

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**

**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

**PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR**

**E ESTRUTURAL APLICADAS**

Avaliação dos efeitos antioxidantes do extrato de *Annona crassiflora* Mart. e seus polifenóis em miocárdio de camundongos hiperlipidêmicos

Aluna: Eliana Akemi Komino

**Orientador: Prof<sup>o</sup>. Dr. Foued Salmen Espíndola**

**Co-Orientador: Dr. Allisson Benatti Justino**

**UBERLÂNDIA - MG**

**2022**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**

**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

**PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR**

**E ESTRUTURAL APLICADAS**

Avaliação dos efeitos antioxidantes do extrato de *Annona crassiflora* Mart. e seus polifenóis em miocárdio de camundongos hiperlipidêmicos

Aluna: Eliana Akemi Komino

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas da Universidade Federal de Uberlândia como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Biologia Celular

Orientador: Prof. Dr. Foued Salmen Espíndola

Co-Orientador: Dr. Allisson Benatti Justino

**UBERLÂNDIA - MG**

**2022**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

---

K81a  
2022 Komino, Eliana Akemi, 1986-  
Avaliação dos efeitos antioxidantes do extrato de *Annona crassiflora* Mart. e seus polifenóis em miocárdio de camundongos hiperlipidêmicos [recurso eletrônico] / Eliana Akemi Komino. - 2022.

Orientador: Foued Salmen Espíndola.  
Coorientador: Allisson Benatti Justino.  
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas.  
Modo de acesso: Internet.  
Disponível em: <http://doi.org/10.14393/ufu.di.2023.6011>  
Inclui bibliografia.

1. Biologia celular. I. Espíndola, Foued Salmen, 1957-, (Orient.). II. Justino, Allisson Benatti, 1992-, (Coorient.). III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas. IV. Título.

CDU: 576.3

---

Rejâne Maria da Silva – CRB6/1925



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**  
 Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural  
 Aplicadas  
 Rua Piauí, Bloco 2B, Sala 2B218 - Bairro Umarama, Uberlândia-MG, CEP 38400-902  
 Telefone: 34 3225-8484 - ppgbc@icbim.ufu.br



### ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em:	Biologia Celular e Estrutural Aplicadas				
Defesa de:	Dissertação de Mestrado Acadêmico , número 10/2022, do PPGBC				
Data:	22 de Dezembro de 2022	Hora de início:	[08:00]	Hora de encerramento:	10:00
Matrícula do Discente:	12012BCE002				
Nome do Discente:	Eliana Akemi Komino				
Título do Trabalho:	Avaliação dos efeitos antioxidantes do extrato etanólico da casca do fruto da <i>Annona crassiflora</i> Mart. e seus polifenóis em miocárdio de camundongos hiperlipidêmicos induzidos por Triton WR-1339 (Tyloxapol)				
Área de concentração:	Biologia Celular				
Linha de pesquisa:	Biotecnologia				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	Plantas Medicinais e Frutos do Cerrado e Diabetes				

Reuniu-se a, por Videoconferência, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas, da Universidade Federal de Uberlândia, assim composta: Professores Doutores: Luciana Karen Calábria – Campus Pontal/UFU; Eugenio Luigi Iorio – UNIUBE; e Foued Salmen Espindola orientador da candidata.

A Banca foi realizada de forma virtual.

Iniciando os trabalhos o presidente da mesa, Dr. Foued Salmen Espindola, apresentou a Comissão Examinadora e a candidata, agradeceu a presença do público, e concedeu à Discente Eliana Akemi Komino 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 presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos examinadores, que passaram a arguir a candidata. Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando a candidata:

Aprovada.

Esta defesa faz 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 Foued Salmen Espíndola, Professor(a) do Magistério Superior, em 22/12/2022, às 09:33, 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 Luciana Karen Calabria, Professor(a) do Magistério Superior, em 22/12/2022, às 09:33, 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 Eugenio Luigi Iorio, Usuário Externo, em 22/12/2022, às 12:03, 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](https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador 4142067 e o código CRC 105C6219.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

**PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR**  
**E ESTRUTURAL APLICADAS**

Avaliação dos efeitos antioxidantes do extrato de *Annona crassiflora* Mart. e seus polifenóis em miocárdio de camundongos hiperlipidêmicos

Aluna: Eliana Akemi Komino

COMISSÃO EXAMINADORA

**Presidente: Prof.º Dr. Foued Salmen Espíndola**

**Examinadores:**

**Prof.º Dr. Eugenio Luigi Iorio**

**Prof.ª Dr. Luciana Karen Calábria**

**Data da defesa: 22/12/2022**

Dedico este trabalho a todos os pesquisadores que almejam a disseminação de informação para construção de conhecimento em favor da consciência, do discernimento e da liberdade. E, a todos os professores, que um dia, reacenderam minha avidez em aprender.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço ao desafio de viver, à possibilidade de sonhar e aos que acreditaram e me deram forças nessa trajetória. Agradeço aos meus pais que não mediram esforços para eu poder me dedicar aos estudos e me incentivaram de todas as formas para eu concluir mais este desafio.

Agradeço aos meus avós que foram exemplos em vida e me deixaram lembranças tão valiosas (in memoriam), agradeço à minha “Batian” que sempre me apoiou e me ensinou a valorizar a importância dos estudos. Agradeço aos meus irmãos com que compartilhei as primeiras etapas da vida. Agradeço aos amigos que foram presentes e aos que se mantiveram distantes, mas ansiosos por notícias, vocês foram importantes quando pude compartilhar alegrias e dificuldades.

Agradeço aos professores e mestres que me inspiraram a entender e acolher a causa humana. Agradeço ao Professor Doutor Foued Salmen Espindola, pela orientação, compreensão e oportunidade de crescimento e amadurecimento acadêmico-científico. Agradeço ao meu co-orientador Doutor Allisson Benatti Justino pelo apoio durante todo o mestrado e elaboração deste trabalho.

Agradeço à equipe do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal de Uberlândia, Doutora Adriele de Souza, Doutora Renata Teixeira, Doutor Douglas Caixeta, Mestre Leticia Afonso, Vinícius Bittar e Ana Luíza pela amizade, dedicação e apoio na realização dos experimentos. Aos órgãos de fomento que possibilitam a execução e manutenção deste trabalho.

Agradeço à banca examinadora que aceitou o convite neste fim de ano.

Muito obrigada.



“A nossa mais elevada tarefa deve ser a de formar seres humanos livres que sejam capazes de, por si mesmos, encontrar propósito e direção para suas vidas.”

Rudolf Steiner

## RESUMO

A dislipidemia e o estresse oxidativo têm relação direta na patogênese das doenças cardiovasculares. *Annona crassiflora* Mart. (ACM) tem sido utilizada pela medicina popular no tratamento de inflamações e dores, sendo esta planta uma fonte de polifenóis com alta capacidade antioxidante. No presente estudo, as propriedades antioxidantes da ACM foram elucidadas em modelo de camundongos hiperlipidêmicos (HLc) induzidos por injeção intraperitoneal de Triton WR-1339 sob administração oral de extrato bruto ou fração enriquecida de polifenóis da casca de frutos ACM. A análise de componentes principais e a correlação de Pearson revelaram associações positivas entre dados bioquímicos fecais e sanguíneos com biomarcadores de estresse oxidativo cardíaco. Aqui, o extrato bruto (CEAc) foi capaz de aumentar o teor de glutathiona reduzida (GSH) e reduzir a atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathiona peroxidase, quando comparado ao grupo veículo sem tratamento. A fração rica em polifenóis do CEAc foi capaz de aumentar a capacidade antioxidante total, os níveis de GSH e a atividade das enzimas SOD e CAT, em comparação ao grupo veículo. Além disso, esta fração diminuiu o teor de carbonilas, a peroxidação lipídica e a atividade das enzimas glutathiona redutase e glicose-6-fosfato desidrogenase em relação ao grupo veículo. A casca do fruto ACM apresentou melhora no sistema glutathiona, principalmente quando utilizada a fração enriquecida com polifenóis, indicando um potencial uso antioxidante cardioprotetor deste extrato vegetal.

Palavras-chave: Dislipidemia. Araticum. Estresse oxidativo

## ABSTRACT

Dyslipidemia and oxidative stress have a straight relation in pathogenesis of cardiovascular diseases. *Annona crassiflora* Mart. (ACM) has been used to treat inflammation and pain in folk medicine, being this plant a source of polyphenols presenting a high antioxidant capacity. In the present study, the antioxidant properties of ACM were elucidated in hyperlipidemic (HLC) mice model induced by intraperitoneal injection of Triton WR-1339 under oral administration of crude extract (CEAc) or polyphenol enriched fraction of ACM fruit peel. Principal component analysis and Pearson's correlation revealed positive associations between blood and fecal biochemical data with cardiac oxidative stress biomarkers. Here, CEAc was able to increase the reduced glutathione content (GSH) and reduce the enzymatic activities of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase, when compared to the vehicle group without treatment. The polyphenols-rich fraction from CEAc was able to enhance the total antioxidant capacity, the GSH content, SOD and CAT enzymatic activities, comparing to vehicle group. Moreover, this fraction decreased carbonyl content, lipid peroxidation and glutathione reductase and glucose-6-phosphate dehydrogenase enzymatic activities, also comparing to vehicle group. ACM fruit peel showed improvement in glutathione system, mainly when used polyphenol enriched fraction, indicating a potential cardioprotective antioxidant usage of this plant extract.

**Keywords:** Dyslipidemia. Araticum. Oxidative stress

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Mortalidade global, causa de morte e diferença da distribuição da causa de morte por idade e sexo.....	23
Figura 2: Vias metabólicas exógena e endógena das lipoproteínas.....	28
Figura 3: Representação esquemática de dislipidemia em síndrome metabólica.....	30
Figura 4: Dieta de estilo ocidental rica em gorduras induzindo inflamação e disbiose, associados a patogênese de dislipidemia, resistência periférica à insulina.....	33
Figura 5: Uma dieta rica em gordura e hiperpermeabilidade intestinal.....	34
Figura 6: Proposta de mecanismos fisiológicos de importância para a síndrome metabólica ....	35
Figura 7: Patofisiologia associadas à dieta ocidental, saúde intestinal e estresse oxidativo .....	37
Figura 8: Formação de aterosclerose.....	40
Figura 9: Glicação e oxidação de LDL.....	41
Figura 10: Os lipídeos, com papel relevante no aparecimento de doenças cardiovasculares e suscetíveis à oxidação.....	46
Figura 11: Efeitos fisiológicos das lipoproteínas lipoxidadas, com consequências no sistema imunitário, inflamação, apoptose e função do HDL .....	48
Figura 12: Mecanismo de ação do Triton WR-1339 (tyloxapol) .....	50
Figura 13: Classificação de polifenóis .....	51
Figura 14: Proteção antioxidante e ações metabólicas da suplementação de polifenóis.....	53
Figura 15: <i>Annona crassiflora</i> Mart.....	55
Figura 16: Delineamento experimental dos camundongos C57BL/6 tratados e não tratados com os compostos (CEAc e PFAc) .....	60
Figura 17: Linha do tempo do delineamento experimental .....	61
Tabela 1: Variação dos níveis de colesterol total plasmático, em mg/dL .....	69
Tabela 2: Variação dos níveis de TG plasmático, em mg/dL .....	70

Tabela 3: Níveis de lipídeos totais fecais, colesterol total fecal e TG fecais, em mg/g, sendo estes coletados antes e pós administração intraperitoneal por Triton WR-1339.....	71
Figura 18: Peroxidação lipídica.....	72
Figura 19: Carbonilação de proteínas .....	73
Figura 20: Conteúdo de tióis .....	74
Figura 21: Atividade da enzima superóxido dismutase .....	75
Figura 22: Atividade da enzima catalase .....	76
Figura 23: Capacidade antioxidante total .....	77
Figura 24: Conteúdo de glutathiona reduzida .....	78
Figura 25: Atividade da enzima glutathiona peroxidase .....	79
Figura 26: Atividade da enzima glutathiona redutase .....	80
Figura 27: Atividade da enzima Glicose 6-fosfato desidrogenase .....	81
Figura 28: Correlação de Pearson entre triglicerídeos plasmáticos, colesterol plasmático e lipídeos fecais .....	82
Figura 29: Correlação de Pearson entre parâmetros lipídicos plasmáticos, dano oxidativo e perfil antioxidante .....	83
Tabela 4: Resultados dos parâmetros de danos oxidativos e perfil antioxidantes nos camundongos que receberam CEAc e PFAC após indução de hiperlipidemia aguda por tyloxapol .....	92

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

•O <sub>2</sub> -	Ânion superóxido
ACM	<i>Annona crassiflora</i> Mart.
AGL	Ácidos graxos livres
AMPK	Proteína quinase ativada por monofosfato de adenosina
Apo B	Apolipoproteína B
ARE	Elemento de resposta antioxidante
AVEs	Acidentes vasculares encefálicos
BSA	Albumina do soro bovino
CAT	Catalase
CEAc	Extrato bruto etanólico
CP	Proteína carbonilada
CT	Colesterol total
DAC	Doença arterial coronariana
DAMP	Padrões moleculares associados a danos
DCNT	Doenças crônicas não transmissíveis
DCV	Doenças cardiovasculares
DHA	Ácido graxo docosahexaenoico
DMPC	1,2-dimiristoil-sn-glicerol-3-fosfocolina
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNP	Dinitrofenil
DNPH	2,4-dinitrofenil-hidrazina
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EGCG	Potencial antioxidante do epigalocatequina-3-galato
EPA	Ácido graxo eicosapentaenoico
EROs	Espécies reativas de oxigênio
ERNs	Espécies reativas de nitrogênio
FRAP	Poder antioxidante de redução do íon férrico
FXR	Receptor farnesóide X
G6PDH	Glicose-6-fosfato desidrogenase

