

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
DEPARTAMENTO DE APOIO A PESQUISA  
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE BOLSAS DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

ATIVIDADE INIBITÓRIA SOBRE A LIPASE E EFEITO HIPOLIPEMIANTE DE UM  
EXTRATO DE FOLHAS DO MARACUJÁ-DO-MATO (*Passiflora nitida* Kunth).

Bolsista: Rhaydson Soares da Silva, CNPq.

MANAUS  
2011

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
DEPARTAMENTO DE APOIO A PESQUISA  
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE BLSAS DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

RELATÓRIO FINAL

PIB-S/0036/2010

ATIVIDADE INIBITÓRIA SOBRE A LIPASE E EFEITO HIPOLIPEMIANTE DE UM  
EXTRATO DE FOLHAS DO MARACUJÁ-DO-MATO (*Passiflora nitida* Kunth).

Bolsista: Rhaydson Soares da Silva, CNPq  
Orientador: Prof. Dr. Émerson Silva Lima

MANAUS  
2011

Todos os direitos deste relatório são reservados à Universidade Federal do Amazonas, ao Laboratório de Atividade Biológica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas e aos seus autores. Parte deste relatório só poderá ser reproduzida para fins acadêmicos ou científicos.

Esta pesquisa, financiada pelo Conselho Nacional de Pesquisa – CNPq, através do Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica da Universidade Federal do Amazonas.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>07</b>
<b>1.1 JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>08</b>
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>09</b>
2.1 Objetivo Geral .....	09
2.2 Objetivos Específicos .....	09
<b>3 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	<b>10</b>
3.1 Gênero <i>Passiflora</i> .....	10
3.1.1 Espécie <i>Passiflora nitida</i> Kunth .....	12
3.2 Princípios ativos naturais e atividade farmacológica.....	12
3.2.1 Atividades farmacológicas do Gênero <i>Passiflora</i> .....	14
3.2.2 Hipercolesterolemia e flavonóides .....	15
<b>4 METODOLOGIA</b> .....	<b>17</b>
4.1 Preparação do extrato .....	17
4.2 Animais.....	17
4.3 Ensaio da atividade inibitória <i>in vitro</i> da lipase pancreática .....	17
4.4 Efeito da administração oral do extrato de <i>P. nitida</i> , pós sobrecarga de triglicerídeos, sobre a trigliceridemia em ratos <i>wistar</i> .....	18
4.5 Dosagens bioquímicas dos marcadores de hipercolesterolemia.....	18
4.6 Efeito hipolipidêmico após indução por dieta hipercolesterolêmica.....	19
4.7 Teste de inibição da alfa-amilase.....	19
4.8 Teste de inibição da alfa-glucosidase .....	20
4.9 Teste do efeito de sobrecarga oral à carboidrato .....	21
4.10 Análise estatística dos dados .....	21
<b>5 RESULTADOS/DISCUSSÃO</b> .....	<b>22</b>
<b>6 CONCLUSÃO</b> .....	<b>24</b>
<b>7 CRONOGRAMA</b> .....	<b>25</b>
<b>8 REFERÊNCIAS</b> .....	<b>30</b>

## Resumo

A utilização de plantas medicinais tem acompanhado a evolução do homem, e muitos dos seus efeitos vêm sendo comprovados cientificamente. O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade inibitória do extrato hidroetanólico das folhas de *Passiflora nítida* kunth sobre a lipase pancreática *in vitro* e o efeito hipoglicemiante e hipolipemiante em ratos. Os testes de inibição enzimática foram realizados utilizando substrato específico para a enzima e realizados em teste colorimétrico utilizando microplacas de 96 poços. Os testes para avaliação do efeito hipoglicemiante foi realizado em ratos normais divididos em dois grupos: grupo 1 (controle) e grupo 2 (extrato 100 mg/kg v.o.) após sobrecarga de sacarose (1,5 mg/kg de peso). O extrato na concentração 1mg/mL apresentou inibição para lipase pancreática de  $82,34 \pm 1,23$  % e a concentração capaz de inibir 50% da atividade enzimática ( $CI_{50}$  em  $\mu\text{g/mL}$ ) foi de  $21,23 \pm 0,80$ . No experimento de inibição da glicemia após a administração do extrato houve um menor nível glicêmico, quando comparado com o grupo controle. Conclui-se que o extrato da *P.nítida* obteve considerável inibição sobre a lipase *in vitro* e inibiu a absorção de glicose após sobre carga de sacarose em ratos.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Passiflora nítida*, lipase pancreática, efeito hipolipemiante, atividade enzimática.

## Abstract

The use of medicinal plants has overseen the evolution of man, and many of its effects have been scientifically proven. The objective of this study was to evaluate the *in vitro* inhibitory activity of the hydroethanolic extract of leaves of *Passiflora nitida* Kunth on the pancreatic lipase and lipid-lowering and hypoglycemic effect in rats. The enzyme inhibition tests were performed using specific substrate for the enzyme and carried out in colorimetric test using 96-well microplates. Tests to assess the hypoglycemic effect was achieved in normal mice divided into two groups: group 1 (control) and group 2 (100 mg extract / kg p.o.) after overload of sucrose (1.5 mg / kg) in the extract in 1mg/mL showed inhibition of pancreatic lipase  $82.34 \pm 1.23\%$  and the concentration to inhibit 50% enzyme activity (IC<sub>50</sub> in  $\mu\text{g/mL}$ ) was  $21.23 \pm 0.80$ . In the experiment of inhibition of glucose after the administration of the extract, there was a lower blood glucose levels, compared with the control group. It is concluded that the extract of *P.nitida* shows considerable inhibition on lipase in vitro and inhibit the absorption of glucose after sucrose loading in rats.

**Keywords:** *Passiflora clear*, pancreatic lipase, lipid-lowering effect, enzyme activity.

## 1. INTRODUÇÃO

O uso de plantas medicinais como opção de cura e tratamento tem aumentado em todo o mundo e os pacientes que adotam essa alternativa são 80% da população do planeta e apenas 30% fazem uso por indicação médica. Mesmo com a biodiversidade vasta, o Brasil é um país que possui poucos trabalhos comprovando a eficácia no tratamento com plantas medicinais (SILVA et. al. 2002).

A família Passifloraceae, possui cerca de 70 gêneros e 600 espécies vegetais. Mais da metade dessas espécies está incluído no gênero *Passiflora*, tendo distribuição principalmente em regiões tropicais e subtropicais e uso popular em diversas áreas. Várias espécies do gênero *Passiflora*, denominadas popularmente como maracujá, são empregadas extensivamente na medicina popular em muitos países, sob diversas formas farmacêuticas (DHAWAN et al., 2004; DI STASI et al., 2002; HOPKINS, 1999; MOBOT, 2008; SANTOS et al., 2005).

