP e são divididos em dois grupos bem distintos: os receptores ionotrópicos P2X, que são canais iônicos dependentes de ligantes, e os receptores metabotrópicos P2Y, que são acoplados à

2005; BOEYNAEMS; COMMUNI, 2006; DI VIRGILIO et al., 2009). O ATP extracelular pode agir como uma molécula pró-inflamatória, que através da ligação aos receptores P2, promove o recrutamento de macrófagos, células dendríticas, linfócitos T CD4+ e CD8+, linfócitos B e aumenta a liberação de citocinas pró-inflamatórias. Em casos em que o ATP extracelular é encontrado em elevadas concentrações, esse pode atuar como uma potente molécula citotóxica, capaz de levar à morte diferentes classes de células pela formação de grandes poros na membrana plasmática (FILIPPINI et al., 1990).

Contraditoriamente, o ATP extracelular também pode desempenhar um papel imunossupressor, por inibir a proliferação de células T e, conseqüentemente, bloquear a liberação de citocinas pró-inflamatórias (DEAGLIO et al., 2007; GESSI et al., 2007). Esse mecanismo se dá principalmente quando o ATP está em baixas concentrações extracelulares, aumentando a sua afinidade por receptores do tipo P2Y, localizados na superfície dos linfócitos. Estes receptores quando estimulados promovem uma “*downregulation*” e levam à liberação de citocinas anti-inflamatórias, promovendo um efeito protetor contra danos teciduais excessivos (BOURS et al., 2006). A modulação dessa sinalização é indispensável para um melhor entendimento da fisiopatologia do DM bem como suas complicações, uma vez que a sinalização purinérgica atua no sistema vascular e tem o potencial de influenciar funções cardíacas, participar de respostas vasomotoras e controlar muitas funções plaquetárias (BURNSTOCK, 2006).

Em relação à agregação plaquetária, o ATP possui um papel complexo nesse mecanismo, uma vez que em baixas concentrações ativa e em altas concentrações inibe a agregação de plaquetas induzida pelo ADP (SOSLAU; YOUNPRAPAKON, 1997; ROZALSKI; NOCUN; WATALA, 2005), que é um importante estimulante da agregação plaquetária, ativando e recrutando plaquetas para o sítio da injúria tecidual (MARCUS et al., 2003b).

As plaquetas são células anucleadas, com formato discoide sendo bastante heterogêneas quanto às características de tamanho, densidade e coloração, sendo formadas a partir da fragmentação dos megacariócitos (GUYTON; HALL, 1997; LEE et al., 1998). O citoplasma da plaqueta é constituído por quatro tipos de grânulos, sendo que nos grânulos densos é que estão presentes cerca de 60% da quantidade total dos nucleotídeos da adenina contidos nas plaquetas, que são liberados para o meio extracelular em resposta à estimulação ou à ativação plaquetária (HOLMSEN, 1985), ADP, ATP, além de conter cálcio, serotonina e pirofosfato (QAWI; ROBSON,

2000). A principal função das plaquetas sanguíneas é a manutenção da integridade vascular, participando da tromborregulação, ou seja, dos processos pelos quais as células sanguíneas interagem com as células das paredes dos vasos para regular ou inibir a formação de trombos (MARCUS et al., 2003a).

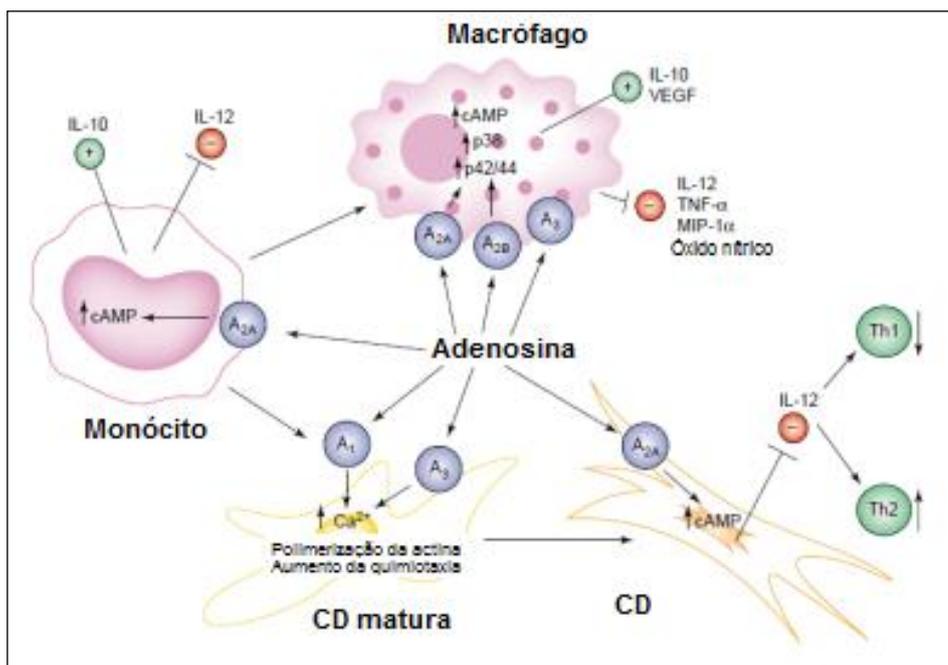
O ADP constitui o principal agonista envolvido no recrutamento e agregação das plaquetas em locais de injúria vascular. A agregação espontânea das plaquetas está ausente, ou raramente é observada em indivíduos saudáveis, enquanto está presente em pacientes com DM, angina instável, infarto do miocárdio, dislipidemia, estresse emocional e em exercícios físicos extenuantes (MUDALIAR et al., 2004). A aterosclerose acelerada observada nas pessoas portadoras de DM é atribuída, em parte, juntamente com a incidência de trombose arterial, à hiper-reatividade das plaquetas (GABBIANELLI et al., 2003). Vários estudos têm fornecido evidências sobre a ativação reforçada ou aumento da atividade das plaquetas em pacientes e em ratos com DM, devido a um desequilíbrio na homeostase purinérgica plaquetária (LUNKES et al., 2003; LUNKES et al., 2008; FERREIRO et al., 2013; SCHMATZ et al., 2013; CALGAROTO et al., 2015). Sendo assim, alterações na agregação, adesão e ativação de plaquetas, parecem representar um fator decisivo na sua hipersensibilidade e função nos pacientes diabéticos, desencadeamento de processos inflamatórios nos vasos, podendo levar a complicações macrovasculares.

Além de ação antitrombótica, a Ado está envolvida em funções cruciais no SNC, como neuromodulação da transmissão sináptica e neuroproteção (ROZALSKI et al., 2005; FREDHOLM et al., 2005). De modo geral, a Ado atua como um mensageiro intercelular, embora não seja considerada um neurotransmissor clássico, pelo fato de não ser armazenada em vesículas, não ser liberada por exocitose e não atuar predominantemente em sinapses (BRUNDEGE; DUNWIDDIE, 1996; FREDHOLM, 2005). Sob condições normais, ela é continuamente formada tanto intracelularmente quanto extracelularmente (FREDHOLM, 2001). Entretanto, em locais de dano tecidual, é produzida em altas concentrações, desempenhando importante papel na regulação da homeostase de muitos sistemas fisiológicos incluindo cardiovascular (vasodilatação e diminuição da pressão sanguínea), nervoso (regulação da liberação de neurotransmissores) e renal, além de atuar como um regulador endógeno da imunidade inata e em lesão tecidual excessiva associada à inflamação (RATHBONE et al., 1999; ALDRICH; BLACKBURN; KELLEMS, 2000; BERAUDI et al., 2003; HASKÓ; CRONSTEIN, 2004; SITKOVSKY; OHTA, 2005; BURNSTOCK, 2006; DESROSIERS et al., 2007). A utilização de Ado

em modelo de dano renal provocado por DM foi capaz de diminuir os níveis de FNT- α e demais marcadores de dano renal, demonstrando que essa via pode ser importante para futuras intervenções farmacológicas (TAŞKIRAN et al., 2016). Ainda, a utilização de dipiridamol em modelo animal semelhante foi capaz de restaurar os níveis de Ado, reduzidos pelo DM, além de equilibrar o balanço entre citocinas pró e anti-inflamatórias *in vivo* e *in vitro* (ELSHERBINY; AL-GAYYAR; ABD EL GALIL, 2015).

O DM provoca uma exagerada estimulação da inflamação e do sistema imune que pode conduzir a uma inflamação descontrolada, resultando em danos celulares e destruição de tecidos. Na tentativa de regulação dessa condição, o ATP e a Ado, juntamente com os receptores purinérgicos e a atividade das ectonucleotidases, colaboram com estas respostas, compreendendo um sistema de *feedback* purinérgico (BOURS et al., 2006), sendo a Ado considerada uma molécula sinalizadora de dano celular, porém com ações antagônicas às do ATP (BOURS et al., 2006). Na superfície dos macrófagos e monócitos, a Ado estimula a liberação de IL-10 e inibe a liberação de IL-12, FNT- α e, somente nos macrófagos, de NO, consequentemente, favorecendo a ação anti-inflamatória (Figura 5) (HASKÓ; CRONSTEIN, 2004).

Figura 5 – Interação do nucleosídeo Ado com seus receptores presentes na superfície de células do sistema imune e os efeitos modulatórios

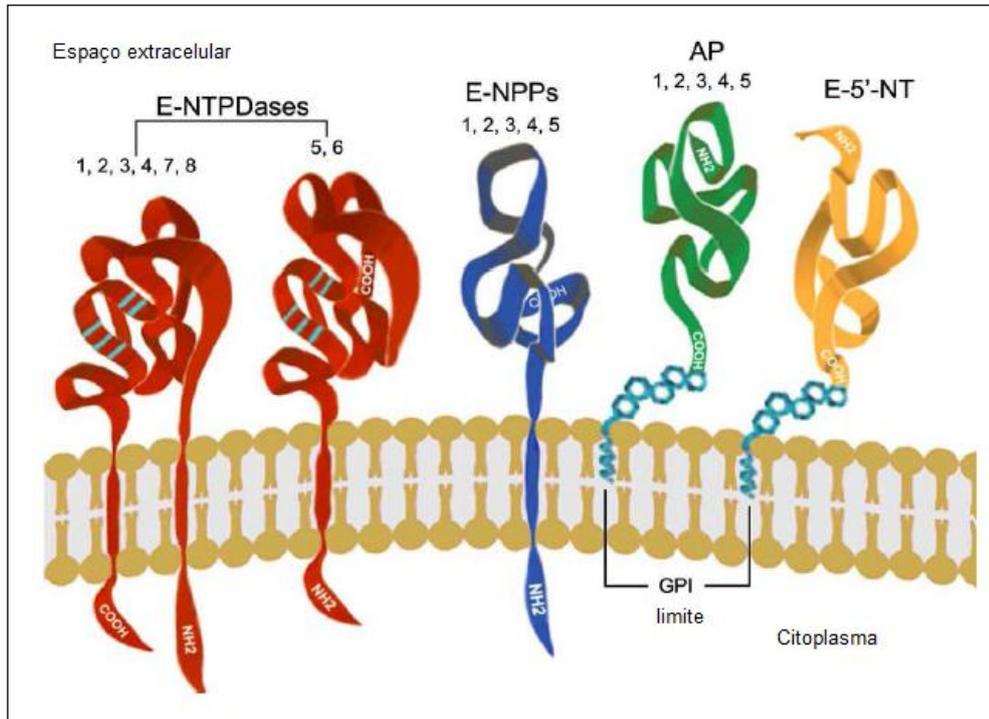


Os metabólitos da Ado são: inosina, hipoxantina, xantina e ácido úrico, esse último excretado através da urina (TRAMS; LAUTER, 1974; LOGUERCIO et al., 1996; BOROWIEC et al., 2006). A inosina apresenta alta concentração extracelular em caso de injúria, quando o nível de Ado também estiver elevado. Esse metabólito pode ligar-se aos mesmos receptores da Ado e iniciar eventos sinalizadores intracelulares, assim como, interferir na função celular independente de receptores (GOMEZ; SITKOVSKY, 2003; HASKÓ; CRONSTEIN, 2004). Os efeitos imunomodulatórios da inosina são atribuídos à supressão da síntese de citocinas pró-inflamatórias, inibição da ativação de neutrófilos e linfócitos e indução de produção da IL-10 (HASKÓ; CRONSTEIN, 2004).

1.3.1 Enzimas que degradam nucleotídeos e nucleosídeos de adenina

Os nucleotídeos extracelulares são degradados por uma cascata de hidrólise constituída por enzimas que estão localizadas na superfície celular (ancoradas na membrana celular), chamadas de ectonucleotidases, cujo sítio ativo está voltado para o meio extracelular, ou estão presentes na forma solúvel no meio intersticial, produzindo seus respectivos nucleotídeos/nucleosídeos e fosfato livre. Este conjunto de enzimas inclui a família das ectonucleosídeos trifosfato difosfohidrolases (EC 3.6.1.5, E-NTPDase), ectonucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterase (EC 3.1.4.1, E-NPP), as fosfatases alcalinas (CD73, E.C.3.1.3.5), a E-5'NT e a ADA (ROBSON et al., 2006) (Figura 7). Estas enzimas já foram relacionadas com várias funções, porém, o principal papel funcional consiste no término da sinalização por nucleotídeos, formação do nucleosídeo Ado, seguido pela recaptação de purinas (ZIMMERMANN, 2001).

Figura 7 – Ectonucleotidasas e suas principais características



NTPDases e NPPs são enzimas integrais de membrana, enquanto que as fosfatases alcalinas (AP) e a ecto-5'-nucleotidase (E-5'-NT) estão ancoradas à membrana plasmática por um resíduo de glicosilfosfatidilinositol (GPI).

Fonte: Adaptado de Cognato e Bonan (2010).

1.3.1.1 Ectonucleosídeo trifosfato difosfohidrolase (EC 3.6.1.5, E-NTPDase)

A família E-NTPDase (superfamília GDA1-CD39) é composta por oito membros, já caracterizados e clonados. Quatro membros desta família de enzimas estão localizados na superfície das células, com um sítio catalítico extracelular, sendo eles E-NTPDases 1, 2, 3 e 8. A E-NTPDase1 hidrolisa ATP e ADP igualmente bem, enquanto a E-NTPDase3 e a E-NTPDase8 apresentam preferência por ATP como substrato. A E-NTPDase2 se caracteriza por possuir uma alta preferência por nucleotídeos trifosfatados (KACZMAREK et al., 1996; CHADWICK; FRISCHAUF, 1997; SMITH; KIRLEY, 1998; SÉVIGNY et al., 2000; ROBSON et al., 2006). Outros dois membros conhecidos como E-NTPDases 5 e 6 apresentam localização intracelular, (MULERO et al., 1999; BRAUN et al., 2000). As E-NTPDases 4 e 7 apresentam localização intracelular com o sítio ativo voltado para o lúmen de organelas citoplasmáticas (WANG et al., 1998; BIEDERBICK, 2000; SHI et al., 2001). Estas enzimas formam AMP na presença de íons cálcio e magnésio, que é

então convertido à Ado pela E-5'NT (CHAN et al., 1986; ZIMMERMANN, 2011; ROBSON et al., 2006).

A E-NTPDase desempenha importante controle da função dos linfócitos, incluindo o reconhecimento do antígeno e ativação de funções efetoras das células T citotóxicas (FILIPPINI et al., 1990), e a capacidade de gerar sinais que amplificam interações célula-célula (KACZMAREK et al., 1996).

1.3.1.2 Ecto-5'- nucleotidase (EC 3.1.3.5, E-5'NT)

Essa enzima é presente em inúmeros tecidos como o renal, o nervoso, o hepático, a placenta, o endotélio vascular e as plaquetas (BARMAN, 1996). Está envolvida em diferentes funções, como na adesão celular, além de representar um marcador de maturação de linfócitos T e B. Juntamente com as E-NTPDases hidroliza AMP até Ado na circulação. Também, a E-5'NT é classificada de acordo com sua localização celular e propriedades bioquímicas, podendo ser uma enzima ancorada à membrana plasmática via glicosilfosfatidil inositol (GPI) ou apresentar-se na forma solúvel, no meio extracelular ou no citoplasma (ZIMMERMANN, 2001). Até o momento, sete subtipos da enzima 5'NT foram isoladas e caracterizadas em humanos. Esses subtipos variam na localização subcelular, sendo cinco deles localizadas no citosol, um na matriz mitocondrial e um anexado a membrana plasmática externa (HUNSUCKER et al., 2005).

O aumento na atividade dessa enzima, juntamente com a E-NTPDase, pode surgir como um mecanismo adaptativo com a finalidade de reduzir os níveis de ATP e aumentar os níveis de Ado no meio (LUNKES et al., 2004; SPANEVELLO et al., 2006; KAIZER et al., 2007). Como citado anteriormente, a atividade dessa enzima é considerada a principal via de produção de Ado no meio extracelular.

Tanto em pacientes diabéticos quanto em modelo experimental de DM, são encontradas alterações nas atividades das ectonucleotidases, em função de uma resposta à complexa patofisiologia dessa doença. Foi demonstrado um aumento na hidrólise dos nucleotídeos ATP, ADP e AMP no SNC e em plaquetas de animais diabéticos (SCHMATZ et al., 2009b; SCHMATZ et al., 2013). Pacientes com DM tipo 2 e hipertensos têm atividade das enzimas 5'NT e NTPDases plaquetárias aumentadas em relação ao grupo controle (LUNKES et al., 2003). Em modelo animal de DM com dano renal foi evidenciado um aumento na atividade dessa

enzima em tecido renal e na excreção urinária de Ado, sugerindo ser um possível candidato a marcador de dano renal inicial (OYARZÚN et al., 2015).

1.3.1.3 Adenosina deaminase (E.C. 3.5.4.4, ADA)

A enzima ADA promove a desaminação hidrolítica da Ado em inosina. Além deste nucleosídeo, outro substrato que é capaz de ser clivado pela ADA é a 2'-desoxiadenosina, a qual é convertida a 2'-desoxinosina (LATINI; PEDATA, 2001; IWAKI-EGAWA et al., 2004). Essa enzima está presente em plantas, bactérias, invertebrados, vertebrados e mamíferos (AIKAWA et al., 1977; DADDONA, 1981; LUPIDI et al., 1992), sendo que sua quantidade difere entre os tecidos humanos. A ADA é encontrada como uma enzima citosólica e também pode ser expressa na superfície celular como uma ectoenzima.

Há duas isoenzimas distintas da ADA, ADA1 e ADA2. A ADA1 é uma enzima monomérica, cuja massa molecular é de aproximadamente 30-40 kDa (VAN DER WEYDEN; KELLEY, 1976). A isoenzima ADA1 é encontrada em todas as células, especialmente em linfócitos e monócitos (VAN DER WEYDEN; KELLEY, 1976). Nos eritrócitos, encontra-se somente a forma menor da isoenzima ADA1.

Evidências demonstram a ADA 1 pode ser associada a uma proteína de ligação conhecida como CD26 ou DPP-IV, uma glicoproteína multifuncional, que pode ser encontrada na forma solúvel ou integrada à membrana, sendo amplamente expressa em linfócitos T, B e células NK (GORRELL et al., 2001; GORRELL, 2005). A CD26 também possui atividade peptidásica e funciona como uma molécula de adesão à matriz extracelular, podendo influenciar processos de sinalização celular (GORRELL et al., 2001). Essa associação entre ecto-ADA com a DPP-IV sugere que esta enzima pode auxiliar na regulação da concentração extracelular de Ado, além de estar diretamente envolvida na ativação de células T (DONG et al., 1996; DONG et al., 1997).

Diferentemente da ADA1, a ADA2 apresenta diferenças, tanto estruturais quanto cinéticas e representa uma menor parte da atividade da ADA em tecidos, sendo abundante em plasma (RATECH; HIRSCHHORN, 1981; IWAKI-EGAWA et al., 2004). Dados recentes têm sugerido que ela pode ser secretada por monócitos ativados em processos inflamatórios (IWAKI-EGAWA et al., 2006).

A deficiência inata da ADA no sistema imune está diretamente relacionada com a síndrome da imunodeficiência severa combinada (SIDSC) e a ausência de linfócitos T e B funcionais em indivíduos afetados, ocasionando lesões e problemas funcionais de muitos órgãos com a alteração do metabolismo de purinas (MORTELLARO et al., 2006). Através da modulação dos níveis endógenos de Ado, essa enzima desempenha um papel crítico na atividade dos linfócitos, já que está envolvida na proliferação dos linfócitos, assim como na produção e diferenciação de citocinas Th1/Th2 (HASKÓ; CRONSTEIN, 2013). Esses efeitos da ADA na modulação das funções do sistema imunitário/inflamatório e no metabolismo da glicose corroboram com a hipótese de que as alterações no metabolismo da Ado poderiam afetar a atividade das células imunológicas e com o conceito de que a sinalização desse nucleosídeo representa um passo importante no processo de decisão molecular, controlando a inflamação no DM.

Por outro lado, um aumento na atividade da enzima em diferentes fluidos biológicos (líquidos pleural, pericárdico, peritoneal, intra-articular e fluidos cerebrospinais) tem sido utilizado para diagnóstico de tuberculose (BAGANHA et al., 1990; DA CUNHA, 1991), peritonite infecciosa, mononucleose infecciosa, febre tifoide, sinusite, meningite e SIDA (Síndrome de Imunodeficiência Adquirida) (TITARENKO et al., 2006).

A ADA desempenha um papel importante na modulação e na ação da insulina sobre o metabolismo da glicose em vários tecidos (RUTKIEWICZ; GÓRSKI, 1990). Em pacientes com DM 1, a atividade da ADA em soro demonstrou estar elevada, principalmente a atividade da isoforma ADA2 (HOSHINO et al., 1994). Por esta razão, vários compostos são estudados com a intenção de modular o sistema purinérgico no DM. De fato, a vitamina D foi capaz de prevenir o aumento provocado pelo DM, na atividade de todas as enzimas envolvidas nessa cascata (CALGAROTO et al., 2015). O resveratrol também demonstrou um aumento na atividade das ectonucleotidases e uma diminuição na atividade da ADA em sinaptossomas e plaquetas de ratos diabéticos (SCHMATZ et al., 2009a; SCHMATZ et al., 2009b). Além disso, o tratamento com vinho tinto e suco de uva demonstrou efeitos semelhantes aos do resveratrol em plaquetas de ratos diabéticos (SCHMATZ et al., 2013). Em outro estudo utilizando modelo animal de DM e hipertensão, o tratamento crônico com vinho tinto foi capaz de melhorar as alterações provocadas nos receptores P1 e P2 (MUSIAL et al., 2016) confirmando o papel desses receptores no

desenvolvimento da hipertensão e do DM (GUIMARÃES; ALBINO-TEIXEIRA, 2012; MUSIAL et al., 2012).

Em nosso laboratório, diversos estudos reportaram a alteração da atividade dessa enzima em diferentes condições. Em intoxicações por diferentes concentrações de metilmercúrio (MeHg), ocorre um aumento na atividade da ADA não somente no hipocampo, como também no fígado e nos rins de ratos recém nascidos (ABDALLA et al., 2011; ABDALLA et al., 2012). Também, Bellé e colaboradores (2009), demonstraram que a atividade da ADA no córtex total é maior em ratos mais jovens (sete dias) quando comparada com ratos de 60 dias. A atividade da ADA também foi investigada na Síndrome Metabólica, demonstrando um aumento na atividade da ADA em linfócitos (DE BONA et al., 2012; DE BONA et al., 2013). Além disso, a atividade da ADA apresenta-se aumentada em condições hiperglicêmicas tanto *in vitro* quanto *in vivo* (DE BONA et al., 2010; DE BONA et al., 2011; BELLÉ et al., 2011; SCHMATZ et al., 2013; BELLÉ et al., 2014; DE BONA et al., 2014; BITENCOURT et al., 2015).

1.4 MODELOS EXPERIMENTAIS DE DM E SUAS COMPLICAÇÕES *IN VIVO*

Modelos animais de DM são considerados ferramentas úteis para estudar a fisiopatologia e aspectos clínicos da doença, inclusive sendo utilizados como o primeiro passo para a investigação de novas alternativas de terapia. São utilizados modelos que ou desenvolvem DM de forma espontânea (camundongo NOD, ratos *Biobreading*-BB) ou através de técnicas químicas, cirúrgicas (mais utilizada em modelo de DM tipo 2, retirada parcial do pâncreas) ou ainda, genética (transgênicos ou "*knock-outs*") (CHATZIGEORGIOU et al., 2009). Os modelos de DM permitem investigar vários eventos e mecanismos de ação envolvendo estresse oxidativo, inflamação crônica, e conseqüentemente complicações crônicas, para substâncias que, futuramente, poderão ser utilizadas como tratamento no DM.

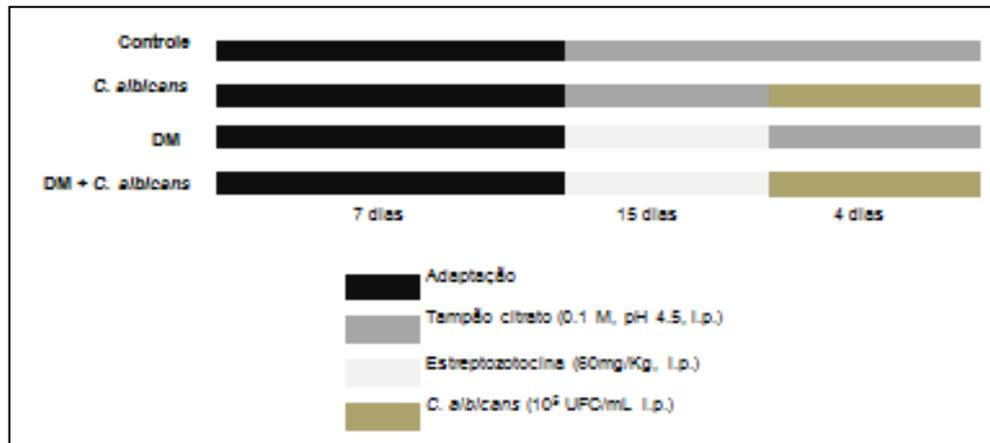
As substâncias químicas mais utilizadas para o desenvolvimento de modelos de DM experimental são o aloxano e a estreptozotocina (STZ). Ambos resultam em hiperglicemia e insulinopenia em espécies como ratos, camundongos e coelhos (SZKUDELSKI, 2001). No entanto, devido à maior estabilidade química, STZ tem sido o agente mais usado para reprodução do DM em roedores (LENZEN, 2008).

O STZ ($C_8H_{15}N_3O_7$) é uma nitrosureia glicosídeo natural, isolado da bactéria *Streptomyces achromogenes*, com conhecida ação antibiótica e antineoplásica, sendo utilizado em baixas doses nesses tratamentos. Tem sua ação diabetogênica através de mecanismos como a presença de 2-desoxi-D-glicose em sua estrutura, que facilita a sua captação preferencial por células β pancreáticas, além de acelerar a geração de espécies reativas de oxigênio e desencadear a fragmentação do DNA destas células (TAKASU et al., 1991; LEUNG; CHAN, 2009). Alternativamente, pode atuar como um doador de NO intracelular que, juntamente com superóxido e radicais hidroxil, contribuem para a necrose das células β (TURK et al., 1993).

Este xenobiótico pode ser utilizado para induzir tanto o DM 1 quanto o 2, dependendo da concentração e da via de administração em animais (SZKUDELSKI, 2001; NEGRI, 2005). Tratamentos com pequenas concentrações e em dias consecutivos culminam com o aparecimento de lesões inflamatórias nas ilhotas pancreáticas através de reação imune mediada pelas células T (LENZEN, 2008). Também, baixas concentrações associadas a uma dieta hipercalórica por pelo menos 60 dias, é desenvolvido o modelo de DM 2 em roedores. Já na dose de 60 mg/Kg, além da indução de DM 1, também reproduz de forma eficaz um modelo experimental de doença renal diabética em ratos (SZKUDELSKI, 2001; LENZEN, 2008; SHIVANNA et al., 2012). A utilização de STZ para o desenvolvimento de modelos de DM é bem caracterizado e padronizado em animais, pois se observa claramente a tríade do DM: poliúria, polifagia e polidipsia, além de perda de peso (LENZEN et al., 2008).

O STZ também tem sido utilizado para mimetizar um modelo de complicação do DM por infecção com *C. albicans*, já que como o paciente diabético, o animal diabético está mais susceptível a infecções (FISHER; LEE; TARRY, 1989; DHULEY, 2001). Este modelo de infecção fúngica utiliza 10^5 UFC/mL via intraperitoneal (I.P.) / intravenosa (I.V.), promovendo uma infecção sistêmica subaguda, geralmente, sendo bem tolerado pelos animais durante várias semanas, sem haver cura espontânea e sendo capaz de mimetizar a infecção humana (Figura 8) (DHULEY, 1999; BOKAEIAN et al., 2010a; BOKAEIAN et al., 2010b). Dentre as espécies de *Candida*, *C. albicans* é a que possui maior capacidade de aderência às células epiteliais e outras superfícies, o que pode estar diretamente relacionado com sua maior patogenicidade (HOWLETT, 1976; KIMURA; PEARSAL, 1978; DOUGLAS, 1985), sendo assim uma espécie adequada para reproduzir modelo seguro de infecção em roedores.

Figura 8 – Esquema de indução de DM seguido por infecção em ratos



Fonte: Autor.

1.5 PLANTAS MEDICINAIS

O homem sempre utilizou os recursos naturais para o seu interesse, explorando-os para a sua sobrevivência. Os vegetais são utilizados para diversos fins, principalmente nutricional e medicinal. A medicina tradicional chinesa e ayurveda são as mais antigas práticas de medicina, já que no florescimento de suas civilizações existiam inúmeros escritos sobre plantas medicinais (BOTSARIS, 1995). O registro mais antigo da utilização de plantas medicinais pelo homem encontra-se na medicina chinesa pelo imperador Shen Nong (2000 a.C.), que investigou o potencial medicinal de diversas plantas e outros produtos naturais, registrados no “Livro da Medicina Interna do Imperador Amarelo”, onde constavam registros de 365 drogas vegetais (POSSE, 2007). No entanto, o manuscrito egípcio “Papiro de Ebers” é considerado um dos mais importantes livros da cultura médica (VIEGAS, 2005).

A busca por especiarias, extremamente valiosas e cobiçadas em meados de 1500, foi o motivo da criação de diversas rotas comerciais terrestres e marítimas com a intenção de fazer a conexão entre os continentes. A colonização do continente americano por nações europeias fez com que se introduzissem o plantio de especiarias asiáticas, mas também levou novas espécies de plantas para o Velho Mundo que posteriormente tornaram-se hábito no cotidiano europeu como exemplo a batata, o café e o chá preto (ALMEIDA, 2000).

Na década de 50, após a segunda guerra mundial, houve um crescimento industrial nos países do terceiro mundo, principalmente incentivado pelo capital

estrangeiro (HOBBSAWM, 1995). Com o interesse no lucro, os medicamentos sintéticos conquistaram lugar na terapêutica, modificando completamente a forma de tratar doenças, o que fez surgir o atual complexo médico- industrial- hospitalar (OLIVEIRA, 1985). Em consequência desse processo, o conhecimento tradicional do uso de plantas medicinais passou a ser posto em segundo plano. Assim, o uso de plantas medicinais tornou-se sinônimo de atraso tecnológico (por falta de estudos científicos), fazendo com que usuários, médicos e pesquisadores se afastarem desse campo (LORENZI; MATOS, 2002).

Na década de 70, o movimento social urbano da Contracultura incluiu, dentre outros campos, a importação de sistemas terapêuticos distintos daqueles já existentes, como a Medicina Tradicional Chinesa, Ayurvédica e Homeopatia. Acompanhando esse processo histórico mundial, em 1978, a OMS criou o Programa de Medicina Tradicional e da Medicina Complementar, que visou facilitar a integração da medicina tradicional e da medicina complementar alternativa nos sistemas nacionais de atenção à saúde, promovendo o uso racional dessa integração. Atualmente, alguns países já contam com políticas nacionais que regulam a práticas da medicina tradicional, são eles: Brasil, China, Dinamarca, Gana, Japão, Noruega, República da Coreia e Arábia Saudita (OMS, 2011).

Segundo a Resolução RDC nº10 (2010), planta medicinal é uma espécie vegetal utilizada com propósitos terapêuticos. Caso tenha sofrido algum processo de estabilização ou de secagem, esta passa a ser chamada de droga vegetal, podendo ser encontrada íntegra, rasurada ou triturada (BRASIL, 1973; BRASIL, 2010). Os medicamentos fitoterápicos são obtidos exclusivamente com matérias-primas vegetais ativas, em que a sua segurança e eficácia são validadas por meio de levantamentos etnofarmacológicos, de utilização e de documentações técnico-científicas ou de evidências clínicas. Estes são caracterizados pelo conhecimento da eficácia e dos riscos de seu uso, assim como pela reprodutibilidade e constância de qualidade (BRASIL, 1973; BRASIL, 2010). Para transformar uma planta medicinal em droga vegetal, uma série de fatores diretamente ligados ao vegetal precisam ser controlados como: variações climáticas, tipo de solo, época de colheita, características genéticas, condições de secagem e de armazenamento (FATIMA, 1999; OLIVEIRA et al., 2011). É essa fundamentação científica necessária para o desenvolvimento de um produto fitoterápico que o diferencia das plantas medicinais a das preparações utilizadas na medicina popular (SONAGLIO et al., 2007).

O consumo das plantas medicinais pode ser feito na forma de chás, que são preparados por decocção, quando a droga vegetal fica em ebulição em água por tempo determinado, sendo indicado para partes da planta mais rígidas, como cascas, raízes, rizomas, caules e sementes; ou por infusão, onde se coloca água fervente sobre a droga vegetal, abafando logo em seguida, por um determinado período de tempo. Esta última é indicada para flores, folhas, inflorescências e frutos. Para as drogas vegetais, que possuem substâncias que degradam com o aquecimento, é indicada a maceração com água, que consiste no contato dessa droga com água, à temperatura ambiente, por um tempo determinado (BRASIL, 2010). Cerca de 50% das espécies medicinais são consumidas via oral na forma de chá e xaropes, seguido do uso tópico na forma de alcoolaturas (mistura com alto teor alcoólico e grande quantidade de ervas).

Plantas medicinais e seus derivados (como por exemplo, os fitoterápicos) são usados como medicação prescrita ou sem receita, automedicação ou autocuidado, remédio caseiro, como suplemento dietético, alimentos funcionais, fitoprotetores, dentre outros (OMS, 2011). As indicações terapêuticas mais frequentes estão relacionadas com doenças do aparelho respiratório e digestivo, tratamento de dores e febres, afecções do sistema geniturinário e circulatório. Muitas espécies de plantas medicinais são comercializadas por erveiros ou feirantes, em mercados e feiras livres de cidades de todo país (ALVES; SILVA; ALVES, 2008; ROCHA et al., 2013).

Aproximadamente 40% dos medicamentos atualmente disponíveis foram desenvolvidos direta ou indiretamente a partir de fontes naturais, sendo: 25% originários de plantas, 12% de microrganismos e 3% de animais. No caso de medicamentos antitumorais e antimicrobianos, cerca de 60% deles são derivados de plantas medicinais. Cerca de 13.000 plantas são usadas como fármacos ou para a síntese de moléculas medicinais (SIMÕES et al., 2004). De acordo com a OMS (2009), 65-80% da população mundial nos países em desenvolvimento depende essencialmente de plantas para o cuidado primário devido, muitas vezes, à pobreza ou à falta de acesso à medicina moderna (CALIXTO, 2005). No entanto, apenas um pequeno percentual das 250.000-500.000 espécies de plantas existentes teve o seu potencial fitoquímico estudado (VASHIST; JINDAL, 2012).

No entanto, vale ressaltar que apesar de muitas plantas serem úteis ao homem, existem aquelas que produzem substâncias tóxicas ou venenosas que através da utilização inadequada, poderão trazer efeitos indesejados. É preciso

conhecer bem as características de cada planta para poder usá-la como remédio, ter conhecimento da doença ou do sintoma apresentado para fazer a seleção correta da planta a ser utilizada e da preparação mais adequada. A forma de uso, a frequência e a quantidade são aspectos muito importantes para sua utilização.

Apesar da grande evolução da medicina alopática, ainda existem obstáculos básicos na sua utilização pelas populações carentes, que vão desde o acesso aos centros de atendimento hospitalares à obtenção de exames e medicamentos, carência de recursos de órgãos públicos de saúde e incessantes aumentos nos preços nos medicamentos alopáticos. Diante dos fatos apresentados, associado com a fácil obtenção, grande tradição do uso de plantas medicinais e os efeitos colaterais provocados por alguns medicamentos, a utilização da pesquisa para aumentar as informações etnobotânicas de plantas medicinais tem merecido atenção considerável de vários segmentos da comunidade científica (HEINRICH, 2000).

1.5.1 Plantas medicinais no Brasil

No Brasil, a primeira descrição sobre o uso de plantas como medicamento foi feita por Gabriel Soares de Souza, autor do Tratado Descritivo do Brasil, em 1587. Esse tratado descrevia os produtos medicinais utilizados pelos índios como “as árvores e ervas da virtude”. Os Jesuítas trouxeram as boticas portáteis para tratar os colonos e nativos acometidos por doenças como tuberculose, varíola e sarampo. No entanto, com o passar do tempo foram forçados a assimilar as plantas nativas utilizadas pelos índios para suprir as deficiências de Portugal (DUNIAU, 2003).

A publicação da primeira edição da Farmacopeia Brasileira, elaborada por Rodolfo Albino, representou um esforço significativo de regulamentar a manipulação de produtos derivados das plantas medicinais. Ao longo de todas as edições (atualmente a Farmacopeia encontra-se na 5ª edição) são contempladas mais de 260 espécies botânicas. No ano de 2011, o Brasil ganhou sua primeira edição do Formulário Nacional de Fitoterápicos, que traz na íntegra 83 monografias de medicamentos, como infusões, xaropes e pomadas.

A política de uso de plantas medicinais teve início no Brasil na década de 80 com o apoio da OMS, onde foi definido o estudo de plantas medicinais como uma das prioridades de investigação clínica. Mais recentemente, instituiu a Relação

Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (RENISUS), que apresenta plantas medicinais que apresentam potencial para gerar produtos de interesse ao SUS. Tem a função de orientar estudos e pesquisas que possam subsidiar a elaboração da Relação Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (RENAFITO), além do desenvolvimento e inovação na área de pesquisa com plantas medicinais e fitoterápicos (CARVALHO, 2008).

Alguns estados e municípios brasileiros por meio de instrumentos normativos já regulamentavam os serviços de fitoterapia na rede pública de saúde mesmo antes das políticas anteriormente citadas e, dentre esses podemos citar o Rio Grande do Sul. Sobre a oferta de serviços ou ações em fitoterapia no país, segundo um diagnóstico de 2008, estas ações estão presentes em 350 municípios/estados em todas as regiões da federação (Figura 9). No RS, estado com maior número de municípios que oferecem plantas medicinais ou fitoterápicos, a fitoterapia é a mais frequente dentre as práticas integrativas e complementares nos municípios.

Figura 9 – Distribuição dos municípios que possuem ações/serviços com plantas medicinais e fitoterapia nas unidades federais



Fonte: Rodrigues, Simoni e Machado (2011).

Apesar de conter mais de 20% do total de espécies conhecidas, os investimentos em pesquisa e desenvolvimento de novos fitomedicamentos são

escassos no Brasil (KLEIN et al., 2009). Estima-se que apenas 10% da população brasileira consumam fitoterápicos. Esse fato por ser explicado, em parte, pelo fato de que o mercado brasileiro nessa área ainda é recente quando comparado com países europeus e asiáticos, pela baixa frequência de prescrições médicas desses produtos e pela falta de conhecimento dos benefícios dos medicamentos fitoterápicos (VALECIO, 2013). Apesar do estudo com plantas medicinais apresentarem limitações, ainda assim, existem dados suficientes que justificam novos estudos.

1.5.1.1 Plantas medicinais utilizadas no tratamento do DM: *Syzygium cumini*

Mais de 800 plantas são usadas como remédios tradicionais para o tratamento do DM em todo o mundo (ALARCON-AGUILARA et al., 1998). Dentre as plantas mais estudadas, podemos citar *S. cumini* (sin. *Eugenia jambolana*, *Syzygium jambolana*, *Eugenia cumini*, *Myrtus cumini*, *Eugenia caryophyllifolia*-*S. cumini*). *S. cumini* pertencente à família Myrtaceae, sendo conhecido popularmente como jabolão, é originária da Índia, podendo ser encontrada em várias regiões do Brasil, inclusive no RS (BRAGANÇA, 1996). A árvore (Figura 10) é de grande porte, podendo atingir vários metros de altura, possui o caule aéreo, ereto, tipo tronco lenhoso e cilíndrico e os ramos são abundantes, retorcidos com folhas dispostas em filotaxia oposta (VIZZOTO; PEREIRA, 2008). As folhas são simples, pecioladas, lanceoladas ou lanceoladas oblongas até elípticas, com margens onduladas, ápices cuspidados e bases cuneadas (OLIVEIRA; AKISUE, 2000; MIGLIATO et al., 2006). As flores estão dispostas em inflorescências, de coloração branca a creme, axilares, racemosas, plurifloras compostas, que caracterizam outros gêneros pertencentes à família Myrtaceae (OLIVEIRA; AKISUE, 2000; MIGLIATO et al., 2006).

Figura 10 – Árvore de *S. cumini*



Fonte: Adaptado de Vizzoto e Pereira, (2008).

Os frutos (Figura 11) são do tipo baga, elípticos, com única semente, envolvido por uma polpa carnososa e comestível, mucilaginosa, doce e adstringente, com pericarpo de coloração roxa escura intensa, sendo geralmente agradáveis ao paladar (LORENZI; MATOS, 2002). No Brasil, o fruto é encontrado nos meses de dezembro a fevereiro e, geralmente é consumido *in natura*, porém esta fruta pode ser processada na forma de compotas, licores, vinhos, vinagre, geleias, tortas e doces, entre outras (VIZZOTO; PEREIRA, 2008).

Figura 11 – Aparência externa e interna do fruto e semente de *S. cumini*



Fonte: Adaptado de Vizzoto e Pereira, (2008).

A casca do caule, do fruto, da folha e da semente, inclusive diferentes partes que constituem a semente, são bastante estudados como alternativa de tratamento

do DM, sendo que diversos compostos fitoquímicos importantes e outros que ainda não tinham sido relatados foram identificados (Tabela 2) (HELMSTADTER, 2008; AYYANAR; SUBASH-BABU, 2012; SRIVASTAVA; CHANDRA, 2013).

Tabela 2 – Compostos fitoquímicos identificados nas diferentes partes de *S. cumini*

Partes da planta	Compostos fitoquímicos identificados
Raízes	Glicosídeo flavonoide e isoramnetina 3-O- rutinosídeo.
Casca do caule	Ácido betulínico, friedelin, epifriedelanol, ester de epifriedelanol, eugenina, ácido β -sitosterol, ácido β -sitosterol-D-glucosídeo, campferol-3-glicosídeo, ácido graxo, quercetina, canferol, miricetina, astragalina, ácido gálico e elágico, bergeninas, flavonoides, taninos galo e elagi.
Folhas	Flavonoides glicosídeos acilados, terpenoides, sitosterol, ácido betulíco, cratególico, gálico, clorogênico, cafeico, elágico, quercetina, miricetina, miricitina, catequina, epicatequina, metil galato, canferol, 3-O-acetil-L-ramnopiranosídeo, triterpenoides, rutina, quercitina, isoquercitrina, quercitrina, esterase, carboxilase galoil e taninos.
Flores	Canferol, quercetina, miricetina, isoquercitina, mirecetina-3-L-arabinosídeo, quercitina-3-D-galactoside, diidromiricetina, ácido oleanólico, ácido oleanólico acetil, eugenol triterpenoide A e B
Frutas	Rafinose, glicose, frutose, manose, frutose, ácido cítrico, málico, oxálico e gálico, antocianinas, taninos, delfinidina-3-gentiobioside, malvidina-3-laminaribioside, petunidina-3-gentiobioside, diglicosídeo cianidina, petunidina, malvidina, Fllc, proteína, gordura, fibra, carboidrato, cálcio, de magnésio, fósforo, ferro, potássio, cobre, enxofre, cloro, vitamina A, tiamina, riboflavina, niacina, ácido ascórbico, colina, ácido fólico, malvidina-3- glucosídeo e petunidina-3- glicosídeo.
Semente	Catequina, epicatequina, rutina, quercitina, isoquercitrina, quercitrina, canferol, clorofila, resinas, taninos flavonóides, fenólicos, ácido gálico, clorogênico, cafeico, elágico, ferrúlico, proteínas, cálcio, açúcar, sais minerais, vitamina C, antocianinas, monoterpenóides, rutina, quercitina, β -sitosterol ácidos graxo insaturados e saturados, glicosídeo jamboline, LH II, Sc2, micaminose, cuminoside, além de ser rico em fibras solúveis e insolúveis.
Óleos essenciais obtidos da folha, caule, sementes e frutas	α -pineno, canfeno, β -pineno, mirceno, limoneno, trans-O-cimeno, cis-Ocimeno, γ -terpineno, terpinoleno, acetato de bornil, α -copaeno, β -carofileno, α -hamuleno, γ -cadineno, δ -cadineno, trans-ocimeno, cis-ocimeno, β -mirceno, α -terpineol, acetato dihidrocarvil, butirato geranil, valerato terpinil, α -terpineol, β -cariofileno, α -humuleno, β -selineno, calacoreno, α -muurolol, α -santalol, cis-farnesol, ácidos láurico, mirístico, palmítico, esteárico, oleico, linoleico, maválico, esterúlico e vernólico.

