

**INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA DO SUL DE
MINAS GERAIS - IFSULDEMINAS**

Danielle Aparecida Quintino Silva Sarto

**EFEITO DO EXTRATO SECO DA *Passiflora incarnata* L. SOBRE A DISLIPIDEMIA,
HIPERTROFIA VENTRICULAR ESQUERDA E ESTRESSE OXIDATIVO
HEPÁTICO DE CAMUNDONGOS DISLIPIDÊMICOS**

Machado/MG

2017

Danielle Aparecida Quintino Silva Sarto

**EFEITO DO EXTRATO SECO DA *Passiflora incarnata* L. SOBRE A DISLIPIDEMIA,
HIPERTROFIA VENTRICULAR ESQUERDA E ESTRESSE OXIDATIVO
HEPÁTICO DE CAMUNDONGOS DISLIPIDÊMICOS**

Dissertação apresentada ao IFSULDEMINAS, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para a obtenção do título de Mestre.

Orientador: José Antônio Dias Garcia

Coorientador: Délcio Bueno da Silva

Machado/MG

2017

S26e Sarto, Danielle Aparecida Quintino Silva.

Efeito do extrato seco da *Passiflora incarnata* L. sobre a dislipidemia, hipertrofia ventricular esquerda e estresse oxidativo hepático camundongos dislipidêmicos / Danielle Aparecida Quintino Silva Sarto. -- Machado : [s.n.], 2017.

43 p. : il.

Orientador: Prof. José Antônio Dias Garcia

Dissertação (Mestrado) – Instituto Federal de Educação, Ciência e tecnologia do Sul de Minas Gerais – Campus Machado

Inclui bibliografia

1. Stress Oxidativo. 2. Maracujá 3. Hipertrofia. 4. Camundongos.
I. Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sul de Minas Gerais - Campus Machado. II. Título.

CDD: 616.07

Danielle Aparecida Quintino Silva Sarto

**EFEITO DO EXTRATO SECO DA *Passiflora incarnata* L. SOBRE A DISLIPIDEMIA,
HIPERTROFIA VENTRICULAR ESQUERDA E ESTRESSE OXIDATIVO
HEPÁTICO DE CAMUNDONGOS DISLIPIDÊMICOS**

Dissertação apresentada ao
IFSULDEMINAS, como parte das
exigências do Programa de Pós-Graduação
Stricto Sensu em Ciência e Tecnologia de
Alimentos, para a obtenção do título de
Mestre

APROVADA em ____ de _____ de 2017.

Profa. Dra. Cristiane da Silva Marciano Grasselli
UNIFAL-MG

Profa. Dra. Brígida Monteiro Vilas
Boas
IFSULDEMINAS

Prof. Dr. José Antônio Dias Garcia
IFSULDEMINAS

Ao meu esposo Luís, pelo apoio incondicional e constante incentivo.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo dom da vida e por me guiar em todos os caminhos.

Aos meus pais e irmã pelo incentivo e por sempre acreditarem em meus sonhos.

Aos meus avós pelo carinho e orações.

Ao IFSULDEMINAS, pela oportunidade de realização dessa dissertação.

Aos técnicos de laboratório Paulo Cesar e Gabriel pela colaboração na realização deste trabalho.

À Profa. Dra. Gérsika Bitencourt Santos pela contribuição na realização das análises de estresse oxidativo.

Ao meu orientador José Antônio, pela dedicação e confiança na realização deste trabalho.

Aos colegas do mestrado pelo conhecimento e risadas divididos às sextas-feiras.

Aos professores do programa pelas experiências divididas.

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a minha formação e para a realização de mais este sonho.

“A persistência é o caminho do êxito”.
Charles Chaplin

RESUMO

A dislipidemia é um fator de destaque ao desenvolvimento das doenças cardiovasculares que é a principal causa de morte no mundo, e a hipertrofia ventricular esquerda uma delas. As alterações no perfil lipídico, também, são responsáveis pelo estresse oxidativo que afeta vários órgãos, sendo o fígado um dos mais afetados. Esse acometimento desencadeia doenças que afetam o órgão estrutural e funcionalmente. Os fitoterápicos, nos últimos anos, estão se despontando como uma alternativa no tratamento de várias desordens, como a dislipidemia. No presente estudo objetivou-se avaliar os efeitos do extrato seco da *Passiflora incarnata* L. sobre a dislipidemia, hipertrofia ventricular esquerda e estresse oxidativo hepático de camundongos dislipidêmicos. Os camundongos machos, com 4 meses, pesando 25 ± 3 g, foram distribuídos em quatro grupos: Grupo C (n=10), camundongos que receberam ração padrão para roedores; Grupo CP (n=10), camundongos que receberam ração padrão para roedores e 200mg/kg de peso corporal de extrato seco de *Passiflora incarnata* L. (por gavagem); Grupo HL (n=10), camundongos que receberam ração hiperlipídica; Grupo HLP, (n=10), camundongos que receberam ração hiperlipídica e tratamento com 200mg/kg de peso corporal de extrato seco de *Passiflora incarnata* L. (por gavagem). Após 30 dias de experimento, os camundongos que receberam ração padrão e extrato seco da *Passiflora incarnata* L. não apresentaram efeito sobre nenhum dos parâmetros analisados. Já os camundongos do grupo HLP apresentaram redução do colesterol total e triglicerídeos e aumento da lipoproteína de alta densidade (HDL) e, ainda, houve diminuição da proteína C reativa, fosfatase alcalina e insulina. No entanto não houve efeito sobre a glicose, o índice Homa e nas enzimas aspartato aminotransferase e alanina aminotransferase. Mesmo assim, houve prevenção da hipertrofia ventricular esquerda e da peroxidação lipídica e produção de proteínas carbonilas, ambos marcadores de estresse oxidativo. Os resultados levaram à conclusão de que o extrato seco da *Passiflora incarnata* L. associado à dieta hiperlipídica atua na prevenção da dislipidemia, como consequência, previne a hipertrofia ventricular esquerda pelo aumento do HDL sérico, de igual modo, também, impede o estresse oxidativo hepático.

Palavras-chave: Maracujá. Dislipidemia. Hipertrofia ventricular esquerda. Estresse oxidativo.

ABSTRACT

Dyslipidemia is a prominent factor for the development of cardiovascular diseases, being the main cause of death in the world. Left ventricular hypertrophy is one of these diseases. Changes in the lipid profile are also responsible for the oxidative stress that affects several organs, being the liver one of the most affected. Such involvement triggers diseases that affect the organ structurally and functionally. In recent years, phytotherapies are emerging as an alternative in the treatment of various disorders, such as dyslipidemia. The present study aimed to evaluate the effects of the dried extract of *Passiflora incarnata* L. on dyslipidemia, left ventricular hypertrophy and hepatic oxidative stress of dyslipidemic mice. The 4-month-old male mice weighing 25 ± 3 g were divided into four groups: Group C (n = 10), mice that received standard rodent ration; Group CP (n = 10), mice receiving standard rodent ration and 200mg / kg body weight of dried extract of *Passiflora incarnata* L. (by gavage); Group HL (n = 10), mice that received hyperlipid ration; Group HLP, (n = 10), mice receiving hyperlipid ration and treatment with 200 mg / kg body weight of dried extract of *Passiflora incarnata* L. (by gavage). After 30 days of experiment, the mice receiving standard ration and dried extract of *Passiflora incarnata* L. had no effect on any of the analyzed parameters. In contrast, the mice in the HLP group had a reduction in total cholesterol and triglycerides, and an increase in high density lipoprotein (HDL), and a decrease in C-reactive protein, alkaline phosphatase and insulin. However, there was no effect on glucose, the Homa index, and on the aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase enzymes. Nevertheless, there was prevention of left ventricular hypertrophy, and lipid peroxidation and carbonyl protein production, both markers of oxidative stress. The results lead to the conclusion that the dried extract of *Passiflora incarnata* L. associated to the hyperlipidic diet acts in the prevention of dyslipidemia, as a consequence it prevents left ventricular hypertrophy and hepatic oxidative stress.

Keywords: Passion fruit. Dyslipidemia. Left ventricular hypertrophy. Oxidative stress.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

- Figura 1 - Representação do tamanho e densidade aproximada das lipoproteínas. 16
- Figura 2 - Flor, folhas e fruto de *Passiflora incarnata* L. 23

CAPÍTULO 2

- Figure 1.** A – Photomicrography stained with hematoxylin/eosin representative of the left ventricle showing the diameter of the cardiomyocytes. B – Photomicrography stained with picrosirius red showing the distribution of interstitial collagen (marked in red by the stain) in the left ventricular myocardium of the mice. C – standard feed; CP - standard feed and dry *Passiflora incarnata* L. leaf extract; HL – high fat feed; HLP – high fat feed and dry *Passiflora incarnata* L. leaf extract. 38

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1 - Valores referenciais para o diagnóstico de dislipidemia em indivíduos acima de 20 anos	18
---	----

CAPÍTULO 2

Table 1. Experimental groups and respective protocols.	35
Table 2. Serum levels of total cholesterol (TC), triglycerides (TG) and HDL cholesterol (HDLc); alkaline phosphatase (AP), aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT); C-reactive protein (CRP), glucose and insulin; HOMA index (Homa-ir).	37
Table 3. Effect of dry <i>Passiflora incarnata</i> L. extract over lipid peroxidation and liver protein oxidation in dyslipidemic mice.	37
Table 4. Morphometric parameters of the heart of dyslipidemic mice.	37

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALT	Alanina aminotransferase
AST	Aspartato aminotransferase
C	Camundongos que receberam ração padrão
CP	Camundongos que receberam ração padrão e extrato seco das folhas de <i>Passiflora incarnata</i> L.
CT	Colesterol total
EPM	Erro padrão da média
ERN	Espécies reativas de nitrogênio
ERO	Espécies reativas de oxigênio
ERS	Espécies reativas de enxofre
FA	Fosfatase alcalina
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HDL-c	Colesterol ligado à lipoproteína de alta densidade
HL	Camundongos que receberam ração hiperlipídica
HLP	Camundongos que receberam ração hiperlipídica e extrato seco das folhas de <i>Passiflora incarnata</i> L.
HMG-CoA redutase	Hidroximetilglutaril coenzima A redutase
Homa-ir	Índice de Homa
HVE	Hipertrofia ventricular esquerda
IDL	Lipoproteína de densidade intermediária
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LDL-c	Colesterol ligado à lipoproteína de baixa densidade
MDA	Dialdeído malônico
PCR	Proteína C-reativa
Qm	Quilomícrons
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico
TG	Triglicerídeos
VLDL	Lipoproteína de densidade muito baixa

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1.....	13
1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1 Dislipidemias.....	15
2.1.1 Lipoproteínas e seu metabolismo.....	15
2.1.2 Definição e classificação das dislipidemias	16
2.1.3 Tratamento das dislipidemias	19
2.2 Estresse oxidativo	20
2.3 Hipertrofia ventricular esquerda.....	22
2.4 <i>Passiflora incarnata</i> L.	23
REFERÊNCIAS	26
CAPÍTULO 2.....	33
ARTIGO 1 - <i>DRY EXTRACT OF Passiflora incarnata</i> L. LEAF: CARDIAC AND HEPATIC OXIDATIVE STRESS PROTECTOR IN LDLR-/- MICE FED HIGH FAT DIET.....	33
ANEXO A – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA).....	43

CAPÍTULO 1

1 INTRODUÇÃO

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS, 2017), as doenças cardiovasculares são a principal causa de morte, em todo o mundo, comprometendo as condições de vida e de saúde de grande parcela da população, contribuindo para o aumento das despesas hospitalares dos sistemas de saúde (CHRISTOFARO et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2009).

