



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

Efeitos hipolipemiante e antioxidante do extrato etanólico da casca do fruto da *Annona crassiflora* Mart. e seus polifenóis em camundongos hiperlipidêmicos induzidos por Triton WR-1339 (tiloxapol)

Aluna: Letícia Pereira Afonso Ramos

Orientador: Prof^o. Dr. Foued Salmen Espíndola

Co-Orientadora: Prof^a. Dra. Françoise Vasconcelos Botelho

UBERLÂNDIA - MG
2020



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

Efeitos hipolipemiante e antioxidante do extrato etanólico da casca do fruto da *Annona crassiflora* Mart. e seus polifenóis em camundongos hiperlipidêmicos induzidos por Triton WR-1339 (tilioxapol)

Aluna: Letícia Pereira Afonso Ramos

Orientador: Prof^o. Dr. Foued Salmen Espíndola

Co-Orientadora: Prof^a. Dra. Françoise Vasconcelos Botelho

**Dissertação apresentada à
Universidade Federal de
Uberlândia como parte dos
requisitos para obtenção do
Título de Mestre em Genética e
Bioquímica**

UBERLÂNDIA - MG
2020

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

R175
2020

Ramos, Leticia Pereira Afonso, 1986-
Efeitos hipolipemiante e antioxidante do extrato
etanólico da casca do fruto da *Annona crassiflora* Mart.
e seus polifenóis em camundongos hiperlipidêmicos
induzidos por Triton WR-1339 (tiloxapol) [recurso
eletrônico] / Leticia Pereira Afonso Ramos. - 2020.

Orientador: Foued Salmen Espíndola.
Coorientadora: Françoise Vasconcelos Botelho.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de
Uberlândia, Pós-graduação em Genética e Bioquímica.
Modo de acesso: Internet.
Disponível em: <http://doi.org/10.14393/ufu.di.2020.774>
Inclui bibliografia.

1. Genética. I. Espíndola, Foued Salmen, 1957-,
(Orient.). II. Botelho, Françoise Vasconcelos, 1971-,
(Coorient.). III. Universidade Federal de Uberlândia.
Pós-graduação em Genética e Bioquímica. IV. Título.

CDU: 575

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:

Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
 Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica
 Av. Pará 1720, Bloco 2E, Sala 244 - Bairro Umuarama, Uberlândia-MG, CEP 38400-902
 Telefone: +55 (34) 3225-8438 - www.ppggb.ibtec.ufu.br - ppggb@ufu.br



ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em:	Genética e Bioquímica				
Defesa de:	Dissertação de Mestrado Acadêmico - 04/2020 - PPGGB.				
Data:	Vinte e dois de dezembro de dois mil e vinte	Hora de início:	09:00h	Hora de encerramento:	09:40h
Matrícula do Discente:	11822GBI008				
Nome do Discente:	Letícia Pereira Afonso Ramos				
Título do Trabalho:	Efeitos hipolipemiante e antioxidante do extrato etanólico da casca do fruto da <i>Annona crassiflora</i> Mart. e seus polifenóis em camundongos hiperlipidêmicos induzidos por Triton WR-1339 (tiloxapol).				
Área de concentração:	Bioquímica				
Linha de pesquisa:	Estrutura e função de proteínas.				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	Plantas Medicinais e Frutos do Cerrado e Diabetes.				

Aos vinte e dois dias do mês de dezembro de dois mil e vinte, às 09:00 horas, reuniu-se via web conferência pela plataforma Google Meet, em conformidade com a Portaria nº 36, de 19 de março de 2020 da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES e Resolução de nº 06/2020 do Conselho de Pesquisa e Pós-graduação pela Universidade Federal de Uberlândia, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Genética e Bioquímica, assim composta: Professores Doutores: Foued Salmen Espíndola (Orientador), Marina Prigol e Joyce Ferreira da Costa Guerra. A participação dos dois últimos se deu por epístola. Iniciando os trabalhos o (a) presidente Dr (a). Foued Salmen Espíndola apresentou a Comissão Examinadora e o candidato(a), agradeceu a presença dos participantes, e concedeu ao Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa. A seguir o senhor(a) presidente procedeu a leitura das epístolas enviadas pelos membros da banca. Em seguida os membros presentes, passaram a arguir o(a) candidato(a). Ultimada a leitura das epístolas e a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando o(a) candidato(a):

(A) PROVADO.

Esta defesa de Dissertação de Mestrado é parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre. O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU. Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **Marina Prigol, Usuário Externo**, em 22/12/2020, às 08:54, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Foued Salmen Espíndola, Professor(a) do Magistério Superior**, em 22/12/2020, às 09:44, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Joyce Ferreira da Costa Guerra, Professor(a) do Magistério Superior**, em 22/12/2020, às 13:07, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **2422080** e o código CRC **2046E9A0**.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

Efeitos hipolipemiante e antioxidante do extrato etanólico da casca do fruto da *Annona crassiflora* Mart. e seus polifenóis em camundongos hiperlipidêmicos induzidos por Triton WR-1339 (tiloxapol)

ALUNA: Leticia Pereira Afonso Ramos

COMISSÃO EXAMINADORA

Presidente: Profº Dr. Foued Salmen Espíndola (Orientador)

Examinadores: Profª. Dra. Marina Prigol
Profª. Dra. Joyce Ferreira da Costa

Data da Defesa: 22/12/2020

As sugestões da Comissão Examinadora e as Normas PGGB para o formato da Dissertação/Tese foram contempladas

Profº. Dr. Foued Salmen Espíndola

*Dedico este trabalho a Deus, minha família, amigos e
a todos que sobretudo acreditam, apoiam
e defendem a ciência e a pesquisa.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por toda proteção e bênçãos que me são concedidas. Ao meu marido, Tony, que me acompanhou, me apoiou e me deu todo suporte durante o mestrado, obrigada pela paciência e parceria meu amor. Aos meus pais, Etelvino e Selma, e minha irmã Patrícia que me apoiaram e incentivaram a nunca desistir dos meus projetos de vida.

Agradeço o meu orientador e professor Dr. Foued pela dedicação, ajuda, por compartilhar seu conhecimento e por ter me dado a oportunidade de participar do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular (LABIBI), onde pude conhecer pessoas maravilhosas. Agradeço minha co-orientadora e professora Dra. Françoise pela confiança e por todo auxílio durante o desenvolvimento do trabalho.

Agradeço aos componentes da banca examinadora pela disponibilidade e aceite do convite para avaliar essa dissertação, tenho certeza que enriquecerão este trabalho.

Agradeço a todos os pesquisadores do laboratório por todo aprendizado, por compartilharem experiências e contribuírem para meu crescimento profissional, além de proporcionarem um ambiente leve, saudável e alegre, muito favorável para minha formação. Em especial a minha amiga Natália, minha parceira de bancada que me ajudou diretamente durante todo o projeto e que esteve ao meu lado nos dias incertos e de descobertas, deixo aqui o meu agradecimento ao Allisson por todo ensinamento, paciência e dedicação a este projeto. Agradeço ao André, Rodrigo e Einy pela ajuda com os camundongos e experimentos. A Adrielle e a Jade por estarem dispostas a ajudar. Ao Douglas, Renata, Danielle, Pedro, Poliana e Joed pela companhia e apoio. Aos meus amigos da turma de mestrado Heitor, que desde o início não mediu esforços para me ajudar quando precisei, a Camila e a Júlia pelo companheirismo e auxílio com as disciplinas e laboratório, em especial a minha amiga Mariane, que se tornou uma amiga para a vida, obrigada pela parceria, risadas, por todo apoio, incentivo e momentos de descontração. Guardo vocês no meu coração.

Agradeço, a todos colegas, professores e técnicos do Instituto de Genética e Bioquímica, em especial a secretária Janaína, por sua inestimável ajuda durante todo o mestrado.

Agradeço a todas as pessoas, de maneira geral, que acreditaram na minha capacidade, que me ajudaram, torceram por essa conquista e de certa forma contribuíram para minha formação como mestra em Genética e Bioquímica na Universidade Federal de Uberlândia.

*“A verdadeira viagem da descoberta não
consiste em procurar novas paisagens,
mas em possuir novos olhos”
(Marcel Proust)*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Dislipidemia.....	1
1.2. Classificação das dislipidemias.....	2
1.3. Metabolismo de lipídeos.....	3
1.4. Agentes dislipidêmicos.....	7
1.5. Dislipidemia e estresse oxidativo.....	9
1.6. Plantas medicinais e compostos bioativos.....	11
1.6.1. <i>Annona crassiflora</i> Mart.....	13
2. OBJETIVOS.....	16
2.1. Objetivo geral.....	16
2.2. Objetivos específicos.....	16
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	17
3.1. Preparo do extrato e frações de <i>Annona crassiflora</i> Mart.....	17
3.1.1. Preparo do extrato bruto etanólico (EtOH).....	17
3.1.2. Preparo da fração acetato de etila (AcEt).....	17
3.1.3. Preparo da fração purificada com proantocianidina B2.....	18
3.2. Análise por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrômetro de massas.....	18
3.3. Animais e delineamento experimental.....	19
3.4. Amostras de sangue e tecido.....	21
3.5. Avaliação do perfil lipídico.....	22
3.5.1. Dosagem de triglicerídeos plasmáticos.....	22
3.5.2. Dosagem de colesterol total plasmático.....	22
3.5.3. Dosagem de HDL colesterol plasmático.....	23
3.5.4. Dosagem do colesterol não-HDL plasmático.....	23
3.6. Quantificação de lipídeos hepáticos e fecais.....	23
3.7. Determinação de proteínas totais.....	24
3.8. Análises de estresse oxidativo.....	24
3.8.1. Superóxido dismutase (SOD).....	24
3.8.2. Catalase (CAT).....	25

3.8.3. <i>Glutathiona reduzida (GSH)</i>	25
3.8.4. <i>Capacidade antioxidante total (FRAP)</i>	26
3.8.5. <i>Sulfidrilas totais</i>	26
3.8.6. <i>Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)</i>	27
3.8.7. <i>Proteína carbonilada</i>	27
3.9. <i>Análise estatística</i>	28
4. RESULTADOS.....	29
4.1. <i>Massa final das extrações na partição líquido-líquido</i>	29
4.2. <i>Avaliação dos parâmetros lipídicos</i>	29
4.2.1. <i>Lipídeos plasmáticos</i>	29
4.2.1.1. <i>Colesterol total, HDL-C e não HDL-C</i>	29
4.2.1.2. <i>Triglicerídeos</i>	30
4.2.2. <i>Lipídeos hepáticos</i>	34
4.2.3. <i>Lipídeos fecais</i>	36
4.3. <i>Biomarcadores do estresse oxidativo</i>	38
4.3.1. <i>Avaliação do potencial antioxidante</i>	38
4.3.1.1. <i>Superóxido dismutase e catalase</i>	38
4.3.1.2. <i>FRAP e sulfidrilas totais</i>	39
4.3.1.3. <i>Glutathiona reduzida (GSH)</i>	40
4.3.2. <i>Indicadores de dano oxidativo</i>	40
4.3.2.1 <i>Peroxidação lipídica (TBARS)</i>	40
4.3.2.2 <i>Carbonilação de proteínas</i>	42
5. DISCUSSÃO.....	43
6. CONCLUSÃO.....	51
7. REFERÊNCIAS.....	52
8. ANEXOS.....	66

LISTA DE ABREVIATURAS

AcEt	Acetato de etila
Apo	Apolipoproteínas
CAT	Catalase
CLAE-ESI -	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a
EM/EM	espectrometria de massas por ionização <i>electrospray</i>
CT	Colesterol total
EtOH	Extrato bruto etanólico
ERN's	Espécies reativas de nitrogênio
ERO's	Espécies reativas de oxigênio
ERON's	Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio
FRAP	Poder antioxidante redutor férrico
GSH	Glutathiona reduzida
GPx	Glutathiona peroxidase
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HMG-CoA	β Hidroxi- β metilglutaril Coenzima A
IDL	Lipoproteína de densidade intermediária
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
MDA	Malondialdeído
MPA	Ácido metafosfórico
NAFLD	Doença hepática gordurosa não-alcoólica
O ₂	Oxigênio
•OH	Radical hidroxil
O ₂ ^{•-}	Ânion superóxido

ONOO ⁻	Peroxinitrito
PCND	Proantocianidina B2
SOD	Superóxido dismutase
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico
TG	Triglicerídeos
TNB	5-tio-2-nitrobenzóico
TPTZ	2,4,6-tripiridil-s-triazina
VLDL	Lipoproteína de muito baixa densidade
QM	Quilomícrons

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Resumo dos estágios da biossíntese de colesterol.....	4
Figura 2: Lipoproteínas presentes no plasma sanguíneo e sua participação na patogênese da aterosclerose.....	6
Figura 3: Mecanismo de ação do Triton WR-1339 (tiloxapol).....	8
Figura 4: Classificação dos compostos fenólicos.....	14
Figura 5: Delineamento experimental dos camundongos C57BL/6 tratados e não tratados com os compostos (EtOH, AcEt e PCND).....	20
Figura 6: Design experimental dos camundongos C57BL/6	21
Figura 7: Atividade da superóxido dismutase hepática (A) e atividade da catalase hepática (B) dos camundongos do grupo Naive (água destilada); Veículo (água destilada e administração intraperitoneal de 400mg/Kg Triton WR-1339); e grupos que receberam pré-tratamento por 12 dias e uma dose após administração intraperitoneal de 400mg/Kg Triton WR-1339 de Extrato Bruto (EtOH), Acetato de Etila (AcEt) e Proantocianidinas (PCND) em concentrações de 10, 30 e 100mg/Kg. Teste: ANOVA one-way test de Dunnett. Valores expressos como média \pm erro padrão * $p < 0,05$ versus grupo veículo.....	38
Figura 8: Análise da capacidade antioxidante total (A) e do conteúdo de sulfidrilas (B) nos fígados dos camundongos do grupo Naive (água destilada); Veículo (água destilada e administração intraperitoneal de 400mg/Kg Triton WR-1339); e grupos que receberam pré-tratamento por 12 dias e uma dose após administração intraperitoneal de 400mg/Kg Triton WR-1339 de Extrato Bruto (EtOH), Acetato de Etila (AcEt) e Proantocianidinas (PCND) em concentrações de 10, 30 e 100mg/Kg. Teste: ANOVA one-way test de Dunnett. Valores expressos como média \pm erro padrão * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$ versus grupo veículo.....	39
Figura 9: Atividade do conteúdo de Glutathiona reduzida (GSH) hepático dos camundongos do grupo Naive (água destilada); Veículo (água destilada e	

administração intraperitoneal de 400mg/Kg Triton WR-1339); e grupos que receberam pré-tratamento por 12 dias e uma dose após administração intraperitoneal de 400mg/Kg Triton WR-1339 de Extrato Bruto (EtOH), Acetato de Etila (AcEt) e Proantocianidinas (PCND) em concentrações de 10, 30 e 100mg/Kg. Teste: ANOVA one-way test de Dunnett. Valores expressos como média \pm erro padrão * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ *versus* grupo veículo.....40

Figura 10: Peroxidação lipídica hepática dos camundongos do grupo Naive (água destilada); Veículo (água destilada e administração intraperitoneal de 400mg/kg Triton WR-1339); e grupos que receberam pré-tratamento por 12 dias e uma dose após administração intraperitoneal de 400mg/Kg Triton WR-1339 de Extrato Bruto (EtOH), Acetato de Etila (AcEt) e Proantocianidinas (PCND) em concentrações de 10, 30 e 100mg/Kg. Teste: ANOVA one-way test de Dunnett. Valores expressos como média \pm erro padrão * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ *versus* grupo veículo.....41

Figura 11: Conteúdo de proteínas carboniladas dos fígados dos camundongos do grupo Naive (água destilada); Veículo (água destilada e administração intraperitoneal de 400mg/Kg Triton WR-1339); e grupos que receberam pré-tratamento por 12 dias e uma dose após administração intraperitoneal de 400mg/Kg Triton WR-1339 de Extrato Bruto (EtOH), Acetato de Etila (AcEt) e Proantocianidinas (PCND) em concentrações de 10, 30 e 100mg/Kg. Teste: ANOVA one-way test de Dunnett. Valores expressos como média \pm erro padrão * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ *versus* grupo veículo.....42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Massa final das extrações da partição líquido-líquido do extrato etanólico da casca do araticum (<i>Annona crassiflora</i>).....	29
Tabela 2: Variação do colesterol total plasmático, em mg/dL, durante e após o experimento em grupos de camundongos submetidos ou não a administração intraperitoneal por Triton WR-1339.....	32
Tabela 3: Variação dos níveis de colesterol total plasmático e suas frações HDL-C e Não HDL-C coletadas na eutanásia, em mg/dL, em grupos de camundongos submetidos ou não a administração intraperitoneal por Triton WR-1339.....	32
Tabela 4: Variação dos níveis de triglicerídeos plasmático, em mg/dL, durante e após o experimento no grupo naïve e em grupos de camundongos submetidos a administração intraperitoneal por Triton WR-1339.....	33
Tabela 5: Níveis de lipídeos totais, triglicerídeos e colesterol total hepático pós administração intraperitoneal por Triton WR-1339.....	35
Tabela 6: Níveis de lipídeos totais, colesterol total e triglicerídeos fecais, em mg/g, sendo estes coletados antes e pós administração intraperitoneal por Triton WR-1339.....	37

RESUMO

A dislipidemia é fator de risco para a patogênese de várias doenças, como obesidade, hipertensão, aterosclerose e doenças cardiovasculares. Além de interferir nas concentrações séricas do colesterol e dos triglicerídeos, a hiperlipidemia está envolvida no aumento do estresse oxidativo e diminuição das defesas antioxidantes. Nesse contexto, as plantas medicinais têm apresentado propriedades antioxidantes que poderiam auxiliar na reversão dos efeitos deletérios provocados pelo excesso de radicais livres. A *Annona crassiflora* Mart, popularmente conhecida como araticum, é uma planta nativa do cerrado rica em compostos bioativos. Embora seja pouco explorada, os estudos tem evidenciado que a *A. crassiflora* apresenta polifenóis com características relevantes na modulação do perfil lipídico, ação antiaterosclerótica, anti-inflamatória e anti-hepatotóxica. Nesse sentido, o presente estudo teve como objetivo investigar os efeitos hipolipemiantes e antioxidantes do extrato etanólico e da fração polifenólica de acetato de etila da casca do fruto da *Annona crassiflora* Mart em camundongos machos C57BL/6 hiperlipidêmicos induzidos por Triton WR-1339 (400 mg/kg). Os animais foram pré-tratados durante 12 dias com três diferentes doses (10, 30 e 100 mg/kg) de extrato etanólico (EtOH) da *A. crassiflora* Mart, bem como da fração dessa planta em acetato de etila (AcEt) e da fração purificada de proantocianidinas (PCND). A injeção intraperitoneal de tiloxapol para indução da dislipidemia foi realizada no 13º dia, retomando o tratamento com uma dose dos compostos bioativos após 26 horas da administração intraperitoneal de Triton WR-1339. Amostras de sangue e fezes foram coletadas periodicamente para avaliar o perfil lipídico dos animais. O fígado foi o órgão de escolha para analisar parâmetros de estresse oxidativo e metabólico nos grupos. Os resultados mostraram que os compostos bioativos do araticum não foram capazes de normalizar os níveis de TG, CT e não HDL-C plasmático, mas aumentou consideravelmente os níveis de HDL-C, em comparação aos grupos que não receberam tratamento. No fígado e nas fezes houve redução nos níveis de TG e CT com o EtOH. O extrato e as frações reduziram TBARS e as frações AcEt e PCND reduziram o conteúdo de proteínas carboniladas no fígado. Embora a capacidade antioxidante (FRAP) não tenha sido alterada entre os grupos, as

sulfidrilas totais no fígado foram maiores com 30 mg/kg da fração AcEt e, ainda, as enzimas antioxidantes SOD e CAT foram aumentadas nas menores doses (10 e 30 mg/kg) do EtOH em relação ao naïve. Os resultados sugerem que os polifenóis extraídos da *A. crassiflora* parecem ter alguma propriedade antioxidante e hepatoprotetora importante mesmo em um modelo experimental agudo e que as PCND isoladas não apresentam o mesmo potencial nessas condições.

Palavras-chave: Dislipidemia, agente dislipidêmico, estresse oxidativo, antioxidante, araticum, compostos bioativos.

ABSTRACT

Dyslipidemia is a risk factor for the pathogenesis of several diseases, such as obesity, hypertension, atherosclerosis and cardiovascular diseases. Furthermore, to interfering with serum cholesterol and triglyceride concentrations, hyperlipidemia is involved in increasing oxidative stress and decreasing antioxidant defenses. In this context, medicinal plants have shown antioxidant properties that could support in reversing the deleterious effects caused by the excess of free radicals. *Annona crassiflora* Mart., popularly known as araticum, is a plant native to the cerrado rich in bioactive compounds. Although underexplored, studies have shown that *A. crassiflora* has polyphenols with relevant characteristics in the modulation of the lipid profile, anti-atherosclerotic, anti-inflammatory and anti-hepatotoxic action. The current study was conducted to evaluate the hypolipidemic and antioxidant effects of the ethanol extract and the polyphenolic fraction in ethyl acetate of the *Annona crassiflora* Mart. fruit peel in C57BL/6 male Triton WR-1339 (400 mg/kg) induced hyperlipidemic mice. The animals were pre-treated for 12 days with three different doses (10, 30 and 100 mg / kg) of ethanolic extract (EtOH) from *A. crassiflora* Mart., as well as the fraction of this plant in ethyl acetate (AcEt) and the purified fraction of proanthocyanidins (PCND). The intraperitoneal injection of tiloxapol to induce dyslipidemia was performed on the 13th day, resuming treatment with the bioactive compounds after 26 hours. Blood and feces samples were collected periodically to assay the animals' lipid profile. The liver was the chosen organ for analyzing parameters of oxidative and metabolic stress in the groups. The results showed that the bioactive compounds from the araticum were not able to normalize the levels of TG, CT and non-plasma HDL-C, but increased HDL-C levels considerably, compared to the control group. In the liver and feces, there was a reduction in TG and CT levels with EtOH. The extract and the fractions reduced lipid peroxidation (TBARS) and the AcEt and PCND fractions reduced the content of carbonylated proteins in the liver. Although the antioxidant capacity (FRAP) was not changed between the groups, the total sulfhydryls in the liver were higher with 30 mg/kg of the AcEt fraction and, still the antioxidant enzymes SOD and CAT were increased in the lowest doses (10 and 30 mg/kg) of EtOH in relation to the naive. These findings

suggest that *A. crassiflora* polyphenols extracted in ethanolic solvent and ethyl acetate, seem to have some important antioxidant and hepatoprotective properties even in an acute experimental model and that isolated PCNDs do not have the same potential under these conditions.

Keyword: Dyslipidemia, Triton WR-1339, oxidative stress, antioxidants, *Annona crassiflora* Mart.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Dislipidemia

As dislipidemias representam alterações metabólicas lipídicas decorrentes de distúrbios em qualquer fase do metabolismo de lipídeos, ocasionando níveis anormais dessas biomoléculas no sangue (GUPTA *et al.*, 2013). Sendo assim, a dislipidemia é definida pela presença de, no mínimo, uma alteração do perfil lipídico: elevada concentração sérica de lipoproteína de baixa densidade (LDL), triglicerídeos (TG) e/ou reduzida de lipoproteína de alta densidade (HDL) (CARVALHO *et al.*, 2007).