*Passiflora nitida*, conhecida popularmente como maracujá-do-mato, maracujá-de-cheiro, maracujá-de-rato e maracujá-suspiro, é uma espécie silvestre originária da Amazônia e está dispersa por todo o norte da América do Sul (HOPKIN, 1999; INPI, 2006; JUNQUEIRA et al., 2007; MORAES et al., 2002).

Tem-se verificado que as substâncias antioxidantes, destacando-se os flavonóides, são capazes de reverter a disfunção endotelial provocada pela hipercolesterolemia e também reduzir o numero de eventos coronários.

## 1.1 JUSTIFICATIVA

O quadro de dislipidemia, o principal fator desencadeador de aterosclerose, é caracterizado com alterações qualitativas e/ou quantitativas dos lipídeos e lipoproteínas sanguíneas, que podem acontecer em decorrência de vários fatores (hábito alimentar, obesidade, sedentarismo, tabagismo, etilismo, distúrbios genéticos), a dieta é o mais importante deles. O acúmulo de uma ou mais classes de lipoproteínas é causado pela deficiência de remoção do plasma ou maior produção. A Sociedade Brasileira de Cardiologia (SBC) recomenda que a medição dos níveis de colesterol comece aos 30 anos, pois já se sabe que em qualquer idade quanto mais alto o nível de colesterol sanguíneo maior a risco de doenças cardiovasculares, controle traduz uma evidente redução de cardiopatias (GEBARA, 1999; LIBBY, 2000; METZE, 2000).

Estima-se, que 25.000 espécies de plantas sejam usadas nas preparações da medicina tradicional, cerca de 2/3 delas encontram-se nos trópicos, como consequência pode-se esperar que as potenciais descobertas de novos produtos naturais biologicamente ativos serão das florestas tropicais (GARCIA, 1995; RIBEIRO et al., 1998). A biodiversidade das florestas tropicais, como a da Amazônia ainda é desconhecida, com isso o uso de produtos naturais medicinais ainda é fragmentário e escasso. Diante destas evidências, a redução do colesterol plasmático (CP) e a proteção endotelial colocam-se como importantes providências para o controle da doença aterosclerótica. Considerando o elevado custo dos medicamentos redutores do CP e a perspectiva de seu uso prolongado, os pacientes têm recorrido a tratamentos alternativos para o controle da hipercolesterolemia. Estes tratamentos têm sido utilizados de forma empírica pela população, carecendo de uma metodologia de estudo que permita conclusões mais confiáveis.



## **2. Objetivos**

### **2.1 Geral:**

Estudar a atividade inibitória da lipase *in vitro* e o efeito hipolipidêmico de um extrato de folhas do maracujá-do-mato (*Passiflora nitida* Kunth).

### **2.2 Específicos:**

- Avaliar a atividade inibitória da lipase *in vitro* de um extrato padronizado de *P. nitida*;
- Conhecer o efeito da administração oral de um extrato padronizado de *P. nitida* pós sobrecarga de triglicerídeos, sobre a trigliceridemia em ratos Wistar;
- Avaliar a atividade hipolipidêmica de um extrato padronizado de *P. nitida* sobre a hiperlipidemia induzida por dieta rica em colesterol em ratos da raça Wistar;
- Avaliar a atividade inibitória de um extrato padronizado de *P. nitida* sobre as enzimas alfa-amilase e alfa-glucosidase;
- Avaliar a atividade hipoglicemiante de um extrato padronizado de *P. nitida* sobre a sobrecarga oral de carboidratos.

### 3 REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 Gênero *Passiflora*

A família Passifloraceae, possui cerca de 70 gêneros e 600 espécies vegetais. Mais da metade dessas espécies está incluído no gênero *Passiflora*, tendo distribuição principalmente em regiões tropicais e subtropicais e uso popular em diversas áreas. Várias espécies do gênero *Passiflora*, denominadas popularmente como maracujá, são empregadas extensivamente na medicina popular em muitos países, sob diversas formas farmacêuticas (DHAWAN et al., 2004; DI STASI et al., 2002; HOPKINS, 1999; MOBOT, 2008; SANTOS et al., 2005), algumas espécies do gênero *Passiflora* e suas respectivas utilizações representada na Tabela 01.

<b>Espécie</b>	<b>Utilização</b>	<b>Parte da planta</b>	<b>Forma utilizada</b>
<i>Passiflora actínia</i>	Sedação	Folha	Extratos hidroalcoólico e Metanólico
<i>Passiflora alata</i>	Aterogenicidade, cardioproteção Hipnose, Inflamação	Folha	Extrato aquoso
	Insônia		Extrato etanólico
	Ansiedade Hipnosedação Antioxidação		Extrato hidroalcoólico
	Algumas condições dolorosas, ansiedade, distúrbios nervosos da menopausa, insônia, irritação da mucosa respiratória, tosse seca	-	Solução líquida de uso oral (3 x dia)
	Dor, redução da atividade motora Espontânea		-
<i>Passiflora caerulea</i>	Indução de vômito, pneumonia (antimicrobiano moderado)	Folha	-
	Ansiedade, sedação	Fruto	
	Diurético, sedação, verminose	Raiz	
	Espasmo, insônia (devida diversas condições nervosas, mas não à	-	

	dor)		
<i>Passiflora capsularis</i>	Emenagogo	-	-
<i>Passiflora coriácea</i>	Antioxidante	Casca, caule e Folha	Extrato hexânico

Tabela 01 – Algumas espécies do gênero *Passiflora* e suas respectivas utilizações.

**Fonte:** (DHAWAN et al., 2004; EDWIN et al., 2007; MONTANHER et al., 2007; PROVENSI, 2007; RUDNICKI et al., 2007; VARGAS et al., 2007).

Espécie	Utilização	Parte da planta	Forma utilizada
<i>Passiflora edulis</i>	Hipertensão	Casca	Extrato metanólico
	Disenteria, hipertensão	Folha	Chá
	Inflamação		Extrato aquoso
	Leishmaniose Dor, febre, inflamação Hipnose, sedação	Folha	Extrato etanólico
	Cicatrização de feridas e Inflamação/Antioxidante	Folha	Extrato hidro- alcoólico
	Calmanete (preparador para o sono tranqüilo)		Infusão: 2 colheres (sopa) de folhas secas de maracujá para 1 xícara de água (tomar uma xícara no começo da noite e outra no momento de deitar-se para dormir),suco
	Ansiedade, nervosismo		-
	Carcinoma gástrico, constipação, estimulação digestiva	Fruto	-
	Insônia	Partes aéreas	Pós preparado em Solução hidroalcoólica (etanol:água - 4:6), usando dióxido de silício coloidal, Aerosil 200®, como adjuvante de secagem
	Ansiedade, sedação		-
Estresse, insônia, malária, taquicardia, tosse nervosa Antifúngico moderado contra <i>Microsporium gypseum</i> , <i>Chrysosporium tropicume</i>			

	<i>Trichophyton terrestre</i> , helmintíase, cólicas de crianças, diarreia, diurético, estimulante, sedação, sintomas da menopausa, tônico	-	-
<i>Passiflora nitida</i>	Antioxidante, atividade antimicrobiana contra <i>Escherichia coli</i>	Casca, caule e folha	Extrato hexânico
	Problemas gastrointestinais	-	-

### Continuação da Tabela 01

Tabela 01 – Algumas espécies do gênero *Passiflora* e suas respectivas utilizações.