Fonte: Ayyanar e Subash-Babu (2012); Srivastava e Chandra (2013).

Essas partes são utilizadas na forma de infusões, sucos, diferentes frações de extratos, além de participarem da formulação de compostos de ervas bastante

utilizados pela população indiana como Dianex®, DCBT, Diabecon®, Diabeta®, Hyponidd®, MTEC e Dihar®) (AYYANAR; SUBASH-BABU; IGNACIMUTHU, 2013; PAL et al., 2016). No sul do Brasil, a população faz infusões com as folhas e consome via oral no lugar da água, como tratamento para o DM (VIZZOTO; PEREIRA, 2008). Já no norte do país, nas comunidades Quilombolas, as folhas são usadas para, além do tratamento do DM, problemas renais (DA SILVA et al., 2012).

Desde a década de 1880 existem relatos de estudos, *in vitro* e *in vivo* (utilizando modelos desenvolvidos em animais e administração via oral em pacientes) sobre os benefícios da utilização dessa planta medicinal. Em 1900 as sementes de *S. cumini* já tinham sido adicionadas à literatura padrão na categoria de fitoterápico terapêutico (HARTWICH, 1897; MARTINDALE; WESTCOTT, 1901; ZÖRNIG, 1911; SCHADEWALDT, 1972; HELMSTADTER, 2008). Cabe ressaltar que *S. cumini* é uma das plantas com potencial interesse pelo SUS, sendo incluída no RENISUS recentemente.

Além das ações hipoglicemiante, hipolipidemiante, antimicrobiano, antifúngico, antiviral, antigenotóxico, anti-inflamatório, antiúlcero-gênico, cardioprotetor, antialérgico, antitumoral, quimioprotetor, radioprotetor, “scavenger” de RL, antioxidante, hepatoprotetor, antidiarreico, anti-infertilidade (AYYANAR; SUBASH-BABU, 2012; AYYANAR; SUBASH-BABUB; IGNACIMUTHU, 2013; SRIVASTAVA; CHANDRA, 2013), atualmente vários grupos de pesquisa têm dedicado estudos para evidenciar cientificamente novas ações farmacológicas das diferentes frações de extrato originadas das diferentes parte dessa planta (Tabela 3).

Tabela 3 – Ações farmacológicas de diferentes partes da planta *S. cumini*

(continua)

Partes da planta	Frações	Ação farmacológica
Casca do caule	Aquoso e metanólico	Hipoglicêmico, hipolipidêmico, antidiarreico, ação em inflamações locais, anti-helmíntico, antisséptico bucal, adstringente, aumento no número de eritrócitos e linfócitos T.
Folhas	Aquoso, metanólico, etanólico, butanólico e óleo essencial	Modulação do sistema purinérgico no DM 2, em eritrócitos submetidos à hiperglicemia, intoxicação aguda por etanol, anti-inflamatório, digestivo, adstringente, proteção contra toxicidade provocada por tetracloreto de carbono <i>in vivo</i> e atividade hipoglicemiante* <i>in vitro</i> ; Óleo essencial possui ação moluscicida e leishmanicida.

Partes da planta	Frações	Ação farmacológica
Frutas		Diminuição do volume urinário, albumina urinária, hipertrofia renal e glicose;
	Aquoso	Tratamento gastrointestinal, hipoglicêmico, antipirético e cardioprotetor; <i>In vivo</i> : aumenta os níveis de insulina em coelhos controle e diabético; <i>In vitro</i> : estimula a secreção de insulina das ilhotas de Langerhans e inibe a atividade da insulinase (66). Demonstra ser candidato, juntamente com as sementes, para o tratamento de complicações do DM.
	Metanólico, etanólico	Cardioprotetor em toxicidade induzida por pesticidas, Protetor contra danos no miocárdio provocados por isopreterenol.

*Dados sobre seu efeito hipoglicemiante são bastante contrários na literatura: as frações etanólica, butanólica e aquosa demonstraram efeito hipoglicêmico em camundongos, não demonstrando efeitos em camundongos normoglicêmicos. Já estudos envolvendo humanos com DM 1 e 2 e em modelo animal de DM, a administração de chá de folhas de *S. cumini*, parece não demonstrar esse efeito. Fonte: Helmstadter (2008); Ayyanar e Subash-Babu (2012); Srivastava e Chandra (2013); Ayyanar; Subash-Babu, Ignacimuthu (2013).

Os extratos de sementes (frações aquosa, hidroalcoólica, etanólica, clorofórmica, éter de petróleo e metanólica) são considerados os mais efetivos nos modelos de DM experimental desenvolvidos *in vivo*, atenuando/revertendo diversos parâmetros afetados por essa doença mesmo em curtos períodos de tratamento, tanto que um estudo revela efeitos hipoglicêmicos do extrato de semente após quatro dias do início do tratamento (CHATURVEDI et al., 2009; SRIVASTAVA; CHANDRA, 2013). A maioria dos estudos mencionados nas revisões bibliográficas publicadas sobre *S. cumini*, fez a utilização de extratos aquoso ou etanólico das sementes, nas doses de 100-200 mg/Kg, em modelo animal utilizando camundongo, rato e coelho, tendo a via oral como via administração (MAHAPATRA et al., 1985; KOHLI; SINGH, 1993; ZAMAN; SHARIQ, 1995; ASHOK; DARADKA, 2001; SHARMA et al., 2003; SHARMA et al., 2006; HELMSTADTER, 2008; AYYANAR; SUBASH-BABU, 2012; SRIVASTAVA; CHANDRA, 2013; AYYANAR; SUBASH-BABU; IGNACIMUTHU, 2013; SEN; CHAKRABORTY; DE, 2016). A escolha da utilização de um extrato aquoso em estudos científicos justifica-se pelo fato de que essa fração de extrato é isento de resíduos químicos provenientes de extração, além de ser mais próximo das formas comumente utilizadas pela população, o que pode vir favorecer a comprovação científica de conhecimentos etnofarmacológicos já existentes, bem como incentivar novos estudos.

O extrato aquoso de sementes (2,5, 5 e 7,5 g/Kg) demonstrou melhora em diversos parâmetros bioquímicos (perfil glicídico e lipídico, ureia, creatinina, enzimas hepáticas) parâmetros de estresse oxidativo (PRINCE; KAMALAKKANNAN; MENON, 1998). A fração aquosa (100 mg/Kg) foi capaz de diminuir a lipoperoxidação e aumentar a atividade de enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione (GSH) e glutathione peroxidase (GPx) em tecidos, além de ter ação sobre a α -glicosidase e α -amilase pancreática (PRINCE; KAMALAKKANNAN; MENON, 2003; REKHA; BALAJI; DEECARAMAN, 2008). Quando esse extrato foi liofilizado, esse foi capaz de aumentar o conteúdo de glicogênio hepático e muscular por aumentar as enzimas hexoquinase, glicoquinase e fosfofrutoquinase (GROVER; VATS; RATHI, 2000). O extrato aquoso da semente foi capaz de prevenir a hiperglicemia e hiperinsulinemia em ratos com DM tipo 2, além de exercer efeitos benéficos em pacientes portadores de DM tipo 2, como redução dos níveis do perfil lipídico (VIKRANT et al., 2001; SAFDAR; KHAN, 2006; SHARMA et al., 2012; SIDANA et al., 2016). Fibras isoladas do extrato aquoso demonstraram reduzir os níveis de glicose e de TOTG (PANDEY; KHAN, 2002).

Estudos publicados recentemente pelo nosso grupo demonstraram que tanto as folhas quanto as sementes de *S. cumini* demonstraram efeitos sobre as enzimas 5'NT e ADA no DM. O extrato de folha de *S. cumini* foi capaz de diminuir a atividade da enzima 5'NT em plaquetas e da ADA de membranas de eritrócitos de pacientes com DM 2 (DE BONA et al., 2010; DE BONA et al., 2011). Quando *S. cumini* e seus principais constituintes (ácido gálico, ácido clorogênico e rutina) foram testados em eritrócitos expostos a condições hiperglicêmicas, pôde-se observar que o efeito de inibição do extrato sobre a atividade da ADA é mais significativo do que a combinação dos compostos em estudo. Ainda, a insulina, a cafeína e o dipiridamol foram capazes de impedir o aumento da atividade da ADA *per se*, e o efeito inibidor causado pelo extrato permaneceu praticamente o mesmo após a combinação desse com insulina ou cafeína. No entanto, quando o extrato e o dipiridamol foram utilizados em associação, o dipiridamol atenuou o efeito de *S. cumini* na atividade na ADA, sugerindo um antagonismo/competição pelo mesmo local de ação (DE BONA et al., 2014). As sementes de *S. cumini* demonstraram impedir o aumento da atividade da ADA em rim e no soro de ratos submetidos a um modelo de DM de curto prazo (BITENCOURT et al., 2015). Nesse mesmo estudo é possível verificar que o extrato aquoso da semente não foi capaz de recuperar as

ilhotas β pancreáticas, mas recuperou o conteúdo de glicogênio hepático e impediu o aumento do Modelo de Avaliação da Homeostase (HOMA-IR) em ratos diabéticos tratados (BITENCOURT et al., 2015). Esses resultados reforçam a hipótese de que *S. cumini* poderia modular o estado hiperglicêmico através da captação de glicose periférica direta. Além disso, esse extrato demonstrou ação protetora sobre a toxicidade do metilmercúrio em ratos e também uma boa ação antifúngica e antimicrobiana *in vitro*, mas os estudos ainda são restritos (ABDALLA et al., 2011; DJIPA; DELMEE; QUETIN-LECLERCQ, 2000; SHAFIA et al., 2002; CHANDRASEKARAN; VENKATESALU, 2004; KUMAR et al., 2008a; SHAD et al., 2014).

Tanto o extrato aquoso quanto etanólico de sementes tiveram sua ação investigada frente a atividade de enzimas envolvidas no metabolismo dos carboidratos. Foi demonstrado um aumento na enzima hexoquinase e no conteúdo de glicogênio hepático, bem como uma diminuição na atividade da glicose-6-fosfatase em ratos (PRINCE; MENON; PARI, 1997). Essas frações também são consideradas agentes potentes contra o estresse oxidativo em modelos de DM *in vivo* (PRINCE; KAMALAKKANNAN; MENON, 2004; RAVI; SIVAGNANAM; SUBRAMANIAN, 2004b; AHMED; HUDED; MALIK, 2010). Ainda não existem estudos do extrato aquoso relacionado à ação anti-inflamatória e frente à oxidação de partículas de LDL, somente de fração etil acetato, metanólica e extrato de sementes rico em flavonoides (KUMAR; PADMANABHAN; KRISHANA, 2007; KUMAR et al., 2008b; SHARMA et al., 2008; JADEJA et al., 2012).

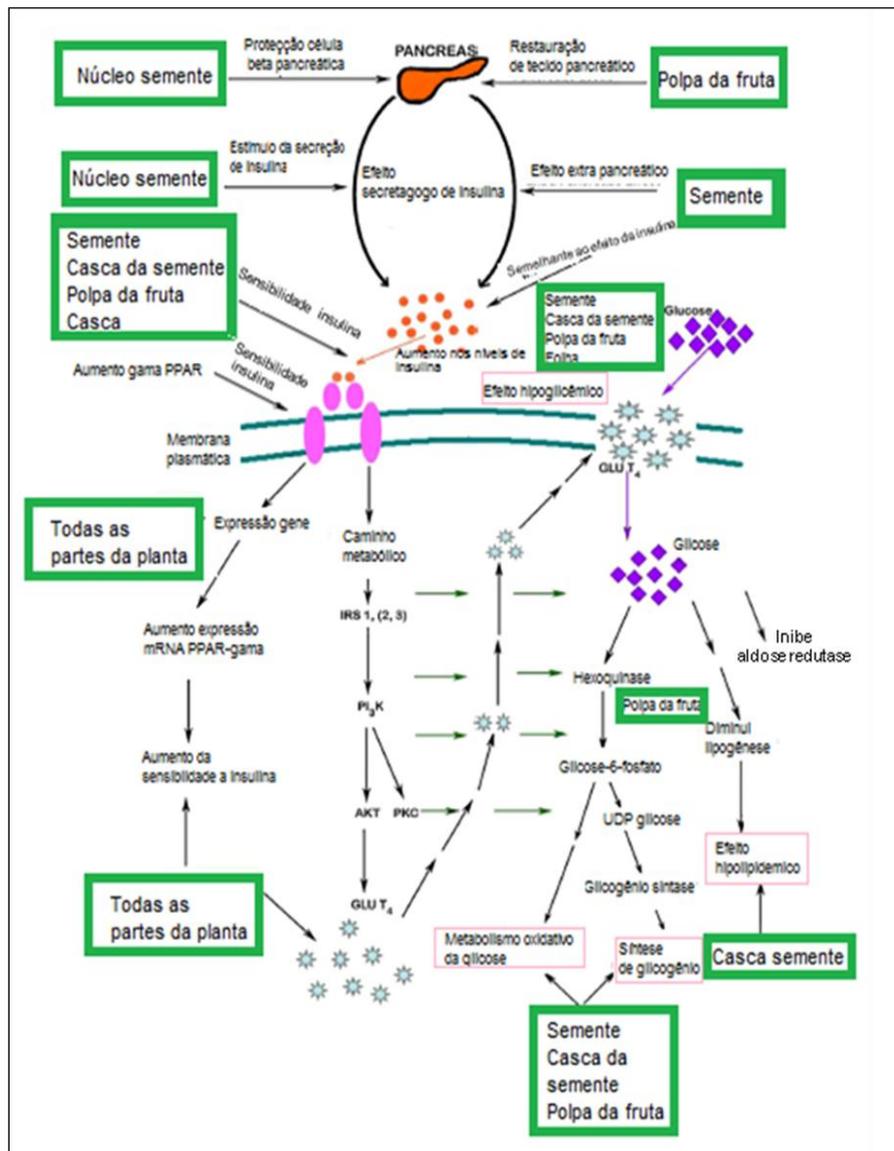
Alguns compostos como, micaminose, cuminoside, LH II, FIIc, que até o momento não haviam sido descritos nessa planta pela literatura, foram isolados e purificados nas frações de extratos de semente (KUMAR et al., 2008c; FARSWAN et al., 2009; SHARMA et al., 2011; TANWAR et al., 2010; TANWAR et al., 2011). Além disso, recentemente foi publicado uma análise proteômica, no qual os autores fornecem dados sobre 15 tipos de proteínas presentes nas sementes de *S. cumini* (BINITA et al., 2014). Esses dados podem vir a auxiliar no desenvolvimento de futuras pesquisas sobre um melhor aproveitamento das propriedades dessas sementes.

Ao realizar estudos sobre toxicidade de extrato de folha, semente e casca (de acordo com a “*Organization for Economic Co-operation and Development*”-OECD), foi observado que esses não demonstraram nenhum indício de toxicidade nos parâmetros analisados mesmo quando utilizando altas doses (5 g/Kg) (RAVI et al.,

2004c; YELE; VEERANJANEYULU, 2010; TRIPATHI; KOHLI, 2014). Diante dos dados descritos, são pertinentes os intensos esforços no desenvolvimento de opções terapêuticas alternativas a base de sementes de *S. cumini*, não somente para o DM, mas também para as suas complicações.

Em relação ao mecanismo de ação e possíveis interações de *S. cumini* no DM, bem como sobre outros fatores relacionados a essa doença, os mesmos ainda não estão completamente esclarecidos. Entretanto, já existem alguns mecanismos sugeridos (Figura 12), que incluem a diminuição na atividade de importantes enzimas envolvidas no metabolismo dos carboidratos, inibição da atividade insulinase extra-hepática, aumento/prevenção da depleção do conteúdo de glicogênio hepático e muscular, estimulação da secreção de insulina a partir das células β remanescentes e atividade mimética à insulina, que pode resultar na captação de glicose periférica direta. Além disso, a planta parece estimular enzimas envolvidas na utilização periférica de glicose. *S. cumini* também promoveu um aumento da atividade da catepsina B pancreática (converte pré-insulina em insulina), restauração da arquitetura das ilhotas pancreáticas, redução do estresse oxidativo e ação antioxidante, melhora da dislipidemia (inibe enzimas envolvidas no metabolismo do colesterol), regulação do transportador de glicose GLUT-4. Também já foi reportado que *S. cumini*, por apresentar resultados semelhantes aos de medicamentos padrão no tratamento do DM, pode ter uma ação semelhante às biguanidas e sulfonilureias (estimulação de células β -pancreáticas) (LAL; CHOUDHURI, 1968; BANSAL; AHMAD; KIDWAI, 1981; PEPATO et al., 2001; SINGH; GUPTA, 2007; HELMSTADTER, 2008; AYYANAR; SUBASH-BABU, 2012; SRIVASTAVA; CHANDRA, 2013; AYYANAR; SUBASH-BABU; IGNACIMUTHU, 2013; SAWANT et al., 2015). Contudo, os mecanismos de ação relacionados a complicações crônicas do DM ainda são pouco explorados.

Figura 12 – Mecanismos de ação propostos até o momento sobre a ação hipoglicêmica das principais partes de *S. cumini*



Fonte: Adaptado de Ayyanar; Subash-Babu e Ignacimuthu (2013).

1.6 NANOTECNOLOGIA

A nanotecnologia é uma ciência multidisciplinar que se dedica ao desenvolvimento de sistemas com dimensão nanométrica (inferior a 1 μm), apresentando um crescimento nas últimas décadas (PARVEEN; MISRA; SAHOO, 2012). Grande parte dos estudos têm se concentrado nas áreas relacionadas às ciências da saúde, onde é possível elencar algumas das diversas aplicações desses sistemas, como, a otimização da liberação de fármacos, a melhora da

biodisponibilidade oral e da distribuição ocular, pulmonar e parenteral, proteção de fármacos frente à degradação química e enzimática, aumento da atividade antioxidante de substâncias ativas incorporadas, melhora da solubilidade dos fármacos e de seus parâmetros farmacocinéticos (PALUMBO et al., 2002; PATRAVALE; DATE; KULKARNI, 2004; BILATI et al., 2005; YI et al., 2007; YANG; WIEDERHOLD; WILLIAMS, 2008; MÜLLER; GOHLA; KECK, 2011; GAO et al., 2012). As vantagens estão relacionadas principalmente ao tamanho reduzido das partículas, o que proporciona maior área superficial em relação ao volume, podendo acarretar no aumento da solubilidade e da dissolução de moléculas insolúveis ou pouco solúveis, e com isso um aumento da biodisponibilidade do fármaco (MERISKO-LIVERSIDGE; LIVERSIDGE, 2008).

Na literatura existem relatos de inúmeros fármacos que já foram incorporados em diferentes sistemas nanoestruturados como alternativa às formas farmacêuticas convencionais. Dentre as diversas classes que usam essa inovação tecnológica estão: anticoagulantes, anti-hipertensivos, antidepressivos, antitumorais, antibióticos, anti-inflamatórios, corticosteroides e antifúngicos (AHLIN et al., 2002; PANDEY et al., 2005; CAFAGGI et al., 2007; MATSUO et al., 2009; MARGULIS-GOSHEN et al., 2010; PALIWAL et al., 2012; KASSAMALI et al. , 2013; HAQUE et al., 2014).

Os carreadores nanoestruturados podem ser sintetizados a partir de diferentes matérias primas, bem como podem apresentar arranjos estruturais variados, dependendo da sua composição quali- quantitativa. Dentre os sistemas mais estudados é possível destacar: lipossomas, nanoemulsões, micelas, nanopartículas poliméricas (nanocápsulas e nanoesferas), nanopartículas magnéticas, nanopartículas lipídicas sólidas e carreadores lipídicos nanoestruturados (SCHAFFAZICK et al., 2003). Sendo assim, frente a uma aplicação farmacêutica, a seleção do sistema a ser utilizado no transporte de fármacos, bem como sua composição, está relacionada à ação desejada e à compatibilidade físico-química com o fármaco em questão. A seguir, o estudo será focado na classe das nanopartículas poliméricas (NP's), um dos dispositivos nanométricos mais explorados.

1.6.1 Nanopartículas poliméricas

As NP's são sistemas coloidais, de tamanho submicrométrico, compostas essencialmente por polímeros naturais ou sintéticos. Estas partículas devem possuir tamanho menor do que 1000 nm, sendo que a maioria varia entre 100-500 nm (QUINTANAR-GUERRERO et al., 1998a). De acordo com a composição qualitativa e organização a nível molecular as nanopartículas poliméricas diferenciam-se em: a) Nanocápsulas: são do tipo reservatório, constituídas por um núcleo líquido, podendo ser oleoso ou aquoso, envolto por uma parede polimérica. A molécula incorporada pode estar dissolvida ou dispersa no núcleo e/ou adsorvida à parede polimérica (KUMARI; YADAV; YADAV, 2010; RAO; GECKELER, 2011). b) Nanoesferas: são sistemas matriciais, compostas por uma matriz sólida de polímero, onde a substância carregada encontra-se molecularmente dispersa ou adsorvida na matriz polimérica (RAO; GECKELER, 2011).

O diâmetro médio da partícula é uma das propriedades mais importantes deste tipo de sistema, o qual pode ser modificado controlando parâmetros envolvidos no método de preparação tais como: temperatura, velocidade de evaporação do solvente, volume das fases, tipo e concentração do tensoativo e velocidade de homogeneização, em se tratando de métodos de emulsificação (RAO; GECKELER, 2011). O diâmetro reduzido das NP's confere inúmeras vantagens farmacocinéticas em comparação a outros sistemas que apresentam dimensões maiores, como a maior capacidade de transpor barreiras biológicas, uma vez que as fenestrações presentes nas barreiras endoteliais são da ordem de nanômetros, proporcionando maior interação com os componentes biológicos (MAINARDES et al., 2007; JAIN; ALEXIS et al., 2008; KUMAR; YADAV; KUMAR, 2010). Ainda, é possível controlar a liberação dos fármacos, há a possibilidade de vetorizar substâncias ativas a sítios de ação específicos e apresentam maior estabilidade comparada a outros sistemas. Além disso, estes sistemas devem ser biocompatíveis, podendo ou não ter a propriedade de biodegradabilidade (GUINEBRETIERE et al., 2002; LEITE et al., 2007; OURIQUE et al., 2008).

Os polímeros empregados nas formulações de NP's podem ser de origem sintética ou natural. Com relação aos polímeros naturais (gelatina, albumina e quitosana), seu emprego em estudos de nanotecnologia farmacêutica é reduzido em relação aos polímeros sintéticos, devido à limitação de manipulação de suas

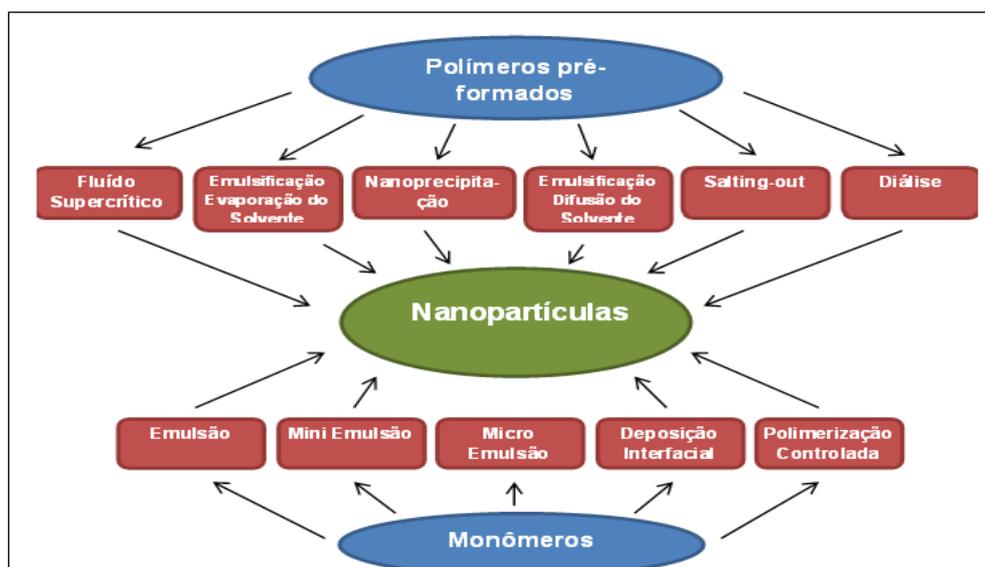
propriedades físico-químicas. A vantagem dos polímeros sintéticos está relacionada à versatilidade quanto à manipulação de sua organização monomérica, o que resulta em propriedades como degradabilidade e compatibilidade em meio biológico, além de apresentarem elevada pureza em comparação aos polímeros naturais (MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010). Dentre os polímeros sintéticos amplamente empregados (ácido poli (lático)- PLA, ácido poli (lático-co-glicólico)- PLGA), a poli (ϵ -caprolactona) (PCL) é um polímero bastante adequado para a preparação de NP's em função da sua elevada permeabilidade e por não apresentar toxicidade (MURTHY; WILSON; SY, 2012). A PCL é solúvel em solventes orgânicos, pode formar misturas miscíveis com vários polímeros, tem baixo ponto de fusão (59-64 °C) e carga negativa, devido aos grupamentos ésteres presentes em sua estrutura. Também, sofre degradação hidrolítica, possuindo degradação lenta, o que se torna uma vantagem para fármacos que necessitam de liberação lenta (SINHA et al., 2004).

Recentemente, a PCL vem sendo utilizada no desenvolvimento de NP's com produtos de origem natural, mas os estudos ainda são bastante restritos. Nanopartículas utilizando PCL e extrato de *Uncaria tomentosa*, em diferentes solventes orgânicos, apresentaram ótimos resultados relacionados com as características físico-químicas de NP's (RIBEIRO et al., 2013). A PCL foi utilizada para o desenvolvimento de nanopartículas contendo chá branco, apresentando manutenção da capacidade antioxidante do chá e uma boa capacidade de liberação de polifenóis em meio gástrico simulado (SANNA et al., 2015). O resveratrol conjugado com PCL e PEG foi capaz de melhorar a questão da baixa solubilidade e sua estabilidade em plasma de ratos (NG et al., 2015).

1.6.2 Métodos de obtenção: emulsificação/ evaporação do solvente

A possível modulação das variáveis envolvidas na obtenção de NP's pode conferir-lhes propriedades que atendam a finalidade de sua aplicação. Neste sentido, numerosas técnicas de preparação de NP's estão disponíveis (Figura 13), e baseiam-se na dispersão de polímeros pré-formados ou na polimerização a partir de monômeros de polímeros (RAO; GECKELER, 2011).

Figura 13 – Representação das técnicas de preparação de NP's



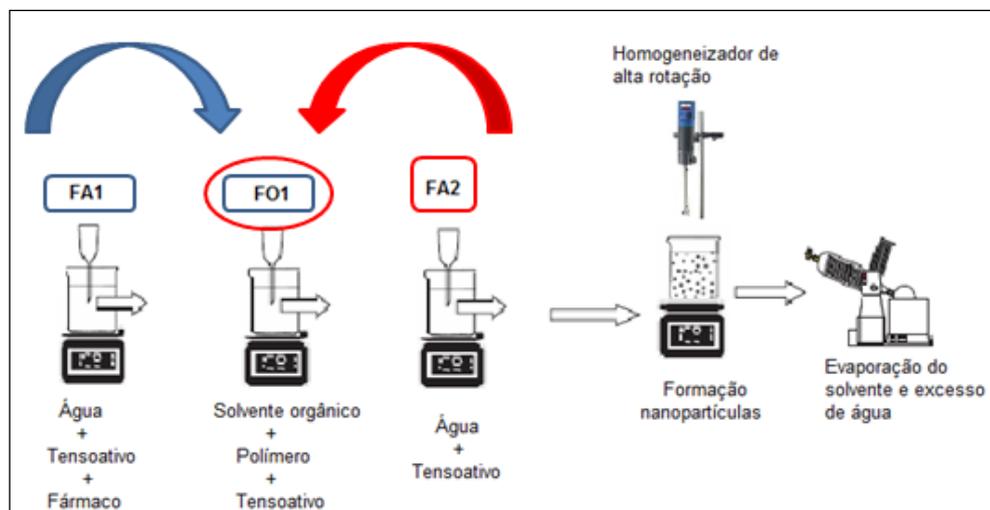
Fonte: Adaptado de Rao e Geckeler, (2011).

Dentre os diferentes métodos descritos na literatura para a preparação de nanopartícula poliméricas, neste trabalho foi empregado o método de emulsificação/evaporação de solvente (MORA-HUERTAS et al., 2012). Método esse que, além de ser bastante utilizado na formação de nanopartículas biodegradáveis, apresenta uma boa reprodutibilidade (QUINTANAR-GUERRERO et al., 1997). De fato, esse método inclui a utilização de polímero pré-formado que proporciona além de menor toxicidade, um maior controle das partículas formadas em relação aos métodos de polimerização *in situ*. Outra vantagem dessa técnica é a possibilidade de desenvolvimento de estruturas que carregam ativos hidrofílicos ou hidrofóbicos, devido à possibilidade de formação de emulsões duplas água-em-óleo-em-água (A/O/A) ou simples óleo-em-água (O/A), respectivamente (MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010). No entanto, como limitação apresenta impossibilidade de ser utilizado em fármacos não solúveis em solventes parcialmente miscíveis em água, além de agregação de polímero quando utilizado em alta concentração (QUINTANAR-GUERRERO et al., 1998a; QUINTANAR-GUERRERO et al., 1998b).

A técnica de emulsificação/evaporação de solvente consiste na formação de uma emulsão simples A/O; a partir de uma fase aquosa contendo o ativo e tensoativo de alto EHL (Tween 80), é vertida em uma fase contendo um solvente parcialmente miscível com a água (chamada de fase orgânica- FO, que pode ter como solvente o acetato de etila), contendo polímero e um tensoativo de baixo EHL

(Span 80). A essa emulsão primária, é adicionada outra fase aquosa (FA2) contendo água e tensoativo de alto EHL, formando uma emulsão múltipla A/O/A, que é levada a um homogeneizador de alta rotação com o intuito de reduzir o tamanho das partículas formadas. A emulsão múltipla é levada ao rotavapor para remoção do excesso de água e solvente orgânico (Figura 14). A técnica de emulsão múltipla é ideal para fármacos com características hidrossolúveis.

Figura 14 – Esquema de formação de emulsão múltipla para o método emulsificação/ evaporação solvente



Esquema de formação de emulsão múltipla para o método emulsificação/ evaporação solvente. FA1: Fase aquosa 1; FA2: Fase aquosa 2; FO1: Fase orgânica 1.

Fonte: Adaptado de Schaffazick et al. (2003).

1.6.3 Caracterização de sistemas nanoestruturados poliméricos

Os sistemas nanoestruturados poliméricos são sistemas de complexa caracterização físico-química, em função do aspecto coloidal das suspensões (SOPPIMATH et al., 2001). A caracterização físico-química dessas nanopartículas usualmente é realizada em termos de: análise de morfologia, tamanho e índice de polidispersão (IPD), potencial zeta (ζ), pH, teor total, eficiência de encapsulamento (EE%), interação fármaco e outros componentes e estabilidade da formulação ao longo do tempo de armazenamento (SCHAFFAZICK et al., 2003; KHAYATA et al., 2012).

A análise da morfologia de sistemas nanoestruturados pode ser realizada por microscopia eletrônica de varredura (MEV), microscopia eletrônica de transmissão

(MET) e microscopia de força atômica (MFA), que permitem não só a análise da forma, mas também a medida das dimensões de nanopartículas (DOMINGO; SAURINA, 2012).

O diâmetro médio das partículas, bem como sua polidispersidade pode ser determinado por diversas técnicas entre elas: espalhamento dinâmico de luz (*Dynamic Light Scattering*– DLS), análise de nanopartículas por rastreamento (*Nanoparticle tracking analysis*– NTA) e análise por difração laser (*Laser Diffraction Particle Size Analyzer*). A técnica de espalhamento dinâmico de luz (DLS) é a mais utilizada para determinar tamanho e distribuição de tamanho das partículas nanométricas, sendo a mais disseminada no meio científico e a que foi utilizada nesse trabalho. Trata-se de uma técnica onde é fornecida a média da intensidade de espalhamento de luz das partículas que estão em movimento browniano em um sistema de suspensão coloidal (GOLDBURG, 1999).

Potencial Zeta (ζ) reflete a carga de superfície das NP's e pode ser influenciado pela presença dos grupos funcionais dos polímeros e por alterações na interface. O potencial zeta é usado como indicativo de estabilidade, visto que valores elevados (em módulo) predizem uma repulsão entre as partículas, reduzindo assim a presença de fenômenos de agregação. A técnica mais utilizada para determinar a carga de superfície de NPs é a mobilidade eletroforética (SCHAFFAZICK et al., 2003; KIRBY; HASSELBRINK, 2004).

O pH é dependente dos componentes da formulação e do fármaco presente. A avaliação do pH é importante pois pode-se monitorar a estabilidade do sistema em relação ao tempo (SCHAFFAZICK et al., 2003). Degradação do polímero e/ou do fármaco podem ser visualizadas através da variação de pH (CALVO et al., 2011).

A eficiência de encapsulamento representa a divisão da fração de fármaco encapsulado sobre a fração de fármaco total adicionado ao sistema, multiplicado por 100 (MENDES et al., 2013). A dificuldade de se obter o valor resulta na separação da fração de fármaco livre da fração associada. A separação das duas frações é realizada na maioria dos casos por ultracentrifugação (TIYABOONCHAI; LIMPEANCHOB, 2007; KHAYATA et al., 2012), podendo ser também por ultrafiltração/centrifugação (LIU et al., 2008) e por agitação mecânica (ESSA; RABANEL; HILDGEN, 2011; SILVA et al., 2011).

1.6.4 Nanopartículas e a utilização de extratos de plantas medicinais

Novos sistemas de administração de fármacos podem auxiliar a superar os problemas associados à utilização de plantas medicinais, já que antes de chegar a circulação sanguínea, alguns constituintes das plantas com ação farmacológica podem ser inativados pelo pH ácido do estômago e outros podem ser metabolizados pelo fígado (FERRIZ; VINOVA, 2010; SARAF et al., 2015; GOPI et al., 2016). A quantidade resultante desses compostos não consegue atingir a corrente sanguínea de forma efetiva e, conseqüentemente, demonstrar pouco/nenhum efeito terapêutico (CONTE et al., 2016).

Dentre os novos sistemas de administração encontram-se as nanopartículas poliméricas que previnem o metabolismo de primeira passagem e aumentam o tempo de permanência na circulação devido ao seu tamanho reduzido (BONIFÁCIO et al., 2014). Ainda, outros fatores motivaram estudos com nanocarreadores contendo plantas medicinais, como o fato de que as frações de extratos utilizam solventes orgânicos, o que pode vir a ser inadequado para o uso humano, além da baixa adesão do paciente ao tratamento com as fitoformulações disponíveis e dos efeitos colaterais associados a medicamentos industrializados (BONIFÁCIO et al., 2014). Além disso, evidências mostram que muitas substâncias terapêuticas atuais têm ação de suprimir apenas os sintomas e acaba por ignorar os processos subjacentes da doença. Em contraste, muitos produtos naturais parecem abordar as muitas causas das doenças, produzindo resultados clínicos superiores. Atualmente, a comunidade científica tem se dedicado ao estudo de desenvolvimento de sistemas nanométricos utilizando extratos naturais principalmente em duas vias: além das NP's, a "green syntesis"- química verde (MITTAL et al., 2014).

Nos últimos anos, várias plantas medicinais e metabólitos secundários têm sido estudados com o intuito de desenvolver diferentes tipos de nanopartículas (principalmente nanopartículas poliméricas, lipossomas e micelas) com as mais diversas ações farmacológicas. A ação antitumoral é uma das mais visadas, justamente pelo fato de que muitos medicamentos anticarcinogênicos tiveram como precursores um produto de origem natural, além da possibilidade de redução dos conhecidos efeitos tóxicos (ANSARI; ISLAM; SAMEEM, 2012; BAKER et al., 2013).

S. cumini tem sido bastante utilizado no desenvolvimento de nanopartículas metálicas, por apresentar uma alta atividade contra radicais livres, por potencializar

a capacidade antioxidante da formulação, além de demonstrar suas demais ações farmacológicas nessa forma nanoparticulada (KUMAR; YADAV; KUMAR, 2010; KUMAR; YADAV, 2012; PRASAD et al., 2012; MITTAL et al., 2014).

Em relação ao desenvolvimento de NP'S, recentemente foi publicado um estudo onde foi verificado o efeito do extrato etanólico de sementes de *S. cumini* incorporado em nanopartículas de PLGA, em modelo de hiperglicemia induzida por arsênio. Testes realizados *in vitro*, utilizando células L6, e *in vivo*, utilizando ratos, demonstraram que essas nanopartículas poliméricas proporcionaram um melhor potencial de ação em parâmetros relacionados à hiperglicemia e estresse oxidativo, do que apenas a utilização do extrato bruto (SAMADDER et al., 2012).

A caracterização do extrato aquoso de *S. cumini* apresenta uma grande quantidade de compostos fenólicos e flavonoides, que requerem a formulação de um produto capaz de manter a integridade estrutural, até o consumo ou a administração, mascarar o sabor, aumentar biodisponibilidade e vetorizar para um alvo fisiológico (BITENCOURT et al., 2015). Nesse contexto, o encapsulamento do extrato torna-se uma alternativa vantajosa para alcançar esses objetivos.

1.6.5 Nanotoxicologia e modelos experimentais de toxicologia

A toxicidade das nanopartículas é um ponto bastante relevante na pesquisa científica. Devido ao tamanho nanométrico destas estruturas, pode ocorrer uma difusão facilitada entre os tecidos e células, sendo capaz de provocar um efeito tóxico bastante acentuado, podendo levar à morte. Inclusive, as características físico-químicas das nanopartículas podem facilitar não somente a entrada, mas também seu acúmulo nos organismos vivos (PASCHOALINO; MARCONE; JARDIM, 2010).

De modo geral, a biocompatibilidade, biodegradabilidade e toxicidade de novos nanomateriais devem ser evidenciadas. Devido ao pouco conhecimento sobre a nanotoxicologia e os efeitos da utilização de produtos de natureza nanotecnológica, a criação de leis específicas para ordenar a produção, distribuição e descarte de produtos que contenham esses materiais tem sido um desafio. Por esse motivo, é possível observar que pesquisadores têm usado como material de apoio o guia da OECD (2001), quando o objetivo do estudo é testar a toxicidade de

nanopartículas poliméricas com extrato vegetal (SONAJE et al., 2007; SILVA, 2011; BULCÃO et al., 2012; ZHANG et al., 2014).

Considerando a tendência atual de substituição dos testes toxicológicos em animais de laboratório, o modelo de *Artemia salina* tem sido bastante utilizado como um bioensaio de laboratório para desenvolver ensaios de toxicidade padrão (ATES et al., 2013a; ATES et al., 2013b). *A. salina* é a larva do camarão de água salgada, invertebrado da fauna dos ecossistemas aquáticos, que se reproduz com facilidade e rapidez, sendo que seus ovos, quando secos, podem ser conservados durante anos. O ensaio de toxicidade é rápido, de baixo custo, não requer equipamentos especiais e utiliza quantidades de amostras relativamente pequenas (MEYER et al., 1982).

O nível de toxicidade é dado através da estimativa da concentração letal média (CL₅₀), ou seja, a concentração capaz de causar a morte de metade das larvas de *A. salina* envolvidas no ensaio. Valores de CL₅₀ superiores a 1000 µg/mL para extratos de plantas são considerados não tóxicos. Resultados desse teste demonstraram ser bem correlacionados com a atividade citotóxica contra alguns tipos de tumores sólidos humanos, podendo ser utilizados como uma ferramenta para a pesquisa pré-*screening* de candidatos a novos fármacos (KPOVIESSI et al., 2012; SANTOS et al., 2010). Além disso, estudos já demonstraram uma boa correlação entre a CL₅₀ obtida no teste *A. salina* e DL₅₀ em camundongos (toxicidade aguda, via oral) (LOGARTO et al., 2011). Apesar de todas as vantagens descritas, ainda tem sido pouco utilizado como teste toxicológico para sistemas nanoparticulados.

Além desse, existem diversos testes utilizando modelos alternativos aos animais, como teste de hemólise, fragilidade osmótica e cultura celular (TAI et al., 2011; PAULA et al., 2012; GHOSHA; CHAKRABORTYB; MUKHERJEEA, 2013; SIGWARD et al., 2013; THASNEEM et al., 2013). No entanto modelos de toxicidade *in vivo* ainda são bastante empregados, uma vez que consideram o metabolismo do organismo como um todo. Existem dois principais protocolos a serem utilizados, a toxicidade aguda e a de doses repetidas (crônica), de acordo com OECD 2001 e Resolução Nº 90 de 2004 (Guia para a realização de estudos de toxicidade pré-clínica de fitoterápicos) da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2004).

No teste de toxicidade aguda, OECD 423, os animais (n=6 por grupo) recebem uma única dose da substância a ser testada (mesma via proposta para o

uso do produto), em concentrações diferentes, após um período de 12 h de jejum. São avaliados parâmetros como mudança no peso, mortalidade, mudanças no padrão de comportamento como agressividade, recusa de alimentos ou água, diarreia, salivação, secreção dos olhos e ouvidos, respiração ruidosa, alterações na atividade locomotora, piloereção, tremores, convulsões, coma, lesão, dor ou qualquer sinal da doença/desconforto em cada grupo, na primeira hora após a administração, perfazendo um total de 14 dias (MALATHI; GOMAZ, 2008; ROSIDAH et al., 2009). Após esse período, os animais são eutanasiados e são realizadas determinações que possam dar indicativos sobre a toxicidade como: análises bioquímicas em soro (alanina aminotransferase (AST), aspartato aminotransferase (ALT), proteína, glicose, colesterol total, triglicerídeos, ureia e creatinina), hemograma completo, peso relativo de tecidos e avaliação de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) em tecidos mais susceptíveis à toxicidade, como cérebro, baço, rins e fígado (MALATHI; GOMAZ, 2008; ROSIDAH et al., 2009).

Já no teste de toxicidade crônica, OECD407, são observados e realizados os mesmos testes descritos acima, no entanto, os animais recebem doses repetidas, durante 28 dias, de diferentes concentrações dos compostos em estudo, além de realizar o teste em pelo menos duas espécies diferentes como roedores (n=10) e não roedores (n=3).