Esse desbalanço no perfil lipídico tem se tornado um grave problema de saúde pública, já que é fator de risco para o desenvolvimento de doenças crônicas não transmissíveis, como doenças coronarianas, cerebrovasculares, diabetes tipo 2 e esteatose hepática, popularmente conhecida como doença do fígado gorduroso (KHLIFI *et al.*, 2019; OH *et al.*, 2006; SHI *et al.*, 2014).

A preocupação da comunidade científica em compreender os parâmetros bioquímicos na hiperlipidemia é decorrente da correlação positiva entre a alteração do perfil lipídico e a aterosclerose (CHEN *et al.*, 2019). A aterosclerose é uma doença inflamatória crônica capaz de provocar o espessamento da parede média e íntima das artérias em decorrência do acúmulo de gordura ou material fibroso no vaso (GARCEZ *et al.*, 2014). Com o avanço da doença, as artérias vão perdendo elasticidade ao passo que formam placas, ou melhor, ateromas capazes de impedir o fluxo sanguíneo e levar à isquemia do tecido (LIBBY *et al.*, 2019).

Estudos apontam que uma das causas da dislipidemia tem sido o ganho de peso, mais especificamente o excesso de gordura corporal, em virtude de um estilo de vida cada vez mais sedentário e pautado em dietas ocidentais (ricas em gorduras, açúcares, aditivos industriais e pobres em fibras e micronutrientes). Além de aumentar a prevalência de dislipidemia, o sobrepeso é fator de risco para diversos agravos à saúde dos indivíduos (FISBERG *et al.*, 2004; GARCEZ *et al.*, 2014).

Em suma, sobrepeso, obesidade e dislipidemia frequentemente estão interligados, e são fatores de risco decisivos para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares (DCV), principais causas de morbimortalidade no Brasil e no mundo (SHEPHERD, 2009; XAVIER *et al.*, 2013).

Os dados de óbitos por DCV são alarmantes. Estima-se que em 2015, mais de 17 milhões de pessoas morreram por complicações cardiovasculares, representando 31% de todas as mortes globais. Destes óbitos, acredita-se que 85% ocorreram devido a ataques cardíacos e acidentes vasculares cerebrais (AVC's), sendo que mais de três quartos dessas mortes tendem a ser mais prevalentes em países de baixa e média renda (BRASIL, 2011; WHO, 2017).

Nos Estados Unidos, a doença cardíaca ainda é a primeira causa de morte e o AVC é o quinto (BENJAMIN *et al.*, 2017). No Brasil observa-se a mesma tendência, as duas principais causas de morte no país, desde 2005, foram as doenças cardíacas isquêmicas e o AVC. Essas doenças têm permanecido como as principais causas de morte global, em ambos os sexos (BRASIL, 2019).

1.2. Classificação das dislipidemias

Segundo a Sociedade Brasileira de Cardiologia (2013), as dislipidemias podem ser classificadas clinicamente considerando os valores de colesterol total (CT), das frações de lipoproteínas (LDL-C e HDL-C) e de triglicerídeos (TG) em quatro grupos: hipercolesterolemia isolada, hipertrigliceridemia isolada, hiperlipidemia mista e HDL-C baixo.

A hipercolesterolemia isolada consiste na elevação isolada do LDL-C (maior ou igual a 160 mg/dL). A hipertrigliceridemia isolada se refere à elevação isolada de TG (maior ou igual a 150 mg/dL) que reflete o aumento do número e/ou do volume de partículas ricas em TG, como VLDL, IDL e quilomícrons. A hiperlipidemia mista em valores aumentados de LDL-C (≥ 160 mg/dL) e TG (≥ 150 mg/dL). E o HDL-C baixo, que contempla a redução isolada do HDL-C (< 40 mg/dL) ou em associação ao aumento de LDL-C ou de TG (XAVIER *et al.*, 2013).

No Brasil, os casos mais comuns de hiperlipidemia têm sido correlacionados com situações clínicas de hipercolesterolemia, isto é, aumento na

concentração sérica de LDL-C com subsequente elevação de colesterol total e HDL-C baixo. Outros estudos apontam que a dislipidemia associada ao acúmulo de gordura corporal é caracterizada por elevação de triglicerídeos (hipertrigliceridemia) e diminuição do HDL-C (GARCEZ *et al.*, 2014; XAVIER *et al.*, 2013).

1.3. Metabolismo de lipídeos

Os lipídeos são biomoléculas de estrutura diversificada, insolúveis em água e com inúmeras funções biológicas. Atuam como sinalizadores intracelulares, isolantes térmicos, armazenadores de energia e apresentam papel fundamental na construção de moléculas mais complexas (OH *et al.*, 2006).

Do ponto de vista clínico, o colesterol e os triglicerídeos são os lipídeos mais relevantes. O colesterol é um constituinte essencial da maioria das membranas biológicas, além de atuar como precursor para a síntese de ácidos e sais biliares, hormônios esteroidais e vitamina D. Ele pode ser sintetizado na maioria das células dos tecidos (XU *et al.*, 2020). Os triglicerídeos são formados a partir de três ácidos graxos ligados a uma molécula de glicerol e constituem uma das formas de armazenamento energético mais importante no organismo. São encontrados nos tecidos adiposo, muscular e hepático (POZZAN *et al.*, 2004).

A maioria das células de mamíferos obtém colesterol por meio de síntese endógena ou captação exógena. A via biossintética converte acetil-CoA, produto derivado do catabolismo celular, em colesterol por meio de quase 30 reações enzimáticas, incluindo a via do mevalonato, síntese de esqualeno e sua subsequente conversão no núcleo esteróide do colesterol (GÖBEL *et al.*, 2020).

O primeiro estágio da biossíntese do colesterol envolve a condensação de moléculas de acetato em β -hidroxi- β -metilglutaril-CoA (HMG-CoA), a qual é convertida em mevalonato por uma enzima regulatória chave, a HMG-CoA redutase. Os estágios posteriores consistem na conversão de mevalonato em dois isoprenos ativados, a condensação de seis unidades de isopreno para formar esqualeno e, por fim, a conversão do esqualeno no núcleo esteróide de quatro anéis (**Figura 1**) (NELSON & COX, 2014; XU *et al.*, 2020).

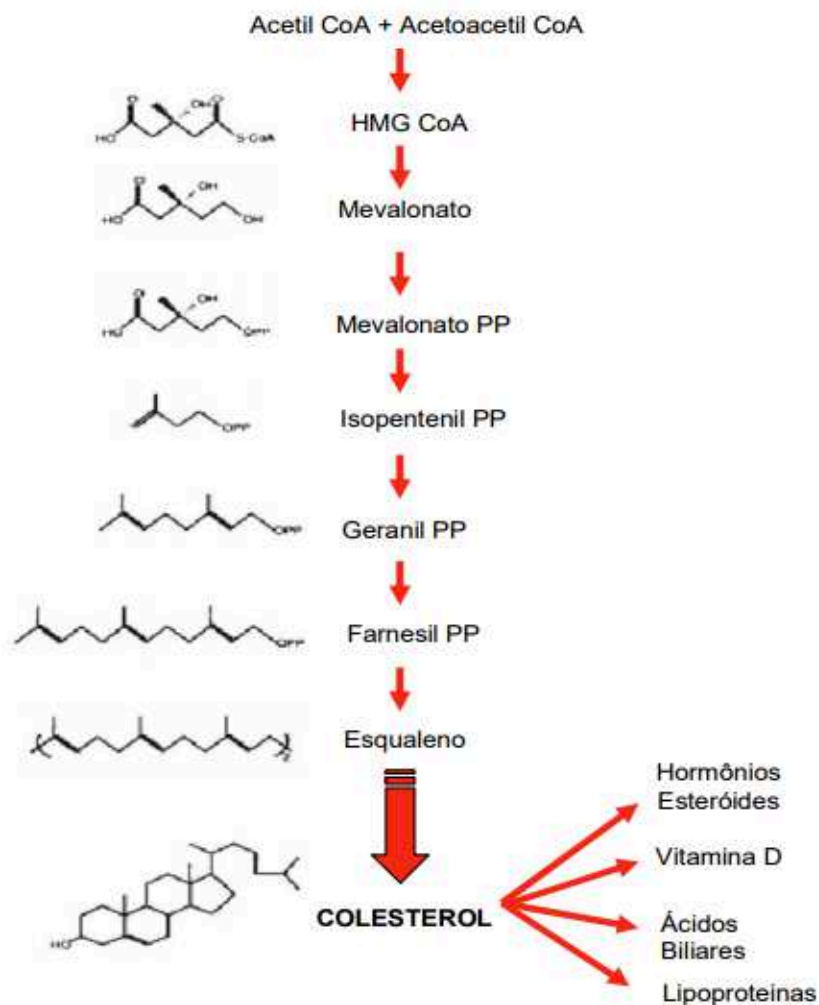


Figura 1: Resumo dos estágios da biossíntese de colesterol. Adaptado (GOLDSTEIN; BROWN, 1990).

A captação exógena do colesterol é realizada no intestino delgado por meio de uma proteína presente na membrana do enterócito abreviada como NPC1-L1 (do inglês Nieman Pick C1-like) (ALTMANN *et al.*, 2004). A homeostase do metabolismo do colesterol vai depender de alguns fatores, como a regulação endógena de sua biossíntese, o seu transporte, a captação e esterificação - responsável pela formação dos chamados ésteres de colesterol (XU *et al.*, 2020).

Outros lipídeos são absorvidos no intestino, como por exemplos os TG provenientes da dieta. Estes são primeiramente emulsificados pelos ácidos e sais biliares formando micelas no intestino delgado e posteriormente, clivados pela ação da lipase pancreática, liberando ácidos graxos livres, monoacilgliceróis e diacilgliceróis. Em seguida, as partículas lipídicas são unidas a apolipoproteínas,

originando uma classe de lipoproteínas denominada quilomícrons (QM). Na corrente sanguínea, os QM sofrem hidrólise pela lipase lipoproteica (LPL), enzima localizada na superfície endotelial de capilares do tecido adiposo e músculo, liberando novamente os ácidos graxos, glicerol e colesterol (SU; KONG; PENG, 2019).

Além dos quilomícrons, são conhecidas outras classes de lipoproteínas (**Figura 2**). Cada uma tem o seu local de síntese, função, composição lipídica e apolipoproteína (apo) específica. As lipoproteínas maiores, ricas em TG e menos densas são representadas pelos quilomícrons (de origem intestinal) e pelas lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL) de origem hepática. Outra classe são as ricas em colesterol, incluindo as lipoproteínas de baixa densidade (LDL-C) e as de densidade alta (HDL-C). Existe ainda uma classe de lipoproteínas de densidade intermediária (IDL) e a lipoproteína Lp(a), que resulta da ligação de uma partícula de LDL à apo (a). A função fisiológica da Lp(a) não é conhecida, mas acredita-se que ela esteja associada a formação e progressão da placa aterosclerótica (BURGESS *et al.*, 2018; LIBBY *et al.*, 2019).

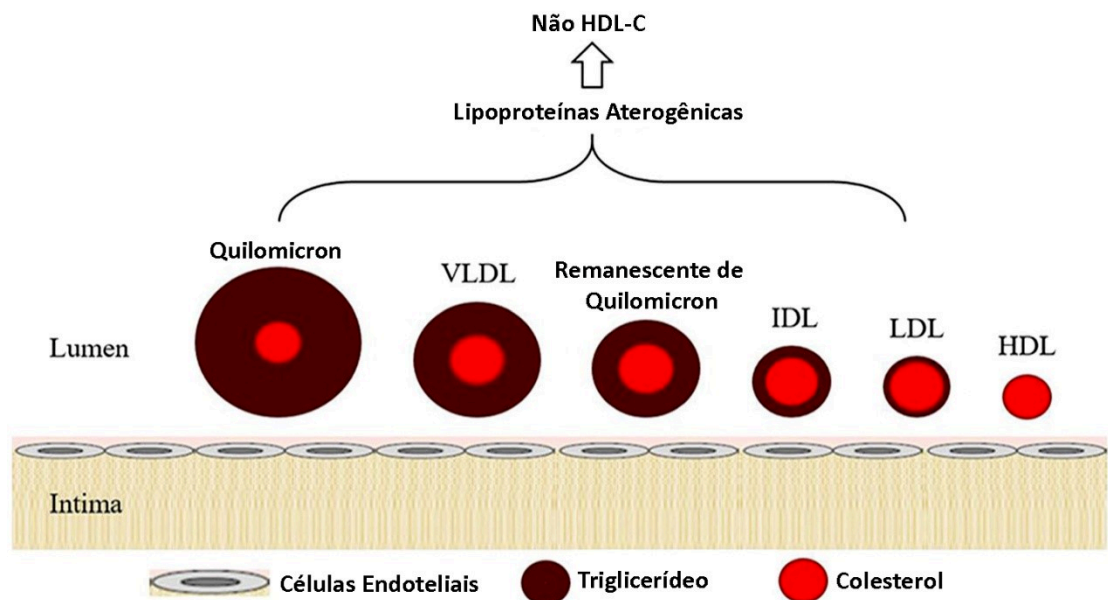


Figura 2: Lipoproteínas presentes no plasma sanguíneo e sua participação na patogênese da aterosclerose. Adaptado (SU; KONG; PENG, 2019)

Em suma, o transporte de lipídeos de origem hepática ocorre por meio das VLDL, IDL e LDL. Na circulação, os TG das VLDL também são hidrolisados pela ação da LPL, sendo os ácidos graxos liberados e redistribuídos aos tecidos para armazenamento ou combustível. Os remanescentes da VLDL originam às IDL, que são removidas rapidamente do plasma. O processo de catabolismo continua, envolvendo a ação da lipase hepática e resultando na formação das LDL (XAVIER *et al.*, 2013).

Quando a soma do colesterol endógeno e dietético ultrapassa a quantidade necessária, esse acúmulo poderá desencadear a formação das placas ateroscleróticas. Apesar da LDL-C ser ainda a lipoproteína mais estudada e relevante na patogênese dessa doença, todas as demais lipoproteínas são potencialmente aterogênicas (quilomícrons, VLDL, IDL), com exceção do HDL-colesterol (SU; KONG; PENG, 2019), conforme ilustrado na **Figura 2**.

É notável que o fígado é o órgão chave para o metabolismo lipídico. Além de ser importante na manutenção dos níveis plasmáticos das lipoproteínas, ele participa da síntese de proteínas e enzimas envolvidas na homeostase lipídica, tais como: receptor de LDL (RLDL), HMG-CoA redutase, lecitina-colesterol aciltransferase (LCAT) e acil-CoA-colesterol aciltransferase (ACAT). A LCAT é uma enzima que catalisa a esterificação do colesterol livre nas lipoproteínas plasmáticas (QM, VLDL e LDL) e desempenha um papel crítico na síntese do HDL, auxiliando na remoção do excesso de colesterol dos tecidos periféricos com subsequente condução ao fígado para posterior metabolização. A ACAT também atua na esterificação do colesterol, mas no fígado (KUNNEN; VAN ECK, 2012).

Como o excesso de colesterol não pode ser catabolizado para o uso como combustível é importante que a sua síntese seja controlada com o propósito de complementar a quantidade ingerida na dieta. Por isso, a biossíntese do colesterol é regulada em resposta aos seus níveis intracelulares, isto é, modulando a expressão de proteínas-chave que controlam a homeostase do colesterol (SU; KONG; PENG, 2019).

A proteína de ligação reguladora de esterol (SREBP, principalmente tipo 2) é o elemento mais importante neste processo. A SREBP2 está geralmente localizada no retículo endoplasmático na forma de um complexo com a proteína ativadora da clivagem da SREBP2 (SCAP) quando os níveis de colesterol celular

são elevados. No entanto, quando os níveis de esteróis dentro da célula declinam, o SCAP facilita a transferência de SREBP2 do retículo endoplasmático para o aparelho de Golgi. Nesta fase, o complexo é clivado, resultando na liberação de uma parte da proteína da membrana. Isso permite que SREBP2 entre no núcleo e ative a transcrição de vários genes que regulam a síntese do colesterol, incluindo da HMG-CoA redutase e do receptor de LDL (ALPHONSE; JONES, 2016).

Defeitos genéticos no metabolismo do colesterol tem sido alvo de pesquisas visando compreender e até tratar casos particulares de hiperlipidemia. A hipercolesterolemia familiar (HF) elucidada por Michael Brown e Joseph Goldstein em 1985 é uma doença genética caracterizada por mutações no receptor de LDL, a qual impede a captação dessa lipoproteína pelo fígado e tecidos periféricos. Como resultado, os indivíduos apresentam níveis elevados de LDL-C na corrente sanguínea, o que aumenta a probabilidade de depósitos de colesterol nas artérias e sua obstrução pela formação das placas ateroscleróticas (BRASILEIRA, 2012).

O fenótipo clínico de HF é geralmente decorrente de defeitos no gene LDLR, que codifica o receptor de LDL. Mutação no gene que codifica a apo B100 (apo presente na LDL) pode também causar hipercolesterolemia por meio da deficiência no acoplamento da LDL ao receptor celular (XAVIER *et al.*, 2013).

1.4. Agentes dislipidêmicos

A maioria dos modelos animais experimentais usados para induzir obesidade, dislipidemia e doença hepática gordurosa não alcoólica (NAFLD) requerem a ingestão crônica de dietas ricas em gordura e carboidratos (AYDIN *et al.*, 2014; DA SILVA-SANTI *et al.*, 2016; TAN *et al.*, 2016) No entanto, existem modelos agressivos para induzir dislipidemia aguda ou crônica em ratos e camundongos não obesos que mimetizam o observado em humanos não obesos (FERNÁNDEZ-MARTÍNEZ *et al.*, 2019).

Pensando nisso, alguns agentes dislipidêmicos têm sido utilizados em roedores, com o intuito de compreender melhor sobre o metabolismo de lipídeos e sobre o efeito da dislipidemia na fisiologia do organismo (DE SOUSA *et al.*, 2017).

O triton WR-1339 (tiloxapol) é um detergente não iônico amplamente utilizado para induzir hiperlipidemia aguda ou crônica em modelos animais, a fim de rastrear drogas naturais ou químicas e avaliar distúrbios metabólicos relacionados ao metabolismo do colesterol e dos triglicerídeos (ABDOU; WAHBY, 2016; KUMAR, GAJENDRA *et al.*, 2013). O mecanismo de ação do tiloxapol está relacionado principalmente com a inibição da enzima LPL, resultando no acúmulo de TG e VLDL, ao passo que reduz a liberação de HDL-C no plasma. Vale ressaltar que a principal função da LPL é favorecer a hidrólise dos triglicerídeos presentes nos QM e VLDL. Sua inibição impedirá o retorno das lipoproteínas ao fígado para serem metabolizadas, o que explica o aumento de VLDL com conseqüente elevação dos níveis de TG e CT na corrente sanguínea. O efeito expressivo sobre o metabolismo do colesterol tem sido relacionado também com a capacidade do tiloxapol em estimular a atividade da HMG-CoA redutase, uma enzima chave na síntese do colesterol (ZARZECKI *et al.*, 2014), conforme ilustrado na **Figura 3**.

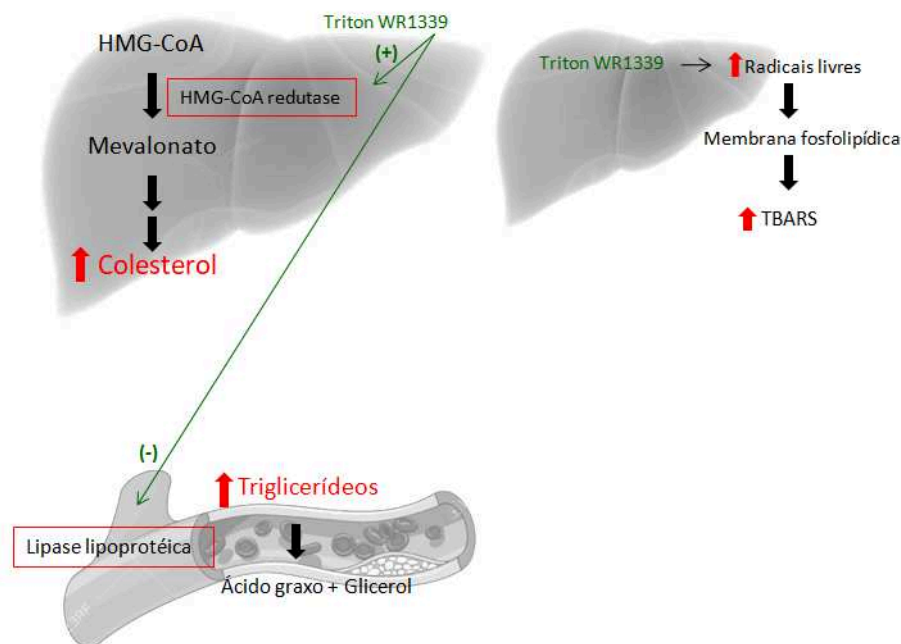


Figura 3: Mecanismo de ação do Triton WR-1339 (tiloxapol). Adaptado (ZARZECKI *et al.*, 2014).

A hiperlipidemia provocada pela administração intraperitoneal de tiloxapol promove o aumento de radicais livres no organismo e, por consequência, aumento do quadro de estresse oxidativo. Esse processo está na base de muitas doenças, incluindo a hiperlipidemia, hipercolesterolemia, diabetes, câncer, entre outras (POPA-WAGNER *et al.*, 2013).

O estresse oxidativo altera a relação entre a produção e a metabolização de ácidos graxos na mitocôndria, havendo um desvio do metabolismo da β -oxidação para a peroxidação lipídica, gerando espécies reativas de oxigênio (ERO's) (BEGRICHE *et al.*, 2013).

O aumento da produção de ERO's causa peroxidação lipídica, seguida de resposta inflamatória, ativação de células estreladas, e modificação de enzimas antioxidantes, desencadeando alterações hepáticas (KORUK *et al.*, 2004; MADAN *et al.*, 2006; OLIVEIRA *et al.*, 2006; PERLEMUTER *et al.*, 2005). Interferindo nas funções biológicas, por provocar alterações em organelas celulares, incluindo os peroxissomas (DE DUVE, 1969).

Quanto aos efeitos do tiloxapol no fígado, estudos anteriores sugerem aumento significativo nos marcadores hepáticos de dano oxidativo, como a peroxidação lipídica, acompanhada de uma deterioração da capacidade antioxidante enzimática e não enzimática em roedores, após administração intraperitoneal do tiloxapol (OH *et al.*, 2006; ROCHA *et al.*, 2009).

1.5. Dislipidemia e Estresse oxidativo

Há um equilíbrio dinâmico entre as espécies pró-oxidantes e as espécies antioxidantes nos sistemas biológicos. Quando a produção ou eliminação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ERON's) é excessiva ou quando os sistemas de reparo ou degradação de moléculas danificadas são prejudicados, ocorre o que chamamos estresse oxidativo (DAVIES *et al.*, 2017).