GPIHBP1	Proteína de ligação à lipoproteína de alta densidade ancorada ao glicosilfosfatidilinositol
GPx	Glutathione peroxidase
GR	Glutathione reductase
GSH	Glutathione reduzida
GSSG	Glutathione oxidada
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogênio
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HepG2	Linhagem celular de hepatoma humano
HFD	Dieta hiperlipídica
HMG-CoA	3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A
HPLC-ESI/MSn	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massa sequencial de ionização por electrospray
ICAM-1	Molécula de adesão intercelular 1
IDL	Lipoproteína de densidade intermediária
IFN- $\gamma$	Interferon <i>gamma</i>
IL	Interleucina
IMC	Índice de massa corporal
INSAT	Ácidos graxos insaturados
iNOS	Óxido nítrico-sintase induzida
KEAP	Proteína associada a ECH semelhante a Kelch
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LH	Lipase hepática
LpA	Lipoproteína A
LPL	Lipoproteína lipase
LPS	Lipopolissacarídeo
MCP1	Proteína quimiotática de monócitos 1
MDA	Malondialdeído
MPA	Ácido metafosfórico
NAD <sup>+</sup>	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida

NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida
NF- $\kappa$ B	Fator nuclear <i>kappa</i> B
NLRP3	Domínio de ligação e oligomerização de nucleotídeos contendo domínios ricos em leucina e domínio pirina tipo 3
NO	Óxido nítrico
NRF2	Fator nuclear derivado de eritróide 2
O <sub>2</sub>	Oxigênio
OH•	Radical hidroxila
ONOO-	Peroxinitrito
OxLDL	Lipoproteína de baixa densidade oxidada
oxPC-LP(a)	Fosfatidilcolina oxidada ligada a lipoproteína A
PBS	Solução tampão fosfato-salina
PFAc	Fração enriquecida de polifenóis por acetato de etila
PGC1- $\alpha$	Coativador-1 alfa do receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama
PGE2	Prostaglandina E2
rLPPS	Produtos reativos de peroxidação lipídica
RNA	Ácido ribonucleico
SAT	Ácidos graxos saturados
SCFA	Ácidos graxos de cadeia curta
SIRT1	Sirtuína 1
SM	Síndrome metabólica
SOD	Superóxido dismutase
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico
TCA	Ácido tricloroacético
TG	Triglicerídeos
TJ	Junção de oclusão
TLR	Receptor do tipo <i>toll</i>
TMAO	N-óxido de trimetilamina
TNB	Ácido 5-tio-2-nitrobenzóico



TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral- <i>alfa</i>
TPTZ	2,4,6-tri(2-piridil)-s-triazina
UPR	Resposta a proteínas não enoveladas
VCAM-1	Molécula de adesão celular vascular 1
VLDL	Lipoproteína de muito baixa densidade

## SUMÁRIO

1. Introdução .....	20
2. Revisão de literatura .....	21
2.1 Doenças cardiovasculares .....	21
2.2 Epidemiologia .....	22
2.3 Dislipidemia .....	24
2.3.1 Classificação de dislipidemia .....	24
2.4 Metabolismo de lipídeos .....	25
2.5 Digestão, mobilização e transporte de gorduras.....	26
2.6 Distúrbios no metabolismo de lipídeos.....	28
2.7 Dislipidemia, intestino, sistema imune e inflamação .....	30
2.8 Síndrome metabólica, saúde intestinal e doença cardiovascular.....	33
2.9 Dislipidemia, inflamação e aterosclerose .....	39
2.10 Estresse oxidativo.....	42
2.11 Sistema antioxidante celular .....	44
2.12 Dislipidemia, estresse oxidativo e disfunção miocárdica .....	45
2.13 Peroxidação lipídica.....	47
2.14 Agentes dislipidêmicos.....	48
2.15 Abordagem terapêutica da dislipidemia .....	51
2.16 Araticum.....	54
3. Objetivos.....	57
4. Metodologia.....	57
4.1 Preparo do extrato e frações de <i>Annona crassiflora</i> Mart. ....	58
4.1.1 Preparo do extrato etanólico.....	58
4.1.2. Preparo da fração acetato de etila.....	58

4.2. Animais e delineamento experimental.....	59
4.3. Amostras de sangue e tecido.....	61
4.4. Avaliação do perfil lipídico.....	62
4.4.1 Dosagem de colesterol total plasmático .....	62
4.4.2. Dosagem de triglicerídeos plasmáticos.....	62
4.4.3. Quantificação de lipídeos fecais.....	63
4.5. Determinação de proteínas totais.....	63
4.6. Análises de estresse oxidativo.....	63
4.6.1. Peroxidação lipídica.....	63
4.6.2 Carbonilação de proteínas .....	64
4.6.3 Conteúdo de tióis .....	64
4.7 Perfil antioxidante .....	65
4.7.1 Superóxido dismutase .....	65
4.7.2. Catalase .....	65
4.7.3. Capacidade antioxidante total (FRAP) .....	66
4.7.4. Glutathiona reduzida .....	66
4.7.5 Atividade da glutathiona peroxidase .....	67
4.7.6 Atividade da glutathiona redutase .....	67
4.7.7. Atividade da glicose6-fosfato desidrogenase.....	67
4.8. Análise estatística .....	68
5. RESULTADOS .....	68
5.1 Avaliação dos parâmetros lipídicos .....	68
5.1.1 Lipídeos plasmáticos .....	68
5.1.1.1 Colesterol total .....	68

5.1.1.2. Triglicerídeos .....	69
5.1.2 Lipídeos fecais .....	70
5.3 Análise de marcadores de estresse oxidativo .....	71
5.3.1 Peroxidação lipídica .....	71
5.3.2 Carbonilação de proteínas .....	73
5.3.3 Conteúdo de tióis .....	74
5.4 Avaliação do perfil antioxidante .....	75
5.4.1 Atividade da Superóxido dismutase .....	75
5.4.2 Atividade da catalase .....	76
5.4.3. Capacidade antioxidante total (FRAP) .....	77
5.4.4 Glutaciona reduzida .....	78
5.4.5 Glutaciona Peroxidase .....	79
5.4.6 Glutaciona redutase.....	80
5.4.7 Atividade de G6PDH .....	81
5.5 Correlação de Pearson .....	82
5.5.1. Triglicerídeos plasmáticos, colesterol plasmático e lipídeos fecais .....	82
5.5.2 Parâmetros lipídicos plasmáticos, dano oxidativo e perfil antioxidante .....	83
6. Discussão .....	83
7. Conclusão .....	93
8. Referência bibliográfica .....	92
9. Anexos.....	108

## 1. Introdução

Doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) abrangem doenças cardiovasculares (DCV), síndrome metabólica (SM), doenças neurológicas, desordens respiratórias e câncer, as quais vem aumentando em todo o mundo devido ao estilo de vida sedentário associado a vários outros fatores, como dieta rica em gordura e glicose, comidas industrializadas e tabagismo (RANA *et al.*, 2022; VIVARELLI *et al.*, 2022).

Aterosclerose, diabetes tipo 2 e obesidade frequentemente coexistem na SM, incluindo vários sinais clínicos, como obesidade central (abdominal), pressão arterial elevada e distúrbios no metabolismo de carboidratos e dislipidemia - não sendo uma entidade médica distinta - está associada a outros fatores de risco para outras DCNT (KANIA-DOBROWOLSKA; BARANIAK, 2022).

Essas entidades são consideradas fatores de risco por induzirem um estado pró-inflamatório, sobrecarga oxidativa, disfunção mitocondrial, depleção de antioxidantes endógenos, disfunção hemodinâmica e isquemia, que se sobrepõem em pacientes “dismetabólicos”, causando alterações pós-traducionais de proteínas, lipídeos e ácido desoxirribonucleico (DNA), levando ao conseqüente e crescente estresse oxidativo (ROSSI *et al.*, 2021).

Dada a sua natureza insidiosa com desfecho letal, as DCNT representam um transtorno social e econômico crescente, o que torna urgente a necessidade de melhorar as estratégias preventivas existentes e de encontrar novas abordagens terapêuticas (KASPER *et al.*, 2017; VIVARELLI *et al.*, 2022). A era das doenças degenerativas e de doenças provocadas pelo homem caracteriza-se pela alta taxa de mortalidade por DCNT – principalmente DCV – superando a mortalidade causada por desnutrição e doenças infecciosas (KASPER *et al.*, 2017).

Evidências da literatura científica apoiam o uso de polifenóis à base de plantas como agentes terapêuticos que podem amenizar os danos causados pelas DCNT, devido a suas propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes. Os polifenóis apresentam efeitos benéficos, incluindo a redução do acúmulo de gordura no fígado, e da dislipidemia, e melhora da pressão arterial (ZHANG *et al.*, 2021; RANA *et al.*, 2022).

Nesse contexto, além de estratégias de adesão a um estilo de vida saudável e ingestão balanceada de macronutrientes, as plantas medicinais podem ser grandes aliadas no manejo clínico da SM, por aumentarem a capacidade antioxidante endógena e capacidade de sequestro de espécies reativas de oxigênio (EROs), podendo auxiliar na reversão dos efeitos deletérios provocados pelo excesso de radicais livres (LIU, 2019).

A *Annona crassiflora* Mart (ACM), popularmente conhecida como araticum, é uma planta nativa do Cerrado, rica em compostos bioativos (LAGE *et al.*, 2014; PIMENTA *et al.*, 2014; JUSTINO *et al.*, 2016). Embora seja pouco explorada, os estudos têm evidenciado que o araticum apresenta polifenóis com características relevantes na modulação do perfil lipídico, ação anti-aterosclerótica, anti-inflamatória, antinociceptiva, antihepatotóxica, antiglicante e antioxidante (ROCHA *et al.*, 2015; JUSTINO *et al.*, 2016; JUSTINO *et al.*, 2017; OLIVEIRA *et al.*, 2018; RAMOS *et al.*, 2021).

Nesse sentido, o presente estudo teve como objetivo investigar os possíveis efeitos antioxidantes da casca do fruto da ACM com o uso de amostras do extrato bruto etanólico (CEAc) e da fração enriquecida de polifenóis por acetato de etila (PFAc) em modelos de camundongos machos com hiperlipidemia induzida por tyloxapol (Triton WR-1339). O coração foi o órgão de escolha para análise dos parâmetros de estresse oxidativo por ser alvo de desfecho clínico das DCV (MAKHMUDOVA *et al.*, 2021), que ocorre, predominantemente, por doença arterial coronariana associada e consequente aos fatores de risco previamente citados, como estilo de vida sedentário, estresse oxidativo e dentro da SM, a própria dislipidemia (D'ORJA, 2020; MAKHMUDOVA *et al.*, 2021; ROSSI *et al.*, 2021).

## **2. Revisão de literatura**

### **2.1 Doenças cardiovasculares**

Dentre as DCNT, vamos abordar mais detalhadamente as DCV, que de acordo com a Organização Mundial de Saúde, são um grupo de doenças do coração e dos vasos sanguíneos e incluem: doença coronariana (doença dos vasos sanguíneos que irrigam o músculo cardíaco), doença cerebrovascular (doença dos vasos sanguíneos que irrigam o cérebro), doença arterial periférica (doença dos vasos sanguíneos que irrigam os membros superiores e inferiores), doença cardíaca reumática (danos no músculo do coração e válvulas cardíacas devido à febre

reumática, causada por bactérias estreptocócicas), cardiopatia congênita (malformações na estrutura do coração existentes desde o momento do nascimento), trombose venosa profunda e embolia pulmonar (coágulos sanguíneos nas veias das pernas, que podem se desalojar e se mover para o coração e pulmões) (OPAS/OMS; 2022).

Ataques cardíacos e acidentes vasculares encefálicos (AVEs), geralmente são eventos agudos causados principalmente por um bloqueio que impede que o sangue flua para o coração ou para o cérebro. A razão mais comum para isso é o acúmulo de depósitos de gordura nas paredes internas dos vasos sanguíneos por aterosclerose. Os AVEs também podem ser causados por uma hemorragia em vasos sanguíneos do cérebro ou a partir de coágulos de sangue. A causa de ataques cardíacos e AVEs geralmente é uma combinação de fatores de risco, como o uso de tabaco, dietas inadequadas, obesidade, sedentarismo, uso do álcool, hipertensão arterial, diabetes *mellitus* e hiperlipidemia. A maioria das DCV pode ser prevenida por meio da mudança de fatores comportamentais de risco (OPAS/OMS; 2022)

## 2.2 Epidemiologia

DCVs são atualmente as principais causas de morte em todo o mundo. Antes de 1990, como mencionado previamente, as doenças infecciosas e a desnutrição eram as causas mais comuns, e as DCVs eram responsáveis por menos de 10% de todos os óbitos. Em 2010, as DCVs foram responsáveis por aproximadamente 16 milhões de mortes no planeta (30%), incluindo quase 40% das mortes nos países desenvolvidos e cerca de 28% nos países com rendas baixa e média (KASPER *et al.*, 2017).

Segundo a Organização Mundial de Saúde, as DCNT foram responsáveis por 41 milhões de mortes no ano de 2019, equivalente a 71% de todas as mortes no mundo (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2022). Em 2016, 17,9 milhões de pessoas morreram em decorrência de DCV, representando 31% de todas as mortes globais. Destes, 85% das mortes foram causadas por ataques cardíacos e AVEs. Globalmente, um terço das doenças isquêmicas do coração ocorrem associados a elevados níveis de colesterol. No total, estima-se que o colesterol elevado cause 2,6 milhões de mortes por ano (4,5% do total de óbitos). Sendo que, em 2008, um total de 39% dos adultos (37% dos homens e 40% das mulheres) apresentaram colesterol total (CT) elevado (DOLZHENKO *et al.*, 2020).

Dentre a mortalidade por DCV, prevalecem a doença arterial coronariana (DAC) e o AVE, sendo que, a taxa de mortes por DAC excede a taxa de mortalidade por AVE em uma razão de 2:1 a 3:1 (KASPER *et al.*, 2017; ROTH *et al.*, 2018), podendo ser observado no gráfico abaixo (Figura 1), a taxa de mortalidade entre homens e mulheres, causa de morte e estratificação por idade.