Considerando o fato de que a incidência e prevalência do DM estão alcançando proporções epidêmicas, inclusive no Brasil e que o desenvolvimento e a progressão de complicações do DM, além de estarem acometendo um número cada vez maior de pacientes, podem estar relacionados com disfunções inflamatórias e estresse oxidativo, se faz necessário a busca por inovações tecnológicas que possam otimizar ações farmacológicas de plantas medicinais de uso popular, como o *S. cumini* em diferentes modelos experimentais que possam contribuir para o conhecimento de suas propriedades bioquímicas, farmacológicas e toxicológicas. Sendo assim, esse estudo reveste-se de mérito, além de fundamentar as bases de inovação.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver e caracterizar uma formulação de nanopartículas poliméricas contendo extrato aquoso da semente de *S. cumini*, bem como verificar parâmetros bioquímicos relacionados à toxicidade e demais efeitos sobre complicações do DM *in vitro* e *in vivo*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.2.1 Em extrato aquoso de sementes de *S. cumini* (ASc) e em nanopartículas poliméricas contendo o extrato (NPASc)

- a) Realizar a caracterização fitoquímica do ASc, através de análise por CLAE-DAD;
- b) Desenvolver NPASc e realizar sua caracterização fitoquímica e físico-química;
- c) Avaliar a capacidade antioxidante através da avaliação do poder redutor pelo método de ferro (FRAP) e scavenging de DPPH, *in vitro*;
- d) Verificar a propriedade antioxidante/antiaterogênica frente a partículas de LDL oxidadas por AAPH, *in vitro*;
- e) Determinar a atividade antifúngica através da determinação da Concentração inibitória mínima (CIM) frente a espécies de *Candida spp.*

2.2.2 Estimar a toxicidade de ASc, NPb e NPASc

- a) Avaliar a letalidade pelo teste de *A. salina*;
- b) Verificar parâmetros de toxicidade gerais como consumo de água e comida, ganho de peso, peso relativo dos órgãos (rim, fígado, baço) e alterações de comportamento em modelo de toxicidade aguda em ratos;
- c) Avaliar marcadores séricos bioquímicos da função hepática (enzimas transaminases), renal (ureia e creatinina) e proteínas totais, assim como o perfil glicídico e lipídico (níveis de colesterol total e triglicerídeos) em modelo de toxicidade aguda em ratos;

- d) Realizar perfil hematológico completo em modelo de toxicidade aguda em ratos;
- e) Quantificar níveis de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) em tecidos hepático, renal, córtex cerebral e baço em modelo de toxicidade aguda em ratos.

2.2.3 Em modelo animal de DM seguido de infecção por *C. albicans* e tratados com ASc e NPASc, avaliar

2.2.3.1 Em soro e urina

- a) Atividade das enzimas 5'NT, NTPDase, ADA, DPP-IV, níveis de NO e AOPP, lipoperoxidação, citocinas, perfil glicídico (níveis de glicose, frutossamina e insulina), perfil lipídico (colesterol total e triglicerídeos), proteínas totais e creatinina em soro;
- b) Níveis de glicose, proteínas totais em urina e atividade da enzima NAG na urina.

2.2.3.2 Em células

- a) Atividade das enzimas 5'NT, NTPDases, ADA e níveis de NO em plaquetas;
- b) Atividade das enzimas ADA, DPP-IV e AChE em linfócitos.

2.2.3.3 Em tecidos

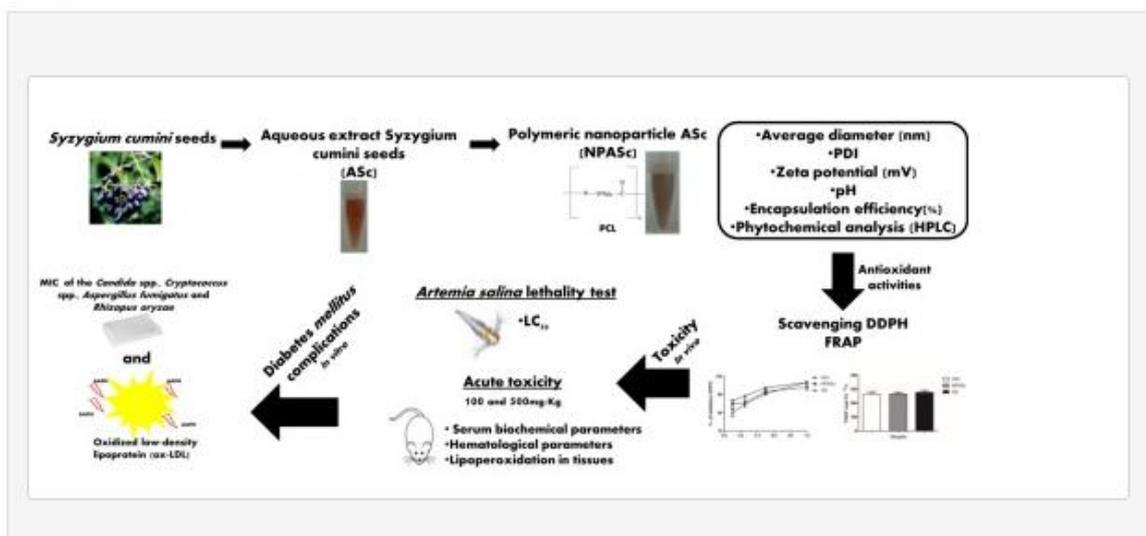
- a) Atividade da enzima ADA, lipoperoxidação e níveis de NO e AOPP em tecidos hepático, renal e pancreático;
- b) Quantificação de unidades formadoras de colônias (UFC) em tecido renal e hepático;
- c) Atividade da enzima NAG em tecido renal.

3 ARTIGOS

3.1 A NEW BIODEGRADABLE POLYMERIC NANOPARTICLE FORMULATION CONTAINING *SYZYGIUM CUMINI*: PHYTOCHEMICAL PROFILE, ANTIOXIDANT AND ANTIFUNGAL ACTIVITY AND *IN VIVO* TOXICITY

Artigo publicado no periódico **Industrial Crops and Products**

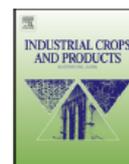
Graphical abstract





Contents lists available at ScienceDirect

Industrial Crops and Products

journal homepage: www.elsevier.com/locate/indcrop

A new biodegradable polymeric nanoparticle formulation containing *Syzygium cumini*: Phytochemical profile, antioxidant and antifungal activity and *in vivo* toxicity



Paula E.R. Bitencourt^a, Luana M. Ferreira^b, Lariane O. Cargnelutti^a, Laura Denardi^c, Aline Boligon^b, Michelli Fleck^a, Ricardo Brandão^a, Margareth L. Athayde^b, Letícia Cruz^b, Régis A. Zanette^d, Sydney H. Alves^c, Maria B. Moretto^{a,*}

^a Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

^b Departamento de Farmácia Industrial, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

^c Departamento de Microbiologia, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

^d Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Farmacologia e Terapêutica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 25 June 2015
Received in revised form 18 December 2015
Accepted 5 January 2016
Available online 29 January 2016

Keywords:

Nanotechnology
Aqueous extract
Oxidative stress
Diabetes complications
Toxicity

ABSTRACT

Syzygium cumini seeds were used for the preparation of an aqueous extract (ASc) and of polymeric nanoparticles containing ASc (NPASc) with the aim to evaluate and compare their *in vitro* efficacy against the complications of Diabetes mellitus (DM) and the *in vivo* toxicity. NPASc were produced by the emulsification/evaporation solvent technique, employing poly-ε-caprolactone, a biocompatible polymer. The antioxidant activity of both ASc and NPASc was evaluated by the scavenging of DPPH radicals and by the ferric reducing antioxidant power assay (FRAP). The *in vitro* efficacy of both formulations against oxidized LDL particles (ox-LDL) and fungal species was also assessed.

NPASc presented properties compatible with nanometric systems, and chromatogram analysis demonstrated that the composition of *S. cumini* was not affected. The antioxidant properties of the extract were also maintained in the new formulation. Indeed, both formulations showed high protection against ox-LDL. The antifungal activity of NPASc against *Candida guilliermondii* and *Candida haemulonii* was superior to that observed for the ASc. No acute toxicity was observed in the *Artemia salina* lethality assay and in rats. These findings highlight the possibility of expanding the use of *S. cumini* to ameliorate the chronic complications of DM. The lack of toxicity of the nanoparticles indicates that NPASc might be a safe candidate for drug delivery systems.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Diabetes mellitus (DM) is a heterogeneous group of metabolic disorders mainly characterized by hyperglycemia which affects over 10% of the world population, representing a fast growing medical problem (ADA, 2013; SBD, 2015). Several studies have demonstrated that diabetes-induced oxidized low-density lipoprotein (ox-LDL) or its products can affect several components of

the atherogenic process, including lesion initiation and thrombosis (Younis et al., 2009; Jin et al., 2011). Moreover, diabetes-mediated changes in immune status may render patients more prone to infections such as those caused by fungi (Delamaire et al., 1997; Sun et al., 2012; Fraga-Silva et al., 2015). The most commonly fungal pathogens found in diabetic patients are *Candida* spp., *Cryptococcus* spp., *Aspergillus fumigatus* and *Rhizopus oryzae* (Kauffman et al., 2011). DM requires continuing medical care, ongoing patient self-management and support to help patients optimize metabolic control, prevent and manage complications in order to improve and maximize their quality of life. There are several drugs of plant origin containing substantial amounts of antioxidant substances such as flavonoids with fewer side effects, and that can be useful for the management of DM (Ayyanar et al., 2013). Therefore, it is

* Corresponding author at: Department of Clinical and Toxicological Analysis, Health Science Center, Federal University of Santa Maria (UFSM), Roraima Avenue 1000, 97105-900 Santa Maria, RS, Brazil.
E-mail address: beatriz.moretto@yahoo.com.br (M.B. Moretto).

necessary to develop a traditionally adapted, but more advanced, complementary and alternative drug formulation to treat the several symptoms of DM and its complications.

The use of nanotechnology for medical therapy has dramatically increased over the past few decades, especially because this technology has the potential to improve treatment strategies against many important diseases (Pautler and Brenner, 2010). However, the use of plant extracts is much less reported due to the complexity of this type of biological matrix (Ribeiro et al., 2015). Among the nanostructured systems, polymeric nanoparticles are one of the most promising nanocarriers being developed. Manufactured with a mean diameter in the range of 10–1000 nm, polymeric nanoparticles are mainly composed of synthetic biodegradable polymers such as the poly- ϵ -caprolactone (PCL). Indeed, studies have reported PCL as the polymeric matrix of choice because of its low cost, biocompatibility and US Food and Drug Administration approval (Rao and Geckeler, 2011; Woodruff and Hutmacher, 2010).

Nanodosage forms can provide a number of advantages for herbal drugs, including enhancement of solubility and bioavailability, reduction of toxicity, increase of therapeutic index, improvement of stability, controlled delivery and protection from physical and chemical degradation. At the same time, the toxicity of nanoparticles is a very important point in scientific research due to the nanometer size of these structures that can provide facilitated diffusion between tissues and promote their accumulation (Faddeh and Garcia-Bennett, 2010). Nonetheless, a limited number of studies have been conducted on this issue.

Herbal drugs have gained popularity both in developing and developed countries because of their natural origin and lesser side effects. *Syzygium cumini* (L.) Skeels is an evergreen tropical tree of the Myrtaceae family. All parts of the plant have been widely used as an alternative medicine in various diseases. Seeds in particular are an important source of phenolic and flavonoid compounds, therefore possessing a promising role in regulating DM (Ayyanar et al., 2013). In fact, recent studies from our group have shown that the extract obtained from different parts of *S. cumini* demonstrated beneficial effects against DM *in vitro* and *in vivo* (De Bona et al., 2010, 2011, 2014; Bitencourt et al., 2015).

Considering the potentialities of nanoparticles and the paucity of data on the use of *S. cumini* against the chronic complications of DM, this study was aimed to develop PCL nanoparticles containing an aqueous seed extract of *S. cumini* (ASc) and to evaluate their antioxidant and antifungal activities *in vitro* and toxicity *in vivo*.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

Ethyl acetate, methanol, acetonitrile and acetic, gallic, chlorogenic, caffeic and ellagic acids were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Polysorbate 80 (Tween 80[®]), PCL, Sorbitan monooleate (Span 80[®]), 2,2'-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH), 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), thiobarbituric acid, catechin, epicatechin, quercetin, isoquercitrin, quercitrin, kaempferol and rutin reference standards were acquired from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). All other chemicals were of analytical grade and were obtained from standard commercial suppliers.

2.2. Plant material and extract preparation

S. cumini seeds were collected at Santa Maria, Rio Grande do Sul, southern Brazil (29°43'22"S and 53°43'47"W). They were identified by the Laboratory of Botanic and Pharmacognosy of the Federal

University of Santa Maria (UFSM) and a voucher specimen (SMDB 14.001) was deposited in the herbarium of the Institution. Eighty grams of the seed powder were extracted with 400 mL of distilled water for 1 h under reflux (Prince et al., 1998). The yield of the extract was 6.2% w/w.

2.3. HPLC-DAD phytochemical analysis

Reverse phase chromatography analyses were carried out under gradient conditions using a C₁₈ column (4.6 mm × 150 mm, 5 μm). The mobile phase was composed of water containing 2% acetic acid (A) and acetonitrile (B), and the composition gradient was: 13% of B until 10 min and changed to obtain 20%, 40%, 50%, 60%, 70% and 100% B at 20, 30, 40, 50, 60 and 80 min, respectively. The ASc was analyzed at 10 mg/mL concentration. The presence of 11 antioxidant compounds was investigated, namely gallic, chlorogenic, caffeic and ellagic acids and catechin, epicatechin, quercetin, quercitrin, isoquercitrin, kaempferol and rutin. Identification of these compounds was performed by comparing their retention time and UV absorption spectrum with those of commercial standards. The flow rate was 0.7 mL/min, the injection volume 50 μL and the wavelength was 254 nm for gallic acid, 280 nm for catechin and epicatechin, 327 nm for chlorogenic, ellagic and caffeic acids and 365 nm for rutin, isoquercitrin, quercitrin, kaempferol and quercetin. The samples and mobile phases were filtered through 0.45 μm membrane filter (Millipore) and then degassed by ultrasonic bath prior to use. The chromatography peaks were confirmed by comparing their retention time with those of reference standards and by DAD spectra (200–500 nm). Calibration curves for each substance were: gallic acid, $Y = 13973x + 1095.6$ ($r = 0.9993$); catechin, $Y = 11840x + 1178.2$ ($r = 0.9998$); epicatechin, $Y = 12542x + 1412.7$ ($r = 0.9991$); chlorogenic acid, $Y = 11864x + 1252.8$ ($r = 0.9994$); caffeic acid, $Y = 13178x + 1267.2$ ($r = 0.9999$); ellagic acid, $Y = 12681x + 1164.9$ ($r = 0.9998$); rutin, $Y = 13077x + 1265.4$ ($r = 0.9992$); isoquercitrin, $Y = 11927x + 1306.2$ ($r = 0.9996$); quercitrin, $Y = 13470x + 1293.7$ ($r = 0.9994$) and quercetin, $Y = 12693x + 1176.0$ ($r = 0.9997$). All chromatographic operations were carried out at ambient temperature and in triplicate. The limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) were calculated based on the standard deviation of the responses and the slope using three independent analytical curves. LOD and LOQ were calculated as 3.3 and $10\sigma/S$, respectively, where σ is the standard deviation of the response and S is the slope of the calibration curve.

2.4. Preparation of the nanoparticle suspension containing ASc (NPASc)

Nanoparticles were prepared by the emulsification/evaporation solvent method described by Quintanar-Guerrero et al. (1998), with modifications. Briefly, 10 mg of ASc were dissolved in an aqueous phase containing 1% polysorbate 80. An organic phase (ethyl acetate) containing 1% PCL and 1% sorbitan monooleate was also prepared. Both phases remained under moderate stirring at 40 °C. After 60 min, the aqueous phase was added in the organic phase, forming the primary emulsion. This emulsion was kept under strong magnetic stirring during 20 min and then a second aqueous phase containing 2% polysorbate 80 was added in the primary emulsion. After 20 min, the emulsion was transferred to a high shear mixer (Marconi, MA-102/PLUS) and stirred at 6000 rpm during 10 min. Then, ethyl acetate was eliminated and water was concentrated by evaporation under reduced pressure to achieve 10 mL final volume. For comparison purposes, blank nanoparticles (NPb) were prepared.

2.5. Characterization of nanoparticle suspensions

2.5.1. Particle size analysis, polydispersity index, pH and zeta potential

The mean droplet size and polydispersity index (PDI) ($n=3$) were measured at 25 °C by photon correlation spectroscopy (Zetasizer Nanoseries, Malvern Instruments, UK) after diluting the samples in ultrapure water (1:500). Zeta potential analyses (ZP) were performed using the same instrument after the samples were diluted in 10 mM NaCl (1:500).

The pH values of nanoparticles were determined by directly immersing the electrode of a calibrate potentiometer in the formulations. Measures were performed at room temperature (25 ± 2 °C) in triplicate.

2.5.2. HPLC-DAD phenolic content analysis and encapsulation efficiency

The total phenolic content present in NPASc ($n=3$) was determined by diluting an aliquot of the sample in 10 mL acetonitrile followed by sonication for 10 min. Samples were filtered through a 45 μ m membrane and injected into the HPLC system according to the method described before. For the determination of encapsulation efficiency, an aliquot of each sample was placed in a 10,000 MW centrifugal device (Amicon® Ultra, Millipore) and free phenolic compounds were separated from the nanostructures by ultrafiltration at 2200 g for 10 min. The difference between the total and the free concentrations of compounds, determined in the nanostructures and in the ultrafiltrate, respectively, was calculated as the encapsulation efficiency (EE%), according to the equation: $EE = \frac{\text{Total content} - \text{Free content}}{\text{Total content}} \times 100$.

2.6. Antioxidant activities

2.6.1. Free radical scavenging ability by the use of a stable DPPH radical

DPPH free radical scavenging activity of the formulations was performed as reported earlier (Joshi et al., 2011). Asc, NPb, NPASc and gallic acid at the concentrations of 100, 250, 500 and 1000 μ g/mL, respectively, were added to an ethanolic DPPH solution (6 mM). The mixture was incubated at room temperature for 30 min before the change in absorbance at 518 nm was observed and percent inhibition was calculated.

2.6.2. Ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay

The FRAP assay was used to measure the total antioxidant power of Asc, NPASc, NPb and gallic acid. The assay was based on a published procedure (Benzie and Strain, 1996). The results were presented as μ M Fe^{2+} /L of compounds.

2.7. In vitro biological activities

2.7.1. LDL separation, preincubation and oxidation

LDL was isolated from fresh human serum ($n=6$) by the precipitation method described previously (Ahotupa et al., 1998). Protein concentration in LDL solution was determined according to Peterson (1977). LDL isolated samples (1 mg of protein/mL) were incubated with or without Asc, NPASc, NPb and gallic acid (100, 250, 500 and 1000 μ g/mL) at 37 °C for 30 min. At the end of incubation samples were oxidized in the presence of 20 μ M AAPH for 4 h at 37 °C to produce ox-LDL. The oxidation was estimated by measuring the production of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) (Okawa et al., 1979). The results were expressed in nmol of malondialdehyde (MDA)/mg of protein. This study was approved by the Ethic Committee of UFSM (number 0049.0.243.000-08).

2.7.2. In vitro antifungal activity

Antifungal activity of Asc, NPASc, NPb and gallic acid was evaluated against *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Candida guilliermondii*, *Candida haemulonii*, *Candida tropicalis*, *Cryptococcus* sp., *Aspergillus fumigatus* and *Rhizopus* sp. Fungi were grown at 35 °C for 48 h on Sabouraud dextrose agar. Inoculum suspensions were prepared using sterile and, after mixing in a vortex, a cell density of a 0.5 McFarland scale was adjusted spectrophotometrically ($\lambda=530$ nm). The broth microdilution assay was carried out following the M27-A3 (CLSI, 2007) and M38-A2 (CLSI, 2008) standard protocols for yeast and filamentous fungi, respectively. *Candida parapsilosis* (ATCC 22019) and *Candida krusei* (ATCC 6258) were used as quality control organisms. The minimum inhibitory concentration (MIC) was defined as the lowest concentration at which no visual growth was observed compared to the positive control wells (cells under optimal growth conditions) after 48 h of incubation at 37 °C. The assays were carried out in duplicate in two different days.

2.8. In vivo preliminary toxicity assays

2.8.1. Artemia salina lethality test

Different concentrations of the compounds were evaluated for toxicity using the *Artemia salina* test (Meyer, 1982). Briefly, dried shrimp eggs were obtained in saline medium (35 g of sea salt, pH 8), under controlled conditions of aeration and lighting. After 24 h of hatching, 10 larvae were transferred to 10 mL vials containing the Asc/NPASc/NPb dilutions or saline (control). Each concentration was evaluated in duplicate.

2.8.2. Acute toxicity in rats

Male adult albino Wistar rats (150–200 g) were randomly divided into seven groups ($n=6$): a control group that received water and six groups that were treated by gavage with a single dose (10 mg/mL/Kg body weight) of the concentrations of 100 or 500 mg/mL of Asc, NPASc or NPb (Zhang et al., 2014; with modifications). Tap water and a standard pellet diet were provided *ad libitum* throughout the experiment, except for the short fasting period where the drinking water was in free access but no food supply was provided 12 h prior to the treatment. General observations as mortality, behavioral pattern changes such as aggressiveness, food or water refusal, diarrhea, salivation, discharge from eyes and ears, noisy breathing, changes in locomotor activity, piloerection, tremors, convulsion, coma, injury, pain or any signs of illness in each treated group were monitored continuously for 1 h after dosing, periodically during the first 24 h (with special attention given during the first 4 h), and daily thereafter for a total of 14 days. Rats were weighed on days 1, 7 and 14 after treatment and food and water consumptions were measured daily. On the 15th day of experiment the rats were anesthetized with isoflurane and euthanized.

The cerebral cortex, spleen, liver and kidney of all animals were observed macroscopically *in situ*, based on the position, color, shape, size and consistency of the organs. Body weight and weight of the organs were measured and recorded. The relative organ weight of each animal was then calculated according to the equation: $\text{Relative organ weight} = \frac{\text{Absolute organ weight}}{\text{Body weight of the rat on the day of euthanasia}} \times 100\%$.

The animals were used according to the guidelines of the Committee on Care and Use of Experimental Animal Resources of UFSM, Brazil (number 074/2014). All efforts were made to minimize the number of animals used and their suffering.

Blood samples were collected by cardiac puncture into tubes with EDTA for hematological analysis. White blood cells count (WBC), red blood cells count (RBC), hemoglobin concentration (Hb), hematocrit (Ht), red blood cell distribution width (RDW), mean corpuscular volume (MCV), mean corpuscular hemoglobin (MCH),

Table 1
Physicochemical characteristics of the nanoparticle suspensions.

	Average diameter (nm)	PDI	Zeta potential (mV)	pH
NPb	191 ± 6.21	0.205 ± 0.02	-9.90 ± 0.69	6.5 ± 0.53
NPASc	196 ± 8.5	0.198 ± 0.03	-15.11 ± 1.81	4.7 ± 0.44

Data are mean ± S.D. (n = 3). PDI, polydispersity index; NPb, blank nanoparticles; NPASc, nanoparticle suspension containing *Syzygium cumini* aqueous seed extract.

mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC) and platelet and differential leukocyte counts were analyzed. Hematological analyses were performed using a fully automated hematological analyzer (KX-21N, Sysmex, Japan).

Serum was collected and analyzed for the following biochemical parameters: alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), protein, glucose, total cholesterol, triglycerides, urea and creatinine. Measurements of biochemical parameters were performed using commercial kits (Labtest, Minas Gerais, Brazil).

Samples of cerebral cortex, spleen, liver and kidney tissues were rapidly dissected, weighed and placed on ice. The tissues were immediately homogenized in 10 mM Tris-HCl, pH 7.4 (1/10 w/v). The homogenates were centrifuged at 4000 × g at 4 °C for 10 min to yield a low-speed supernatant (S1) that was used for the determination of lipoperoxidation by a modification of the method of Buege and Aust (1978). Calculations were made based on standard curves and presented as nmol MDA/mg of protein.

2.9. Statistical analysis

The analyses were performed using Statistica for Windows, version 6.0 (StatSoft Inc., OK, USA). Data were analyzed using one way ANOVA followed by Duncan multiple range test and presented as mean ± standard error of mean (S.E.M.). A value of $p < 0.05$ was considered statistically significant for all analyses. In the *A. salina* lethality test, the number of dead larvae was counted after 24 h and used to calculate the 50% lethal concentration (LC₅₀) by trimmed Spearman–Kärber analysis.

3. Results and discussion

3.1. Characterization of nanoparticle suspensions

Nanoparticle systems have been considered promising carriers of therapeutic drugs and the application of these particles as carriers of natural compounds has been studied over the past few years. The results of the physicochemical characterization of the double emulsion/solvent evaporation method for the development of NPb and NPASc are observed in Table 1. The nanoparticles showed average diameters lower than 200 nm and PDI less than 0.2, which indicates a narrow distribution. The zeta potential was negative, a characteristic of nanoparticles prepared with polysorbate 80 and PCL. Moreover, the presence of the phenolic compounds could have contributed to the negative zeta potential, since NPASc was more acid than NPb. Besides the characteristics compatible with colloidal suspensions, NPASc presented homogeneous and milky appearance.

The chromatographic profiles of ASc and NPASc showed that the encapsulation did not alter the phenolic composition of the ASc (Fig. 1). Moreover, the results of the EE showed that almost 100% of the phenolic compounds were entrapped within the particle. The development of aqueous plant extract-loaded nanoparticles presenting high entrapment efficiencies for all the present compounds could be considered a real challenge, particularly if hydrophilic active principles are involved because water soluble substances

tend to partition in the aqueous phase and not in the polymeric particles (Ribeiro et al., 2013). As far as we know, this is the first attempt to prepare nanoparticles with an antihyperglycemic hydrophilic extract of plant origin using the multiple emulsion approach.

3.2. Antioxidant activities

3.2.1. DPPH and FRAP

Besides the known hypoglycemic activity of extracts obtained from different *S. cumini* plant parts, several studies have drawn attention to the high antioxidant activity of crude extracts, which appears to be associated with the efficacy of this medicinal plant in the treatment of diverse pathologies (Helmstadter, 2008; Ayyanar et al., 2013). There are few reports where different fractions of *S. cumini* have been used in the synthesis of silver, gold and poly-D,L-lactide-co-glycolide nanoparticles (Kumar et al., 2010; Kumar and Yadav, 2012; Samadder et al., 2012). However, to the authors' knowledge, there are no data using ASc and nanoparticles with the PCL polymer. The antioxidant activities of the ASc and of NPASc were compared to the antioxidant activity of gallic acid, a component found in higher concentration in the ASc and which was used as positive control in the *in vitro* tests. It was found that both ASc and NPASc have a high capacity to inhibit DPPH radicals (Fig. 2), even at the lowest concentration studied ($p < 0.05$). Statistical analyses showed that both formulations have a similar reduction power in the FRAP assay (Fig. 2). It is important to note that the entrapment of the ASc in the nanoparticles did not affect its antioxidant scavenging activity, since both formulations showed similar results in the DPPH and FRAP assays, which are methods commonly used to investigate the antioxidant potential of plant extracts (Braca et al., 2002; Srivastava and Chandra, 2013).

3.3. In vitro biological activities

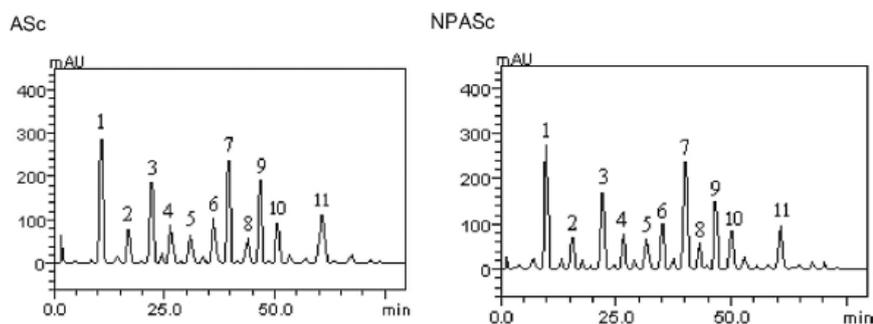
3.3.1. ox-LDL

Chronic complications of DM may also be associated with the formation of atherosclerotic plaques that involves cleavage of polyunsaturated fatty acids within the LDL particle, which can lead to cardiovascular compromise (Khan et al., 2014). This is the first study on the action of nanoparticulate systems containing *S. cumini* against ox-LDL. Our results demonstrate that both ASc and NPASc protected LDL particles from the oxidation by the AAPH, corroborating with the finding that the antioxidant activity of *S. cumini* was maintained in the nanoparticle formulation. (Fig. 2). Moreover, *S. cumini* could act to lower the presence of ox-LDL in bloodstream and the number of proatherogenic potentials, such as inflammatory cytokines, recruitment of monocytes and its subsequent differentiation into macrophages, thus reducing the formation of atherosclerotic lesions. Gallic acid showed a significant antioxidant activity when compared with ASc and NPASc. A previous study reported that *S. cumini* seed extract enriched with gallic acid was not only able to prevent LDL oxidation by copper *in vitro* but also inhibited the formation of foam-cells (Jadeja et al., 2012), confirming the possible antiatherogenic potential of the extract. Importantly, NPb did not exhibit any antioxidant activity in the DPPH, FRAP and ox-LDL assays.

3.3.2. Antifungal activity

The MICs of the ASc and of NPASc can be observed in Table 2. Both *S. cumini* formulations showed species-dependent activity against *Candida* spp., although NPASc showed increased antifungal activity against *C. guilliermondii* and *C. haemulonii*. No antifungal activity against filamentous fungi was observed for both formulations at the concentrations tested.

Interestingly, the major component of the ASc, gallic acid, did not show antifungal activity, with exception for *C. albicans*



Compounds	ASc (10mg)	NPASc (10mg)
	mg/g	mg/mL
Gallic acid	10.88±0.15	10.25±0.23
Catechin	2.25±0.01	2.22±0.01
Chlorogenic	5.96±0.02	5.38±0.14
Caffeic acid	2.69±0.02	2.28±0.16
Ellagic acid	2.07±0.05	2.06±0.03
Epicatechin	2.82±0.36	2.75±0.03
Rutin	7.79±0.03	7.54±0.05
Isoquercitrin	1.93±0.07	1.87±0.06
Quercitrin	6.02±0.01	5.22±0.35
Quercetin	2.74±0.25	2.73±0.01
Kaempferol	3.09±0.04	2.86±0.11

Fig. 1. HPLC chromatogram obtained from the ASc and NPASc. Gallic acid (peak 1), catechin (peak 2), chlorogenic acid (peak 3), caffeic acid (peak 4), ellagic acid (peak 5), epicatechin (peak 6), rutin (peak 7), isoquercitrin (peak 8), quercetin (peak 9) and kaempferol (peak 10). ASc, aqueous seed extract of *S. cumini*; NPASc, nanoparticle suspension containing ASc.

Table 2

Minimum inhibitory concentrations ($\mu\text{g/mL}$) of ASc and NPASc against yeast and filamentous fungi.

Microorganisms	ASc	NPASc	Gallic acid
<i>Candida albicans</i>	320	320	320
<i>C. glabrata</i>	$\geq 1280^a$	≥ 1280	≥ 1280
<i>C. krusei</i>	320	320	≥ 1280
<i>C. guilliermondii</i>	640	160	≥ 1280
<i>C. haemulonii</i>	≥ 1280	320	≥ 1280
<i>C. tropicalis</i>	≥ 1280	≥ 1280	≥ 1280
<i>Cryptococcus sp</i>	320	320	160
<i>Aspergillus fumigatus</i>	≥ 1280	≥ 1280	≥ 1280
<i>Rhizopus</i>	≥ 1280	≥ 1280	≥ 1280

^a The highest concentration tested. ASc, aqueous seed extract of *S. cumini*.

and *Cryptococcus* spp., which lead us to conclude that this compound is not the main responsible for the antifungal activity of the extract. The activity observed against the yeasts, although moderate, warrant further evaluation *in vivo* as adjuvant therapy, especially against strains that are resistant to antifungal drugs. Indeed, because of their size, these nanoparticles could be internalized by fungal cells (Peng et al., 2008), increasing the antifungal activity of the plant extract, as observed using NPASc against *C. guilliermondii* and *C. haemulonii*. NPb did not exhibit any antifungal activity against the strains tested (data not shown).

3.4. 4 In vivo toxicity of ASc and NPASc

3.4.1. *salina* lethality test

The results of *A. salina* testing showed a decreasing trend in the percentage of survival by increasing sample concentra-

tion (50–1000 $\mu\text{g/mL}$). A $\text{LC}_{50} > 1000 \mu\text{g/mL}$ was observed for ASc, NPASc and NPb (Supplementary material). According to previous studies, this value is considered not bioactive for active plant constituents (Meyer et al., 1982; Kpoviessi et al., 2012).

3.4.2. Effect of ASc, NPASc and NPb on toxicity parameters

No clinical signs of toxicity or death were observed in all treated animals throughout the 14 days following treatment. The administration of the ASc or of NPASc did not affect the consumption of food and water in the treated and control groups. Moreover, no significant difference was observed in organ and mean body weights among the groups and no abnormality or gross lesions were observed in the organs (Supplementary material).

For a concise toxicological evaluation related to administration of nanoparticles, not only changes in organs but also the biochemical and hematological profiles (Tables 3 and 4) of the treated animals should be evaluated (Lasagna-Reeves et al., 2010). The results demonstrated no significant alterations in hematological parameters and in serum levels of proteins and enzymatic markers of liver (AST, ALT) and kidney (urea, creatinine) dysfunction. Corroborating these findings, no changes in the lipoperoxidation levels were observed in the cerebral cortex, spleen, kidney and liver (Table 5). These results indicate that the administration of ASc and NPASc is considered safe in the doses used. These results corroborate previous reports that showed the safety on use of *S. cumini* seeds and bark even in high doses (Ravi et al., 2004; Tripathi and Kohli, 2014). The data also reflect the biological safety of the PCL, a synthetic, biodegradable and biocompatible polymer (Fontana et al., 2010).

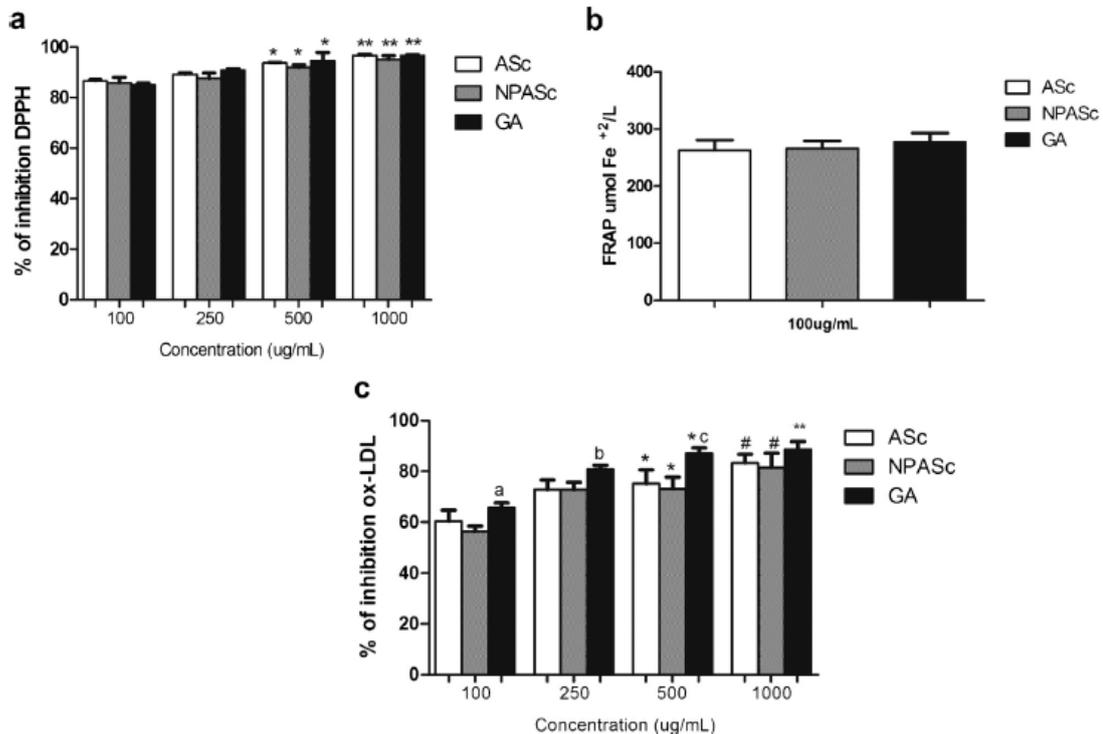


Fig. 2. Antioxidant activities of ASC, NPASc and GA. (a) DPPH assay (% of inhibition); (b) FRAP (umol Fe²⁺/L); and (c) ox-LDL (% of inhibition). The data represent mean \pm S.E.M ($n=6$). * $p < 0.001$ when compared with 100 $\mu\text{g/mL}$; ** $p < 0.001$ when compared with 100 and 250 $\mu\text{g/mL}$; # $p < 0.001$ different from 100, 250 and 500 $\mu\text{g/mL}$; ^a $p < 0.01$ when compared with 100 $\mu\text{g/mL}$ of NPASc; ^b $p < 0.01$ when compared with 250 $\mu\text{g/mL}$ of ASC and NPASc; ^c $p < 0.01$ when compared with 500 $\mu\text{g/mL}$ of ASC and NPASc. ASC, aqueous seed extract of *S. cumint*; NPASc, nanoparticle suspension containing ASC; GA, gallic acid.

Table 3
Serum biochemical parameters in rats treated with a single dose of ASC, NPb and NPASc.

	Control	ASC100 mg/mL/kg	ASC500 mg/mL/kg	NPb 100 mg/mL/kg	NPb500 mg/mL/kg	NPASc 100 mg/mL/kg	NPASc 500 mg/mL/kg
Glucose	82.18 \pm 9.04	84.66 \pm 11.17	90.9 \pm 5.64	86.49 \pm 12.44	95.91 \pm 9.68	96.66 \pm 2.97	90.76 \pm 9.18
Cholesterol	97.78 \pm 8.83	106.5 \pm 6.93	108.5 \pm 1.18	90.19 \pm 5.14	104.7 \pm 11.8	103.2 \pm 4.44	106.2 \pm 11.35
Triglycerides	138.8 \pm 8.58	137.99 \pm 13.7	139.38 \pm 15.01	138.3 \pm 12.87	134.9 \pm 6.91	142.6 \pm 10.10	143.18 \pm 9.27
Total protein	5.64 \pm 0.26	5.93 \pm 0.24	5.57 \pm 0.06	5.49 \pm 0.14	5.8 \pm 0.14	6.06 \pm 0.26	5.85 \pm 0.29
Urea	38.75 \pm 2.39	42.2 \pm 4.92	44.25 \pm 4.44	45 \pm 4.57	44 \pm 4.96	45 \pm 2.89	38.5 \pm 1.52
Creatinine	0.46 \pm 0.02	0.44 \pm 0.02	0.4 \pm 0.04	0.42 \pm 0.03	0.4 \pm 0.04	0.4 \pm 0.02	0.38 \pm 0.03
ALT	35 \pm 1.87	35 \pm 5.62	34.75 \pm 1.25	38.2 \pm 4.22	34.75 \pm 1.25	37.57 \pm 2.2	39.5 \pm 1.8
AST	119.2 \pm 9.06	112.8 \pm 9.24	105.5 \pm 4.97	109.8 \pm 4.28	104.3 \pm 3.77	104.4 \pm 2.08	107.8 \pm 6.99

The data represent mean \pm S.E.M. ($n=6$) and were submitted to one-way ANOVA followed by Duncan multiple range test. ASC, aqueous seed extract of *S. cumint*; NPb, blank nanoparticles; NPASc, nanoparticle suspension containing ASC. Glucose (mg/dL); Cholesterol (mg/dL); Triglycerides (mg/dL); Total protein (g/dL); Urea (mg/dL); Creatinine (mg/dL); ALT: Alanine transaminase, (U/L); AST: Aspartate transaminase (U/L).

Table 4
Hematological parameters in rats treated with a single dose of ASC, NPb and NPASc.

	Control	ASC 100 mg/mL/kg	ASC 500 mg/mL/kg	NPb 100 mg/mL/kg	NPb 500 mg/mL/kg	NPASc 100 mg/mL/kg	NPASc 500 mg/mL/kg
RBC	7.19 \pm 0.44	6.8 \pm 0.44	6.86 \pm 0.26	7.02 \pm 0.18	7.19 \pm 0.11	7.21 \pm 0.15	7.6 \pm 0.08
HGB	13.4 \pm 0.62	12.6 \pm 0.7	13.03 \pm 0.26	13.24 \pm 0.35	13.23 \pm 0.28	13.2 \pm 0.24	13.65 \pm 0.18
HCT	41.58 \pm 2.22	39.06 \pm 2.46	39.95 \pm 1.18	40.4 \pm 1.26	41.2 \pm 0.71	41.77 \pm 0.89	43.71 \pm 0.57
MCHC	32.28 \pm 0.37	32.32 \pm 0.31	32.63 \pm 0.3	32.8 \pm 0.24	32.1 \pm 0.2	31.63 \pm 0.3	31.35 \pm 0.24
MVC	57.94 \pm 0.69	57.46 \pm 0.97	57.48 \pm 0.61	57.58 \pm 0.98	57.43 \pm 0.59	58 \pm 0.46	57.60 \pm 0.49
MCH	18.7 \pm 0.37	18.58 \pm 0.38	18.98 \pm 0.36	18.68 \pm 0.48	18.54 \pm 0.26	17.85 \pm 0.15	18.32 \pm 0.23
PLT	947.2 \pm 104.5	971.6 \pm 182.7	928 \pm 139.1	1110 \pm 145.6	1127 \pm 53.92	998.7 \pm 79.98	1050 \pm 33.35
Leukocytes (%)	5.52 \pm 0.66	4.5 \pm 0.43	5.62 \pm 0.58	5.84 \pm 1.2	5.77 \pm 0.56	4.63 \pm 0.47	4.95 \pm 0.6
Lymphocytes (%)	65.75 \pm 3.96	69.4 \pm 1.77	73 \pm 2.27	73.75 \pm 7.39	72 \pm 7.24	71.00 \pm 2.85	71.67 \pm 3.1
Neutrophils (%)	27.2 \pm 4.04	26 \pm 1.54	22.5 \pm 3.30	26.25 \pm 2.72	24.25 \pm 3.75	26.00 \pm 2.30	28.00 \pm 4.32

The data represent mean \pm S.E.M. ($n=6$) and were submitted to one-way ANOVA followed by Duncan multiple range test. ASC, aqueous seed extract of *S. cumint*; NPb: blank nanoparticles; NPASc, nanoparticle suspension containing ASC; RBC, red blood cells ($10^6/\mu\text{L}$); HGB, hemoglobin (g/dL); HCT, hematocrit (%); MCHC, mean cell hemoglobin concentration (g/dL); MVC, mean corpuscular volume (fL); MCH, mean cell hemoglobin (pg); PLT, platelets ($10^3/\mu\text{L}$).

Table 5
Lipoperoxidation levels (nmol MDA/mg of protein) in cerebral cortex, spleen, kidney and liver of rats treated with a single dose of Asc, NPb and NPAsc.

Groups	Control	Asc 100 mg/mL/Kg	Asc 500 mg/mL/Kg	NPb 100 mg/mL/Kg	NPb 500 mg/mL/Kg	NPAsc 100 mg/mL/Kg	NPAsc 500 mg/mL/Kg
Cerebral cortex	0.37 ± 0.06	0.36 ± 0.03	0.34 ± 0.04	0.32 ± 0.01	0.37 ± 0.02	0.26 ± 0.04	0.25 ± 0.02
Spleen	0.29 ± 0.04	0.3 ± 0.04	0.29 ± 0.04	0.24 ± 0.02	0.28 ± 0.05	0.23 ± 0.03	0.24 ± 0.03
Kidney	0.45 ± 0.06	0.43 ± 0.05	0.42 ± 0.06	0.41 ± 0.04	0.36 ± 0.01	0.37 ± 0.04	0.38 ± 0.03
Liver	0.45 ± 0.03	0.45 ± 0.05	0.49 ± 0.02	0.48 ± 0.04	0.38 ± 0.01	0.49 ± 0.06	0.49 ± 0.02

The data represent mean ± S.E.M. (n = 6) and were submitted to one-way ANOVA followed by Duncan multiple range test. Asc, aqueous seed extract of *S. cumini*; NPb: blank nanoparticles; NPAsc, nanoparticle suspension containing Asc.

4. Conclusion

This study showed that a nanoparticle preparation containing an aqueous plant extract and using PCL as polymer was successfully performed by the emulsification/evaporation solvent method. Our results revealed that Asc-loaded nanoparticles present physico-chemical characteristics compatible with nanoparticulate systems and that the phytochemical chromatography is a good parameter for assessing the efficiency of the encapsulating process. The development of the formulation did not affect the substantial antioxidant activity of *S. cumini*, since no significant difference was observed between Asc and NPAsc in DPPH and FRAP tests. Indeed, both formulations demonstrated a high inhibitory activity against ox-LDL particles. NPAsc also showed a higher *in vitro* activity against fungi such as *C. guilliermondii* and *C. haemulonii* in comparison to Asc. The lack of toxicity in *A. salina* and in rats, which is a pivotal factor in the development of strategies for testing the toxicity of biodegradable polymeric nanoparticles, highlights the safety potential of *S. cumini*-loaded polymeric nanoparticles and warrant further studies against the chronic complications of DM.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgments

The authors wish to thank the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq-Pq 303245/2014-0). The first author acknowledges the grant from the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). We thank C. B. da Silva for Zetasizer access.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.01.007>.