A hiperlipidemia além de promover alterações séricas de colesterol e triglicerídeos, interfere negativamente nesse equilíbrio dinâmico. Isso ocorre porque o estado hiperlipidêmico provoca aumento na produção de ERO's, afetando os sistemas de defesa antioxidantes endógenos, a exemplo das enzimas

glutathione peroxidase (GPx), superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT). Tal desequilíbrio no balanço redox pode ocasionar danos oxidativos em alguns tecidos como, por exemplo, fígado, cérebro e tecido adiposo (ABDOU; WAHBY, 2016; DUARTE *et al.*, 2010).

O fígado desempenha um papel central na manutenção da homeostase lipídica sistêmica. Por isso, ele tem sido o órgão mais susceptível a danos oxidativos provocados pelo excesso de ERON's na hiperlipidemia. Os estudos ainda revelam que a hiperlipidemia está intrinsecamente relacionada à redução do sistema de defesa antioxidante hepático (KUMAR *et al.*, 2006; OH *et al.*, 2006).

Os organismos aeróbios são totalmente dependentes do oxigênio, pois esse gás está diretamente relacionado ao metabolismo celular. A própria respiração celular das mitocôndrias, as NADPH oxidoredutases e os citocromos P450 são produtores endógenos de espécies reativas. Para a obtenção de energia pela fosforilação oxidativa, o oxigênio funciona como aceptor de elétrons ricos em energia, sendo estes provenientes do catabolismo dos nutrientes. Nesse caminho, também há formação de espécies intermediárias parcialmente reduzidas de oxigênio as quais são altamente reativas (MOLDOGAZIEVA *et al.*, 2018). Essas espécies são comumente conhecidas como radicais livres.

As espécies reativas de oxigênio (ERO's) incluem formas parcialmente reduzidas de oxigênio, como é o caso do radical hidroxil ($\bullet\text{OH}$), o ânion superóxido, ($\text{O}_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), entre outros. O acúmulo desses radicais livres pode ser acompanhado pela formação de espécies reativas de nitrogênio (ERN's), como é o caso do peroxinitrito (ONOO^-), um ânion altamente reativo formado pela reação entre o superóxido e o óxido nítrico (LUBOS *et al.*, 2008).

A geração excessiva de ERON's pode induzir uma série de alterações de constituintes celulares, incluindo a inativação de enzimas, danos aos ácidos nucléicos, proteínas e peroxidação de lipídios de membrana, podendo estar envolvida na patogênese de várias doenças, como doenças neurodegenerativas, cardiovasculares, hepáticas e câncer (DUARTE *et al.*, 2010; FURUKAWA *et al.*, 2004; KHLIFI *et al.*, 2019).

A correlação entre dislipidemias, como a hipercolesterolemia e o aumento da produção de radicais livres de oxigênio já tem sido estudada há anos

(CATAPANO *et al.*, 2000). Alterações tanto nos sistemas de defesa antioxidante enzimático (SOD, CAT e GPx) como não enzimático (ácido ascórbico, α -tocoferol e glutatona) provocados pela hiperlipidemia parecem comprometer a capacidade dessas moléculas em reduzir os danos oxidativos (BARBOSA *et al.*, 2010; CHENG *et al.*, 2017).

A hiperlipidemia provoca o aumento na produção de EROs gerando radicais livres e afetando os sistemas de defesa endógenos, tal desequilíbrio no balanço redox induz o estresse oxidativo sistêmico, ocasionando dano oxidativo nos tecidos, iniciando assim a peroxidação lipídica das membranas celulares. Além disso, os radicais livres alteram a composição das lipoproteínas, produzindo lipoproteínas de baixa densidade oxidadas (Ox-LDL) no interior dos vasos sanguíneos. Ox-LDL tem múltiplas funções biológicas e favorece o aumento da expressão de citocinas pró-inflamatórias, moléculas adesivas e fatores de crescimento, propiciando o desenvolvimento de placas ateromatosas (JABARPOUR *et al.*, 2019).

Nessa abordagem, as plantas medicinais constituem uma importante fonte de bioativos que podem amenizar os danos oxidativos (AUDDY *et al.*, 2003). Os compostos bioativos ou fitoquímicos extraídos de plantas são conhecidos há muito tempo por possuírem diversas propriedades benéficas, incluindo propriedades antioxidantes (FRANÇA *et al.*, 2019; ZHANG *et al.*, 2016). Ainda assim, novas espécies e compostos bioativos com princípios potencialmente terapêuticos precisam ser cada vez mais explorados.

1.6. Plantas medicinais e compostos bioativos

Várias plantas tem se mostrado promissoras na reversão da dislipidemia pela diminuição dos níveis lipídicos plasmáticos ou pela redução do estresse oxidativo (AUDDY *et al.*, 2003; KHANNA *et al.*, 2002; KHLIFI *et al.*, 2019).

O extrato aquoso da *Marrubium vulgare* M., por exemplo, é fonte de antioxidantes naturais capazes de inibir a oxidação do LDL e melhorar o transporte reverso do colesterol (IBRAHIM *et al.*, 2016). O extrato etanólico rico em polifenóis extraído de outras plantas, como *Syzygium cumini* e *Morinda*

citrifolia também tem apresentado características anti-hipertrigliceridêmica (FRANÇA *et al.*, 2019) antidiabética, anti-obesidade, antioxidante e neuroprotetora, respectivamente (TORRES *et al.*, 2017). O extrato derivado de *Sambucus nigra* (sabugueiro), rico em conteúdo polifenólico, possui capacidade antioxidante, protegendo células contra agentes oxidantes, dessa forma, compostos fenólicos naturais estão envolvidos na manutenção da saúde celular, prevenção e tratamento de doenças crônico-degenerativas (BRATU *et al.*, 2012; FERGUSON, 2001; REIS *et al.*, 2007).

Os polifenóis são antioxidantes nutrientes comuns, derivados principalmente de frutas, vegetais, chá, café, cacau, cogumelos, bebidas e ervas. A classificação dos polifenóis inclui principalmente flavonoides (60%), ácidos fenólicos (30%), e outros polifenóis (incluindo estilbenos e ligninas). Os flavonoides, o grupo mais estudado de polifenóis, são divididos em seis subclasses: flavonóis, flavonas, flavanonas, flavonóis, antocianinas, e isoflavonas (CHENG *et al.*, 2017).

Devido ao seu caráter antioxidante, os polifenóis são substâncias potenciais contra doenças oxidativas, como hiperlipidemia, acidente vascular cerebral e doença cardiovascular, especificamente, doença cardíaca isquêmica relacionada à aterosclerose. Acredita-se que o seu mecanismo de ação esteja associado à neutralização dos radicais livres, doando um elétron ou átomo de hidrogênio para suprimir a geração dessas espécies reativas, ou ainda, na inibição das espécies precursoras de radicais livres (CHENG *et al.*, 2017; ZHANG *et al.*, 2016).

A suplementação com compostos bioativos naturais tem ganhado atenção na pesquisa em decorrência dos seus efeitos benéficos na reversão da hiperlipidemia (CHEN *et al.*, 2018; LEE *et al.*, 2011; LIANG *et al.*, 2013). Os flavonoides, em específico as proantocianidinas, vem sendo citadas na literatura devido seus efeitos farmacológicos referentes às propriedades antioxidantes, anti-carcinogênicas, antimicrobianas (CHEN *et al.*, 2014), antidiabéticas (ARIMBOOR *et al.*, 2012) e ainda cardioprotetoras e anti-arteriosclerótidas (HUMMER *et al.*, 2012).

Portanto, a busca por extratos hipolipemiantes para prevenção e tratamento da dislipidemia é necessária devido aos inúmeros benefícios

funcionais e biológicos que as plantas medicinais podem oferecer para garantir maior sucesso na terapia da doença.

1.6.1. *Annona crassiflora* Mart

A *Annona crassiflora* Mart é um membro da família Annonacea e, popularmente conhecida como “araticum do cerrado”, “marolo”, “cascudo”, “pinha do cerrado”, entre outros. É uma planta nativa do cerrado brasileiro encontrada principalmente nos estados de Minas Gerais, São Paulo, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Bahia, Tocantins, Pará, Maranhão, Piauí e Distrito Federal (ARRUDA; PASTORE, 2019).

O fruto da *Annona crassiflora* Mart apresenta características sensoriais bem marcantes, com cor atraente, sabor intenso e aroma exótico, além de apresentar um alto teor de nutrientes e compostos bioativos. A polpa apresenta uma coloração variando de branco a amarelo e é levemente adocicada. Contém alto teor de carboidratos (18,65%), quantidades relativamente baixas de lipídios (3,78%) e proteínas (1,27%), mas é excelente fonte de fibra alimentar, vitamina A, C e folatos, e ainda, minerais, como cobre, manganês, potássio, magnésio, zinco. (BEZERRA *et al.*, 2018; CARDOSO *et al.*, 2013). Além disso, a polpa da *A. crassiflora* Mart. tem ganhado destaque por ser fonte de carotenóides, polifenóis, tocoferóis, flavonoides e ácidos orgânicos, como o ácido cítrico e málico (BAILÃO *et al.*, 2015; CARDOSO *et al.*, 2013; ROESLER *et al.*, 2007). O consumo desses frutos ocorre *in natura*, no entanto, os mesmos têm sido processados para a fabricação de sorvetes, picolés, geléias e sucos. Oportunamente, grande parte da casca do fruto, bem como outros subprodutos da *A. crassiflora* acabam sendo descartados, em decorrência da presença de compostos fenólicos ou outros metabólitos com baixa palatabilidade (CARDOSO *et al.*, 2013).

Atualmente tem aumentado o interesse na utilização de subprodutos da *A. crassiflora*, tais como as cascas do fruto, sementes, folhas, caule e raiz. Alguns estudos sugerem que esses subprodutos apresentam grande potencial para uso na indústria de alimentos, embalagens, produtos médicos, farmacêuticos e cosméticos (BEZERRA *et al.*, 2018; PEREIRA *et al.*, 2017).

Outro fator relevante é que alguns compostos bioativos, como os alcalóides podem ser purificados da casca dos frutos e das folhas. Essas classes de compostos exibem uma variedade de atividades biológicas, incluindo antitumoral, atividades inseticidas, antiparasitárias e herbicidas. Assim, esses subprodutos podem ser usados para aplicações farmacêuticas, médicas, veterinárias e agrícolas (ARRUDA; PASTORE, 2019).

Os compostos bioativos de plantas são metabólitos secundários, isto é, moléculas que não são essenciais ao crescimento e desenvolvimento das plantas, mas que estão frequentemente envolvidos na adaptação destas às condições ambientais. Dentre os compostos ativos mais expressivos na *A. crassiflora* é possível destacar os polifenóis também conhecidos como compostos fenólicos (BAILÃO *et al.*, 2015).

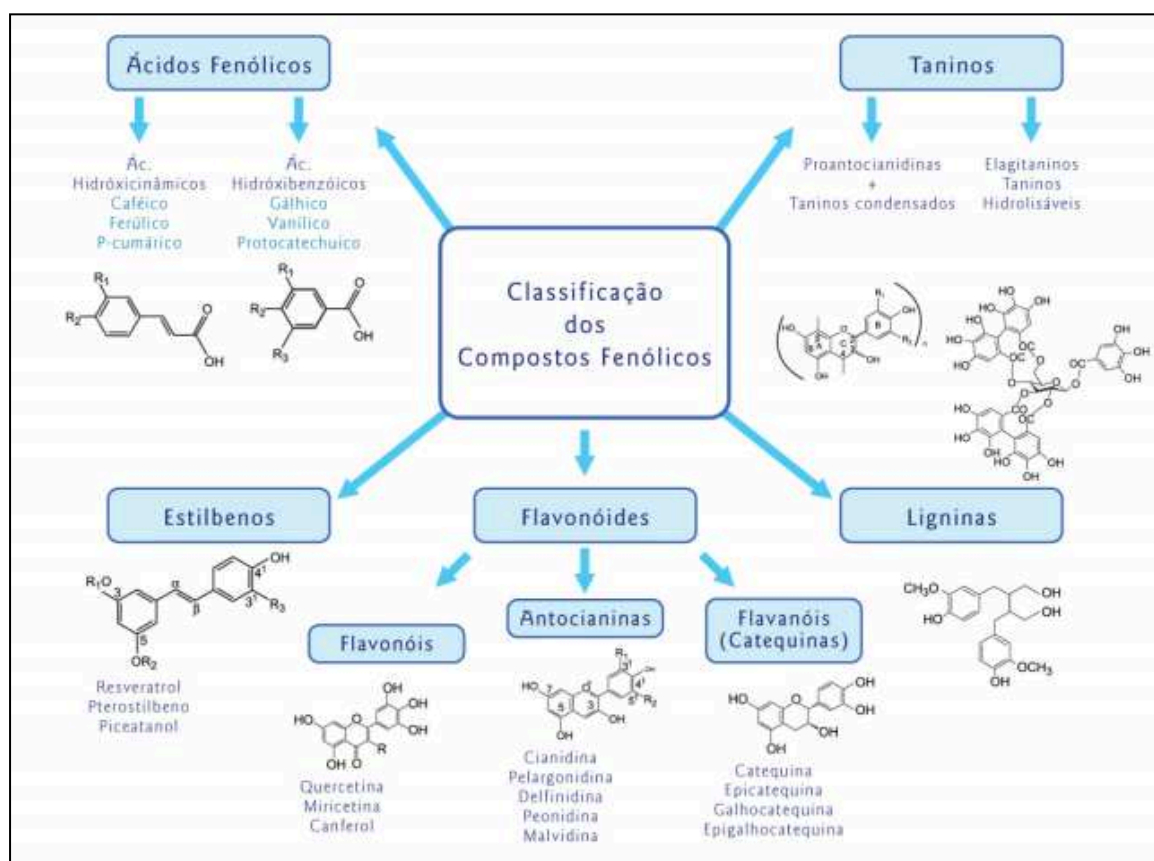


Figura 4: Classificação dos compostos fenólicos. Adaptado (PAREDES-LÓPEZ *et al.*, 2010).

Os polifenóis, mais estudados na literatura são os ácidos fenólicos, flavonoides, estibenos, ligninas e terpenos. Todos têm uma origem em comum: derivam da fenilalanina ou do seu precursor, o ácido chiquímico (**Figura 4**).

Os polifenóis têm recebido muita atenção da comunidade científica por seus numerosos efeitos biológicos e funcionais, como a modulação do perfil lipídico e a sua função antiaterosclerótica, anti-inflamatória, antialérgica, antitumoral, anti-hepatóxica, antiulcerogênica, antimicrobiana, antiviral e vasodilatadora (LIN *et al.*, 2016; LU *et al.*, 2010). A suplementação de polifenóis, como proantocianidinas exerce efeitos metabólicos benéficos. Fontes ricas nestes compostos e muito populares como cacau, uva e chá verde, por exemplo, contém proantocianidinas, epicatequina e galato epigallocatequina (DE PASCUAL-TERESA *et al.*, 2000; JAVAID *et al.*, 2018; REIS *et al.*, 2007).

Justino e colaboradores (2016 e 2017) com o extrato etanólico da casca de araticum e suas frações, especialmente as frações acetato de etila e *n*-butanol, mostraram um alto nível de compostos fenólicos, como flavonoides e proantocianidinas que são amplamente relatados como antioxidantes potentes e também com propriedades anti-inflamatórias. Os compostos ricos em polifenóis encontrados foram ácido clorogênico, cafeoil-glucósido, (epi) catequina, proantocianidina B2 e C1, feruloil-galactosídeo, quercetina-glicosídeo e kaempferol. Essa fração enriquecida de polifenóis da casca de frutos de *A. crassiflora*, demonstrou potencial efeito hepatoprotetor devido sua ação antioxidante e antinitrosativa no tecido hepático de ratos diabéticos, devido à redução da aspartato e alanina aminotransferase, fosfatase alcalina, bem como da peroxidação lipídica hepática, proteína carbonilada e óxido nítrico sintase indutível; ao passo que aumentou as atividades de glutathione peroxidase, superóxido dismutase e catalase.

Com isso, o presente estudo visa investigar as propriedades hipolipidêmicas desta fração enriquecida em polifenóis que tem sido purificada no laboratório na hiperlipidemia induzida por tiloxapol em camundongos. Espera-se caracterizar o papel desta fração na redução das alterações do metabolismo dos lipídeos, do colesterol e do estresse oxidativo no fígado dos animais tratados.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Investigar os efeitos hipolipemiante e antioxidante do extrato etanólico da casca do fruto da *Annona crassiflora* Mart. e seus polifenóis em modelo animal hiperlipidêmico induzido por Triton WR-1339.

2.2. Objetivos específicos

- Preparar a diluição do extrato etanólico bruto da casca do fruto de *A. crassiflora* (EtOH), da partição deste extrato bruto com acetato de etila (AcEt) e a fração purificada a partir desta partição de acetato de etila, contendo apenas proantocianidina B2 (PCND);
- Caracterizar, por espectrometria de massas, a fração enriquecida com proantocianidinas;
- Avaliar o efeito do tratamento com EtOH, AcEt e PCND em camundongos normolipidêmicos e com hiperlipidemia induzida por Triton WR 1339 (Tiloxapol);
- Avaliar o efeito do tratamento com EtOH, AcEt e PCND após a hiperlipidemia induzida por tiloxapol no fígado com biomarcadores de estresse oxidativo;
- Avaliar o efeito do tratamento com EtOH, AcEt e PCND após a hiperlipidemia induzida por tiloxapol sobre o conteúdo de lipídeos totais, triglicerídeos e colesterol hepáticos e fecais.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Preparo do extrato e frações de *Annona crassiflora* Mart

3.1.1. Preparo do extrato bruto etanólico (EtOH)

A casca da *Annona crassiflora*, previamente coletada de acordo com os termos de deliberação 246/2009, autorizada pelo Conselho de Gestão do Patrimônio Genético nº 010743/2015-4 (**Anexo 1**), foi inicialmente pesada e extraída pelo método de maceração a temperatura ambiente, sob proteção da luz. Foi adicionado 6,0 L de etanol 98% como solvente em 1,0 kg de material vegetal à 25°C, previamente secos em estufa a 50°C durante 24h. Após seis dias de incubação, essa mistura foi filtrada e o etanol foi extraído em um rotaevaporador sob pressão reduzida à 40°C. Esse processo foi realizado repetidas vezes até a exaustão da extração. Ao final, o extrato bruto etanólico (EtOH) foi congelado à -20°C e, posteriormente, desidratado por liofilização para posteriores análises.

3.1.2. Preparo da fração acetato de etila (AcEt)

O extrato bruto etanólico foi utilizado para realizar a partição líquido-líquido. Para isso, 30 gramas do EtOH foi solubilizado em 225,0 mL de solução metanol:água na proporção de 9:1. Posteriormente, o extrato foi filtrado e submetido à partição com o auxílio de um funil de separação. Foram utilizados os seguintes solventes em ordem crescente de polaridade: hexano, diclorometano, acetato de etila, *n*-butanol e água. Os solventes foram removidos por rotaevaporação sob pressão reduzida à 40°C. As frações foram congeladas, liofilizadas e armazenadas à -20°C. A fração de acetato de etila (AcEt) foi escolhida para a realização dos testes.

3.1.3. Preparo da fração purificada com proantocianidina B2

Para o preparo da fração purificada, 3,0 gramas de AcEt foi dissolvido em metanol:água na proporção de (35:65). A mistura foi separada por cromatografia de exclusão de tamanho (Sephadex Lh-20, 500x22 mm, GE Health-care-Bio-Sciences AB, Uppsala, Sweden). As proantocianidinas foram eluídas em 250 mL de acetona:água na proporção de (60:40). As frações obtidas foram analisadas em cromatografia de camada delgada e, logo após, rotaevaporadas à 40°C sob pressão reduzida para a remoção do solvente. Por último, as mesmas foram liofilizadas e armazenadas à -20°C. A fração purificada com proantocianidina B2 (PCND) foi utilizada para os testes em animais.

3.2. Análise por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrômetro de massas

Os compostos que apresentaram melhores atividades biológicas na fração acetato de etila foram identificados por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrômetro de massa com ionização por electrospray (CLAE-ESIEM/EM) utilizando o equipamento da Bruker Daltonics, modelo Maxis 3G microTOF. Foi utilizado a proporção 70:30 de água:isopropanol para solubilização das amostras utilizando seringa de 500 µL, adaptada a uma bomba de infusão direta a uma taxa de fluxo de 200 µ/h. A temperatura do nebulizador foi ajustada a 200°C e potencial de 4,5 kV foi aplicado para aquecimento do capilar. Foi realizada uma calibração com formiato de sódio a 10 mmol/L em cada amostra, no início da corrida cromatográfica. Os parâmetros do CLAE foram: coluna Shimadzu Shim-pack XRODS III 150 x 2 mm, partículas de 5 µm e poros de 110 Å de diâmetro, fase móvel: água acidificada com ácido fórmico (0,1%, v.v-1) (A) e acetonitrila acidificada com ácido fórmico (0,1%, v.v -1) (B). Foi utilizado o seguinte sistema gradiente de solventes: 15-40% (0-7 min); 40-90% (7-8 min); 90-90% (8-9 min); 90-15% (9-10 min), e utilizou-se fluxo de 0,35 mL.min e detectado a UV de 280 e 360 nm. Os dados foram adquiridos no modo negativo e positivo, com ajuste para um intervalo de 20 a 1500 m/z. A resolução do equipamento é de

2 ppm. Os dados obtidos são medidas de alta resolução de massa e comparadas através do erro (em ppm) calculado em relação a massa exata por meio da Equação: $E_{ppm} = [(massa_{exata} - massa_{experimental}) / massa_{exata}] \cdot 10^6$

3.3. Animais e delineamento experimental

Mediante aprovação do projeto de pesquisa pelo Comitê de Ética na Utilização de Animais - CEUA/UFU, protocolo nº039/19 (**Anexo 2**), o Centro de Bioterismo e Experimentação Animal da Universidade Federal de Uberlândia (CBEA/UFU) forneceu um total de setenta e cinco camundongos machos da linhagem C57BL/6 com quatro semanas de idade.

Inicialmente esses animais foram pesados e distribuídos em quinze gaiolas com dimensões de 30x19x13cm. Cada gaiola comportava de quatro a cinco animais, sendo todas alojadas no CBEA, com a devida ambientação e ciclos claro/escuro de 12 horas. Durante todo o período de experimental, os animais receberam água potável, filtrada no próprio biotério e trocada diariamente, e ração balanceada *ad libitum* (**Anexo 3**). Semanalmente era feita a troca das gaiolas e a reposição de água e comida. Os testes experimentais ocorreram quando os camundongos completaram sete semanas de idade.

Três grupos experimentais foram organizados de acordo com o tipo de composto da *A. crassiflora* que seria suplementado: extrato bruto etanólico (EtOH), fração acetato de etila (AcEt) e fração purificada contendo apenas proantocianidina B2 (PCND). Em conformidade à escolha dos compostos, os animais foram divididos em cinco grupos. Os grupos naive (grupo controle normolipidêmico) e grupos veículo (grupo hiperlipidêmico, que recebeu injeção intraperitoneal de 400mg/kg de Triton WR-1339) ambos foram compostos por animais que não seriam tratados. Os outros três grupos foram alinhados com três doses dos compostos EtOH, AcEt e PCND: 10 mg, 30 mg ou 100 mg de extrato/fração por kg de peso animal, conforme ilustrado na **Figura 5**.