**Fonte:** (DHAWAN et al., 2004; EDWIN et al., 2007; MONTANHER et al., 2007; PROVENSÍ, 2007; RUDNICKI et al., 2007; VARGAS et al., 2007).

#### 3.1.1 *Passiflora nitida* Kunth

*Passiflora nitida*, conhecida popularmente como maracujá-do-mato, maracujá-de-cheiro, maracujá-de-rato e maracujá-suspiro, é uma espécie silvestre originária da Amazônia e está dispersa por todo o norte da América do Sul. Sobre sua morfologia externa, trata-se de uma herbácea ou lenhosa de folhas de superfície cartáceas a coriáceas, opacas e envernizadas. Apresenta nervuras terciárias distintamente percurrentes, retas e oblíquas. Suas nervuras secundárias apresentam glândulas terminais um pouco proeminentes. As margens são levemente dentadas (HOPKIN, 1999; INPI, 2006; JUNQUEIRA et al., 2007; MORAES et al., 2002).

A planta cresce espontaneamente em vegetação secundária, beira de rios e estradas e seus frutos são consumidos in natura pela população local. Uma das principais utilizações medicinais da espécie é em distúrbios gastrointestinais (CIRAD, 2006; HOPKIN, 1999; INPI, 2006; MORAES et al., 2002).

#### 3.2 Princípios ativos naturais e atividade farmacológica

As plantas medicinais são empregadas na prevenção, tratamento, cura de distúrbios, disfunções ou doenças como primeiro recurso medicinal desde a Antiguidade, tendo representado a base da terapêutica durante muitos anos. São usadas popularmente contra várias doenças infecciosas e parasitárias, vetores, problemas crônico-degenerativos, emagrecimento, para a regulação da menstruação, com intuito abortivo e até como antídoto ao veneno de cobra (MACIEL et al., 2002; SILVA, 2002).

O interesse da população em drogas de origem vegetal e o estímulo ao uso destas deve-se a várias razões, entre as quais, a dificuldade de acesso aos medicamentos industrializados, os efeitos colaterais da terapêutica convencional, além do conceito equivocado de que produtos naturais não fazem mal à saúde. No entanto, a grande maioria das plantas medicinais é utilizada de forma empírica, sem a devida comprovação científica de suas virtudes farmacológicas (RATES, 2001; MACIEL et al., 2002; TOLEDO et al., 2003).

Os produtos naturais servem como recurso para a inovação na elaboração de drogas, tendo um papel significativo na descoberta e compreensão de vias celulares específicas de doenças. Contudo, a transformação de uma planta em um medicamento deve visar à preservação da integridade química do vegetal, garantindo a constância de sua ação biológica e a sua segurança de utilização, além de valorizar seu potencial terapêutico (TOLEDO et al., 2003).

As plantas podem ser submetidas à extração e procedimentos de purificação sucessivos para isolar as combinações de substâncias de interesse, que podem por si só ser ativas e usadas diretamente como uma droga ou podem ser usadas como precursores em processos sintéticos ou modelos para síntese total de novas drogas, com atividades farmacológicas bem definidas ou em estudos de relação estrutura-atividade. O medicamento obtido empregando-se exclusivamente matérias-primas ativas vegetais, cuja composição não

inclua substâncias ativas de qualquer outra origem, nem as associações destas com extratos vegetais, é denominado fitoterápico.

Um fitoterápico também é caracterizado pelo conhecimento da eficácia e dos riscos de seu uso, assim como pela reprodutibilidade e constância de sua qualidade. Sua eficácia e segurança são validadas através de levantamentos etnofarmacológicos de utilização, documentações tecnocientífica sem publicações ou ensaios clínicos de fase III (ANVISA, 2004; RATES, 2001).

Apesar de diversas plantas terem sido estudadas do ponto de vista fitoquímico e de conhecer bastante sobre os seus usos populares, a realização de ensaios bioquímicos e biológicos para a identificação de atividades farmacológicas em espécies amazônicas é uma área pouco desenvolvida.

### **3.2.1 Atividades farmacológicas do Gênero *Passiflora***

A atividade antiinflamatória de espécies do gênero *Passiflora* foi comprovada cientificamente para a *P. incarnata*, *P. edulis* e *Passiflora alata*. A atividade antinociceptiva, por sua vez, foi comprovada para a *P. edulis*. Os estudos de *Passiflora nitida* presentes na literatura, dizem respeito à atividade antimicrobiana contra *Escherichia coli* e à atividade antioxidante (BENDINI et al., 2006; BENINCÁ et al., 2007; BEZERRA, José et al., 2006; BORRELLI et al., 1996; GARROS et al., 2006; GOMES et al., 2006; SILVA et al., 2001; GONÇALVESFILHO et al., 2006; SILVA et al., 2006; MONTANHER et al., 2007; VARGAS et al., 2007).

Os flavonóides, glicosídeos, alcalóides, compostos fenólicos e componentes cianogênicos têm sido relatados como os principais fitocomponentes das espécies de *Passiflora*. No entanto, as atividades farmacológicas destas espécies têm sido geralmente atribuídas aos componentes flavonoídicos, por exemplo, benzoflavonas tri-substituídas,

crisina e vitexina. Visto que ao sofrerem metabolização no intestino delgado, os flavonóides atuam como antioxidantes, através da alteração da produção de radicais livres, eliminação de precursores dos radicais livres, quelação de metais e elevação de antioxidantes endógenos.

Acredita-se que a ingestão regular de alimentos fontes desses compostos auxilie a prevenção de doenças cardiovasculares, pois regulam a permeabilidade capilar permitindo o fluxo constante de oxigênio e nutrientes essenciais; além de relaxarem os músculos do sistema cardiovascular através de ações hipertensoras; evitam a formação de coágulos; previnem a oxidação de LDL por radicais livres (BENINCÁ et al., 2007; BÔAS, 2007; DHAWAN et al., 2001a, 2003, 2004; DI STASI et al., 2002; DOYAMA et al., 2005; FENNER, 2006; OGA et al., 1984; PIMENTEL, 2005; PROVENSI, 2007; RHAMAN et al., 1997; SHARMA, 2003; SOULIMANI et al., 1997).