A dislipidemia é resultante da anormalidade do perfil lipídico, que é formado pelo colesterol total, lipoproteína de baixa densidade, lipoproteína de alta densidade e triglicerídeos (ADAM et al., 2001). Constitui-se um dos fatores para o desenvolvimento das doenças cardiovasculares (POLANCZYK, 2005). Dentre essas doenças, está a hipertrofia ventricular esquerda, caracterizada por modificações na estrutura, no funcionamento e no metabolismo do coração; abrange o aumento da dimensão do cardiomiócito, aumento da espessura da parede das artérias coronarianas, rarefação da microcirculação do coração e fibrose extracelular (ISOYAMA, 1998).

Alterações nas concentrações séricas de colesterol e triglicerídeos atuam, negativamente, nos biomarcadores de estresse oxidativo e provocam a produção de espécies reativas de oxigênio por diversos mecanismos, que levam à amplificação da peroxidação lipídica. O estresse oxidativo associado à dislipidemia afeta diversos órgãos, porém os órgãos mais acometidos são coração, fígado e rins (ABUHASHISH et al., 2013; BALKAN et al., 2002). O estresse oxidativo é um fator crucial para inúmeras doenças hepáticas com anormalidades estruturais e funcionais (CICHOŹ-LACH; MICHALAK, 2014).

As doenças hepáticas impactam a qualidade, como também a expectativa de vida, pois o fígado é um órgão de múltiplas funções, que o tornam essencial para o funcionamento do organismo. Nos últimos anos, houve aumento do número das internações e da mortalidade por doenças hepáticas no Brasil (NADER; MATTOS; BASTOS, 2014).

O tratamento da dislipidemia, desse modo, torna-se essencial para que tais contornos não se concretizem. Para isso, é preconizado que ocorram mudanças no hábito alimentar e abandono do sedentarismo, mas, em alguns casos, é indicado o uso de medicamentos como as estatinas, ezetimiba, fibratos, resinas, ácido nicotínico (FALUDI et al., 2017). O uso de fitoterápicos tem tomado força, em virtude do preço ou dos efeitos colaterais provocados pelos medicamentos tradicionais (GONÇALVES et al., 2006). Alguns fitoterápicos estão sendo

testados sobre a dislipidemia, tais como alho e extrato de açafrão (SUKANDAR et al., 2013), arroz fermentado vermelho (GORDON; BECKER, 2011) e alcachofra (SHIMODA et al., 2003).

O extrato seco da folha *Passiflora incarnata* L. vem sendo utilizado como um fitoterápico com aplicabilidade sobre a insônia, ansiedade e como sedativo, com ampla utilização em todo o mundo (DHAWAN et al., 2001). Os fito-componentes mais representativos na *Passiflora incarnata* L. são os flavonoides, definido como um conjunto de C-glicosilados como vitexina, isovitexina, schaftosídeo, isoschaftosídeo e isovitexina-2'' -O-glicosilada (WOHLMUTH et al., 2010; ZERAIK et al., 2010).

Objetivou-se, assim, neste trabalho, avaliar a influência do extrato seco da *Passiflora incarnata* L. sobre a dislipidemia, hipertrofia ventricular esquerda e estresse oxidativo hepático de camundongos dislipidêmicos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Dislipidemias

2.1.1 Lipoproteínas e seu metabolismo

Os lipídeos são substâncias de natureza orgânica, representados, principalmente, por fosfolipídeos, triglicerídeos, colesterol e ácidos graxos. As lipoproteínas são responsáveis pelo seu transporte pela circulação linfática e sanguínea, em razão da sua insolubilidade no meio aquoso (PASSARELLI, 2011; XAVIER et al., 2013).

As lipoproteínas são macromoléculas formadas por uma fração lipídica e outra proteica, que permite um eficiente mecanismo de transporte de lipídeos entre os tecidos (HARVEY; FERREIER, 2012). Elas são classificadas em cinco categorias, conforme a composição, tamanho e densidade (HARVEY; FERREIER, 2012; MARTINEZ, 2003).

Quilomícrons (Qm): apresentam maior tamanho e menor densidade, são formadas nas células da mucosa intestinal. Fazem o transporte de lipídeos para os tecidos periféricos e transportam cerca de 90% dos triglicerídeos oriundos da dieta, além do colesterol, da absorção biliar e de vitaminas lipossolúveis. Apresentam cerca de 1 a 2% de proteína e são relativamente pobres em colesterol de fosfolipídios (FIGURA 1).

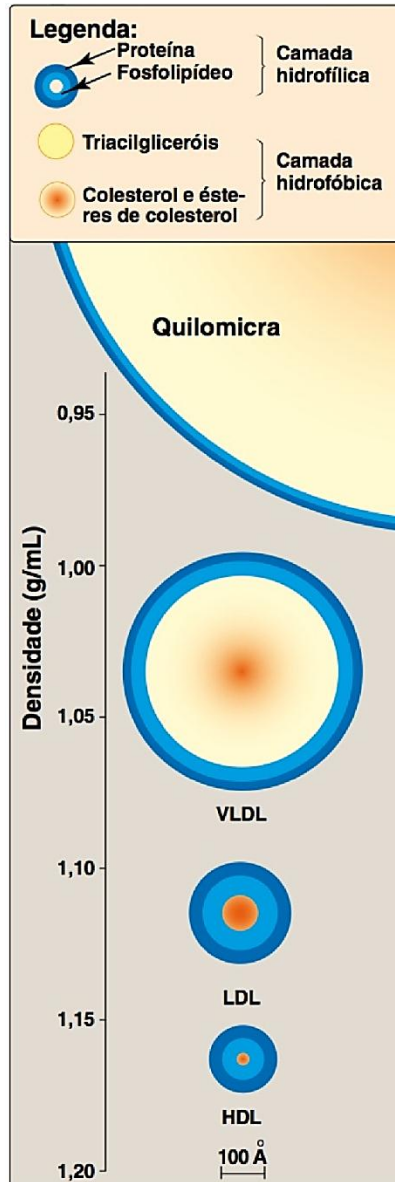
Lipoproteína de densidade muito baixa (VLDL): são produzidas no fígado. É rica em triglicerídeos, originados do metabolismo endógeno, cerca de 60% e, também, possuem pequena porção de colesterol (FIGURA 1).

Lipoproteína de densidade intermediária (IDL): é um produto intermediário na formação da lipoproteína de baixa densidade (LDL). Originada da depleção do triglicerídeo da VLDL, pela ação da lipase lipoproteica. Na sequência, a IDL sofrerá a ação da lipase hepática formando a LDL.

Lipoproteína de baixa densidade (LDL): dispõe de alta concentração de colesterol e ésteres de colesterol. Tem a função de prover colesterol para os tecidos periféricos pelo receptor de LDL (LDLr) (FIGURA 1).

Lipoproteína de alta densidade (HDL): é a menor das lipoproteínas e mais densa. Formada no fígado e intestino, é responsável pelo transporte reverso do colesterol, por sua retirada das células e realiza a troca com outras lipoproteínas ou leva-o diretamente ao fígado, em que este colesterol, não utilizado pelos tecidos extra-hepáticos, será eliminado na bile ou utilizado na formação de mais VLDL (FIGURA 1).

Figura 1 - Representação do tamanho e densidade aproximada das lipoproteínas.



Fonte: Harvey e Ferreier (2012).

2.1.2 Definição e classificação das dislipidemias

As dislipidemias são definidas como alterações lipídicas decorrentes de distúrbios do metabolismo das lipoproteínas, sendo classificadas em primárias e secundárias (PASSARELI, 2011). As dislipidemias estão associadas aos níveis anormais de triglicerídeos (TG) e/ou alterações do colesterol total (CT), colesterol ligado à lipoproteína de alta densidade (HDL-c), colesterol ligado à lipoproteína de baixa densidade (LDL-c) e lipoproteína à [Lp(a)] plasmática (MARTINEZ, 2003; PASSARELI, 2011). Essas alterações do perfil lipídico têm sido estudadas exaustivamente, por sua forte ligação com as doenças cardiovasculares (MARTINEZ, 2003).

Por meio da etiologia é feita a classificação das dislipidemias em primária e secundária. As dislipidemias primárias são decorrentes de alterações genéticas com alterações no metabolismo de LDL-c, HDL-c e TG (MARTINEZ, 2003; NAKANDAKARE, 2011). São classificadas geneticamente em dislipidemias monogênicas, ocasionadas por um só gene, e poligênicas, ocasionadas pela relação de diversas mutações e polimorfismos que separadamente não causariam a doença (MARTINEZ, 2003).

As dislipidemias secundárias são resultantes dos hábitos de vida inadequados, como sedentarismo, dieta inadequada e etilismo (NATIONAL CHOLESTEROL EDUCATION PROGRAM - NCEP, 2001). Também pode ser consequência de uma doença já pré-existente como diabetes mellitus, síndrome nefrótica, insuficiência renal crônica, obesidade, hipotireoidismo, icterícia obstrutiva ou do uso de medicamentos betabloqueadores, utilização de altas doses de diuréticos, anabolizantes e corticosteroides (SANTOS et al., 2001).

Fenotípica ou laboratorialmente, a classificação considera os valores de CT, LDL-c, TG e HDL-c. Estas dosagens bioquímicas compreendem o perfil lipídico (SPOSITO et al., 2007). Para a caracterização laboratorial das dislipidemias, é aconselhável que seja feita no indivíduo com um estado metabólico estável, que esteja em dieta habitual, que não tenha praticado atividade física e ingerido álcool pelo menos 24 e 72 horas antes da coleta de sangue, respectivamente (LOPES; MARTINEZ, 2004; XAVIER et al., 2013).

A coleta de sangue deverá ser realizada, após 12 horas de jejum, para verificação das concentrações de TG, bem como para o cálculo da concentração de LDL-c pela fórmula de Friedewald ($LDL-C = CT - HDL-C - TG/5$), em que TG/5 representa o colesterol ligado à VLDL ou VLDL colesterol (VLDL-C), ou diretamente dosado no plasma. As determinações de CT e do HDL-c podem ser realizadas em amostras coletadas sem jejum prévio (LOPES; MARTINEZ, 2004; XAVIER et al., 2013).

A classificação laboratorial é de quatro tipos (SANTOS et al., 2001; SPOSITO et al., 2007):

- a) Hipercolesterolemia isolada: aumento do colesterol total isoladamente, em geral, representada pela elevação do LDL-c.
- b) Hipertrigliceridemia isolada: elevação isolada dos TG, normalmente representada pelo aumento da quantidade das partículas ricas em TG como VLDL, IDL e Qm.
- c) Hiperlipidemia mista: valores elevados de LDL-c e de TG.
- d) HDL-c baixo: isoladamente ou em combinação com elevação de LDL-c ou TG.

Na Tabela 1 demonstram-se os valores de referência, para o diagnóstico da dislipidemia aos indivíduos acima de 20 anos.