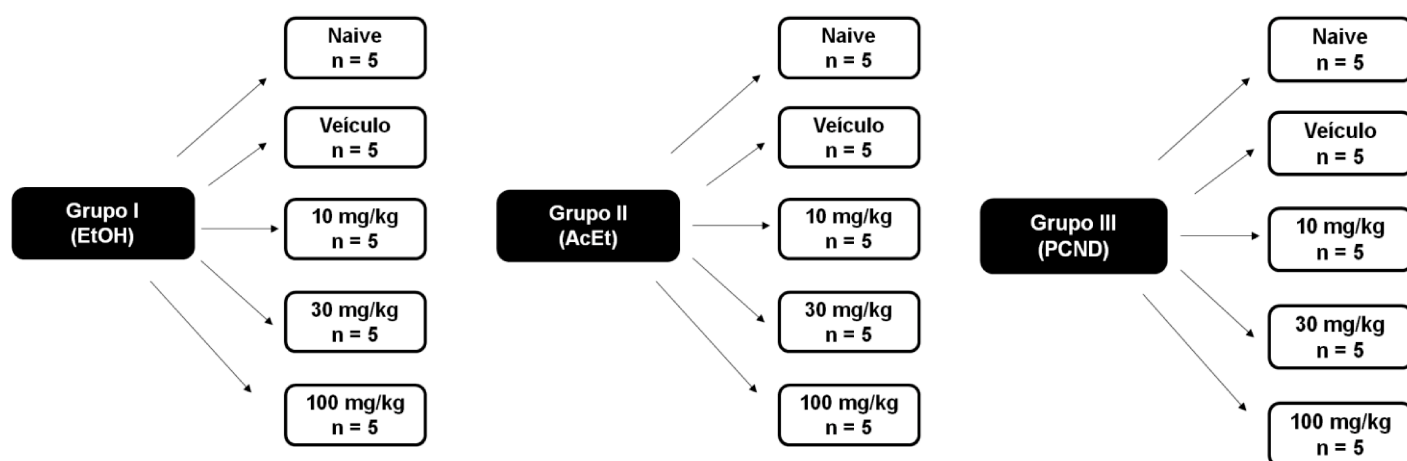


Figura 5: Delineamento experimental dos camundongos C57BL/6 tratados e não tratados com os compostos (EtOH, AcEt e PCND).

O pré-tratamento dos animais teve duração de doze dias, sendo as aplicações feitas diariamente por gavagem. Para isso, foi utilizada uma agulha de gavagem curvada com a ponta arredondada própria para camundongos, sendo nela conectada uma seringa contendo 200 μ L dos compostos. A agulha foi levemente empurrada pelo esôfago dos camundongos para garantir a administração oral. Os animais dos grupos “naive” e “veículo” receberam água destilada e os demais grupos receberam as doses de extrato/frações destinadas a cada grupo, sob as mesmas condições supracitadas. Ao final do dia, as fezes dos animais foram coletadas manualmente, colocadas em tubo falcon e armazenadas em -20°C para análises posteriores.

No décimo terceiro dia o pré-tratamento foi suspenso. Foi realizada a troca de gaiolas, pesagem dos animais e uma nova coleta de sangue, em conformidade às condições anteriores ao tratamento. Logo após os animais foram submetidos a uma injeção intraperitoneal de 400 mg/Kg de peso de Triton WR-1339 (tiloxapol), com exceção dos camundongos do grupo “naive”. Após 24 horas de aplicação do tiloxapol, foi realizada a terceira coleta de sangue para avaliar o perfil bioquímico plasmático. Concluída às 26 horas da injeção de tiloxapol foi administrada a última dose dos compostos bioativos nos grupos tratados.

Ao final de 48 horas após administração do tiloxapol, os animais foram eutanasiados intraperitonealmente com cetamina (80 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg)

diluídos em tampão fosfato de sódio pH 7,3. O design experimental deste estudo encontra-se ilustrado na **Figura 6**.

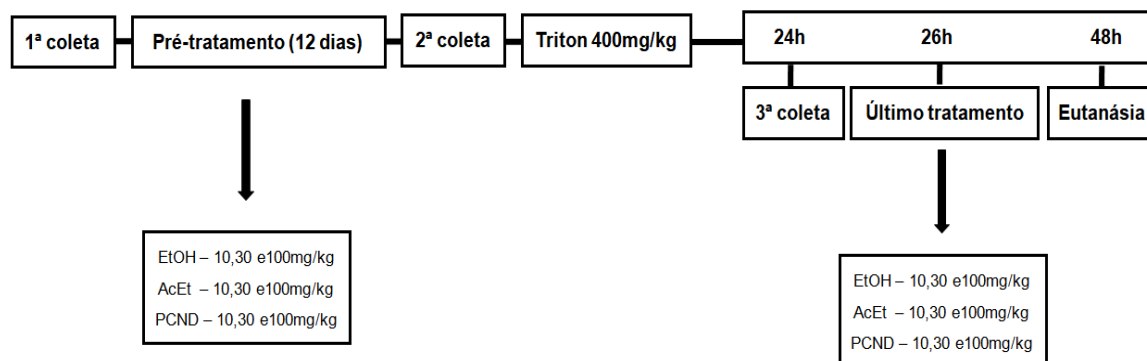


Figura 6: Design experimental dos camundongos C57BL/6.

3.4. Amostras de sangue e tecidos

As amostras de sangue foram coletadas após jejum de 10 horas em três momentos: no início do experimento, após 12 dias de pré-tratamento com os extratos/frações e após a indução da dislipidemia por injeção intraperitoneal de tilioxapol. Em todas essas situações, os animais foram submetidos a um jejum de dez horas. Para a coleta, os animais foram anestesiados e foi realizado um pequeno corte na cauda e utilizado capilares heparinizados. O sangue coletado foi imediatamente centrifugado a 3000 rpm, 4°C, por 10 minutos e o plasma armazenado à -20°C para quantificação de triglicérides e colesterol total, sendo a análise de triglicérides feita no mesmo dia da coleta.

Os órgãos coletados após eutanásia foram o fígado, o coração, o cérebro e o tecido adiposo epididimal. Antes da retirada do fígado, os animais foram perfundidos com 10 mL de solução fosfato-salina (PBS). O fígado foi retirado, pesado e fragmentado em três porções. Tanto o lóbulo maior como o menor foram imediatamente congelados em nitrogênio líquido e armazenados no ultrafreezer à -80°C para as análises de estresse oxidativo e lipídeos totais, respectivamente. A outra porção do fígado foi armazenada em tubos com formalina 10%. O coração e o tecido adiposo epididimal foram congelados em nitrogênio líquido e, posteriormente, armazenados à -80°C. O cérebro foi

primeiramente fragmentado em lóbulo direito e esquerdo e depois armazenado nas mesmas condições. Sendo utilizado para análise deste trabalho somente o fígado e o restante dos órgãos retirados serão analisados posteriormente em outros trabalhos.

3.5. Avaliação do perfil lipídico

3.5.1. Dosagem de triglicerídeos plasmáticos

A concentração de triglicerídeos plasmáticos foi obtida por kit comercial Interkit para dosagem de Triglicérides, um sistema colorimétrico capaz de quantificar um composto de coloração rósea formado na reação final, cuja absorção é de 500nm. A concentração foi determinada a partir de uma curva padrão com quatro concentrações conhecidas. Foi adicionado 100 µL das soluções padrão, 100 µL das amostras diluídas e 100 µL do reagente de cor em uma microplaca de 96 poços. A leitura da microplaca foi realizada à absorbância de 500 nm em espectrofotômetro. A intensidade da cor formada foi diretamente proporcional à concentração.

3.5.2. Dosagem de colesterol total plasmático

Para a dosagem do colesterol total plasmático foi utilizado kit comercial Interkit para dosagem de Colesterol, um sistema colorimétrico que visa quantificar um cromóforo róseo avermelhado com absorção máxima a 500 nm. A concentração do colesterol total também foi determinada a partir de uma curva padrão com quatro concentrações conhecidas. Foram adicionadas 100 µL das soluções padrão, 100 µL das amostras diluídas e 100 µL do reagente de cor em uma microplaca de 96 poços. A leitura da microplaca foi realizada à absorbância de 500 nm em espectrofotômetro. A intensidade da cor formada foi diretamente proporcional à concentração.

3.5.3. Dosagem de HDL-colesterol plasmático

A quantificação de HDL-colesterol plasmático dos animais também foi obtida por reação de ponto final. O ensaio baseia-se na precipitação seletiva das lipoproteínas de baixa e muito baixa densidade (LDL, IDL e VLDL), para que seja possível determinar unicamente as lipoproteínas de alta densidade (HDL).

As amostras de plasma foram inicialmente homogeneizadas com o reagente precipitante e centrifugadas a 12.000 rpm à 4 °C durante 4 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi utilizado para a determinação do HDL-C e o precipitado descartado.

Além dos sobrenadantes, uma solução padrão de 20 mg/dL foi pipetada em uma microplaca de 96 poços. A seguir, foi feita a incubação à 37°C com o reagente de cor durante 15 minutos, e a leitura espectrofotométrica à 500 nm.

3.5.4. Dosagem do colesterol não-HDL plasmático

O colesterol não-HDL (LDL colesterol e VLDL colesterol) foi calculado pela diferença entre o colesterol total e o HDL colesterol.

3.6. Quantificação de lipídeos hepáticos e fecais

Os lipídeos totais fecais e hepáticos foram extraídos segundo o método de Folch (Folch, 1957). Primeiramente as amostras foram homogeneizadas em uma solução de clorofórmio: metanol (2:1) e, em seguida, metanol. As mesmas foram centrifugadas a 3.000 rpm e 4°C durante 15 minutos. Uma solução de clorofórmio e NaCl 0,73% foram adicionadas ao sobrenadante. Após homogeneização, uma nova centrifugação foi realizada utilizando os mesmos parâmetros. Desprezou-se a fase superior e foi feita a lavagem do conteúdo com solução de clorofórmio, deixando secar a 37°C. A quantidade de lipídeos extraídos foi dada pela diferença entre o peso dos tubos após a secagem com o peso dos tubos limpos. Os lipídeos

extraídos foram solubilizados em isopropanol para a determinação do colesterol total e dos triglicerídeos, em conformidade aos ensaios já elucidados.

3.7. Determinação de proteínas totais

O ensaio de Bradford foi escolhido para a determinação de proteínas totais das amostras do fígado. As proteínas da amostra ligam-se ao corante de Bradford (*Comassie Brilliant Blue*) podendo ser quantificadas espectrofotometricamente a 595 nm (BRADFORD, 1976).

Uma solução estoque de soro albumina bovino (BSA) 2mg/mL foi utilizada para a construção da curva padrão (0,1 – 1,4 µg/µL) para a determinação de proteínas das amostras por regressão linear. Tanto a curva como as amostras foram incubadas com o reagente de Bradford em microplaca de 96 poços durante 10 minutos à temperatura ambiente. A leitura espectrofotométrica foi feita em 595 nm.

3.8. Análises de Estresse Oxidativo

O fígado foi homogeneizado, com auxílio do homogeneizador de tecidos, 100mg de amostra em tampão fosfato 900µL pH 7,4 50mM EDTA 5mM. A solução foi centrifugada a 10000g durante 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi coletado e utilizado para as análises de estresse oxidativo e o *pellet* descartado.

3.8.1. Superóxido dismutase (SOD)

A superóxido dismutase (SOD) é uma enzima que catalisa a reação de dismutação de dois radicais superóxido em peróxido de hidrogênio e oxigênio, sendo uma defesa primária contra o estresse oxidativo. O princípio desse ensaio baseia-se na inibição da reação do radical superóxido com o pirogalol. Como o superóxido é gerado pela auto-oxidação do pirogalol em meio básico, a SOD presente na amostra compete pelo radical. A auto-oxidação do pirogalol leva a

formação de um composto colorido, detectado no espectrofotômetro a 420 nm (MARKLUND, 1985).

Para avaliar a atividade enzimática da SOD, foi construída uma curva padrão com diferentes concentrações da enzima a partir de um estoque com tampão Tris 50 mM com EDTA 1 mM pH 8,2 (tampão SOD), SOD 10 U/mL e pirogalol 24 mM preparado em HCl 10 mM. As amostras de sobrenadante foram pipetadas na microplaca com tampão SOD e pirogalol. A leitura cinética ocorreu em microplacas a 420 nm durante 10 minutos em um intervalo de 15 em 15 segundos.

3.8.2. Catalase (CAT)

A catalase (CAT) é uma enzima capaz de converter peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em oxigênio e água. A atividade da catalase foi medida através da degradação do H_2O_2 pela variação de absorbância à 240nm, em um meio de reação contendo H_2O_2 20 mM, tampão fosfato 10 mM (pH 7.0) e 10 uL de amostra (AEBI, 1984).

Inicialmente, as amostras foram incubadas com Triton 10% no gelo por 15 minutos. Em seguida, foi adicionado peróxido de hidrogênio 20 mM em tampão fosfato de potássio 10 mM. A leitura cinética foi realizada em microplacas específicas para ultravioleta, aplicando um comprimento de onda de 240 nm durante 10 minutos em um intervalo de 15 em 15 segundos.

3.8.3. Glutathiona reduzida (GSH)

A glutathiona reduzida (GSH) é um tripeptídeo formado pelos aminoácidos glutamato, cisteína e glicina. Desempenha papel fundamental na prevenção de danos causados por radicais livres, agindo como co-substrato de algumas enzimas antioxidantes, tais como glutathiona peroxidase e glutathiona S-transferases (BROWNE&ARMSTRONG, 1998).

As amostras (150 µL) foram previamente precipitadas com ácido metafosfórico (MPA) na proporção de 1:1. Em seguida, foram centrifugadas a 7000xg durante 10 minutos a 4°C e o sobrenadante foi utilizado para as análises. Foram retirados 30 µL do sobrenadante, ao qual foi adicionado 185 µL de tampão fosfato de sódio 100 mM, pH 8.0, contendo EDTA 5mM e 15 µL de ortofaldialdeído (1 mg/ml em metanol). A incubação da mistura foi feita no escuro à temperatura ambiente por 15 minutos. Uma curva padrão de GSH (0,001-0,1 mM) foi construída para quantificar as amostras usando regressão linear. A leitura foi feita em um fluorímetro com excitação de 350 nm e emissão de 420 nm.

3.8.4. Capacidade antioxidante total (FRAP)

O ensaio FRAP (do inglês Ferric Reducing Antioxidant Power) foi utilizado para mensurar a capacidade antioxidante total dos tecidos. Basicamente, as espécies antioxidantes reduzem Fe^{3+} a Fe^{2+} . O ferro presente nas amostras é inicialmente quelado pela 2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ), formando o complexo Fe^{2+} -TPTZ. Este é reduzido para a forma ferrosa, provocando uma coloração azul intensa quantificável em um comprimento de onda de 593 nm (BENZIE & STRAIN, 1996).

Para a análise, os sobrenadantes foram incubados com o reagente de FRAP (tampão acetato 0,3 M pH 3,6, solução de TPTZ 10 mM e solução de cloreto férrico 20 mM) à 37 °C durante 10 minutos e, posteriormente submetidos à leitura de microplacas. As concentrações foram obtidas por meio de uma curva padrão de trolox (10 – 200 µM), um análogo da vitamina E, por regressão linear.

3.8.5. Sulfidrilas totais

As sulfidrilas totais também são quantificadas para compreender o potencial antioxidante das amostras, já que determinam os tióis totais. Nesse ensaio, o reagente de cor conhecido como reagente de Ellman's (ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico) é reduzido por tióis, gerando um derivado amarelo, o 5-

tio-2-nitrobenzóico (TNB), lido espectrofotometricamente à 412 nm (AKSENOV *et al.*, 2001).

A metodologia envolve a incubação das amostras em tampão fosfato (PBS) com EDTA 1 mM pH 7,4 junto com o reagente DTNB 10 mM preparado em solução de fosfato de potássio 0,2 M pH 8,0. A incubação foi feita no escuro durante 15 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, as microplacas foram lidas em um comprimento de onda de 412 nm no espectrofotômetro. As concentrações de sulfidrilas totais foram calculadas descontando-se os valores do branco do reagente e da amostra.

3.8.6. Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

A peroxidação lipídica é decorrente do ataque dos radicais livres aos lipídeos de membrana, um dos produtos liberados é o malondialdeído (MDA). Esta substância aquecida na presença do ácido tiobarbitúrico (TBA) forma um composto de coloração rosada, a qual é lida espectrofotometricamente a 532 nm (YAGI, 1998).

As amostras (100µL) foram misturadas a 400µL de água (H₂O) e 500µL de ácido tricloroacético 20% (TCA). Desta solução, 400µL foram retirados e adicionado a um tubo com ácido clorídrico 0,5M (HCl) e hidroxitolueno butilado 50mM (BHT). Outros 400µL foram colocados em tubo com ácido tiobarbitúrico 0,75% (TBA) diluído em HCl 0,5M e BHT 50mM. Os tubos foram fervidos em banho maria por 30 minutos e centrifugados a 10000g por 6 minutos a 4°C. O sobrenadante foi analisado em um fluorímetro a 515 nm de excitação e 553 nm de emissão. Uma curva padrão de 1,1,3,3-tetrametroxipropano (TMP) em tampão fosfato de sódio com KCl pH 7,4 foi construída para o cálculo de TBARS por regressão linear.

3.8.7. Proteína Carbonilada

A formação de carbonilas nas proteínas é um importante marcador de dano oxidativo. A detecção de grupos carbonílicos protéicos no ensaio se baseou na

reação do grupo carbonila com o 2,4-dinitrofenil-hidrazina (DNPH), produzindo dinitrofenil (DNP), mensurado espectrofotometricamente. (REZNICK & PACKER, 1994).

As amostras foram incubadas no escuro com DNPH 10 mM em HCl 2,5 N durante uma hora, sob agitação a cada 15 minutos. Em seguida, foram incubadas com ácido tricloroacético (TCA) 20% no gelo durante 10 minutos. Após centrifugação à 9000xg por 5 minutos, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* lavado com etanol-acetato de etila (1:1) e homogeneizado em vórtex. Uma nova centrifugação foi realizada nas mesmas condições para a ressuspensão do *pellet* em guanidina 6M solubilizada em HCl 2,5 N e aquecimento em banho-maria à 37°C por 5 minutos. Uma curva padrão de albumina (BSA) foi construída para a quantificação das proteínas presentes a 280 nm. Para determinar a carbonilação foi realizada a leitura na microplaca UV a 370 nm.

3.9. Análise estatística

As análises estatísticas e os gráficos foram realizados pelo *software* prisma (GraphPad Software, San Diego Califórnia – EUA), versão 6.0. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média e para avaliar a diferença entre os resultados obtidos foi utilizado o método da Análise de Variância (ANOVA) one-way, post-test de Dunnett comparando todos os grupos com o grupo veículo (grupo hiperlipidêmico) e Test-T comparando grupo veículo (grupo hiperlipidêmico) versus grupo naïve (grupo normolipidêmico). Foi considerado o nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

4. RESULTADOS

4.1. Massa final das extrações na partição líquido-líquido

A massa final do processo de extração etanólica por maceração à temperatura ambiente encontrado da casca seca (1Kg) de araticum (*Annona crassiflora*) foi de 106,7g de extrato bruto etanólico. Segue os valores da massa final de cada partição na **Tabela1**.

Tabela 1: Massa final das extrações da partição líquido-líquido do extrato etanólico da casca do araticum (*Annona crassiflora*)

Partições	Massa final das extrações (g)	Rendimento (%)
Hexano	0,42	1,4
Diclorometano	0,83	2,8
Acetato de etila	6,23	20,7
<i>n</i> -Butanol	2,19	7,3

Alguns estudos têm mostrado que compostos fenólicos presentes nas partições de acetato de etila presentes na casca do fruto da *A. crassiflora* demonstram alta capacidade antioxidante (COS *et al.*, 2003; GAO *et al.*, 2011; GU *et al.*, 2006; JUSTINO *et al.*, 2016; VELLOSA *et al.*, 2011; WU, 2007). Visto isso, foi feita a cromatografia utilizando CLAE-ESI-EM/EM identificando o composto proantocianidina B2 referente às partições acetato de etila derivadas do extrato etanólico da casca do araticum. O material complementar está em anexo (**Anexo 4, 5 e 6**).

4.2. Avaliação dos parâmetros lipídicos

4.2.1. Lipídeos plasmáticos

4.2.1.1. Colesterol total, HDL-C e não HDL-C

Os níveis plasmáticos de colesterol antes e após a eutanásia estão apresentados na **Tabela 2 e 3** abaixo.

Os dados na **Tabela 2** revelaram que não houve diferença estatística de CT entre os grupos durante a primeira coleta de sangue, nem mesmo na segunda coleta após o pré-tratamento de 12 dias dos grupos com 10, 30 ou 100 mg/kg de EtOH, AcEt ou PCND. Entretanto, após a administração intraperitoneal de 400mg/kg de Triton WR-1339, o grupo veículo apresentou concentração consideravelmente maior de CT circulante ($359,8 \pm 48,2$) se comparado ao grupo naive ($36,95 \pm 3,9$). O mesmo comportamento foi observado entre esses grupos no dia da eutanásia.

Apesar do aumento do HDL-C em todos os grupos tratados, houve diferença significativa nas concentrações de 30 mg/kg das frações EtOH e AcEt administradas em comparação ao grupo veículo. Igualmente, os animais tratados com 100 mg/kg de PCND praticamente triplicou os níveis de HDL-C plasmático ($128,4 \pm 21,9$) quando comparados aos animais que não foram tratados ($39,4 \pm 13,3$).

Quanto ao não HDL-C, foi possível notar que o grupo naive apresentou níveis plasmáticos de $27,4 \pm 12,8$ mg/dL, enquanto os animais submetidos ao tiloxapol apresentaram concentrações bem maiores ($195,6 \pm 63,4$ mg/dL). Curiosamente, nenhuma concentração do extrato e das frações foi capaz de normalizar os níveis de não HDL-C no sangue.

4.2.1.2. Triglicerídeos

Os níveis de triglicerídeos plasmáticos antes e após a eutanásia estão representados na **Tabela 4**.

Os dados revelaram que não houve diferença de TG entre os grupos durante a primeira e a segunda coleta de sangue. Todavia, os valores de TG plasmático foram expressivamente maiores após 24 horas de administração de tiloxapol nos camundongos do grupo veículo ($2990,9 \pm 436,3$) em comparação aos animais do grupo naive ($65,9 \pm 4,1$), que não foram submetidos ao agente

dislipidêmico. A propósito, não houve reversão dos níveis de TG plasmático nos grupos tratado com EtOH, AcEt e PCND.