### **3.2. 2 Hipercolesterolemia e flavonóides**

A associação entre hiperlipidemia e doença coronariana está bem estabelecida e se fundamenta principalmente no papel do colesterol durante o desenvolvimento da aterosclerose. O acúmulo de LDL sobre a membrana endotelial torna-se fator de risco para a aterosclerose e doenças cardiovasculares e a fração HDL (lipoproteína de alta densidade) impede este depósito. Embora a patogênese dessa enfermidade seja complexa, um dos fatores determinantes reside na oxidação das LDL, induzindo o desenvolvimento da placa ateromatosa.

De outro lado, a redução do número de eventos e de mortalidade ou doença coronária, a interrupção ou mesmo a regressão da doença aterosclerótica através de drogas redutoras do colesterol plasmático, também tem sido referida por inúmeros estudos. Os mecanismos envolvidos na redução dos eventos e na mortalidade por doença coronária, quando ocorre diminuição do colesterol plasmático, parecem estar relacionados à reversão da disfunção

endotelial e estabilização da placa de aterosclerose, uma vez que não se observa aumento significativo do diâmetro vascular ao nível da placa de aterosclerose (ALVES et al., 2008; BLANKENHORN et al., 1987; BROWN et al., 1990; RIBEIRO et al., 1998; WHITNEY, 1994).

Tem-se verificado que as substâncias anti-oxidantes, destacando-se os flavonóides, que são capazes de reverter a disfunção endotelial provocada pela hipercolesterolemia e também reduzir o numero de eventos coronários. Os flavonóides são compostos polifenólicos vegetais que atuam como antioxidantes e estão presentes em uma série de alimentos como cacau, chás (verde e preto), uvas vermelhas, vinho tinto e café. Como exemplos de substancias flavonoides temos as catequinas, quercetinas e isoflavonas.

É conhecido suas ações antioxidantes e protetoras de doenças coronarianas in vitro e in vivo porém, estudos epidemiológicos como o feito por Rimm et al., (1999) e Hertog et al., (1997) não acharam evidência entre o consumo de chá e melhora na oxidação do LDL ou risco cardiovascular em humanos. Pesquisas feitas em pacientes cardíacos em uso de chocolate amargo mostraram um provável efeito protetor como o feito por Wanet al., (2001).

Mais tarde, Davies et al (2003) associaram o consumo de chá preto (Camélia) com a diminuição do colesterol total, LDL e ApoLipoproteina B (ApoB). Há também o famoso estudo de Lyon et al., (1999) onde pela primeira vez se detectou influência direta entre os hábitos alimentares e diminuição do risco de desenvolver doenças cardiovasculares (DCV). Houve significância estatística na suposição que o consumo do vinho tinto durante refeições diminuiria a taxa de mortalidade por doenças cardiovasculares na França, independente da quantidade e qualidade de gordura ingerida na dieta. Estes resultados levaram os cientistas a pesquisarem os mecanismos que levariam a diminuição da oxidação do colesterol humano e associarem ao poder antioxidante dos flavonóides (BEECHER, 2003; DAVIES et al., 2003;



DULLO et al., , 1999) (CHAN et al., 1999; CHAUDHARI et al., 1977; HERTOOG et al., 1993; NAGAO et al., 2005; WAN et al., 2001).

## **4. Material e métodos**

### **4.1 Preparação do Extrato**

O extrato foi preparado segundo Carvalho, et al (2008), no qual o extrato bruto aquoso (EA), de *P. nitida* foi obtido através do método de maceração estática com 1000 mililitros (mL) de solvente (água), à temperatura ambiente, por um período de sete dias. Após filtrações, o solvente do extrato foi liofilizado gerando o extrato bruto da planta.

### **4.2 Animais**

Foram utilizados ratos machos (linhagem *Wistar*), provenientes do biotério da Universidade Federal do Amazonas – UFAM. Os animais serão divididos em cinco grupos com seis animais cada, e foram acondicionados em gaiolas, em sala fechada e isolada, umidade  $60\pm 10$ , temperatura de  $22\pm 2$ , controlada por ar-condicionado.

### **4.3 Ensaio da atividade inibitória *in vitro* da lipase pancreática**

Para a determinação da atividade lipásica foi utilizado o procedimento de Lee (Lee et al., 1993) com modificações. Foi preparada uma solução (5mg/mL) de lipase pancreática de suíno cru tipo II (Sigma, Steinheim, a Alemanha). Uma solução 10mM de p-nitrofenilpalmitato (PNP) (Sigma, Steinheim, a Alemanha), em acetonitrila foi preparada e somada com etanol para alcançar a concentração final 3.33 mM de PNP. A composição da mistura da reação foi: 10  $\mu$ L de PNP 3,3 mM, 162 $\mu$ L de Tris-HCl 75mM amarelado (pH=8.5) (Sigma, Steinheim, a Alemanha), 16  $\mu$ L de extrato e 12 $\mu$ L de solução de enzima. A mistura foi incubada à 37°C por 25 minutos antes do substrato ser somado. No controle positivo foi substituído o bioativo com o mesmo volume a mistura de água: metanol (1:1). A reação foi realizada em microplacas e a absorbância medida a 405nm. Todos os testes foram realizados em triplicatas e amostras em branco sem a enzima serão medidas para o extrato. A inibição do

bioativo foi calcula pela seguinte fórmula: Inibição =  $100 - (\text{Abs. Extrato} / \text{Abs. Controle}) * 100$ .

A partir dos resultados de inibição foi calculada a concentração capaz de inibir 50% da atividade enzimática utilizando um teste de regressão linear. Para efeito de comparação, o orlistat (xenical) foi testado e determinado a CI50.

#### **4.4 Efeito da administração oral do extrato de *P. nitida*, pós sobrecarga de triglicerídeos, sobre a trigliceridemia em ratos *Wistar*.**

Após 1 semana de aclimação. Dez ratos serão divididos em dois grupos. Grupo I – o qual realizada coleta de sangue caudal, em seguida será administrado 500µl/100g de solução salina, após trinta minutos 500µl/100g da solução hipercolesterolêmica ( 1:1 banha de porco/óleo de oliva e 20mg/mL de ácido cólico ). Grupo II – o qual também será realizada coleta caudal, em seguida será administrada 500µl/100g do extrato de *Passiflora nitida*Kunth(100mg/kg), após trinta minutos será administrada 500µl/100g da solução hipercolesterolêmica. Serão realizadas três coletas de sangue nos animais dos dois grupos nos tempos: 0h, 2h e 4h.