Tabela 1 - Valores referenciais para o diagnóstico de dislipidemia em indivíduos acima de 20 anos

Lipídeos	Valores mg/dl	Categoria
CT	< 200	Desejável
	200-239	Limítrofe
	≥ 240	Alto
LDL	< 100	Ótimo
	100-129	Desejável
	130-159	Limítrofe
	160-189	Alto
HDL	≥ 190	Muito alto
	> 60	Desejável
TG	< 40	Baixo
	< 150	Desejável
	150-200	Limítrofe
	200-499	Alto
	≥ 500	Muito Alto

Fonte: Adaptado da V Diretriz Brasileira de Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose do Departamento de aterosclerose (SBC) (XAVIER et al., 2013).

O controle da dislipidemia é um fator de grande importância, para a redução da mortalidade por doenças cardiovasculares (NICOLAU et al., 1992). Portanto medidas preventivas devem ser tomadas para que não haja consequências desastrosas à saúde pública (NCEP, 2001; SANTOS et al., 2001). A hipercolesterolemia é uma das causas para o desenvolvimento da hipertrofia ventricular esquerda (GARCIA; INCERPI, 2008), por indução do estresse oxidativo (SATO et al., 2004), além disso, atua alterando a função e a expressão dos canais K_{ATP} no miocárdio, ocasionando a hipertrofia cardíaca, pelo fato de que a ativação desses canais levam à hipertrofia cardíaca, mediante a inibição da 70-KDa S6 Kinase, a qual é uma enzima responsável pela síntese proteica no remodelamento do miocárdio (GENDA et al., 2002; LEE et al., 2004).

A dislipidemia, também, é apontada como fator preditivo para o estresse oxidativo. Concentrações séricas alteradas de colesterol e TG agem desfavoravelmente os biomarcadores de estresse oxidativo, além de promoverem a produção de ERO por vários mecanismos, que acarretam na amplificação da peroxidação lipídica (ABUHASHISH et al., 2013; BALKAN et al., 2002).

2.1.3 Tratamento das dislipidemias

A mudança de estilo de vida funciona como um tratamento não medicamentoso que traz inúmeros benefícios pelas alterações dos hábitos alimentares, redução do peso corporal e abandono do sedentarismo (FALUDI et al., 2017). Porém, em alguns casos, o tratamento medicamentoso deve ser iniciado dependendo do risco cardiovascular do paciente e do tipo de dislipidemia presente (FALUDI et al., 2017; STONE et al., 2014; XAVIER et al., 2013). Para a hipercolesterolemia isolada, os medicamentos recomendados são as estatinas, que podem ser administradas em associação com a ezetimiba e, em algumas situações, aos fibratos ou ao ácido nicotínico (FALUDI et al., 2017).

As estatinas inibem a 3-hidroxi-3-metilglutaril CoA redutase (HMG-CoA), bloqueando a síntese hepática de colesterol, com consequente redução de LDL-c (DAVIDSON; TOTH, 2004; KOO, 2014). A ezetimiba inibe seletivamente a absorção do colesterol, na borda em escova no intestino delgado, conduzindo a um menor aporte de colesterol ao fígado, ocasionando estímulo à síntese de receptores de LDL, como consequência, há a redução do LDL-c sérico de 10% a 25% (FALUDI et al., 2017; KOSOGLOU et al., 2005). As resinas, também conhecidas como sequestradores de ácidos biliares, ligam-se aos ácidos biliares, ao promover complexos, eliminados nas fezes o que impede a recirculação destas substâncias. Em compensação a essas perdas, o fígado expande a conversão de colesterol em ácidos biliares (SCHULZ, 2006).

Na hipertrigliceridemia isolada, é indicado o uso dos fibratos; em segundo plano, o ácido nicotínico ou o uso simultâneo dos dois (FALUDI et al., 2017). Os fibratos estimulam os receptores nucleares denominados “Receptores Alfa Ativados da Proliferação dos Peroxissomas”. Esse estímulo acarreta o aumento da produção e ação da lipase lipoproteica, encarregada da hidrólise intravascular de TG e a redução da apolipoproteína C-II, responsável pela inibição da lipase lipoproteica (LEMIEUX; SALOMON; DESPRES, 2003). O ácido nicotínico interfere na ação da lipase tecidual nos adipócitos, ocasionando uma menor liberação de ácidos graxos livres para a corrente sanguínea, o que leva à redução da síntese de TG pelos hepatócitos. Diminui o LDL-c, aumenta o HDL-c e reduz o TG (FALUDI et al., 2017).

Os medicamentos são eficazes, no tratamento da dislipidemia, porém são caros e não são isentos de efeitos colaterais, proporcionalmente, à dose utilizada (GONÇALVES et al., 2006). Considerando este fato, os tratamentos alternativos são uma boa opção, como os fitoterápicos. O uso de plantas, para o tratamento de doenças, não é recente e, cada vez mais, estão se tornando uma solução para aqueles que buscam uma alternativa para problemas de

saúde sem recorrer aos medicamentos tradicionais (CUNHA et al., 2010; GONÇALVES et al., 2006). Alguns estudos estão sendo realizados testando a ação de fitoterápicos sobre a dislipidemia.

Sukandar et al. (2013) verificaram a ação da cápsula de alho (*Allium sativum*) e extrato de açafrão (*Curcuma domestica*) em comparação com a sinvastatina sobre o perfil lipídico de 39 pessoas com dislipidemia. Os resultados apresentados de perfil lipídico por aqueles que receberam a cápsula foi comparável aos encontrados naqueles que receberam sinvastatina. O arroz fermentado vermelho tem se mostrado eficaz no tratamento da hipercolesterolemia em ensaios clínicos (GORDON; BECKER, 2011) e consiste em uma alternativa àqueles que não podem fazer uso das estatinas (BURKE, 2015). O arroz fermentado vermelho contém quantidades variáveis de monacolins, uma família de substâncias que inibem a Hidroximetilglutaril-coenzima A (HMG-CoA) redutase (GORDON; BECKER, 2011; MUSSELMAN; PETTIT; DERENSKI, 2012). Em estudos desenvolvidos com animais, foi constatado que a alcachofra reduz o colesterol e TG séricos (SHIMODA et al., 2003). Estudos destacam que o extrato de alcachofra tem efeitos inibitórios exercidos indiretamente sobre a HMG-CoA redutase, cuja ação é proporcional à concentração (RONDANELLI et al., 2013).

2.2 Estresse oxidativo

Radicais livres são átomos, moléculas ou íons com elétrons desemparelhados e, em reações químicas com outras moléculas, são extremamente ativos. Os radicais são oriundos, no sistema biológico, de moléculas que contêm oxigênio, nitrogênio ou enxofre. Essas moléculas são parte ou grupo de moléculas designadas espécies reativas de oxigênio (ERO), espécies reativas de nitrogênio (ERN) e espécies reativas de enxofre (ERS). As ERO englobam os radicais livres como o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o radical hidroperoxil (HO_2^{\cdot}), o radical hidroxil (OH^{\cdot}), o óxido nítrico e outras espécies reativas como peróxido de hidrogênio (H_2O_2), oxigênio *singlet* (1O_2), ácido hipocloroso (HOCl) e o peróxido nitrito ($ONOO^{\cdot-}$) (LÜ et al., 2010). As ERN são provenientes do óxido nítrico, por meio da reação do ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), para produzir peróxido nitrito ($ONOO^{\cdot-}$). As ERS são formadas com base em tióis em reação com as ERO (RAHMAN, 2007).

Os mecanismos de ação dos radicais livres são vários, podendo reagir com as moléculas, ao redor pela doação de elétrons, redução de radicais, recepção de elétrons e oxidação de radicais, pelas reações: (a) abstração de hidrogênios; (b) reação de adição; (c) reação de autoaniquilação; (d) por meio de dismutação (SLATER, 1984).

Tais reações ocasionam a produção de ERO, ERN e ERS, as quais estão associadas a doenças como câncer, doenças renais e hepáticas, doença cardiovascular, abrangendo aterosclerose e derrame, doenças neurológicas, artrite reumatoide, hipertensão, síndrome da angústia respiratória no adulto, doenças autoimunes, doenças degenerativas relacionadas com o envelhecimento, inflamação, diabetes mellitus e suas complicações, catarata, doença de Alzheimer, Parkinson e Huntington, autismo, vasculites, lúpus eritematoso, pré-eclâmpsia, glomerulonefrites, hemocromatose e úlcera gástrica (CHANDRA et al., 2010; LÜ et al., 2010; RAHMAN, 2007; SINGH et al., 2010).

Durante o metabolismo aeróbico, grande parte do oxigênio utilizado, cerca de 95%, origina-se da produção de energia pelas mitocôndrias na célula. O restante do oxigênio, não sendo completamente reduzido à água, é destinado à produção de espécies reativas de oxigênio, em uma sequência de reações de oxirredução (LEITE; SARNI, 2003; URSO; CLARKSON, 2003).

A primeira redução do oxigênio molecular forma o radical superóxido ($O_2 + e^- \rightarrow O_2^-$) (GIORDANO, 2005; OPARA, 2006). O superóxido, após a sua formação, pode dar origem a outras reações gerando radicais hidroxilas. Além disso, pode reagir com óxido nítrico, formando peroxinítrito ($O_2^- + NO \rightarrow ONOO^-$), substância que se apresenta como potente radical livre e que é altamente tóxica para os cardiomiócitos (KEMPF; WOLLERT, 2004; OPARA, 2006; YANG et al., 2004). O acréscimo de um segundo elétron e dois íons de hidrogênio ao ânion superóxido acarreta na formação do peróxido de hidrogênio ($O_2^- + 2e^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2$) (OPARA, 2006). A reação de Fenton adicionará o terceiro elétron dando origem ao radical hidroxila ($H_2O_2 + Fe^{2+}/Cu^+ \rightarrow OH + OH^- + Fe^{3+} + Cu^{2+}$). Enfim, a adição do quarto elétron produz água (H_2O) (GIORDANO, 2005).

As ERO também podem ser advindas de outros mecanismos, produzidas pelas xantina oxidases, nicotinamida adenina dinucleotídio fosfato-oxidase (NADPH), citocromo P450-oxidase e pela autooxidação de catecolaminas e lipoxigenases (GIORDANO, 2005; MADAMANCHI; HAKIM; RUNGE, 2005). O aumento da presença das ERO no sistema biológico desencadeia peroxidação de membranas lipídicas, dano oxidativo de ácidos nucleicos e oxidação de grupos sulfidrilas e nas proteínas (SIES, 1991).

O estresse oxidativo é resultado do desequilíbrio entre compostos oxidantes e antioxidantes, em benefício da formação excessiva de espécies reativas e pela perda da velocidade de remoção desses (BARBOSA et al., 2010).

O sistema de defesa antioxidante atua na inibição e/ou redução dos danos causados pela ação nociva dos radicais livres. As ações são atingidas por alguns mecanismos de ação como:

evitando a formação dos radicais livres (sistema de prevenção), impedindo a ação desses (sistemas varredores) ou favorecendo o reparo e constituição das estruturas biológicas lesadas (sistema de reparo) (CLARKSON; THOMPSON, 2000; KOURY; DONANGELO, 2003). O sistema de defesa antioxidante é dividido, usualmente, em enzimático e não enzimático (HALLIWELL; WHITEMAN, 2004).