O sangue coletado após eutanásia mostrou a mesma tendência. A concentração de TG foi elevada nos animais do grupo veículo e se manteve nos grupos tratados com o extrato ou as frações. Os dados mostraram que o TG do grupo veículo ($1614,0 \pm 112,7$) foi aproximadamente 40 vezes maior que o dos animais que receberam apenas água destilada ($34,6 \pm 5,6$).

Tabela 2: Variação do colesterol total plasmático, em mg/dL, durante e após o experimento em grupos de camundongos submetidos ou não a administração intraperitoneal por Triton WR-1339.

	EtOH					AcEt			PCND		
(mg/dL)	Naive	Veículo	10 mg/kg	30mg/kg	100mg/kg	10 mg/kg	30mg/kg	100mg/kg	10 mg/kg	30mg/kg	100mg/kg
Primeira coleta	32,95 ±5,45	34,63 ±3,63	34,48 ± 4,57	33,73 ± 0,47	33,17 ± 2,3	27,63± 4,34	27,17±3,55	26,68±3,14	30,72 ±8,3	40,06 ±6,20	33,42 ±4,56
Segunda coleta	36,95± 3,88	38,90 ±4,02	40,19 ± 6,65	40,44 ± 3,30	38,65 ± 2,7	36,46± 2,58	30,37±5,46	30,46± 3,21	43,19 ±4,26	45,31 ± 3,7	46,01 ±3,06
Pós Triton	36,95±3,9***	359,8 ± 48,2	242,4 ± 28,1	219,7 ± 60,1	240,7 ± 49,3	382,0±19,4	289,7±62,9	342,7±17,5	422,9± 35,0	330,0± 23,5	259,9± 58,9
Eutanásia	60,2±8,6**	332,9±65,8	391,4±47,6	380,9±61,2	413,0±39,6	391,4±54,9	337,0±89,9	355,6±25,4	433,1± 41,9	378,2±64,4	354,6± 53,6

Variação dos níveis de colesterol total plasmático, em mg/dL, dos animais no Início do experimento (Primeira coleta); animais após pré-tratamento por 12 dias de Extrato Bruto (EtOH), Acetato de Etila (AcEt) e Proantocianidinas (PCND) em concentrações de 10, 30 e 100mg/kg, exceto grupo Naive e grupo Veículo que receberam água destilada (Segunda Coleta); dos animais que foram submetidos a injeção intraperitoneal de 400mg/kg de Triton WR-1339, exceto grupo Naive (Coleta Pós Triton) e coleta sanguínea na Eutanásia. Teste: ANOVA one-way test de Dunnett. Valores expressos como média ± erro padrão** p<0,01 e ***p<0,001 versus grupo veículo.

Tabela 3: Variação dos níveis de colesterol total plasmático e suas frações HDL-C e Não HDL-C coletadas na eutanásia, em mg/dL, em grupos de camundongos submetidos ou não a administração intraperitoneal por Triton WR-1339.

			EtOH			AcEt			PCND		
mg/dL	Naive	Veículo	10 mg/kg	30mg/kg	100mg/kg	10 mg/kg	30mg/kg	100mg/kg	10 mg/kg	30mg/kg	100mg/kg
CT Eutanásia	60,2±8,6**	332,9±65,8	391,4±47,6	380,9±61,2	413,0±39,6	391,4±54,9	337,0±89,9	355,6±25,4	433,1±41,9	378,2±64,4	354,6±53,6
HDL-c Eutanásia	35,4±11,4	39,4±13,3	126,1 ±49,9	150,7±21,6**	144,2±54,3	124,0±41,9	129,4±31,8*	115,4±59,7	135,6±40,4	127,9±65,7	128,4±21,9**
Não HDL -c Eutanásia	27,4±12,8*	195,6±63,4	265,3±43,5	284,6±57,9	272,1±61,8	186,1±27,7	257,3±80,7	296,8±28,8	305,7±14,7	273,2±42,5	254,2±48,4

Variação dos níveis de colesterol total coletados na eutanásia (CT Eutanásia), fração HDL-C e não HDL-C provenientes da coleta da Eutanásia, em mg/dL, dos camundongos do grupo Naive (água destilada); Veículo (água destilada e administração intraperitoneal de 400mg/kg Triton WR-1339); e dos grupos que receberam pré-tratamento por 12 dias e uma dose após 26h da administração intraperitoneal de 400mg/kg Triton WR-1339 de Extrato Bruto (EtOH), Acetato de Etila (AcEt) e Proantocianidinas (PCND) em concentrações de 10, 30 e 100mg/kg. Teste: ANOVA one-way test de Dunnett. Valores expressos como média ± erro padrão *p<0,05 e **p<0,01 versus grupo veículo.

Tabela 4: Variação dos níveis de triglicerídeos plasmático, em mg/dL, durante e após o experimento no grupo naive e em grupos de camundongos submetidos a administração intraperitoneal por Triton WR-1339.

mg/dL	EtOH					AcEt			PCND		
	Naive	Veículo	10 mg/kg	30mg/kg	100mg/kg	10 mg/kg	30mg/kg	100mg/kg	10 mg/kg	30mg/kg	100mg/kg
Primeira coleta	56,8 ± 2,7	28,5 ± 2,2	36,5 ± 1,8	37,7 ± 2,5	36,2 ± 2,0	36,2 ± 1,9	37,3 ± 2,4	33,1 ± 2,0	36,8 ± 1,6	37,1 ± 2,5	39,4 ± 1,9
Segunda coleta	65,9 ± 4,1	64,5 ± 4,8	82,1 ± 8,7	86,6 ± 3,3	59,9 ± 2,8	34,1 ± 1,7	30,1 ± 1,3	30,1 ± 5,5	66,6 ± 4,2	71,2 ± 9,1	85,1 ± 0,1
Pós Triton	65,9 ± 4,1**	2990,9 ± 436,3	2425,3 ± 457,6	2443,5 ± 621,1	2095,9 ± 646,5	2642,5 ± 539,9	2418,6 ± 250,1	2794,1 ± 194,7	2730,6 ± 117,3	2445,1 ± 259,8	2092,9 ± 61,31
Eutanásia	34,6 ± 5,6*	1614 ± 112,7	1520,4 ± 241,8	1701,2 ± 299,6	1306,6 ± 696,4	917,7 ± 287,8	1344,2 ± 409,3	1079,3 ± 196,4	1500,6 ± 185,2	1505,4 ± 159,7	917,7 ± 282,5

Variação dos níveis de triglicerídeos plasmático, em mg/dL, dos animais no Início do experimento (Primeira coleta); que receberam pré-tratamento por 12 dias de Extrato Bruto (EtOH), Acetato de Etila (AcEt) e Proantocianidinas (PCND) em concentrações de 10, 30 e 100mg/kg(Segunda Coleta); dos animais que foram submetidos a injeção intraperitoneal de 400mg/kg de Triton WR-1339, exceto grupo Naive (Coleta Pós Triton) e coleta sanguínea na Eutanásia Teste: ANOVA one-way e pós- teste de Dunnett. Valores expressos como média ± erro padrão *p<0,05 e ** p<0,01 versus grupo veículo.

4.2.2. Lipídeos hepáticos

A **Tabela 5** representa os dados de lipídeos totais quantificados pelo método de Folch e a concentração de TG e CT hepáticos dos camundongos do grupo naive, veículo e daqueles que receberam pré-tratamento por 12 dias e uma única dose realizada de EtOH, AcEt e PCND nas três concentrações (10, 30 e 100 mg/Kg) após 26h da administração intraperitoneal de 400mg/kg Triton WR-1339.

Os dados revelaram que os lipídeos totais, bem como TG e CT foram elevados no grupo veículo quando comparados ao grupo naive. No entanto, os animais que foram previamente tratados com o extrato e fração PCND antes da injeção intraperitoneal do Triton WR-1339 apresentaram melhoras no perfil lipídico hepático, em especial no TG e CT.

Os animais tratados com EtOH nas concentrações de 10 e 100 mg/Kg tiveram redução de TG hepáticos em relação ao veículo, mas esses lipídeos não diferiram entre os animais tratados com AcEt e PCND e os não tratados. Em adição, os níveis de CT hepático mostraram resultados significativamente menores nas três doses de EtOH em comparação ao grupo veículo. O mesmo foi observado nas concentrações de 10 e 100 mg/kg de PCND.

Tabela 5: Níveis de lipídeos totais, triglicerídeos e colesterol total hepático pós administração intraperitoneal por Triton WR-1339.

(mg/g)	EtOH					AcEt			PCND		
	Naive	Veículo	10 mg/kg	30mg/kg	100mg/kg	10 mg/kg	30mg/kg	100mg/kg	10 mg/kg	30mg/kg	100mg/kg
LIP hepáticos	33,13 ± 2,78*	46,20 ± 3,96	47,40 ± 7,27	44,60 ± 7,42	45,25 ± 6,76	47,40 ± 4,36	43,50 ± 5,27	45,20 ± 3,93	47,20 ± 3,64	45,20 ± 7,88	43,60 ± 3,56
TG hepáticos	3,61 ± 0,22***	6,65 ± 0,41	5,33 ± 0,14*	5,73 ± 0,17	5,30 ± 0,10*	6,65 ± 0,11	7,04 ± 0,31	6,89 ± 0,13	6,37 ± 0,25	6,43 ± 0,22	5,85 ± 0,09
CT hepáticos	2,51 ± 0,04***	5,04 ± 0,12	4,11 ± 0,06***	4,26 ± 0,11**	4,23 ± 0,02***	4,96 ± 0,05	4,88 ± 0,07	4,90 ± 0,09	4,71 ± 0,06*	4,71 ± 0,12	4,64 ± 0,06*

Extração de lipídeos hepáticos seguido dos seus níveis de triglicerídeos e colesterol total dos camundongos do grupo Naive (água destilada); Veículo (água destilada e administração intraperitoneal de 400mg/kg Triton WR-1339); e grupos que receberam pré-tratamento por 12 dias e uma dose pós administração intraperitoneal de 400mg/kg Triton WR-1339 de Extrato Bruto (EtOH), Acetato de Etila (AcEt) e Proantocianidinas (PCND) em concentrações de 10, 30 e 100mg/kg. Teste: ANOVA one-way test de Dunnett. Valores expressos como média ± erro padrão
 *p<0,05 , **p<0,01, ***p<0,001 versus grupo veículo.

4.2.3. Lipídeos fecais

Os resultados de lipídeos totais, TG e CT fecais antes e após a administração intraperitoneal de Triton WR-1339 estão descritos na **Tabela 6**. Os lipídeos totais sofreram poucas variações antes e após o tiloxapol, sendo observada diferença significativa apenas nos animais do grupo veículo. A concentração de 100 mg/kg da fração AcEt ($9,0 \pm 0,6$) foi a única que apresentou diminuição nos lipídeos totais quando comparado aos animais do grupo veículo ($13,5 \pm 1,6$).

Os dados de TG mostraram que houve o aumento de lipídeos nas fezes dos animais do grupo veículo em relação ao grupo naïve após a administração do Triton WR-1339. Além disso, todos os demais grupos apresentaram aumento de TG após a administração de tiloxapol. Curiosamente, apenas os animais tratados com a fração EtOH nas concentrações de 10 e 100 mg/kg tiveram uma diminuição de TG pós tiloxapol, quando comparada ao grupo veículo.

Foi possível notar que as fezes coletadas antes da administração do tiloxapol mostraram menor teor de colesterol nos animais pré-tratados com 10 e 100 mg/kg da fração EtOH em comparação ao grupo veículo. Ainda foi observado um aumento de CT fecal nos animais que receberam a gavagem com Triton WR-1339 ($5,9 \pm 0,1$) em relação aos que receberam apenas água destilada ($4,1 \pm 0,1$).

Tabela 6: Níveis de lipídeos totais, colesterol total e triglicerídeos fecais, em mg/g, sendo estes coletados antes e pós administração intraperitoneal por Triton WR-1339.

(mg/g)	EtOH					AcEt			PCND		
	Naive	Veículo	10 mg/kg	30mg/kg	100mg/kg	10 mg/kg	30mg/kg	100mg/kg	10 mg/kg	30mg/kg	100mg/kg
LIP fecal A.T.	13,33± 2,52	13,50 ± 1,60	10,0 ± 0,60	13,66 ± 3,66	12,33 ± 2,33	10,33 ± 1,20	11,00 ± 1,73	9,00 ± 0,58*	14,33 ± 2,18	13,33 ± 2,40	12,66 ± 5,36
LIP fecal P.T.	14,45 ± 3,94	23 ± 2,33##	14,67 ± 3,76	17,67 ± 3,38	16,87 ± 4,47	13,67 ± 4,10	15,66 ± 3,18	14,33 ± 4,91	18,33 ± 5,17	16,33 ± 3,48	16,33 ± 0,88
TG fecal A.T.	5,97 ± 0,36	5,56 ± 0,60	4,65 ± 0,12	5,43 ± 0,21	5,22 ± 0,14	5,75 ± 0,05	5,33 ± 0,08	5,35 ± 0,14	6,20 ± 0,28	5,35 ± 0,16	5,51 ± 0,23
TG fecal P.T.	5,42 ± 0,30***	7,75 ± 0,23##	6,86± 0,15*###	7,62 ± 0,60##	6,86±0,24*###	7,59± 0,41##	7,36± 0,08###	7,58± 0,06##	8,00 ± 0,61##	7,35± 0,48##	7,60± 0,33###
CT fecal A.T.	4,84 ± 0,18	4,91 ± 0,19	4,32 ± 0,14*	4,63 ± 0,15	4,26 ± 0,09*	5,04 ± 0,13	5,35 ± 0,17	4,84 ± 0,22	4,85 ± 0,05	5,35 ± 0,17	4,69 ± 0,03
CT fecal P.T.	4,12 ± 0,10***	5,91 ± 0,14##	5,62 ± 0,06###	6,44± 0,19###	5,93 ± 0,08###	6,00 ± 0,29#	5,48 ± 0,08#*	5,71 ± 0,19#	6,03± 0,13###	6,03 ± 0,21#	6,23± 0,14###

Extração de lipídeo fecal antes da administração intraperitoneal de Triton WR-1339 (LIP fecal A.T.) e de lipídeo fecal pós administração intraperitoneal de Triton WR-1339 (LIP fecal P.T.) seguido dos seus níveis de triglicerídeos e colesterol total antes e pós administração intraperitoneal de Triton WR-1339 respectivamente (TG fecal A.T.), (TG fecal P.T.), (CT fecal A.T.), (CT fecal P.T.) dos camundongos do grupo Naive (água destilada); Veículo (água destilada e administração intraperitoneal de 400mg/kg Triton WR-1339); e grupos que receberam pré-tratamento por 12 dias e uma dose após administração intraperitoneal de 400mg/kg Triton WR-1339 de Extrato Bruto (EtOH), Acetato de Etila (AcEt) e Proantocianidinas (PCND) em concentrações de 10, 30 e 100mg/kg. Teste: ANOVA one-way test de Dunnett. Valores expressos como média ± erro padrão *p<0,05 , ***p<0,001 versus grupo veículo e Teste T com valores expressos como média ± erro padrão #p<0,05, ##p<0,01 e ###p<0,001 refere-se ao grupo veículo versus naive.

4.3. Biomarcadores do estresse oxidativo

4.3.1. Avaliação do potencial antioxidante

4.3.1.1. Superóxido dismutase e catalase

A atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) hepática estão ilustradas na **Figura 7**.

Os resultados mostraram que os animais que receberam tratamento com o extrato bruto etanólico nas concentrações de 10 e 30 mg/kg de peso apresentaram valores significativamente maiores de SOD (138.80 ± 8.09 e 137.10 ± 12.08 , respectivamente) em relação ao grupo veículo ($100.00 \pm 15,68$), conforme a Figura 7A. Curiosamente, a concentração de 100 mg/kg do EtOH, bem como as demais doses das frações AcEt e PCND não mostraram diferença significativa em comparação ao grupo veículo.

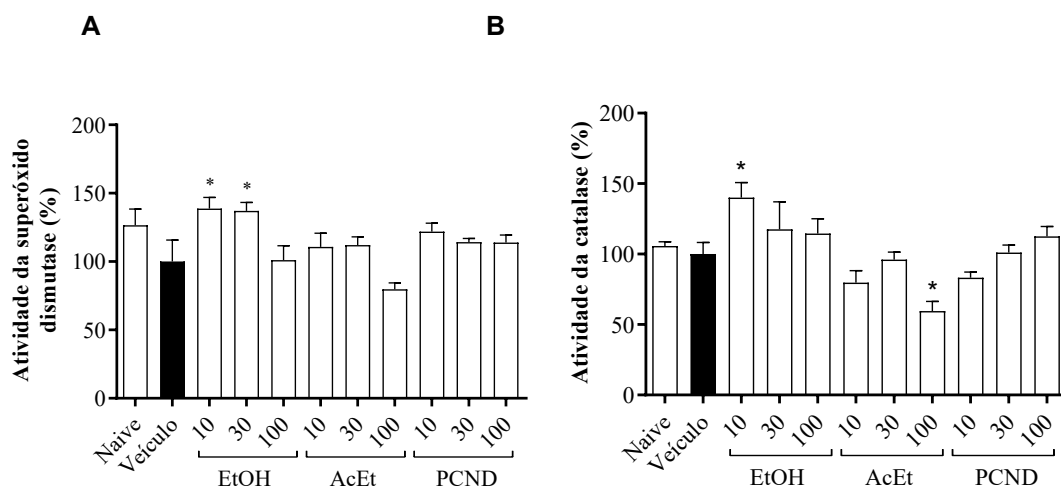


Figura 7: Atividade da superóxido dismutase hepática (A) e atividade da catalase hepática (B) dos camundongos do grupo Naive (água destilada); Veículo (água destilada e administração intraperitoneal de 400mg/kg Triton WR-1339); e grupos que receberam pré-tratamento por 12 dias e uma dose após administração intra-peritoneal de 400mg/kg Triton WR-1339 de Extrato Bruto (EtOH), Acetato de Etila (AcEt) e Proantocianidinas (PCND) em concentrações de 10, 30 e 100mg/kg. Teste: ANOVA one-way, post-test de Dunnett. Valores expressos como média \pm erro padrão * $p < 0,05$ versus grupo veículo.

Em relação à atividade da catalase (Figura 7B), observamos que apenas a concentração de 10 mg/kg de EtOH apresentou valores elevados da enzima ($140.10 \pm 10,53$) comparado ao veículo ($100,00 \pm 8,24$), enquanto as demais concentrações não diferiram com o mesmo grupo. Em contrapartida, na concentração de 100 mg/kg da fração AcEt, os valores de CAT ($59,54 \pm 6,83$) foram quase duas vezes menor em comparação ao veículo ($100,00 \pm 8,24$).

4.3.1.2. FRAP e sulfidrilas totais

A capacidade antioxidante total não apontou diferença significativa entre os grupos estudados (**Figura 8A**). No entanto, foi possível notar uma redução bem expressiva do conteúdo de sulfidrilas totais no grupo veículo ($100,00 \pm 18,23$) em relação ao naive ($206,00 \pm 28,77$), conforme ilustrado na **Figura 8B**. Em adição, a dose de 30 mg/kg da fração AcEt também aumentou no teor de sulfidrilas totais ($183,30 \pm 18,79$) em relação ao veículo.

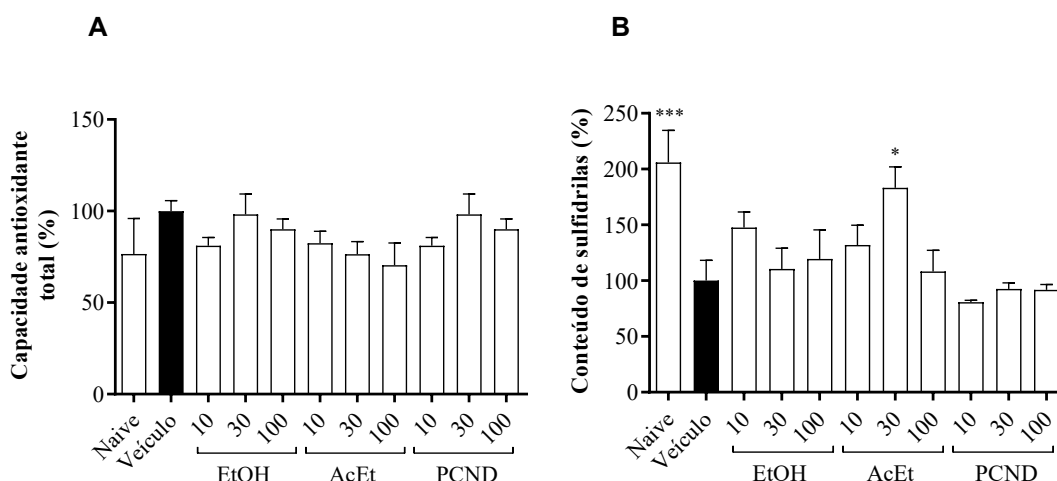


Figura 8: Análise da capacidade antioxidante total (A) e do conteúdo de sulfidrilas (B) nos fígados dos camundongos do grupo Naive (água destilada); Veículo (água destilada e administração intraperitoneal de 400mg/kg Triton WR-1339); e grupos que receberam pré-tratamento por 12 dias e uma dose após administração intraperitoneal de 400mg/kg Triton WR-1339 de Extrato Bruto (EtOH), Acetato de Etila (AcEt) e Proantocianidinas (PCND) em concentrações de 10, 30 e 100mg/kg. Teste: ANOVA one-way, post-test de Dunnett. Valores expressos como média \pm erro padrão * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$ versus grupo veículo.

4.3.1.3. *Glutathiona reduzida (GSH)*

Os resultados ilustrados na **Figura 9** mostraram que os animais do grupo naive apresentaram menor percentual de GSH ($67,68 \pm 1,46$) em comparação aos animais do grupo veículo ($100,00 \pm 5,17$). Surpreendentemente, os animais que foram tratados com as maiores concentrações das frações EtOH e AcEt (100 mg/kg) mostraram teor de GSH reduzido em relação ao veículo, com valores de ($62,60 \pm 6,41$) e ($52,26 \pm 4,93$), respectivamente.

De maneira similar, os animais que foram tratados com a concentração de 10 mg/kg da fração PCND revelaram uma redução no conteúdo de GSH, cujo valor foi de ($71,87 \pm 1,76$), em comparação ao veículo.

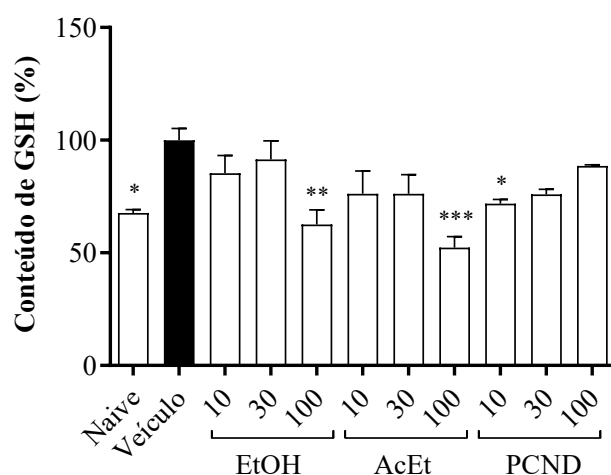


Figura 9: Atividade do conteúdo de Glutathiona reduzida (GSH) hepático dos camundongos do grupo Naive (água destilada); Veículo (água destilada e administração intraperitoneal de 400mg/kg Triton WR-1339); e grupos que receberam pré-tratamento por 12 dias e uma dose após administração intra-peritoneal de 400mg/kg Triton WR-1339 de Extrato Bruto (EtOH), Acetato de Etila (AcEt) e Proantocianidinas (PCND) em concentrações de 10, 30 e 100mg/kg. Teste: ANOVA one-way, post-test de Dunnett. Valores expressos como média \pm erro padrão * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ versus grupo veículo.