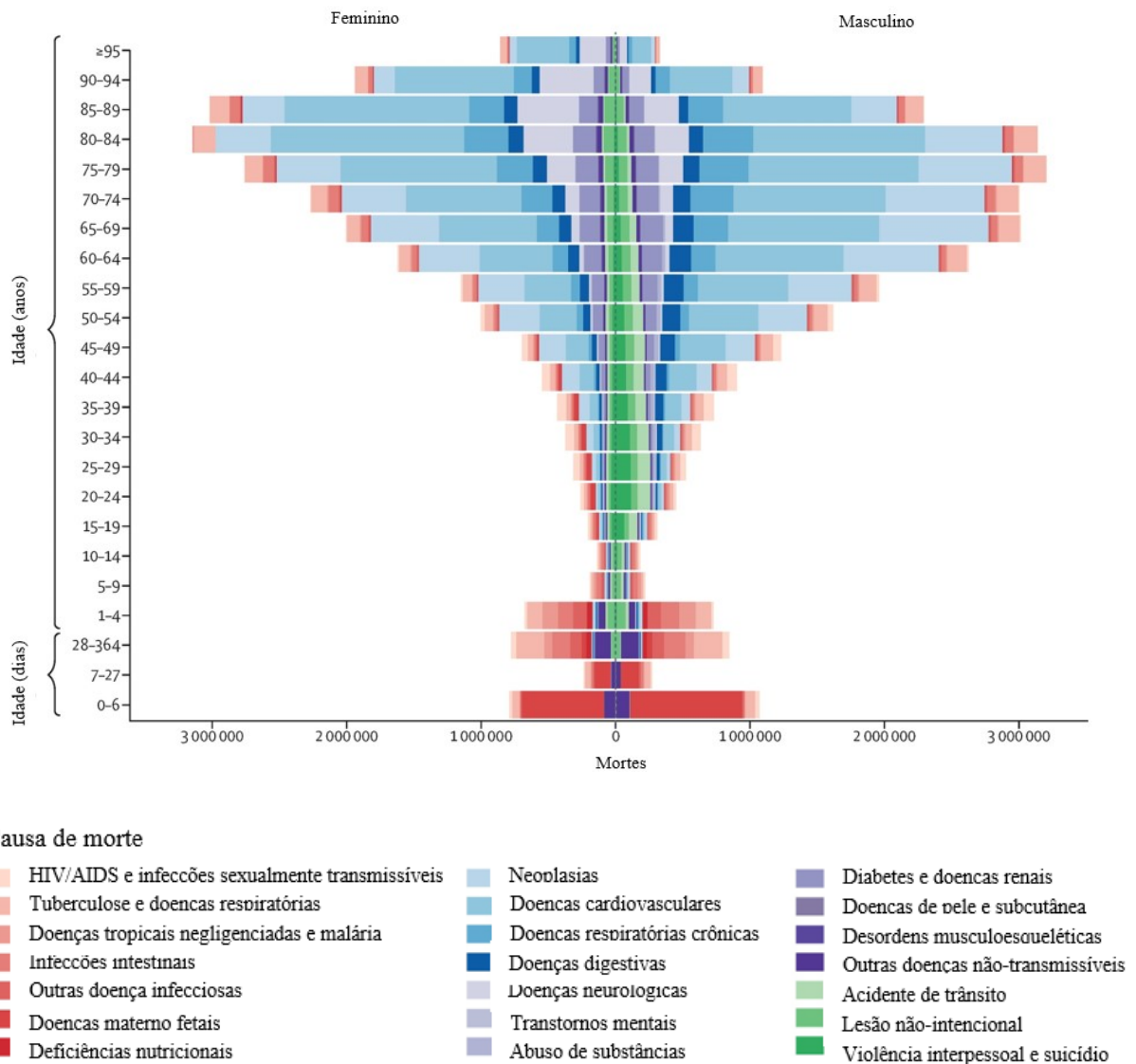


Figura 1: Mortalidade global, causa de morte e diferença da distribuição da causa de morte por idade e sexo. FONTE: Modificado de ROTH *et al.* (2018).



O projeto *Global Burden of Disease, Injuries, and Risk Factors Study* (GBD 2017) (ROTH *et al.*, 2018) identificou e compilou dados de mortalidade e morbidade de 195 países entre 1980 e 2017, associado a quatro fatores de risco metabólicos principais para DCV– níveis de lipídeos, hipertensão arterial, obesidade e diabetes *mellitus* (KASPER *et al.*, 2017; ROTH *et al.*, 2018).

No Brasil, no levantamento do DATASUS, entre os anos 2013 e 2018, identificou-se que as DCV são causadoras de 29,4% dos óbitos em um ano e mais de 308 mil indivíduos morrem por ano, sobretudo de infarto e AVE. O constante problema insere o Brasil entre os 10 países com maior taxa de óbitos cardiovasculares (OLIVEIRA *et al.*, 2020). Esta dissertação irá abordar principalmente as alterações lipídicas, as quais serão detalhadas a seguir.

### 2.3 Dislipidemia

As dislipidemias representam alterações metabólicas lipídicas decorrentes de distúrbios em qualquer fase do metabolismo de lipídeos, ocasionando níveis anormais dessas biomoléculas no sangue (NATESAN; KIM, 2021). Essa disfunção é causada por distúrbios alimentares, obesidade e doenças genéticas, aumentando em cerca de duas vezes as chances de desenvolver DCV (YAO; LI; ZENG, 2020).

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 (WANG *et al.*, 2022). Sabe-se que um fator chave para o início e a progressão da aterogênese é o colesterol plasmático elevado, principalmente quando há uma exposição contínua e cumulativa da lipoproteína de baixa densidade (LDL) ao tecido arterial, como um potencial fator determinante para o início da aterosclerose (SCIPIONE; CYBULSKY, 2022).

#### 2.3.1 Classificação de dislipidemia

Segundo a Sociedade Brasileira de Cardiologia (2017), as dislipidemias podem ser classificadas laboratorialmente, em quatro grupos, considerando os valores de CT, das frações de lipoproteínas LDL e lipoproteína de alta densidade (HDL); e triglicerídeos (TG): hipercolesterolemia isolada, hipertrigliceridemia isolada, hiperlipidemia mista e HDL baixo (FALUDI *et al.*, 2017):

- Hipercolesterolemia isolada: aumento isolado do LDL (LDL  $\geq$  160 mg/dL).

- Hipertrigliceridemia isolada: aumento isolado dos TG (TG  $\geq$  150 mg/dL ou  $\geq$  175 mg/dL, se a amostra for obtida sem jejum).
- Hiperlipidemia mista: aumento do LDL (LDL  $\geq$  160 mg/dL) e dos TG (TG  $\geq$  150 mg/dL ou  $\geq$  175 mg/dL, se a amostra for obtida sem jejum). Se TG  $\geq$  400 mg/dL, o cálculo do LDL pela fórmula de *Friedewald* é inadequado, devendo-se considerar a hiperlipidemia mista quando o não HDL-c  $\geq$  190 mg/dL.
- HDL baixo: redução do HDL (homens  $<$  40 mg/dL e mulheres  $<$  50 mg/dL) isolada ou em associação ao aumento de LDL ou de TG.

## 2.4 Metabolismo de lipídeos

Os lipídeos são biomoléculas de estrutura diversificada, insolúveis em água e com inúmeras funções biológicas, que atuam principalmente como sinalizadores intracelulares, isolantes térmicos, armazenadores de energia e apresentam papel fundamental na construção de moléculas mais complexas (NELSON; COX, 2012; KASPER *et al.*, 2017). 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, podendo ser sintetizado na maioria das células dos tecidos (NELSON; COX, 2012). Do ponto de vista clínico, o colesterol e os TG são os lipídeos mais relevantes (KASPER *et al.*, 2017).

De forma geral, o colesterol, os ácidos graxos e as vitaminas lipossolúveis da dieta são absorvidas na parte proximal do intestino delgado (KASPER *et al.*, 2017). A partir da absorção, esses elementos são transportados pelas lipoproteínas, que são grandes complexos macromoleculares, compostas de lipídeos e proteínas (NELSON; COX, 2012; KASPER *et al.*, 2017). Esse papel das lipoproteínas é de suma importância, carreando os lipídeos da dieta do intestino para os tecidos que necessitam de ácidos graxos para a energia ou para o armazenamento, por meio dos líquidos corporais (plasma, líquido intersticial e linfa) para os tecidos e a partir deles (NELSON; COX, 2012; KASPER *et al.*, 2017).

Os TG 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 (NELSON; COX, 2012). Os ácidos graxos dos TG fornecem uma grande fração da energia oxidativa nos animais, sendo encontrados nos tecidos adiposo, muscular e hepático (NELSON; COX, 2012).

## 2.5 Digestão, mobilização e transporte de gorduras

Os TG da dieta são emulsificados no intestino delgado por sais biliares, hidrolisados pelas lipases intestinais, absorvidos pelas células epiteliais intestinais, reconvertidos em TG, e então transformados em quilomícrons pela combinação com apolipoproteínas específicas (NELSON; COX, 2012). Os ácidos graxos de cadeia mais longa (> 12 carbonos) são incorporados em TG e acondicionados com apolipoproteína B-48, ésteres de colesterol, ésteres de retinil, fosfolipídeos e colesterol para formar quilomícrons (NELSON; COX, 2012).

Os quilomícrons nascentes são secretados na linfa intestinal e transportados pelo ducto torácico diretamente para a circulação sistêmica, onde sofrem extenso processamento pelos tecidos periféricos antes de alcançar o fígado. As partículas entram em contato com a lipoproteína lipase (LPL), a qual está ancorada a uma proteína de ligação à lipoproteína de alta densidade ancorada ao glicosilfosfatidilinositol, GPIHBP1, que está ligada às superfícies endoteliais dos capilares no tecido adiposo, no coração e no músculo esquelético (NELSON; COX, 2012; KASPER *et al.*, 2017).

Os TG dos quilomícrons são hidrolisados pela LPL e os ácidos graxos livres (AGL) são liberados (KASPER *et al.*, 2017). Os AGL são captados por miócitos ou adipócitos adjacentes e são oxidados para produzir energia ou reesterificados e armazenados na forma de TG (NELSON; COX, 2012; KASPER *et al.*, 2017). Uma vez dentro das células, os ácidos graxos são ativados na membrana mitocondrial externa pela conversão em tioésteres de acil-CoA graxos, que serão oxidadas na matriz mitocondrial após passar pelo ciclo da carnitina (NELSON; COX, 2012).

Alguns dos AGL ligam-se à albumina antes de penetrar nas células e são transportados para outros tecidos, em especial para o fígado (NELSON; COX, 2012; KASPER *et al.*, 2017). A partícula de quilomícron diminui progressivamente de tamanho à medida que o cerne hidrofóbico é hidrolisado e os lipídeos hidrofílicos (colesterol e fosfolipídeos) e as apolipoproteínas sobre a superfície da partícula são transferidos para as HDLs, criando os remanescentes de quilomícrons (KASPER *et al.*, 2017).

Os remanescentes de quilomícrons são rapidamente removidos da circulação pelo fígado por meio de um processo que requer a apolipoproteína E como ligante para os receptores no fígado (NELSON; COX, 2012; KASPER *et al.*, 2017).

Em consequência, poucos quilomícrons ou remanescentes de quilomícrons, ou até mesmo nenhum, em geral estão presentes no sangue depois de um jejum de 12 horas, exceto em pacientes com certos distúrbios do metabolismo das lipoproteínas (KASPER *et al.*, 2017).

As lipoproteínas são os principais carreadores de lipídeos no sangue, apresentam partículas complexas com um núcleo central de ésteres de colesterol e TG cercados por colesterol livre, fosfolipídeos e apolipoproteínas. As lipoproteínas plasmáticas são normalmente divididas em 7 classes, de acordo com seu tamanho, composições lipídicas e apolipoproteínas, que são quilomícrons, remanescentes de quilomícrons, lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL), lipoproteína de densidade intermediária (IDL), LDL, HDL e lipoproteína A (LpA) (AFONSO; SPICKETT, 2019).

Os quilomícrons são responsáveis pelo transporte de lipídeos da dieta do intestino para os tecidos metabolizadores de lipídeos, músculo e adiposo, e os remanescentes de quilomícrons resultantes entregam os lipídeos remanescentes ao fígado. VLDL, IDL, LDL estão envolvidos na segunda fase da entrega de TG e colesterol do fígado para os tecidos periféricos, enquanto as partículas de HDL são responsáveis pelo transporte reverso do colesterol das células nos tecidos periféricos para o fígado para as lipoproteínas da via endógena (PARTHASARATHY; STEINBERG; WITZTUM, 1992; AFONSO; SPICKETT, 2019).

As lipoproteínas desempenham um papel na adsorção e transporte de lipídeos dietéticos do intestino e lipídeos endógenos do fígado, podendo ser observado esquematicamente na Fig. 2. HDL estão envolvidas no chamado transporte reverso de colesterol dos tecidos periféricos para o fígado e intestino, exercendo assim um papel protetor. Já a LDL é a principal transportadora de colesterol para as células, sendo considerada um fator de risco cardiovascular bem estabelecido. Esta classe de lipoproteínas é responsável pelo desenvolvimento da aterosclerose como consequência de sua modificação (oxidação, acetilação e agregação) no espaço subendotelial. Após essas modificações, a LDL provoca lesão endotelial, promove a adesão das células inflamatórias e sua diferenciação aos macrófagos (PARTHASARATHY; STEINBERG; WITZTUM, 1992).