References

American Diabetes Association, 2013. Standards of Medical Care in Diabetes 2013. *Diabetes Care* 36, S11–S66.

Ahotupa, M., Marniemi, J., Lehtimäki, T., et al., 1998. Baseline diene conjugation in LDL lipids as a direct measure of *in vivo* LDL oxidation. *Clin. Biochem.* 31, 257–261.

Ayyanar, M., Subash-Babu, P., Ignacimuthu, S., 2013. *Syzygium cumini* (L.) skeels.: a novel therapeutic agent for diabetes: folk medicinal and pharmacological evidences. *Complement. Ther. Med.* 21, 232–243.

Benzie, I.F., Strain, J.J., 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: the FRAP assay. *Anal. Biochem.* 239, 70–76.

Bitencourt, P.E.R., De Bona, K., Cargnelutti, L., et al., 2015. *Syzygium cumini* seed extract ameliorates adenosine deaminase activity and biochemical parameters but does not alter insulin sensitivity and pancreas architecture in a short-term model of diabetes. *J. Complement. Integr. Med.* 12, 1–7.

Buege, J.A., Aust, S.D., 1978. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 52, 302–310.

Braca, A., Sortino, C., Politi, M., Morelli, I., et al., 2002. Antioxidant activity of flavonoids from *Licantia licantiaeflora*. *J. Ethnopharmacol.* 79, 379–381.

Clinical and Laboratory Standards Institute, 2007. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, M100-S17. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.

Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing yeasts, M27-A3. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.

De Bona, K.S., Bellé, L.P., Sari, M.H., et al., 2010. *Syzygium cumini* extract decrease adenosine deaminase, 5' nucleotidase activities and oxidative damage in platelets of diabetic patients. *Cell. Physiol. Biochem.* 26, 729–738.

De Bona, K.S., Bitencourt, P.E., Bellé, L.P., et al., 2011. Erythrocytic enzymes and antioxidant status in patients with Type 2 diabetes: benefic effect of *Syzygium cumini* leaf extract *in vitro*. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 94, 84–90.

De Bona, K.S., Bonfanti, G., Bitencourt, P.E., et al., 2014. *Syzygium cumini* is more effective in preventing the increase of erythrocytic ADA activity than phenolic compounds under hyperglycemic conditions *in vitro*. *J. Physiol. Biochem.* 70, 321–330.

Delamare, M., Maugendre, D., Moreno, M., et al., 1997. Impaired leucocyte functions in diabetic patients. *Diabet. Med.* 14, 29–34.

Fadeel, B., Garcia-Bennett, A.E., 2010. Better safe than sorry: understanding the toxicological properties of inorganic nanoparticles manufactured for biomedical applications. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 62, 362–374.

Fontana, M.C., Coradini, K., Pohlmann, A.R., et al., 2010. Nanocapsules prepared from amorphous polyesters: effect on the physicochemical characteristics, drug release, and photostability. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 10, 3091–3099.

Fraga-Silva, T.F., Marchetti, C.M., Mimura, L.A., et al., 2015. Relationship among short and long term of hypoinsulinemia-hyperglycemia, dermatophytosis, and immunobiology of mononuclear phagocytes. *Mediators Inflamm.* 34234.

Helmsstatter, A., 2008. *Syzygium cumini* (L.) SKEELS (Myrtaceae) against diabetes—125 years of research. *Die Pharmazie* 63, 91–101.

Jadeja, R.N., Thouajam, M.C., Sankhari, J.M., et al., 2012. Standardized flavonoid-rich *Eugenia jambolana* seed extract retards *in vitro* and *in vivo* LDL oxidation and expression of VCAM-1 and P-Selectin in atherogenic rats. *Cardiovasc. Toxicol.* 12, 73–82.

Joshi, R., Poonam Gulati, A., 2011. Biochemical attributes of tea flowers (*Camellia sinensis*) at different developmental stages in the Kangra region of India. *Sci. Hortic.* 130, 66–74.

Jin, S., Hong, J.H., Jung, S.H., Cho, K.H., 2011. Turmeric and laurel aqueous extracts exhibit *in vitro* anti-atherosclerotic activity and *in vivo* hypolipidemic effects in a zebrafish model. *J. Med. Food.* 14, 247–255.

Kauffman, C.A., Pappas, P.G., Sobel, J.D., et al., 2011. *Essentials of Clinical Mycology*, 2nd. Springer, New York.

Khan, S.S., Butler, J., Gheorghide, M., 2014. Management of comorbid diabetes mellitus and worsening heart failure. *JAMA* 311, 2379–2380.

Kpoviessi, B.G.K., Ladekan, E.Y., Kpoviessi, D.S., et al., 2012. Chemical variation of essential oil constituents of *Ocimum gratissimum* L. from Benin: and impact on antimicrobial properties and toxicity against *Artemia salina* leach. *Chem. Biodivers.* 9, 139–150.

Kumar, V., Yadav, S.C., Yadav, S.K., 2010. *Syzygium cumini* leaf and seed extract mediated biosynthesis of silver nanoparticles and their characterization. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 85, 1301–1309.

Kumar, V., Yadav, S.K., 2012. Characterisation of gold nanoparticles synthesised by leaf and seed extract of *Syzygium cumini* L. *J. Exp. Nanosci.* 7, 440–451.

Lasagna-Reeves, C., Gonzalez-Romero, D., Barria, M.A., et al., 2010. Bioaccumulation and toxicity of gold nanoparticles after repeated administration in mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 393, 649–655.

Meyer, B.N., Ferrigni, N.R., Putnam, J.E., et al., 1982. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Med.* 45, 31–34.

Okawa, H., Oshiri, N., Yagi, K., 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Ann. Biochem.* 95, 351–358.

Pautler, M., Brenner, S., 2010. Nanomedicine: promises and challenges for the future of public health. *Int. J. Nanomed.* 5, 803–809.

Peng, H.S., Liu, X.J., Lv, G.X., et al., 2008. Voriconazole into PLGA nanoparticles: improving agglomeration and antifungal efficacy. *Int. J. Pharm.* 352, 29–35.

Peterson, G.L., 1977. A simplification of the protein assay method of Lowry et al which is more generally applicable. *Anal. Biochem.* 83, 346–356.

Prince, P.S., Menon, V.P., Pari, L., 1998. Hypoglycemic activity of *Syzygium cumini* seeds: effect on lipid peroxidation in alloxan diabetic rats. *J. Ethnopharmacol.* 61, 1–7.

Quintanar-Guerrero, D., Alleman, E., Doelker, E., et al., 1998. Preparation and characterization of nanocapsules from preformed polymers by new process based on emulsification-diffusion technique. *Pharm. Res.* 15, 1056–1062.

Samadder, A., Das, S., Das, J., et al., 2012. Ameliorative effects of *Syzygium jambolanum* extract and its poly (lactic-co-glycolic) acid nano-encapsulated

- form on arsenic-induced hyperglycemic stress: a multi-parametric evaluation. *J. Acupunct. Meridian Stud.* 5, 310–318.
- Sociedade Brasileira de Diabetes, 2015. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes. Available at <http://diabetes.org.com.br>. (accessed 29.05.15.)
- Srivastava, S., Chandra, D., 2013. Pharmacological potentials of *Syzygium cumini*: a review. *J. Sci. Food Agric.* 93, 2084–2093.
- Sun, C., Sun, L., Ma, H., et al., 2012. The phenotype and functional alterations of macrophages in mice with hyperglycemia for long term. *J. Cell. Physiol.* 227, 1670–1679.
- Rao, J.P., Geckeler, K.E., 2011. Polymer nanoparticles: preparation techniques and size-control parameters. *Prog. Polym. Sci.* 36, 887–913.
- Ravi, K.K., Sivagnanam, K., Subramanian, S., 2004. Anti-diabetic activity of *Eugenia jambolana* seed kernels on streptozotocin-induced diabetic rats. *J. Med. Food.* 7, 187–191.
- Ribeiro, A.F., Rezende, R.L.O., Cabral, L.M., et al., 2013. Poly ϵ -caprolactone nanoparticles loaded with *Uncaria tomentosa* extract: preparation, characterization, and optimization using the Box-Behnken design. *Int. J. Nanomed.* 8, 431–442.
- Ribeiro, A.F., Ferreira, C.T.G., dos Santos, J.F., et al., 2015. Design of experiments for the development of poly(D,L-lactide-co-glycolide) nanoparticles loaded with *Uncaria tomentosa*. *J. Nanopart. Res.* 17, 19.
- Tripathi, A.K., Kohli, S., 2014. Pharmacognostical standardization and antidiabetic activity of *Syzygium cumini* (Linn.) barks (Myrtaceae) on streptozotocin-induced diabetic rats. *J. Complement. Integr. Med.* 11, 71–81.
- Zhang, C., Peng, F., Liu, W., et al., 2014. Nanostructured lipid carriers as a novel oral delivery system for triptolide: induced changes in pharmacokinetics profile associated with reduced toxicity in male rats. *Int. J. Nanomed.* 20, 1049–1063.
- Woodruff, M.A., Huttmacher, D.W., 2010. The return of a forgotten polymer – polycaprolactone in the 21st century. *Prog. Polym. Sci.* 35, 1217–1256.
- Younis, N., Charlton-Menys, V., Sharma, R., et al., 2009. Glycation of LDL in non-diabetic people: small dense LDL is preferentially glycated both *in vivo* and *in vitro*. *Atherosclerosis* 202, 162–168.

Supplementary Material
Industrial Crops and Products

A new biodegradable polymeric nanoparticle formulation containing *Syzygium cumini*: phytochemical profile, antioxidant and antifungal activity and *in vivo* toxicity

Paula E.R. Bitencourt^a, Luana M. Ferreira^b, Lariane O. Cargnelutti^a, Laura Denardi^c, Aline Boligon^b, Michelli Fleck^a, Ricardo Brandão^a, Margareth L. Athayde^b, Letícia Cruz^b, Régis A. Zanette^d, Sydney H. Alves^c, Maria B. Moretto^{a*}

^aDepartamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

^bDepartamento de Farmácia Industrial, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil.

^cDepartamento de Microbiologia, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil.

^dPrograma de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Farmacologia e Terapêutica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

*Corresponding author: Maria Beatriz Moretto. Department of Clinical and Toxicological Analysis, Health Science Center, Federal University of Santa Maria (UFMS), Roraima Avenue 1000, 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil. Tel +55 55 32208749. Email: beatriz.moretto@yahoo.com.br

Table 1. Relative weights organs of rats treated with single dose of ASc, NPb and NPASc.

	Control	ASc 100mg/mL/Kg	ASc 500mg/mL/Kg	NPb 100mg/mL/Kg	NPb 500mg/mL/Kg	NPASc 100mg/mL/Kg	NPASc 500mg/mL/Kg
Cerebral cortex	0.34 ± 0.02	0.42 ± 0.01	0.32 ± 0.02	0.39 ± 0.02	0.36 ± 0.03	0.37 ± 0.02	0.37 ± 0.01
Spleen	0.26 ± 0.02	0.3 ± 0.01	0.2 ± 0.02	0.29 ± 0.03	0.29 ± 0.05	0.3 ± 0.01	0.28 ± 0.01
Kidney	0.36 ± 0.03	0.33 ± 0.04	0.33 ± 0.02	0.33 ± 0.01	0.32 ± 0.02	0.36 ± 0.01	0.36 ± 0.01
Liver	3.62 ± 0.09	3.79 ± 0.20	2.84 ± 0.48	3.51 ± 0.05	3.20 ± 0.24	3.55 ± 0.14	3.5 ± 0.29

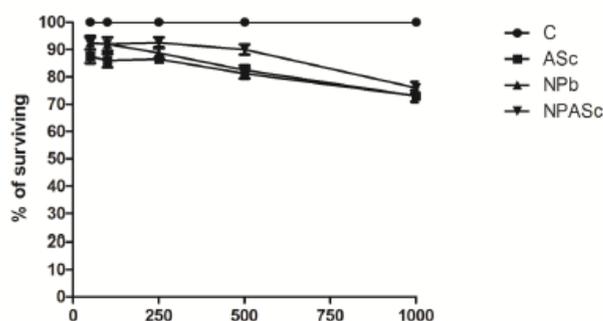
The data (%) represent mean ± S.E.M (n=6) and were submitted to one-way ANOVA followed by Duncan multiple range test. ASc, aqueous seed extract *S. cumini*; NPb, blank nanoparticle; NPASc, nanoparticles aqueous seed extract *S. cumini*.

Table 2. Mean body weight of rats treated with single dose of ASc, NPb and NPASc..

	Control	ASc 100mg/mL/Kg	ASc 500mg/mL/Kg	NPb 100mg/mL/Kg	NPb 500mg/mL/Kg	NPASc 100mg/mL/Kg	NPASc 500mg/mL/Kg
Mean body weight	45.8 ± 5	39.2 ± 2.1	45 ± 5.1	40.8 ± 8.5	46.3 ± 7.3	46.8 ± 9.4	39.4 ± 4.4

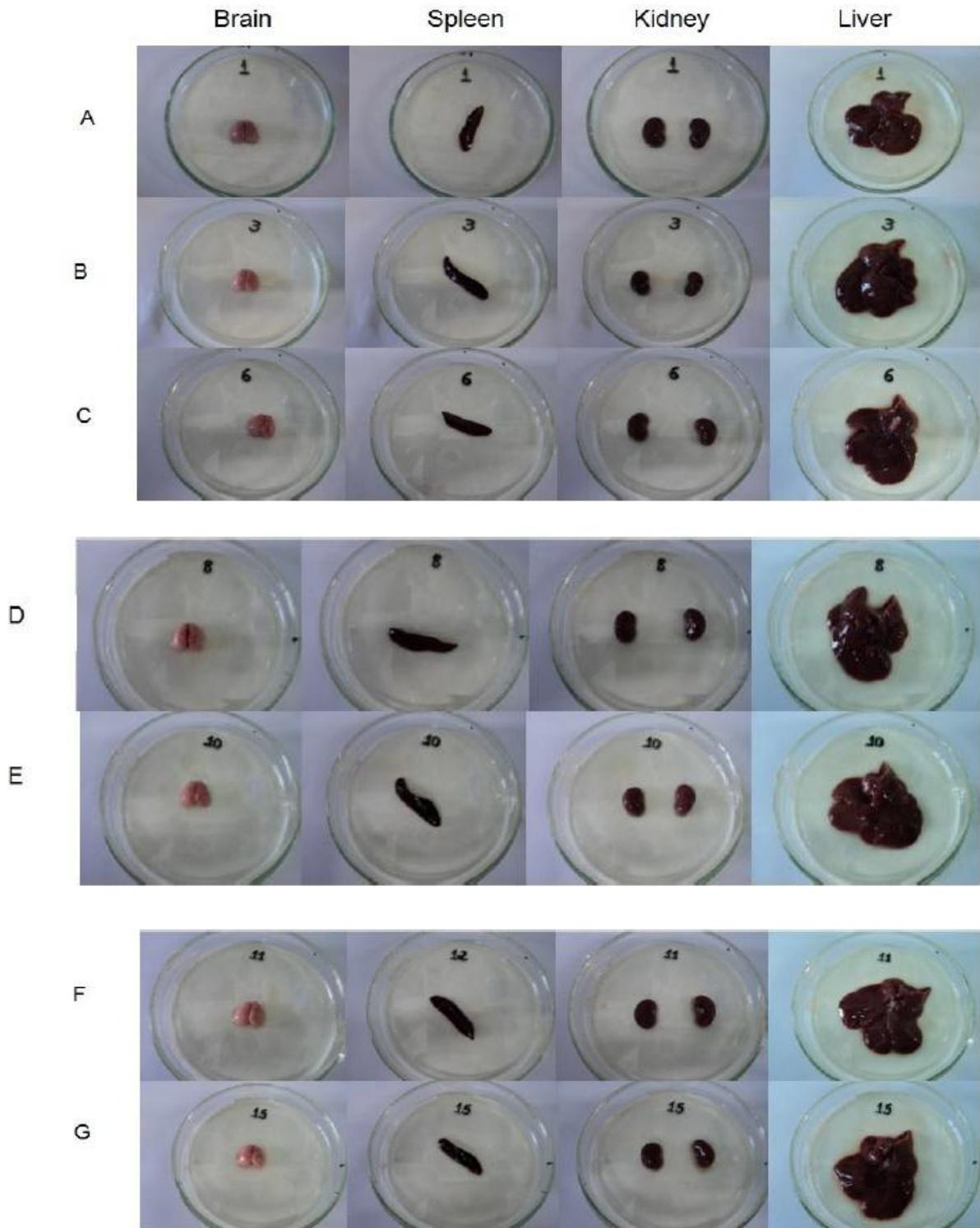
The data (g) represent mean ± S.E.M (n=6) and were submitted to one-way ANOVA followed by Duncan multiple range test. ASc, aqueous seed extract *S. cumini*; NPb, blank nanoparticle; NPASc, nanoparticles aqueous seed extract *S. cumini*.

Figure 1. Survival percentage of *A. salina*.



Values are mean ± S.E.M. C: control; ASc, aqueous seed extract *S. cumini*; NPb, blank nanoparticle; NPASc: nanoparticles aqueous seed extract *S. cumini*. The % of surviving was: ASc (50ug/mL: 87.5±2.5; 100ug/mL: 86.5±2.5; 250ug/mL: 86.50±1.83; 500ug/mL: 81.25±1.83; 1000ug/mL: 73.33±1.25); NPb (50ug/mL: 92.50±2.5; 100ug/mL: 92.50±2.5; 250ug/mL: 88.75±2.26; 500ug/mL: 82.50±1.63; 1000ug/mL: 73.33±2.10); NPASc (50ug/mL: 92.50±2.26; 100ug/mL: 92.50±2.5; 250ug/mL: 91.25±2.26; 500ug/mL: 90.00±1.89; 1000ug/mL: 76.67±2.10).

Figure 2. Macroscopic analysis of structures



Macroscopic analysis of the organs brain, spleen, liver and kidney. (A) Control; (B) ASc 100mg/mL; (C) ASc 500mg/mL; (D) NPb 100mg/mL; (E) NPb 500mg/mL; (F) NPASc 100mg/mL; (G) NPASc 500mg/mL; ASc, aqueous seed extract *S. cumini*; NPb, blank nanoparticle; NPASc: nanoparticles aqueous seed extract *S. cumini*.

3.2 ANTI-INFLAMMATORY ACTION OF SEED EXTRACT AND POLYMERIC NANOPARTICLES OF *SYZYGIUM CUMINI* IN DIABETIC RATS INFECTED WITH *CANDIDA ALBICANS*

Artigo aceito para publicação no periódico **Journal of Applied Pharmaceutical Science**

Anti-inflammatory action of seed extract and polymeric nanoparticles of *Syzygium cumini* in diabetic rats infected with *Candida albicans*

Paula E. R. Bitencourt¹, Lariane O. Cargnelutti¹, Carolina S. Stein¹, Raquel Lautenchleger¹, Luana M. Ferreira², Manuela Sangoi¹, Aline Boligon², Marta M. M. F. Duarte⁴, Rafael N. Moresco¹, Leticia Cruz², Régis A. Zanette³, Sydney H. Alves³, Maria Beatriz Moretto^{1*}

¹Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil. ²Departamento de Farmácia Industrial, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Brazil. ³Departamento de Microbiologia, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Brazil. ⁴Universidade Luterana do Brasil, Santa Maria, Brazil. ⁵Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Farmacologia e Terapêutica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

ARTICLE INFO

Article history:

Received on: XX/XX/XXXX

Revised on: XX/XX/XXXX

Accepted on: XX/XX/XXXX

Available online:

XX/XX/XXXX

Key words:

Diabetes model; *Candida albicans* infection; cytokines; ectonucleotidases; *Syzygium cumini* seeds; nanotechnology.

ABSTRACT

The role of *Syzygium cumini* against chronic complications of Diabetes mellitus (DM), such as fungal infection and inflammation, has been poorly explored. Here, we evaluated the treatment with *S. cumini* aqueous seed extract (ASc, 100mg/Kg) and polymeric nanoparticles containing ASc (NPASc, 100mg/Kg) in diabetic rats infected or not by *Candida albicans* (CA). Male Wistar rats were divided in: control; DM; CA; CA+ASc; CA+NPASc; DM+CA; DM+CA+ASc; and DM+CA+NPASc. Rats were daily treated for 21 days, when glycemic profile, ectonucleotidase (NTPDase and 5'-NT), adenosine deaminase (ADA), acetylcholinesterase (AChE) and dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV) activities and nitric oxide (NO) and cytokine levels were analyzed in serum, platelets, lymphocytes and tissues. The results showed that NTPDase, 5'-NT and ADA activities and NO, IL-1, IL-6, TNF- α and IFN- γ levels were increased in *C. albicans*, DM and DM+CA. The treatment with ASc and NPASc decreased ectonucleotidase and AChE activities and NO levels. Both treatments also prevented the increase in ADA activity and pro-inflammatory cytokines in cells and serum. In liver and pancreas, NPASc decreased NO levels more efficiently than ASc. The modulation of ectoenzyme activities can be one of the mechanisms by which *S. cumini* act on cytokines that affect the development of chronic complications in DM.

INTRODUCTION

Diabetes mellitus (DM), a disorder characterized by chronic hyperglycemia and impaired insulin signaling, generates metabolic changes and an inflammatory status that will eventually affect all body tissues (Boteanu *et al.*, 2015). Several different immune deficits have been described in diabetic

patients, given that cell-mediated immunity seems to be particularly affected, including dysfunctions of white blood cells such as impaired leukocyte adherence, chemotaxis, oxidative burst and bactericidal activity (Fraga-Silva *et al.*, 2015). The cholinergic anti-inflammatory pathway mediated by acetylcholine (ACh) regulates immune responses to pathogens (Borovikova *et al.*, 2000), but the role of this pathway in infections is not well characterized. Moreover, pro-inflammatory mediators such as nitric oxide (NO) play an important role mediating various cellular signaling pathways and inducing pro-inflammatory and destructive effects, exerting antimicrobial action (Shahani and Sawa, 2011; Samarghandian *et al.*, 2013).

* Corresponding Author

Maria Beatriz Moretto, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil. Email: beatriz@smail.ufsm.br

enhanced drug bioavailability within the cells, tissues, or both, besides the minimization of the degradation process (Samadder *et al.*, 2012; Bonifácio *et al.*, 2014).

Recently, our group demonstrated that polymeric nanoparticles containing an aqueous extract of *S. cumini* (NPASc) were able to maintain the antioxidant properties of the extract (ASc) and lack toxicity in *Artemia salina* and in rats, highlighting their potential in the treatment of DM and its complications (Bitencourt *et al.*, 2016).

Previous studies from our group have investigated the effects *S. cumini* and adenosine in DM (De Bona *et al.*, 2014; Bitencourt *et al.*, 2015). Nonetheless, as there is paucity of data evaluating the effects of ASc and NPASc on the chronic complications of DM, including increased susceptibility to fungal infections, the present study was aimed: 1) to evaluate changes in cholinergic and purinergic systems in DM rats infected or not by

standards and by DAD spectra (200 to 500 nm). All chromatographic operations were carried out at ambient temperature and in triplicate. Calibration curves for each substance were: gallic acid, $Y = 13973x + 1095.6$ ($r = 0.9993$); catechin, $Y = 11840x + 1178.2$ ($r = 0.9998$); epicatechin, $Y = 12542x + 1412.7$ ($r = 0.9991$); chlorogenic acid, $Y = 11864x + 1252.8$ ($r = 0.9994$); caffeic acid, $Y = 13178x + 1267.2$ ($r = 0.9999$); ellagic acid, $Y = 12681x + 1164.9$ ($r = 0.9998$); rutin, $Y = 13077x + 1265.4$ ($r = 0.9992$); isoquercitrin, $Y = 11927x + 1306.2$ ($r = 0.9996$); quercitrin, $Y = 13470x + 1293.7$ ($r = 0.9994$) and quercetin, $Y = 12693x + 1176.0$ ($r = 0.9997$). The limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) were calculated based on the standard deviation of the responses and the slope using three independent analytical curves. LOD and LOQ were calculated as 3.3 and $10 \sigma/S$, respectively, where σ is the standard deviation of the response and S is the slope of the calibration curve. For the

The association between diabetes and the prevalence of microbial infections such as those caused by fungi has also been reported (Joshi *et al.*, 1999).

Disturbances in cell metabolism caused by DM can lead to changes in intra- and extracellular concentrations of adenine nucleotides and nucleosides. The extracellular metabolism of ATP, which is released in response to cellular stress or damage, to adenosine is usually mediated by a variety of enzymes such as triphosphate diphosphohydrolase (NTPDase), which also hydrolyzes ADP to adenosine.

Additionally, following hydrolysis of ATP to AMP, AMP is dephosphorylated by 5'-nucleotidase (5'-NT) to produce adenosine, which has anti-inflammatory and immunosuppressive functions (Schmatz *et al.*, 2013). The extracellular concentrations of adenosine are regulated through the enzyme adenosine deaminase (ADA), which can also interact with membrane proteins such as dipeptidyl peptidase IV (CD26/DPP-IV) (Gorrell *et al.*, 2001). This process is directly involved in T-cell activation (Kameoka *et al.*, 1993).

Syzygium cumini L. Skeels, a traditional medicinal tropical plant of Myrtaceae family widely known as jambolan or jamun, possesses hypoglycemic, anti-inflammatory and antioxidant properties (for review, see Ayyanar *et al.*, 2013). In Brazil, the most used parts of the plant are fruits, which are consumed fresh, and leaves (Vizzotto, 2008), whose infusion is used by the Southern population to treat DM and by quilombo communities to treat kidney, heart and hyperlipidemia (Da Silva *et al.*, 2012). *S. cumini* is included in the List of Medicinal Plants of Interest for the Public Health System (Rennisus) issued by the Brazilian Ministry of Health, which includes plants considered as potentially valuable for the generation of herbal medicines (Brasil, 2009).

Phenols and flavonoids present in high amounts in *S. cumini* are responsible for the several biological activities observed *in vitro*. However, these compounds do not have the same profile of activity *in vivo*. In this sense, polymeric nanoparticles offer a non-toxic and efficient carrier system for

Candida albicans; 2) to evaluate whether ASc and NPASc have potential as anti-inflammatory and antifungal candidates.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals

Ethyl acetate, methanol, acetonitrile and acetic, gallic, chlorogenic, caffeic and ellagic acids were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Polysorbate 80 (Tween 80[®]), poly-ε-caprolactone (PCL, 85 g/mol), sorbitan monooleate (Span 80[®]), adenosine, ATP, ADP, streptozotocin, catechin, epicatechin, quercetin, isoquercitrin, quercitrin, kaempferol and rutin reference standards were acquired from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). All other chemicals were of analytical grade and were obtained from standard commercial suppliers.

ASc and NPASc preparation, characterization and phytochemical analysis

S. cumini seeds were collected (29°43'22"S and 53°43'47"W, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil) fresh, locally and they were cleaned, dried and powdered. They were identified by the Laboratory of Botanic and Pharmacognosy of the Federal University of Santa Maria and a voucher specimen (SMDB 14.001) was deposited in the Herbarium of the institution. ASc was prepared according to Prince *et al.* (1998). NPASc were prepared by the emulsification/evaporation solvent method described by Quintanar-Guerrero *et al.* (1998), with modifications according to Bitencourt *et al.* (2016).

The presence of 11 antioxidant compounds in ASc and NPASc, namely gallic, chlorogenic, caffeic and ellagic acids and catechin, epicatechin, quercetin, quercitrin, isoquercitrin, kaempferol and rutin was investigated by HPLC-DAD. Identification of these compounds was performed by comparing their retention time and UV absorption spectrum with those of the commercial standards. Reverse phase chromatography analyses were carried out under gradient conditions using a C₁₈ column (4.6 mm x 150 mm, 5 μm). The chromatography peaks were confirmed by comparing their retention time with those of reference

determination of encapsulation efficiency (EE), free phenolic compounds were separated from the nanostructures by ultrafiltration (Bitencourt *et al.*, 2016). The difference between the total and the free concentrations of compounds, determined in the nanostructures and in the ultrafiltrate, respectively, was calculated according to the equation: $EE = \text{Total content} - \text{Free content} / \text{Total content} \times 100$.

Animals

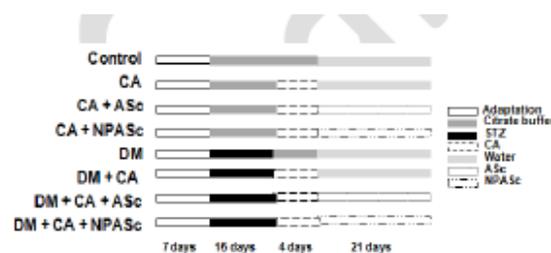
Male albino Wistar rats (weighing 150–200 g) were housed in colony cages (six rats per cage). All animal experiments were conducted in accordance with principles for laboratory animal use and care, as described in the guidelines of the Ethics Committee for Animal Research of the Federal University of Santa Maria, which approved the experimental protocol (n° 074/2014). All efforts were made to minimize the number of animals used and their suffering.

Induction of DM, animal infection and experimental design

DM type I was induced by the intraperitoneal administration of a single dose of streptozocin (STZ) (60 mg/kg) dissolved in freshly prepared 0.1 M citrate buffer, pH 4.5. Control animals received only citrate buffer. Diabetic rats were allowed to drink 5% glucose solution overnight to overcome the drug-induced hypoglycemia and only diabetic rats with a fasting blood glucose level of at least 250 mg/dl were included in the experiment.

Inoculum was obtained from a clinical *C. albicans* strain grown for 20 h at 30 °C. Yeast cells were harvested by centrifugation at 3000 rpm for 10 min, washed three times with sterile PBS, counted in a hemocytometer and resuspended in sterile PBS to the required inoculum concentration (10^5 colony forming units (CFU)/mL). Fifteen days after DM induction, rats assigned to *C. albicans* infection were inoculated intraperitoneally with 0.2 ml of yeast suspension (Fisher *et al.*, 1989). This inoculum consistently infects >90% of normal rats in this model.

ASe or NPASc were administered by gavage at a dose of 100 mg/kg (Bitencourt *et al.*, 2015). Rats were divided into eight groups of six animals each, according to the following schematic timeline of the experimental design:



At day 21 of treatment, the rats were anesthetized with isoflurane, euthanized and the blood was collected by cardiac puncture. Samples of liver and kidney were rapidly dissected, weighed and placed on ice. Moreover, kidney and liver fragments were aseptically removed and 0.1 g of each organ was homogenized in

sterile saline. Samples were cultured onto Sabouraud dextrose agar, incubated at 30 °C for 72 h, and the number of yeasts was expressed as CFU/g of tissue.

Platelet preparation

Platelet-rich plasma (PRP) was prepared by the method of Lunkes *et al.* (2003) and the protein concentration was measured by the method of Lowry *et al.* (1981), using bovine serum albumin as the standard.

Lymphocyte isolation

Rat lymphocytes were isolated from the spleen under aseptic conditions, as described by Sai Ram *et al.* (1997). The final cell suspension was resuspended in PBS (pH 7.4) and 3×10^6 cells/mL were used for each analysis. The protein concentration was measured by the method of Lowry *et al.* (1981), using bovine serum albumin as the standard.

Acetylcholinesterase (AChE) was determined in lymphocyte suspension by a modification of the spectrophotometric method of Ellman *et al.* (1961). The enzymatic activity was expressed in $\mu\text{mol AcSCh/h/mg}$ of protein.

Biochemical and inflammatory analyses

Serum obtained by centrifugation was analyzed spectrophotometrically for glucose and fructosamine levels using commercial diagnostic kits (Labtest Diagnóstica, Brazil). Plasmatic insulin was measured by radioimmunoassay (DPC Coat-a-Count kit, CA, USA) in a gamma counter. Serum inflammatory cytokine quantification was assessed by ELISA using commercial kits for interferon (IFN)- γ , tumor necrosis factor (TNF)- α , interleukin (IL)-1, IL-6 and IL-10 (R&D Systems, MN, USA), according to manufacturer's instructions.

DPP-IV activity

DPP-IV activity was measured spectrophotometrically in serum and lymphocyte suspension by the method of Jarmolowska *et al.* (2007) and Schön *et al.* (1984), respectively. Samples were incubated with Gly-Pro p-nitroanilide p-toluenesulfonate for 120 min at 37 °C. The reaction was stopped by adding 1 M acetate

buffer (pH 4.5). P-nitroanilide was used as standard and the values were expressed in U/l.

NTPDase and 5'-NT activities

The reaction medium used to assay ATP, ADP and AMP hydrolysis in rat platelets and serum was prepared as described by Lunkes *et al.* (2003) and Oses *et al.* (2004), respectively, and the inorganic phosphate (Pi) released was measured as previously described (Chan *et al.*, 1986). Enzyme activities were expressed as nmol Pi released/min/mg of protein.

ADA activity

ADA activity in serum, platelets, lymphocytes and tissues (homogenized in 50 mM PBS, pH 7) was estimated spectrophotometrically as previously described (Giusti and

Galanti, 1984). The results were expressed as U/L in serum and U/L/mg of protein in lymphocytes and tissues. The protein concentration was measured by the method of Lowry *et al.* (1980).

Oxide nitric (NO) measurement

NO was determined indirectly by quantifying serum, lymphocytes and tissues (homogenized in 10 mM Tris-HCl buffer solution, pH 7.4). NO was measured by the modified Griess method using the Cobas Mira[®] automated analyzer (Tatsch *et al.*, 2011). The results were expressed as $\mu\text{M/L}$.

Statistical analysis

Data were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Duncan's post hoc test using Statistica 6.0 software (StatSoft Inc., USA). The limit of statistical significance was set at $p < 0.05$. The results were expressed as mean \pm SEM.

RESULTS

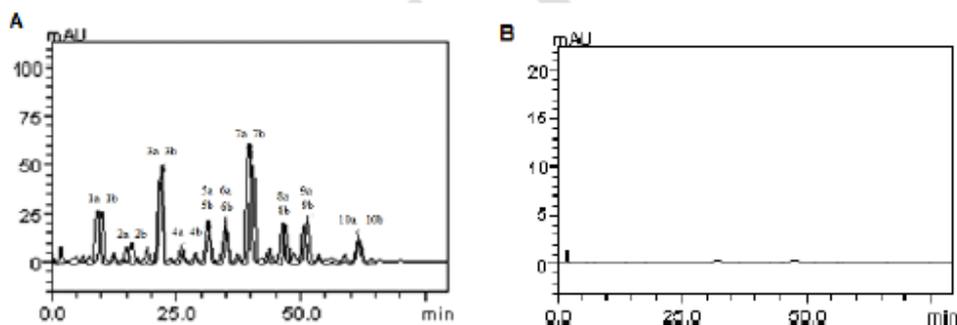
Characterization of NPASc

The chromatographic profiles of NPASc showed that nanoencapsulation did not alter the phenolic composition of ASc (Fig. 1A) and the results of encapsulation efficiency showed that

almost 100% of phenolic compounds were entrapped within the particle (Fig. 1B). Nanoparticles showed average diameters lower than 200 nm and PDI less than 0.2, which indicates a narrow distribution (data not shown).

Biochemical and immunological parameters

As expected, there was an increase in the levels of glucose, fructosamine and a decrease in the levels of insulin in DM and DM+CA groups when compared with the control group (Table 1). The administration of ASc (DM+CA+ASc) attenuated these levels, but did not prevent the decrease of insulin levels when compared to DM+CA. NPASc (DM+CA+NPASc) decreased fructosamine and glucose levels and avoided the decrease of insulin levels when compared with DM+CA ($p < 0.01$). Levels of the pro-inflammatory cytokines IL-1, IL-6, TNF- α and INF- γ were increased in DM, CA and mainly in DM+CA when compared to control ($p < 0.01$). ASc (CA+ASc) and NPASc (DM+CA+NPASc) were able to reduce these levels when compared to respective controls (CA and DM+CA). Furthermore, we observed a decrease in IL10 levels in DM, CA and DM+CA when compared to control. Interestingly, ASc did not affect this parameter, but NPASc were able to increase IL10 levels in CA+NPASc and DM+CA+NPASc, in comparison to the respective controls. DPPIV activity was not altered.



Compounds	AS (a) mg/g	NPASc (b) mg/g
Gallic acid	10.72 \pm 0.002	10.08 \pm 0.01
Catechin	2.26 \pm 0.003	2.23 \pm 0.02
Chlorogenic	5.57 \pm 0.001	5.49 \pm 0.03
Caffeic acid	2.61 \pm 0.014	2.08 \pm 0.01
Ellagic acid	2.08 \pm 0.007	2.01 \pm 0.01
Epicatechin	2.85 \pm 0.005	2.74 \pm 0.02
rutin	7.75 \pm 0.012	7.65 \pm 0.03
Isoquercitrin	5.94 \pm 0.003	4.92 \pm 0.01
Quercetin	2.83 \pm 0.009	2.76 \pm 0.02
Kaempferol	3.76 \pm 0.015	2.30 \pm 0.01

Fig. 1: HPLC chromatogram obtained from ASc, NPASc (A) and EE (B).

Gallic acid (peak 1a and b), catechin (peak 2a and b), chlorogenic acid (peak 3a and b), caffeic acid (peak 4a and b), ellagic acid (peak 5a and b), epicatechin (peak 6a and b), rutin (peak 7a and b), isoquercitrin (peak 8a and b), quercetin (peak 9a and b) and kaempferol (peak 10a and b). ASc, aqueous seed extract of *S. cumini*; NPASc, nanoparticle suspension containing ASc.

Table 1. Effect of the treatment with ASc and NPASc on serum biochemical and immunological parameters in rats.

Groups	Glucose	Fructosamin	Insulin	DPPIV	IL1	IL6	TNF- α	IFN- γ	IL10
Control	83.25 \pm 2.58b	0.89 \pm 0.06b	0.34 \pm 0.02a	33.19 \pm 2.34a	36.50 \pm 2.02d	43.75 \pm 1.49d	59.00 \pm 1.87e	74.75 \pm 2.28e	96.00 \pm 2.5
CA	83.75 \pm 6.90b	0.83 \pm 0.11b	0.39 \pm 0.02a	35.65 \pm 3.69a	130.0 \pm 5.46ab	136.0 \pm 3.24b	158.3 \pm 1.49b	209.5 \pm 6.06a	59.50 \pm 2.5
CA+ASc	90.05 \pm 4.53b	0.86 \pm 0.10b	0.39 \pm 0.02a	34.34 \pm 3.82a	99.75 \pm 0.85c	113.0 \pm 1.95e	137.3 \pm 1.79f	187.8 \pm 5.61c	66.50 \pm 2.2
CA+NPASc	90.50 \pm 1.91b	1.06 \pm 0.03b	0.35 \pm 0.02a	33.16 \pm 3.89a	89.00 \pm 0.91c	101.0 \pm 2.48ce	127.0 \pm 2.55df	177.8 \pm 6.14c	79.50 \pm 2.2
DM	358.2 \pm 18.89a	2.15 \pm 0.13a	0.17 \pm 0.01b	37.86 \pm 3.13a	86.75 \pm 3.70c	93.25 \pm 3.27c	121.8 \pm 2.32d	126.0 \pm 2.04d	66.50 \pm 2.2
DM+CA	346.50 \pm 14.99a	2.04 \pm 0.27a	0.16 \pm 0.01b	39.82 \pm 3.95ab	149.8 \pm 6.29e	169.3 \pm 4.85a	189.3 \pm 6.11a	216.8 \pm 8.23a	51.00 \pm 2.1
DM+CA+ASc	180.2 \pm 8.75c	1.07 \pm 0.10b	0.18 \pm 0.02b	41.04 \pm 3.05b	140.3 \pm 5.96abe	149.0 \pm 7.03b	175.5 \pm 7.63b	203.0 \pm 9.11a	54.50 \pm 2.2
DM+CA+NPASc	153.10 \pm 8.83d	1.02 \pm 0.14b	0.37 \pm 0.03a	44.47 \pm 2.24b	127.0 \pm 6.33b	141.5 \pm 6.34b	166.8 \pm 7.71b	206.0 \pm 1.68a	65.75 \pm 1.1

Values are expressed as mean \pm SEM. Values are expressed as mean \pm SEM. Different letters indicate significant difference among groups ($p < 0.05$, ANOVA-Duncan's test). Glucose (mg/dL); fructosamine (mmol/L); insulin (ng/mL); DPP-IV (U/L); IL1, IL6, IL10 and TNF- α (pg/mL); IFN- γ (μ g/mL).

Table 2. Effect of the treatment with ASc and NPASc on biochemical parameters in lymphocyte suspension.

Groups	ADA	DPPIV	AChE	NOx
Control	2.52 \pm 0.15e	104.00 \pm 4.91c	0.67 \pm 0.04b	57.68 \pm 4.75d
CA	6.59 \pm 0.22b	153.20 \pm 6.54a	0.76 \pm 0.03b	239.10 \pm 10.72b
CA+ASc	4.65 \pm 0.33c	140.50 \pm 5.47ab	0.76 \pm 0.05b	264.70 \pm 8.68b
CA+NPASc	2.73 \pm 0.25e	154.40 \pm 9.49a	0.78 \pm 0.08b	248.00 \pm 12.24b
DM	7.30 \pm 0.54b	131.30 \pm 2.56b	1.13 \pm 0.09a	230.10 \pm 12.69b
DM+CA	6.24 \pm 0.11b	132.50 \pm 4.76b	1.11 \pm 0.07a	237.00 \pm 12.47b
DM+CA+ASc	5.13 \pm 0.39c	125.70 \pm 7.36b	0.65 \pm 0.01b	135.90 \pm 7.41c
DM+CA+NPASc	3.30 \pm 0.37d	128.90 \pm 10.02b	0.73 \pm 0.01b	138.3 \pm 7.22c

Values are expressed as mean \pm SEM. Values are expressed as mean \pm SEM. Different letters indicate significant difference among groups ($p < 0.05$, ANOVA-Duncan's test). ADA (U/L/mg of protein); DPPIV (U/L); NOx (μ mol/L); AChE (umol AcSCh/h/mg of protein).

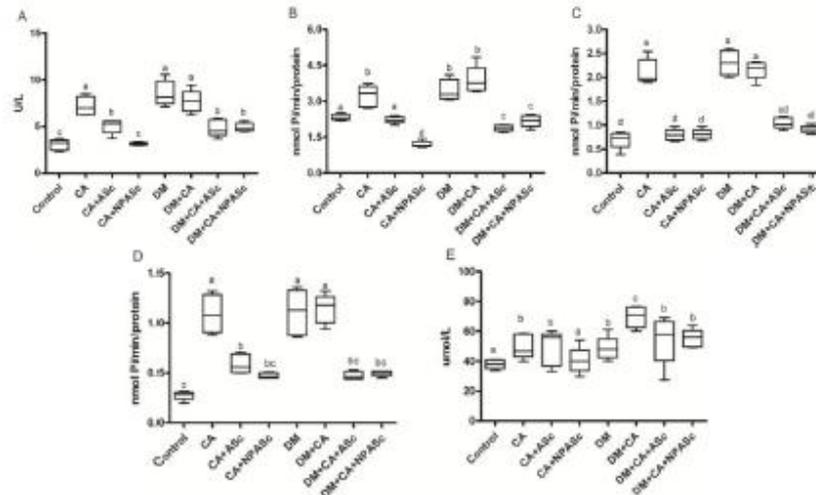


Fig. 2: NTPDase using ATP and ADP and 5'NT using AMP serum activities and NO serum levels in control, diabetic and/or *C. albicans*-infected rats treated or not with ASc or NPASc. Values are expressed as mean \pm SEM. Different letters indicate significant difference among groups ($p < 0.05$, ANOVA-Duncan's test). a= ADA (U/L); b= AMP, c= ADP (nmol Pi/min/protein); d= ATP (nmol Pi/min/protein) and e= NO (μ mol/L).

Biochemical parameters in lymphocyte suspension

Table 2 shows an increase in lymphocytic ADA, DPPIV and AChE activities and in NO levels in DM and DM+CA rats, when compared to control. The administration of ASc and NPASc prevented the increase in these values, except for DPPIV activity in comparison with DM+CA. Moreover, it was observed an increase in ADA and DPPIV activity and in NO levels in *C. albicans*-infected rats. Only ADA activity was reversed by the treatment with ASc and NPASc in these animals.