4.3.2. Indicadores de dano oxidativo

4.3.2.1. *Peroxidação lipídica (TBARS)*

O dano lipídico representado pelo método de TBARS revelou que os animais submetidos à administração intraperitoneal de Triton WR-1339 apresentaram maior peroxidação lipídica em relação ao grupo naíve. No entanto, os camundongos previamente tratados com os extratos e frações mostraram menor dano lipídico comparados ao veículo, conforme ilustrado na **Figura 10** abaixo.

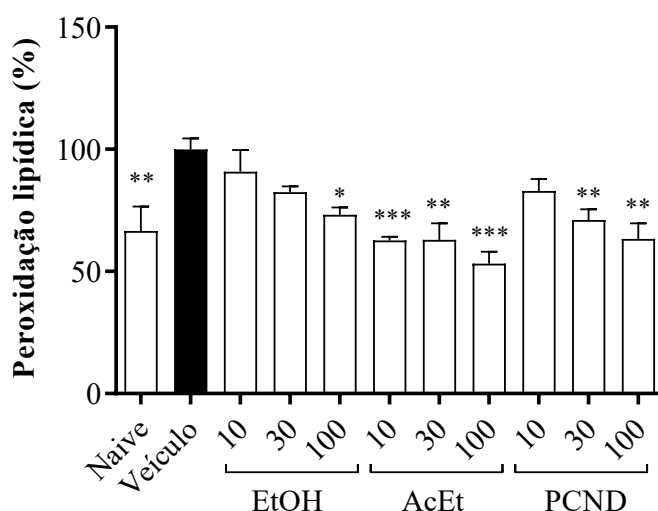


Figura 10: Peroxidação lipídica hepática dos camundongos do grupo Naíve (água destilada); Veículo (água destilada e administração intraperitoneal de 400mg/kg Triton WR-1339); e grupos que receberam pré-tratamento por 12 dias e uma dose após administração intraperitoneal de 400mg/kg Triton WR-1339 de Extrato Bruto (EtOH), Acetato de Etila (AcEt) e Proantocianidinas (PCND) em concentrações de 10, 30 e 100mg/kg. Teste: ANOVA one-way, post-test de Dunnett. Valores expressos como média \pm erro padrão * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ versus grupo veículo.

As concentrações das frações EtOH e PCND foram relevantes para a redução da peroxidação lipídica, tendo em vista que as maiores doses administradas tiveram menor dano oxidativo. A concentração de 100 mg/kg de EtOH apresentou valores médios percentuais de $(73,25 \pm 2,87)$, os quais foram significativamente menores que o veículo $(100,00 \pm 4,42)$ e a fração PCND diferiu positivamente em comparação ao veículo tanto nas concentrações de 30 como de 100 mg/Kg, com valores médios de TBARS de $(71,08 \pm 4,35)$ e $(63,25 \pm 6,48)$, respectivamente.

Quanto à fração AcEt, embora não tenha sido observado diferença entre as concentrações administradas, todas as três doses apresentaram valores menores de dano lipídico em relação ao veículo.

4.3.2.2. Carbonilação de proteínas

Os resultados de carbonilação protéica (**Figura 11**) mostraram que o grupo veículo apresentou maior porcentagem de dano protéico ($100,00 \pm 2,54$) em relação ao grupo naïve, com média de ($82,25 \pm 4,89$). E apenas as concentrações de 10 mg/Kg dos extratos EtOH e AcEt apresentaram redução no conteúdo de proteínas carboniladas comparados ao veículo. Os valores médios apresentados foram de ($79,94 \pm 5,76$) e ($68,56 \pm 13,09$) para 10 mg/Kg de EtOH e AcEt, respectivamente.

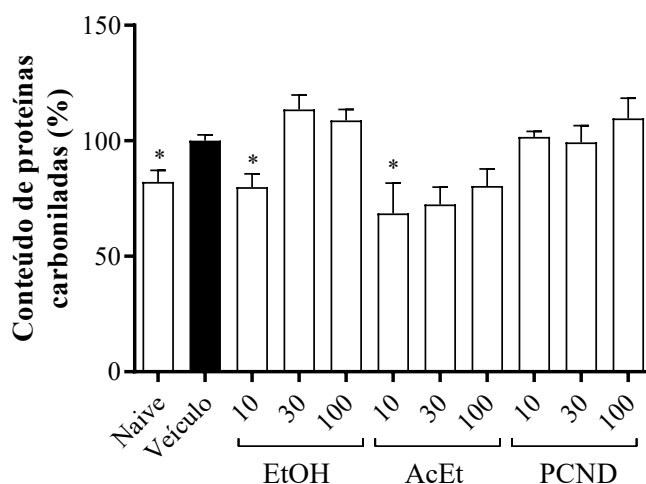


Figura 11: Conteúdo de proteínas carboniladas dos fígados dos camundongos do grupo Naive (água destilada); Veículo (água destilada e administração intraperitoneal de 400mg/kg Triton WR-1339); e grupos que receberam pré-tratamento por 12 dias e uma dose após administração intraperitoneal de 400mg/kg Triton WR-1339 de Extrato Bruto (EtOH), Acetato de Etila (AcEt) e Proantocianidinas (PCND) em concentrações de 10, 30 e 100mg/kg. Teste: ANOVA one-way, post-test de Dunnett. Valores expressos como média \pm erro padrão * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ versus grupo veículo.

5. Discussão

A dislipidemia é uma anormalidade caracterizada por altas concentrações plasmáticas de colesterol totais (CT), de lipoproteína de baixa densidade (LDL-C) e triglicerídeos (TG), sendo também comumente acompanhada de um baixo nível de lipoproteína de alta densidade (HDL-C) (FERNÁNDEZ-MARTÍNEZ *et al.*, 2019; SAHEBKAR *et al.*, 2014; TAHERI *et al.*, 2016).

Para a descoberta de novos produtos naturais ou drogas com potencial hipolipidêmico são realizados estudos em modelo animal com agentes específicos capazes de induzir a dislipidemia. A escolha do Triton WR-1339 como agente dislipidêmico neste trabalho foi pautado em estudos anteriores, que avaliaram a atividade hipolipidêmica de plantas medicinais em modelo experimental induzido pelo Triton (IBRAHIM *et al.*, 2016; KHANNA *et al.*, 2002; PANDIT *et al.*, 2014; ZARZECKI *et al.*, 2014).

O Triton WR-1339, conhecido como tiloxapol, é um detergente não iônico (surfactante) usado para induzir dislipidemia aguda ou crônica em animais, inibindo a lipase lipoproteica, que por sua vez, aumenta a atividade da enzima HMG-CoA redutase, enzima chave da biossíntese do colesterol. Como consequência, o tiloxapol promove o aumento tanto de CT quanto TG plasmático (FERNÁNDEZ-MARTÍNEZ *et al.*, 2019).

Tem se observado que o tiloxapol apresenta pico de ação em 24 horas e uma queda do colesterol plasmático após 72 horas do uso da droga em ratos (LEVINE; SALTZMAN, 2007) em camundongos pode observar queda dos níveis de colesterol plasmático após 48 horas (XIE W, *et.al.*, 2007) podendo os níveis atingirem valores comparáveis aos basais, contudo se houver intervalos de tempo com níveis lipídicos normais, será possível a ocorrência de regeneração ou regressão das lesões ateromatosas. (BERTGES, *et al.*, 2011; LEVINE; SALTZMAN, 2007)

O modelo animal utilizado neste trabalho foi a linhagem de camundongos C57BL/6 machos. O modelo foi efetivo na indução aguda de dislipidemia após 24 horas da injeção intraperitoneal de 400 mg/kg de Triton WR-1339, já que os animais do grupo veículo claramente tiveram alterações nos lipídeos circulantes, hepáticos e fecais. Doses iguais ou até mesmo menores de tiloxapol foram

utilizadas em outros estudos para a indução da dislipidemia em ratos Wistar (ADIGUN *et al.*, 2016; SARAVANAN *et al.*, 2011) e camundongos (HARNAFI *et al.*, 2020).

A administração aguda de Triton WR-1339 não interferiu na massa corporal e no ganho de peso dos camundongos, nem mesmo no consumo alimentar e hídrico desses animais (dados não mostrados), conforme (**Anexo 7**). Esses dados sugerem que a dieta ofertada (**Anexo 3**) e o modelo de indução de dislipidemia aguda não foram capazes de alterar os parâmetros morfométricos dos animais.

Os resultados das Tabelas 2, 3 e 4 mostraram que as concentrações plasmáticas de colesterol total, a fração não HDL-C e os triglicerídeos foram significativamente elevadas após a administração do Triton WR-1339. Ibrahim e colaboradores (2016) e Saravanan e colaboradores (2011) também demonstraram elevação nos níveis de TG e CT (HARNAFI *et al.*, 2020; HECK *et al.*, 2019) acompanhada de significativa redução de HDL-C após administração do tiloxapol em modelo animal.

Apesar de o grupo veículo ter tido um aumento na concentração plasmática de colesterol total e não HDL-C, os grupos tratados com extrato bruto e a fração AcEt na dose de 30 mg/kg mostraram resultados promissores na redução da dislipidemia, visto que houve o aumento do HDL-C plasmático. Em adição, a maior dose da fração purificada (PCND) também ganhou destaque no aumento dos valores plasmáticos de HDL-C (Tabela 3). Do mesmo modo, o estudo de Veber e colaboradores (2020), mostraram que extratos aquosos contendo ácidos fenólicos, flavonoides, galocatequina e epicatequina aumentaram significativamente os níveis de HDL-C em ratos hiperlipidêmicos induzidos por Triton WR-1339.

Assim, mesmo que os extratos e as frações não tenham impactado diretamente na redução dos níveis do CT e não HDL colesterol, a fração AcEt e as proantocianidinas B2 foram capazes de elevar os níveis do HDL-C, que tem função antiaterogênico, mesmo em uma única dose administrada após a aplicação intraperitoneal de tiloxapol. Harnafi e colaboradores (2008) também demonstraram que houve aumento significativo da fração HDL-C após 24 horas de tratamento com o extrato de acetato de etila da planta *Ocimum basilicum* (manjerição).

A literatura tem estudado os efeitos do tiloxapol nos órgãos, como o fígado, cérebro e rins (MISHRA *et al.*, 2014; SARAVANAN *et al.*, 2011; VEBER *et al.*, 2020). Os nossos achados mostraram que os efeitos dislipidêmicos atingiram o fígado dos animais do grupo veículo, elevando os valores médios de lipídeos totais, CT e TG. Todavia, as três doses administradas do extrato bruto, bem como as concentrações de 10 e 100 mg/kg de PCND (Tabela 5) foram capazes de normalizar os níveis hepáticos de CT, evidenciando o potencial hipolipidêmico desses fitoquímicos. Curiosamente, apenas as doses de 10 e 100 mg/kg do extrato bruto foram capazes de reduzir os triglicerídeos hepáticos após injeção com tiloxapol.

Extratos ricos em polifenóis, como taninos e flavonoides, presentes nas cascas de amêndoas *Prunus dulcis* reduziram significativamente o colesterol total, fração LDL-C e triglicerídeos no sangue de camundongos hiperlipidêmicos induzidos por Triton WR-1339 (200 mg/kg) e por dieta rica em gordura, ao passo que aumentou consideravelmente a fração HDL-C plasmática, no trabalho de Harnafi *et al* (2020).

O Método de Folch para quantificação de lipídeos nas fezes demonstrou que não apenas os lipídeos totais, mas também o conteúdo de colesterol e triglicerídeos foram elevados após a injeção de tiloxapol (Tabela 6). Mais uma vez esses resultados corroboram com a tese de que o Triton WR-1339 foi capaz de induzir dislipidemia e que esta causou um desequilíbrio no metabolismo lipídico hepático. Igualmente, em nosso estudo, apenas o extrato bruto nas doses de 10 e 100 mg/kg foi capaz de reduzir os níveis séricos de TG e de CT fecais.

O menor conteúdo de lipídeos hepáticos e fecais sugere que o extrato bruto possivelmente possui bioativos com capacidade de modular a captação ou metabolização dos lipídeos e das lipoproteínas no intestino e no fígado. Uma hipótese é que o EtOH pode estar envolvido na inibição da absorção de colesterol e de triglicerídeos no intestino, o que resulta em um menor liberação desses lipídeos também para o fígado, diminuindo assim o conteúdo de CT e TG.

Por outro lado, o estudo de Mishra e colaboradores (2014) mostrou que o teor de gordura nas fezes aumentou em ratos tratados com o extrato metanólico rico em flavonoides de frutos da *Trichosanthes anguina* após 24 horas da injeção de 300mg/kg de Triton WR-1339, em comparação aos animais não tratados. A

sugestão proposta para o aumento do conteúdo lipídico fecal nesse estudo foi de que os bioativos ali presentes tenham diminuído sinergicamente a captação de colesterol intestinal e/ou interferido na circulação entero-hepática dos ácidos biliares, deixando-os indisponíveis para a emulsificação das gorduras.

A busca por compostos bioativos naturais com baixa toxicidade e que apresentam propriedades antioxidantes tem se destacado no controle do estresse oxidativo gerado por muitas fisiopatologias (BAHADORAN *et al.*, 2013; DEY & LAKSHMANAN, 2013; ZEKA *et al.*, 2017). O presente estudo mostrou o potencial antioxidante da casca do fruto de *A. crassiflora* avaliando frações ricas em polifenóis sobre parâmetros lipídicos séricos e por marcadores de balanço redox no fígado de camundongos com dislipidemia.

Plantas inteiras ou misturas/extratos de plantas são usadas em vez de compostos isolados, pois o acesso pode ser mais acessível do que adquirir moléculas isoladas (WAGNER & ULRICH-MERZENICH, 2009). Além disso, a interação sinérgica ou efeitos multifatoriais entre compostos presentes em extratos de ervas podem aumentar os efeitos biológicos (WAGNER & ULRICH-MERZENICH, 2009).

Os compostos fenólicos são considerados benéficos para a saúde humana, reduzindo o risco de doenças crônico-degenerativas, reduzindo o estresse oxidativo e inibindo a oxidação de macromoléculas (BAHADORAN *et al.*, 2013; KHAN *et al.*, 2020; LIN *et al.*, 2016). Acredita-se que o mecanismo potencial dos efeitos protetores dos compostos fenólicos, incluindo os flavonoides, seja devido à eliminação direta dos radicais livres. Os antioxidantes fenólicos podem doar átomos de hidrogênio aos radicais lipídicos e produzir derivados lipídicos e radicais antioxidantes, que são mais estáveis e menos disponíveis para promover a auto-oxidação (LU *et al.*, 2010). Além de eliminar os radicais livres, as múltiplas atividades dos antioxidantes incluem a inativação de catalisadores metálicos por quelação, redução dos hidroperóxidos em derivados estáveis de hidroxila e interação sinérgica com outros compostos redutores (LIMA *et al.*, 2017).

Uma vez que a hipertrigliceridemia e hipercolesterolemia estão associadas com mudanças funcionais e estruturais no tecido hepático, incluindo aumentos nos níveis de ERO's (DEVAKI *et al.*, 2013; KLISIC *et al.*, 2018; YANG *et al.*, 2008), foram avaliados parâmetros de estresse oxidativo no fígado dos

camundongos com dislipidemia. O estresse oxidativo exerce papel importante na patogênese de diversas doenças, como cardiovascular, aterosclerose, inflamação, câncer, toxicidade de drogas, lesão de reperfusão e doenças neurodegenerativas e hepáticas induzidas por hiperlipidemia, pode acelerar a formação de radicais e, por consequência, danificar a defesa antioxidante intrínseca (BURTON & JAUNIAUX, 2011).

A capacidade antioxidante total hepática não foi alterada com a indução da dislipidemia, porém, os resultados deste estudo mostraram um aumento na peroxidação lipídica e na carbonilação de proteínas hepáticas, indicando que o modelo de dislipidemia induzida por tiloxapol foi capaz de gerar espécies reativas de oxigênio, que são fatores que desencadeiam a patogênese da hiperlipidemia. Esses níveis aumentados podem ser atribuídos ao aumento da produção de ERO's e/ou deficiência do sistema de defesa antioxidante endógeno.

Muitos compostos oxigenados, particularmente aldeídos como o malondialdeído (MDA) e dienos conjugados, são produzidos durante o ataque de radicais livres às lipoproteínas de membrana e ácidos graxos poli-insaturados (YANG *et al.*, 2008). A superóxido dismutase enzimática (SOD), a glutathione peroxidase (GSH-Px) e catalase (CAT) e os antioxidantes não enzimáticos como a glutathione reduzida (GSH) desempenham papéis importantes no alívio dos danos aos tecidos devido à formação de radicais livres (YANG *et al.*, 2008).

A hipertrigliceridemia e a hipercolesterolemia estão associadas à modificação oxidativa de LDL, glicação de proteínas, auto-oxidação de glicose, levando assim à produção excessiva de produtos de peroxidação lipídica que podem causar elevação do estresse oxidativo quando se tem uma hiperlipidemia (YANG *et al.*, 2008). O aumento da peroxidação lipídica é considerada uma consequência do estresse oxidativo que ocorre quando o equilíbrio dinâmico entre o mecanismo pró-oxidante e antioxidante é prejudicado (KUMARI & MENON, 1987). Sabe-se que estados hiperlipidêmicos estão associados a propriedades físicas alteradas das membranas celulares (ENGELMANN *et al.*, 1992), o que pode facilitar o escape de radicais livres da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial ou a ativação da NADPH oxidase. Os hidroperóxidos lipídicos no LDL isolado do plasma sanguíneo são indicativos de oxidação que já ocorreu *in vivo*.

A formação de equivalentes de MDA foi menor nos camundongos tratados com todas as doses testadas da fração AcEt, e com as doses maiores do extrato bruto e da fração PCND (Figura 10). Estudos anteriores demonstraram o potencial do flavonoides, como as proantocianidinas, que estão presentes em EtOH, AcEt e PCND, na redução da peroxidação lipídica e no aumento da capacidade antioxidante (GU *et al.*, 2006; JUSTINO *et al.*, 2019; LEE *et al.*, 2007).

ERO's também podem danificar proteínas (SUZUKI *et al.*, 2010). Os principais mecanismos moleculares que levam ao dano às proteínas são a oxidação, caracterizada pela formação de carbonilas e a perda de grupos tiol (LEVINE *et al.*, 1990; SUZUKI *et al.*, 2010). A carbonilação de proteínas é um dano oxidativo irreversível, muitas vezes levando à perda da função da proteína, que é considerada um indicador generalizado de dano oxidativo grave e disfunção protéica derivada de doença (DALLE-DONNE *et al.*, 2003).

O extrato bruto e a fração AcEt foram capazes de reduzir a carbonilação de proteínas hepáticas nos camundongos com dislipidemia (Figura 11). Curiosamente, os efeitos na redução da carbonilação protéica foram observados quando EtOH e AcEt foram administrados na menor dose testada (10 mg/kg). Isso pode ser justificado pelo fato de que a quantidade de extrato/fração possa ter excedido, o que fez com que o seu impacto terapêutico diminuísse. Em altas concentrações, pode haver múltiplos fatores e efeitos biológicos mais complexos, tais como efeitos antagonistas entre os compostos presentes na mistura da fração, múltiplos locais de ligação ou múltiplos alvos que formam agregados coloidais em concentração relevante, o que pode contribuir para a perda de atividade em concentrações mais altas (OWEN *et al.*, 2014).

Um estudo realizado por Tabassum e colaboradores (2007) mostrou que a catequina, um flavonóide previamente identificado em AcEt, foi capaz de evitar a carbonilação de proteínas no fígado, indicando seu potencial em inibir a formação de proteínas carboniladas. Além disso, Filomeni e colaboradores (2012) mostraram a redução da carbonilação de proteínas pelo flavonóide kaempferol, também presente na fração AcEt.

Dislipidemia envolvendo altos níveis séricos de colesterol LDL-C e/ou baixos níveis séricos de HDL-C está relacionada com redução dos níveis de tióis e alterações no status redox de tiol/ dissulfeto (KINSCHERF *et al.*, 2003), o que

corroborar o nível de tióis hepáticos diminuído nos camundongos com dislipidemia induzida por tilioxapol. Os tióis representam membros eficazes no sistema antioxidante endógeno, podendo ser convertidos em dissulfetos por eventos de oxidação (AKSENOV & MARKESBERY, 2001). Glutathione (GSH), cisteína, homocisteína e N-acetilcisteína são tióis naturais que protegem o organismo contra o estresse oxidativo (LUBOS, *et al.*, 2011).

A oxidação dos grupos tióis foi observada após a indução da dislipidemia, como consequência do estresse oxidativo, e foi inibida pela fração AcEt na concentração de 30 mg/kg (Figura 8B). Estudos têm mostrado a capacidade de flavonoides na restauração do status de tióis (DIETZMANN *et al.*, 2002; JUSTINO *et al.*, 2019). A dose menor (10 mg/kg) de AcEt não teve efeito por conta de os compostos majoritários presentes na fração estarem em concentrações mais baixas, e a dose maior testada pode ter provocado efeitos antagonistas entre os compostos presentes.

O aumento do nível de GSH nos camundongos dislipidêmicos pode ser devido ao seu uso necessário para aliviar o estresse oxidativo gerado com a dislipidemia. O aumento do conteúdo de GSH pode ter ocorrido em resposta compensatória à elevada produção endógena de peróxido de hidrogênio no fígado dos animais dislipidêmicos, uma vez que a hiperlipidemia tem sido relatada na redução da atividade da GSH-Px (SHYAMALA *et al.*, 2005) e, assim, o uso de GSH no ciclo enzimático da GSH-Px tenha sido prejudicado, contribuindo assim com o seu aumento nos animais dislipidêmicos.

Em relação ao tratamento com as frações enriquecidas com polifenóis da casca do fruto de *A. crassiflora*, o extrato bruto e a fração AcEt na maior dose (100 mg/kg), e a fração PCND na menor dose (10 mg/kg) normalizaram o conteúdo de GSH (Figura 9). Os polifenóis, principalmente as proantocianidinas, têm a capacidade de reduzir o estresse oxidativo, levando à menor depleção e/ou necessidade de uso de GSH, conforme relatado por AL-NUMAIR e colaboradores (2015) e LEE *et al.* (2007).

Enzimas antioxidantes (SOD, GSH-Px e CAT) podem transformar moléculas reativas de oxigênio em substâncias não tóxicas, construindo assim a primeira linha de defesa contra ERO's quando ocorre estresse oxidativo no organismo (BURTON & JAUNIAUX, 2011). A superóxido dismutase catalisa a

conversão do ânion superóxido em peróxido de hidrogênio e oxigênio. As moléculas de H_2O_2 são posteriormente eliminadas pela CAT, que catalisa a decomposição de H_2O_2 em H_2O e O_2 ou por tiol peroxidases (AEBI, 1984).