O sistema enzimático é composto pelas enzimas superóxido dismutase, Catalase e glutathione peroxidase. Os mecanismos usados por essas enzimas são de prevenção, impedindo e/ou controlando a produção de radicais livres, comprometidas com a iniciação das reações em cadeia que resultam na propagação e amplificação do processo, por conseguinte, a ocorrência de danos oxidativos (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; SCHNEIDER; OLIVEIRA, 2004). O sistema de defesa não enzimático é formado pelos compostos antioxidantes obtidos pela dieta, dos quais se destacam: vitaminas, minerais e compostos fenólicos. As vitaminas com potencial antioxidante são ácido ascórbico (vitamina C), o α -tocoferol e β -caroteno, precursores de vitaminas E e A, respectivamente. Também há carotenoides que não possuem atividade de vitamina A, como luteína, licopeno e zeaxantina. Zinco, cobre, selênio e magnésio são os representantes dos minerais com ação antioxidante (BIANCHI; ANTUNES, 1999; PRASAD et al., 2007).

2.3 Hipertrofia ventricular esquerda

A hipertrofia ventricular esquerda (HVE) é caracterizada por modificações na estrutura, no funcionamento e no metabolismo do coração, que abrange o aumento da dimensão do cardiomiócito, aumento da espessura da parede das artérias coronarianas, rarefação da microcirculação do coração e fibrose extracelular (ISOYAMA, 1998). Os cardiomiócitos recebem estimulação hipertrófica. Dentro da célula, esse estímulo é traduzido e, como consequência, haverá alterações bioquímicas que levam à ativação de mensageiros citosólicos e nucleares, que irão agir no núcleo celular, regulando a transcrição, determinando a expressão gênica que desencadeará a HVE (GARCIA; INCERPI, 2008).

Dentre os fatores que induzem a HVE, estão os hemodinâmicos e os neuro-humorais. Os hemodinâmicos envolvem, em sua gênese, aumento da necessidade metabólica e sobrecarga da pré e pós-carga ao coração. O fator neuro-humoral inclui as catecolaminas, angiotensina II, insulina, como também o estresse oxidativo, hipercolesterolemia e citocinas e fatores de crescimento induzidos pelo processo inflamatório (GARCIA; INCERPI, 2008).

A hipercolesterolemia pode interferir no funcionamento e na expressão dos canais de K_{ATP} no miocárdio, gerando a hipertrofia cardíaca (LEE et al., 2004). Já o estresse oxidativo, ocasionado pelo aumento de ERO nos cardiomiócitos, induzido pela hipertensão e estresse mecânico no miocárdio, ativam a via MAPK, que desempenha papel importante na hipertrofia cardíaca (AIKAWA et al., 2001). Além disso, o desequilíbrio redox diminui a biodisponibilidade de óxido nítrico, no sistema cardiovascular e modifica o equilíbrio entre os fatores hipertróficos e os fatores anti-hipertróficos, provocando no miocárdio um remodelamento (GARCIA; INCERPI, 2008; LI; SHAH, 2004). O estresse oxidativo cardíaco pode ser induzido por várias situações fisiopatológicas e genéticas, como aumento da concentração de angiotensina II, hipercolesterolemia, estresse mecânico no miocárdio e processos inflamatórios (AIKAWA et al., 2001; LANG et al., 2000; SATO et al., 2004; YAO; YU; FUKUDA, 2006).

A prevenção da dislipidemia é de grande relevância, pois estudos apontam que a HVE aumenta o risco de doença cardíaca coronária, acidente vascular cerebral, insuficiência cardíaca congestiva e isquemia cerebral transitória (SAMESINA; AMODEO, 2001).

2.4 *Passiflora incarnata* L.

A espécie *Passiflora incarnata* L. é conhecida pelos nomes populares: maracujá-vermelho, flor da paixão e maracujá (BRASIL, 2015). É uma planta nativa na região entre o Sul dos Estados Unidos até a Argentina. Seus frutos são ovalados e apresentam cor verde-clara com polpa branca (Figura 2). A sua utilização, na medicina tradicional, é datada desde a época da colonização das Américas pelos espanhóis, que aprenderam com os Astecas como usá-las (LORENZI; MATOS, 2008; SOULIMANI et al., 1997). O extrato seco das partes aéreas da *Passiflora incarnata* L. tem sido muito utilizado como fitoterápico. A *Passiflora incarnata* L. possui aplicabilidade popularmente para a insônia, ansiedade e como sedativo, com ampla utilização em todo o mundo (DHAWAN et al., 2001), um fármaco presente em várias farmacopeias pelo mundo (KAMALDEEP; SANJU; ANUPAM, 2004).

Figura 2 – Flor, folhas e fruto de *Passiflora incarnata* L.



Fonte: Brasil (2015).

Os flavonoides são os fitocomponentes mais representativos na *Passiflora incarnata* L., um conjunto de C-glicosilados como vitexina, isovitexina, schaftosídeo, isoschaftosídeo e isovitexina-2'' -O-glicosilada (WOHLMUTH et al., 2010; ZERAIK et al., 2010). Em relação às outras espécies do gênero, a *Passiflora incarnata* L. é a que apresenta maior concentração de isovitexina. A maior concentração de flavonoides foi encontrada nas folhas, com maior concentração de isovitexina nos estágios de pré-floração e floração (MENGHINI et al., 1993). Segundo Marroquín, Cruz e Cáceres (2012), os flavonoides presentes na *Passiflora incarnata* L. apresentam capacidade antioxidante. Os flavonoides são estruturalmente ideais para o sequestro de radicais livres, portanto sua ação antioxidante é mais efetiva que das vitaminas C e E. Porém, a atividade antioxidante dessas substâncias é dependente da sua estrutura e pode ser definida por cinco fatores: capacidade de doar H e elétrons, estabilidade do radical flavonil formado, reatividade a outros antioxidantes, solubilidade e interação com as membranas e capacidade de quelar metais (ALVES et al., 2007; BARREIROS, 2006). Pesquisas indicam que os flavonoides possuem ação antioxidante sobre o LDL e previnem a agregação plaquetária (OLIVEIRA et al., 2010).

Há outros constituintes relatados na *Passiflora incarnata* L. tais como alcaloides, carboidratos, os quais são rafinose, sacarose, d-glicose e d-frutose, óleos essenciais, substâncias responsáveis pelo odor característico e além de vinte e um aminoácidos (BUCHBAUER; JIROVETZ, 1992; GAVASHELI; MONIAVA; ERISTAVI, 1974, 1975; POETHKE; SCHWARZ; GERLACH, 1970). Os estudos realizados com *Passiflora incarnata* L., em sua maioria, são voltados para a atividade ansiolítica e sedativa (KAMALDEEP; SANJU; ANUPAM, 2004). Como exemplo, o estudo realizado por Gibbert et al. (2017), em que investigaram o efeito do extrato seco da *Passiflora incarnata* L. sobre a melhoria da resistência ao estresse e qualidade de vida de adultos com agitação nervosa. Dantas et al. (2017)

verificaram o efeito da *Passiflora incarnata* L., no controle da ansiedade de pacientes submetidos à extração dental. Gupta et al. (2012) investigaram o efeito hipoglicemiante do extrato metanoico das folhas de *Passiflora incarnata* L. em camundongos com diabetes induzida por estreptozotocina.

REFERÊNCIAS

- ABUOHASHISH, H. M. et al. Ameliorative effects of rutin and ascorbic acid combination on hypercholesterolemia-induced hepatotoxicity in female rats. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, London, v. 7, n. 6, p. 280-288, 2013.
- ADAM, M. et al. Dyslipidemia. **Current Treatment Options in Cardiovascular Medicine**, London, v. 3, p. 347-357, 2001.
- AIKAWA, R. et al. Reactive oxygen species in mechanical stress-induced cardiac hypertrophy. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Orlando, v. 289, n. 4, p. 901-907, Dec. 2001.
- ALVES, C. Q. et al. Avaliação da atividade antioxidante de flavonóides. **Diálogos e Ciência**, Salvador, ano 5, n. 12, p. 1-8, dez. 2007.
- BALKAN, J. et al. Effects of added dietary taurine on erythrocyte lipids and oxidative stress in rabbits fed a high cholesterol diet. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, Tokyo, v. 66, p. 2701-2705, 2002.
- BARBOSA, K. B. F. et al. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 23, n. 4, p. 629-643, ago. 2010.
- BARREIROS, A. L. B. S. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e a defesa do organismo. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, p. 113-123, 2006.
- BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 12, n. 2, p. 123-130, 1999.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Monografia da espécie *Passiflora incarnata* linnaeus (maracujá-vermelho)**. Brasília, DF, 2015. Disponível em: <<http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2016/fevereiro/05/Monografia-Passiflora-incarnata.pdf>>. Acesso em: 19 jul. 2017.
- BUCHBAUER, G.; JIROVETZ, L. Volatile constituents of the essential oil of *P. incarnata* L. **Journal of Essential Oil Research**, Carol Stream, v. 4, p. 329-334, 1992.
- BURKE, F. M. Red yeast rice for the treatment of dyslipidemia. **Current Atherosclerosis Reports**, Berlin, v. 17, n. 4, p. 17-22, Apr. 2015.
- CHANDRA, N. et al. Free radicals, antioxidants and functional foods: impact on human health. **Pharmacognosy Reviews**, Bangalore, v. 4, n. 8, p. 118-126, July/Dec. 2010.
- CHRISTOFARO, D. G. D. et al. Prevalência de fatores de risco para doenças cardiovasculares entre escolares em Londrina - PR: diferenças entre classes econômicas. **Revistas Brasileira de Epidemiologia**, São Paulo, v. 14, n. 1, p. 27-35, 2011.
- CICHOŹ-LACH, H.; MICHALAK, A. Oxidative stress as a crucial factor in liver diseases. **World Journal of Gastroenterology**, Hong Kong, v. 7, n. 20, p. 8082-8091, July 2014.

CLARKSON, P. M.; THOMPSON, H. S. Antioxidants: what role do they play in physical activity and health? **American Journal of Clinical Nutrition**, Oxford, v. 72, n. 2, p. 637-646, 2000.

CUNHA, A. et al. **Plantas na terapêutica: farmacologia e ensaios clínicos**. 2. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2010.

DANTAS, L. P. et al. Effects of *Passiflora incarnata* and midazolam for control of anxiety in patients undergoing dental extraction. **Medicina Oral, Patologia Oral y Cirugia Bucal**, Valencia, v. 22, n. 1, p. 95-101, Jan. 2017.

DAVIDSON, M. H.; TOTH, P. P. Comparative effects of lipid lowering therapies. **Progress in Cardiovascular Diseases**, New York, v. 47, p. 73-104, 2004.

DHAWAN, K. et al. Correct Identification of *Passiflora incarnate* Linn., a promising herbal anxiolytic and sedative. **Journal of Medicinal Food**, New Rochelle, v. 4, n. 3, p. 137-144, 2001.

FALUDI, A. A. et al. Atualização da diretriz brasileira de dislipidemias e prevenção da aterosclerose. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, São Paulo, v. 109, p. 1-76, 2017. Suplemento 1.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, São Paulo, v. 43, n. 1, p. 61-68, 1997.

GARCIA, J. A. D.; INCERPI, E. K. Fatores e mecanismos envolvidos na hipertrofia ventricular esquerda e o papel anti-hipertrofico do óxido nítrico. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, São Paulo, v. 90, p. 443-450, 2008.