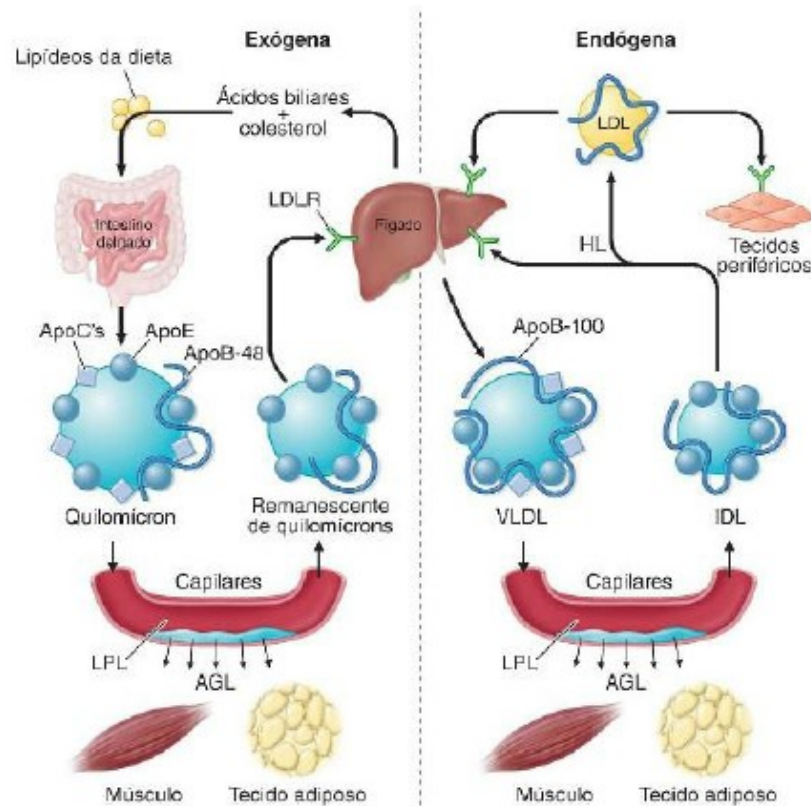


Figura 2: Vias metabólicas exógena e endógena das lipoproteínas. A via exógena transporta lipídeos da dieta para a periferia e o fígado. A via endógena transporta lipídeos hepáticos para a periferia. Legenda: AGL, ácidos graxos livres; Apo, apolipoproteína; HL, lipase hepática; IDL, lipoproteína de densidade intermediária; LDL, lipoproteína de baixa densidade; LDLR, receptor de lipoproteína de baixa densidade; LPL, lipoproteína lipase; VLL, lipoproteína de densidade muito baixa. FONTE: KASPER *et al.*, 2017.

## 2.6 Distúrbios no metabolismo de lipídeos

Distúrbios do colesterol e TG elevados: embora literalmente centenas de proteínas influenciem o metabolismo das lipoproteínas e possam interagir, produzindo dislipidemia no indivíduo, existe um número limitado de “pontos centrais” distintos que regulam o metabolismo das lipoproteínas que interagem entre si e influenciam uns aos outros, podendo ser observado na Fig. 3 (KOLOVOU, 2005; KASPER *et al.*, 2017):

- **Aumento dos ácidos graxos livres:** O defeito primário é provavelmente focado na incapacidade de incorporar os AGL aos TGs pelo tecido adiposo (esterificação inadequada). Isso resulta em redução da captura de ácidos graxos e consequente

retenção pelo tecido adiposo. A resistência à insulina também causa redução da retenção de AGL pelos adipócitos. Ambas as anormalidades levam ao aumento do fluxo de AGL de volta ao fígado (KOLOVOU, 2005).

- **Aumento de TGs:** O aumento do fluxo de AGL da periferia para o fígado no estado resistente à insulina estimula a síntese hepática de TG. A redução substancial nas taxas de depuração de VLDL aparece à medida que o TG plasmático aumenta levando ao acúmulo de grandes partículas de VLDL. Estas quedas de taxas de depuração provavelmente refletem nas taxas de lipólise e podem ser atribuídas a uma mudança na atividade da LPL (reduzida no estado de resistência à insulina) e outros fatores como o teor de apoC-II ou a razão apoCII/CIII (moduladores da atividade da LPL) em VLDL (KOLOVOU, 2005).
- **LDL pequeno e denso:** Na resistência insulínica, os níveis da LDL são geralmente dentro dos limites normais ou apenas levemente aumentado; porém a LDL é muitas vezes de composição anormal (LDL pequena e densa). A anormalidade subjacente que causa a LDL pequena e densa é a hipertrigliceridemia. Nestas condições, VLDL ricas em TG (VLDL1) se acumulam. Quando a VLDL1 é quebrada pela LPL, uma população de partículas de LDL com Apo B alterada é produzida. Essas partículas não se ligam eficientemente aos receptores de LDL e, portanto, têm uma permanência prolongada na circulação (KOLOVOU, 2005).
- **Níveis baixos de colesterol HDL:** O colesterol HDL baixo em pacientes com SM é frequentemente considerado como secundário ao TG elevado. Na presença de aumento dos níveis plasmáticos de TG, ocorre a formação de HDL rica em TG. Estas HDLs ricas em TGs são mais propensas a serem catabolizadas, sofrem hidrólise e dissociação de seu componente proteico, apo A (a principal proteína da HDL) (KOLOVOU, 2005).

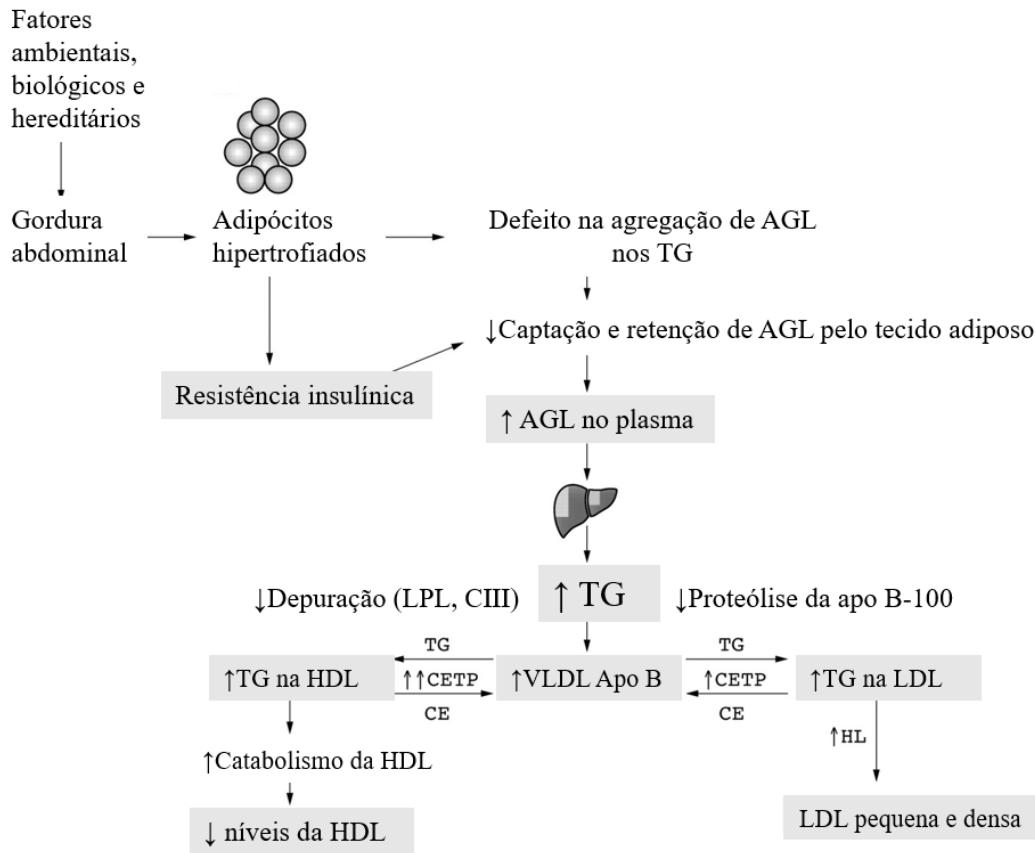


Figura 3: Representação esquemática de dislipidemia em síndrome metabólica. Legenda: AGL, ácidos graxos livres; TG, triglicerídeos; LPL, lipoproteína lipase; CIII, apolipoproteína CIII; apo, apolipoproteína; HDL, lipoproteína de alta densidade; CETP, proteína de transferência de colesteril éster; CE, colesteril éster; VLDL, lipoproteína de muito baixa densidade; LDL, lipoproteína de baixa densidade; HL, lipase hepática. FONTE: Modificado de Kolovou (2005).

Além dos distúrbios no metabolismo de lipídeos, o acometimento do sistema cardiovascular está vinculado à inflamação e estresse oxidativo, que serão abordados a seguir.

## 2.7 Dislipidemia, intestino, sistema imune e inflamação

Alguns nutrientes estão mais fortemente relacionados a uma resposta pró-inflamatória do que outros, por exemplo, como ácido graxos saturados (SAT), a quantidade e a qualidade consumida são consideradas um dos principais determinantes da magnitude da inflamação pós-prandial (MALESZA *et al.*, 2021). Em 2021, foi publicado um posicionamento sobre o consumo de gorduras e saúde cardiovascular pelo Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia (IZAR *et al.*, 2021). Nesse documento, os autores afirmam que a

nutrição tem papel importante na gênese das DCNT, consideradas um dos mais importantes problemas de saúde pública da atualidade no mundo e no nosso país. Além da quantidade, a qualidade dos alimentos que consumimos (em particular aqueles que são de fonte de gorduras) participa tanto da patogênese das DCV, quanto na sua prevenção (IZAR *et al.*, 2021).

Recomendações clássicas sobre o consumo de gorduras: O primeiro trabalho, publicado na década de 50, mostraram que o aumento do consumo de gorduras se associava significativamente com a maior prevalência da aterosclerose (PAGE *et al.*, 1957). O estudo baseou-se na análise de dados populacionais a partir da utilização de inquérito alimentar, em que se avaliava o efeito da quantidade e dos tipos de SAT e ácidos graxos insaturados (INSAT) sobre a mortalidade e a DCV (PAGE *et al.*, 1957).

Assim, a primeira recomendação quanto ao consumo de gorduras estabeleceu limite máximo de 30% do valor calórico total da dieta na forma de gorduras e recomendou redução no consumo de SAT (PAGE *et al.*, 1957). As diretrizes subsequentes publicadas pela *American Heart Association* e as orientações do *Dietary Guidelines for Americans 2015-2020* mantiveram a mesma linha para a prevenção cardiovascular, recomendando limite máximo de 35% do valor calórico total da dieta, podendo variar conforme o perfil lipídico de cada indivíduo (IZAR *et al.*, 2021). Além disso, recomendam-se ingestão de no máximo 10% do valor total da dieta para SAT, estímulo ao consumo de INSAT e ausência de ácidos graxos *trans* na dieta (IZAR *et al.*, 2021).

Os SAT podem exercer um efeito molecular semelhante ao lipopolissacarídeo (LPS) e ativar o receptor do tipo *toll* 4 (TLR), levando à liberação de citocinas pró-inflamatórias, ao comprometimento da função da barreira intestinal e à interrupção do metabolismo celular (MALESZA *et al.*, 2021). Os SAT são componentes essenciais do lípide A, presente na parede celular de bactérias gram-negativas – é a porção endotóxica do LPS (IZAR *et al.*, 2021). Já é claro na literatura científica que os SAT disparam a sinalização inflamatória, pois modulam tanto a via do fator nuclear *kappa* B (NF- $\kappa$ B), por meio da estrutura dos receptores TLR4, como a via do TLR2 (CHEN *et al.*, 2017; IZAR *et al.*, 2021).

No nível sistêmico, o consumo excessivo de gordura desencadeia  $\beta$ -oxidação mitocondrial de AGL, aumentando posteriormente a produção de EROs, o que pode causar uma resposta pró-inflamatória, mediado, por exemplo, ativando NF- $\kappa$ B e causando a expressão de citocinas pró-inflamatórias como interferon gama (IFN- $\gamma$ ), fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e óxido nítrico-sintase induzida (iNOS) (MALESZA *et al.*, 2021).



Outra estratégia de intensificação do processo inflamatório induzido pelo consumo de SAT é a ativação intracelular da proteína inflamassomal com domínio de ligação e oligomerização de nucleotídeos contendo domínio ricos em leucina e domínio pirina tipo 3 (NLRP3) (WEN *et al.*, 2011). Quando o inflamassomo encontra-se ativo, tornam maduras as interleucinas (IL)1 $\beta$  e IL-18, induzidas pelo NF- $\kappa$ B (IZAR *et al.*, 2021). Além de ter sido demonstrado que a gordura SAT oriunda da dieta foi capaz de ativar esse mecanismo através do receptor TLR4, as prostaglandinas E2 (PGE2) derivadas do ácido araquidônico também o fazem, trazendo implicações importantes à doença coronariana e a comorbidades associadas ao diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2), como a retinopatia diabética (WEN *et al.*, 2011; CHEN *et al.*, 2017; IZAR *et al.*, 2021).

Um dos mecanismos possíveis pelos quais a dieta hiperlipídica (HFD) pode exercer seu efeito pró-inflamatório é a estimulação do estresse oxidativo. HFD induziu a expressão de genes considerados marcadores de estresse do retículo endoplasmático que estão intimamente relacionados com o estresse oxidativo (MALESZA *et al.*, 2021).

Além disso, a HFD promove alterações no intestino e em sua microbiota, resultando em disbiose, disfunção da barreira intestinal, aumento da permeabilidade intestinal e vazamento de metabólitos bacterianos tóxicos na circulação, todos os quais contribuem para o desenvolvimento de inflamação sistêmica de baixo grau, ilustrada na Fig. 4 (MALESZA *et al.*, 2021).