Embora os níveis de peroxidação lipídica, carbonilação protéica, conteúdo de tióis e de GSH tenham sofrido alterações no fígado com a dislipidemia induzida por tiloxapol, as atividades das enzimas SOD e CAT não foram alteradas (Figura 7). Atividades diminuídas de SOD e GSH-Px têm sido descritas quando há um alto teor de lipídios (LIMA *et al.*, 2017; SHYAMALA *et al.*, 2005; YANG *et al.*, 2008). No entanto, esses estudos avaliaram de forma crônica o efeito da dislipidemia sobre a atividade dessas enzimas antioxidantes. Uma hiperlipidemia aguda como observada neste estudo pode não ter efeito significativo sobre as atividades das enzimas SOD e CAT.

A atividade da CAT foi reduzida pelo tratamento com a fração AcEt na dose 100 mg/kg (Figura 7B). Os compostos fenólicos presentes na fração AcEt, por meio das propriedades de eliminação e neutralização de ROS, podem ter sido responsáveis pela redução da atividade da CAT no tecido hepático. Curiosamente, o tratamento dos camundongos com o extrato bruto etanólico da casca dos frutos de *A. crassiflora* aumentou a atividade das enzimas SOD e CAT. Estudos anteriores mostraram a presença de flavonoides no extrato EtOH (JUSTINO *et al.*, 2020; PEREIRA *et al.*, 2017), os quais não estão presentes nas frações AcEt e PCND (JUSTINO *et al.*, 2019; PEREIRA *et al.*, 2016). A presença desses compostos ativos no extrato EtOH pode ter contribuído com o aumento na atividade das enzimas SOD e CAT (LILI *et al.*, 2010).

Vale ressaltar que a fração AcEt apresentou os maiores efeitos nos parâmetros de estresse oxidativo, com destaque para a redução da peroxidação lipídica, carbonilação proteica e atividade da CAT, além do aumento do conteúdo de tióis no fígado. Isso pode ser explicado pela presença de proantocianidinas e flavonoides como quercetina e kaempferol na fração AcEt, e que não estão presentes na fração PCND. Além disso, a partição líquido-líquido do extrato bruto etanólico concentrou os compostos fenólicos na fração AcEt, o que contribuiu para o aumento da sua capacidade antioxidante, como demonstrado de forma *in vitro* por JUSTINO e colaboradores (2016).

6. Conclusão

O presente estudo valida o modelo experimental proposto visto que a injeção intraperitoneal de 400 mg/kg de Triton WR-1339 foi eficaz na indução de dislipidemia nos camundongos da linhagem C57BL/6, sendo observado aumento considerável nos níveis de TG, CT e não HDL plasmático e, ainda, de lipídeos totais, colesterol e triglicerídeos fecais e hepáticos.

Uma grande variedade de fitoquímicos presentes no extrato bruto parece agir de maneira sinérgica na redução dos efeitos deletérios da dislipidemia, por contribuírem para o aumento de HDL-C plasmático e melhora do perfil lipídico no fígado e fezes, contribuindo para o possível efeito hipolipidêmico da casca da *A. crassiflora* Mart.

Apesar do pré tratamento e da única dose de tratamento após a administração de Triton WR-1339 não intervirem na recuperação rápida dos níveis lipídicos sanguíneos e de não serem observadas alterações na capacidade antioxidante total com o extrato e as frações no fígado, foi possível concluir que os compostos fenólicos, em especial a fração AcEt, encontrados na casca da *A. crassiflora* Mart apresentaram maiores efeitos nos parâmetros do estresse oxidativo ao passo que reduziram a peroxidação lipídica e a carbonilação de proteínas, demonstrando o grande potencial antioxidante da casca da *A. crassiflora* Mart. no combate dos radicais livres provocados pelo estado hiperlipidêmico.

7. Referências

ABDOU, Heba M; WAHBY, Mayssaa M. Neuroprotection of Grape Seed Extract and Pyridoxine against Triton-Induced Neurotoxicity. *Oxidative medicine and cellular longevity*, v. 2016, p. 8679506, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/8679506>

AEBI, H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol*, 105, p. 121-126, 1984. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(84\)05016-3](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(84)05016-3)

AL-NUMAIR, K. S.; CHANDRAMOHAN, G.; VEERAMANI, C.; ALSAIF, M. A. Ameliorative effect of kaempferol, a flavonoid, on oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats. *Redox Rep*, 20, n. 5, p. 198-209, Sep 2015. <https://doi.org/10.1179/1351000214Y.0000000117>

ALPHONSE, Peter A.S.; JONES, Peter J.H. Revisiting Human Cholesterol Synthesis and Absorption: The Reciprocity Paradigm and its Key Regulators. *Lipids*, v. 51, n. 5, p. 519–536, 2016. <https://doi.org/10.1007/s11745-015-4096-7>

ALTMANN, Scott W *et al.* Niemann-Pick C1 Like 1 protein is critical for intestinal cholesterol absorption. *Science (New York, N.Y.)*, v. 303, n. 5661, p. 1201–1204, fev. 2004. <https://doi.org/10.1126/science.1093131>

AKSENOV, M. Y.; MARKESBERY, W. R. Changes in thiol content and expression of glutathione redox system genes in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett*, 302, n. 2-3, p. 141-145, Apr 20 2001. [https://doi.org/10.1016/S0304-3940\(01\)01636-6](https://doi.org/10.1016/S0304-3940(01)01636-6)

ARRUDA, Henrique Silvano; PASTORE, Glaucia Maria. Araticum (*Annona crassiflora* Mart.) as a source of nutrients and bioactive compounds for food and non-food purposes: A comprehensive review. *Food Research International*, v. 123, n. March, p. 450–480, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.05.011>

AUDDY, B *et al.* Screening of antioxidant activity of three Indian medicinal plants,

traditionally used for the management of neurodegenerative diseases. *Journal of ethnopharmacology*, v. 84, n. 2–3, p. 131–138, fev. 2003. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(02\)00322-7](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(02)00322-7)

AYDIN, Suleyman *et al.* Today's and yesterday's of pathophysiology: biochemistry of metabolic syndrome and animal models. *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)*, v. 30, n. 1, p. 1–9, jan. 2014. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2013.05.013>

BAHADORAN, Z.; MIRMIRAN, P.; AZIZI, F. Dietary polyphenols as potential nutraceuticals in management of diabetes: a review. *J Diabetes Metab Disord*, 12, n. 1, p. 43, 2013. <https://doi.org/10.1186/2251-6581-12-43>

BAILÃO, Elisa Flávia Luiz Cardoso *et al.* Bioactive compounds found in Brazilian cerrado fruits. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 16, n. 10, p. 23760–23783, 2015. <https://doi.org/10.3390/ijms161023760>

BARBOSA, Kiriague Barra Ferreira *et al.* Estresse oxidativo: Conceito, implicações e fatores modulatórios. *Revista de Nutricao*, v. 23, n. 4, p. 629–643, 2010. <https://doi.org/10.1590/S1415-52732010000400013>

BENJAMIN, Emelia J. *et al.* *Heart Disease and Stroke Statistics'2017 Update: A Report from the American Heart Association*. [S.l.: s.n.], 2017. v. 135. <https://doi.org/10.1161/CIR.0000000000000491>

BENZEI, I. F. & STRAIN, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal Biochem*. 1996; 239: 70–76. <https://doi.org/10.1006/abio.1996.0292>

BERTGES, L. C.; MOURÃO JUNIOR, C. A.; SOUZA, J. B.; CARDOSO, V. A. C. Hiperlipidemia induzida por Triton WR-1339 (Tyloxapol) em ratos Wistar. *Revista Brasileira de Ciências Médicas e da Saúde*, v. 1, n. 1, p. 29–31, 2010.

BEZERRA, Tânia Sulamytha *et al.* Induction of crystallization influences the

retention of volatile compounds in freeze-dried marolo pulp. *Drying Technology*, v. 36, n. 10, p. 1250–1262, 2018. <https://doi.org/10.1080/07373937.2017.1399275>

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 1976; 72: 248-254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Análise de Situação de Saúde. Plano de ações estratégicas para o enfrentamento das doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) no Brasil 2011-2022. Brasília: Ministério da Saúde, 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância de Doenças e Agravos não Transmissíveis e Promoção da Saúde. Saúde Brasil 2018 uma análise de situação de saúde e das doenças e agravos crônicos: desafios e perspectivas. Brasília: Ministério da Saúde, 2019.

BRASILEIRA, Sociedade. I Diretriz Brasileira de Hipercolesterolemia Familiar (HF). v. 99, 2012.

BRATU, M. M. *et al.*: Antioxidant Activity and Toxicity of *Sambucus nigra*, Food Technol. Biotechnol. 50 (2) 177–182 (2012).

Begriche K , Massart J , Robin MA , Bonnet F , Fromenty B . Adaptações mitocondriais e disfunções na doença hepática gordurosa não alcoólica. *Hepatology*. 2013 08 de janeiro. doi: 10.1002/hep.26226. [Epub ahead of print]. <https://doi.org/10.1002/hep.26226>

BROWNE, R. W.; ARMSTRONG, D. Reduced glutathione and glutathione disulfide. *Inf: Free Radical and Antioxidant Protocols*. Human Press, 1998. p. 347-352. <https://doi.org/10.1385/0-89603-472-0:347>

BURGESS, Stephen *et al.* Association of LPA Variants With Risk of Coronary

Disease and the Implications for Lipoprotein(a)-Lowering Therapies: A Mendelian Randomization Analysis. *JAMA cardiology*, v. 3, n. 7, p. 619–627, jul. 2018.

BURTON, G. J.; JAUNIAUX, E. Oxidative stress. Best practice & research. Clinical obstetrics & gynaecology, 25, n. 3, p. 287-299, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2010.10.016>

CARVALHO D. F., PAIVA A. A., MELO A. S., RAMOS A. T., MEDEIROS J. S., MEDEIROS C. C., *et al.* Perfil lipídico e estado nutricional de adolescentes. *Rev Bras Epidemiol*.2007;10(4):491-8. <https://doi.org/10.1590/S1415-790X2007000400007>

CATAPANO, A L; MAGGI, F M; TRAGNI, E. Low density lipoprotein oxidation, antioxidants, and atherosclerosis. *Current opinion in cardiology*, v. 15, n. 5, p. 355–363, set. 2000. <https://doi.org/10.1097/00001573-200009000-00008>

CHEN, Zhaojun *et al.* Effects of sanshoamides and capsaicinoids on plasma and liver lipid metabolism in hyperlipidemic rats. *Food Science and Biotechnology*, v. 28, n. 2, p. 519–528, 2019. <https://doi.org/10.1007/s10068-018-0466-2>

CHENG, Yu Chen *et al.* Polyphenols and Oxidative Stress in Atherosclerosis-Related Ischemic Heart Disease and Stroke. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, v. 2017, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/8526438>

DALLE-DONNE, I.; GIUSTARINI, D.; COLOMBO, R.; ROSSI, R. *et al.* Protein carbonylation in human diseases. *Trends in Molecular Medicine*, 9, n. 4, p. 169-176, 2003/04/01/ 2003. [https://doi.org/10.1016/S1471-4914\(03\)00031-5](https://doi.org/10.1016/S1471-4914(03)00031-5)

DA SILVA-SANTI, Lorena Gimenez *et al.* Liver Fatty Acid Composition and Inflammation in Mice Fed with High-Carbohydrate Diet or High-Fat Diet. *Nutrients*, v. 8, n. 11, out. 2016. <https://doi.org/10.3390/nu8110682>

DAVIES, Joanna M S *et al.* The Oxygen Paradox, the French Paradox, and age-related diseases. *GeroScience*, v. 39, n. 5–6, p. 499–550, dez. 2017.

<https://doi.org/10.1007/s11357-017-0002-y>

DE DUVE, C. H. The peroxysome: a new cytoplasmic organelle. *Proc. R. Soc. London. Ser. B*, London, v.173, p. 710-723,1969.

DE PASCUAL-TERESA, S; SANTOS-BUELGA, C; RIVAS-GONZALO, J C. Quantitative analysis of flavan-3-ols in Spanish foodstuffs and beverages. *Journal of agricultural and food chemistry*, v. 48, n. 11, p. 5331–5337, nov. 2000. <https://doi.org/10.1021/jf000549h>

DE SOUSA, Joubert Aires *et al.* Evaluation of DNA damage in Wistar rat tissues with hyperlipidemia induced by tyloxapol. *Experimental and molecular pathology*, v. 103, n. 1, p. 51–55, ago. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2017.06.009>

DEVAKI, M.; NIRUPAMA, R.; YAJURVEDI, H. N. Chronic stress-induced oxidative damage and hyperlipidemia are accompanied by atherosclerotic development in rats. *Stress*, 16, n. 2, p. 233-243, Mar 2013. <https://doi.org/10.3109/10253890.2012.719052>

DEY, A.; LAKSHMANAN, J. The role of antioxidants and other agents in alleviating hyperglycemia mediated oxidative stress and injury in liver. *Food Funct*, 4, n. 8, p. 1148-1184, Aug 2013. <https://doi.org/10.1039/c3fo30317a>

DIETZMANN, J.; THIEL, U.; ANSORGE, S.; NEUMANN, K. H. et al. Thiol-inducing and immunoregulatory effects of flavonoids in peripheral blood mononuclear cells from patients with end-stage diabetic nephropathy. *Free Radic Biol Med*, 33, n. 10, p. 1347-1354, Nov 15 2002. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(02\)01043-2](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(02)01043-2)

DUARTE, Marta M M F *et al.* Oxidative stress in hypercholesterolemia and its association with Ala16Val superoxide dismutase gene polymorphism. *Clinical biochemistry*, v. 43, n. 13–14, p. 1118–1123, set. 2010. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2010.07.002>

ENGELMANN, B.; STREICH, S.; SCHÖNTHIER, U. M.; RICHTER, W. O. et al. Changes of membrane phospholipid composition of human erythrocytes in hyperlipidemias. I. Increased phosphatidylcholine and reduced sphingomyelin in patients with elevated levels of triacylglycerol-rich lipoproteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism*, 1165, n. 1, p. 32-37, 1992/11/11/ 1992. [https://doi.org/10.1016/0005-2760\(92\)90072-4](https://doi.org/10.1016/0005-2760(92)90072-4)

FERGUSON, L R. Role of plant polyphenols in genomic stability. *Mutation research*, v. 475, n. 1–2, p. 89–111, abr. 2001. [https://doi.org/10.1016/S0027-5107\(01\)00073-2](https://doi.org/10.1016/S0027-5107(01)00073-2)

FERNÁNDEZ-MARTÍNEZ, Eduardo *et al.* Dietary chia seeds (*Salvia hispanica*) improve acute dyslipidemia and steatohepatitis in rats. *Journal of Food Biochemistry*, v. 43, n. 9, p. 1–17, 2019. <https://doi.org/10.1111/jfbc.12986>

FILOMENI, G.; GRAZIANI, I.; DE ZIO, D.; DINI, L. et al. Neuroprotection of kaempferol by autophagy in models of rotenone-mediated acute toxicity: possible implications for Parkinson's disease. *Neurobiology of Aging*, 33, n. 4, p. 767-785, 2012/04/01/ 2012. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2010.05.021>

FISBERG, Regina Mara *et al.* Índice de Qualidade da Dieta: avaliação da adaptação e aplicabilidade. *Revista de Nutrição*, v. 17, n. 3, p. 301–318, 2004. <https://doi.org/10.1590/S1415-52732004000300003>

FOLCH, J., LEES, M., STANLEY, G. H. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 1957; 497-509. <https://doi.org/10.1590/S1415-52732004000300003>

FRÜHBECK, G., *et al.* BAT: a new target for human obesity? *Trends in Pharmacological Sciences*. 2009;30(8):387–396. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2009.05.003>

FRANÇA, Lucas Martins *et al.* Syzygium cumini Leaf Extract Reverts

Hypertriglyceridemia via Downregulation of the Hepatic XBP-1s/PDI/MTP Axis in Monosodium L-Glutamate-Induced Obese Rats. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, v. 2019, 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/9417498>

FURUKAWA, Shigetada *et al.* Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *The Journal of clinical investigation*, v. 114, n. 12, p. 1752–1761, 2004. <https://doi.org/10.1172/JCI21625>

GARCEZ, Marcela Riccioppo *et al.* Prevalence of dyslipidemia according to the nutritional status in a representative sample of São Paulo. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, v. 103, n. 6, p. 476–484, 2014. <https://doi.org/10.5935/abc.20140156>

GÖBEL, Andy *et al.* Cholesterol and beyond - The role of the mevalonate pathway in cancer biology. *Biochimica et biophysica acta. Reviews on cancer*, v. 1873, n. 2, p. 188351, abr. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2020.188351>

GOLDSTEIN, Joseph L.; BROWN, Michael S. Regulation of the mevalonate pathway. *Nature*, v. 343, n. 6257, p. 425–430, 1990. <https://doi.org/10.1038/343425a0>

GU, L.; HOUSE, S. E.; WU, X.; OU, B. *et al.* Procyanidin and catechin contents and antioxidant capacity of cocoa and chocolate products. *J Agric Food Chem*, 54, n. 11, p. 4057-4061, May 31 2006. <https://doi.org/10.1021/jf060360r>

IBRAHIM, Abeer Y. *et al.* Evaluation of hypolipidemic Marrubium vulgare effect in Triton WR-1339-induced hyperlipidemia in mice. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, v. 9, n. 5, p. 453–459, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.apjtm.2016.03.038>

JABARPOUR, Maryam *et al.* The impact of dyslipidemia and oxidative stress on vasoactive mediators in patients with renal dysfunction. *International Urology and Nephrology*, v. 51, n. 12, p. 2235–2242, 2019. <https://doi.org/10.1007/s11255-019-02319-7>

JAVAID, Muhammad Shahid *et al.* Epigallocatechin Gallate as an anti-obesity

therapeutic compound: an in silico approach for structure-based drug designing. *Natural product research*, v. 32, n. 17, p. 2121–2125, set. 2018. <https://doi.org/10.1080/14786419.2017.1365074>

JUSTINO, A. B.; BARBOSA, M. F.; NEVES, T. V.; SILVA, H. C. G. et al. Stephalagine, an aporphine alkaloid from *Annona crassiflora* fruit peel, induces antinociceptive effects by TRPA1 and TRPV1 channels modulation in mice. *Bioorganic Chemistry*, 96, p. 103562, 2020/03/01/ 2020. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2019.103562>

JUSTINO, A. B.; FRANCO, R. R.; SILVA, H. C. G.; SARAIVA, A. L. et al. B procyanidins of *Annona crassiflora* fruit peel inhibited glycation, lipid peroxidation and protein-bound carbonyls, with protective effects on glycated catalase. *Scientific reports*, 9, n. 1, p. 19183-19183, 2019. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-55779-3>

JUSTINO, A. B.; PEREIRA, M. N.; VILELA, D. D.; PEIXOTO, L. G. et al. Peel of araticum fruit (*Annona crassiflora* Mart.) as a source of antioxidant compounds with α -amylase, α -glucosidase and glycation inhibitory activities. *Bioorganic Chemistry*, 69, p. 167-182, 12// 2016. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2016.11.001>

JUSTINO, Allisson Benatti et al. Hepatoprotective Properties of a Polyphenol-Enriched Fraction from *Annona crassiflora* Mart. Fruit Peel against Diabetes-Induced Oxidative and Nitrosative Stress. *Journal of agricultural and food chemistry*, v. 65, n. 22, p. 4428–4438, jun. 2017.

KHAN, M.; LIU, H.; WANG, J.; SUN, B. Inhibitory effect of phenolic compounds and plant extracts on the formation of advance glycation end products: A comprehensive review. *Food Research International*, 130, p. 108933, 2020/04/01/ 2020. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108933>

KHANNA, A. K.; RIZVI, F.; CHANDER, R. Lipid lowering activity of *Phyllanthus niruri* in hyperlipemic rats. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 82, n. 1, p. 19–22,

2002. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(02\)00136-8](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(02)00136-8)

KHLIFI, Rihab *et al.* Assessment of hypolipidemic, anti-inflammatory and antioxidant properties of medicinal plant *Erica multiflora* in triton WR-1339-induced hyperlipidemia and liver function repair in rats: A comparison with fenofibrate. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, v. 107, n. June, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2019.104404>

KINSCHERF, R.; CAFALTZIS, K.; RÖDER, F.; HILDEBRANDT, W. *et al.* Cholesterol levels linked to abnormal plasma thiol concentrations and thiol/disulfide redox status in hyperlipidemic subjects. *Free Radical Biology and Medicine*, 35, n. 10, p. 1286-1292, 2003/11/15/ 2003. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2003.07.001>

KLISIC, A.; ISAKOVIC, A.; KOCIC, G.; KAVARIC, N. *et al.* Relationship between Oxidative Stress, Inflammation and Dyslipidemia with Fatty Liver Index in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 126, n. 6, p. 371-378, Jun 2018. <https://doi.org/10.1055/s-0043-118667>

Koruk M, Taysi S, Savas MC, Yilmaz O, Akcay F, Karakok M. Oxidative Stress and Enzymatic Antioxidant Status in Patients with Nonalcoholic Steatohepatitis. *Ann Clin Lab Sci*. 2004; 34(1):57-62.

KUMAR, Gajendra *et al.* The hypolipidemic activity of Ayurvedic medicine, *Arogyavardhini vati* in Triton WR-1339-induced hyperlipidemic rats: A comparison with fenofibrate. *Journal of Ayurveda and integrative medicine*, v. 4, n. 3, p. 165–170, jul. 2013. <https://doi.org/10.4103/0975-9476.118707>

KUMAR, Sekar Ashok; SUDHAHAR, Varatharajan; VARALAKSHMI, Palaninathan. Protective role of eicosapentaenoate-lipoate (EPA-LA) derivative in combating oxidative hepatocellular injury in hypercholesterolemic atherogenesis. *Atherosclerosis*, v. 189, n. 1, p. 115–122, nov. 2006.

<https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2005.11.037>

KUMARI, S. S.; MENON, V. P. Changes in levels of lipid peroxides and activities of superoxide dismutase and catalase in isoproterenol induced myocardial infarction in rats. *Indian J Exp Biol*, 25, n. 6, p. 419-423, Jun 1987.