ADA, 5'-NT and NTPDase activities and NO levels in serum

An increase in serum ADA, 5'-NT and NTPDase activities was observed in DM and DM+CA when compared to

control. ASc (DM+CA+ASc) and NPASc (DM+CA+NPASc) were able to decrease these activities when compared to DM+CA (Fig. 2). The activities of these enzymes were also increased in CA group in relation to control, and once again, both treatments (CA+ASc and CA+NPASc) effectively decreased ADA, 5'-NT and NTPDase activities when compared to CA.

NO levels were increased in DM ($p < 0.05$) and CA ($p < 0.05$) and an exacerbated increase was observed in DM+CA ($p < 0.01$) in relation to control. The administration of ASc or NPASc reversed these levels when compared to DM+CA. Conversely, ASc did not affect NO levels in CA+ASc, but NPASc treatment (CA+NPASc) was able to reverse this parameter to near normalcy.

Table 3: Effect of the treatment with ASc and NPASc on ADA activity and NOx levels in tissues.

Groups	Kidney		Liver		Pancreas	
	ADA	NOx	ADA	NOx	ADA	NOx
Control	37.72±3.72d	145.30±11.40e	6.98±0.72d	569.0±15.07b	11.85±1.02bc	427.8±41.47d
CA	45.94±3.12bc	265.00±8.46b	13.63±0.36a	637.2±37.20ab	13.13±0.79bc	633.6±39.53b
CA+ASc	39.41±2.64cd	198.30±5.82d	12.59±0.44ab	642.7±25.87ab	9.83±0.85c	411.0±6.02d
CA+NPASc	44.02±2.05bc	192.30±13.12d	12.65±0.38ab	552.9±36.10b	10.91±1.96c	374.0±33.94d
DM	55.44±4.92b	283.40±9.48ab	14.75±0.67a	672.8±38.95a	17.35±1.74a	520.9±11.03c
DM+CA	51.03±1.93b	293.20±5.70a	14.52±1.39a	680.9±28.60a	13.74±0.50b	639.0±33.66b
DM+CA+ASc	39.98±2.65cd	234.00±8.42c	10.35±0.50bc	703.6±27.27c	10.75±0.91bc	811.5±16.79a
DM+CA+NPASc	40.79±0.86cd	212.2±7.33cd	9.92±1.23c	559.2±31.93b	10.84±0.86bc	637.9±24.47b

Values are expressed as mean ± SEM. Values are expressed as mean ± SEM. Different letters indicate significant difference among groups ($p < 0.05$, ANOVA-Duncan's test). ADA (U/L/mg of protein); NOx ($\mu\text{mol/L}$).

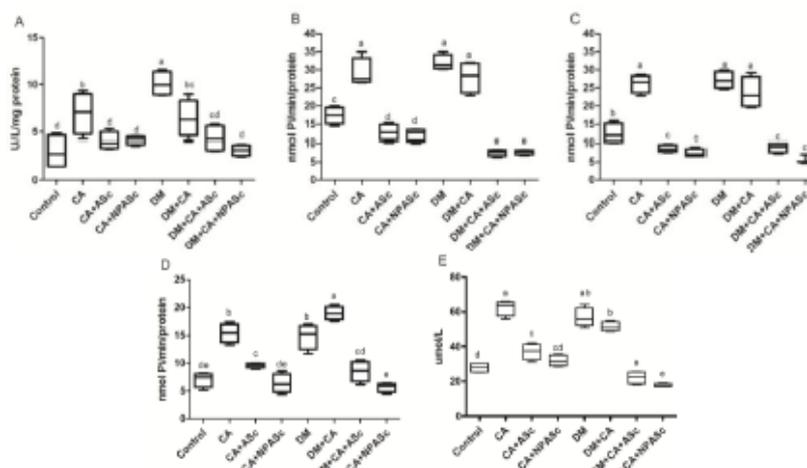


Fig. 3: NTPDase using ATP and ADP and 5'-NT using AMP activities and NO levels in platelets of control, diabetic and/or *C. albicans*-infected rats treated or not with ASc or NPASc. Values are expressed as mean ± SEM. Different letters indicate significant difference among groups ($p < 0.05$, ANOVA-Duncan's test). a= ADA (U/L); b= AMP, c= ADP (nmol Pi/min/protein); d= ATP (nmol Pi/min/protein) and e= NO ($\mu\text{mol/L}$).

ADA, 5'-NT and NTPDase activities and NO levels in platelets

Similarly to the effects observed in serum, ADA, 5'-NT and NTPDase activities were also increased in platelets of DM and/or *C. albicans*-infected animals. The enzymatic activities were decreased in the groups treated with ASc and NPASc. Likewise, NO levels were also increased in DM, CA, and DM+CA, but the treatment was only able to normalize NO levels in CA+NPASc (Fig. 3).

ADA and NO in tissues

ADA activity was increased in animals with DM and/or infected with *C. albicans*, mainly in the kidney and liver. Kidney and liver ADA activities in DM animals infected with *C. albicans* and treated with ASc (DM+CA+ASc) or NPASc (DM+CA+NPASc) were decreased when compared to the respective control (DM+CA) (Table 3). This effect was not observed in non-diabetic rats infected with *C. albicans* and treated with ASc (CA+ASc) or NPASc (DM+CA+NPASc). Pancreas ADA activity did not differ among groups, except for the significant increase observed in DM ($p < 0.01$). Kidney NO levels were also increased in rats with DM and/or *C. albicans* infection in

comparison to the control group. Groups treated with ASc (CA+ASc and DM+CA+ASc) and NPASc (CA+NPASc and DM+CA+NPASc) showed a significant decrease in kidney NO levels in comparison to their respective controls (CA and DM+CA). In the liver, an increase in NO levels was observed in DM and CA, and the treatment with ASc (DM+CA+ASc) and NPASc (DM+CA+NPASc) had effect when compared to DM+CA ($p < 0.01$). Finally, an increase in NO levels was observed in the pancreas of animals in DM, CA and DM+CA groups when compared to the control group. The treatment was only effective in CA+ASc and CA+NPASc when compared with CA.

In vivo antifungal activity

Fungal tissue burden counts in kidney and liver were of 10.25 ± 0.85 CFU/g and 2.53 ± 0.39 CFU/g (CA) and of 13.25 ± 1.25 and 3.66 ± 0.8 CFU/g (DM+CA), respectively. Kidney and liver of rats treated with ASc showed fungal load of 9.5 ± 0.5 and 2.5 ± 0.5 CFU/g (CA+ASc) and 12.25 ± 1.01 and 2 ± 0.57 CFU/g (DM+CA+ASc), respectively. Kidney and liver of rats treated with NPASc showed fungal load of 7.3 ± 0.5 and 2 ± 0.1 CFU/g (CA+NPASc) and 11 ± 2.05 and 1.25 ± 0.25 CFU/g

(DM+CA+NPASc), respectively. No fungi were recovered from animals not infected by *C. albicans* (control and DM).

DISCUSSION

We examined the metabolic changes in a short-term DM model with *C. albicans* infection, their association with inflammatory changes and disturbances in adenine nucleosides and nucleotides and the treatment with *S. cumini* seeds in the form of extract and polymeric nanoparticles. DM promoted an increase in 5'-NT and NTPDase activities in serum and platelets as a response to metabolic insult, which is in agreement with other studies (Lunkes *et al.*, 2003; Lunkes *et al.*, 2004; Schmatz *et al.*, 2013). Curiously, the animals inoculated with *C. albicans* also showed an increase in ATP, ADP and AMP hydrolysis in serum and platelets, contributing to an increase in adenosine production. This was accompanied by an increase in ADA activity, which could be related to an attempt of the organism to compensate organic alterations such as the high levels of ATP released during inflammation, leading to an increase in adenosine deamination. In line with the enhancement of ectonucleotidase activities in serum and platelets, ADA activity was increased in kidney, liver and pancreas of DM animals, corroborating previous studies (Schmatz *et al.*, 2009; Bitencourt *et al.*, 2015). An increase in ADA activity was also observed in the same organs of *C. albicans*-infected animals. The decrease in adenosine levels is likely to contribute to a high inflammatory state well-known in DM, with increased release of pro-inflammatory cytokines (IL-1, IL-6, TNF- α and IFN- γ) and NO, as observed in DM, CA and DM+CA groups. These groups also showed increased ADA and DPPIV activities in lymphocyte suspension. This may be related to the interaction of ADA and DPPIV on T cells, resulting in costimulatory signs responsible for the activation of the T-cell receptor, presenting an important role in immune responses (Gorrell *et al.*, 2001; Elgün *et al.*, 2001).

Taken together, these findings indicate that the upregulation of ectoenzymes in serum and lymphocytes, which reflects in the immune system, and in the platelets, an important source of nucleotides and nucleosides, may play important roles in (1) controlling cellular responses induced by diabetes complications and (2) attenuating systemic changes caused by the fungal infection (Schmatz *et al.*, 2013; Idzko *et al.*, 2014). An important finding of this study was that both ASc and NPASc were able to reduce 5'-NT, NTPDase and ADA activities in cells and serum, and thus facilitating the regulation of the immune system for assisting the host response in an attempt to control the inflammation caused by DM and *C. albicans*. Moreover, ASc and NPASc decreased the activity of this enzyme in the kidney and liver of the treated groups, thus modulating adenosine concentrations. This effect is highly relevant, since adenosine has been proven to play an important role in the modulation of insulin action on glucose metabolism in different tissues and to reduce inflammation and tissue injury (Rutkiewicz and Górski, 1990;

Cuzzocrea *et al.*, 2000). The model of candidiasis used in the present experiment is a sub-acute systemic infection that is usually well tolerated by the animals for several weeks, is not cleared spontaneously and mimics human infection (Fisher *et al.*, 1989). Therefore, as expected, we observed an increase in pro-inflammatory cytokines in the group infected with *C. albicans*. Moreover, hyperglycemia is known to increase the production of free radicals and to induce inflammation, which can lead to a permanent stimulation of immune cells (Buchta *et al.*, 2013; Kim *et al.*, 2014).

This is in agreement with the extremely strong inflammatory response observed in DM rats infected with *C. albicans*. Nonetheless, ASc and NPASc were able to decrease the levels of pro-inflammatory cytokines and to increase the levels of the anti-inflammatory cytokine IL-10, attenuating the deleterious effects of the exacerbated inflammatory response. These results are likely to be related to the modulation of ectonucleotidase activities by *S. cumini*, reflecting in the increase of extracellular adenosine and, consequently, regulating host immune responses. Moreover, secondary metabolites of *S. cumini* extract have been reported to block the activation of nuclear factor kappa B (NF- κ B), a proinflammatory transcription factor that leads to activation of inflammatory mediators in several pathologies (Donepudi *et al.*, 2012; Swami *et al.*, 2012).

The antifungal activity of *S. cumini in vitro* is still quite controversial (Chandrasekaran and Venkatesalu, 2004; Shad *et al.*, 2014), possibly due to different concentrations of phytochemical compounds present in extract formulations of plants obtained from different geographical areas. Previously, we have reported that gallic and chlorogenic acids, compounds which are present in greater quantities in the extract, showed low or no antifungal activity against fungi when evaluated alone. Notwithstanding, the formulations containing the whole extract, ASc and NPASc, showed increased antifungal activity *in vitro*, demonstrating a synergistic effect when the compounds are used together (Bitencourt *et al.*, 2016).

Here we observed that DM rats had higher fungal burden than non-diabetic. No antifungal activity was observed for ASc, but liver and kidney of rats treated with NPASc showed lower fungal burden in comparison to controls. The antifungal activity, associate with the immune response developed by the animals, support the hypothesis that the anti-inflammatory activity of the extract *in vivo* is more prominent than the antifungal activity. To the authors' knowledge, this is the first study evaluating the effects of *S. cumini* in DM rats with candidiasis.

The role that host-derived ACh plays in modulating the growth and pathogenicity of microorganisms is unclear. We observed an increase in AChE activity in lymphocyte suspensions in DM, CA and DM+CA groups. ASc and NPASc were equally able to decrease the activity of AChE in DM+CA+ASc and DM+CA+NPASc, increasing ACh levels, which has recently been shown to be an inhibitor of *C. albicans* biofilm formation and pathogenicity (Rajendran *et al.*, 2015).

Indeed Indeed, ACh has anti-inflammatory properties that could have modulated the immune responses in the rats, contributing to increase IL-10 levels. In line with Helmstadter (2008), we observed a hypoglycemic effect in the animals treated with ASc, but NPASc treatment was able to reduce the glucose more effectively, probably because of its capacity to normalize insulin levels. PCL polymer has been used in the development of nanoparticulate systems of natural products and has presented several advantages such as maintaining the antioxidant capacity, bioavailability, solubility and stability of polyphenols (Sanna *et al.*, 2015; Ng *et al.*, 2015). Consequently, it can promote an improvement of the known pharmacological activity of these substances such as stimulating insulin secretion from the remaining β -cells and mimicking insulin activity, resulting in peripheral glucose uptake (Ayyanar *et al.*, 2013).

The effects of STZ on β -cells may be mediated by local liberation of NO from STZ within islets, contributing to a part of its diabetogenic potential and exaggerating β -cell necrosis (Turk *et al.*, 1993). In fact, other studies have reported an increased NO concentration in serum and tissues (Yang *et al.*, 2014; Sokolovska *et al.*, 2015; Varsha *et al.*, 2015) and inducible nitric oxide synthase (iNOS) overexpression in STZ-induced diabetic rats (Al-Rejaie *et al.*, 2015). In this context, we observed an increase in NO levels not only in pancreas, but also in the liver and kidneys of DM and/or *C. albicans*-infected animals, which can be related to the fact that besides of the enhancement in interactions of superoxide with NO in the oxidative diabetic environment, NO is involved in pathogen killing mechanism and contributes to damage in other tissues (Shahani and Sawa, 2011; Samarghandian *et al.*, 2013). The higher effect of NPASc in decreasing the levels of NO in tissues in comparison to ASc can be attributed to the physico-chemical characteristics of nanoparticles that can facilitate crossing membranes and interacting more effectively (Jain and Kumar, 2010). A second advantage of this formulation is its high capacity to encapsulate not only hydrophilic but also lipophilic compounds such as rutin and quercetin, which have important pharmacological actions and can be adsorbed in the polymeric wall. In addition, this system provides greater protection against oxidation and other degrading reactions that occurs in the initial segments of intestine, where phenolic substances present in the extract have major absorption (Mora-Huertas, 2010; Ferriz and Vinová, 2010; Bonifácio *et al.*, 2014).

CONCLUSION

In conclusion, the involvement of ectonucleotidases during infections has been described for several microorganisms. However, there is little information on how these enzymes would contribute to the understanding of pathological condition in fungal infections. Rats with DM and/or *Candida* infection showed increased levels of ectonucleotidases and pro-inflammatory cytokines. ASc and NPASc were able to attenuate hyperglycemia and to prevent the increase in cytokine levels and in ectonucleotidase and AChE activities. As purines are recognized

for their important role in modulating processes linked to inflammation, this may take action to regulate cytokine levels which in turn helped to decrease NO levels. Thus, we suggest that the modulation of ectoenzyme activities can be one of the mechanisms by which *S. cumini* act on cytokines that affect the development of chronic complications of DM. Of note, since NPASc was able to maintain the properties of the crude extract, this drug delivery system may be used for other hydrophilic drugs of medicinal plant origin.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

ACKNOWLEDGMENT

The authors wish to thank the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq-Pq303245/2014-0). The first author acknowledges the fellowship from the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

REFERENCES

- Al-Rejaie SS, Aleisa AM, Abuhashish HM, Parmar MY, Ola MS, Al-Hosaini AA, Ahmed MM. Naringenin neutralises oxidative stress and nerve growth factor discrepancy in experimental diabetic neuropathy. *Neurol Res*, 2015; 37: 924-933.
- Ayyanar M, Subash-Babu P, Ignacimuthu S. *Syzygium cumini* (L.) Skeels., a novel therapeutic agent for diabetes: folk medicinal and pharmacological evidences. *Complement. Ther Med*, 2013; 21: 232-43.
- Bitencourt PER, De Bona KS, Cargnelutti LO, Bonfanti G, Pigatto A, Boligon A, Athayde ML, Pierezan F, Zanette RA, Moretto MB. *Syzygium cumini* seed extract ameliorates adenosine deaminase activity and biochemical parameters but does not alter insulin sensitivity and pancreas architecture in a short-term model of diabetes. *J Complement. Integr Med*, 2015; 12: 187-193.
- Bitencourt PER, Ferreira LM, Cargnelutti LO, Denardi L, Boligon A, Fleck M, Brandão R, Athayde ML, Cruz L, Zanette RA, Alvez SH, Moretto MB. A new biodegradable polymeric nanoparticle formulation containing *Syzygium cumini*: Phytochemical profile, antioxidant and antifungal activity and *in vivo* toxicity. *Ind Crops Prod*, 2016; 83: 400-407.
- Borovikova LV, Ivanova S, Zhang M, Yang H, Botchkina GI, Watkins LR, Wang H, Abumrad N, Eaton JW, Tracey KJ. Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. *Nature*, 2000; 405: 458-462.
- Boteanu RM, Uyy E, Suica VI, Antohe F. High-mobility group box 1 enhances the inflammatory process in diabetic lung. *Arch Biochem Biophys*, 2015; 6: 55-64.
- Bonifácio BV, Silva PBD, Ramos MADS, Negri KMS, Bauab TM, Chorilli M. Nanotechnology-based drug delivery systems and herbal medicines: a review. *Int J Nanomed*, 2014; 9: 1-15.
- Buchta V, Matula V, Kestřánek J, Vejsová M, Křivčiková L, Špaček J. Je diabetes mellitus rizikový faktor kvasinkového poševního zánětu? Is diabetes mellitus a risk factor in genital yeast infections? *Česká Gynekol*, 2013; 78: 537-544.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Portal da Saúde: Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. 2009. Available at: http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2015/janeiro/05/programa_nacional-plantas-medicinais-fitoter-picos-pupnfm.pdf [Accessed: Fev de 2016].
- Chan KM, Delfert D, Junger KD. A direct colorimetric assay for Ca²⁺-stimulated ATPase activity. *Anal Biochem*, 1986; 157: 375-380.

- Chandrasekaran M, Venkatesalu V. Antibacterial and antifungal activity of *Syzygium jambolanum* seeds. *J Ethnopharmacol*, 2004; 91: 105-108.
- Cuzzocrea S, Mazzon E, Calabro G, Dugo L, De Sarro A, van De LOO FA, Caputi AP. Inducible nitric oxide synthase knockout mice exhibit resistance to pleurisy and lung injury caused by carrageenan. *Am J Respir Crit Care Med*, 2000; 162: 1859-1866.
- Da Silva NC, Regis ACD, Esquibel MA, Santos JES, Almeida MZ. Uso de plantas medicinais na comunidade quilombola da Barra II - Bahia, Brasil. *Boletim Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 2012; 11: 435-453.
- De Bona KS, Bonfanti G, Bitencourt PE, Cargnelutti LO, Da Silva TP, Zanette RA, Pigatto AS, Moretto M. *Syzygium cumini* is more effective in preventing the increase of erythrocytic ADA activity than phenolic compounds under hyperglycemic conditions *in vitro*. *J Physiol Biochem*, 2014; 70: 321-30.
- Donepudi AC, Aleksunes LM, Driscoll MV, Seeram NP, Slitt AL. The traditional Ayurvedic medicine, *Eugenia Jambolana* (Jamun Fruit) decreases liver inflammation, injury, and fibrosis during cholestasis. *Liver Int*, 2012; 32: 560-573.
- Ellman GL, Courtney DK, Andres V, Feather-Stone RM. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol*, 1961; 7: 88-95.
- Elgin S, Keskinoglu A, Yilmaz E. Tissue dipeptidyl peptidase IV and adenosine deaminase activities in benign prostatic hypertrophy and prostate cancer. *Cancer Res Ther Control*, 2001; 11: 107-11.
- Ferriz JM, Vinová J. Prodrug design of phenolic drugs. *Curr Pharm Des*, 2010; 16: 4491-4499.
- Fisher MA, Lee PG, Tarry WF. Fluconazole (UK-49,858) treatment of candidiasis in normal and diabetic rats. *Antimicrob Agents Chemother*, 1989; 33: 1042-1045.
- Fraga-Silva TF, Marchetti CM, Mimura LA, Locachevic GA, Golim MA, Venturini J, Arruda MS. Relationship among short and long term of hypoinsulinemia-hyperglycemia, dermatophytosis, and immunobiology of mononuclear phagocytes. *Mediators Inflamm*, 2015; 342345.
- Giusti G, Galanti B, 1984. Colorimetric method. In: Bergmeyer HU, editor. *Methods of enzymatic analysis*. Weinheim: Verlag Chemie, 315-23.
- Gorrell MD, Gysbers V, McCaughan GW. CD26: a multifunctional integral membrane and secreted protein of activated lymphocytes. *Scand J Immunol*, 2001; 54: 249-264.
- Helmstader A. *Syzygium cumini* (L.) SKEELS (Myrtaceae) against diabetes-125 years of research. *Die Pharmazie*, 2008; 63: 91-101.
- Idzko M, Ferrari D, Riegel AK, Eltzschig H. Extracellular nucleotide and nucleoside signaling in vascular and blood disease. *Blood*, 2014; 124: 1029-1037.
- Jain JP, Kumar N. Development of amphotericin B loaded polymersomes based on (PEG)3-PLA co-polymers: Factors affecting size and *in vitro* evaluation. *Eur J Pharm Sci*, 2010; 40: 456-465.
- Jarnolowska B, Bielkiewicz K, Iwan M, Sidor K, Kostyra E, Kaczmarek M. Serum activity of dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV; EC 3.4.14.5) in breast-fed infants with symptoms of allergy. *Peptides*, 2007; 28: 678-82.
- Joshi N, Caputo GM, Weitekamp MR, Karchmer AW. Infections in patients with diabetes mellitus. *N Engl J Med*, 1999; 341: 1906-1912.
- Kameoka J, Tanaka T, Nojima Y, Schlossman SF, Morimoto C. Direct association of adenosine deaminase with a T cell activation antigen, CD26. *Science*, 1993; 261: 466-9.
- Kim JS, Lee YH, Kim JC, Ko YH, Yoon CS, Yi HK. Effect of exercise training of different intensities on anti-inflammatory reaction in streptozotocin-induced diabetic rats. *Biol Sport*, 2014; 31: 73-79.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 1951; 193: 265-75.
- Lunkes G, Lunkes D, Stefanello F, Morsch A, Morsch V, Mazzanti C, Schetinger MR. Enzymes that hydrolyze adenine nucleotides in diabetes and associated pathologies. *Thromb Res*, 2003; 109: 189-194.
- Lunkes GI, Lunkes DS, Morsch VM, Mazzanti CM, Morsch AL, Miron VR, Schetinger MR. NTPDase and 5'- nucleotidase activities in rats with alloxan-induced diabetes. *Diabetes Res Clin Pract*, 2004; 65: 1-6.
- Mora-Huertas CE, Fessi H, Elaissari A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. *Int J of Pharmaceutics*, 2010; 385: 113-14.
- Ng YJ, Benson HAE, Brown DH, Chen Y. Synthesis and characterization of novel copolymeric resveratrol conjugates. *J Chem*, 2015; 1-6.
- Oses JP, Cardoso CM, Germano RA, Kirst IB, Rucker B, Furstnau CR, Wink MR, Bonan CD, Battastini AM, Sarkis JJ. Soluble NTPDase: An additional system of nucleotide hydrolysis in rat blood serum. *Life Sci*, 2004; 74: 3275-3284.
- Prince PS, Menon VP, Pari L. Hypoglycemic activity of *Syzygium cumini* seeds: effect on lipid peroxidation in alloxan diabetic rats. *J Ethnopharmacol*, 1998; 61: 1-7.
- Quintana-Guerrero D, Alleman E, Doelker E, Fessi H. Preparation and characterization of nanocapsules from preformed polymers by new process based on emulsification-diffusion technique. *Pharm Res*, 1998; 15: 1056-1062.
- Rajendran R, Borghi E, Falleni M, Perdoni F, Tosi D, Lappin DF, O'Donnell L, Greetham D, Ramage G, Nile C. Acetylcholine protects against *Candida albicans* infection by inhibiting biofilm formation and promoting hemocyte function in a *Galleria mellonella* infection model. *Eukaryot Cell*, 2015; 14: 834-844.
- Rutkiewicz J, Gorski J. On the role of insulin in regulation of adenosine deaminase activity in rat tissues. *FEBS Lett*, 1990; 271: 79-80.
- Sai Ram M, Sharma SK, Ilavazhagan G, Kumar D, Selvamurthy W. Immunomodulatory effects of NIM-76, a volatile fraction from neem oil. *J Ethnopharmacol*, 1997; 55: 133-139.
- Samadder A, Das S, Das J, Paul A, Khuda-Bukhsh AR. Ameliorative effects of *Syzygium jambolanum* extract and its poly(lactic-co-glycolic acid) nano-encapsulated form on arsenic-induced hyperglycemic stress: a multi-parametric evaluation. *J Acupunct Meridian Stud*, 2012; 5: 310-8.
- Samarghandian S, Borji A, Delkosh MB, Samini F. Safranal treatment improves hyperglycemia, hyperlipidemia and oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Pharm Pharm Sci*, 2013; 16: 352-362.
- Sanna V, Lubinu G, Madau P, Pala N, Nurra S, Mariani A, Sechi M. Polymeric nanoparticles encapsulating white tea extract for nutraceutical application. *J Agric Food Chem*, 2015; 63: 2026-32.
- Schmatz R, Schetinger MR, Spanevello RM, Mazzanti CM, Stefanello N, Maldonado PA, Gutierrez J, Corrêa M de C, Girotto E, Moretto MB, Morsch VM. Effects of resveratrol on nucleotide degrading enzymes in streptozotocin induced diabetic rats. *Life Sci*, 2009; 84: 345-350.
- Schmatz R, Mann TR, Spanevello R, Machado MM, Zanini D, Pimentel VC, Stefanello N, Martins CC, Cardoso AM, Bagatini M, Gutierrez J, Leal CA, Pereira LB, Mazzanti C, Schetinger MR, Morsch VM. Moderate red wine and grape juice consumption modulates the hydrolysis of the adenine nucleotides and decreases platelet aggregation in streptozotocin-induced diabetic rats. *Cell Biochem Biophys*, 2013; 65: 129-43.
- Schön E, Demuth HU, Barth A, Ansoorge S. Dipeptidyl peptidase IV of human lymphocytes. Evidence for specific hydrolysis of glycylproline p-nitroamide in T-lymphocytes. *Biochem J*, 1984; 223: 255-8.
- Shad AA, Ahmad S, Ullah R, Abdel-Salam NM, Fouad H, Rehman NU, Hussain H, Saeed W. Phytochemical and Biological Activities of Four Wild Medicinal Plants. *ScientificWorldJournal*, 2014.
- Shahani N, Sawa A. Nitric oxide signaling and nitrosative stress in neurons: role for S-nitrosylation. *Antioxid Redox Signal*, 2011; 14: 1493-1504.
- Sokolovska J, Isajevs S, Rostoka E, Sjakste T, Trapiņa I, Osina K, Paramonova N, Sjakste N. Changes in glucose transporter expression

and nitric oxide production are associated with liver injury in diabetes. *Cell Biochem Funct*, 2015; 33: 366-374.

Swami SB, Thakor NSJ, Patil MM, Haldankar PM. Jammu (*Syzygium cumini* (L.)): A Review of Its Food and Medicinal Uses. *Food and Nutrition Sciences*, 2012; 3: 1100-1117.

Tatsch E, Bochi GV, Pereira RS, Kober H, Agertt VA, de Campos MM, Gomes P, Duarte MM, Moresco RN. A simple and inexpensive automated technique for measurement of serum nitrite/nitrate. *Clin Biochem*, 2011; 44: 348-350.

Turk J, Corbett JA, Ramanadham S, Bohrer A, McDaniel ML. Biochemical evidence for nitric oxide formation from streptozotocin in isolated pancreatic islets. *Biochem Biophys Res Commun*, 1993; 197: 1458-1464.

Varsha S, Raman T, Manikandan R, Dhanasekaran G. Hypoglycemic action of vitamin K1 protects against early-onset diabetic nephropathy in streptozotocin-induced rats MKN. *Nutrition*, 2015; 31: 1284-1292.

Vizzotto M C, Pereira M C. Caracterização das propriedades funcionais do jambolão. *Embrapa Clima Temperado. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento*, 2008; 79: 1-26.

Yang SJ, Lee J, Kim WEA, Dal Nam K, Hahn HG, Young Choi S, Cho SW. Effects of N-adamantyl-4-methyl thiazol-2-amine on hyperglycemia, hyperlipidemia and oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats. *Eur J Pharmacol*, 2014; 736: 26-34.

How to cite this article:

Bitencourt PER, Cargnelutti LO, Stein CS, Lautenschlager R, Ferreira LM, Sangoi M, Boligon A, Duarte MMMF, Moresco RN, Cruz L, Zanette RA, Alves SH, Moretto MA. Anti-inflammatory action of seed extract and polymeric nanoparticles of *Syzygium cumini* in diabetic rats infected with *Candida albicans*. *J App Pharm Sci*, 2016; 6 (xx): xxx-xxx.

4 MANUSCRITO

4.1 *SYZYGIUM CUMINI* LOADED POLYMERIC NANOPARTICLES OR SEED EXTRACT AMELIORATE OXIDATIVE STRESS MARKERS AND OTHER BIOCHEMICAL PARAMETERS IN DIABETIC RATS INFECTED WITH *CANDIDA ALBICANS*

Manuscrito submetido ao periódico **Pharmaceutical Biology**

Syzygium cumini* loaded polymeric nanoparticles or seed extract ameliorate oxidative stress markers and other biochemical parameters in diabetic rats infected with *Candida albicans

Paula E. R. Bitencourt^{a*}, Lariane O. Cargnelutti^a, Carolina S. Stein^a, Raquel Lautenchleger^a, Luana M. Ferreira^b, Manuela Sangoi^a, Laura Denardi^c, Raphaela M. Borges^a, Aline Boligon^b, Rafael N. Moresco^a, Letícia Cruz^b, Régis A. Zanette^d, Sydney H. Alves^c, Maria Beatriz Moretto^a.

^aDepartamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil.

^bDepartamento de Farmácia Industrial, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Brazil.

^cDepartamento de Microbiologia, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Brazil.

^dPrograma de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Farmacologia e Terapêutica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

*Corresponding author: Paula Eliete Rodrigues Bitencourt. Department of Clinical and Toxicological Analysis, Health Science Center, Federal University of Santa Maria (UFSM), Roraima Avenue 1000, 97105-900, Santa Maria, Brazil.

Tel +55 55 32208804. Email: bitencourt.paula@yahoo.com.br

Keywords: advanced oxidation protein product; N-acetyl- β -d-glucosaminidase; TBARS; streptozotocin; diabetic complications; animal models

Word count: 4555

Abstract

Context: *Syzygium cumini* (Myrtaceae) is a medicinal plant widely used in folk medicine for the treatment of diabetes mellitus (DM). However, studies on the use of this plant and of nanoparticle formulations against DM-related fungal infections are scarce.

Objective: To evaluate the effect of the treatments with aqueous seed extract of *S. cumini* (ASc) and ASc-loaded polymeric nanoparticles (NPASc) on biochemical parameters in diabetic rats infected or not by *Candida albicans*.

Materials and methods: Male Wistar rats were divided into eight groups: Control, DM, *C. albicans*, *C. albicans* + ASc, *C. albicans* + NPASc, DM + *C. albicans*, DM + *C. albicans* + ASc and DM + *C. albicans* + NPASc. Rats were daily treated with ASc or NPASc (100 mg/kg) for 21 days. Biochemical parameters in serum and urine, advanced oxidation protein product (AOPP) and TBARS levels in serum, kidney, liver and pancreas and N-acetyl- β -d-glucosaminidase (NAG) activities in kidney and urine were evaluated.

Results: Biochemical and oxidative stress parameters increased in rats with DM and/or candidiasis. NPASc was more effective than ASc in decreasing glucose (56%), cholesterol (33%) and creatinine (51%) levels; serum (16%) and pancreatic (46%) AOPP and serum (25%) and renal (48%) TBARS levels when compared with DM + *C. albicans* group. In *C. albicans* group, both treatments decreased NAG activity but did not decrease creatinine levels.

Conclusion: These data suggest that the use of nanotechnology is able to improve plant extract properties such as antioxidant activity that may be useful in diabetes-related complications.

Introduction

Diabetes mellitus (DM) is a chronic condition that occurs in response to the lack or reduction of insulin production or by the ineffectiveness of the insulin produced, resulting in increased levels of glucose in the blood. According to the International Diabetes Federation (IDF 2015), there are currently about 415 million diabetic patients, while in 2040 this disease will affect 642 million people. Over time, the resulting high levels of glucose in the blood causes damage to many tissues in the body, leading to the development of disabling and life-threatening health complications (IDF 2015).

Exposure to hyperglycemia not only causes a decrease in leukocyte function but also lead to a permanent stimulation of polymorphonuclear cells and therefore a less pronounced

cellular response to an infective stimulus (Buchta et al. 2013). This is associated with an increased susceptibility of DM patients to fungal infections, such as those caused by *Candida albicans*. During microbial infection, the immune system cells expose the microbes to various insults including reactive nitrogen species (RNS), reactive oxygen species (ROS) and cationic streams. A lower formation of these free radicals and consequently in this route of microbial elimination is observed in DM (Miramón et al. 2012).

The conventional antifungal therapy has shown many adverse effects, including damage to the liver and kidneys, which may contribute to the aggravation of renal lesions in diabetic patients. In this context, it is necessary to increase the number of studies on the use of natural products with strong pharmacological actions and that can act in the pathophysiology of DM, preventing the development and progression of the complications of this disease. *Syzygium cumini* (L.) Skeels (Myrtaceae) is a plant known for its hypoglycemic, hypolipidemic, antifungal, anti-inflammatory and antioxidant pharmacological properties, which are attributed to the presence of bioactive compounds in different parts of the plant, especially the seeds (Ayyanar & Subash-babu 2012; Ayyanar et al. 2013; Srivastava & Chandra 2013). Nevertheless, the therapeutic effect of medicinal plants has been questioned due to very low bioavailability of the main constituents after metabolic transformation by the liver (Conte et al. 2016). Recently our group demonstrated that polymeric nanoparticles containing an aqueous extract of *S. cumini* were able to maintain the antioxidant properties and to enhance the antifungal activity of the extract *in vitro* (Bitencourt et al. 2016). In particular, polymeric nanoparticles prove to be a valuable alternative, since they can control the release of drugs, are biocompatible, biodegradable and exhibit increased stability when compared to other systems. Considering the growing number of diabetic patients, the recurrent cases of fungal infection in this population and the search for alternative treatments that can alleviate the deleterious effects of DM, this study was aimed at evaluating the effect of treatments with an aqueous seed extract of *S. cumini* (ASc) and ASc-loaded polymeric nanoparticles (NPASc) on biochemical parameters in rats with DM infected or not by *C. albicans*.

Methods

Chemicals

Ethyl acetate, methanol, acetonitrile, acetic acid, gallic acid, chlorogenic acid, caffeic acid and ellagic acid were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Polysorbate 80 (Tween 80[®]), poly- ϵ -caprolactone (PCL), sorbitan monooleate (Span 80[®]), streptozotocin

(STZ), catechin, quercetin and rutin reference standards were acquired from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). All other chemicals were of analytical grade and were obtained from standard commercial suppliers.

Extract and nanoparticle suspension preparation, characterization and phytochemical analysis

S. cumini seeds were collected (29°43'22"S and 53°43'47"W, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil) and identified by the Laboratory of Botanic and Pharmacognosy of the Federal University of Santa Maria (voucher number SMDB 14.001). A suspension of 100 g of seeds in 200 ml of distilled water was stirred magnetically overnight (12 h) at room temperature. This was repeated three consecutive times. The residue was removed by filtration and the extract evaporated to dryness at a lower temperature (40 °C) under reduced pressure in a rotary evaporator. The residual extract was dissolved in water for further use (Prince et al. 1998). NPASc were prepared by the emulsification/evaporation solvent method (Quintanar-Guerrero et al. 1998), with modifications according to Bitencourt et al. (2016). Briefly, 10 mg of ASc were dissolved in an aqueous phase containing 1% polysorbate 80. An organic phase (ethyl acetate) containing 1% PCL and 1% sorbitan monooleate was also prepared. After 60 min, the aqueous phase was added to the organic phase, forming the primary emulsion. This emulsion was kept under strong magnetic stirring for 20 min and then a second aqueous phase containing 2% polysorbate 80 was added to the primary emulsion. After 20 min, the emulsion was transferred to a high shear mixer (Marconi, MA-102/PLUS) and stirred at 6000 rpm during 10 min. Then, ethyl acetate was eliminated through rotary evaporation. The total phenolic content present in NPASc (n= 3) was determined by diluting an aliquot of the sample in 10 mL acetonitrile followed by 10 min sonication. Samples were filtered and injected into the HPLC system.

The presence of seven antioxidant compounds in ASc and NPASc, namely gallic, chlorogenic, caffeic and ellagic acids and catechin, quercetin and rutin was investigated by HPLC-DAD. Reverse phase chromatography analyses were carried out under gradient conditions using a C₁₈ column (4.6 mm x 150 mm, 5 µm). The mobile phase was composed of water containing 2% acetic acid (A) and acetonitrile (B). The chromatography peaks were confirmed by comparing their retention times with those of reference standards and by DAD spectra (200 to 500 nm). Calibration curves for each substance were: gallic acid, $Y = 13973x + 1095.6$ ($r = 0.9993$); catechin, $Y = 11840x + 1178.2$ ($r = 0.9998$); epicatechin, $Y = 12542x + 1412.7$ ($r = 0.9991$); chlorogenic acid, $Y = 11864x + 1252.8$ ($r = 0.9994$); caffeic acid, $Y =$

13178x + 1267.2 (r = 0.9999); ellagic acid, Y = 12681x + 1164.9 (r = 0.9998); rutin, Y = 13077x + 1265.4 (r = 0.9992); isoquercitrin, Y = 11927x + 1306.2 (r = 0.9996); quercitrin, Y = 13470x + 1293.7 (r = 0.9994) and quercetin, Y = 12693x + 1176.0 (r = 0.9997). All chromatographic operations were carried out at ambient temperature and in triplicate.

Induction of diabetes, Candida albicans infection and experimental design

The rats were reared, before and after treatment, under similar environmental conditions, with food and drinking water *ad libitum*. In this study, the animals were divided into eight groups (n= 6) as follows:

Control rats;

DM: diabetic rats;

CA: rats infected with *C. albicans*;

CA+ASc: rats infected with *C. albicans* and treated with ASc;

CA+NPASc: rats infected with *C. albicans* and treated with NPASc;

DM+CA: diabetic rats infected with *C. albicans*;

DM+CA+ASc: diabetic rats infected with *C. albicans* and treated with ASc;

DM+CA+NPASc: diabetic rats infected with *C. albicans* and treated with NPASc.

Type 1 DM was induced in male albino Wistar rats (weighing 150-200 g) by intraperitoneal injection of streptozotocin at a dose of 60 mg/kg (Bitencourt et al. 2015). Only diabetic rats with a fasting blood glucose level of at least 250 mg/dL were included in the experiment. Fifteen days after DM induction, rats in groups 3-8 were inoculated intraperitoneally with 0.2 mL of a suspension containing 10⁵ colony forming units (CFU)/mL obtained from a clinical *C. albicans* strain (Fischer et al. 1989).

ASc and NPASc were administered by gavage at a dose of 100 mg/kg (Bitencourt et al. 2015). At day 21 of experiment, the rats were anesthetized with isoflurane, euthanized by decapitation and blood and urine were collected. Samples of liver, kidneys and pancreas were rapidly dissected, weighed and homogenized in appropriate buffer.

All animal experiments were conducted in accordance with principles for laboratory animal use and care, as described in the guidelines of the Ethics Committee for Animal Research of the Federal University of Santa Maria, which approved the experimental protocol (n° 074/2014).

Biochemical analysis

Serum obtained by centrifugation was analyzed spectrophotometrically for glucose, fructosamine, total protein, cholesterol, triacylglycerol and creatinine levels using commercial

diagnostic kits (Labtest Diagnóstica, Brazil). The hepatic glycogen content was determined by the method previously described (Krisman 1962) and the results were expressed as mg of glycogen per mg of tissue.

Oxidative stress levels

The protein oxidation was assessed through measurement of advanced oxidation protein product (AOPP) concentrations in serum and tissues (Witko-Sarsat et al. 1998). Lipid peroxidation was estimated in serum and tissues by measurement of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) (Ohkawa et al. 1979; Buege & Aust 1978). The protein concentration was measured by the method of Lowry et al. 1981, using bovine serum albumin as the standard.

N-acetyl- β -d-glucosaminidase (NAG) assay and urinary parameters

Kidney homogenates and urine samples were added to an enzyme reaction mixture that consists of a substrate (p-nitrophenyl-n-acetyl- β -d-glucosaminide) dissolved in sodium citrate buffer (pH 4.4). Samples were incubated at 37 °C for 15 min, and the reaction was stopped by adding 2-amino-2-methyl-1-propanol buffer (pH 10.25). NAG activity is proportional to the absorbance of the liberated p-nitrophenylate ion measured spectrophotometrically at 405 nm after correction of absorbance using a urine blank sample (Horak et al. 1981). The protein concentration was measured by the method of Lowry et al. (1980). Urinary glucose levels and total protein were determined using commercial diagnostic kits (Labtest Diagnóstica, Brazil).

Statistical analysis

Data were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Duncan's *post hoc* test using Statistica 6.0 software (StatSoft. Inc., USA). The limit of statistical significance was set at $p < 0.05$. The results were expressed as mean \pm SEM.

Results and Discussion

Efforts have been made on the developing nanoparticles with physical, chemical and biological biocompatible properties that can be applied to optimize and overcome limitations on the use of medicinal plants, improving solubility and increasing the rate of release, penetration and distribution of vegetal extracts (Mora-Huertas 2010; Rezaei-kelishadi et al.

2014; Bonifácio et al. 2014). ASc has high concentrations of phenols and flavonoids (gallic acid: 10.79 mg/g; catechin: 2.25 mg/g; chlorogenic acid: 5.62 mg/g; caffeic acid: 2.65 mg/g; ellagic acid: 2.08 mg/g; rutin: 7.76 mg/g; quercetin: 2.78 mg/g), which were not altered in NPASc (gallic acid: 10.16 mg/g; catechin: 2.23 mg/g; chlorogenic: 5.44 mg/g; caffeic acid: 2.18 mg/g; ellagic acid: 2.02 mg/g; rutin: 7.60 mg/g; quercetin: 2.75 mg/g). The development of NPASc was successful, as already previously demonstrated (Bitencourt et al. 2016).

As expected, animals with DM (DM and DM+CA groups) showed significantly increased serum levels of glucose, fructosamine, cholesterol, triglycerides and creatinine, and significantly decreased levels of protein and hepatic glycogen (Table 1), when compared to Control. The treatment of diabetic animals infected with *C. albicans* with NPASc (DM+CA+NPASc) achieved better therapeutic effect than the treatment with ASc (DM+CA+ASc) in attenuating total cholesterol, creatinine and serum glucose levels, when compared to DM+CA group. The hypoglycemic and hypolipidemic action of the ASc has been shown in the literature (Ayyanar et al. 2013; Bitencourt et al. 2015). In addition, the main compounds found in ASc and NPASc, gallic acid, chlorogenic acid and rutin, have been studied for their hypoglycemic activity in rat models of DM (Saklani et al. 2016, Kade et al. 2014; Meng et al. 2013). Nonetheless, the superior effects observed for NPASc are likely to be related to the physicochemical properties of these structures such as greater protection against oxidation and other degrading reactions that occur in the initial segments of intestine, where the phenolic substances present in the extract have major absorption (Ferriz & Vinová 2010; Bonifácio et al. 2014).