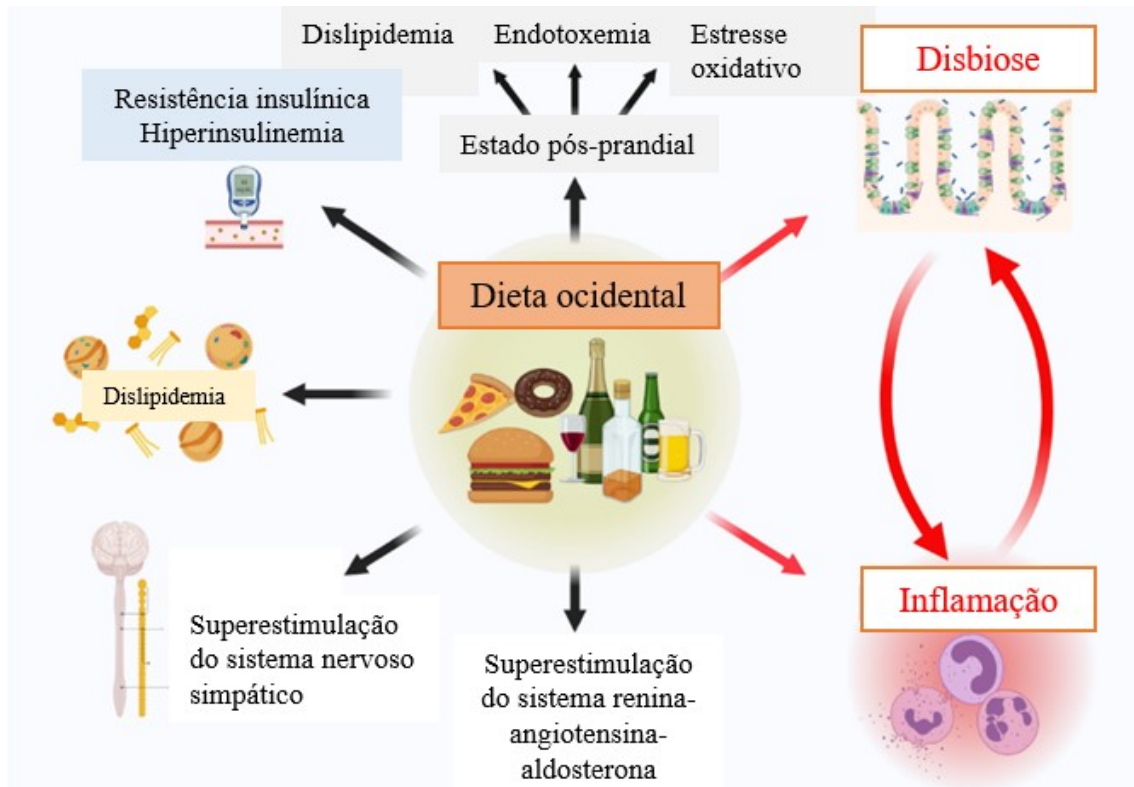


Figura 4: Dieta de estilo ocidental rica em gorduras induzindo inflamação e disbiose, associados a patogênese de dislipidemia, resistência periférica à insulina. FONTE: Modificado de MALESZA *et al.* (2021).

## 2.8 Síndrome metabólica, saúde intestinal e doença cardiovascular

Os quilomícrons ricos em TG pós-prandiais constituem um fator de risco independente para aterosclerose, principalmente na indução de resistência insulínica. Um epitélio intestinal hiperpermeável após refeições gordurosas, ver figura 5, pode ser o gatilho para resistência generalizada à insulina. Isso sugere um papel fundamental para o intestino também na doença vascular, já que a resistência à insulina no tecido adiposo resulta na desinibição da LPL dependente de hormônios, resultando em uma liberação contínua de AGL que atuam como um substrato para a liberação hepática de VLDL. Altos níveis de VLDL circulante pós-prandial aumentam a taxa de interação com a liberação induzida pela refeição de quilomícrons de apolipoproteína B-48, resultando na formação de restos de lipoproteínas enriquecidos com éster de colesterol, alguns dos quais são altamente aterogênicos (FÄNDRIKS, 2016).

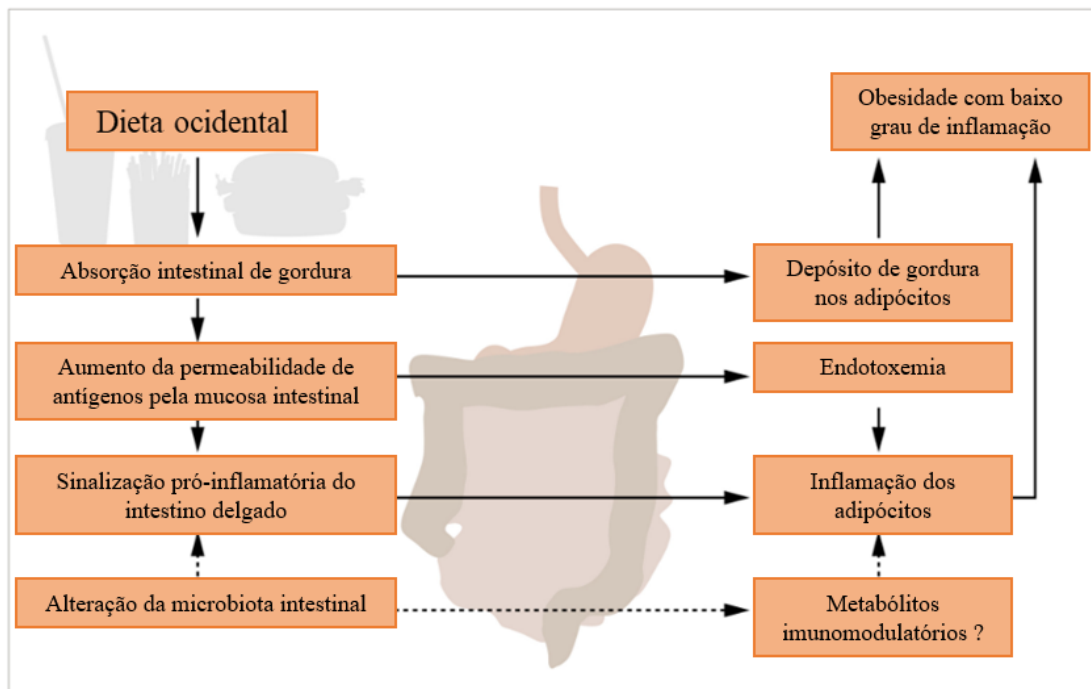


Figura 5: Uma dieta rica em gordura e hiperpermeabilidade intestinal. Dieta rica em gordura e carboidratos faz com que o epitélio intestinal se torne mais permeável às macromoléculas microbianas (endotoxina) e inicia uma reação pró-inflamatória em cascata. A mucosa intestinal hiperpermeável pode, assim, fornecer uma ligação entre a dieta e o estado inflamatório sistêmico de baixo grau que impulsiona a resistência à insulina periférica. FONTE: Modificado de FÄNDRIS (2016).

Além disso, após a refeição com alto consumo de gordura, um acúmulo de quilomícrons no espaço intercelular da mucosa intestinal pode aumentar a pressão local, resultando em afrouxamento da junção de oclusão (TJ) entre os enterócitos ou mesmo perfuração de membrana basal. A barreira intestinal comprometida, a torna mais permeável para a translocação de LPS, favorecendo a inflamação. Estudo em ratos, demonstrou que a absorção de gordura ativa os mastócitos na mucosa intestinal, resultando na liberação aumentada de mediadores de mastócitos, incluindo histamina ou PGE2. Este processo está correlacionado com o aumento da permeabilidade intestinal transcelular e paracelular (MALESZA *et al.*, 2021).

Uma característica fisiológica notável é que a alta concentração de glicose intramucosa intestinal associada à refeição parece ser um forte sinal para a liberação de gordura armazenada

nos enterócitos. Isso significa que a lipemia pós-prandial reflete os lipídeos ingeridos várias horas antes, reforçando a importância das cargas de glicemia e glicose intraluminal, ver Fig. 6 (FÄNDRIS, 2016).

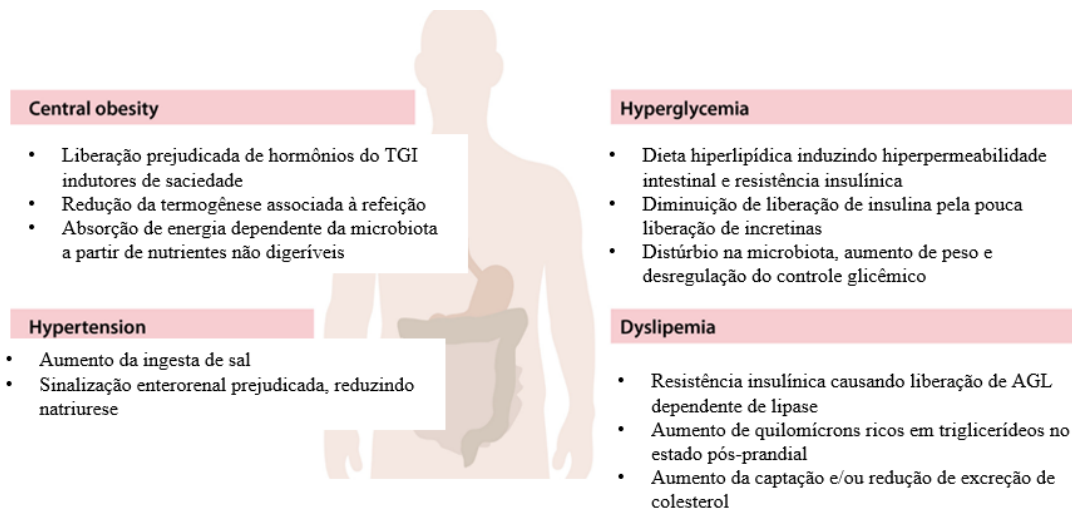


Figura 6: Proposta de mecanismos fisiológicos de importância para a síndrome metabólica. Legenda: GI, gastrointestinal. FONTE: Modificado de FÄNDRIS (2016).

O termo “obesidade central” é usado, indicando que a distribuição de gordura, particularmente a adiposidade abdominal, é fundamental e não o peso corporal em si. A circunferência da cintura, particularmente, tem sido promovida como um melhor indicador individual como preditor para SM do que o índice de massa corporal (IMC) relacionado à altura do corpo (ASHWELL; GUNN; GIBSON, 2011). A razão pela qual a adiposidade abdominal, em vez da subcutânea, está mais intimamente associada à doença metabólica pode estar relacionada com a liberação de adipocinas pró-inflamatórias a partir dos adipócitos de localização visceral, contribuindo para o início da resistência insulínica periférica (TCHERNOF; DESPRÉS, 2013).

O tecido adiposo é composto por adipócitos, pré-adipócitos, células imunes, fibroblastos, nódulos linfáticos e tecido nervoso (FONSECA-ALANIZ *et al.*, 2006). O adipócito é a única célula capaz de armazenar gordura sem comprometer sua funcionalidade, e sua função primária é promover lipogênese e lipólise (FONSECA-ALANIZ *et al.*, 2006). O tecido adiposo ainda é capaz de secretar diversas substâncias bioativas, como leptina, citocinas (TNF, IL6, MCP1, IL1 $\beta$ ) e outras adipocinas, desempenhando função autócrina, parácrina e

endócrina (PRADO *et al.*, 2009). Tais ações podem ser moduladas por diferentes ácidos graxos provenientes da alimentação (FONSECA-ALANIZ *et al.*, 2006).

Entretanto quando há um excesso de lipídeos no tecido adiposo, um processo de remodelação é acionado, caracterizado pela hipertrofia e hiperplasia dos adipócitos e secreção de citocinas em concentrações elevadas, que as caracterizam como pró-inflamatórias na tentativa de restabelecer a homeostase (IZAR *et al.*, 2021). Todavia, cronicamente, a secreção de TNF- $\alpha$ , IL6, iNOS e proteína quimiotática de monócitos 1 (MCP1), e o recrutamento de células inflamatórias como neutrófilos, células T e macrófagos, promovem inflamação, fibrose e resistência à insulina no próprio tecido adiposo, o qual exerce papel fundamental no desarranjo metabólico característico da obesidade e SM (IZAR *et al.*, 2021).

A sinalização celular mediada pelos receptores de TNF- $\alpha$  culmina com ativação do NF- $\kappa$ B, que incrementa a secreção de citocinas e caracteriza a inflamação local (CHEN *et al.*, 2017). Nessa condição, o adipócito apresenta intensificação da lipólise com aumento da liberação de AGL (IZAR *et al.*, 2021). Os SAT provenientes da lipólise dos adipócitos ativam os receptores TLR4 de macrófagos residentes no tecido, agravando a resposta inflamatória local, estabelecendo um círculo vicioso, ver Fig. 7 (CHEN *et al.*, 2017; IZAR *et al.*, 2021).

Concomitante a essas ações, ocorre gradativamente a polarização de macrófago da subpopulação M2 (anti-inflamatório, ligado à resolução da lesão) para M1 (via clássica de ativação, associada à resposta Th1) (IZAR *et al.*, 2021). Com isso, ocorre intensificação do estado inflamatório e indução de resistência à insulina no tecido adiposo (CHEN *et al.*, 2017; IZAR *et al.*, 2021). Além disso, na obesidade, outros fatores como hipóxia do tecido adiposo, EROs e endotoxemia contribuem para manutenção da inflamação no tecido adiposo (IZAR *et al.*, 2021).

Ademais, a insulina exerce importante efeito no tecido adiposo, pois inibe a lipólise e estimula a lipogênese e a captação de glicose e AGL (CHEN *et al.*, 2017). A ativação de vias inflamatórias antagoniza a ação da insulina ao induzir resistência ao hormônio e favorece o surgimento de doenças associadas ao risco cardiometabólico (IZAR *et al.*, 2021). Ainda vale notar que a própria presença de ácidos graxos poli-insaturados nas membranas celulares faz com que essas sejam potentes geradoras de radicais livres (BARBOSA *et al.*, 2010).