#### **4.5 Dosagens bioquímicas dos marcadores de hipercolesterolemia**

Lipídios. O colesterol total, lipoproteínas de alta densidade (HDL), lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e triglicérides em amostras séricas serão determinados colorimetricamente e enzimaticamente utilizando ensaio kits comerciais (Labtest, Minas Gerais, Brasil). Será utilizado o equipamento automatizado Cobas Mira Plus (Roche).

#### **4.6 Efeito hipolipidêmico após indução por dieta hipercolesterolêmica**

O Efeito hipolipidêmico após indução por dieta hipercolesterolêmica será realizado segundo Seok, et al., (2004), no qual trinta ratos serão divididos aleatoriamente em cinco grupos com seis animais cada. Após 1 semana de aclimação, será incorporada a dieta-padrão

dos animais, 2,0% de colesterol, 0,5% de ácido cólico e 0,1% de Propiluracil durante 6 dias. Os animais serão então separados em 5 grupos. Grupo I – que receberão apenas a dieta Hipercolesterolêmica e nenhum tratamento; Grupos II e III – receberão dieta hipercolesterolêmica, e administração por via oral (gavagem) diariamente do extrato padronizado de *P. nítida* nas doses de 100 mg/kg e 200mg/kg, respectivamente; o grupo IV receberá dieta hipercolesterolêmica e administração de Xenical ( 20mg/kg). A dieta padrão será retirada 10h antes de cada amostragem de sangue e será feita por coleta caudal a cada 7 dias durante um mês.

#### **4.7 Teste de inibição da alfa-amilase**

O teste foi realizado segundo o método modificado de Subramanianet AL.(2008) e tem como princípio a degradação do substrato cromógeno alfa-(2-cloro-4-nitrofenil)-beta-1,4-galactopiranosilmaltoside (Labtest, Lagoa Santa, MG, Brasil). O extrato de *P. nítida* diluída em DMSO (50% v.v) foi testado em várias concentrações, a partir de 100µg/mL. Na microplaca, 20µL do extrato de *P.nítida* com 20µL de DMSO contendo 0,1mg/ml de alfa-amilase (Sigma Aldrich Chemical, USA) acondicionou-se em estufa na temperatura de 37° C por 5 min. Em seguida, 200µL do substrato foram adicionados, e realizou-se a primeira leitura, 405 nm (A1). Então, a microplaca foi acondicionada a 37° C por 10 minutos para que seja efetuada a leitura final (A2) na mesma absorvância. Como droga inibidora padrão utilizou-se a Acarbose nas mesmas condições. A porcentagem de inibição da alfa-amilase foi calculada com a seguinte equação:

$$\% \text{inibição} = 100 - (A2 - A1 \text{ amostra} / A2 - A1 \text{ controle negativo}) \times 100$$

Onde: A1: absorvância da leitura inicial,

A2: absorvância da leitura final.

#### **4.8 Teste de inibição da alfa-glucosidase**

O teste foi realizado utilizando o método modificado de Andrade Cetto et AL.(2008) e baseia-se no princípio de degradação do substrato cromógeno 4-nitrofenil- $\alpha$ -D-glicopiranosídeo (Labtest, MG, Brasil). Sendo assim, 20 $\mu$ L de tampão de fosfato de sódio 0,1 M, pH 6,9 com extrato de *P.nítida* em várias concentrações (a partir de 100  $\mu$ g/ mL) foi incubado a 37° C por 5 min com 180  $\mu$ L de tampão contendo 2 mg/mL de alfa-glucosidase (Sigma Aldrich Chemical). Depois de cinco minutos em estufa a 37° C foi adicionado 150 $\mu$ L do substrato para que seja efetuada a primeira leitura (A1) em absorvância de 405 nm (ANDRADE-CETTO et AL.,2008). A leitura final (A2) na mesma absorvância realizou-se depois de 30 minutos em estufa a 37° C. Como droga inibidora padrão será utilizada a Acarbose nas mesmas condições. Para o cálculo da inibição será utilizada a equação:

$$\% \text{ inibição} = 100 - (A2 - A1 \text{ amostra} / A2 - A1 \text{ controle negativo}) \times 100$$

Onde: A1: absorvância da leitura inicial,

A2: absorvância da leitura final.

#### **4.9 Teste do efeito de sobrecarga oral à carboidrato**

O teste realizou-se de acordo com Kasabri et al. (2011). Para este teste foram utilizados animais saudáveis em jejum de 8 a 12 horas. A primeira coleta de sangue caudal foi efetuada antes de qualquer administração, correspondendo o tempo 0 na curva glicêmica. A dosagem de glicose sérica efetuou-se utilizando o aparelho ACCUCHECK®.

Depois da primeira coleta de sangue foi administrado a dose de, 50 e 100 mg/ Kg de peso do animal, do extrato de *P.nítida* ao grupo 1 e 2, respectivamente. Ao grupo 3

administrou-se a droga padrão, Acarbose, na dose de 100 mg/Kg e aos animais do grupo 4 foi administrada solução salina. Todas as administrações foram via oral por gavagem sendo 1mL para cada 100g de animal.

Passados 15 minutos da administração da substância inibidora, teste e controle, foi administrada aos animais a solução de carboidrato, sendo que foram testados a glicose, sacarose e amido. Então monitorou-se o pico glicêmico pós-prandial com coleta de sangue em 15, 30, 60 e 120 minutos após a administração da solução de carboidratos.

#### **4.10 Análise estatística dos dados**

Os resultados obtidos foram analisados com o programa SigmaStat (versão 3.5 para Windows; Systat Software, San Jose, California, EUA), expressos como média  $\pm$  desvio padrão e apresentados na forma gráfica por utilização do programa Excel (Microsoft®; Seattle, Washington, EUA). A comparação de mais de um grupo realizou-se utilizando um teste de análise de variância (ANOVA) e a comparação entre dois grupos foi realizado através do teste t de student. Utilizou-se um nível de significância de  $p < 0,05$ .

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente estudo avaliou-se que o extrato aquoso de *P. nitida* na concentração 1mg/mL apresentaram respectivamente, inibição (%) para lipase pancreática de  $82,34 \pm 1,23$  e a concentração média capaz de inibir 50% da atividade enzimática - CI50 (mg/mL) para lipase pancreática foi de  $21,23 \pm 0,80$  (Tabela 2).

### Ensaio da atividade inibitória *in vitro* da lipase pancreática

Observou-se que todos os extratos de *P. nítidas* inibiram de maneira significativa a lipase pancreática e notou-se também que a % de inibição apresentou-se diretamente proporcional ao aumento da concentração dos extratos.