A significant increase in proteinuria, glycosuria and NAG urinary excretion was observed in diabetic animals infected or not by *C. albicans* (DM and DM+CA). It has been demonstrated that DM causes changes in the activity of kidney enzymes, thereby leading to increased excretion of proteins and glucose and culminating in the development of kidney damage (Komala et al. 2014). NAG is a lysosomal brush border enzyme found in the proximal tubular cells and, because of its relatively high molecular weight (>130 kDa), it is not filtered through the glomeruli. However, NAG is released into the urine after renal tubular injury, which justifies its use as a marker of proximal tubular injury of diverse causes (Liangos et al. 2007; Vaidya et al. 2008; Moresco et al. 2013). In addition, previous studies have suggested that this enzyme is also produced by *C. albicans* strains, and is likely to be involved in the pathogenicity of this fungal species, favoring the growth and colonization of cell surfaces (Niimi et al. 1997). Interestingly, an increase in serum creatinine levels and in

kidney and urinary NAG activity was also observed in nondiabetic rats infected with *C. albicans* (CA; Table 1).

In non-diabetic rats infected with *C. albicans*, the treatments with ASc and NPASc were effective in reducing urinary and kidney NAG activity, but did not reduce serum creatinine levels. In diabetic groups infected with *C. albicans*, treatments reduced serum creatinine levels, proteinuria and glycosuria. Indeed, NPASc was more effective than ASc in reducing the levels of serum creatinine and urinary NAG activity. Under inflammation, interstitial spaces are wider, allowing the retention of polymeric nanoparticles and the release of the extract to exert its pharmacological actions within the affected tissue (Tian et al. 2011).

Oxidative stress in DM increases non-enzymatic protein glycation forming advanced glycation end-products (AGEs) and a class of compounds with physicochemical characteristics similar to AGEs, named AOPP (Selmeçi 2011). In the present study, we observed an increased in the AOPP levels in serum and kidney in DM, CA and DM+CA groups when compared to Control (Table 2). The increase in AOPP formation is related to the degree of oxidative modifications in proteins and to inflammation, in line with the results of kidney NAG activity. A significantly increase in AOPP levels was also observed in the liver and pancreas of the DM group in comparison to Control. The increase in AOPP levels has been associated with DM, including in animal models, and may influence the development of chronic inflammatory complications of this pathology (Lee et al. 2010; Tiwari et al. 2014; Koroglu et al. 2015; Badawy et al. 2015). NPASc treatments (CA+NPASc and DM+CA+NPASc) had superior effect ($P<0.01$) when compared to ASc ($P<0.05$; CA+ASc and DM+CA+NPASc) in decreasing the AOPP levels in serum and pancreas, when compared to respective controls (CA and CA+DM). Most of *S. cumini* active principles such as flavonoids are highly soluble in water and have poor lipid solubility. These characteristics severely limit their ability to cross biological membranes, altering the pharmacodynamic profile of therapeutic compounds. Therefore, the results observed with AOPP may be related to the characteristics of polymeric nanoparticles such as enhancement of solubility, bioavailability, therapeutic index, stability and controlled delivery, as well as to the antioxidant and anti-inflammatory properties of the extract constituents (Rasoanaivo et al. 2011; Conte et al. 2016). Recently, a liposomal formulation was able to improve the oral bioavailability and antioxidant activity of chlorogenic acid (Feng et al. 2016). Moreover, chlorogenic acid-loaded chitosan nanoparticles showed a controlled release profile and a preserved antioxidant activity under *in vitro* conditions (Nallamuthu et al. 2015). Chitosan is a nontoxic polymer with permeation enhancing properties that is very used in combination with PCL. In the same way, a d- α -tocopheryl polyethylene glycol 1000 succinate

nanoemulsion showed significant improvement in solubility, *in vitro* release, *ex vivo* permeation and antioxidant activity of rutin (Sharma et al. 2015). A silica nanoparticle presented similar effects for gallic acid (Hu et al. 2013).

TBARS levels in serum, kidney, liver and pancreas showed a similar, significant increase in DM, CA and DM+CA groups when compared to Control (Table 2). This shows that both the infection and the DM promote oxidative stress but do not act synergistically. Nonetheless, despite the production of free radicals is a mechanism by which macrophages kill pathogens, systemic oxidative stress is not considered a threat to the pathogen (Enjalbert et al. 2007). Therefore, attenuating this process would benefit the host against the deleterious effects of oxidative stress. ASc and NPASc treatments were able to decrease TBARS levels in the treated groups (CA+ASc, CA+NPASc, DM+CA+NPASc, DM+CA+NPASc) when compared to respective control groups (CA and DM+CA). The high antioxidant power of *S. cumini* is attributed to the presence of phenols and flavonoids, which helps to counteract the pro-oxidant response of the host (Ayyanar et al. 2013).

Conclusions

The present study demonstrated that diabetes and/or *C. albicans* infection alter biochemical parameters in serum, urine and tissues of rats. The evaluated parameters indicated that NPASc was more effective than ASc improving the antioxidant properties of the extract and ameliorating oxidative burst evoked by DM and/or candida infection in rats. Therefore, ASc and NPASc could be used as an adjunctive therapy for chronic complications of DM.

Acknowledgment

The authors wish to thank the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq-Pq303245/2014-0). The first author acknowledges the fellowship from the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Declaration of Interest

The authors report no declaration of interest.

References

Ayyanar M, Subash-Babu P. 2012. *Syzygium cumini* (L.) Skeels: A review of its phytochemical constituents and traditional uses. Asian Pac J Trop Biomed. 2:240-246.

Ayyanar M, Subash-Babub P, Ignacimuthuc S. 2013. *Syzygium cumini* (L.) Skeels., a novel therapeutic agent for diabetes: Folk medicinal and pharmacological evidences. *Complement Ther Med.* 21:232-243.

Badawy EA, Rasheed WI, Elias TR, Hussein J, Harvi M, Morsy S, Mahmoud Yel-L. 2015. Flaxseed oil reduces oxidative stress and enhances brain monoamines release in streptozotocin-induced diabetic rats. *Hum Exp Toxicol.* 34:1-6.

Bitencourt PER, Ferreira LM, Cargnelutti LO, Denardi L, Boligon A, Fleck M, Brandao R, Athayde ML, Cruz L, Zanette RA, et al. 2016. A new biodegradable polymeric nanoparticle formulation containing *Syzygium cumini*: phytochemical profile, antioxidant and antifungal activity and in vivo toxicity. *Ind Crop Prod.* 83:400-407.

Bitencourt PE, Bona KS, Cargnelutti LO, Bonfanti G, Pigatto A, Boligon A, Athayde ML, Pierozan F, Zanette RA, Moretto MB. 2015. *Syzygium cumini* seed extract ameliorates adenosine deaminase activity and biochemical parameters but does not alter insulin sensitivity and pancreas architecture in a short-term model of diabetes. *J Complement Integr Med.* 12:187-93.

Bonifácio BV, Silva PBD, Ramos MADS, Negri KMS, Bauab TM, Chorilli M. 2014. Nanotechnology-based drug delivery systems and herbal medicines: a review. *Int J Nanomedicine.* 9:1-15.

Buchta V, Matula V, Kestřánek J, Vejsová M, Křivčíková L, Špaček, J. 2013. Je diabetes mellitus rizikový factor kvasinkového poševního zánětu? Is diabetes mellitus a risk factor in genital yeast infections? *Česká Gynekol.* 78:537-544.

Buege JA, Aust SD. 1978. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 52:302-10.

Conte R, Luca I, Luise A, Petillo O, Calarco A, Peluso G. 2016. New Therapeutic Potentials of Nanosized Phytomedicine. *J Nanosci Nanotech.* 16:8176–8187.

Enjalbert B, MacCallum M, Odds FC, Brown AJP. 2007. Nich specific activation of the oxidative stress response by the pathogenic fungus *Candida albicans*. *Infect Immun*. 75:2143-51.

Feng Y, Sun C, Yuan Y, Zhu Y, Wan J, Firempong CK, Omari-Siaw E, Xu Y, PuZ, Yu J, Xu X. 2016. Enhanced oral bioavailability and in vivo antioxidant activity of chlorogenic acid via liposomal formulation. *Int J Pharm*. 30:342-349.

Ferriz JM, Vinová J. 2010. Prodrug design of phenolic drugs. *Curr Pharm Des*. 16:4491-4499.

Fisher MA, Lee PG, Tarry W F. 1989. Fluconazole (UK-49,858) treatment of candidiasis in normal and diabetic rats. *Antimicrob Agents Chem*. 33:1042-1045.

Horak E, Hopfer SM, Sunderman Jr FW. 1981. Spectrophotometric assay for urinary N-acetyl-beta-d-glucosaminidase activity. *Clin Chem*. 27:1180-5.

Hu H, Nie L, Feng S, Suo J. 2013. Preparation, characterization and in vitro release study of gallic acid loaded silica nanoparticles for controlled release. *Pharmazie*. 68:401-405.

International Diabetes Association (IDF). 2015. *Diabetes Atlas*, 7th ed. Russels, Belgium, 2015.

Kade II, Ogunbolude Y, Kamdem JP, Rocha JBT. 2014. Influence of gallic acid on oxidative stress-linked streptozotocin-induced pancreatic dysfunction in diabetic rats. *J Basic Clin Physiol Pharmacol*. 25:35-45.

Kaloriti D, Jacobsen M, Yin Z, Patterson M, Tillmann A, Smith DA, Cook E, You T, Grimm MJ, Bohovych, E, et al. 2014. Mechanisms underlying the exquisite sensitivity of *Candida albicans* to combinatorial cationic and oxidative stress that enhances the potent fungicidal activity of phagocytes. *MBio*. 5:e01334-14.

Kamiyama, A, Niimi M, Tokunaga M, Nakayama H. 1989. Adansonian study of *Candida albicans*: intraspecific homogeneity excepting *C. stellatoidea* strains. *J Med Vet Mycol*. 27:229- 241.

Komala MG, Gross S, Mudaliar H, Huang C, Pegg K, Mather A, Shen S, Pollock CA, Panchapakesan U. 2014. Inhibition of kidney proximal tubular glucose reabsorption does not prevent against diabetic nephropathy in type 1 diabetic eNOS knockout mice. *PLoS One*. 9:e108994.

Koroglu P, Senturk GE, Yucel D, Ozakpinar OB, Uras F, Arbak S. 2015. The effect of exogenous oxytocin on streptozotocin (STZ)-induced diabetic adult rat testes. *Peptides*. 63:47-54.

Krisman CR. 1962. A method for the colorimetric estimation of glycogen with iodine. *Anal Biochem*. 4:17-23.

Lee SH, Nam BY, Kang EW, Han SH, Li JJ, Kim do H, Kim SH, Kwak SJ, Park JT, Chang TI, et al. 2010. Effects of an oral adsorbent on oxidative stress and fibronectin expression in experimental diabetic nephropathy. *Nephrol Dial Transplant*. 25:2134-41.

Liangos O, Perianayagam MC, Vaidya VS, Han WK, Wald R, Tighiouart H, MacKinnon RW, Li L, Balakrishnan VS, Pereira BJ, Bonventre JV, Jaber BL. 2007. Urinary N-acetyl-beta-(D)-glucosaminidase activity and kidney injury molecule-1 level are associated with adverse outcomes in acute renal failure. *J Am Soc Nephrol*. 18:904-12.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 193:265-75.

Meng S, Cao J, Feng Q, Peng J, Hu Y. 2013. Roles of Chlorogenic Acid on Regulating Glucose and Lipids Metabolism: A Review. *J Evid Based Complementary Altern Med*. 801457.

Miramón P, Dunker C, Windecker H, Bohovych IM, Brown AJP, Kurzai O, Hube B. 2012. Cellular responses of *Candida albicans* to phagocytosis and the extracellular activities of neutrophils are critical to counteract carbohydrate starvation, oxidative and nitrosative stress. *Plos one* 7: e52850.

Mora-Huertas CE, Fessi H, Elaissari A. 2010. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. *Int J Pharm.* 385:113-14.

Moresco RN, Sangoi MB, De Carvalho JA, Tatsch E, Bochi GV. 2013. Diabetic nephropathy: traditional to proteomic markers. *Clin Chim Acta.* 5:17-30.

Munro CA, Winter K, Buchan A, Henry K, Becker JM, Brown AJ, Bulawa CE, Gow NA. 2001. Chs1 of *Candida albicans* is an essential chitin synthase required for synthesis of the septum and for cell integrity. *Mol Microbiol.* 39:1414-26.

Nallamuthu I, Devi A, Khanum F. 2015. Chlorogenic acid loaded chitosan nanoparticles with sustained release property, retained antioxidant activity and enhanced bioavailability. *AJPS.* 10:203-211.

Niimi K, Niimi M, Shepherd MG, Cannon RD. 1997. Regulation of N-acetylglucosaminidase production in *Candida albicans*. *Arch Microbiol.* 168:464-4724.

Ohkawa H, Oshishi N, Yagi K. 1979. Assay of lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem.* 95:351-358.

Prince PSM, Menon VP, Pari L. 1998. Hypoglycaemic activity of *Syzigium cumini* seeds: effect on lipid peroxidation in alloxan diabetic rats. *J Ethnopharmacol.* 61:1-7.

Quintanar-Guerrero D, Alleman E, Doelker E, Fessi H. 1998. Preparation and characterization of nanocapsules from preformed polymers by new process based on emulsification-diffusion technique. *Pharm Res.* 15:1056-1062.

Rasoanaivo P, Wright CW, Willcox ML, Gilbert B. 2011 Whole plant extracts versus single compounds for the treatment of malaria: synergy and positive interactions. *Malar J.* 10:S4

Rezaei-kelishadi M, Nuri M, Erfani Z, Palizban A, Parandin P. 2014. Control, management and treatment of diabetes using modern drug delivery systems and special properties of nanoparticles. *J Biol Today's World.* 3:206-211.

Saklani R, Gupta SK, Mohanty IR, Kumar B, Srivastava S, Mathur R. 2016. Cardioprotective effects of rutin via alteration in TNF- α , CRP, and BNP levels coupled with antioxidant effect in STZ-induced diabetic rats. *Mol Cell Biochem.* 420:65-72.

Sharma S, Sahni JK, Ali J, Baboota S. 2015. Effect of high-pressure homogenization on formulation of TPGS loaded nanoemulsion of rutin – pharmacodynamic and antioxidant studies. *Drug Deliv.* 22:541-551.

Selmeci L. 2011. Advanced oxidation protein products (AOPP): novel uremic toxins, or components of the non-enzymatic antioxidant system of the plasma proteome? *Free Radical Res.* 45:1115-1123.

Srivastava S, Chandra D. 2013. Pharmacological potentials of *Syzygium cumini*: a review. *J Sci Food Agric.* 93:2084-2093.

Tian H, Tang Z, Zhuang X, Chen X, Jing X. 2011. Biodegradable synthetic polymers: Preparation, functionalization and biomedical application. *Prog Polym Sci.* 37:237-280.

Tiwari BK, Kumar D, Abidi AB, Rizvi SI. 2014. Efficacy of composite extract from leaves and fruits of medicinal plants used in traditional diabetic therapy against oxidative stress in alloxan-induced diabetic rats. *ISRN Pharmacology.* 4:608590.

Vaidya VS, Waikar SS, Ferguson MA, Collings FB, Sunderland K, Gioules C, Bradwin G, Matsouaka R, Betensky RA, Curhan GC, Bonventre JV. 2008. Urinary biomarkers for sensitive and specific detection of acute kidney injury in humans. *Clin Transl Sci.* 1:200-8.

Witko-Sarsat V, Friedlander M, Nguyen Khoa T, Capeillère-Blandin C, Nguyen AT, Canteloup S, Dayer JM, 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.* 161:2524-32.

Table 1. Effect of the treatment with ASc and NPASc in biochemical parameters in rats.

	Control	DM	CA	CA+ASc	CA+NPASc	DM+CA	DM+CA+ASc	DM+CA+NPASc ^c
Serum								
Glucose	83.25 ± 2.6b	358.2 ± 18.9a	83.75 ± 6.9b	90.05 ± 4.5b	90.50 ± 1.9b	346.50 ± 15a	180.2 ± 8.75c	153.10 ± 8.8d
Fructosamin	0.89 ± 0.1b	2.15 ± 0.1a	0.83 ± 0.1b	0.86 ± 0.1b	1.06 ± 0.1b	2.04 ± 0.3a	1.07 ± 0.1b	1.02 ± 0.1b
Cholesterol	86.84 ± 2.2b	107.4 ± 4a	85.17 ± 1.9b	79.28 ± 5.4b	76.45 ± 3.4b	111.8 ± 5.7a	89.13 ± 3.1b	74.71 ± 5.7c
Triglycerides	80.61 ± 3.4b	162.1 ± 9.4a	86.35 ± 3.1b	90.57 ± 3.2b	80.19 ± 6b	151.5 ± 3a	90.49 ± 5.8b	90.22 ± 4.3b
Creatinine	0.31 ± 0.02d	0.56 ± 0.05a	0.48 ± 0.01bc	0.40 ± 0.02c	0.44 ± 0.04bc	0.49 ± 0.08ab	0.30 ± 0.03d	0.24 ± 0.02d
Protein	6.91 ± 0.3a	5.43 ± 0.2b	6.86 ± 0.2a	6.55 ± 0.3a	6.53 ± 0.3a	5.80 ± 0.2b	6.64 ± 0.4a	6.84 ± 0.3a
Hepatic glycogen	1.23 ± 0.03b	0.82 ± 0.05e	1.12 ± 0.06b	1.13 ± 0.04b	1.21 ± 0.02b	0.91 ± 0.04c	1.60 ± 0.08a	1.82 ± 0.16a
Urine								
Glucose	4.55 ± 0.4c	460.50 ± 14.4a	4.50 ± 0.6c	4.68 ± 0.3c	5.11 ± 0.6c	429.70 ± 26.7a	211.90 ± 11.1b	215.00 ± 9.4b
Protein	88.17 ± 8.3ce	134.80 ± 8.6b	82.86 ± 3.8ce	71.06 ± 6.1c	78.39 ± 9.3c	181.2 ± 8a	93.35 ± 6.7de	84.14 ± 10e
Urinary NAG	0.44 ± 0.04e	3.65 ± 0.40c	1.29 ± 0.11d	0.88 ± 0.10de	0.65 ± 0.10e	7.63 ± 1.13a	5.66 ± 0.29b	3.95 ± 0.40c
Kidney NAG	549.6 ± 23e	1306 ± 13a	1234 ± 37a	834.9 ± 27d	800.4 ± 31d	1120 ± 25a	998.7 ± 30c	946.8 ± 23c

Values are expressed as mean ± SEM (n = 6). Mean values with different letters in a row differ (P < 0.05) by the Duncan test. DM: diabetic rats; CA: rats infected with *C. albicans*; CA+ASc: rats infected with *C. albicans* and treated with ASc; CA+NPASc: rats infected with *C. albicans* and treated with NPASc; DM+CA: diabetic rats infected with *C. albicans*; DM+CA+ASc: diabetic rats infected with *C. albicans* and treated with ASc; DM+CA+NPASc: diabetic rats infected with *C. albicans* and treated with NPASc. Serum: Glucose (mg/dL); Fructosamin (mmol/L); Insulin (ng/mL); Cholesterol (mg/dL); Triglycerides (mg/dL); Creatinine (mg/dL); Protein (g/dL); Hepatic glycogen (mg/mg of tissue); Urine: Glucose (mg/dL); Protein (mg/dL); Urinary NAG (U/L); Kidney NAG (U/L/mg of tissue).

Table 2. Effect of the treatment with ASc and NPASc on AOPP and lipoperoxidation in serum and tissue of rats.

	Control	DM	CA	CA+ASc	CA+NPASc	DM+CA	DM+CA+ASc	DM+CA+NPASc
Serum	AOPP	12.84 ± 0.6c	17.18 ± 0.8a	15 ± 1b	14.20 ± 0.95b	8.59 ± 0.83d	15.51 ± 0.86b	14.2 ± 0.74b
	TBARS	12.74 ± 0.3c	14.6 ± 0.3ab	14.5 ± 0.2b	13 ± 0.3b	12.4 ± 0.2d	15.7 ± 0.2a	15.2 ± 0.5b
Kidney	AOPP	21.27 ± 1.1b	27.29 ± 0.9a	27.3 ± 2.2a	23.8 ± 1ab	19.54 ± 2.3b	26.7 ± 2a	23.26 ± 1.1ab
	TBARS	0.4 ± 0.02bc	0.61 ± 0.03a	0.49 ± 0.05a	0.34 ± 0.01c	0.34 ± 0.02c	0.58 ± 0.05a	0.45 ± 0.02b
Liver	AOPP	38.4 ± 1.9bc	48.47 ± 1.9a	38.36 ± 3bc	33.2 ± 2.9c	34.59 ± 3.3c	43.9 ± 3.75ab	44.4 ± 6.7bc
	TBARS	0.13 ± 0.01c	0.28 ± 0.01a	0.24 ± 0.01ab	0.16 ± 0.01c	0.11 ± 0.01c	0.23 ± 0.01b	0.15 ± 0.01c
Pancreas	AOPP	20.8 ± 1.6bc	28.3 ± 1.18a	23.4 ± 1.9b	15.9 ± 1.82de	11.09 ± 1.3f	24.3 ± 2.2ab	18.2 ± 1.77cd
	TBARS	0.31 ± 0.03c	1.51 ± 0.13a	1.12 ± 0.12b	0.27 ± 0.02cd	0.32 ± 0.01c	1.14 ± 0.06b	0.14 ± 0.01e

Values are expressed as mean ± SEM (n = 6). Mean values with different letters in a row differ (P < 0.05) by the Duncan test. DM: diabetic rats; CA: rats infected with *C. albicans*; CA+ASc: rats infected with *C. albicans* and treated with ASc; CA+NPASc: rats infected with *C. albicans* and treated with NPASc; DM+CA: diabetic rats infected with *C. albicans*; DM+CA+ASc: diabetic rats infected with *C. albicans* and treated with ASc; DM+CA+NPASc: diabetic rats infected with *C. albicans* and treated with NPASc. AOPP (μM/L in serum and μmol/L/g of protein in tissues); TBARS (nmol of MDA/ml in serum and nmol of MDA/mg protein in tissues).

5 CONSIDERAÇÕES GERAIS

Dentre as plantas que exibem alto potencial farmacológico, além de ser amplamente utilizada pela população, destaca-se *S. cumini*, que apesar de extensa utilização de diferentes partes dessa planta, é a semente que concentra os principais metabólitos responsáveis pelas suas diversas propriedades já relatadas. O extrato aquoso de sementes de *S. cumini* (ASc) apresentou uma alta concentração de compostos fenólicos e flavonoides na sua caracterização fitoquímica, que devido as suas características, torna relevante o desenvolvimento de uma nanopartícula polimérica. A NPASc apresentou resultados compatíveis com sistemas nanométricos, além de manter a composição fitoquímica do extrato de forma praticamente inalterada, exibir alto potencial antioxidante frente as metodologias testadas (DPPH, FRAP e LDL-ox) e até mesmo potencializar a atividade antifúngica do extrato frente as espécies como *C. guilliermondii* e *C. haemulonii*.

Os testes de toxicidade realizados, *A. salina* e toxicidade aguda em ratos, refletem que o polímero PCL e o extrato utilizado não apresentam toxicidade nas concentrações testadas. Tal fato é corroborado com estudos anteriores que não demonstraram toxicidade de ASc mesmo em altas concentrações (RAVI et al., 2004a). É importante ressaltar que a nanopartícula branca (NPb) foi igualmente submetida aos testes, não demonstrando qualquer atividade *per se* ou toxicidade. A importância e ineditismo de nosso trabalho encontram-se, principalmente, na utilização de um extrato aquoso de sementes de *S. cumini*, já que até o momento, somente Samadder et al. (2012), descreveram a utilização de um extrato etanólico de sementes de *S. cumini* no desenvolvimento de nanopartículas utilizando um polímero com características bastante semelhantes ao PCL.

O *S. cumini* é bastante utilizado pela população e estudos demonstraram relevantes ações farmacológicas como ação hipoglicêmica, hipolipidêmica, antioxidante dentre outras (AYYANAR; SUBASH-BABU; IGNACIMUTHU, 2013).

O aumento na exposição à hiperglicemia prejudica o sistema imunológico dos pacientes diabéticos. Neste estudo, o modelo de DM induzida experimentalmente em ratos, seguido pela infecção por *C. albicans* foi utilizado para avaliação de parâmetros relacionados à inflamação e ao estresse oxidativo após o tratamento com ASc e NPASc. Nos parâmetros relacionados com o DM no soro, os resultados foram compatíveis com a condição diabetogênica e especialmente, no grupo de

animais somente infectados com *C. albicans* e não tratados, que além do aumento nos níveis séricos de creatinina, apresentou um aumento na atividade da enzima NAG renal e urinária.

Ao mesmo tempo, NPASc teve efeito superior ao do ASc na redução dos níveis de glicose e aumento nos níveis de insulina, possivelmente devido as características físico-químicas dos sistemas nanométricos que podem ter potencializados as propriedades já descritas para *S. cumini*. Além disso, ambos os tratamentos foram capazes de reduzir estes parâmetros nos grupos de animais diabéticos. Porém, no grupo submetido apenas à infecção fúngica, ambos os tratamentos foram capazes de reduzir somente a atividade da NAG renal e urinária. O efeito superior do tratamento nos animais dos grupos diabéticos pode ser atribuído ao fato de que as células tubulares desses estão em intenso processo inflamatório, onde as células estão mais espaçadas (efeito evidenciado de permeabilidade e retenção), sendo possível que as nanopartículas poliméricas tenham ficado retidas neste espaço, permitindo que o extrato exerça suas ações farmacológicas no tecido afetado (TIAN et al., 2011).

Como esperado, os animais diabéticos apresentaram um aumento nas atividades 5'-NT e NTPDase em soro e plaquetas (LUNKES et al., 2003; LUNKES et al., 2004; SCHMATZ et al., 2009a). Curiosamente, o grupo de animais diabéticos + *C. albicans* e o grupo de animais inoculados apenas com *C. albicans* também demonstraram resultados semelhantes. Outra importante enzima dessa cascata, a ADA, apresentou resultados similares nesses mesmos grupos, em tecido renal e hepático, sendo que os linfócitos também apresentaram um aumento na atividade da DPP-IV e AChE, o que pode estar relacionado com o aumento nas citocinas pró-inflamatórias (IL-1, IL-6, TNF- α e IFN- γ). O desbalanço na atividade das enzimas relacionadas ao sistema purinérgico pode ser um dos mecanismos pelo qual é possível verificar o aumento na produção dos níveis séricos e celulares de NO nesses grupos, outra molécula também envolvida na regulação do processo inflamatório (BECKMAN; KOPPENOL, 1996).

No entanto, com relação aos níveis de NO foi verificado um aumento em todos os tecidos testados (rim, fígado e pâncreas), o que pode estar relacionado com a administração de STZ, que tem na geração de NO um dos seus mecanismos de ação, além do aumento na formação de NO por parte do hospedeiro contra os agentes patogênicos (TURK et al., 1993; KUMAR et al., 2015). O conjunto desses

resultados demonstra que, de fato, todo o sistema purinérgico está em desequilíbrio durante o DM e também na infecção por *C. albicans*, apesar de que, quando juntas essas condições patológicas apresentam semelhante aumento nas atividades enzimáticas e níveis de NO, do que quando analisadas de forma separada.

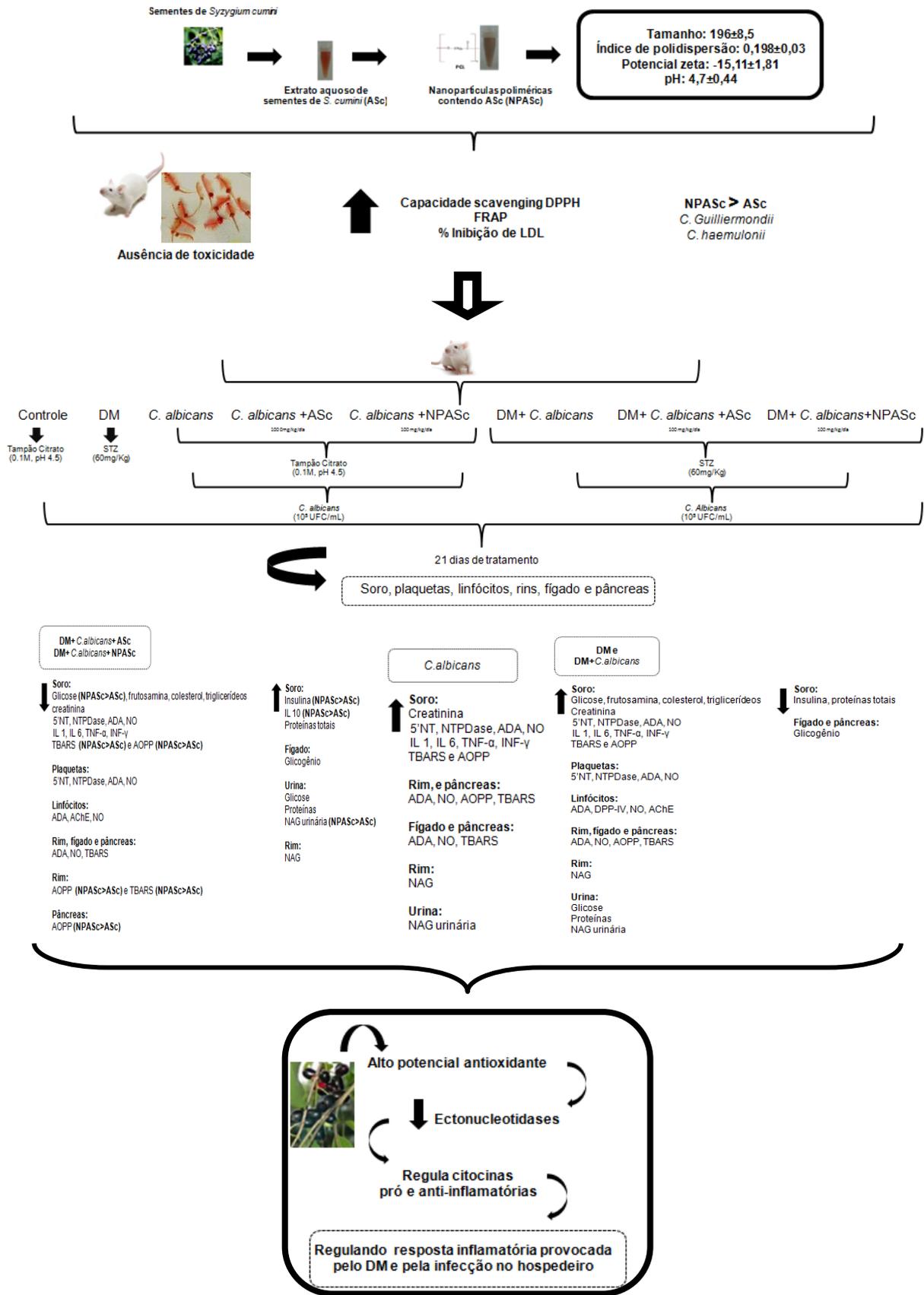
Os tratamentos com ASc e NPASc foram igualmente capazes de diminuir não somente a atividade das ectonucleotidases e, possivelmente prevenindo o aumento nos níveis de NO no soro e em plaquetas, mas também na diminuição da atividade da ADA, AChE e NO nos linfócitos dos animais infectados com *C. albicans*, DM e DM+ *C. albicans*. A regulação desses sistemas pode ter levado à diminuição dos níveis séricos de citocinas pró-inflamatórias e ao aumento nos níveis de IL-10 (anti-inflamatória), demonstrando que ambos os tratamentos demonstram capacidade de atuar em diferentes vias de forma sistêmica relacionadas à inflamação no DM. Tanto ASc quanto NPASc foram capazes de diminuir a atividade da ADA em rim e fígado dos animais do grupo DM, *C. albicans* e DM + *C. albicans*, demonstrando a capacidade de *S. cumini* na regulação tecidual dos níveis de Ado. No entanto, com relação somente a infecção por *C. albicans*, a resposta apresentada pelos tratamentos, juntamente com a redução de citocinas pró-inflamatórias, necessárias para a fagocitose do fungo, associada à moderada atividade antifúngica demonstrada no teste de suscetibilidade do ASc, NPASc e ácido gálico sugerem que a atividade anti-inflamatória do extrato é mais proeminente do que a atividade antifúngica.

Cabe ressaltar que essas alterações encontradas no sistema purinérgico e inflamatório também podem estar relacionadas com o estresse oxidativo, como demonstrado nesse trabalho, onde houve um aumento na lipoperoxidação e AOPP no soro e tecidos (renal, hepático e pancreático) nos grupos de animais diabéticos corroborando com achados da literatura que evidenciam sua relação com as complicações crônicas do DM (PFAFFLY, 2001). Além disso, no grupo de animais somente infectados com *C. albicans* foi possível observar um aumento nos níveis renais de TBARS e AOPP, demonstrando que esse tecido parece ser bastante afetado no modelo desenvolvido nesse trabalho, já que também foi possível observar um aumento nos níveis séricos de creatinina, na atividade da enzima NAG renal e urinária, comprovando que a infecção foi capaz de provocar danos nos túbulos renais.

O efeito superior das NPASc na diminuição dos níveis de NO (em tecido renal, hepático e pancreático) e AOPP (tecido renal e pancreático) pode estar relacionado com propriedades conferidas as nanopartículas poliméricas como a proteção contra degradações físico-químicas. Além disso, os compostos fenólicos e flavonóides presentes no *S. cumini* podem ter sido responsáveis pela redução da lipoperoxidação em todos os tecidos de todos os grupos tratados, já que estruturas nanométricas podem melhorar a biodistribuição dos compostos encontrados em maior quantidade no extrato, como ácido gálico, ácido clorogênico e rutina (HU et al., 2013; NALLAMUTHU et al., 2015; SHARMA et al., 2015; FENG et al., 2016). Esse resultado é bastante relevante para o hospedeiro, uma vez que, quando na presença de uma agente infeccioso, o organismo passa a produzir um excesso de radicais livres na tentativa de remover o microrganismo, o que pode provocar um desbalanço ainda maior em pacientes portadores de alguma outra patologia também produtora de RL, como o DM.

Como ainda são restritos os estudos que relacionam o efeito da infecção por *C. albicans* no DM sobre alteração de biomarcadores no hospedeiro, esses resultados representam uma importante abordagem para esclarecer o uso do extrato desta planta. Além de fornecer dados para o melhor entendimento do DM e suas complicações reforçando sua importância e o desafio em desenvolver nanopartículas poliméricas com substâncias hidrofílicas através do aprimoramento de uma formulação em escala nanométrica.

Figura 15 – Resumo gráfico



6 CONCLUSÕES

Os modelos experimentais investigados resultaram nas seguintes conclusões:

- O desenvolvimento das NPASc contendo ASc foi realizado com êxito, uma vez que as NPASc apresentaram características compatíveis com as dos sistemas nanométricos, mantendo a atividade antioxidante de *S. cumini* frente a testes realizados *in vitro*, além de potencializar a atividade antifúngica do extrato frente a *C. guilliermondii* e *C. haemulonii*;
- ASc, NPb e NPASc não apresentaram toxicidade nos testes de letalidade de *A. salina* e nos parâmetros avaliados relacionados à toxicidade aguda em ratos, refletindo a segurança do polímero e extrato utilizado;
- Em modelo experimental de complicação do DM é possível observar um desequilíbrio nos parâmetros bioquímicos quantificados em soro, enzimáticos em tecidos e células e de estresse oxidativo em soro e tecidos nos grupos *C. albicans*, DM, e DM + *C. albicans*;
- Nesses mesmos grupos pode ser verificado um aumento nas atividades das enzimas envolvidas no sistema purinérgico em soro, células e tecidos e, consecutivamente uma elevação de citocinas pró-inflamatórias e NO, demonstrando o desequilíbrio desse sistema;
- Tanto o ASc quanto as NPASc foram capazes de atenuar as alterações provocadas pelo DM e pela infecção, sugerindo que um dos possíveis mecanismos pelo qual *S. cumini* pode atuar no controle dos desequilíbrios encontrados nesse modelo é através da modulação do sistema purinérgico, aumentando os níveis de ADo e assim, diminuindo as citocinas pró-inflamatórias, os níveis de NO e melhorando o status redox do hospedeiro. Consequentemente, a ação orquestrada dessas rotas pode regular a inflamação provocada pela infecção fúngica no DM.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia Celular e Molecular**. 6. ed. Rio de Janeiro: Ed. Elsevier. 2008. 564 p.
- ABDALLA, F. H. et al. Methylmercury-induced changes in target organs of suckling rat pups. **Experimental Toxicology Pathology**, v. 64, n. 6, p. 605-609, 2012.
- ABDALLA, F. H. et al. Protective effects of *Syzygium cumini* seed extract against methylmercury-induced systemic toxicity in neonatal rats. **Biometals**, v. 24, n. 2, p. 349-356, 2011.
- ABDUL-GHANI, M. A.; DE FRONZO, R. A. Inhibition of renal glucose reabsorption: a novel strategy for achieving glucose control in type 2 diabetes mellitus. **Endocrine Practice**, v. 14, n. 6, p. 782-90, 2008.
- AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Resolução nº 90, de 16 de março de 2004**. Determina a publicação do "GUIA PARA A REALIZAÇÃO DE ESTUDOS DE TOXICIDADE PRÉ-CLÍNICA DE FITOTERÁPICOS". Disponível em: http://elegis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?mode=PRINT_VERSION&id=10242. Acesso em: 10/12/2014.
- AHLIN, P. et al. Investigation of polymeric nanoparticles as carriers of enalaprilat for oral administration. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 239, n. 1-2, p. 113-120, 2002.
- AHMED, F.; HUDED, S.; MALIK, F. A. *In vitro* study on the radical scavenging and antilipidperoxidative effects of *Eugenia jambolana* aqueous extracts. **Journal of Pharmacy Research**, v. 3, p. 198-200, 2010.
- AHMED, M. S.; REID, E.; KHARDORI, N. Respiratory infections in diabetes: Reviewing the risks and challenges. **Journal Of Respiratory Diseases**, v. 29, n. 7, p. 285-293, 2008.
- AHREN, B. Vildagliptin: an inhibitor of dipeptidyl peptidase-4 with antidiabetic properties. **Expert Opinion on Investigational Drugs**, v. 15, n.4, p. 431-442, 2006.
- AIKAWA, T.; UMEMORI-AIKAWA, Y.; FISHER, J.R. Purification and properties of the adenosine deaminase from the midgut gland of a marine bivalved mollusk *Atrina* spp. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 58, n. 4, p. 357-364, 1977.
- ALARCON-AGUILARA, F. J. et al. Study of the anti-hyperglycemic effect of plants used as antidiabetics. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 61, n. 2, p. 101-110, 1998.
- ALDRICH, M.; BLACKBURN, M.; KELLEMS, R. The importance of adenosine deaminase for lymphocyte development and function. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 272, n. 2, p. 311-335, 2000.
- ALEXIS, F. et al. Factors Affecting the Clearance and Biodistribution of Polymeric Nanoparticles. **Molecular Pharmaceutics**, v. 5, n. 4, p. 505-515, 2008.

- ALMEIDA, M. Z. **Plantas Medicinais**. 3. ed. Salvador, Bahia: Editora da Universidade Federal da Bahia, 2000, 224p.
- ALVES, R. R. N.; SILVA, C. C.; ALVES, H. N. Aspectos sócio-econômicos de comércio de plantas e animais em área metropolitana do Norte e Nordeste do Brasil. **Revista de Biologia e Ciência da Terra**, v. 8, n. 1, p. 181-189, 2008.
- ANSARI, S. H.; ISLAM, F.; SAMEEM, M. Influence of nanotechnology on herbal drugs: A Review. **Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research**, v. 3, n. 3, p. 142-146, 2012.
- ARDESTANI, A.; YAZDANPARAST, R.; JAMSHIDI, S. H. Therapeutic effects of *Teucrium polium* extract on oxidative stress in pancreas of streptozotocin-induced diabetic rats. **Journal of Medicinal Food**, v. 11, n. 3, p. 525-532, 2008.
- ASHOK, P.; DARADKA, M. M. H. Antidiabetic activity of *Syzygium cumini* seed extracts in Alloxan induced diabetic mice. **Hamdard Medicus**, v. 52, p. 41, 2001.
- ASSOCIAÇÃO AMERICANA DE DIABETES. Standards of Medical Care in Diabetes-2015. **Diabetes Care**, v. 38, p. S1-S99, 2015.
- ASSOCIAÇÃO AMERICANA DE DIABETES. Standards of Medical Care in Diabetes-2016. **Diabetes Care**, v. 39, p. S1-S199, 2016.
- ATES, M. et al. Comparative evaluation of impact of Zn and ZnO nanoparticles on brine shrimp (*Artemia salina*) larvae: effects of particle size and solubility on toxicity. **Environmental Science: Processes & Impacts**, v. 1, 2013b.
- ATES, M. et al. Effects of aqueous suspensions of titanium dioxide nanoparticles on *Artemia salina*: assessment of nanoparticle aggregation, accumulation and toxicity. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 185, n. 4, p. 3339-3348, 2013a.
- AVOGARO, A. et al. Endothelial dysfunction in type 2 diabetes mellitus. **Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases**, v. 16, p. S39-S45, 2006.
- AYYANAR, M.; SUBASH-BABU, P. *Syzygium cumini* (L.) Skeels: A review of its phytochemical constituents and traditional uses. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 2, n. 3, p. 240-246, 2012.
- AYYANAR, M.; SUBASH-BABUB, P.; IGNACIMUTHUC, S. *Syzygium cumini* (L.) Skeels., a novel therapeutic agent for diabetes: Folk medicinal and pharmacological evidences. **Complementary Therapies in Medicine**, v. 21, n. 3, p. 232-243, 2013.
- BADAWY, E. A. et al. Flaxseed oil reduces oxidative stress and enhances brain monoamines release in streptozotocin-induced diabetic rats. **Human & Experimental Toxicology**, v. 34, n. 11, p. 1-6, 2015.
- BADER, M. S. Diabetic foot infection. **American Family Physician**, v. 78, n. 1, p. 71-79, 2008.
- BAGANHA, M. F. et al. Serum and pleural adenosine deaminase. Correlation with lymphocytic populations. **Chest**, v. 97, n. 3, p. 605-610, 1990.

BAKER, S. et al. Plants: Emerging as Nanofactories towards Facile Route in Synthesis of Nanoparticles. **BiolImpacts**, v. 3, n. 3, p. 111-117, 2013.

BANSAL, R.; AHMAD, N.; KIDWAI, J. R. Effects of oral administration of *Eugenia jambolana* seeds and chlorpropamide on blood glucose level and pancreatic cathepsin B in rat. **Indian Journal of Biochemistry and Biophysics**, v. 18, n. 5, p. 377, 1981.

BARALDI, P. G.; BOREA, P. A. New potent and selective human adenosine A3 receptor antagonists. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 21, p. 456-459, 2000.

BARBEDO, L. S.; SGARBI, D. B. G. Candidíase. **DST- Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis**, v. 22, n. 1, 22-38, 2010.

BARBOSA, J. H. P.; OLIVEIRA, S. L.; SEARA, L. T. O. Papel dos produtos finais de glicação avançada (AGEs) no desencadeamento das complicações vasculares de diabetes. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 52, n. 6, p. 940-950, 2008.

BARMAN, T. E. **Enzyme Handbook**. New York: Springer Verlag, v. 2, 1696.

BARNARD, E. A.; SIMON, J.; WEBB, T. E. Nucleotide receptors in the nervous system: an abundant component using diverse transductional mechanisms. **Molecular Neurobiology**, v. 15, n. 2, p. 103-129, 1997.

BASTOS, A. et al. Diabetes and increased lipid peroxidation are associated with systemic inflammation even in well-controlled patients. **Journal of Diabetes and Its Complications**, v. 30, n. 8, p. 1593-1599, 2016.

BATLOUNI, M. Hipótese oxidativa da aterosclerose e emprego dos antioxidantes na doença arterial coronária. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 68, n. 1, p. 55-63, 1997.

BECKMAN, J. S.; KOPPENOL, W. H. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. **American Journal of Physiology**, v. 271, p. C1424-C1437, 1996.

BELLÉ, L. P. et al. **Vitis vinifera seed extract reduces adenosine deaminase activity in high glucose-treated human lymphocytes**. 1. ed. Nova Publishers, 2014, 7 p.

BELLÉ, L. P. et al. Comparative evaluation of adenosine deaminase activity in cerebral cortex and hippocampus of young and adult rats: effect of garlic extract (*Allium sativum* L.) on their susceptibility to heavy metal exposure. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 104, p. 408-413, 2009.

BELLÉ, L. P. et al. Expression of CD26 and its Association with Dipeptidyl Peptidase IV Activity in Lymphocytes of Type 2 Diabetes Patients. **Cell Biochemistry and Biophysics**, v. 61, n. 2, p. 297-302, 2011.