GAVASHELI, N. M.; MONIAVA, I. I.; ERISTAVI, L. I. Aminoacids from *P. incarnata* cultivated in the Georgian SSR. **Khimiya Prirodnikh Soedinenii**, Tashkent, v. 10, p. 266, 1974.

_____. Oligosaccharides of *P. incarnata*. **Khimiya Prirodnikh Soedinenii**, Tashkent, v. 11, p. 84-85, 1975.

GENDA, S. et al. K(ATP) channel opening is an endogenous mechanism of protection against the no-reflow phenomenon but its function is compromised by hypercholesterolemia. **Journal of the American College of Cardiology**, New York, v. 40, n. 7, p. 1339-1346, 2002.

GIBBERT, J. et al. Improvement of stress resistance and quality of life of adults with nervous restlessness after treatment with a passion flower dry extract. **Complementary Medicine Research**, Basel, v. 24, n. 2, p. 83-89, Apr. 2017.

GIORDANO, F. J. Oxygen, oxidative stress, hypoxia and heart failure. **Journal of Clinical Investigation**, Michigan, v. 115, n. 3, p. 503-508, 2005.

GONÇALVES, M. C. R. et al. Berinjela (*Solanum melongena* L.): mito ou realidade no combate as dislipidemias? **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, Curitiba, v. 16, n. 2, p. 252-257, abr./jun. 2006.

GORDON, R. Y.; BECKER, D. J. The role of red yeast rice for the physician. **Current Atherosclerosis Reports**, Berlin, v. 13, n. 1, p. 73-80, 2011.

GUPTA, R. K. et al. Antidiabetic activity of *Passifloraincarnata* Linn. in streptozotocin-induced diabetes in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 139, p. 801-806, 2012.

HALLIWELL, B.; WHITEMAN, M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? **British Journal of Pharmacology**, London, v. 142, n. 2, p. 231-255, 2004.

HARVEY, R. A.; FERRIER, D. R. **Bioquímica ilustrada**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2012.

ISOYAMA, S. Coronary vasculature in hypertrophy. In: SHERIDAN, D. J. (Ed.). **Left ventricular hypertrophy**. London: Churchill, 1998. p. 29-36.

KAMALDEEP, D.; SANJU, D.; ANUPAM, S. Passiflora: a review update. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 94, n. 1, p. 1-23, Sept. 2004.

KEMPF, T.; WOLLERT, K. C. Nitric oxide and the enigma of cardiac hypertrophy. **Bioessays**, Cambridge, v. 26, n. 6, p. 608-615, 2004.

KOO, B. K. Statin for the primary prevention of cardiovascular disease in patients with diabetes mellitus. **Diabetes & Metabolism Journal**, Seoul, v. 38, p. 32-34, 2014.

KOSOGLOU, T. et al. Ezetimibe: a review of its metabolism, pharmacokinetics and drug Interactions. **Clinical Pharmacokinetics**, Auckland, v. 44, p. 467-494, 2005.

KOURY, J. C.; DONANGELO, C. M. Zinco, estresse oxidativo e atividade física. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 16, n. 4, p. 433-441, 2003.

LANG, D. et al. Coronary microvascular endothelial cell redox state in left ventricular hypertrophy: the role of angiotensin II. **Circulation Research**, Baltimore, v. 86, n. 4, p. 463-469, Mar. 2000.

LEE, T. M. et al. Effect of pravastatin on left ventricular mass by activation of myocardial KATP channels in hypercholesterolemic rabbits. **Atherosclerosis**, Limerick, v. 176, p. 273-278, 2004.

LEITE, H. P.; SARNI, S. S. Radicais livres, antioxidantes e nutrição. **Revista Brasileira de Nutrição Clínica**, São Paulo, v. 18, n. 2, p. 87-94, 2003.

LEMIEUX, I.; SALOMON, H.; DESPRES, J. P. Contribution of apoCIII reduction to the greater effect of 12-week micronized fenofibrate than atorvastatin therapy on triglyceride levels and LDL size in dyslipidemic patients. **Annals of Medicine**, Helsinki, v. 35, p. 442-448, 2003.

- LI, J. M.; SHAH, A. M. Endothelial cell superoxide generation: regulation and relevance for cardiovascular pathophysiology. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, Bethesda, v. 287, n. 5, p. 1014-1030, Nov. 2004.
- LOPES, A. C.; MARTINEZ, T. L. R. **Dislipidemias: da teoria a pratica**. São Paulo: Atheneu, 2004.
- LORENZI, H.; MATTOS, F. J. A. **Plantas medicinais do Brasil: nativas e exóticas**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2008.
- LÜ, J. M. et al. Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: experimental approaches and model systems. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, New York, v. 14, n. 4, p. 840-860, 2010.
- MADAMANCHI, N. R.; HAKIM, Z. S.; RUNGE, M. S. Oxidative stress in atherogenesis and arterial thrombosis: the disconnect between cellular studies and clinical outcomes. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, Carrboro, v. 3, n. 2, p. 254-267, 2005.
- MARROQUÍN, M. N.; CRUZ, S. M.; CÁCERES, A. Antioxidant activity and phenolic compounds in three species of Passifloraceae (*Passiflora edulis*, *P. incarnata*, *P. ligularis*) from Guatemala. **Acta Horticulturae**, The Hague, v. 964, p. 93-98, 2012.
- MARTINEZ, T. L. R. **Manual de condutas clínicas em dislipidemias**. Rio de Janeiro: Medline, 2003.
- MENGHINI, A. et al. Flavonoids contents in *Passiflora* spp. **Pharmacology Research Communications**, New York, v. 27, p. 13-14, 1993.
- MUSSELMAN, M. E.; PETTIT, R. S.; DERENSKI, K. L. A review and update of red yeast rice. **Journal Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, Cairo, v. 17, n. 1, p. 33-39, 2012.
- NADER, L. A.; MATTOS, A. A.; BASTOS, G. A. N. Burden of liver disease in Brazil. **Liver International**, New York, v. 34, n. 6, p. 844-849, July 2014.
- NAKANDAKARE, E. R. Classificação das dislipidemias. In: QUINTÃO, E. C. R.; NAKANDAKARE, E. R.; PASSARELLI, M. (Ed.). **Lípides: do metabolismo à aterosclerose**. São Paulo: Sarvier, 2011. p. 169-196.
- NATIONAL CHOLESTEROL EDUCATION PROGRAM. Expert panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults: executive summary of the third report of the national cholesterol education program (NCEP) expert panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults (Adult Treatment Panel III). **JAMA**, Chicago, v. 285, n. 19, p. 2486-2497, May 2001.
- NICOLAU, J. C. et al. Perfil do colesterol na cidade de São José do Rio Preto. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, São Paulo, v. 59, p. 433-440, 1992.

OLIVEIRA, R. M. S. et al. Influência do estado nutricional pregresso sobre o desenvolvimento da SM em adultos. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, São Paulo, v. 92, n. 2, p. 107-112, 2009.

OLIVEIRA, T. T. et al. Flavonóides e aterosclerose. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, Rio de Janeiro, v. 42, n. 1, p. 49-54, 2010.

OPARA, E. C. Oxidative stress. **Disease-a-Month**, Chicago, v. 52, n. 5, p. 183-198, 2006.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Doenças cardiovasculares**. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/>>. Acesso em: 28 jul. 2017.

PASSARELLI, M. Lipoproteínas. In: QUINTÃO, E. C. R.; NAKANDAKARE, E. R.; PASSARELLI, M. (Ed.). **Lípidos: do metabolismo à aterosclerose**. São Paulo: Sarvier, 2011. p. 1-85.

POETHKE, V. W.; SCHWARZ, C.; GERLACH, H. Substances of *Passiflora incarnata* (Constituents of *Passiflora bryonioides*). **Alkaloids Planta Medica**, Berlin, v. 18, p. 303-314, 1970.

POLANCZYK, C. A. Cardiovascular risk factors in Brazil: the next 50 years! **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, São Paulo, v. 84, p. 199-201, 2005.

PRASAD, A. S. et al. Zinc supplementation decreases incidence of infections in the elderly: effect of zinc on generation of cytokines and oxidative stress. **American Journal of the Clinical Nutrition**, Oxford, v. 85, n. 3, p. 837-844, 2007.

RAHMAN, K. Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors. **Clinical Interventions in Aging**, Arlington, v. 2, n. 2, p. 219-236, 2007.

RONDANELLI, M. et al. Health-promoting properties of artichoke in preventing cardiovascular disease by its lipidic and glycemic-reducing action. **Monaldi Archives for Chest Disease**, Pavia, v. 80, n. 1, p. 17-26, Mar. 2013.

SAMESINA, N.; AMODEO, C. Hipertrofia ventricular esquerda. **Revista Brasileira de Hipertensão**, São Paulo, v. 8, n. 3, p. 316-320, jul./set. 2001.

SANTOS, R. D. et al. III diretrizes brasileiras sobre dislipidemias e diretriz de prevenção da aterosclerose do Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, São Paulo, v. 77, p. 1-48, 2001.

SATO, K. et al. Hypercholesterolemia impairs transduction of vasodilator signals derived from ischemic myocardium: myocardium-microvessel cross-talk. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, Dallas, v. 24, n. 11, p. 2034-2039, 2004.

SCHNEIDER, C. D.; OLIVEIRA, A. R. Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, São Paulo, v. 10, n. 4, p. 308-313, jul./ago. 2004.

- SCHULZ, I. Tratamento das dislipidemias: como e quando indicar a combinação de medicamentos hipolipemiantes. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, São Paulo, v. 50, n. 2, p. 344-359, abr. 2006.
- SHIMODA, H. et al. Anti-hyperlipidemic sesquiterpenes and new sesquiterpene glycosides from the leaves of artichoke (*Cynarascolymus L.*): structure requirement and mode of action. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, New York, v. 13, n. 2, p. 223-228, 2003.
- SIES, H. Oxidative stress: from basic research to clinical application. **American Journal of Medicine**, New York, v. 91, p. 31-38, 1991.
- SINGH, P. P. et al. Reconvene and reconnect the antioxidant hypothesis in human health and disease. **Indian Journal of Clinical Biochemistry**, New Delhi, v. 25, n. 3, p. 225-243, 2010.
- SLATER, T. F. Free radical mechanisms in tissue injury. **Biochemical Journal**, London, v. 222, p. 1-15, 1984.
- SOULIMANI, R. et al. Behavioural effects of *Passiflora incarnate L.* and its indole alkaloid and flavonoid derivatives and maltol in the mouse. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 57, n. 1, p. 11-20, June 1997.
- SPOSITO, A. C. et al. IV diretriz brasileira sobre dislipidemias e prevenção da aterosclerose: Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, São Paulo, v. 88, n. 1, p. 2-19, 2007.
- STONE, N. J. et al. Treatment of blood cholesterol to reduce atherosclerotic cardiovascular disease risk in adults: synopsis of the 2013 ACC/AHA cholesterol guideline. **Annals of Internal Medicine**, Philadelphia, v. 160, n. 5, p. 339-343, Mar. 2014.
- SUKANDAR, E. Y. et al. Safety of garlic (*Allium sativum*) and turmeric (*Curcuma domestica*) extract in comparison with simvastatin on improving lipid profile in dyslipidemia patients. **Journal of Medical Sciences**, Faisalabad, v. 13, n. 1, p. 10-18, 2013.
- URSO, M. L.; CLARKSON, P. M. Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation. **Toxicology**, Limerick, v. 189, p. 41-54, 2003.
- WOHLMUTH, H. et al. Pharmacognosy and chemotypes of Passionflower (*Passiflora incarnata L.*). **Biological Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v. 33, n. 6, p. 1015-1018, 2010.
- XAVIER, H. T. et al. V diretriz brasileira de dislipidemias e prevenção da aterosclerose. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, São Paulo, v. 101, n. 4, p. 1-20, 2013.
- YANG, H. et al. Retardation of atherosclerosis by overexpression of catalase or both Cu/Zn-superoxide dismutase and catalase in mice lacking apolipoprotein E. **Circulation Research**, Dallas, v. 95, p. 1075-1081, 2004.
- YAO, E. H.; YU, Y.; FUKUDA, N. Oxidative stress on progenitor and stem cells in cardiovascular diseases. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, Beijing, v. 7, n. 2, p. 101-108, Apr. 2006.