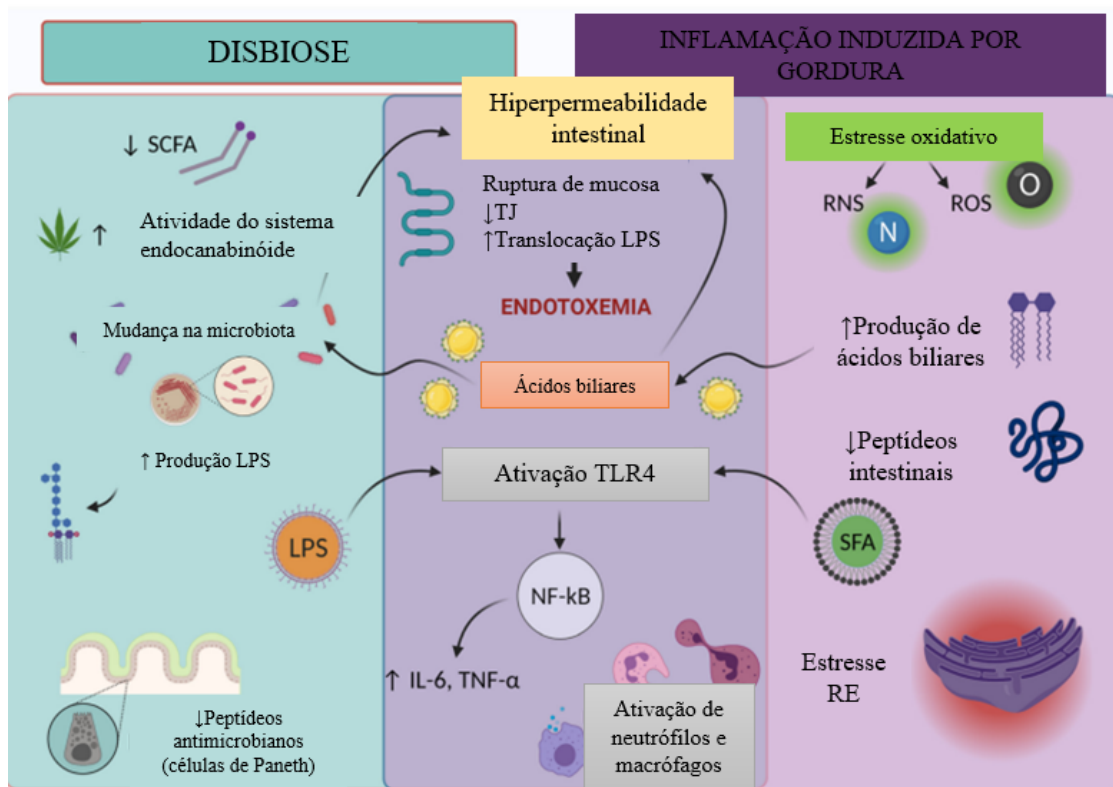


Figura 7. Patofisiologia associadas à dieta ocidental, saúde intestinal e estresse oxidativo. Legenda: SCFA, ácidos graxos de cadeia curta; LPS, lipopolissacarídeo; TJ, junções apertadas; TLR4, *toll like receptor 4*; NF-κB, fator nuclear *kappa-light chain-enhancer* de células B ativadas; IL-6, interleucina 6; TNF-α, fator de necrose tumoral-alfa; RNS, espécies reativas de nitrogênio; EROs, espécies reativas de oxigênio; RE, retículo endoplasmático; SFA, ácidos graxos saturados. FONTE: Modificado de MALESZA *et al.* (2021).

Na última década, estudos tem direcionado a atenção para a interação entre a ingestão de nutrientes, o metabolismo da microbiota intestinal e o risco de desenvolver DCVs. Padrões moleculares associados a microbiota são ligados a receptores de reconhecimento de padrões de hospedeiro e têm sido sugeridos como vias de sinalização para a patogênese das DCVs. Além disso, a microbiota hospedeira produz vários metabólitos, como N-óxido de trimetilamina (TMAO), que estão associados à patogênese de DCVs. Em contrapartida, os ácidos graxos de cadeia curta (SCFAs) e ácidos biliares secundários liberados por uma microbiota salutogênica, podem desviar a rota de adoecimento (BROWN; HAZEN, 2018).

Sabe-se que, com o maior consumo de dietas ricas em SAT aumenta-se a permeabilidade paracelular intestinal, por interferir em proteínas do complexo das TJ, e com isso elevam as concentrações plasmáticas de LPS. Alterações na permeabilidade intestinal estão

relacionadas com a regulação das TJ, complexo proteico que mantém as junções célula-célula no epitélio intestinal, formando uma barreira contra a passagem de macromoléculas (IZAR *et al.*, 2021).

Além disso, vários estudos em animais humanos e não humanos identificaram o TMAO, metabólito da trimetilamina derivada de micróbio intestinal, como um potencial promotor de doenças crônicas, incluindo aterosclerose. Em humanos, TMAO e seus precursores têm sido associados com carga aterosclerótica, aumento do risco para DCVs graves e morte. Nos modelos pré-clínicos, o TMAO acelerou o desenvolvimento da aterosclerose, e induziu trombose, apoiando um papel para a microbiota intestinal na patogênese e complicações associadas das DCVs (RONCAL *et al.*, 2019). Ainda, TMAO impede o transporte reverso do colesterol, o que pode contribuir para a patogênese da DCV, promovendo acúmulo de colesterol nos macrófagos (IZAR *et al.*, 2021).

Os SCFAs são os principais produtos finais da degradação microbiana de carboidratos e proteínas no intestino, os quais apresentam inúmeros efeitos em todo o corpo, como transporte e o metabolismo das células epiteliais, controle de metabólitos de lipídeos e carboidratos em hepatócitos e fornecimento de energia. Por exemplo, propionatos poderiam reduzir a expressão induzida por citocina de moléculas de adesão induzida por citocinas, como VCAM-1 (molécula de adesão celular vascular 1) e a ICAM-1 (molécula de adesão intercelular 1) em células endoteliais, inibindo o NF- $\kappa$ B, reduzindo a glicemia e o colesterol, atuando no metabolismo lipídico, inibindo a síntese de colesterol nos hepatócitos e reduzindo fatores de risco de DCVs (CHEN *et al.*, 2018).

A microbiota intestinal pode afetar o metabolismo lipídico e do colesterol através de sais biliares e o receptor de sal biliar (também conhecido como receptor farnesóide X, FXR). O FXR foi identificado na modulação do metabolismo lipídico e da glicose. Os sais biliares são importantes para a absorção de lipídeos dietéticos e vitaminas lipossolúveis, pois participam na solubilização de gorduras (HU *et al.*, 2015; KASPER *et al.*, 2017). Os sais biliares são sintetizados a partir do colesterol no fígado, armazenados na vesícula biliar e liberados no intestino após a ingestão de uma refeição (HU *et al.*, 2015).

Esses sais biliares também podem atuar como moléculas de sinalização que se ligam ao FXR, um receptor nuclear que regula vários processos fisiológicos, como glicose e metabolismo lipídico. No fígado, a ativação mediada por ácido biliar do FXR regula o metabolismo de TG, especialmente a produção de VLDL e lipogênese *de novo*. A sinalização

FXR no intestino delgado também foi demonstrada na regulação da esteatose e a obesidade (HU *et al.*, 2015). Em camundongos propensos à aterosclerose, a ativação do FXR mostrou efeitos protetores na formação de lesões ateroscleróticas (ZHANG; GÉRARD, 2022).

## **2.9 Dislipidemia, inflamação e aterosclerose**

A aterosclerose é uma doença inflamatória crônica, com atuação de macrófagos e linfócitos no processo de formação de placas de ateroma, capazes de provocar o espessamento da parede média e íntima das artérias em decorrência do acúmulo de gordura, com núcleo lipídico formado por colesterol e ésteres de colesterol, linfócitos e restos necróticos, além de material fibroso formado por colágeno produzido por fibras musculares lisas que migraram para a camada íntima dos vasos sanguíneos (SANTOS *et al.*, 2021).

Com o avanço da doença aterosclerótica, 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). Podendo contribuir para a incidência de AVE isquêmico, resultante de oclusão de artérias cerebrais devido à - trombose, cardioembolia, aterosclerose ou tampão plaquetário focal – ou então, uma isquemia consequente à uma redução completa do fluxo sanguíneo para o cérebro, como na parada cardíaca (WHITE *et al.*, 2000).

A LPL ao longo da superfície capilar do lúmen hidrolisa VLDL, resultando em restos de VLDL/partículas IDL e produtos de lipólise. As partículas de lipoproteína de densidade intermediária (IDL) são ainda catabolizadas em LDL por lipase hepática (HL). LPL também hidrolisa quilomícrons, produzindo restos ou remanescentes de quilomícrons (Figura 8). As lipoproteínas ricas em TG e seus remanescentes penetram prontamente na parede arterial e podem ser absorvidos por macrófagos levando à formação de células espumosas e ao desenvolvimento de placas ateroscleróticas (WANG *et al.*, 2022).



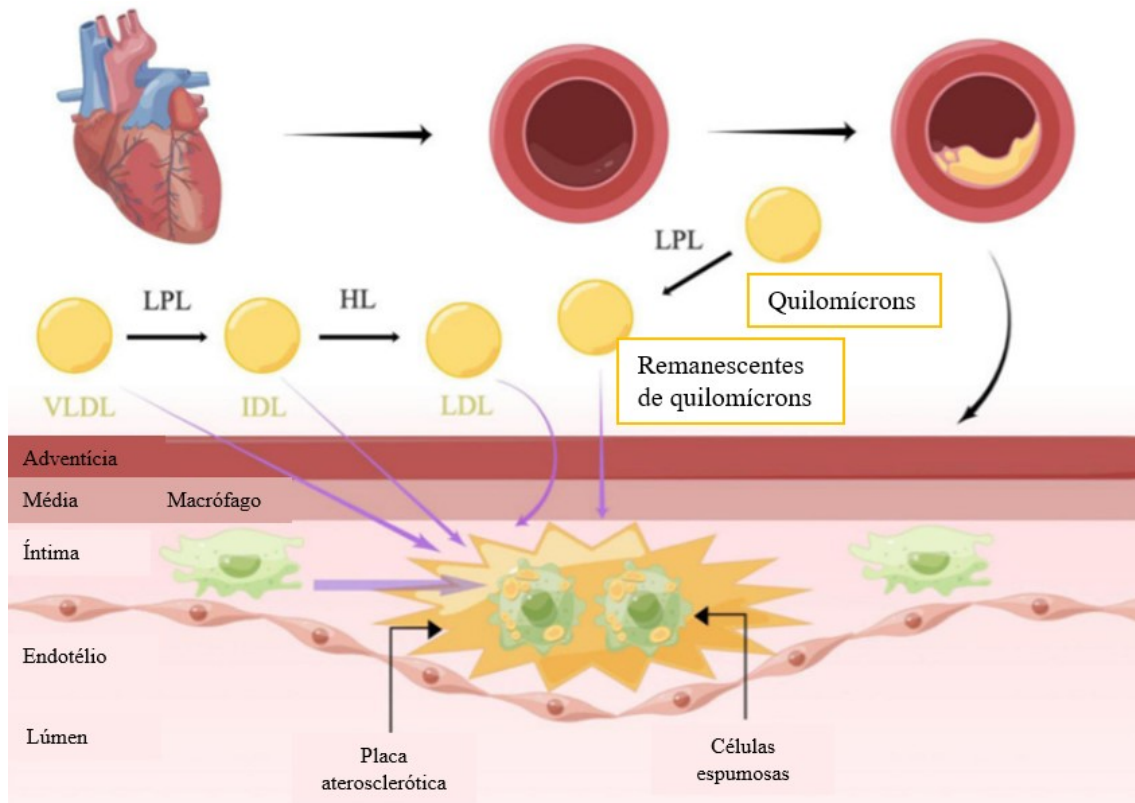


Figura 8: Formação de aterosclerose. Legenda: TRLs, lipoproteínas ricas em triglicerídeos; LPL, lipoproteína lipase; LH, lipase hepática; VLDL, lipoproteína de densidade muito baixa; IDL, lipoproteína de densidade intermediária; LDL, lipoproteína de baixa densidade; RC, colesterol remanescente. FONTE: Modificado de WANG *et al.* (2022).

Vários fatores de risco, como o aumento da pressão arterial, fazem com que o endotélio se deteriore e dê início à formação de placa aterosclerótica. Sabe-se que o início do desenvolvimento dessa placa começa com o endotélio vascular sendo danificado por muitos fatores de risco, como a elevada concentração de LDL, como mencionado previamente (SCIPIONE; CYBULSKY, 2022). Sendo assim, condições em que a LDL sofre oxidação, principalmente nos estados de hiperlipidemia e a hiperglicemia, desencadeiam uma sinalização inflamatória do endotélio vascular para um perfil pró-aterogênico (CATANIA; BARROS; FERREIRA, 2009).

Então quando a LDL sofre oxidação, acetilação e agregação no espaço subendotelial, provoca lesão endotelial, promove adesão de células inflamatórias e a diferenciação para macrófagos pró-inflamatórios. Além disso, uma infinidade de efeitos, relevantes para a progressão da doença, são induzidos, como disfunção endotelial, inibição endotelial de iNOS,

liberação de citocinas inflamatórias e agregação plaquetária (GIANAZZA *et al.*, 2019). Esse processo de oxidação das lipoproteínas será abordado com mais detalhes, na seção 2.11 Peroxidação lipídica, logo adiante, pois, a LDL oxidada na íntima pode levar ao aumento na formação de células espumosas na lesão local e formação de placa aterosclerótica. Juntamente com a resistência à insulina, comumente presente em quadros de dislipidemia, podem interferir no metabolismo da glicose, levando à hiperglicemia prolongada, a qual desencadeia o estresse oxidativo e reações inflamatórias causando danos celulares. Além disso, a LDL exposta a altos níveis de glicose circulante resulta LDL glicada. A ligação do açúcar com a fita proteica (Apo B) é chamada de glicação de LDL, modificação da Apo B pelos radicais livres conhecida como oxidação de LDL (Figura 9) (MANZLOOR *et al.*, 2022).