KUNNEN, Sandra; VAN ECK, Miranda. Lecithin:cholesterol acyltransferase: old friend or foe in atherosclerosis? *Journal of lipid research*, v. 53, n. 9, p. 1783–1799, set. 2012. <https://doi.org/10.1194/jlr.R024513>

LEE, Y. A.; KIM, Y. J.; CHO, E. J.; YOKOZAWA, T. Ameliorative effects of proanthocyanidin on oxidative stress and inflammation in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Agric Food Chem*, 55, n. 23, p. 9395-9400, Nov 14 2007. <https://doi.org/10.1021/jf071523u>

LIBBY, Peter *et al.* Atherosclerosis. *Nature Reviews Disease Primers*, v. 5, n. 1, p. 1–18, 2019. <https://doi.org/10.1038/s41572-019-0106-z>

LEVINE, R. L.; GARLAND, D.; OLIVER, C. N.; AMICI, A. *et al.* Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol*, 186, p. 464-478, 1990. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(90\)86141-H](https://doi.org/10.1016/0076-6879(90)86141-H)

LEVINE, S.; SALTZMAN, A. A procedure for inducing sustained hyperlipemia in rats by administration of a surfactant. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, v. 55, n. 2, p. 224-226, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.vascn.2006.05.009>

LILI, J.; TIANYU, L.; ZHENGTAO, W. Pyrrolizidine alkaloid clivorine induced oxidative injury on primary cultured rat hepatocytes. *Human & Experimental Toxicology*, 29, n. 4, p. 303-309, 2010/04/01 2010. <https://doi.org/10.1177/0960327110361757>

LIMA, A. B.; DELWING-DE LIMA, D.; VIEIRA, M. R.; POLETTTO, M. Z. *et*

al. Hypolipemiant and antioxidant effects of *Eugenia brasiliensis* in an animal model of coconut oil-induced hypertriglyceridemia. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 96, p. 642-649, 2017/12/01/ 2017. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.10.047>

LIN, D.; XIAO, M.; ZHAO, J.; LI, Z. et al. An Overview of Plant Phenolic Compounds and Their Importance in Human Nutrition and Management of Type 2 Diabetes. *Molecules*, 21, n. 10, Oct 15 2016. <https://doi.org/10.3390/molecules21101374>

LU, J. M.; LIN, P. H.; YAO, Q.; CHEN, C. Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: experimental approaches and model systems. *J Cell Mol Med*, 14, n. 4, p. 840-860, Apr 2010. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2009.00897.x>

LUBOS, Edith; HANDY, Diane E; LOSCALZO, Joseph. Role of oxidative stress and nitric oxide in atherothrombosis. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*, v. 13, p. 5323–5344, maio 2008. <https://doi.org/10.2741/3084>

Madan K, Bhardwaj P, Thareja S, Dattagupta S, Saraya A. Oxidant stress and antioxidant status among patients with nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). *J Clin Gastroenterol*. 2006;40(10):930–5. <https://doi.org/10.1097/01.mcg.0000212608.59090.08>

MARKLUND, S.; MARKLUND, G. Involvement of the Superoxide Anion Radical in the Autoxidation of Pyrogallol and a Convenient Assay for Superoxide Dismutase. *Eur. J. Biochem*. 1974; 47(3): 234-247. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1974.tb03714.x>

MOLDOGAZIEVA, N T et al. ROS and RNS signalling: adaptive redox switches through oxidative/nitrosative protein modifications. *Free radical research*, v. 52, n. 5, p. 507–543, maio 2018. <https://doi.org/10.1080/10715762.2018.1457217>

MORAIS CARDOSO, Leandro De et al. *Araticum* (*Annona crassiflora* Mart.) from

the Brazilian Cerrado: Chemical composition and bioactive compounds. *Fruits*, v. 68, n. 2, p. 121–134, 2013. <https://doi.org/10.1051/fruits/2013058>

OH, Phil Sun; LEE, Sei Jung; LIM, Kye Taek. Hypolipidemic and antioxidative effects of the plant glycoprotein (36 kDa) from *Rhus verniciflua* stokes fruit in triton WR-1339-induced hyperlipidemic mice. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, v. 70, n. 2, p. 447–456, 2006. <https://doi.org/10.1271/bbb.70.447>

Oliveira CPMS, Coelho AMM, Barbeiro HV, Lima VMR, Soriano F, Ribeiro C, et al. Liver mitochondrial dysfunction and oxidative stress in the pathogenesis of experimental nonalcoholic fatty liver disease. *Braz J Med Biol Res*. 2006;39(2) 189-194. <https://doi.org/10.1590/S0100-879X2006000200004>

OWEN, S. C.; DOAK, A. K.; GANESH, A. N.; NEDYALKOVA, L. et al. Colloidal drug formulations can explain "bell-shaped" concentration-response curves. *ACS chemical biology*, 9, n. 3, p. 777-784, 2014. <https://doi.org/10.1021/cb4007584>

PAREDES-LÓPEZ, Octavio *et al.* Berries: improving human health and healthy aging, and promoting quality life--a review. *Plant foods for human nutrition (Dordrecht, Netherlands)*, v. 65, n. 3, p. 299–308, set. 2010. <https://doi.org/10.1007/s11130-010-0177-1>

PEREIRA, M. N.; JUSTINO, A. B.; MARTINS, M. M.; PEIXOTO, L. G. et al. Stephalagine, an alkaloid with pancreatic lipase inhibitory activity isolated from the fruit peel of *Annona crassiflora* Mart. *Industrial Crops and Products*, 97, p. 324-329, 3// 2017. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.12.038>

Perlemuter G, Davit-Spraul A, Cosson C, Conti M, Bigorgne A, Paradis V, et al. Increase in liver antioxidant enzyme activity in non-alcoholic fatty liver disease. *Liver Int*. 2005;25(5):946–53. <https://doi.org/10.1111/j.1478-3231.2005.01126.x>

POMPELLA, A.; VISVIKIS, A.; PAOLICCHI, A.; DE TATA, V. et al. The changing

faces of glutathione, a cellular protagonist. *Biochem Pharmacol*, 66, n. 8, p. 1499-1503, Oct 15 2003. [https://doi.org/10.1016/S0006-2952\(03\)00504-5](https://doi.org/10.1016/S0006-2952(03)00504-5)

POPA-WAGNER, Aurel *et al.* Oximed2013-963520. v. 2013, n. Figure 1, 2013.

POZZAN, Roselee *et al.* Dislipidemia, Síndrome Metabólica e RiscoCardiovascular. *Revista da SOCERJ*, v. 17 n°2, p. 97–102, 2004.

REIS, Mauro *et al.* A theoretical study of phenolic compounds with antioxidant properties. *European journal of medicinal chemistry*, v. 42, n. 4, p. 440–446, abr. 2007. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2006.11.008>

REZNICK, A. Z.; PACKER, L. Oxidative damage to proteins: Spectrophotometric method for carbonyl assay. *Methods in enzymology*. 1994; 233: 357-363. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(94\)33041-7](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(94)33041-7)

ROCHA, Juliana Trevisan Da *et al.* Hypolipidaemic activity of orally administered diphenyl diselenide in Triton WR-1339-induced hyperlipidaemia in mice. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 61, n. 12, p. 1673–1679, 2009. <https://doi.org/10.1211/jpp/61.12.0013>

ROESLER, Roberta *et al.* Antioxidant activity of *Annona crassiflora*: Characterization of major components by electrospray ionization mass spectrometry. *Food Chemistry*, v. 104, n. 3, p. 1048–1054, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.01.017>

SHEPHERD, Alison. Obesity: prevalence, causes and clinical consequences. *Nursing standard (Royal College of Nursing (Great Britain) : 1987)*, v. 23, n. 52, p. 51–7; quiz 58, set. 2009. <https://doi.org/10.7748/ns.23.52.51.s52>

SHI, Yinghua *et al.* The regulation of alfalfa saponin extract on key genes involved in hepatic cholesterol metabolism in hyperlipidemic rats. *PloS one*, v. 9, n. 2, p. e88282, 2014. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0088282>

SHYAMALA, M. P.; PARAMUNDAYIL, J. J.; VENUKUMAR, M. R.; LATHA, M. S. Probing the anti-hyperlipidemic efficacy of the allspice (*Pimenta officinalis* Lindl.) in rats fed with high fat diet. *Indian J Physiol Pharmacol*, 49, n. 3, p. 363-368, Jul-Sep 2005.

SU, Xin; KONG, Yi; PENG, Daoquan. Evidence for changing lipid management strategy to focus on non-high density lipoprotein cholesterol. *Lipids in Health and Disease*, v. 18, n. 1, p. 1–7, 2019. <https://doi.org/10.1186/s12944-019-1080-x>

SUZUKI, Y. J.; CARINI, M.; BUTTERFIELD, D. A. Protein carbonylation. *Antioxidants & redox signaling*, 12, n. 3, p. 323-325, 2010. <https://doi.org/10.1089/ars.2009.2887>

TABASSUM, H.; PARVEZ, S.; REHMAN, H.; BANERJEE, B. D. et al. Catechin as an antioxidant in liver mitochondrial toxicity: Inhibition of tamoxifen-induced protein oxidation and lipid peroxidation. *J Biochem Mol Toxicol*, 21, n. 3, p. 110-117, 2007. <https://doi.org/10.1002/jbt.20167>

TAN, Hor-Yue *et al.* Preclinical Models for Investigation of Herbal Medicines in Liver Diseases: Update and Perspective. *Evidence-based complementary and alternative medicine: eCAM*, v. 2016, p. 4750163, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/4750163>

TORRES, Mylena Andréa Oliveira *et al.* One Plant, Many Uses: A Review of the Pharmacological Applications of *Morinda citrifolia*. *Phytotherapy Research*, v. 31, n. 7, p. 971–979, 2017. <https://doi.org/10.1002/ptr.5817>

WAGNER, H.; ULRICH-MERZENICH, G. Synergy research: approaching a new generation of phytopharmaceuticals. *Phytomedicine*, 16, n. 2-3, p. 97-110, Mar 2009. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2008.12.018>

World Health Organization. Cardiovascular diseases (CVDs) Fact Sheet. 2017.

XAVIER, HT *et al.* V Brazilian Guidelines of dyslipidemias prevention of atherosclerosis. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, v. 101, n. 4, p. 1–22, 2013.

Xie W, Wang W, Su H, Xing D, Cai G, Du L. Hypolipidemic mechanisms of *Ananas comosus* L. leaves in mice: different from fibrates but similar to statins. *J Pharmacol Sci* 2007 Mar;103(3):267-74. <https://doi.org/10.1254/jphs.FP0061244>

XU, Huanji *et al.* Cholesterol metabolism: New functions and therapeutic approaches in cancer. *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer*, v. 1874, n. 1, p. 188394, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2020.188394>

YAGI, K. Simple procedure for specific assay of lipid hydroperoxides in serum or plasma. In: *Free radical and antioxidant protocols*. Human Press. 1998. p. 107-110. <https://doi.org/10.1385/0-89603-472-0:107>

YANG, R.-L.; SHI, Y.-H.; HAO, G.; LI, W. *et al.* Increasing Oxidative Stress with Progressive Hyperlipidemia in Human: Relation between Malondialdehyde and Atherogenic Index. *Journal of clinical biochemistry and nutrition*, 43, n. 3, p. 154-158, 2008. <https://doi.org/10.3164/jcbn.2008044>


ZARZECKI, Micheli Stéfani *et al.* Hypolipidemic action of chrysin on Triton WR-1339-induced hyperlipidemia in female C57BL/6 mice. *Toxicology reports*, v. 1, p. 200–208, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2014.02.003>

ZEKA, K.; RUPARELIA, K.; ARROO, R. R. J.; BUDRIESI, R. *et al.* Flavonoids and Their Metabolites: Prevention in Cardiovascular Diseases and Diabetes. *Diseases* (Basel, Switzerland), 5, n. 3, p. 19, 2017. <https://doi.org/10.3390/diseases5030019>

ZHANG, Jixiang *et al.* ROS and ROS-Mediated Cellular Signaling. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. [S.l.: s.n.], , 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/4350965>

8. Anexos

Anexo 1: Autorização de acesso e de remessa de componente do patrimônio genético.

<div data-bbox="424 555 603 640"></div> <p data-bbox="309 663 727 712">Autorização de Acesso e de Remessa de Componente do Patrimônio Genético</p> <p data-bbox="242 734 794 873">O Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq, nos termos Deliberação 246/2009, do Conselho de Gestão do Patrimônio Genético, autoriza a instituição identificada no verso deste documento a acessar e remeter componente do Patrimônio Genético com a finalidade de pesquisa científica.</p> <p data-bbox="373 913 663 938">Brasília, 02 de outubro de 2015</p> <p data-bbox="280 956 756 1041">Marcelo Marcos Morales Diretor de Ciências Agrárias, Biológicas e da Saúde PO 513/2013</p>	<p data-bbox="807 629 1042 651">Processo: 010743/2015-4</p> <p data-bbox="807 663 1126 685">Validade: 02/11/2015 a 02/11/2017</p> <p data-bbox="807 696 1337 719">Instituição: UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA</p> <p data-bbox="807 730 1067 752">CNPJ: 256.483.870/0001-18</p> <p data-bbox="807 763 1161 786">Pesquisador: Foued Salmen Espindola</p> <p data-bbox="807 797 1003 819">CPF: 242.039.476-34</p> <p data-bbox="807 831 1054 853">RG: M1189277 - SSP / MG</p> <p data-bbox="807 880 1353 1019"><i>Para visualizar a versão digital da Autorização de Acesso e de Remessa de Componente do Patrimônio Genético, V.Sa. poderá utilizar a ferramenta disponibilizada pelo CNPq para esse fim na página http://servicosweb.cnpq.br/visualizador e informar o número do protocolo 9504814591790738 para recuperá-la do banco de dados do CNPq</i></p>
---	--

**Anexo 2: Formulário de parecer do Comitê de Ética na Utilização de Animais
– CEUA/UFU nº 039/19.**



Universidade Federal de Uberlândia
– Comissão de Ética na Utilização de Animais –



CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Avaliação das propriedades hipolipidêmica, antiinflamatórias e antioxidantes de polifenóis da *Annona crassiflora* Mart. na hiperlipidemia induzida por Triton WR-1339 (tilioxapol) em camundongos.", protocolo nº 039/19, sob a responsabilidade de **Foued Salmen Espindola** – que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata, para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADA** pela COMISSÃO DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS (CEUA) da UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA, em reunião 23 de Agosto de 2019.

(We certify that the project entitled "Avaliação das propriedades hipolipidêmica, antiinflamatórias e antioxidantes de polifenóis da *Annona crassiflora* Mart. na hiperlipidemia induzida por Triton WR-1339 (tilioxapol) em camundongos.", protocol 039/19, under the responsibility of **Foued Salmen Espindola** - involving the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata, for purposes of scientific research - is in accordance with the provisions of Law nº 11.794, of October 8th, 2008, of Decree nº 6.899 of July 15th, 2009, and the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA) and it was approved for ETHICS COMMISSION ON ANIMAL USE (CEUA) from FEDERAL UNIVERSITY OF UBERLÂNDIA, in meeting of August 23th, 2019).

Vigência do Projeto	Início: 02/09/2019 Término: 31/08/2020
Espécie / Linhagem / Grupos Taxonômicos	Camundongo Isogênico
Número de animais	243
Peso / Idade	20g/ 06 semanas
Sexo	Macho
Origem / Local	Rede de Biotérios – UFU (REBIR – UFU)
Local onde serão mantidos os animais:	Rede de Biotérios – UFU (REBIR – UFU)

Uberlândia, 29 de Agosto de 2019.

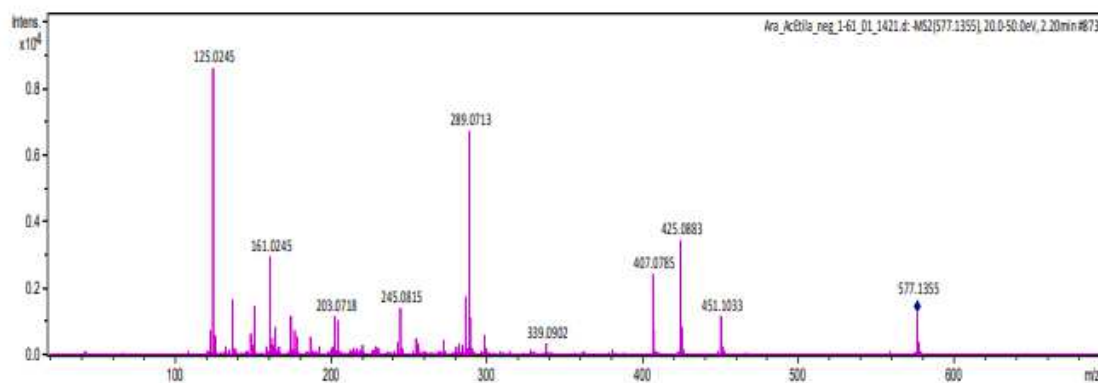
Prof. Dr. Lúcio Vilela Carneiro Girão
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Comissão de Ética na Utilização de Animais /UFU
Coordenador da CEUA
Portaria Nº 342 DE 10 DE MAIO DE 2019

Anexo 3: Composição básica da ração padrão oferecida aos animais durante o experimento.

Composição	g/kg
Umidade	125
Proteína bruta	220
Extrato etéreo	50
Material mineral	90
Fibra bruta	70

Ingredientes: milho integral moído, farelo de soja, farelo de trigo, carbonato de cálcio, fosfato bicálcico, cloreto de sódio, óleo vegetal, vitamina A, vitamina D3, vitamina E, vitamina K3, vitamina B1,B2, B3, B6,B7, B9, B12, pantotenato de cálcio, cloreto de colina, sulfato de ferro, sulfato de manganês, sulfato de zinco, sulfato de cobre, iodato de cálcio, selenito de sódio, sulfato de cobalto, lisina, metionina, BHT.

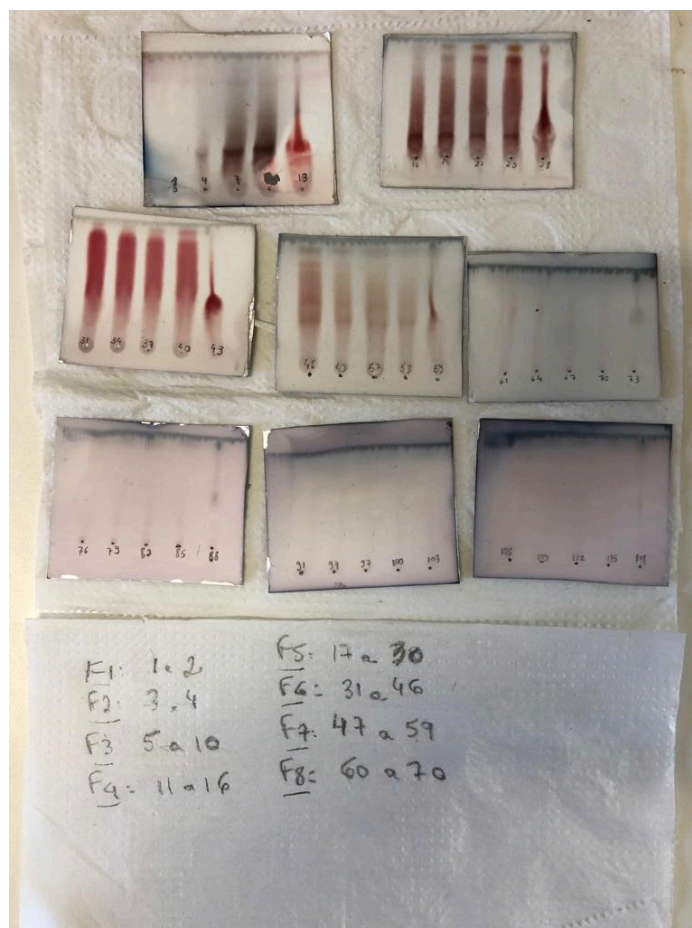
Anexo 4: Espectro de MS/MS do composto Proantocianidina B2 identificado na fração acetato de etila.



Anexo 5: Peso dos compostos na fração acetato de etila identificados por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrômetro de massa com ionização por electrospray (CLAE-ESIEM/EM).

Frações	Peso (g)
F1 (1 e 2)	0,001
F2 (3 e 4)	0,013
F3 (5 a 10)	0,136
F4 (11 a 16)	0,284
F5 (17 a 30)	0,787
F6 (31 a 46)	0,343
F7 (47 a 59)	0,036
F8 (60 a 70)	0,008
F9 (71 a 85)	0,025
F10 (86 a 101)	0,01
F11 (104 a 116)	0,001

Anexo 6: Fotos dos compostos da fração acetato de etila identificados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC).



Anexo 7: Tabelas de consumo alimentar e hídrico (a) e massa corporal (b) dos camundongos C57BL/6 durante o experimento.

(a) Tabela de consumo alimentar e hídrico diário por animal de cada grupo, expresso em gramas e mililitros.

A						B				
Consumo ração por animal por dia (g)						Consumo hídrico por animal por dia (mL)				
	Naive	Veículo	10mg/kg	30mg/kg	100mg/kg	Naive	Veículo	10mg/kg	30mg/kg	100mg/kg
EtOH	4,84	3,89	3,27	3,76	4,1	5,34	4,71	4,43	4,43	5,18
AcEt	3,66	3,41	3,59	3,56	3,87	6,93	6,86	6,96	5,93	6,28
PCND	4,91	5,3	4,44	4,32	4,23	5,09	4,71	4,5	4,64	4,43

Consumo alimentar e hídrico dos camundongos da linhagem C57BL/6 expressos em gramas e mililitros (A) e (B). A ração e água utilizada foi padrão utilizado pelo biotério para todos os grupos, Grupo Naive (água destilada por gavagem); Veículo (água destilada e administração intraperitoneal de 400mg/kg Triton WR-1339); e grupos pré tratados por 12 dias e uma dose após administração intraperitoneal de 400mg/kg Triton WR-1339 de Extrato Bruto (EtOH), Acetato de Etila (AcEt) e Proantocianidinas (PCND) em concentrações de 10, 30 e 100mg/kg. Valores expressos pela divisão do consumo diário da gaiola de cada grupo dividido pela quantidade de animais.

(b) Tabela de massa corporal inicial, final e ganho de peso dos camundongos de cada grupo, expresso em gramas.

(g)	EtOH					AcEt			PCND		
	Naive	Veículo	10 mg/kg	30mg/kg	100mg/kg	10 mg/kg	30mg/kg	100mg/kg	10 mg/kg	30mg/kg	100mg/kg
Peso inicial	21,63±0,52	20,67±0,45	20,29±0,80	18,84±0,53	19,19±0,27	20,74±1,12	20,1±1,01	19,18±1,19	20,92±0,59	20,36±0,77	21,0±0,81
Peso final	22,53±0,55	21,79±0,66	21,3±0,73	20,12±0,50	20,15±0,24	21,78±1,20	21,36±0,93	20,38±0,92	21,74±0,78	21,26±0,51	21,94±0,48
Ganho peso	0,90±0,25	1,12±0,33	1,01±0,12	1,28±0,33	0,96±0,17	1,04±0,18	1,26±0,29	1,20±0,41	0,82±0,14	0,9±0,15	0,94±0,38

Ganho de peso corporal dos camundongos da linhagem C57BL/6 recebendo dieta padrão. Grupo Naive (água destilada); Veículo (água destilada e administração intraperitoneal de 400mg/kg Triton WR-1339); e dos grupos que receberam pré-tratamento por 12 dias e uma dose após administração intraperitoneal de 400mg/kg Triton WR-1339 de Extrato Bruto (EtOH), Acetato de Etila (AcEt) e Proantocianidinas (PCND) em concentrações de 10, 30 e 100mg/kg. Valores expressos como média ± erro padrão.