ZERAIK, M. L. et al. Maracujá: um alimento funcional? **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 20, n. 3, p. 459-471, 2010.

CAPÍTULO 2

ARTIGO 1 - DRY EXTRACT OF *Passiflora incarnata* L. LEAF: CARDIAC AND HEPATIC OXIDATIVE STRESS PROTECTOR IN LDLR^{-/-} MICE FED HIGH FAT DIET

Artigo preparado de acordo com as normas para submissão do *Brazilian Archives of Biology and Technology*–BAPT (<http://www.scielo.br/revistas/babt/iinstruc.htm>).

Dry Extract of *Passiflora incarnata* L. leaf: Cardiac and Hepatic Oxidative Stress Protector in LDLr-/- Mice Fed High-Fat Diet

P. incarnata: oxidative stress protector

ABSTRACT

The control of dyslipidemia by using herbal products is an important subject for studies. In this study, the effects of dry *Passiflora incarnata* L. extract over dyslipidemia, left ventricular hypertrophy and hepatic oxidative stress of dyslipidemic mice were evaluated. The LDLr-/- mice were divided into four experimental groups, each receiving the following diets: Group C (n=10) – standard feed; Group CP (n=10) – standard feed and 200 mg/kg of body weight of *Passiflora incarnata* L. leaf dry extract; Group HL (n=10) – high fat feed; Group HLP (n=10) – high fat feed and 200 mg/kg of body weight of *Passiflora incarnata* L. leaf dry extract. The mice receiving high fat feed with *Passiflora incarnata* L. dry extract showed decrease of total cholesterol, triglycerides and increase of high-density lipoprotein (HDL), as well as decrease of C-reactive protein, alkaline phosphatase and insulin. There was no effect over glucose, Homa index and enzymes aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase. However, the prevention of left ventricular hypertrophy occurred, as well as lipid peroxidation and the production of carbonyl proteins, which are both oxidative stress markers. In conclusion, *Passiflora incarnata* L. dry extract associated to high-fat diet acts in the prevention of dyslipidemia, consequently, hindering the occurrence of hepatic oxidative stress and the development of left ventricular hypertrophy by the increase of serum HDL.

Keywords: Passion fruit; left ventricular hypertrophy; dyslipidemia; oxidative stress.

INTRODUCTION

Dyslipidemia is one of the risk factors for the development of cardiovascular diseases¹. The appearance of dyslipidemia derives from an abnormal lipid profile, composed of total cholesterol (TC), low-density lipoprotein (LDL), high-density lipoprotein (HDL) and triglycerides (TG)².

Dyslipidemia is also one of the biochemical factors for the development of left ventricular hypertrophy (LVH), as well as oxidative stress, hyperinsulinemia and inflammatory process³⁻⁴. LVH is considered a highly relevant indicator for morbidity and mortality by cardiovascular diseases³.

Alterations on the serum concentration of cholesterol and triglycerides negatively act over the biomarkers of oxidative stress and cause the production of oxygen-reactive species by various mechanisms, leading to the increase of lipid peroxidation, associated to dyslipidemia. Furthermore, the oxidative stress associated to dyslipidemia affects many organs, with prominence over heart, liver and kidneys⁵⁻⁶. Many hepatic diseases with structural and functional abnormalities have oxidative stress as crucial factor for its development⁷.

Therefore, treating dyslipidemia is indispensable, preventing the emergence of LVH and hepatic diseases caused by oxidative stress. The change in habits is the main strategy proposed for the treatment of dyslipidemia, but the use of medication is indicated for some cases⁸. Herbal medications have been tested over changes of the lipid profile in the search for new treatments⁹⁻¹⁰, and have conquered the market due to its price and considering the collateral effects caused by medications⁹⁻¹¹.

Passiflora incarnata L., also known as passion fruit, has been used as anxiolytic and sedative herbal medication. Many studies highlight its antispasmodic, analgesic, anticonvulsive and antidiabetic effect, as well as for cough, bronchitis and asthma¹²⁻¹³. Flavonoids are the most representative phytochemicals of *Passiflora incarnata* L., represented by apigenin, luteoline, quercetin, kaempferol, C-glycosylated flavonoids, vitexin, isovitexin, orientin, isorientin, schaftoside, isoschaftoside, swertisin and isovitexin-2''-O-glycosylated¹⁴⁻¹⁵⁻¹⁶.

Therefore, considering the increase in research and in the applicability of *Passiflora incarnata* L., the objective of this study was to evaluate the action of the dry *Passiflora incarnata* L. leaf extract over dyslipidemia, left ventricular hypertrophy and hepatic oxidative stress of LDLr-/- mice.

MATERIALS AND METHODS

Animal protocol

The experiments were conducted using 40 male mice, homozygote for the LDL receptor gene (LDLr^{-/-}), with four months of age and weighing 25 ± 3 g, divided into groups of ten animals each (Table 1). The animals were maintained under controlled temperature ($25 \pm 1^\circ\text{C}$) and light/dark cycle of 12 hours.

Table 1. Experimental groups and respective protocols.

Group	Experimental protocol	Denomination
1	LDLr ^{-/-} mice that received standard feed for rodents (Nuvital TM , Nuvilab, Colombo, Brazil), during 30 days.	C
2	LDLr ^{-/-} mice that received standard feed for rodents (Nuvital TM , Nuvilab, Colombo, Brazil) and 200 mg/kg of body weight of dry <i>Passiflora incarnata</i> L. leaf extract per gavage, during 30 days.	CP
3	LDLr ^{-/-} mice that received high fat feed with 20% total fat, 1.25% cholesterol and 0.5% colic acid; a total of 2.89 kcal/g (Instituto Tecnológico de Alimentos, Campinas, Brazil), during 30 days.	HL
4	LDLr ^{-/-} mice that received high fat feed with 20% total fat, 1.25% cholesterol and 0.5% colic acid; a total of 2.89 kcal/g (Instituto Tecnológico de Alimentos, Campinas, Brazil) and treatment with 200 mg/kg of body weight of dry <i>Passiflora incarnata</i> L. leaf extract per gavage during 30 days.	HLP

All animals received water and *ad libitum* feeding. The administration of water (vehicle) and dry *Passiflora incarnata* L. leaf extract was performed daily by gavage. The extract was commercially obtained, containing 0.06% of total flavonoids calculated as vitexin (Gemini, Anapolis, Brazil). The experimental procedures were conducted according to directives established by the Conselho Nacional de Controle de Experiencias Animal (CONCEA – National Council for Animal Experience Control) and were approved by the Animal Ethics Committee of the Universidade José do Rosário Vellano (UNIFENAS, Alfenas, MG, Brazil) (n° 12A/2012).

After 30 days of experimentation, mice were fasted for 12 hours and, subsequently anesthetized via intraperitoneal using xylazine (BayerTM) and Ketamine (Parke-DavisTM), in the concentrations of 6 and 40 mg/kg, respectively. Blood samples were collected by retro-orbital venous plexus puncture, using heparinized capillary tubes for serum analyses of triglycerides (TG), total cholesterol (TC), high-density lipoprotein (HDL), C-reactive protein (CRP), glucose, insulin and hepatic enzymes alkaline phosphatase (AP), aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT). The heart was removed for posterior morphometric and histological analyses. The liver was removed and homogenized (at 4°C) in buffer saline solution with 0.1 M (PBS, pH 7.2) in the proportion of 5 mL/g of organ. The homogenized solution was centrifuged at 3000 g during 10 minutes at 4°C. The supernatant was posteriorly used.

Serum analyses

Serum was obtained by centrifuging the blood (1200 g, 4°C, 10 minutes). TG, TC and HDLc were measured using the colorimetric enzymatic methods, described by Hedrick et al.¹⁷. AP, AST and ALT were dosed by spectrophotometry. The level of CRP was determined by turbidimetry and photometry (Humastar 300, Human Diagnostics, Germany). Glucose was measured by the colorimetric enzymatic method. Insulin was determined using the ELISA specific commercial kit (DAKO Ltd., UK). The Homa index (Homa-ir) was calculated using the formula: {Homa-ir = [fast insulinemia (mU/L) x fast glycemia (mmol/L)]/22.5} to determine resistance to insulin.

Morphometric and histological analyses

The left ventricle was isolated from the heart and weighed (mg). The index of left ventricular hypertrophy was calculated using the proportion of ventricle weight (mg) by body weight (g). The left ventricle was fixed in 10% formalin for 24 hours before inclusion into paraffin for histological cuts of

four micrometers, according to Junqueira et al.¹⁸. The histological cuts were stained with picosirius red and hematoxylin/eosin for quantitative analysis of collagen and for cardiomyocyte morphometry, respectively. The cuts stained with picosirius red were analyzed with polarized light. Each micrograph was analyzed using the LGMC-image software, version 1.0, by which the fractional percentages of collagen related to the areas marked in red were acquired¹⁹. Four photomicrographs (200x) were obtained from the histological cuts stained with hematoxylin/eosin, using the same pre-fixed point on the transversal cuts of the ventricle of each mouse, using a digital camera coupled to the Leica IM50 program (version 1.20). The diameters of eight to 12 cardiomyocytes of each histological cut were measured, totalizing 12 cuts for each animal²⁰. All histological analyses were conducted by a single examiner using the double-blind method.

Hepatic lipid peroxidation evaluation

The lipid peroxidation evaluation was performed by measuring the peroxidation products that react to the thiobarbituric acid (TBA) by testing the reactive species (TBARS), according to methodology described by Winterbourn et al.²¹. Aliquots (150 μ L) of the homogenized liver were mixed with 1.22 M of phosphoric acid (750 μ L), deionized water (1350 μ L) and TBA (0.67%, 750 μ L) and incubated. Subsequently, the mixture was boiled in water for one hour at 95 °C and taken to cooling in ice bath (4°C). The solution was mixed with methanol (1800 μ L) and NaOH 1 M (200 μ L), and transferred to cuvette. The estimated TBARS concentration was obtained using the standard curve of malonic dialdehyde (MDA, 1,1,3,3 tetraethoxypropane). To quantify the MDA/TBARS, a spectrofluorometric detector Varian Cary Eclipse (λ excitation = 532 nm; emission λ = 563 nm) was used. The results were expressed in μ mol MDA/mol of protein. Total protein concentration was determined by the Bradford method²².