Amostra	Concentração (µg/mL)	Inibição (%) Média S.D	CI50 (µg/mL) Média S.D
<i>P. nítida</i> aquoso 2	1000	$82,34 \pm 1,23$	$21,23 \pm 0,80$
	100	$67,55 \pm 2,25$	
	10	$48,58 \pm 0,10$	
	1	$47,48 \pm 0,22$	

Tabela 2 - Determinação da CI 50 em dois extratos de *P. nítida*. Legenda: CI (concentração inibitória); *P. nítida* (*Passiflora nítida*); µg (microgramas); mL (Mililitros); S.D. (Desvio Padrão).

Observou-se que houve significativa inibição do extrato das folhas da *P.nítida* sobre a lipase pancreática *in vitro*.

(Figura 1). Os resultados podem ser indicativos do aproveitamento biotecnológico desta espécie de *P. nítida* da Amazônia.

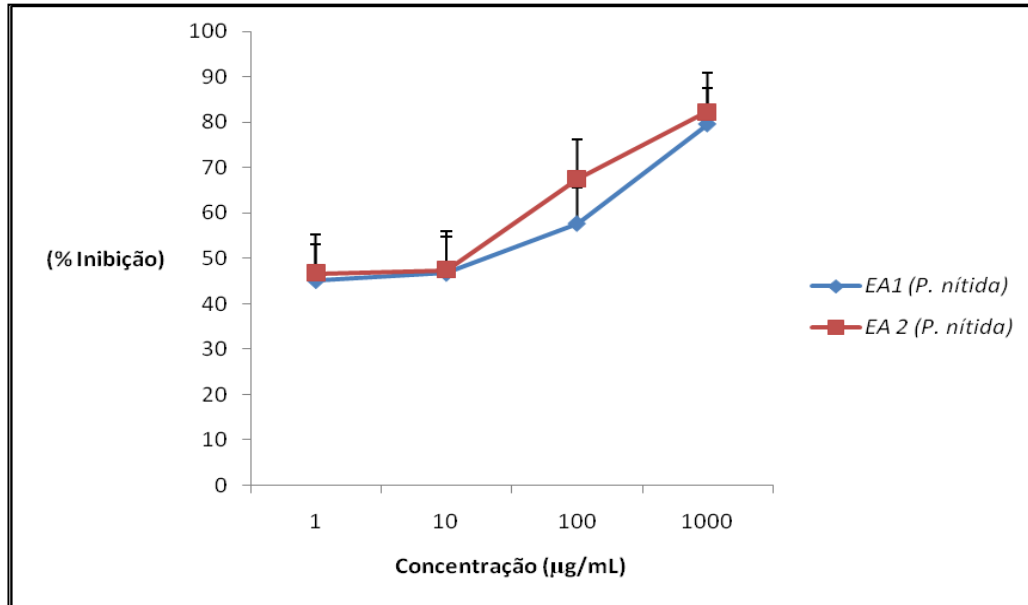


Figura 01- Atividade inibitória *in vitro* de extratos aquosos das folhas de *Passiflora nítida* sobre a lipase pancreática (concentração x inibição). Legenda: E A (Extrato aquoso)

O extrato aquoso da *P. nítida* também teve efeito na inibição da glicemia pós sobrecarga oral de sacarose.

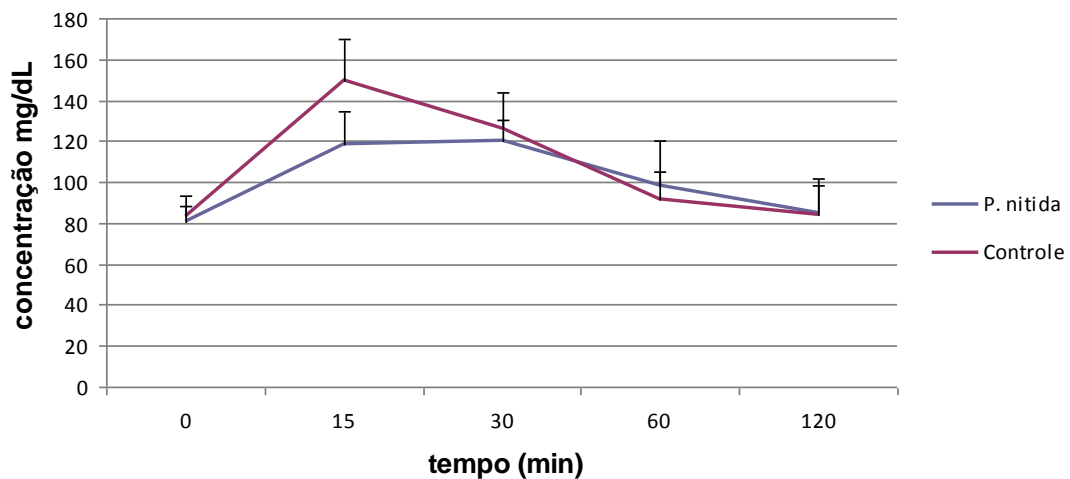


Figura 2. Efeito da administração oral do extrato aquoso da *Passiflora nítida kunth* na glicemia pós-sobrecarga de sacarose em ratos wistar (Média ± D.P.).



Os dados sobre o efeito hipolipidêmico previamente objetivado não foram alcançados por vários motivos: No decorrer do projeto o bolsista teve que ser substituído e essa segunda pessoa que entrou no projeto não tinha experiência com o trabalho em animais o que dificultou a realização dos experimentos no tempo hábil. Ainda com a primeira bolsista foram realizadas diversas tentativas de induzir a hipercolesterolemia com a dieta, sem sucesso. Também o teste agudo proposto precisou de ajustes e que não foi realizado a tempo. O segundo bolsista que entrou no projeto não demonstrou responsabilidade nem disposição para a carga de trabalho para cumprir os objetivos do projeto. Somente agora no final de julho conseguiu-se ajustar a metodologia para o estudo agudo e crônico da hiperlipidemia. Espera-se que para a apresentação do trabalho no CONIC possamos ter os dados da inibição da hiperlipidemia como previamente objetivado.

## 6 CONCLUSÃO

- Verificou-se que o extrato hidroetanólico inibiu de maneira significativa a lipase pancreática e notou-se também que a percentagem de inibição apresentou-se diretamente proporcional ao aumento da concentração do extrato.
- Observou-se que a administração oral do extrato aquoso da *P. nitida* após sobrecarga de sacarose em ratos foi capaz de diminuir os níveis glicêmicos em ratos.



## 8 REFERÊNCIAS

ALVES, M.J.Q.F.; MESQUITA, F.F.; SAKAGUTI, M.; TARDIVO, A.C. Efeito hipocolesterolêmico dos ácidos caféicos da própolis. *Revista Brasileira*, volume 10, n.1, p.100-105, 2008.

ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução – RDC n. 17, de 24 de fevereiro de 2000. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. In: *Diário Oficial da União*, 25 fevereiro. 2000.

BEECHER, G.R. Overview of Dietary Flavonoids: nomenclature, occurrence and intake. *American Society for Nutritional Sciences* 2003; 22: 3248S-54.

BENDINI, A.; CERRETANI, L.; PIZZOLANTE, L.; TOSCHI, T.; GUZZO, F.; CEOLDO, S.; MARCONI, A.; ANDRETTA, F.; LEVI, M. Phenol content related to antioxidant and antimicrobial activities of *Passiflora* spp. extracts. *European Food Research Technology*, volume 223, n. 1, p. 102-9, 2006.

BENINCÁ, J.; MONTANHER, A.; ZUCOLOTTI, S.; ESCHENKEL, E.; FRÖDE, T. Evaluation of the anti-inflammatory efficacy of *Passiflora edulis*. *Food Chemistry*, volume 104, n. 3, p. 1097-105, 2007.

BEZERRA, J.; CAMPOS, A.; VASCONCELOS, P.; NICARETA, J.; RIBEIRO, E.; SEBASTIÃO, A.; URDIALES, A.; MOREIRA, M.; BORGES, A. Extrato de *Passiflora edulis* na cicatrização de anastomose colônica em ratos: estudo morfológico e tensiométrico. *Acta Cirúrgica Brasileira*, volume 21 (Supl. 3), p. 16-25, 2006.

BLANKENHOM, D.; NESSIM, A.; JOHNSON, R.; SANMARCO, M.; AZEN, S. *Beneficial effects of colestipol-niacin therapy on coronary atherosclerosis and venous bypass graft*. *JAMA* 1987; 257: 3233-40.

BÔAS, L. *Estudo dos constituintes químicos ansiolíticos e sedativos de Passiflora actinia Hook.*, Passifloraceae. Curitiba: UFPR, 2005. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, 2007.

BORRELLI, F.; PINTO, L.; IZZO, A.A., MASCOLO, N.; CAPASSO, F.; MERCATI, V.; TOJA, E.; AUTORE, G. Anti-inflammatory activity of *Passiflora incarnata* L. in rats. *Phytotherapy Research*, volume 10 (Supl 1), p. 104S-6S, 1996.

BROWN, G.; ALBERS, J.; FISHER, L. *Regression of coronary artery disease as result of intensive lipid lowering therapy in men high levels of apolipoprotein B*. *Nengl J Med* 1990; 323: 1290-98.

DAVIES, M.J.; JUDD, J.T.; BAER, D.J.; CLEVIDENCE, B.A.; PAUL, D.R.; EDWARDS, A.J.; *Black tea consumption reduces total and LDL cholesterol in mildly hypercholesterolemic adults*. J Nutr 2003; 133: 3298S-3302S.

DHAWAN, K.; SHARMA, A. Anupam. Antitussive activity of the methanol extract of *Passifloraincarnata* leaves. *Fitoterapia*, volume 73, n. 5, p. 397-9, 2002a.

DI STASI, L.; HIRUMA-LIMA, C.; GONZALES, F.; PORTILHO, W. *Violales* medicinais. In: DI STASI, Luiz Claudio; HIRUMALIMA, Clélia Akiko. *Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica*. 2. Edição revistas. P. Edição da UNESP, 2002.

DOYAMA, J.T.; RODRIGUES, H.G.; NOVELLI, E.L.B.; CEREDA, E.; VILEGAS, W. Chemical investigation and effects of the tea of *Passiflora alata* on biochemical parameters in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, volume 96, n. 3, p. 371-4, 2005.

FENNER, R. *Avaliação do efeito hipnótico/sedativo e ansiolítico de um extrato seco nebulizado de Passiflora alata Curtis* (Passifloraceae). Porto Alegre: UFRGS, 2006. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2006.

GARCIA, E. S. *Biodiversity, Biotechnology and Health*. *Cad. Saúde Públ.*, Rio de Janeiro, 11 (3): 495-500, Jul/Sep, 1995.

GARROS, I.; CAMPOS, A.; TÂMBARA, E.; TENÓRIO, S.; TORRES, A.; AGULHAM, M.; ARAÚJO, A.; SANTIS-ISOLAN, P.; OLIVEIRA, R.; ARRUDA E. Extrato de *Passiflora edulis* na cicatrização de feridas cutâneas abertas em ratos: estudo morfológico e histológico. *Acta Cirúrgica Brasileira*, volume 21 (Supl. 3), p.55-65, 2006.

GOMES, C.; CAMPOS, A.; TORRES, O.; VASCONCELOS, P.; MOREIRA, A.; TENÓRIO, S.; TÂMBARA, E.; SAKATA, K.; MORAES-JÚNIOR, H.; FERRER, A. Efeito do extrato de *Passiflora edulis* na cicatrização da parede abdominal de ratos: estudo morfológico e tensiométrico. *Acta Cirúrgica Brasileira*, volume 21 (Supl. 2), p.9-16, 2006.

GONÇALVES-FILHO, A.; TORRES, O.; CAMPOS, A.; TÂMBARA-FILHO, R.; ROCHA, L.; THIEDE, A.; LUNEDO, S.; BARBOSA, R.; BERNHARDT, J.; VASCONCELOS, P. Efeito do extrato de *Passiflora edulis* (maracujá) na cicatrização de bexiga em ratos: estudo morfológico. *Acta Cirúrgica Brasileira*, volume 21 (Supl. 2), p. 3-8, 2006.

HOPKINS, M. G.; SOUZA, M.; RIBEIRO, J.; HOPKINS, M.; VICENTINI, A.; SOTHERS, C.; COSTA, M.; BRITO, J.; SOUZA, M.; MARTINS, L.; LOHMANN, L.; ASSUNÇÃO, P.; PEREIRA, E.; SILVA, C.; MESQUITA, M.; PROCÓPIO, L. Flora da Reserva Ducke: guia de identificação das plantas vasculares de uma floresta de terra-firme na Amazônia Central. Manaus: INPA, 1999.

HERTOG, M.G.L.; FESKENS, E.J.M.; HOLMANN P.C.H.; KATAN, M.B. Dietary antioxidant flavonoids and the risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. *Lancet* 1993; 342:1007-11.

IPGRI; CIRAD – *International plant genet resources institute*; CENTRE DE COOPÉRATION INTERNATIONALE EN RECHERCHE AGRONOMIQUE POUR LE DÉVELOPPEMENT. *Passiflora nitida* (H.B.K.) (Passifloraceae). Disponível em: <<http://www.ciat.cgiar.org>>. Acesso em: 26 abr. 2006.