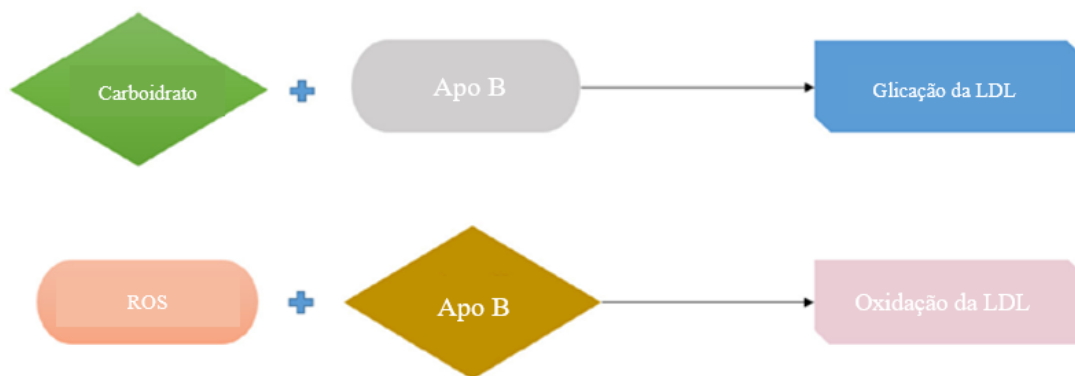


Figura 9: Glicação e oxidação de LDL. Ligação de carboidrato com a fita de apolipoproteína B (Apo B) é chamada de glicação de LDL. Modificação de Apo B por radicais livres é chamada de oxidação de LDL. Legenda: LDL, lipoproteína de baixa densidade; ROS, espécies reativas de oxigênio. FONTE: Modificado de Manzoor *et al.* (2022).

A permeabilidade da túnica íntima às lipoproteínas plasmáticas é aumentada pela disfunção endotelial, favorecendo sua retenção na região subendotelial e maior estresse oxidativo (SANTOS *et al.*, 2021; SCIPIONE; CYBULSKY, 2022). LDL oxidadas se ligam aos receptores de macrófagos, resultando em acúmulo de ésteres de colesterol e formação de células espumosas, potencializando a inflamação (SANTOS *et al.*, 2021). Além da oxidação da LDL, o estresse oxidativo desencadeia a produção de fatores pró-trombóticos e citocinas inflamatórias, que causam disfunção endotelial e lesões vasculares ateroscleróticas (WANG *et al.*, 2022).

O conceito de produção crônica ou prolongada de EROs é considerado central para a progressão da doença inflamatória (KNAUS, 2020). Vimos previamente a fisiopatologia da inflamação na aterosclerose e iremos abordar o conceito de estresse oxidativo com mais detalhe na seção seguinte.

### 2.10 Estresse oxidativo

As EROs são classicamente definidas como metabólitos parcialmente reduzidos de oxigênio ( $O_2$ ) que possuem forte capacidade oxidante. Eles são deletérios para as células em altas concentrações, mas em "concentrações fisiológicas" (concentrações exatas ainda a serem definidas), apresentam funções de sinalização complexa, como moléculas sinalizadoras que regulam o crescimento celular, a adesão das células a outras células, a diferenciação, a senescência e a apoptose (KNAUS, 2020).

Além disso, a capacidade de um organismo de produzir EROs como subproduto do metabolismo do  $O_2$ , nas quantidades ideais, permite que ele realize tarefas vitais como fertilização de óvulos, ativação de genes e ativação de mecanismos de defesa durante uma infecção, bem como a geração de energia através da cadeia de transporte de elétrons (BARBOSA *et al.*, 2010).

Átomos, íons ou moléculas contendo oxigênio ( $O_2$ ) com um elétron desemparelhado em sua órbita externa são conhecidos como EROs (ANDRADE *et al.*, 2010). Eles exibem extrema instabilidade e alta reatividade, e têm uma propensão a ligar o elétron desemparelhado com outros encontrados em estruturas próximas, agindo como receptores de elétrons (oxidantes) ou doadores (redutores) (ANDRADE *et al.*, 2010; REIS *et al.*, 2008). Quando em desbalanço redox, as EROs são prejudiciais, podendo oxidar proteínas, lipídeos e danificar o DNA (KNAUS, 2020).

A água é criada nas mitocôndrias quando o  $O_2$  passa por redução tetravalente, aceitando quatro elétrons (BARBOSA *et al.*, 2010). A citocromo oxidase, uma enzima que controla a produção de EROs e previne o excesso, catalisa esse processo (BARBOSA *et al.*, 2010). Entretanto, entre 2% e 5% do  $O_2$  oxidado nas mitocôndrias é redirecionado para uma via metabólica alternativa e reduzido univalentemente, produzindo radicais livres (BARBOSA *et al.*, 2010).

Ânion superóxido ( $\bullet O_2^-$ ) peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ), radical hidroxila ( $OH\bullet$ ) e peroxinitrito ( $ONOO^-$ ) são as EROs primárias que funcionam como sinais moleculares

vasculares (ZHOU *et al.*, 2019). A biodisponibilidade do óxido nítrico (NO) é diminuída como resultado do ONOO-, um oxidante poderoso e duradouro que produz EROs e espécies reativas de nitrogênio (ERNs) (SIGNORI *et al.*, 2007) e sua biodisponibilidade é um componente-chave da função vascular (ZHOU *et al.*, 2019; SIGNORI *et al.*, 2007).

O radical OH•, que é produzido pela interação entre os radicais •O<sub>2</sub>- e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, amplifica os efeitos do estresse oxidativo, pois é extremamente instável e aproximadamente 1 milhão de vezes mais reativo que seus antecedentes (meia-vida de 9-10 segundos) (PERCÁRIO, 2010; BARBOSA *et al.*, 2010). A peroxidação lipídica é facilitada pelos radicais •O<sub>2</sub>- e seus produtos de redução, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e, particularmente, o radical OH•- (PERCÁRIO, 2010). Isso causa danos às mitocôndrias, lisossomos e à própria membrana celular, o que resulta em morte celular (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006). A exposição prolongada aos radicais livres, mesmo em baixas concentrações, pode danificar moléculas biologicamente significativas, comprometer a sobrevivência de células e levar a dano tecidual e adoecimento (FANG; YANG; WU, 2002; PACHER; BECKMAN; LIAUDET, 2007).

Proteínas, lipoproteínas, DNA e ácido ribonucleico (RNA) são os principais alvos dos radicais livres e a sua produção excessiva causa lesões nas células, alterando sua integridade estrutural e, conseqüentemente, sua funcionalidade (OLIVEIRA; KOURY; DONANGELO, 2007). Mesmo que, todos os componentes celulares estejam suscetíveis à ação das EROs, as membranas celulares são as estruturas mais vulneráveis à peroxidação lipídica (FERREIRA; MATSUBARA, 1997). Essas alterações em sua estrutura e permeabilidade resultam em perdas de seletividade iônica, liberação de compostos citoplasmáticos e formação de produtos tóxicos (BATISTA; COSTA; PINHEIRO-SANT'ANA, 2007).

O malondialdeído (MDA), que é produzido pela oxidação da LDL e cujos níveis estão elevados em associação com fatores de risco cardiovascular como hipertensão, hiperlipidemia e diabetes, é um dos compostos carbonílicos reativos produzidos quando os peróxidos lipídicos derivados de ácidos graxos poli-insaturados se decompõem (GROTTO *et al.*, 2008). As concentrações de espécies reativas podem elevar-se acima da capacidade do organismo de eliminá-las como resultado do aumento da tensão intracelular e/ou de mecanismos de defesa antioxidante ineficazes, condição conhecida como estresse oxidativo que inclina a balança em favor da produção de radicais livres de O<sub>2</sub> (BARBOSA *et al.*, 2010).

## 2.11 Sistema antioxidante celular

Antioxidantes são definidos como qualquer substância que é capaz de retardar ou deter efetivamente o processo de oxidação, mesmo que presente em menores concentrações que o substrato oxidável (BARBOSA *et al.*, 2010), podendo agir diretamente, impedindo a formação ou neutralizando a ação dos radicais livres e espécies não-radicaís, inibindo o início da peroxidação lipídica, sequestrando radicais livres e/ou quelando íons metálicos, favorecendo o reparo e a reconstituição das estruturas biológicas lesadas, ou ainda participando de sistemas enzimáticos de perfil antioxidante, mesmo que indiretamente (CATANIA; BARROS; FERREIRA, 2009; BARBOSA *et al.*, 2010; OLIVEIRA; SCHOFFEN, 2010)

A reação em cadeia induzida por EROs ocorre em três etapas: "iniciação", caracterizada pela formação de moléculas altamente reativas como resultado do metabolismo do O<sub>2</sub>; "propagação", que acontece quando as EROs reagem com um substrato; e "cessação", que é a parada da reação em cadeia (POLJSK; ŠUPUT; MILISAV, 2013).

Como resultado, a forma mais eficaz de combater os radicais livres e, por extensão, proteger contra lesões oxidativas celulares e genéticas que contribuem para o surgimento de DCNT, é intervir com a cessação da reação, uma vez que as EROs são inevitavelmente produzidas pelo corpo humano como metabólitos fisiológicos (GOMES, 2007). Sabe-se que importantes sistemas de defesa endógenos estão presentes em células, tecidos e fluidos corporais (POLJSK; ŠUPUT; MILISAV, 2013) e são capazes de eliminar inúmeras espécies reativas e minimizar os danos oxidativos causados pelos radicais livres (POLJSK; ŠUPUT; MILISAV, 2013). Esses mecanismos de defesa antioxidante endógenos compreendem as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutatona peroxidase (GPx) e glutatona redutase (GR) (CASTELO-BRANCO; TORRES, 2011).

O papel das enzimas antioxidantes está bem estabelecido, com SOD atuando por dismutação do radical  $\bullet\text{O}_2^-$  no composto mais estável, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (CHIN *et al.*, 2011). As enzimas CAT e GPx, por outro lado, atuam de maneira integrada para evitar o acúmulo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, uma vez que este, mediante a participação dos metais ferro e cobre, culmina na geração do radical OH $\bullet$ , contra o qual não há sistema enzimático de defesa. Dada a potencialidade do radical OH $\bullet$  e a falta de defesa enzimática especializada, a manutenção da integridade da célula depende criticamente do equilíbrio perfeito das enzimas antioxidantes (BARBOSA *et al.*, 2010).

Nesse sentido, a glutathiona desempenha um papel fundamental na neutralização de  $H_2O_2$  e na proteção celular contra o estresse oxidativo. O sistema enzimático representa a primeira defesa antioxidante endógena contra as EROs; porém, para impedir os danos celulares decorrentes do estresse oxidativo persistente, o aporte de substâncias da dieta com potencial antioxidante é de fundamental importância (CATANIA; BARROS; FERREIRA, 2009).

### **2.12 Dislipidemia, estresse oxidativo e disfunção miocárdica**

A dislipidemia é uma doença complexa que afeta a estrutura e a função cardíaca mesmo antes da aterosclerose ocorrer. Por muito tempo, os efeitos diretos dos lipídeos séricos na função cardíaca independente da aterosclerose não eram conhecidos. Estudos recentes indicam que lipídeos séricos podem se acumular no coração, induzir estresse oxidativo, fibrose cardíaca inflamatória, diminuir a autofagia e a densidade microvascular e alterar a função mitocondrial dos cardiomiócitos, tornando o miocárdio vulnerável aos danos e levando à disfunção cardíaca (YAO; LI; ZENG, 2020).

No coração, as EROs desempenham um papel importante na homeostase celular, modulando a proliferação celular, a diferenciação e o acoplamento excitação-contração. O estresse oxidativo ocorre quando a produção de EROs excede a capacidade de tampão dos sistemas de defesa antioxidantes, levando a anormalidades celulares e moleculares, resultando em disfunção cardíaca. As EROs representam importantes mensageiros secundários dentro do coração, uma vez que estão envolvidos em múltiplos processos fisiológicos, incluindo diferenciação, proliferação e acoplamento excitação-contração (D'ORIE *et al.*, 2020).

Estudos clínicos têm mostrado que a hiperlipidemia aumenta o risco de insuficiência cardíaca não isquêmica (Figura 10), enquanto que a redução de lipídeos plasmáticos pode reverter a disfunção cardíaca. Além de afetar indiretamente a função do coração ao promover o desenvolvimento da aterosclerose, a hiperlipidemia também afeta diretamente a função sistólica e a resposta eletrofisiológica cardíaca, o que pode estar relacionado ao acúmulo gradual de lipídeos cardíacos e consequente estresse oxidativo sistêmico, estado pró-inflamatório e disfunção mitocondrial (YAO; LI; ZENG, 2020).

Além disso, a hipercolesterolemia pode resultar em alterações da ultraestrutura do miocárdio através de vários mecanismos. Em primeiro lugar, a presença de altos níveis de CT e AGL, promove ativação e degranulação de mastócitos desencadeando inflamação e liberação de mediadores pró-fibrose, resultando em fibrose tecidual. Em segundo lugar, a hipercolesterolemia interrompe o sistema imunológico e induz a produção de autoanticorpos, aumentando a vulnerabilidade do miocárdio e agravando os danos cardíacos. Em terceiro lugar, a autofagia insuficiente resulta em apoptose e lesão cardíaca (YAO; LI; ZENG, 2020).