Determination of carbonyl proteins

Carbonyl of oxidized proteins was estimated using 2,4-dinitrophenylhydrazin spectrophotometric assay, by reacting 2,4-dinitrophenylhydrazin with carbonyl proteins. The aliquots (500 μ L) of homogenized solution (liver) and a 10 μ M 2,4-dinitrophenylhydrazin solution (500 μ L) were incubated during one hour with dripping trichloroacetic acid (TCA, 20%) until complete precipitation. Subsequently, a solution of ethanol/ethyl acetate (500 μ L) was added to the resulting mixture and centrifuged (600 g per 10 minutes). Finally, the sediment was dissolved in 1000 μ L of Guanidine 6 M, and absorbance was measured at 370 nm²³. The results were expressed in carbonyl nmol/mg of total protein. Total protein concentration was determined by the Bradford method²².

Statistical analyses

The data were expressed as mean \pm mean standard error (MSE). The analysis of variance (ANOVA) was followed by the Tukey test to compare the means between the different groups. The differences were considered significant at $p < 0.05$. All statistical treatments were performed using the Graphpad InStat statistical software, version 3.05, for Windows (Graphpad InStatTM, San Diego, CA, USA).

RESULTS

The mice from the HL group presented increased serum levels of TC and TG when compared to the mice receiving standard diet (group C). Serum levels of HDLc decreased. The administration of dry *Passiflora incarnata* L. extract prevented the increase of TC in groups CP and HLP when compared to groups C and HL, respectively (Table 2). However, the effect of the dry extract over the levels of TG only prevented the increase for HLP mice when compared to the HL group. The dry extract also partially prevented the decrease in the HDLc levels of HLP mice, when compared to group HL (Table 2).

The severe dyslipidemia observed in mice from the HL group generated an increase in lipid peroxidation and hepatic protein oxidation in relation to the other studied groups (Table 3). The dry *Passiflora incarnata* L. extract prevented the increase of lipid peroxidation and, more prominently, hepatic protein oxidation for HLP mice, with distinguished results when compared to mice from groups C and CP (Table 3). When analyzing the enzymes AP, AST and ALT, an increase in the serum levels of all three enzymes was observed in HL mice in relation to the mice from group C. The use of dry extract partially prevented the serum increase of AP in HLP mice. However, the dry extract presented no effect over AP serum

levels of CP mice. The dry extract also presented no interference over serum levels of AST and ALT of CP and HLP animals when compared to C and HL groups, respectively (Table 2).

Table 2. Serum levels of total cholesterol (TC), triglycerides (TG) and HDL cholesterol (HDLc); alkaline phosphatase (AP), aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT); C-reactive protein (CRP), glucose and insulin; HOMA index (Homa-ir).

Groups	C	CP	HL	HLP
TC (mg/dL)	254±8 ^b	132±4 ^c	758±17 ^a	229±12 ^b
TG (mg/dL)	138±5 ^b	103±6 ^b	246±13 ^a	118±13 ^b
HDLc (mg/dL)	64±3 ^a	72±4 ^a	26±2 ^c	45±2 ^b
AP (U/L)	116±6 ^c	116±3 ^c	178±10 ^a	146±7 ^b
AST (U/L)	139±5 ^b	161±6 ^b	249±12 ^a	262±15 ^a
ALT (U/L)	64±6 ^b	66±4 ^b	181±17 ^a	170±17 ^a
CRP (mg/dL)	6±0.4 ^c	5±0.6 ^c	14.8±0.8 ^a	9.8±1 ^b
Glucose (mMol/L)	5.6±0.2 ^a	5.7±0.1 ^a	5.8±0.3 ^a	5.6±0.1 ^a
Insulin (mU/L)	2.8±0.2 ^c	2.7±0.2 ^c	6.1±0.8 ^a	4.0±0.3 ^b
Homa-ir	0.7±0.06 ^b	0.7±0.05 ^b	1.6±0.08 ^a	1.0±0.6 ^{a,b}

The values were expressed as mean ± MSE. Distinct letters indicate significant difference between groups ($p < 0.05$ – Tukey Test). C – standard feed; CP – standard feed and dry *Passiflora incarnata* L. leaf extract; HL – high fat feed; HLP – high fat feed and dry *Passiflora incarnata* L. leaf extract.

The mice from group HL presented resistance to insulin, which was demonstrated by the increase of Homa index and serum levels of insulin, without altering serum glucose levels (Table 2). The dry *Passiflora incarnata* L. extract partially prevented resistance to insulin in HLP animals, avoiding the increase of serum insulin levels and, consequently, the increase of the Homa index (Table 2). The partial effect of the dry extract over insulin resistance observed in HLP mice was demonstrated by the difference in the insulin serum levels and Homa index in relation to mice from groups C and CP (Table 2).

Table 3. Effect of dry *Passiflora incarnata* L. extract over lipid peroxidation and liver protein oxidation in dyslipidemic mice.

Groups	C	CP	HL	HLP
Lipid peroxidation ($\mu\text{mol MDA/mol}$ of protein)	0.08±0.008 ^b	0.06±0.0004 ^b	0.11±0.012 ^a	0.03±0.002 ^c
Protein oxidation (nmol carbonyl/mg of total protein)	2.84±0.67 ^b	2.63±0.37 ^b	5.47±0.67 ^a	2.44±0.79 ^b

The values were expressed as mean ± MSE. Distinct letters indicate significant difference between groups ($p < 0.05$ – Tukey Test). C – standard feed; CP – standard feed and dry *Passiflora incarnata* L. leaf extract; HL – high fat feed; HLP – high fat feed and dry *Passiflora incarnata* L. leaf extract.

Severe dyslipidemia associated to the increase in hepatic oxidative stress and resistance to insulin of mice from group HL was followed by left ventricular hypertrophy, observed by the increase in the proportion of left ventricle weight (mg)/animal weight (g) due to the increase in the diameter of the cardiomyocytes and collagen deposits in the left ventricular myocardium (Table 3, Table 4 and Fig. 1). The serum levels of CRP also increased for mice from the HLP group when compared to the other groups (Table 2). The dry extract prevented left ventricular hypertrophy and the increase of CRP for HLP mice (Table 4, Fig. 1 and Table 2).

Table 4. Morphometric parameters of the heart of dyslipidemic mice.

Groups	C	CP	HL	HLP
Proportion ventricular weight (mg)/animal weight (g)	3.6±0.08 ^b	3.6±0.11 ^b	4.2±0.12 ^a	3.4±0.14 ^b
Cardiomyocyte diameter (mm)	18±0.8 ^b	18±0.5 ^b	25±1.6 ^a	19±1.0 ^b
Collagen deposits (%)	4.9±0.2 ^b	5.1±1 ^b	11.2±0.8 ^a	4.6±0.9 ^b

The values were expressed as mean ± MSE. Distinct letters indicate significant difference between groups ($p < 0.05$ – Tukey Test). C – standard feed; CP – standard feed and dry *Passiflora incarnata* L. leaf extract; HL – high fat feed; HLP – high fat feed and dry *Passiflora incarnata* L. leaf extract.

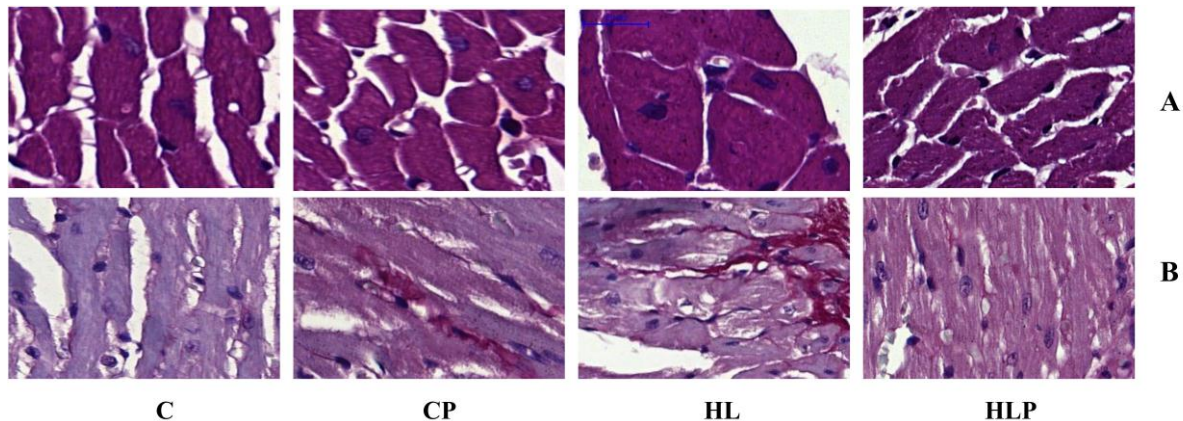


Figure 1. A – Photomicrography stained with hematoxylin/eosin representative of the left ventricle showing the diameter of the cardiomyocytes. B – Photomicrography stained with picrosirius red showing the distribution of interstitial collagen (marked in red by the stain) in the left ventricular myocardium of the mice. C – standard feed; CP - standard feed and dry *Passiflora incarnata* L. leaf extract; HL – high fat feed; HLP – high fat feed and dry *Passiflora incarnata* L. leaf extract.

DISCUSSION

In the present study, we verified that the administration of *Passiflora incarnata* L. extract influenced the lipid profile of mice from the HLP group, preventing the decrease of HDLc and the increase of TG and TC. The last can be attributed to the presence of flavonoids in the extract. These flavonoids inhibit the enzyme responsible for the biosynthesis from cholesterol to hydroxymethylglutaryl CoA reductase, as well as lipogenic enzyme glucose-6-phosphate dehydrogenase and malic enzyme^{24,25}.

The mice from group HL presented LVH similar to those of studies developed in the laboratory, demonstrating that LDL^{-/-} mice fed high-fat diet developed LVH and atherosclerosis due to the inflammatory process caused by severe dyslipidemia, associated to the decrease of the bioavailability of nitric oxide and of the serum levels of HDL and its antioxidant and anti-inflammatory functions^{3,26-29}. Furthermore, HL mice presented resistance to insulin, with hyperinsulinemia associated to the increase in serum levels of enzymes AP, AST and ALT.

Dyslipidemia and insulin are important factors for the development of left ventricular hypertrophy³⁰. Hypercholesterolemia can act in K_{ATP} channels of the myocardium, altering its function and expression, presenting as trigger for cardiac hypertrophy^{31,32}. Insulin can cause the biosynthesis of myocardial proteins and, directly or indirectly, cardiac hypertrophy³³. Therefore, the decrease of total cholesterol and triglycerides, associated to the decrease in insulin levels, contribute for the prevention of LVH in mice from group HLP. *Passiflora incarnata* L. prevented LVH, resistance to insulin, increase of CRP and oxidative stress. However, the lower occurrence of oxidative stress has prevented the decrease of liver HDL with consequent increase in the levels of HDLc, hindering the development of LVH in the animals used for this study, due to its antioxidant and anti-inflammatory functions^{34,35}.

The mice that received high-fat diet and dry *Passiflora incarnata* L. extract (HLP), when compared to the HL group, presented increase in the levels of HDLc and decrease in TG and insulin, which are predicting factors for the metabolic syndrome^{36,37}. A decrease in CRP, inflammation biomarker commonly found in high levels in the metabolic syndrome, was also observed³⁸, contributing with a reduction of the risk of cardiovascular diseases such as LVH.