JUNQUEIRA, K.; FALEIRO, F.; RAMOS, J.; BELLON, G.; JUNQUEIRA, N.; BRAGA, M. Variabilidade genética de acessos de maracujá-suspiro com base em marcadores moleculares. *Revista Brasileira de Fruticultura*, volume 29, n. 3, p.571-5, dez. 2007.

Lee YP, Chung GH, Rhee JS. Purification and characterization of *Pseudomonas fluorescens* SIK W1 lipase expressed in *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta* 1169: 156-164, 1993.

LORGERIL, M.; SALEN, P.; MARTIN J.L. *Mediterranean diet, traditional risk factors, and the rate of cardiovascular complications after myocardial infarction: final report of the Lyon Diet Heart Study*. *Circulation*. 1999; 99:779- 785.

MACIEL, Maria Aparecida M.; PINTO, Angelo C.; VEIGA-JÚNIOR, Valdir F.; GRYNBERG, Noema F.; ECHEVARRIA, Aurea. Plantas medicinais: A necessidade de estudos multidisciplinares. *Química Nova*, volume 25, n. 3, p. 429-38, 2002.

METZE, K.; MONTENEGRO, M.R. Artérias, veias e linfáticos. In: BRASILEIRO FILHO, Geraldo. *Bogliolo Patologia*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

MONTANHER, Ana Beatriz; ZUCOLOTTI, Silvana Maria; SCHENKEL, Eloir Paulo; FRÖDE, Tânia Silvia. Evidence of anti-inflammatory effects of *Passiflora edulis* in a inflammation model. *Journal of Ethnopharmacology*, volume 109, n. 2, p.281-8, 2007.

MORAES, M.; VIEIRA, M.; NOVAES, Q.; REZENDE, Jorge A.M. Susceptibilidade de *Passiflora nitida* ao Passion fruit woodiness virus. *Fitopatologia Brasileira*, volume 27, n. 1, p.108, jan./fev. 2002.

PIMENTEL, C. V. M. B.; FRANCKI, V. M. F.; GOLLUCKE, A. P. B. Alimentos Funcionais: introdução as principais substâncias bioativas em alimentos. S. P.: Varela, 2005.

PROVENSI, G. *Investigação da atividade ansiolítica de Passiflora alata Curtis* (Passifloraceae). Porto Alegre: UFRGS, 2007. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2007.

RATES, Stela Maria Kuze; BRIDI, Raquel. Heterosídeos cardioativos. In: SIMÕES, Cláudia Maria Oliveira; SCHENKEL, Eloir Paulo; GOSMAN, Grace; MELLO, João Carlos Palazzo; MENTZ, Lilian Auler; PETROVICK, Pedro Ros (Org.). *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 6. Edição Porto Alegre: Edição da UFRGS; Florianópolis: Edição da UFSC, 2007.

RIBEIRO, J.; OZAKI, M.; EROS, K. Credidio L, Metze K - *Effects of vitamin E on endothelium dependent coronary flow hypercholesterolemic dogs*. *Atherosclerosis* 1996; 126: 43-51.

RIBEIRO, P.; NEYRA, L.; OSAKI, E. Efeito da Berinjela sobre os Lípides Plasmáticos, a Peroxidação Lipídica e a Reversão da Disfunção Endotelial na Hipercolesterolemia Experimental. *Neura Bragagnolo Arq Bras Cardiol* volume 70, (nº 2), 1998.

RIM, E.; STAMPFER, M.J.; ASCHERO, A.; GIOVANNUCCI, E. *Vitamin E consumption and risk of coronary disease in men*. *N Engl J Med* 1993; 328:145-56.

RIMM, E.B. et al. *Relation between intake of potentially anticarcinogenic flavonoids and risk for coronary heart disease in male health professionals*. *Annals of Internal Medicine*, volume 125, p.384-9, 1996.

SANTOS, K.C.; SANTOS, C.A.M.; OLIVEIRA, R.M.W. *Passiflora actinia* Hooker extracts and fractions induce catalepsy in mice. *Journal of Ethnopharmacology*, volume 100, n. 3, p. 306-9, 2005.

SILVA, Rosimar R.; OLIVEIRA, Tânia T.; NAGEM, Tanus J.; LEÃO, Maria A. *Efeito de flavonóides no metabolismo do ácido araquidônico*. *Medicina*, volume 35, n. 2, p. 127-33, abr./jun. 2002.

SOULIMANI, R.; YOUNOS, C.; JARMOUNI, S.; BOUSTA, D.; MISSLIN, R.; MORTIER, F. Behavioural effects of *Passifloraincarnata* L. and its indole alkaloid and flavonoid derivatives and maltol in the mouse. *Journal of Ethnopharmacology*, volume 57, n. 1, p. 11-20, 1997.

SOUSA, O.V.; DEL-VECHIO-VIEIRA, G.; ALMEIDA, B.H.; MIRANDA, M.A.; FILGUEIRAS, R.C.; CAMPOS, A.C.; SILVÉRIO, M.S. Efeitos farmacológicos e toxicológicos do extrato de *Posoqueria acutifolia* Mart. (Rubiaceae) em roedores. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, volume 28, n. 1, p.51-6, 2007.

TOLEDO, Ana Cristina Oltramari; HIRATA, Lilian Lúcio; BUFFON, Marilene da Cruz M.; MIGUEL, Marilis Dallarmi; MIGUEL, Obdulio Gomes. *Fitoterápicos: uma abordagem farmacotécnica. Lecta-Universidade de São Francisco*, volume 21, n. 1/2, p. 7-13, jan./dez. 2003.

VARGAS, A.J.; GEREMIAS, D.S.; PROVENSÍ, G.; FORNARI, P.E.; REGINATTO, F.H.; GOSMANN, G.; SCHENKEL, E.P.; FRÖDE, T.S. *Passiflora alata* and *Passiflora edulis* spray-dried aqueous extracts inhibit inflammation in mouse model of pleurisy. *Fitoterapia*, volume 78, n. 2, p. 112-9, 2007.

WAN, Y.; VINSON, J.A.; PROCH, J.; LAZARUS, S.A. *Effects of cocoa powder and dark chocolate on LDL oxidative susceptibility and prostaglandin concentrations in humans*. *Am J Clin Nutr* 2001; 74:596-602.

WHITNEY, N.E. Nutrition and disorders of the blood vessel, heart, and lungs. In *Understanding normal & clinical nutrition*. 4 ed. *Minneapolis: West Publishing company*, volume 27, p.879-909, 1994.

SILVA, R.L. et. al. Effect of the aqueous extract of *Hyptis Pectinata* on hepatocyte proliferation after partial hepatectomy. *Acta Cirúrgica Brasileira* – v. 17. p- 101-105. 2002.