BERAUDI, A. et al. Distribution and expression of A1 adenosine receptors, adenosine deaminase and adenosine deaminase-binding protein (CD26) in goldfish brain. **Neurochemistry International**, v. 42, n. 6, p. 455-464, 2003.

BERGOLD, A. M.; GEORGIADIS, S. Novidades em fármacos antifúngicos: uma revisão new antifungic drugs: A Review. **Visão Acadêmica**, v. 5, n. 2, p. 159-172, 2004.

BIEDERBICK, A. First apyrase splice variants have different enzymatic properties. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 25, p. 19018-19024, 2000.

BILATI, U.; ALLÉMANN, E.; DOELKER, E. Strategic approaches for overcoming peptide and protein instability within biodegradable nano- and microparticles. **European Journal of Pharmaceutics and Pharmaceutics**, v. 59, n. 3, p. 375- 388, 2005.

BINITA, K. et al. Proteomic identification of *Syzygium cumini* seed Extracts by MALDI-TOF/MS. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 172, n. 4, p. 2091-2105, 2014.

BITENCOURT, P. E. et al. *Syzygium cumini* seed extract ameliorates adenosine deaminase activity and biochemical parameters but does not alter insulin sensitivity and pancreas architecture in a short-term model of diabetes. **Journal of Complementary and Integrative Medicine**, v. 12, n. 3, p. 187-93, 2015.

BOCHI, G. V. et al. In vitro oxidation of collagen promotes the formation of advanced oxidation protein products and the activation of human neutrophils. **Inflammation**, v. 39, n. 2, p. 916-927, 2016.

BOEYNAEMS, J. M.; COMMUNI, D. Modulation of inflammation by extracellular nucleotides. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 126, n. 5, p. 943-944, 2006.

BOHANNON, N. J. V. Treatment of vulvovaginal candidiasis in patients with diabetes. **Diabetes Care**, v. 21, n. 3, p. 451-456, 1998.

BOKAEIAN, M. et al. Effects of garlic extract treatment in normal and streptozotocin diabetic rats infected with *Candida albicans*. **Indian Journal of Clinical Biochemistry**, v. 25, n. 2, p. 182-187, 2010a.

BOKAEIAN, M. et al. *Eucalyptus globulus* (Eucalyptus) treatment of candidiasis in normal and diabetic rats. **Iranian Biomedical Journal**, v. 14, n. 3, p. 121-126, 2010b.

BONIFÁCIO, B. V. et al. Nanotechnology-based drug delivery systems and herbal medicines: a review. **International Journal of Nanomedicine**, v. 9, p. 1-15, 2014.

BOROWIEC, A. et al. Adenosine as a metabolic regulator of tissue function: production of adenosine by cytoplasmic 5'-nucleotidases. **Acta Biochimica Polonica**, v. 53, n. 2, p. 269-278, 2006.

BOTSARIS, A. S. **Fitoterapia chinesa e plantas brasileiras**. São Paulo: Ícone, 1995, p. 550.

- BOURS, M. J. et al. Adenosine 5'- triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation. **Pharmacology Therapy**, v. 112, n. 2, p. 358-404, 2006.
- BRADLEY, J. R. TNF-mediated inflammatory disease. **Journal of Pathology**, v. 214, n. 2, p. 149-160, 2008.
- BRAGANÇA, L. A. R. Aspectos gerais no preparo e no controle de qualidade de planta e fitoterápicos hipoglicemiantes. **Plantas medicinais antidiabéticas: uma abordagem multidisciplinar**. Rio de Janeiro: Universidade Federal Fluminense 1996, p. 105-22.
- BRASIL. Lei nº 5991 de 17 de dezembro de 1973. Dispõe sobre o Controle Sanitário do Comércio de Drogas, Medicamentos, Insumos Farmacêuticos e Correlatos, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 19 dez. 1973.
- BRASIL. Resolução RDC nº. 10, de 9 de março de 2010 Dispõe sobre a notificação de drogas vegetais junto à Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e dá outras providências. **Diário Oficial da União, Brasília**, DF, 10 mar. 2010.
- BRAUN, N. et al. Sequencing, functional expression and characterization of rat NTPDase6, a nucleoside diphosphatase and novel member of the ecto- nucleoside triphosphate diphosphohydrolase family. **Biochemical Journal**, v. 351, p. 639-647, 2000.
- BROOKS-WORRELL, B.; NARLA, R.; PALMER, J. P. Islet autoimmunity in phenotypic type 2 diabetes patients. **Diabetes, Obesity and Metabolism**, v. 15, n. 3, p. 137-140, 2013.
- BRUNDEGE, J. M.; DUNWIDDIE, T. V. Modulation of excitatory synaptic transmission by adenosine released from single hippocampal pyramidal neurons. **Journal of Neuroscience**, v. 16, n. 18, p. 5603-5612, 1996.
- BRUNO, G. et al. Incidence of type 1 and type 2 diabetes in adults aged 30-49 years: the population-based registry in the province of Turin, Italy. **Diabetes Care**, v. 28, p. 2613-2619, 2005
- BRUNTON, L. L.; MAYER, S. E. Extrusion of cyclic AMP from pigeon erythrocytes. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 254, n. 19, p. 9714-9720, 1979.
- BUCHTA, V. et al. Je diabetes mellitus rizikový faktor kvasinkového poševního zánětu. **Česká Gynekologie**, v. 78, n. 6, p. 537-544, 2013.
- BULCÃO, R. P. et al. Acute and subchronic toxicity evaluation of poly (epsilon-caprolactone) lipid-core nanocapsules in rats. **Toxicological Sciences**, v. 132, n. 1, p. 162-176, 2012.
- BURNSTOCK, G. Pathophysiology and therapeutic potential of purinergic signaling. **Pharmacological Reviews**, v. 58, n. 1, p. 58-86, 2006.
- BURNSTOCK, G. Purine and pyrimidine receptors. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 64, n. 12, p. 1471-1483, 2007.

BURNSTOCK, G.; KNIGHT, G. E. Cellular distribution and functions of P2 receptor subtypes in different systems. **International Review of Cytology**, v. 240, p. 301-304, 2004.

BUZZINI, P.; MARTINI, A. Discrimination between *Candida albicans* and other pathogenic species of the genus *Candida* by their differential sensitivities to toxins of a panel of killer yeasts. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 9, p. 3362- 3364, 2001.

CAFAGGI, S. et al. Preparation and evaluation of nanoparticles made of chitosan or N-trimethyl chitosan and a cisplatin–alginate complex. **Journal of Controlled Release**, v. 121, n. 1-2, p. 110-123, 2007.

CALDERONE, R. A.; FONZI, W. A. Virulence factors of *Candida albicans*. **Trends in Microbiology**, v. 9, n. 7, p. 327-335, 2001.

CALGAROTO, N. S. et al. Vitamin D₃ prevents the increase in ectonucleotidase activities and ameliorates lipid profile in type 1 diabetic rats. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 405, n. 1-2, p. 11-21, 2015.

CALIXTO, J. B. Twenty five years of research on medicinal plants in Latin America: a personal review. **Journal Ethnopharmacology**, v. 100, n. 1-2, p. 131-134, 2005.

CALVO, J. et al. Cyclodextrin/poly(anhydride) nanoparticles as drug carriers for the oral delivery of atovaquone. **Biomedical Microdevices**, v. 13, n. 10, p. 1015- 25, 2011.

CANNON, R. D. et al. Oral *Candida*: Clearance, Colonization, or Candidiasis? **Journal Dental Research**, v. 74, n. 5, p. 1152-1161, 1995.

CARVALHO, A. C. B. et al. Situação do registro de medicamentos fitoterápicos no Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 2, p. 314-319, 2008.

CELEDON, G. et al. Free radical-induced protein degradation of erythrocyte membrane is influenced by the localization of radical generation. **IUBMB Life**, v. 51, n. 6, p. 377-380, 2001.

CHAN, K.; DELFERT, D.; JUNGER, K. D. A direct colorimetric assay for the Ca²⁺-ATPase activity. **Analytical Biochemistry**, v. 157, n. 2, p. 375-380, 1986.

CHANDRASEKARAN, M.; VENKATESALU, V. Antibacterial and antifungal activity of *Syzygium jambolanum* seeds. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 91, n. 1, p. 105-108, 2004.

CHATTERJEE, S. et al. Identification of a biologically active component in minimally oxidized low density lipoprotein (MM-LDL) responsible for aortic smooth muscle cell proliferation. **Glycoconjugate journal**, v. 20, n. 5, p. 331-338, 2004.

CHATURVEDI, A. et al. Antidiabetic and anti-ulcer effects of extract of *Eugenia jambolana* seed in mild diabetic rats: study on gastric mucosal offensive acid- pepsin secretion. **Indian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 53, n. 2, p. 137-146, 2009.

CHATZIGEORGIU, A. et al. The use of animal models in the study of Diabetes mellitus. **In Vivo**, v. 23, n. 2, p. 245-258, 2009.

COLWELL, J. A.; NESTO, R. W. The platelet in diabetes. **Diabetes Care**, v. 26, n. 7, p. 2181-2188, 2003.

CONTE, R. et al. New Therapeutic Potentials of Nanosized Phytomedicine. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 16, n. 8, p. 8176-8187, 2016.

CUMAOGU, A. et al. Effects of antioxidant stobadine on protein carbonylation, advanced oxidation protein products and reductive capacity of liver in streptozotocin-diabetic rats: role of oxidative/nitrosative stress. **Biofactors**, v. 30, n. 3, p. 171-178, 2007.

CURFS, J. H.; MEIS, J. F.; HOOGKAMP-KORSTANJE, J. A. A primer on cytokines: sources, receptors, effects, and inducers. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 10, n. 4, p. 742-780, 1997.

DA CUNHA, J. G. Adenosine deaminase. A pluridisciplinary enzyme. **Acta Médica Portuguesa**, v. 4, n. 6, p. 315-323, 1991.

DA SILVA, N. C. B. et al. Medicinal plants use in Barra Il quilombola community – Bahia, Brazil. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, v. 11, n. 5, p. 435-453, 2012.

DADDONA, P. E. Human adenosine deaminase. Properties and turnover in cultured T and B lymphoblasts. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 256, n. 23, p. 12496-12501, 1981.

DAHLE, U. R.; OLSEN, I. Anaerobiosi and serum promote mycelium formation by *Candida albicans* in clones on TSBV agar. **Acta odontologica Scandinavica**, v. 49, n. 1, p. 41-45, 1991.

DALLE-DONNE, I. et al. Biomarkers of oxidative damage in human disease. **Clinical Chemistry**, v. 52, n. 4, p. 601-623, 2006.

DALLE-DONNE, I. et al. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. **Clinica Chimica Acta**, v. 329, n. 1-2, p. 23-38, 2003.

DAUGHERTY, A. et al. Myeloperoxidase, a catalyst for lipoprotein oxidation, is expressed in human atherosclerotic lesions. **Journal of Clinical Investigation**, v. 94, n. 1, p. 437-444, 1994.

DE BONA, K. S. et al. Lymphocytic enzymes and lipid peroxidation in patients with Metabolic Syndrome. **Clinical Biochemistry**, v. 45, n. 13-14, p. 1081-1085, 2012.

DE BONA, K. S. et al. Butyrylcholinesterase and γ -glutamyltransferase activities and oxidative stress markers are altered in metabolic syndrome, but are not affected by body mass index. **Inflammation**, v. 36, n. 6, p. 1539-1547, 2013.

DE BONA, K. S. et al. Erythrocytic enzymes and antioxidant status in people with type 2 diabetes: Beneficial effect of *Syzygium cumini* leaf extract *in vitro*. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 94, n. 1, p. 84-90, 2011.

DE BONA, K. S. et al. *Syzygium cumini* is more effective in preventing the increase of erythrocytic ADA activity than phenolic compounds under hyperglycemic conditions *in vitro*. **Journal of Physiology and Biochemistry**, v. 70, n. 2, p. 321-330, 2014.

DE BONA, K.S. et al. *Syzygium cumini* extract decrease adenosine deaminase, 5'nucleotidase activities and oxidative damage in platelets of diabetic patients. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 26, n. 4-5, p. 729-738, 2010.

DE WAAL, R. M. et al. Interleukin 10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via downregulation of class II major histocompatibility complex expression. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 174, n. 4, p. 915-924, 1991.

DEAGLIO, S. et al. Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 204, n. 6, p. 1257-1265, 2007.

DELAMAIRE, M. et al. Impaired leucocyte function in diabetic patients. **Diabetic Medicine**, v. 14, n. 1, p. 29-34, 1997.

DESROSIERS, M. D. et al. Adenosine deamination sustains dendritic cell activation in inflammation. **Journal of Immunology**, v. 179, p. 1884-1892, 2007.

DHULEY, J. N. Hamycin therapy of murine disseminated candidiasis: efficacy and interaction with fluconazole. **Roczniki Akademii Medycznej w Białymstoku**, v. 46, p. 326-333, 2001.

DI VIRGILIO, F. et al. Purinergic signalling in inflammation of the central nervous system. **Trends in Neurosciences**, v. 32, n. 2, p. 79-87, 2009.

DI VIRGILIO, F. Purinergic mechanism in the immune system: A signal of danger for dendritic cells. **Purinergic Signalling**, v. 1, n. 3, p. 205-209, 2005.

DINARELLO, C. A. Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases. **Blood**, v. 117, n. 14, p. 3720-3732, 2011.

DJIPA, C. D.; DELMEE, M.; QUETIN-LECLERCQ, J. Antimicrobial activity of bark extracts of *Syzygium jambos* (L.) Alston (Myrtaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 71, n. 1-2, p. 307-313, 2000.

DOMINGO, C.; SAURINA, J. An overview of the analytical characterization of nanostructured drug delivery systems: Towards green and sustainable pharmaceuticals: A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 744, p. 8-22, 2012.

DONDERS, G. G. Lower genital tract infections in diabetic women. **Current Infectious Disease Reports**, v. 4, n. 6, p. 536-539, 2002.

DONG, R. P. et al. Determination of adenosine deaminase binding domain on CD26 and its immunoregulatory effect on T cell activation. **The Journal of Immunology**, v. 159, p. 6070-6076, 1997.

DONG, R. P. et al. Characterization of adenosine deaminase binding to human CD26 on T cells and its biologic role in immune response. **The Journal of Immunology**, v. 156, p. 1349-1355, 1996.

DOOLEY, K. E.; CHAISSON, R. E. Tuberculosis and diabetes mellitus: convergence of two epidemics. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 9, n. 12, p. 737-746, 2009.

DOUGLAS, L. J. Adhesion of *Candida* species to epithelial surfaces. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 15, n. 1, p. 27-43, 1987.

DRUCKER, D. J.; NAUCK, M. A. The incretin system: glucagon-like peptide-1 receptor agonists and dipeptidyl peptidase-4 inhibitors in type 2 diabetes. **Lancet**, v. 368, n. 9548, p. 1696-1705, 2006.

DUNGAN, K. M. 1,5-anhydroglucitol (GlycoMark) as a marker of short-term glycemic control and glycemic excursions. **Expert Review of Molecular Diagnostics**, v. 8, n. 1, p. 9-19, 2008.

DUNIAU, M. C. M. **Plantas Mediciniais: da magia à ciência**. Rio de Janeiro: Ed. Brasport; 2003, 150p.

EL-AKABAWY, G.; EL-KHOLY, W. Neuroprotective effect of ginger in the brain of streptozotocin-induced diabetic rats. **Annals of Anatomy**, v. 196, n. 2-3, p. 119-128, 2014.

EL-SHERBINY, N. M.; AL-GAYYAR, M. M.; ABD EL GALIL, K. H. Nephroprotective role of dipyridamole in diabetic nephropathy: Effect on inflammation and apoptosis. **Life Sciences**, v. 15, n. 143, p. 143-148, 2015.

ERBEN, N. et al. Healthcare-associated infections and the distribution of causative pathogens in patients with diabetes mellitus. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 32, n. 6, p. 821-825, 2013.

ESPOSITO, K. et al. Inflammatory cytokine concentrations are acutely increased by hyperglycemia in humans. **Circulation**, v. 106, n. 16, p. 2067-2072, 2002.

ESSA, S.; RABANEL, J. M.; HILDGEN, P. Characterization of rhodamine loaded PEG-g-PLA nanoparticles (NPs): Effect of poly(ethylene glycol) grafting density. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 411, n. 1-2, p. 178-187, 2011.

ESTERBAUER, H. et al. Continuous monitoring of in vitro oxidation of human low density lipoprotein. **Free Radical Research Communications**, v. 6, n. 1, p. 67-75, 1989.

EVANS, J. L.; GOLDFINE, I. D.; MADDUX, B. A. Oxidative stress and stress-activated signaling pathways: a unifying hypothesis of type 2 diabetes. **Endocrine Reviews**, v. 23, n. 5, p. 599-622, 2002.

FARSWA, M. et al. Modulatory effect of an isolated compound from *Syzigium cumini* seeds on biochemical parameters of diabetic rats. **Pharmacognosy Magazine**, v. 5, n. 3, p. 127-133, 2009.

FATIMA, S. Effect of water stress on growth and essential oil metabolism in *Cymbopogon martinii* (palmarosa) cultivars. **Journal of Essential Oil Research**, v. 11, n. 4, p. 491-496, 1999.

FEDERAÇÃO INTERNACIONAL DE DIABETES (FID), 2015. **Diabetes Atlas**, 7th ed. Russels, Belgium, 2015.

FENG, Y. et al. Enhanced oral bioavailability and in vivo antioxidant activity of chlorogenic acid via liposomal formulation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 30, n. 501 (1-2), p. 342-349, 2016.

FERREIRO, J. L. et al. Effects of cangrelor in coronary artery disease patients with and without diabetes mellitus: an *in vitro* pharmacodynamic investigation. **Journal of Thrombosis and Thrombolysis**, v. 35, n. 2, p. 155-64, 2013.

FERRIZ, J. M.; VINOVÁ, J. Prodrug design of phenolic drugs. **Current Pharmaceutical Design**, v. 16, n. 18, p. 4491-4499, 2010.

FILHO, W. E. et al. Evaluation, intervention, and follow-up of patients with diabetes in a primary health care setting in Brazil: the importance of a specialized mobile consultancy. **Diabetology & Metabolic Syndrome**, v. 8, n. 8, p. 56, 2016.

FILIPPINI, A.; TAFFS, R. E.; SITKOVSKY, M. V. Extracellular ATP in T lymphocyte activation: possible role in effector functions. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 87, n. 21, p. 8267-8271, 1990.

FISHER, M. A.; LEE, P. G.; TARRY, W. F. Fluconazole (UK-49,858) treatment of candidiasis in normal and diabetic rats. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 33, n. 7, p. 1042-1045, 1989.

FLORA FILHO, R.; ZILBERSTEIN, B. Óxido nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade. Metabolismo, síntese e funções. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 46, n. 3, p. 265-271, 2000.

FRAGA-SILVA, T. F. et al. Relationship among Short and Long Term of Hypoinsulinemia-Hyperglycemia, Dermatophytosis, and Immunobiology of Mononuclear Phagocytes. **Mediators Inflammatory**, 342345, 2015.

FREDHOLM, B. B. et al. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXXI. Nomenclature and classification of adenosine receptors--an update. **Pharmacology Reviews**, v. 63, n. 1, p. 1-34. 2011

FREDHOLM, B. B. et al. Adenosine and brain function. **International Review of Neurobiology**, v. 63, p. 191-270, 2005.

GABBIANELLI, R. et al. A new method to evaluate spontaneous platelet aggregation in type 2 diabetes by Cellfacts. **Clinical Chimica. Acta**, v. 329, n. 1-2, p. 95-102, 2003.

GAO, L. et al. Drug nanocrystals: In vivo performances. **Journal of Controlled Release**, v. 160, n. 3, p. 418-430, 2012.

GEERLINGS, S. E.; HOEPELMAN, A. I. Immune dysfunction in patients with diabetes mellitus (DM). **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 26, n. 3-4, p. 259-265, 1999.

GESSI, S. et al. Adenosine receptors in colon carcinoma tissues and colon tumoral cell lines: Focus on the A3 adenosine subtype. **Journal of Cellular Physiology**, v. 211, n. 3. p. 826-836, 2007.

GHOSHA, M.; CHAKRABORTYB, A.; MUKHERJEEA, A. Cytotoxic, genotoxic and the hemolytic effect of titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles on human erythrocyte and lymphocyte cells *in vitro*. **Journal of Applied Toxicology**, v. 33, n. 10, p. 1097-1110, 2013.

GOLDBURG, W. I. Dynamic light scattering. **American Journal of Physics**, v. 67, n. 12, p. 1152-1160, 1999.

GOMEZ, G.; SITKOVSKY, M. V. Targeting G protein-coupled A2a adenosine receptors to engineer inflammation *in vivo*. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 35, n. 4, p. 410-414, 2003.

GOPI, S. Introduction of Nanotechnology in Herbal Drugs and Nutraceutical: A Review. **Journal of Nanomedicine & Biotherapeutic Discovery**, v. 6, n. 143, 2016.

GORRELL, M. D. Dipeptidyl peptidase IV and related enzymes in cell biology and liver disorders. **Clinical science (London, England: 1979)**, v. 108, n. 4, p. 277-292, 2005.

GORRELL, M. D.; GYSBERS, V.; MCCAUGHAN, G. W. CD26: a multifunctional integral membrane and secreted protein of activated lymphocytes. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 54, n. 3, p. 249-264, 2001.

GREENE, M. T. et al. Predictors of hospital-acquired urinary tract-related bloodstream infection. **Infection Control & Hospital Epidemiology**, v. 33, n. 10, p. 1001-1007, 2012.

GROSS, J. L.; NEHME, M. Detecção e tratamento das complicações crônicas do diabetes melito: Consenso da Sociedade Brasileira de Diabetes e Conselho Brasileiro de Oftalmologia. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 45, n. 3, p. 279-284, 1999.

GROVER, J. K.; VATS, V.; RATHI, S. S. Anti-hyperglycemic effect of *Eugenia jambolana* and *Tinospora cordifolia* in experimental diabetes and their effects on key metabolic enzymes involved in carbohydrate metabolism. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 73, n. 3, p. 461-470, 2000.

GUARRO, J.; GENÉ, J.; STCHIGEL, A. M. Developments in fungal taxonomy. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, n. 3, p. 454-500, 1999.

GUIMARÃES, S.; ALBINO-TEIXEIRA, A. Hypertension due to chronic blockade of P1-purinoceptors. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 59, p. 158-164, 2012.

GUINEBRETIERE, S. et al. Nanocapsules of biodegradable polymers: preparation and characterization by direct high resolution electron microscopy. **Materials Science and Engineering: C**, v. 21, n. 1-2, p. 137-142, 2002.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de Fisiologia Médica**. 9. ed. Rio de Janeiro: 1997, p. 1014.

HAQUE, S. et al. Development and evaluation of brain TARGETED intranasal alginate nanoparticles for treatment of depression. **Journal of Psychiatric Research**, v. 48, n. 1, p. 1-12, 2014.

HARTWICH, C. **Die Neuen Arzneidrogen aus dem Pflanzenreiche**. Berlin, 1897, pp. 327-328.

HASKÓ, G.; CRONSTEIN, B. N. Adenosine: an endogenous regulator of innate immunity. **Trends Immunology**, v. 25, n. 1, p. 33-39, 2004.

HASKÓ, G.; CRONSTEIN, B. Regulation of Inflammation by Adenosine. **Frontiers in Immunology**, v. 4, p. 85, 2013.

HEINRICH, M. Ethnobotany and its role in drug development. **Phytotherapy Research**, v. 14, n. 7, p. 479-488, 2000.

HELMSTADTER, A. *Syzygium cumini* (L.) SKEELS (Myrtaceae) against diabetes—125 years of research. **Pharmazie**, v. 63, n. 2, p. 910-1010, 2008.

HENDERSON, G. B.; STRAUSS, B. P. Evidence for cAMP and cholate extrusion in C6 rat glioma cells by a common anion efflux pump. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 266, n. 3, p. 1641-1645, 1991.

HERMAN, G. A. et al. Dipeptidyl peptidase-4 inhibitors for the treatment of type 2 diabetes: focus on sitagliptin. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v. 81, n. 5, p. 761-767, 2007.

HOBSBAWM, E. **A era dos extremos: o breve século XX**. 2. ed. São Paulo: Ed. Companhia das Letras, 1995.

HOLMAN, N.; YOUNG, B.; GADSBY, R. Current prevalence of type 1 and type 2 diabetes in adults and children in the UK. **Diabetic medicine: a journal of the British Diabetic Association**, v. 32, p. 1119-1120, 2015.

HOLMSEN, H. Nucleotide metabolism of platelets. **Annual Review of Physiology**, v. 47, p. 677-690, 1985.

HONG, C. Y.; CHIA, K. S.; LING, S. L. Urinary protein excretion in type 2 diabetes with complications. **Journal of Diabetes and Its Complications**, v. 14, n. 5, p. 259-265, 2000.

HOSHINO, T. et al. Practice Elevated adenosine deaminase activity in the serum of patients with Diabetes mellitus. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 25, n. 2, p. 97-102, 1994.

HOWLETT, J. A. The infection of rat tongue mucosa in vitro with five species of *Candida*. **Journal of Medical Microbiology**, v. 9, p. 309-316, 1976.

HU, H. et al. 2013. Preparation, characterization and in vitro release study of gallic acid loaded silica nanoparticles for controlled release. **Pharmazie**, v. 68, n. 6, p. 401-405, 2013.

HUNSUCKER, S.; MITCHELL, B.; SPYCHALA, J. The 5'-nucleotidase as regulators of nucleotide and drug metabolism. **Pharmacology & therapeutics**, v. 107, n. 1, p. 1-30, 2005.

ICHINOSE, K.; KAWASAKI, E.; EGUCHI, K. Recent advancement of understanding pathogenesis of type 1 diabetes and potential relevance to diabetic nephropathy. **American Journal Nephrology**, v. 27, n. 6, p. 554-564, 2007.

ILLES, P.; RIBEIRO, A. Molecular physiology of P2 receptors in the central nervous system. **European Journal of Pharmacology**, v. 483, n. 1, p. 5-17, 2004.

ITABE, H. Oxidative modification of LDL: its pathological role in atherosclerosis. **Clinical Reviews In Allergy & Immunology**, v. 37, n. 1, p. 4-11, 2009.

IWAKI- EGAWA, S. I.; NAMIKI, C.; WATANABE, Y. Adenosine deaminase 2 from chicken liver: purification, characterization, and N- terminal amino acids sequence. **Comparative Biochemistry and Physiology - Part B: Biochemistry & Molecular Biology**, v. 137, n. 2, p. 247-254, 2004.

IWAKI-EGAWA, S.; YAMAMOTO, T.; WATANABE, Y. Human plasma adenosine deaminase 2 is secreted by activated monocytes. **Biological Chemistry**, v. 387, n. 3, p. 319-321, 2006.

JADEJA, R. N. et al. Standardized flavonoid-rich *Eugenia jambolana* seed extract retards *in vitro* and *in vivo* LDL oxidation and expression of VCAM-1 and P- Selectin in atherogenic rats. **Cardiovascular Toxicology**, v. 12, n. 1, p. 73-82, 2012.

JAIN, J. P.; KUMAR, N. Development of amphotericin B loaded polymersomes based on (PEG)3-PLA co-polymers: Factors affecting size and in vitro evaluation. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 40, n. 5, p. 456-465, 2010.

JARVELA, I. Y. et al. Gestational identifies women at risk for permanent type 1 and type 2 diabetes in fertile age: Predictive role of autoantibodies. **Diabetes Care**, v. 29, n. 3, p. 607-612, 2006.

JENKINSON, H. F.; SHEPHERD, M. G. A mutant of *Candida albicans* deficient in b-N-acetylglucosaminidase (chitinase). **Journal of general microbiology**, v. 133, n. 8, p. 2097-2106, 1987.

JEON, C. Y.; MURRAY, M. B. Diabetes mellitus increases the risk of active tuberculosis: a systematic review of 13 observational studies. **PLOS Medicine**, v. 7, n. 7, p. e152, 2008.

JOHN, W. G. Use of HbA1c in the diagnosis of diabetes mellitus in the UK. The implementation of World Health Organization guidance 2011. Department of Health Advisory Committee on Diabetes. **Diabetic Medicine**, v. 29, n. 11, p. 1350-1357, 2012.

JOSHI, N. et al. Infections in patients with diabetes mellitus. **The New England Journal of Medicine**, v. 341, p. 1906-1912, 1999.

KACZMAREK, E. et al. Identification and characterization of CD39/vascular ATP diphosphohydrolase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 51, p. 33116-33122, 1996.

KAIZER, R. R. et al. The effect of aluminum on NTPDase and 5"-nucleotidase activities from rat synaptosomes and platelets. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 25, n. 6, p. 381-386, 2007.

KAMIYAMA, A. et al. Adansonian study of *Candida albicans*: intraspecific homogeneity excepting *C. stellatoidea* strains. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, v. 27, n. 4, p. 229-241, 1989.

KASSAMALI, Z. et al. How low can you go? Use of low- and standard-dose liposomal amphotericin B for treatment of invasive fungal infections. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 17, n. 8, p. e615-e620, 2013.

KATHERINE, E. et al. Inflammatory cytokine concentrations are acutely increased by hyperglycemia in humans. **Circulation**, v. 106, p. 2067-2072, 2002.

KAWASHIMA, K.; FUJII, T. The lymphocytic cholinergic system and its contribution to the regulation of immune activity. **Life Sciences**, v. 74, n. 6, p. 675-696, 2003.

KAWASHIMA, K.; FUJII, T. Extraneuronal cholinergic system in lymphocytes. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 86, n. 1, p. 29-48, 2000.

KELLY, M. A. et al. Molecular aspects of type 1 Diabetes. **Journal of Clinical Pathology**, v. 56, n. 1, p. 1-10, 2003.

KHAYATA, N. et al. Stability study and lyophilization of vitamin E-loaded nanocapsules prepared by membrane contactor. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 439, n. 1-2, p. 254-259, 2012.

KIM, C.; NEWTON, K. M.; KNOOP, R. H. Gestational diabetes and the incidence of type 2 diabetes. **Diabetes Care**, v. 25, n. 10, p. 1862-1868, 2002.

KIMURA, L. H.; PEARSAL, N. N. Adherence of *Candida* to human buccal epithelial cells. **Infection and Immunity**, v. 21, p. 64-68, 1978.

- KIRBY, B. J.; HASSELBRINK, E. F. Zeta potential of microfluidic substrates: 1. Theory, experimental techniques, and effects on separations. **Electrophoresis**, v. 25, n. 2, p. 187-202, 2004.
- KLEIN, T. et al. Fitoterápicos: Um futuro promissor. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, n. 3, v. 30, p. 241-248, 2009.
- KNOWLER, W. C. et al. Reduction in the incidence of type 2 diabetes with lifestyle intervention or metformin. **The New England Journal of Medicine**, v. 346, p. 393-403, 2002.
- KORCHAK, H. M. et al. Neutrophil stimulation: receptor, membrane, and metabolic events. **Federation proceedings**, v. 43, n. 12, p. 2749-2754, 1984.
- KOROGLU, P. et al. The effect of exogenous oxytocin on streptozotocin (STZ)-induced diabetic adult rat testes. **Peptides**, v. 63, p. 47-54, 2015.
- KOWALEWSKA, B. et al. Higher diversity in fungal species discriminates children with type 1 diabetes mellitus from healthy control. **Journal of Patient Preference and Adherence**, v. 21, n. 10, p. 591-599, 2016.
- KPADONOU KPOVIESSI, B. G. et al. Chemical variation of essential oil constituents of *Ocimum gratissimum* L. from Benin, and impact on antimicrobial properties and toxicity against *Artemia salina* leach. **Chemistry & Biodiversity**, v. 9, n. 1, p. 139-150, 2012.
- KREFT, E. et al. Renal vasculature reactivity o agonist of P2X7 receptor is increased in streptozotocin- induced diabetes. **Pharmacological Reports**, v. 68, n. 1, p. 71-74, 2016.
- KRISKO, A.; KVEDER, M.; PIFAT, G. Effect of caffeine on oxidation susceptibility of human plasma low density lipoproteins. **Clinica Chimica Acta**, v. 355, n. 1-2, p. 47-53, 2005.
- KUHAD, A.; CHOPRA, K. Curcumin attenuates diabetic encephalopathy in rats: Behavioral and biochemical evidences. **European Journal of Pharmacology**, v. 576, n. 1-3, p. 34-42, 2007.
- KUHAD, A.; SETHI, R.; CHOPRA, K. Lycopene attenuates diabetes-associated cognitive decline in rats. **Life Sciences**, v. 83, n. 3-4, p. 128-134, 2008.
- KUKREJA, A.; MACLAREN, N. K. Autoimmunity and diabetes. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 84, n. 12, p. 4371-4318, 1999.
- KUMAR, A. et al. Anti-diabetic activity of *Syzygium cumini* and its isolated compound against streptozotocin-induced diabetic rats. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 2, p. 246-249, 2008c.
- KUMAR, A. et al. Anti-inflammatory activity of *Syzygium cumini* seed. **African Journal of Biotechnology**, v. 7, n. 8, p. 941-943, 2008b.

KUMAR, A.; PADMANABHAN, N.; KRISHANA, M. R. V. Central nervous system activity of *Syzygium cumini* seeds. **Pakistan Journal of Nutrition**, v. 6, n. 6, p. 698-700, 2007.

KUMAR, D. et al. Candidemia-induced pediatric sepsis and its association with free radicals, nitric oxide, and cytokine level in host. **Journal of Critical Care**, v. 30, n. 2, p. 296-303, 2015.

KUMAR, E. K. et al. Anti-arthritic property of methanolic extract of *Syzygium cumini* seeds. **International Journal of Integrative Biology**, v. 4, p. 55-61, 2008a.

KUMAR, V.; YADAV, S. C.; KUMAR, S. K. *Syzygium cumini* leaf and seed extract mediated biosynthesis of silver nanoparticles and their characterization. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 85, n. 10, p. 1301-1309, 2010.

KUMAR, V.; YADAV, S. K. Characterisation of gold nanoparticles synthesised by leaf and seed extract of *Syzygium cumini* L. **Journal of Experimental Nanoscience**, v. 7, n. 4, p. 440-451, 2012.

KUMARI, A.; YADAV, S. K.; YADAV, S. C. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. **Colloids and Surfaces B**, v. 75, n. 1, p. 1-18, 2010.

LAAKSO, M. Hyperglycemia and cardiovascular disease in type 2 diabetes. **Diabetes**, v. 48, n. 5, p. 937-942, 1999.

LAL, B. N.; CHOUDHURI, K. D. Observations on *Momordica charantia* Linn, (Karvellaka) and *Eugenia jambolana* Lam. (Jamboo) as oral antidiabetic remedies. **Indian Journal of Medical Research**, v. 2, p. 161, 1968.

LARONE, D. H. **Medically important fungi: a guide to identification**. 4a. ed. Washington, DC: Ed. American Society for Microbiology Press, 2002.

LATINI, S.; PEDATA, F. Adenosine in the central nervous system: release mechanisms and extracellular concentrations. **Journal of Neurochemistry**, v. 79, n. 3, p. 463-484, 2001.

LEE, G. R. et al. **Hematologia Clínica**. São Paulo: Manole, 1998, 2623 p.

LEE, S. H. et al. Effects of an oral adsorbent on oxidative stress and fibronectin expression in experimental diabetic nephropathy. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 25, n. 7, p. 2134-2141, 2010.

LEITE, E. A. et al. Cardiotoxicity reduction induced by halofantrine entrapped in nanocapsule devices. **Life Sciences**, v. 80, n. 14, p. 1327-1334, 2007.

LENZEN, S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. **Diabetologia**, v. 51, n. 2, p. 216-226, 2008.

LETH, R. A. et al. Obesity, diabetes, and the risk of infections diagnosed in hospital and postdischarge infections after cesarean section: a prospective cohort study. **Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica**, v. 90, n. 5, p. 501-509, 2011.

LEUNG, P. S.; CHAN, Y. C. Role of oxidative stress in pancreatic inflammation. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 11, n. 1, p. 135-165, 2009.

LIU, W. et al. Investigation of the carbopol gel of solid lipid nanoparticles for the transdermal iontophoretic delivery of triamcinolone acetonide acetate. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 364, n. 1, p. 135-141, 2008.

LLOYD, H. G. et al. The transmethylation pathway as a source for adenosine in the isolated guinea-pig heart. **The Biochemical Journal**, v. 252, n. 2, p. 489-494, 1988.

LOGARTO, A. P. et al. Comparative study of the assay of *Artemia salina* L. and the estimate of the medium lethal dose (LD50 value) in mice, to determine oral acute toxicity of plant extracts. **Phytomedicine**, v. 8, n. 5, p. 395-400, 2011.

LOGUERCIO, C. et al. Intravenous load of fructose and fructose 1,6-diphosphate: effects on uricemia in patients with nonalcoholic liver disease. **The American Journal of Gastroenterology**, v. 91, n. 3, p. 559-564, 1996.

LONGO, P. L. et al. Serum levels of inflammatory markers in type 2 diabetes patients with chronic periodontitis. **Journal of Applied Oral Science**, v. 22, n. 2, p. 103-108, 2014.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. Nova Odessa, SP: Computação gráfica Osmar Gomes, 2002, 357 p.

LOTUFO, P. A. Construção do Estudo Longitudinal de Saúde do Adulto (ELSA-Brasil). **Revista Saúde Pública**, v. 47, p. 3-9, 2013.

LUNKES, G. I. et al. Enzymes that hydrolyze adenine nucleotides in diabetes and associated pathologies. **Thrombosis Research**, v. 109, n. 4, p. 189-194, 2003.

LUNKES, G. et al. NTPDase and 5'-nucleotidase in rats alloxan induced diabetes. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 65, n. 1, p. 1-6, 2004.

LUNKES, G. I. et al. Effect of high glucose levels in human platelet NTPDase and 5'-nucleotidase activities. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 81, n. 3, p. 351-357, 2008.

LUPIDI, G. et al. Adenosine deaminase from *Saccharomyces cerevisiae*: interaction with ground and transition state analogs. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1122, n. 3, p. 311-316, 1992.

LUSIS, A. J. Atherosclerosis. **Nature**, v. 407, n. 6801, p. 233-241, 2000.

LUZ, M. T. **Novos saberes e práticas em saúde coletiva: Estudo sobre racionalidades médicas e atividades corporais**. 2. ed. São Paulo: Ed. HUCITEC, 2005.

MAHON, J. L.; SOSENKO, J. M.; RAFKIN-MERVIS, L. The TrialNet natural history study of the development of type 1 diabetes: Objectives, design, and initial results. **Pediatric Diabetes**, v. 10, n. 2, p. 97-104, 2009.

MAINARDES, R. M. **Desenvolvimento de nanopartículas de PLA e PLA-PEG para administração intranasal de zidovudina.** 2007. 133 p. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas)– Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Araraquara, 2007.

MALATHI, R.; GOMAZ, P. Evaluation of preliminary toxicity studies on the methanolic leave extract of *Tylophora asthmatica* in experimental rats. **Journal of Pharmacological and Toxicological**, v. 3, p. 34-40, 2008.

MANDRUP-POULSEN, T.; PICKERSGILL, L.; DONATH, M. Y. Blockade of interleukin 1 in type 1 diabetes mellitus. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 6, n. 3, p. 158-166, 2010.

MARCUS, A. J. et al. Heterologous cell-cell interactions: thromboregulation, cerebroprotection and cardioprotection by CD39 (NTPDase-1). **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 1, n. 12, p. 2497-2509, 2003a.

MARCUS, A. J. et al. Metabolic control of excessive extracellular nucleotide accumulation by CD39/ecto-nucleotidase-1: implications for ischemic vascular diseases. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 305, n. 1, p. 09-16, 2003b.

MARGULIS-GOSHEN, K. et al. Formation of celecoxib nanoparticles from volatile microemulsions. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 393, n. 1-2, p. 231-238, 2010.

MARRIOT, M. S. Enzymic activity of purified plasma membranes from the yeast and mycelial forms of *Candida albicans*. **Journal of General Microbiology**, v. 89, p. 345-352, 1975.

MARTIN, M. U.; WESCHE, H. Summary and comparison of the signaling mechanisms of the Toll/ interleukin 1 receptor family. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1592, n. 3, p. 265-280, 2002.

MARTINDALE, W.; WESTCOTT, W. **The Extra Pharmacopoeia.** 10. ed. London, p. 313-314, 1901.

MATÉS, J. M.; PÉREZ-GOMEZ, C.; NÚÑEZ DE CASTRO, I. Antioxidant enzymes and human diseases. **Clinical Biochemistry**, v. 32, n. 8, p. 595-603, 1999.

MATÉS, J. M.; SÁNCHEZ-JIMÉNEZ, F. Antioxidant enzymes and their implications in pathophysiologic processes. **Frontiers in Bioscience**, v. 15, n. 4, p. D339-345, 1999.

MATSUO, Y. et al. Effect of betamethasone phosphate loaded polymeric nanoparticles on a murine asthma model. **Cellular Immunology**, v. 260, n. 1, p. 33-38, 2009.

MEIGS, J. B. Epidemiology of cardiovascular complications in type 2 Diabetes. **Acta Diabetology**, v. 40, p. 358-361, 2003.

MELO, F. A. M. **Disfuncionalidade da lipoproteína de alta densidade e risco cardiometabólico -relação com outros biomarcadores**. 2014. 317 p. Tese (Tese em Ciências da Saúde)- Universidade de Coimbra, Coimbra, 2014.

MENDES, L. et al. Multicompartmental nanoparticles for co-encapsulation and multimodal drug delivery to tumor cells and neovasculature. **Pharmaceutical Research**, v. 31, n. 5, p. 1-14, 2013.

MÉNDEZ FILHO, J. D.; RODRÍGUEZ, H. G. R. Sobre los beneficios de los radicales libres. **Revista medica del Instituto Mexicano del Seguro Social**, v. 35, n. 4, p. 309-313, 1997.

MENEZES, M. M.; LOPES, C. T.; NOGUEIRA, L. S. Impact of educational interventions in reducing diabetic complications: a systematic review. **Revista Brasileira de Enfermagem**, v. 69, n. 4, p. 726-37, 2016.

MERISKO-LIVERSIDGE, E. M.; LIVERSIDGE, G. G. Drug nanoparticles: formulating poorly water-soluble compounds. **Toxicologic Pathology**, v. 36, n. 1, p. 43-48, 2008.

MEYER, B. N. et al. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta Medica**, v. 45, n. 5, p. 31-34, 1982.

MEYER, S. A.; AHEARN, D. G.; YARROW, D. Genus 4. *Candida berkholt*. In: KREGGER-van RIJ, N. J. W. **The yeasts: a taxonomic study**, 3. ed. Amsterdam: Ed. Elsevier Science Publisers, p. 585-844, 1984.

MIGLIATO, F. K. et al. Ação Farmacológica de *Syzygium cumini* (L.) Skeels. **Acta Farmacéutica Bonaerense**, v. 25, n. 2, p. 310-314, 2006.

MITTAL, A. K. et al. Biosynthesis of silver nanoparticles: Elucidation of prospective mechanism and therapeutic potential. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 415, n. 1, p. 39-47, 2014.

MOILANEN, E.; VAPPATALO, H. Nitric oxide in inflammation and immune response. **Annals of Medicine**, v. 27, n. 3, p. 359-367, 1995.

MOORE, K. W. et al. Interleukin-10. **Annual review of immunology**, v. 11, p. 165-190, 1993.

MORA-HUERTAS, C. E. et al. Nanocapsules prepared via nanoprecipitation and emulsification–diffusion methods: Comparative study. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 80, n. 1, p. 235-239, 2012.

MORA-HUERTAS, C. E.; FESSI, H.; ELAISSARI, A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 385, n. 1-2, p. 113-114, 2010.

MORESCO, R. N. et al. Diabetic nephropathy: traditional to proteomic markers. **Clinica Chimica Acta**, v. 5, p. 17-30, 2013.

MORTELLARO, A. et al. Ex vivo gene therapy with lentiviral vectors rescues adenosine deaminase (ADA)-deficient mice and corrects their immune and metabolic defects. **Blood**, v. 108, n. 9, p. 2979-2988, 2006.

MOSMANN, T. R. Properties and functions of Interleukin-10. **Advances in Immunology**, v. 56, p. 1-26, 1994.

MUDALIAR, S. Intense management of diabetes mellitus: role of glucose control and antiplatelet agents. **The Journal of Clinical Pharmacology**, v. 44, n. 4, p. 414-422, 2004.