Notably, the mice that received high-fat diet with *Passiflora incarnata* L. demonstrated significant reduction in carbonyl proteins and lipid peroxidation, both considered oxidative stress markers^{21,23}. The flavonoids present in *Passiflora incarnata* L., such as vitexin and isovitexin³⁹, present antioxidant activity⁴⁰, which may have contributed in the reduction of the oxidative stress markers for group HLP. Flavonoids present antioxidant activity by eliminating free radicals, by means of the metal chelating property, suppressing the enzymes involved in the synthesis of free radicals and by stimulating the antioxidant enzymes⁴¹. The use of antioxidants is a strategy to prevent hepatic oxidative stress and, consequently, the hepatic diseases originated from oxidative stress⁴².

CONCLUSIONS

The dry *Passiflora incarnata* L. extract presented antioxidant effect, preventing cardiac and hepatic diseases related to oxidative stress, and can be indicated as aid for the treatment of diseases caused by oxidative stress derived of disturbances in lipid metabolism.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank the Federal Institute of Education, Science and Technology of South of Minas Gerais (Brazil) and University José do Rosário Vellano (Brazil) for the support.

REFERENCES

1. Organização Mundial da Saúde (OMS). As 10 principais causas de morte: principais causas de morte. 2017; Accessed in 19 Oct. 2017; Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/>.
2. Adam M, Cohen MD, Daniel J, Rader MD. Dyslipidemia. *Curr Treat Options Cardiovasc Med*. 2001; 3: 347–357.
3. Garcia JAD, Santos L, Moura AL, Ricardo KFS, Wanschel ACBA, Shishido SM, et al. S-Nitroso-N-Acetylcysteine (SNAC) Prevents Myocardial Alterations in Hypercholesterolemic LDL Receptor Knockout Mice by Antiinflammatory Action. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2008; 51(1):78-85.
4. Madamanchi NR, Vendrov A, Runge MS. Oxidative stress and vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005; 25(4):29–38.
5. Balkan J, Oztezcan S, Aykac-Toker G, Uysel M. Effects of added dietary taurine on erythrocyte lipids and oxidative stress in rabbits fed a high cholesterol diet. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2002; 66(12):2701– 2705.
6. Abuhashish HM, Aleisa AM, Ahmed MM, Alkhamees OA, Al-Rejaie SS, Alroujayee AS. Ameliorative effects of rutin and ascorbic acid combination on hypercholesterolemia-induced hepatotoxicity in female rats. *Afr J Pharm Pharmacol*. 2013; 7(6):280–288.
7. Cichoż-Lach H, Michalak A. Oxidative stress as a crucial factor in liver diseases. *World J Gastroenterol*. 2014; 7(20):8082–8091.
8. Faludi AA, Izar MCO, Saraiva JFK, Chacra APM, Bianco HT, Afiune Neto A, et al. Atualização da Diretriz Brasileira de Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose – 2017. *Arq Bras Cardiol*. 2017; 109(2)supl.1:1-76.
9. Pizzio VR, Brasileiro BG, Oliveira TT, Nagem TJ. Plantas com possível atividade hipolipidêmica: uma revisão bibliográfica de livros editados no Brasil entre 1998 e 2008. *Rev Bras Plantas Med*. 2011; 13(1): 98-109.
10. Moll, MCN. Antihiperlipemiantes de origen vegetal. *Rev Fitoter*. 2006; 6:11-26.
11. Gonçalves MCR, Diniz MFFM, Borba JDC, Nunes XP, Barbosa-Filho JM. Berinjela (*Solanum melongena* L.) – mito ou realidade no combate as dislipidemias? *Rev Bras Farmacogn*. 2006; 16(2):252-257.
12. Dhawan K, Kumar R, Kumar S, Sharma A. Correct Identification of *Passiflora incarnate* Linn., a Promising Herbal Anxiolytic and Sedative. *J Med Food*. 2001; 4(3):137-144.
13. Dhawan K, Kumar S, Sharma A. Suppression of alcohol-cessation-oriented hyper-anxiety by the benzoflavone moiety of *Passiflora incarnata* Linn. in mice. *J Ethnopharmacol*. 2002; 81:239–244.
14. Dhawan K, Kumar S, Sharma A. Anti-anxiety studies on extracts of *Passiflora incarnata* Linn. *J Ethnopharmacol*. 2001a; 78:165–170.
15. Dhawan K, Kumar S, Sharma A. Anxiolytic activity of aerial and underground parts of *Passiflora incarnata*. *Fitoterapia*. 2001b; 72:922–926.
16. Wohlmuth H, Penman KG, Pearson T, Lehmann RP. Pharmacognosy and chemotypes of Passionflower (*Passiflora incarnata* L.). *Biol Pharm Bull*. 2010; 33(6):1015-1018.
17. Hedrick CC, Castellani LW, Wong H, Lusic AJ. In vivo interactions of apoA-II, apoA-I, and hepatic lipase contributing to HDL structure and antiatherogenic functions. *J Lipid Res*. 2001; 42(4):563-570.
18. Junqueira LC, Bignolas G, Brentani RR. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. *Histochem J*. 1979; 11(4): 447-455.


19. Shirani J, Pick R, Roberts WC, Maron BJ. Morphology and significance of the left ventricular collagen network in young patients with hypertrophic cardiomyopathy and sudden cardiac death. *J Am Coll Cardiol.* 2000; 35(1):36–44.
20. Armstrong AT, Binkley PF, Baker PB, Myerowitz PD, Leier CV. Quantitative investigation of cardiomyocyte hypertrophy and myocardial fibrosis over 6 years after cardiac transplantation. *J Am Coll Cardiol.* 1998; 32(3):704–710.
21. Winterbourn CC, Gutteridge JM, Halliwell B. Doxorubicin-dependent lipid peroxidation at low partial pressures of O₂. *J Free Radic Biol Med.* 1985; 1(1):43–49.
22. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976; 72:248–254.
23. Punchard NA, Kelly FJIRL. *Free Radicals: A Practical Approach.* Oxford: Oxford University Press; 1996.
24. Anila L, Vijayalakshmi NR. Flavanoids from *Embllica officinalis* and *Mangifera indica* - effectiveness for dyslipidemia. *J Ethnopharmacol.* 2002; 79(1):81–87.
25. Jung UJ, Lee MK, Park YB, Kang MA, Choi MS. Effect of citrus flavonoids on lipid metabolism and glucose-regulating enzyme mRNA levels in type-2 diabetic mice. *Int J Biochem Cell Biol.* 2006; 38(7):1134–1145.
26. Krieger MH, Santos KFR, Shishido SM, Wanschel ACBA, Estrela HFG, Santos L, et al. Antiatherogenic effects of S-nitroso-N-acetylcysteine in hypercholesterolemic LDL receptor knockout mice. *Nitric Oxide.* 2006; 14(1):12–20.
27. Garcia JAD, Lima CC, Messoria LB, Cruz AF, Marques APS, Simão TP, et al. Efeito anti-inflamatório da lipoproteína de alta densidade no sistema cardiovascular de camundongos hiperlipidêmicos. *Rev Port Cardiol.* 2011; 30(10):763–774.
28. Silva DB, Miranda AP, Silva DB, D'Angelo LR, Rosa BB, Soares EA, et al. Propolis and swimming in the prevention of atherogenesis and left ventricular hypertrophy in hypercholesterolemic mice. *Braz J Biol.* 2015; 75(2):414–422.
29. Santos L, Davel AP, Almeida TIR, Almeida MR, Soares EA, Fernandes GJM, et al. Soy milk versus simvastatin for preventing atherosclerosis and left ventricle remodeling in LDL receptor knockout mice. *Braz J Med Biol Res.* 2017; 50(3): e5854.
30. Garcia JAD, Incerpi EK. Factors and mechanisms involved in left ventricular hypertrophy and the anti-hypertrophic role of nitric oxide. *Arq Bras Cardiol.* 2008; 90(6):443–450.
31. Ueda Y, Kitakaze M, Komamura K, Minamino T, Asanuma H, Sato H, et al. Pravastatin restored the infarct size-limiting effect of ischemic preconditioning blunted by hypercholesterolemia in the rabbit model of myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol.* 1999; 34(7):2120–2125.
32. Genda S, Miura T, Miki T, Ichikawa Y, Shimamoto K. K(ATP) channel opening is an endogenous mechanism of protection against the no-reflow phenomenon but its function is compromised by hypercholesterolemia. *J Am Coll Cardiol.* 2002; 40(7):1339–1346.
33. Samuelsson AM, Bollano E, Mobini R, Larsson BM, Omerovic E, Fu M, et al. Hyperinsulinemia: Effect on Cardiac Mass/Function, Angiotensin II Receptor Expression, and Insulin Signaling Pathways. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2006; 291(2):H787–796.
34. Christison J, Karjalainen A, Brauman J, Bygrave F, Stocker R. Rapid reduction and removal of HDL- but not LDL associated cholesteryl ester hydroperoxides by rat liver perfused in situ. *Biochem J.* 1996; 314(3):739–742.
35. Holvoet P. Relations between metabolic syndrome, oxidative stress and inflammation and cardiovascular disease. *Verh K Acad Geneesk Belg.* 2008; 70(3):193–219.

36. Alberti FGMM, Zimmet PZ. For the WHO Consultation. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: Diagnosis and classification of diabetes mellitus, provisional report of a WHO consultation. *Diabet Med.* 1998; 15(7):539–553.
37. JAMA. Expert Panel on Detection, Evaluation and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults. Executive summary of the Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation and Treatment of High Cholesterol. *JAMA.* 2001; 285(19):2486–2497.
38. Ridker PM, Hennekens CH, Buring JE, Rifai N. Proteína C-reativa e outros marcadores de inflamação na predição de doenças cardiovasculares em mulheres. *N Engl J Med.* 2000; 342:836-843.
39. He M, Min JW, Kong WL, He XH, Li JX, Peng BW. A review on the pharmacological effects of vitexin and isovitexin. *Fitoterapia.* 2016; 115:74–85.
40. Marroquín MN, Cruz SM, Cáceres, A. Antioxidant activity and phenolic compounds in three species of Passifloraceae (*Passiflora edulis*, *P. incarnata*, *P. ligularis*) from Guatemala. *Acta Hort.* 2012; 964:93-98.
41. Procházková D, Bousová I, Wilhelmová N. Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. *Fitoterapia.* 2011;82(4):513-523.
42. Li S, Tan HY, Wang N, Zhang ZJ, Lao L, Wong CW. The Role of Oxidative Stress and Antioxidants in Liver Diseases. *Int J Mol Sci.* 2015; 16(11):26087-26124.

ANEXO A – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)**PARECER N.º 12A/2012**

A COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CEUA –, da UNIFENAS, tendo analisado, nesta data, o protocolo do projeto de pesquisa intitulado **EFEITOS DOS FLAVONÓIDES NA DISLIPIDEMIA, NA HIPERTROFIA VENTRICULAR ESQUERDA E NA ATROSCLEROSE DE CAMUNDONGOS**, de autoria do Prof. Délcio Bueno da Silva, resolveu enquadrá-lo na categoria de aprovado.

Alfenas, 20 de junho de 2012.


Profª. Dra. Maria Cristina da Costa Resck
Coordenadora do CEUA

Data para apresentação do Relatório Final: 01/ 07/2013

Modelo, do Relatório Final e Parcial: <http://www.unifenas.br/pesquisa/>

Comitê de Ética em Pesquisa– UNIFENAS – (35) 3299-3137 comitedeetica@unifenas.br