MULERO, J. J. et al. CD39-L4 is a secreted human apyrase, specific for the hydrolysis of nucleoside diphosphates. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 29, p. 20064-20067, 1999.

MULLER, L. Increased risk of common infections in patients with type 1 and 2 diabetes mellitus. **Clinical Infectious Diseases**, v. 41, n. 3, p. 281-288, 2005.

MÜLLER, R. H.; GOHLA, S.; KECK, C. M. State of the art of nanocrystals -Special features, production, nanotoxicology aspects and intracellular delivery. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 78, n. 1, p. 1-9, 2011.

MUNRO, C. A. et al. Chs1 of *Candida albicans* is an essential chitin synthase required for synthesis of the septum and for cell integrity. **Molecular Microbiology**, v. 39, p. 1414-26, 2001.

MURTHY, N.; WILSON, S.; SY, J. C. 9.28 - Biodegradation of Polymers. In: EDITORS-IN-CHIEF: KRZYSZTOF, M. e MARTIN, M. **Polymer Science: A Comprehensive Reference**. Amsterdam: Ed. Elsevier, p. 547-560, 2012.

MUSIAL, D. C. et al. Alteration of purinergic neurotransmission in isolated atria of streptozotocin-induced diabetic rats. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 59, n. 5, p. 158-164, 2012.

MUSIAL, D. C. et al. Chronic treatment with red wine modulates the purinergic neurotransmission and decreases blood pressure in hypertensive SHR and diabetic-STZ rats. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 66, n. 5, p. 579-586, 2015.

NALLAMUTHU, I.; DEVI, A.; KHANUM, F. Chlorogenic acid loaded chitosan nanoparticles with sustained release property, retained antioxidant activity and enhanced bioavailability. **Asian Journal of Pharmaceutical Science**, v. 10, n. 3, p. 203-211, 2015.

NASH, E. E. et al. A murine model of *Candida glabrata* vaginitis shows no evidence of an inflammatory immunopathogenic response. **PLoS One**, v. 11, n. 1, p. 1-14, 2016.

NEGRI, G. Diabetes melito: plantas e princípios ativos naturais hipoglicemiantes. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n. 2, p. 121-142, 2005.

NETT, J. E. The host's reply to *Candida* biofilm. **Pathogens**, v. 5, n. 1, p. 33, 2016.

NG, Y. J. et al. Synthesis and Characterization of Novel Copolymeric Resveratrol Conjugates. **Journal of Chemistry**, 245625, 2015.

NIIMI, K. et al. Regulation of N- acetylglucosaminidase production in *Candida albicans*. **Archives of Microbiology**, v. 168, n. 6, p. 464-472, 1997.

NIKI, E. Free radical initiators as source of water- or lipid-soluble peroxy radicals. **Methods in Enzymology**, v. 186, p. 100-108, 1990.

NISHIKAWA, T.; EDELSTEIN, D.; BROWNLEE, M. The missing link: a single unifying mechanism for diabetic complications. **Kidney International**, v. 77, p. 526-530, 2000.

NIZRI, E.; HAMRA-AMITAY, Y. Antiinflammatory properties of cholinergic upregulation: a new role for acetylcholinesterase inhibitors. **Neuropharmacology**, v. 50, n. 5, p. 540-7, 2006.

NORDBERG, G. F. et al. Mini-review. Prevalence of kidney dysfunction in humans-relationship to cadmium dose, metallothionein, immunological and metabolic factors. **Biochemie**, v. 91, n. 10, p. 1282-1285, 2009.

ODDS, F. C. Effects of temperature on anti-Candida activities of antifungal antibiotics. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 37, n. 4, p. 685-691, 1993.

OECD. Guideline 423. Acute oral toxicity— acute toxic class method. adopted by the council on 17th december. **Organization for Economic Cooperation and Development**, Paris, France 2001.

OLAH, M. E.; STILES, G. L. Adenosine receptor subtypes: Characterization and therapeutic regulation. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 35, p. 581-606, 1995.

OLIVEIRA, E. R. **O que é Medicina Popular**. São Paulo: Ed. Brasiliense, 1985.

OLIVEIRA, F.; AKISUE, G. **Fundamentos de Farmacobotânica**. 2. ed. São Paulo: Ed. Atheneu, p. 67-139, 2000.

OLIVEIRA, M. T. R. et al. Efeito da temperatura do ar de secagem sobre o teor e a composição química do óleo essencial de *Pectis brevipedunculata*. **Química nova**, v. 34, n. 7, p. 1200-1204, 2011.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). **The world medicines situation 2011: traditional medicines: global situation, issues and challenges**. Geneva: OMS, 2011.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Definition, diagnosis and classification of Diabetes mellitus and its complications: report of a WHO consultation. **Geneva, World Health Organization**, 2009.

OURIQUE, A. F. et al. Tretinoin-loaded nanocapsules: Preparation, physicochemical characterization, and photostability study. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 352, n. 1-2, p. 1-4, 2008.

OYARZÚN, C. et al. Increased levels of adenosine and ecto 5' nucleotidase (CD 73) activity precede renal alterations in experimental diabetic rats. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 468, n. 1-2, p. 354-359, 2015.

PAK, M. A. et al. Inhibition of adenosine kinase increases endogenous adenosine and depresses neuronal activity in hippocampal slices. **Neuropharmacology**, v. 33, n. 9, p. 1049-1053, 1994.

PAL, R. S. et al., Review article on: the usage of herbal medicines in the treatment of diabetes. **European Journal of Pharmaceutical and Medical Research**, v. 3, n. 6, p. 201-204, 2016.

PALIWAL, R. et al. Chitosan nanoconstructs for improved oral delivery of low molecular weight heparin: In vitro and in vivo evaluation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 422, n. 1-2, p. 179-184, 2012.

PALMER J. P. et al. Insulin antibodies in insulin- dependent diabetics before insulin treatment. **Science**, v. 222, n. 4630, p. 1337-1339, 1983.

PALUMBO, M. et al. Improved antioxidant effect of idobenone-loaded polyethyl-2-cyanacrylate nanocapsules tested on human fibroblasts. **Pharmaceutical Research**, v. 19, n. 1, p. 71-78, 2002.

PANDEY, M.; KHAN, A. Hypoglycaemic effect of defatted seeds and water soluble fibre from the seeds of *Syzygium cumini* skeels in alloxan diabetic rats. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 40, n. 10, p. 1178-1182, 2002.

PANDEY, R. et al. Nano-encapsulation of azole antifungals: Potential applications to improve oral drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 301, n. 1-2, p. 268-276, 2005.

PARASASSI, T. et al. Loss of apoB-100 secondary structure and conformation in hydroperoxide rich, electronegative LDL(-). **Free Radical Biology & Medicine**, v. 31, n. 1, p. 82-89, 2001.

PARVEEN, S.; MISRA, R.; SAHOO, S.K. Nanoparticles: a boon to drug delivery, therapeutics, diagnostics and imaging. **Nanomedicine**, v. 8, n. 2, p. 147-166, 2012.

PASCHOALINO, M. P.; MARCONE, G. P. S.; JARDIM, W. F. Os Nanomateriais e a Questão Ambiental. **Química Nova**, v. 33, n. 9, p. 421-430, 2010.

PATRAVALE, V. B.; DATE, A. A.; KULKARNI, R. M. Nanosuspensions: a promising drug delivery strategy. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 56, n. 7, p. 827-840, 2004.

PAULA, A. J. et al. Suppression of the Hemolytic Effect of Mesoporous Silica Nanoparticles after Protein Corona Interaction: Independence of the Surface Microchemical Environment. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 23, n. 10, p. 1807-1814, 2012.

- PELEG, A. Y. et al. Common infections in diabetes: pathogenesis, management and relationship to glycaemic control. **Diabetes/Metabolism Research and Reviews**, v. 23, n. 1, p. 3-13, 2007.
- PEPATO, M. T. et al. Lack of antidiabetic effect of a *Eugenia jambolana* leaf decoction on rat streptozotocin diabetes. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 34, n. 3, p. 389-395, 2001.
- PERSSON, P., et al. Adenosine A2 a receptor stimulation prevents proteinuria in diabetic rats by promoting an anti-inflammatory phenotype without affecting oxidative stress. **Acta Physiologica**, v. 214, n. 3, p. 311-318, 2015.
- PETTINATI, A. H. **Anatomia patológica das candidíases**. In: LACAZ, C. S. *Candidíases São Paulo*, Ed. Pedagógica Universitária e Ed. Universidade de São Paulo, p. 101-112, 1980.
- PFAFFLY, J. R. Diabetic complications, hyperglycemia & free radicals. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 77, p. 222, 2001.
- PIETROPAOLO, M. et al. Evidence of islet cell autoimmunity in elderly patients with type 2 diabetes. **Diabetes**, v. 49, n. 1, p. 32-38, 2000.
- PIWOWAR, A. Advanced oxidation protein products. Part I. Mechanism of the formation, characteristics and property. **Polski Merkuriusz Lekarski**, v. 28, n. 164, p. 166-169, 2010.
- POSSE, J. C. **Plantas medicinais utilizadas pelos usuários do sus nos bairros de Paquetá e Santa Teresa: uma abordagem etnobotânica**. 2007. 133 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)- Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2007.
- PRASAD, R. et al. Biogenic synthesis of silver nanoparticles from the leaf extract of *Syzygium cumini* (L.) and its antibacterial activity. **International Journal of Pharmacy and Biological Sciences**, v. 3, n. 4, p. 745-752, 2012.
- PRASSL, R.; LAGGNER, P. Molecular structure of low density lipoprotein: current status and future challenges. **European Biophysics Journal**, v. 38, n. 2, p. 45-48, 2009.
- PRINCE, P. S. M.; KAMALAKKANNAN, N.; MENON, V. P. Anti-diabetic and antihyperlipidaemic effect of alcoholic *Syzygium cumini* seeds in alloxan induced diabetic albino rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 91, n. 2-3, p. 209-213, 2004.
- PRINCE, P. S. M.; MENON, V. P.; PARI, L. Effect of *Syzygium cumini* extracts on hepatic hexokinase and glucose-6-phosphatase in experimental diabetes. **Phytotherapy Research**, v. 11, n. 7, p. 529-531, 1997.
- PRINCE, P. S. M.; MENON, V. P.; PARI, L. Hypoglycaemic activity of *Syzygium cumini* seeds: effect on lipid peroxidation in alloxan diabetic rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 61, n. 1, p. 1-7, 1998.

PRINCE, S. M. P.; KAMALAKKANNAN, N.; MENON, V. P. *Syzygium cumini* seed extracts reduce tissue damage in diabetic rat brain. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 84, n. 2-3, p. 205-209, 2003.

QAWI, I.; ROBSON, S. C. New developments in anti-platelet therapies: potential use of CD39/vascular ATP diphosphohydrolase in thrombotic disorders. **Current Drug Targets**, v. 1, n. 3, p. 285-296, 2000.

QUEIROZ, P. C. et al. Prevalência das complicações micro e macrovasculares e de seus fatores de risco em pacientes com diabetes mellitus e síndrome metabólica. **Revista da Sociedade Brasileira de Clínica Médica**, n. 9, v. 4, p. 254-258, 2011.

QUINTANAR-GUERRERO, D. et al. Preparation techniques and mechanisms of formation of biodegradable nanoparticles from preformed polymers. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 24, n. 12, p. 1113-1128, 1998a.

QUINTANAR-GUERRERO, D. et al. Mechanistic study of the formation of polymer nanoparticles by the emulsification- diffusion technique. **Colloid and Polymer Science**, v. 275, p. 640-647, 1997.

QUINTANAR-GUERRERO, D. et al. Preparation and characterization of nanocapsules from preformed polymers by a new process based on emulsification-diffusion technique. **Pharmaceutical Research**, v. 15, n. 7, p. 1056-1062, 1998b.

RABINOVITCH, A. et al. Inducible nitric oxide synthase (iNOS) in pancreatic islets of nonobese diabetic mice: identification of iNOS-expressing cells and relationships to cytokines expressed in the islets. **Endocrinology**, v. 137, n. 5, p. 2093-2099, 1996.

RAHMOUNE, H. et al. Glucose transporters in human renal proximal tubular cells isolated from the urine of patients with non-insulin- dependent diabetes. **Diabetes**, n. 54, v. 12, p. 3427-3434, 2005.

RAJENDRAN, R. et al. Acetylcholine protects against *Candida albicans* infection by inhibiting biofilm formation and promoting hemocyte function in a *Galleria mellonella* infection model. **Eukaryotic Cell**, v. 14, n. 8, p. 834-844, 2015.

RALEVIC, V.; BURNSTOCK, G. Receptors for purines and pyrimidines. **Pharmacological Reviews**, v. 50, n. 3, p. 413-492, 1998.

RANG, H. P.; DALE, M. M. **Farmacologia**. 7. ed. São Paulo: Ed. Elsevier, 2012. 768p.

RAO, J. P.; GECKELER, K. E. Polymer nanoparticles: preparation techniques and size-control parameters. **Progress in Polymer Science**, v. 36, p. 887-913, 2011.

RATECH, H.; HIRSCHHORN, R. Serum adenosine deaminase in normals and in a patient with adenosine deaminase deficient-severe combined immunodeficiency. **Clinica Chimica Acta**, v. 115, n. 3, p. 341-347, 1981.

RATHBONE, M. et al. Trophic effects of purines in neurons and glial cells. **Progress in Neurobiology**, v. 59, n. 6, p. 663-690, 1999.

RAVI, K.; SIVAGNANAM, K.; SUBRAMANIAN, S. Anti-diabetic activity of *Eugenia jambolana* seed kernels on streptozotocin-induced diabetic rats. **Journal of Medicinal Food**, v. 7, n. 2, p. 187-191, 2004c.

RAVI, K.; RAJASEKARAN, S.; SUBRAMANIAN, S. Anti-hyperlipidemic effect of *Eugenia jambolana* seed kernel on streptozotocin-induced diabetes in rats. **Food Chem Toxicology**, v. 43, n. 9, p. 1433-1439, 2005.

RAVI, K.; RAMACHANDRAN, B.; SUBRAMANIAN, S. Protective effect of *Eugenia jambolana* seed kernel on tissue antioxidants in streptozotocin-induced diabetic rats. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 27, n. 8, p. 1212-1217, 2004b.

RAVI, K.; SIVAGNANAM, K.; SUBRAMANIAN, S. Anti-diabetic activity of *Eugenia jambolana* seed kernels on streptozotocin-induced diabetic rats. **Journal of Medicinal Food**, v. 7, n. 2, p. 187-91, 2004a.

RAYFIELD, E. J. et al. Infection and diabetes: the case for glucose control. **The American Journal of Medicine**, v. 72, p. 439-450, 1982.

REIS, J. S. et al. Oxidative stress: a review on metabolic signaling in type 1 diabetes. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabologia** v. 52, n. 7, p. 1096-1105, 2008.

REKHA, N.; BALAJI, R.; DEECARAMAN, M. Effect of aqueous extract of *Syzygium cumini* pulp on anti-oxidant defense system in streptozotocin induced diabetic rats. **Iranian Journal of Pharmacology & Therapeutics**, v. 7, n. 2, p. 137-145, 2008.

RIBEIRO, A. F. et al. Poly ϵ -caprolactone nanoparticles loaded with *Uncaria tomentosa* extract: preparation, characterization, and optimization using the Box–Behnken design. **International Journal of Nanomedicine**, v. 8, p. 431-442, 2013.

RISTIC, S.; BATES, P. C. Vildagliptin: a novel DPP-IV inhibitor with pancreatic islet enhancement activity for treatment of patients with type 2 diabetes. **Drugs Today**, v. 42, n.8, p. 519-531, 2006.

ROBSON, S. C.; SÉVIGNY, J.; ZIMMERMANN, H. The E-NTPDase family of ectonucleotidases: Structure function relationships and pathophysiological significance. **Purinergic Signaling**, v. 2, p. 409-430, 2006.

ROCHA, F. A. G. et al. Características do comércio informal de plantas medicinais no município de Lagoa Nova/RN. **Holos**, v. 5, p. 264-281, 2013.

RODRIGUES, A. G.; SANTOS, M. G.; DE SIMONI, C. Fitoterapia na Saúde da Família. In: Sociedade Brasileira de Medicina de Família e Comunidade (Org.). **Programa de Atualização em Medicina de Família e Comunidade (PROMEF)**. Porto Alegre: Artmed/Panamericana, 2011. 31-65 p.

ROGLIC, G. et al. The burden of mortality attributable to diabetes: realistic estimates for the year 2000. **Diabetes Care**, v. 28, n. 9, p. 2130-2135, 2005.

ROMANI, L.; BISTONI, F.; PUCSETTI, P. Adaptation of *Candida albicans* to the host environment: the role of morphogenesis in virulence and survival in mammalian hosts. **Current Opinion in Microbiology**, v. 6, p. 338-343, 2003.

ROSENZWAJG, M. et al. Interleukin 2 in the pathogenesis and therapy of type 1 diabetes. **Current Diabetes Reports**, v. 14, n. 12, p. 553, 2014.

ROSIDAH, Y. A. M. et al. Toxicology evaluation of standardized methanol extract of *Gynura procumbens*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 123, n. 2, p. 244-249, 2009.

ROZALSKI, M.; NOCUN, M.; WATALA, C. Adenosine diphosphate receptors on blood platelets – potential new targets for antiplatelet therapy. **Acta Biochimica Polonica**, v. 52, n. 2, p. 411-415, 2005.

RÜCKER, B. et al. The nucleotide hydrolysis is altered in blood serum of streptozotocin induced diabetic rats. **Archives of Physiology and Biochemistry**, v. 116, n. 2, p. 79-87, 2010.

RUTKIEWICZ, J.; GÓRSKI, J. On the role of insulin in regulation of adenosine deaminase activity in rat tissues. **FEBS Letters**, v. 271, n. 1-2, p. 79-80, 1990.

SACAN, O. et al. Zinc supplementation ameliorates glycoprotein components and oxidative stress changes in the lung of streptozotocin diabetic rats. **Biometals**, v. 29, n. 2, p. 239-248, 2016.

SAFDAR, M.; KHAN, A. H. Effect of jaman fruit extract on serum glucose and lipid profile in type 2 diabetic individuals. **Pakistan Journal of Nutrition**, v. 5, n. 6, p. 573-576, 2006.

SALAVEJ, P.; SPALTEHOLZ, H.; ARNHOLD, J. Modification of amino acid residues in human serum albumin by myeloperoxidase. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 40, n. 3, p. 516-525, 2006.

SAMADDER, A.; DAS, S. Ameliorative effects of *Syzygium jambolanum* extract and its poly (lactic-co-glycolic) acid nano-encapsulated form on arsenic-induced hyperglycemic stress: a multi-parametric evaluation. **Journal of Acupuncture & Meridian Studies**, v. 5, n. 6, p. 310-318, 2012.

SANKHARI, J. M. et al. Safety evaluation of *Eugenia jambolana* seed extract. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 3, n. 12, p. 982-987, 2010.

SANNA, V. et al. Polymeric nanoparticles encapsulating white tea extract for nutraceutical application. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, n. 7, p. 2026-2032, 2015.

SANTOS, A. F. et al. Toxicity of some glucose/mannose-binding lectins to *Biomphalaria glabrata* and *Artemia salina*. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 794-798, 2010.

SARAF, S. et al. Advancements and Avenues in Nanophytomedicines for Better Pharmacological Responses. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 15, p. 1-10, 2015.

SARIKONDA, G. et al. Higher proinflammatory cytokine production and spontaneous activation in some type 1 and type 2 diabetic subjects. **Clinical Immunology**, v. 155, n. 1, p. 27-9, 2014.

SATO K. L. et al. Diabetes como modelo de neuropatia autonômica. **Medicina Ribeirão Preto**, v. 39, n. 1, p. 28-38, 2006.

SAWANT, L. et al. Aldose reductase and protein tyrosine phosphatase 1B inhibitory active compounds from *Syzygium cumini* seeds. **Pharmaceutical Biology**, v. 53, n. 8, p. 1176-1182, 2015.

SCHADEWALDT, H. **Geschichte des Diabetes mellitus**. Berlin, p. 72-73, 1972.

SCHAFFAZICK, S. R. et al. Freeze-drying polymeric colloidal suspensions: Nanocapsules, nanospheres and nanodispersion. A comparative study. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 56, n. 3, p. 501-505, 2003.

SCHMATZ, R. et al. Ectonucleotidase and acetylcholinesterase activities in synaptosomes from the cerebral cortex of streptozotocin-induced diabetic rats and treated with resveratrol. **Brain Research Bulletin**, v. 80, n. 6, p. 371-376, 2009b.

SCHMATZ, R. et al. Effects of resveratrol on nucleotide degrading enzymes in streptozotocin-induced diabetic rats. **Life Sciences**, v. 84, n. 11-12, p. 345-350, 2009a.

SCHMATZ, R. et al. Moderate red wine and grape juice consumption modulates the hydrolysis of the adenine nucleotides and decreases platelet aggregation in streptozotocin-induced diabetic rats. **Cell Biochemistry and Biophysics**, v. 65, n. 2, p. 129-143, 2013.

SEFI, M. et al. Mitigating effects of antioxidant properties of *Artemisia campestris* leaf extract on hyperlipidemia, advanced glycation end products and oxidative stress in alloxan- induced diabetic rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 78, n. 7, p. 1986-1993, 2010.

SEFI, M. et al. *Artemisia campestris* leaf extract alleviates early diabetic nephropathy in rats by inhibiting protein oxidation and nitric oxide end products. **Pathology - Research and Practice**, v. 208, n. 3, p. 157-162, 2012.

SELMECI, L. Advanced oxidation protein products (AOPP): novel uremic toxins, or components of the non-enzymatic antioxidant system of the plasma proteome? **Free Radical Research**, v. 45, n. 10, p. 1115-1123, 2011.

SELMECI, L. et al. Human blood plasma advanced oxidation protein products (AOPP) correlates with fibrinogen levels. **Free Radical Research**, v. 40, n. 9, p. 952-958, 2006.

SEN, S.; Chakraborty, R.; DE, B. Indian Traditional Medicinal Systems, Herbal Medicine, and Diabetes. **Diabetes Mellitus in 21st Century**, p. 125-151, 2016.

SESTERHEIM, P.; SAITOVITCH, D.; STAUB, H. L. Diabetes mellitus tipo 1: multifatores que conferem suscetibilidade à patogénia auto-imune. **Scientia Medica**, v. 17, n. 4, p. 212-217, 2007.

SÉVIGNY, J. et al. Identification and characterization of a novel hepatic canalicular ATP diphosphohydrolase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 8, p. 5640-5647, 2000.

SHAD, A. A. et al. Phytochemical and Biological Activities of Four Wild Medicinal Plants. **The Scientific World Journal**, 857363, 2014.

SHAFIA, P. M. et al. Antibacterial activity of *Syzygium cumini* and *Syzygium travancoricum* leaf essential oils. **Fitoterapia**, v. 73, n. 5, p. 414-416, 2002.

SHARMA, S. B. et al. Hypoglycaemic and hypolipidemic effect of ethanolic extract of seeds of *Eugenia jambolana* in alloxan-induced diabetic rabbits **Journal of Ethnopharmacology**, v. 85, n. 2-3, p. 201-206, 2003.

SHARMA, A. K. et al. *Syzygium cumini* Ameliorates Insulin Resistance and β -Cell Dysfunction via Modulation of PPAR γ , Dyslipidemia, Oxidative Stress, and TNF- α in Type 2 Diabetic Rats. **Journal of Pharmacological Science**, v. 119, n. 3, p. 205-213, 2012.

SHARMA, B.; BALOMAJUMDER, C.; ROY, P. Hypoglycaemic and hypolipidemic effects of flavonoid rich extract from *Eugenia jambolana* seeds on streptozotocin induced diabetic rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 7, p. 2376-2383, 2008.

SHARMA, S. B. et al. Ameliorative effect of active principle isolated from seeds of *Eugenia jambolana* on carbohydrate metabolism in experimental diabetes. **Evidence- Based Complementary and Alternative Medicine**, 789871, p. 1-22, 2011.

SHARMA, S. B. et al. Antihyperglycemic effect of the fruit pulp of *Eugenia jambolana* in experimental diabetes mellitus. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 104, n. 3, p. 367-73, 2006.

SHARMA, S. et al. Effect of high-pressure homogenization on formulation of TPGS loaded nanoemulsion of rutin – pharmacodynamic and antioxidant studies. **Drug Delivery**, n. 22, n. 4, p. 541-551, 2015.

SHI, J. D. et al. Molecular cloning and characterization of a novel mammalian endo-apyrase (LALP1). **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 20, p. 17474-17478, 2001.

SHI, X. Y. et al. Advanced oxidation protein products promote inflammation in diabetic kidney through activation of renal nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase. **Endocrinology**, v. 149, n. 4, p. 1829-1839, 2008.

- SHIVANNA, N. et al. Antioxidant, anti-diabetic and renal protective properties of *Stevia rebaudiana*. **Journal of Diabetes and Its Complications**, v. 27, n. 2, p. 103-113, 2012.
- SICCHIERI, L.B. **Caracterização de lipoproteína de baixa densidade (LDL) por meios espectroscópicos**. 2012. 127 p. Dissertação (Mestrado em Ciências na área de Tecnologia Nuclear)- Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo, 2012.
- SIDANA, S. et al. Effect of *Syzygium cumini* (jamun) seed powder on dyslipidemia: a double blind randomized control trial. **International Journal of Research in Medical Sciences**, v. 4, n. 7, p. 2603-2610, 2016.
- SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. **Micologia médica à luz de autores contemporâneos**. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan. 2004.
- SIGWARD, E. et al. Formulation and cytotoxicity evaluation of new self- emulsifying multiple W/O/W nanoemulsions. **International Journal of Nanomedicine**, v. 8 p. 611-625, 2013.
- SILVA, A. C. et al. Preparation, characterization and biocompatibility studies on risperidone-loaded solid lipid nanoparticles (SLN): High pressure homogenization versus ultrasound. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 86, n. 1, p. 158-165, 2011.
- SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia da Planta ao Medicamento**. 5. ed. Porto Alegre/ Florianópolis: Ed. da UFSC/ Ed. UFRGS. 2004.
- SINGH, N.; GUPTA, M. Effects of ethanolic extract of *Syzygium cumini* (Linn) seed powder on pancreatic islets of alloxan diabetic rats. **Indian Journal Of Experimental Biology**, v. 45, n. 10, p. 861-867, 2007.
- SINHA, V. R. et al. Poly-ε-caprolactone microspheres and nanospheres: an overview. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 278, n. 1, p. 1-23, 2004.
- SITKOVSKY, M. V. Extracellular purines and their receptors in immunoregulation. Review of recent advances. **Nippon Ika Daigaku Zasshi**, v. 65, n. 5, p. 351-357, 1998.
- SMITH, T. M.; KIRLEY, T. L. Cloning, sequencing, and expression of a human brain ecto-apyrase related to both the ecto-ATPases and CD39 ecto-apyrases. **Biochimical et Biophysica Acta**, v. 1386, n. 1, p. 65-78, 1998.
- SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES (SBD). **Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes**, 2015. Disponível em: <http://diabetes.org.com.br>). Acesso em: 01/09/2016.
- SONAGLIO, D. et al. Desenvolvimento tecnológico e produção de produtos fitoterápicos. In: SIMÕES et al. (org). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre: Ed. UFRGS; Florianópolis: Ed. UFSC. 2007. 289-326 p.

SONAJE, K. et al. Development of biodegradable nanoparticles for oral delivery of ellagic acid and evaluation of their antioxidant efficacy against cyclosporine a induced nephrotoxicity in rats. **Pharmaceutical Research**, v. 24, n. 5, p. 899-908, 2007.

SOPPIMATH, K. S. et al. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. **Journal of Controlled Release**, v. 70, n. 1-2, p. 1-20, 2001.

SOREQ, H.; SEIDMAN, S. Acetylcholinesterase – new roles for an old actor. **Nature Reviews. Neuroscience**, v. 2, n. 4, p. 294-302, 2001.

SPANEVERELLO, R. M. et al. NTPDase and 5'-nucleotidase activities in synaptosomes from the cerebral cortex of rats experimentally demyelinated with ethidium bromide and treated with interferon β . **Neurochemical Research**, v. 31, n. 4, p. 455-462, 2006.

SRIVASTAVA, S.; CHANDRA, D. Pharmacological potentials of *Syzygium cumini*: a review. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 93, n. 9, p. 2084-2093, 2013.

STEFEEK, M. et al. Oxidative modification of rat eye lens proteins by peroxy radicals in vitro: protection by the chain-breaking antioxidants stobadine and Trolox. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1741, n. 1-2, p. 183-190, 2005.

STOCKER J. R.; J KEANEY, F. Role of oxidative modifications in atherosclerosis. **Physiological Reviews**, v. 84, n. 4, p. 1381-1478, 2004.

SZKUDELSKI, T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in b cells of the rat pancreas. **Physiological Research**, v. 50, n. 6, p. 536-546, 2001.

TAI, Y. et al. One-step synthesis of highly biocompatible multi-shaped gold nanostructures with fruit extract. **Institution of Engineering and Technology Nanobiotechnology**, v. 5, n. 2, p. 52-59, 2011.

TAKASU, N. et al. Streptozotocin- and alloxan induced H_2O_2 generation and DNA fragmentation in pancreatic islets. H_2O_2 as mediator for DNA fragmentation. **Diabetes**, v. 40, n. 9, p. 1141-1145, 1991.

TANWAR, R. S. et al. Antiatherosclerotic potential of active principle isolated from *Eugenia jambolana* in streptozotocin induced diabetic rats. **Evidence- Based Complementary and Alternative Medicine**, 127641, 2011.

TANWAR, R. S. et al. Attenuation of renal dysfunction by antihyperglycemic compound isolated from fruit pulp of *Eugenia jambolana* in streptozotocin induced diabetic rats. **Indian Journal of Biochemistry and Biophysics**, v. 47, n. 2, p. 83-9, 2010.

TAŞKIRAN, E. et al. Exogenously administered adenosine attenuates renal damage in streptozotocin- induced diabetic rats. **Renal failure**, v. 14, p. 1-7, 2016.

TAYEBATI, S. K. et al. Immunochemical and immunocytochemical characterization of cholinergic markers in human peripheral blood lymphocytes. **Journal of Neuroimmunology**, v. 132, n. 1-2, p. 147-55, 2002.

TEIXEIRA-SALUM, T. B. et al. Distinct Th1, Th2 and Treg cytokines balance in chronic periapical granulomas and radicular cysts. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 39, n. 3, p. 250-256, 2010.

THASNEEM, Y. M. et al. Biomimetic mucin modified PLGA nanoparticles for enhanced blood compatibility. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 409, n. 1, p. 237-244, 2013.

TIAN, H. et al. Biodegradable synthetic polymers: Preparation, functionalization and biomedical application. **Progress in Polymer Science**, v. 37, p. 237-280, 2011.

TITARENKO, O. T. et al. Adenosine deaminase in the complex diagnosis of different forms of extrapulmonary tuberculosis. **Problemy Tuberkuleza i Bolezneĭ Legkikh**, v. 11, p. 14-18, 2006.

TIWARI, B. K. et al. Efficacy of Composite Extract from Leaves and Fruits of Medicinal Plants Used in Traditional Diabetic Therapy against Oxidative Stress in Alloxan-Induced Diabetic Rats. **ISRN Pharmacology**, v. 4, 608590, 2014.

TIYABOONCHAI, W.; LIMPEANCHOB, N. Formulation and characterization of amphotericin B–chitosan–dextran sulfate nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 329, n. 1-2, p. 142-149, 2007.

TRAMS, E. G.; LAUTER, C. J. On the sidedness of plasma membrane enzymes. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 345, n. 2, p. 180-197, 1974.

TRIPATHI, A. K.; KOHLI, S. Pharmacognostical standardization and antidiabetic activity of *Syzygium cumini* (Linn.) barks (Myrtaceae) on streptozotocin-induced diabetic rats. **Journal of Complementary and Integrative Medicine**, v. 11, p. 71-81, 2014.

TURK, J. et al. Biochemical evidence for nitric oxide formation from streptozotocin in isolated pancreatic islets. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 197, n. 3, p. 1458-1464, 1993.

URURAHY, M. A. et al. Association of polymorphisms in IL6 gene promoter region with type 1 diabetes and increased albumin-to-creatinine ratio. **Diabetes/Metabolism Research and Reviews**, v. 31, n. 5, p. 500-506, 2015.

VALÉCIO, M. **Fitoterápicos crescer e aparecer**. Fito 2013 - Conteúdo dirigido aos profissionais da saúde. Disponível em: <<http://www.guiadafarmacia.com.br/fito-2013/fitoterapicos-crescer-e-aparecer>>. Acesso em: 07/12/2015.

VALERIUS, N. H. et al. Neutrophil and lymphocyte function in patients with diabetes mellitus. **Acta Medica Scandinavica**, v. 211, n. 6, p. 463-472, 1982.

- VAN DER WEYDEN, M. B.; KELLEY, W. N. Human adenosine deaminase. Distribution and properties, **The Journal of Biological Chemistry**, v. 251, n. 19, p. 5448-5456, 1976.
- VARELLA, P. V.; FORTE, W. C. N. F. Citokines: a review. **Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia**, v. 24, n. 4, p. 146-154, 2001.
- VASHIST, H.; JINDAL, A. Antimicrobial Activity of Medicinal Plants– Review. **International Journal or Research in Pharmaceutical and Biomedical Science**, v. 3, n. 1, p. 222-230, 2012.
- VIEGAS, E. C. et al. Toxicidade de óleos essenciais de alho e casca de canela contra fungos do grupo *Aspergillus flavus*. **Revista Horticultura Brasileira**, v. 23, n. 4, p. 915-919, 2005.
- VIGITEL BRASIL 2007: Vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância de Doenças e Agravos não Transmissíveis e Promoção da Saúde – Brasília: **Ministério da Saúde**, 2007.
- VIGITEL BRASIL 2015: Vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância de Doenças e Agravos não Transmissíveis e Promoção da Saúde – Brasília: **Ministério da Saúde**, 2015.
- VIKRANT, V. et al. Treatment with extracts of *Momordica charantia* and *Eugenia jambolana* prevents hyperglycemia and hyperinsulinemia in fructose fed rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 76, n. 2, p. 139-143, 2001.
- VIZZOTTO, M. C.; PEREIRA, M. C. Caracterização das propriedades funcionais do jambolão. Embrapa Clima Temperado. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**, v. 79, p. 1-26, 2008.
- WANG, J. C. et al. AOPPs induce MCP-1 expression by increasing ROS- mediated activation of the NF- κ B pathway in rat mesangial cells: inhibition by sesquiterpene lactones. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 32, n. 6, p. 1867-1877, 2013.
- WANG, L. J. et al. Expression of heme oxygenase-1 in atherosclerotic lesions. **The American Journal of Pathology**, v. 152, n. 3, p. 711-720, 1996.
- WANG, T. F.; GUIDOTTI, G. Golgi localization and functional expression of human uridine diphosphatase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 18, p. 11392-11399, 1998.
- WAUTIER, J. L.; GUILLAUSSEAU, P. J. Advanced glycation end products, their receptors and diabetic angiopathy. **Diabetes and Metabolism.**, v. 27, n. 5, p. 535-542, 2001.
- WILD, S. et al. Global prevalence of diabetes. Estimates for the year 2000 and projections for 2030. **Diabetes Care**, v. 27, n. 5, p. 1047-1053, 2004.

- WILLIAMS, D. N. et al. The microbial flora of the vagina and its relationship to bacteriuria in diabetic and non-diabetic women. **British Journal of Urology**, v. 47, n. 4, p. 453-457, 1975.
- WILSON, R. M.; TOMLINSON, D. R.; REEVES, W. G. Neutrophil sorbitol production impairs oxidative killing in diabetics. **Diabetic Medicine**, v. 4, n.1, p. 7-40, 1987.
- WINER, D. A. et al. B cells promote insulin resistance through modulation of T cells and production of pathogenic IgG antibodies. **Nature Medicine**, v. 17, n. 5, p. 610-617, 2011.
- WITKO-SARSAT, V. et al. Advanced oxidation protein products as novel mediators of inflammation and monocyte activation in chronic renal failure. **The Journal of Immunology**, v. 161, n. 5, 2524-2532, 1998.
- WITKO-SARSAT, V. et al. Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia. **Kidney International**, v. 49, n. 5, p. 1304-1313, 1996.
- YANG, W.; WIEDERHOLD, N. P.; WILLIAMS, R. O., RD. Drug delivery strategies for improved azole antifungal action. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 5, n. 11, p. 1199-1216, 2008.
- YANO, J.; NOVERR, M. C.; FIDEL, P. L. JR. Cytokines in the host response to *Candida vaginitis*: Identifying a role for non-claasical immune mediators, S100 alarmins. **Cytokine**, v. 58, n. 1, p. 118-128, 2012.
- YEGUTKIN, G. Nucleotide and nucleoside converting ectoenzymes: important modulators of purinergic signalling cascade. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1783, n. 5, p. 673-694, 2008.
- YELE, S. U.; VEERANJANEYULU, A. Toxicological assessments of aqueous extract of *Eugenia jambolana* stem bark. **Pharmaceutical Biology**, v. 48, n. 8, p. 849-854, 2010.
- YI, Y.; YOON, H. J. et al. A mixed polymeric micellar formulation of itraconazole: Characteristics, toxicity and pharmacokinetics. **Journal of Controlled Release**, v. 117, n. 1, p. 59-67, 2007.
- YILDIRIMTURK, S. et al. The effects of supplemental melatonin administration on the healing of bone defects in streptozotocin-induced diabetic rats. **Journal of Applied Oral Science**, v. 24, n. 3, p. 239-249, 2016.
- YLÄ-HERTTUALA, S. et al. Evidence for the presence of oxidatively modified low density lipoprotein in atherosclerotic lesions of rabbit and man. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 84, n. 4, p. 1086-1095, 1989.
- YOON, S. et al. Smoking status-dependent association of the 27-bp repeat polymorphism in intron 4 of endothelial nitric oxide synthase gene with plasma nitric oxide concentrations. **Clinica Chimica Acta**, v. 324, n. 1-2, p. 113-120, 2002.
- YOSHIDA, K. Mechanisms of LDL oxidation. **Clinica Chimica Acta**, v. 411, n. 23-24, p. 1875-1882, 2010.

YOUNIS, N. et al. Glycation of LDL in non-diabetic people: small dense LDL is preferentially glycosylated both in vivo and in vitro. **Atherosclerosis**, v. 202, n. 1, p. 162-168, 2009.

ZAGURY, L.; ZAGURY, R. L. **Tratamento atual do Diabetes mellitus**. Itapevi, SP. A. Araújo Silva Farmacêutica, 2009. 522 p.

ZHANG, C. et al. Nanostructured lipid carriers as a novel oral delivery system for triptolide: induced changes in pharmacokinetics profile associated with reduced toxicity in male rats. **International Journal of Nanomedicine**, v. 9, p. 1049-1063, 2014.

ZHANG, J. M.; AN, J. Cytokines, inflammation, and pain. **International Anesthesiology Clinics**, v. 45, n. 2, p. 27-37, 2007.

ZHAO, L. Effects of free radicals in diabetes. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 77, p. 222, 2001.

ZIMMERMANN, H. Purinergic signaling in neural development. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 22, n. 2, p. 194-204, 2011.

ZIMMERMANN, H. Ectonucleotidases: some recent developments and a note on nomenclature. **Drug Development Research**, v. 52, n. 1-2, p. 44-56, 2001.

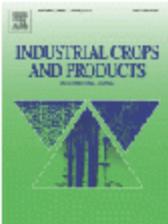
ANEXOS

ANEXO A – PERMISSÃO PARA REPRODUÇÃO DO ARTIGO 1




[Home](#)
[Account Info](#)
[Help](#)


[Live Chat](#)



Title: A new biodegradable polymeric nanoparticle formulation containing *Syzygium cumini*: Phytochemical profile, antioxidant and antifungal activity and in vivo toxicity

Author: Paula E.R. Bitencourt, Luana M. Ferreira, Lariane O. Cargnelutti, Laura Denardi, Aline Boligon, Michelli Fleck, Ricardo Brandão, Margareth L. Athayde, Leticia Cruz, Régis A. Zanette, Sydney H. Alves, Maria B. Moretto

Publication: Industrial Crops and Products

Publisher: Elsevier

Date: May 2016

Copyright © 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

Logged in as:
Paula Bitencourt
Account #:
3000725750

[Logout](#)

Order Completed

Thank you for your order.

This Agreement between Paula Bitencourt ("You") and Elsevier ("Elsevier") consists of your license details and the terms and conditions provided by Elsevier and Copyright Clearance Center.

Your confirmation email will contain your order number for future reference.

[Get the printable license.](#)

License Number	3930350192427
License date	Aug 15, 2016
Licensed Content Publisher	Elsevier
Licensed Content Publication	Industrial Crops and Products
Licensed Content Title	A new biodegradable polymeric nanoparticle formulation containing <i>Syzygium cumini</i> : Phytochemical profile, antioxidant and antifungal activity and in vivo toxicity
Licensed Content Author	Paula E.R. Bitencourt, Luana M. Ferreira, Lariane O. Cargnelutti, Laura Denardi, Aline Boligon, Michelli Fleck, Ricardo Brandão, Margareth L. Athayde, Leticia Cruz, Régis A. Zanette, Sydney H. Alves, Maria B. Moretto
Licensed Content Date	May 2016
Licensed Content Volume	83
Licensed Content Issue	n/a
Licensed Content Pages	8
Type of Use	reuse in a thesis/dissertation
Portion	full article
Format	both print and electronic
Are you the author of this Elsevier article?	Yes
Will you be translating?	No
Order reference number	
Title of your thesis/dissertation	EFEITO DO EXTRATO AQUOSO E DE NANOPARTICULAS POLIMÉRICAS CONTENDO SEMENTES DE <i>Syzygium cumini</i> SOBRE COMPLICAÇÕES DO DIABETES MELLITUS IN VITRO E IN VIVO
Expected completion date	Dec 2016
Estimated size (number of pages)	185
Elsevier VAT number	GB 494 6272 12
Requestor Location	Paula Bitencourt Av. Roraima, 1000 Santa Maria, RS 97105900 Brazil Attn: Paula Bitencourt
Total	0.00 USD

[ORDER MORE](#)

[CLOSE WINDOW](#)

ANEXO B – CARTA DE ACEITE DO ARTIGO 2

August 11, 2016

Dear Dr. Maria Beatriz Moretto

I am pleased to inform you that your manuscript titled as "Anti-inflammatory action of seed extract and polymeric nanoparticles of *Syzygium cumini* in diabetic rats infected with *Candida albicans*" (Manuscript Number: JAPS-2016-06-467) was accepted for publication in the Journal of Applied Pharmaceutical Science. You are required to submit article processing charges USD 75 within next three days of receiving this mail through Banking/Paypal. Payment details are as follows;

For SWIFT/wire transfer:

[Please add US \$ 10 extra for bank transaction charges]

A/C Name: OPEN SCIENCE PUBLISHERS LLP

A/C No. 50200005570011

Bank Name: HDFC bank Pvt. Ltd.

IFSC: HDFC0000192

SWIFT Code: HDFCINBBXXX

MICR code: 474240002

Paypal email: opensciencepublishersllp@gmail.com

Please send a scanned copy of the deposition receipt of amount transferred to editor@japsonline.com

You could check your possible publication date at your author page.

You may login to your author account page, and visit accepted articles section in order to get official/formal acceptance letter as PDF.

I would like to remind that you could send your future manuscripts to Journal of Applied Pharmaceutical Science.

Sincerely yours,

Paras Sharma

Associate Editor

Journal of Applied Pharmaceutical Science

editor@japsonline.com

<http://japsonline.com/index.php>

ANEXO C – COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DO MANUSCRITO 1

ScholarOne Manuscripts™ Paula Bitencourt ▾ Instructions & Forms Help Log Out

**Pharmaceutical
Biology**  Taylor & Francis
Taylor & Francis Group

Home Author Review

Author Dashboard

Author Dashboard

1 Submitted Manuscripts >

Submitted Manuscripts

STATUS	ID	TITLE	CREATED	SUBMITTED
ME: Lewandowski, Carol • Under Review	NPHB-2016-2438	Syzygium cumini loaded polymeric nanoparticles or seed extract ameliorate oxidative stress markers and other biochemical parameters in diabetic rats infected with Candida albicans View Submission Cover Letter	28-Sep-2016	29-Sep-2016