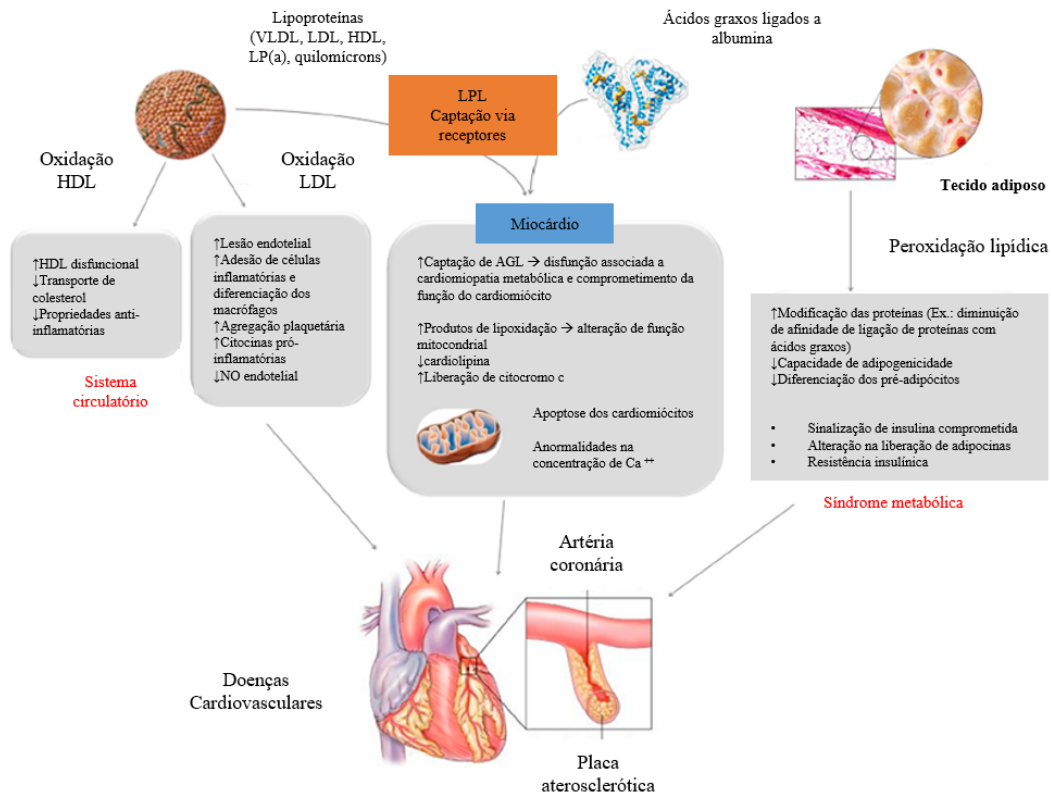


Figura 10: Os lipídeos, com papel relevante no aparecimento de doenças cardiovasculares e suscetíveis à oxidação. Os lipídeos podem ser originados de diversas fontes, tanto na corrente sanguínea quanto nos tecidos. Relevância dos lipídeos circulantes e teciduais no desenvolvimento de doenças cardiovasculares. Legenda: VLDL, lipoproteína de muito baixa densidade; LDL, lipoproteína de baixa densidade; HDL, lipoproteína de alta densidade; Lp(a), lipoproteína(a); LPL, lipoproteína lipase; AGL, ácidos graxos livres; NO, óxido nítrico. FONTE: Modificado de Gianazza *et al.* (2019).

### 2.13 Peroxidação lipídica

A peroxidação lipídica é uma reação em cadeia endógena que consiste na degradação oxidativa de lipídeos, radicais livres ou espécies não radicais livre que atacam lipídeos contendo ligações duplas carbono-carbono, com a abstração de hidrogênio de uma inserção de carbono e  $O_2$  que resulta em radicais peroxila lipídicos e  $H_2O_2$  (SHIBATA *et al.*, 2017).

Esse processo gera uma gama de produtos que podem ser identificados e quantificados, como oxisteróis, 4-hidroxi-2-nonenal, MDA, acroleína, isoprostanos e isolevuglandinas, fosfolipídeos oxidados e alguns outros produtos derivados da peroxidação lipídica (GIANAZZA *et al.*, 2019). Mitocôndria, membrana plasmática, retículo endoplasmático e peroxissoma são as principais fontes de EROs. O radical  $OH\bullet$  e  $HOO\bullet$  são as principais EROs que afetam os lipídeos, sendo que a reação em cadeia da peroxidação lipídica, geralmente termina quando uma molécula antioxidante reage com o radical peróxido lipídico (GIANAZZA *et al.*, 2019).

Muitos dos lipídeos presentes nas lipoprotéínas são suscetíveis a danos oxidativos por peroxidação lipídica, dando origem aos produtos reativos de peroxidação lipídica (rLPPs). Tendo em vista a proximidade das porções proteica e lipídica dentro das lipoproteínas, é alta a probabilidade de formação de adutos entre rLPPs e resíduos de aminoácidos das proteínas, em um processo chamado lipoxidação (AFONSO; SPICKETT, 2019).



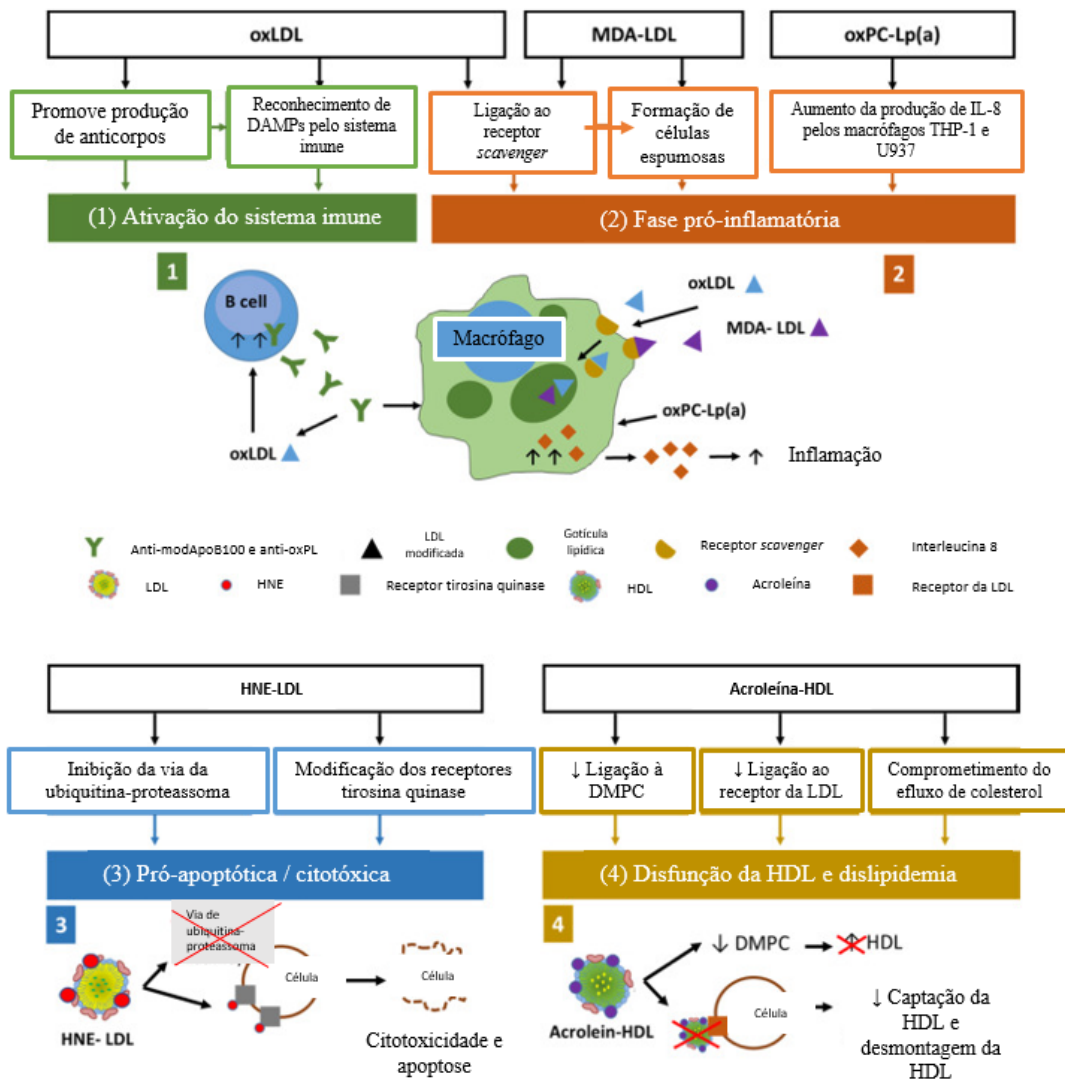


Figura 11: Efeitos fisiológicos das lipoproteínas oxidadas, com consequências no sistema imune, inflamação, apoptose e função do HDL. Legenda: (1) LDL oxidado estimula a produção de anticorpos contra si próprio e fosfolípidios oxidados, que podem ser reconhecidos pelo sistema imunológico; (2) oxLDL e MDA-LDL se ligam a receptores necrófagos, levando à sua internalização e formação de células espumosas; a oxPC-Lp(a) promove a expressão de IL-8 por macrófagos, aumentando inflamação; (3) HNE-LDL leva à apoptose tanto pela inibição da via do proteassoma da ubiquitina quanto pela modificação dos receptores da tirosina quinase, levando à sua inibição; (4) A acroleína-HDL inibe o aumento de HDL causado por 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfolina (DMPC) e a captação e desmontagem de HDL devido a diminuição da ligação ao receptor de LDL. Legenda: HDL, lipoproteína de alta densidade; LDL, lipoproteína de baixa densidade; MDA: malondialdeído; oxPC-LP(a), fosfatidilcolina oxidada ligada a lipoproteína A; IL, interleucina; HNE, 4-hidroxi-nonal; DAMP, padrões moleculares associados a danos; OxLDL, lipoproteína de baixa densidade oxidada. (AFONSO; SPICKETT, 2019).

Desde a descoberta do papel da LDL oxidada em patologias como a aterosclerose, algum esforço tem sido colocado na compreensão dos efeitos biológicos que esta lipoproteína pode ter, especialmente na patologia (Figura 11). Muitas revisões foram publicadas sobre o assunto, desde seu papel na aterosclerose, apoptose e inflamação promovendo disfunção endotelial e envelhecimento, entre outros. Embora para a HDL oxidada não tenha sido feita tanta pesquisa, alguns de seus efeitos também foram descobertos, e é claro que os efeitos benéficos dessa lipoproteína podem ser perdidos após a modificação covalente. A oxidação de HDL induz a perda de seu efeito protetor contra a LDL oxidada e isso, por sua vez, induz mais estresse oxidativo e citotoxicidade (embora em menor grau do que a LDL oxidada) (AFONSO; SPICKETT, 2019). Pode-se inferir que muitos mecanismos ainda precisam ser elucidados em relação à dislipidemia e o estresse oxidativo. Na próxima seção abordaremos o agente indutor de dislipidemia eleito para esta pesquisa.

#### **2.14 Agentes dislipidêmicos**

O tyloxapol, também conhecido como Triton WR-1339, tem sido utilizado como detergente não iônico para indução de hiperlipidemia aguda em modelos animais, com o objetivo de identificar drogas químicas ou naturais e avaliar distúrbios relacionados ao metabolismo de colesterol e/ou TG (KUMAR *et al.*, 2013; ABDOU; WAHBY, 2016). Esse detergente inibe a enzima LPL, resultando no acúmulo de TG e VLDL, enquanto reduz a liberação de HDL no plasma.

A principal função da LPL é favorecer a hidrólise dos TG presentes nos quilomícrons e VLDL e quando esta enzima está inibida, ocorre impedimento do retorno das lipoproteínas ao fígado para serem metabolizadas, o que explica o aumento de VLDL com consequente aumento de TG e CT na corrente sanguínea. Além disso, o tyloxapol apresenta um efeito sobre o metabolismo do colesterol por estimulação da atividade da 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A (HMG-CoA) redutase, uma enzima importante na síntese do colesterol (ZARZECKI *et al.*, 2014), conforme ilustrado na Figura 12.

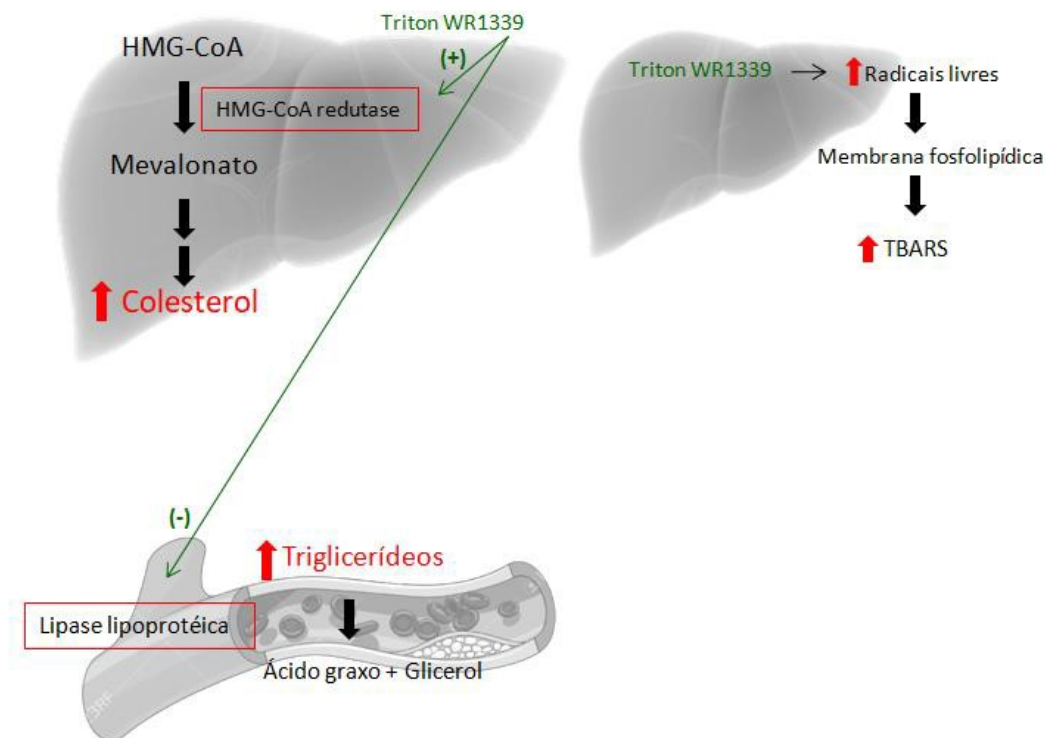


Figura 12: Mecanismo de ação do Triton WR-1339 (tyloxapol). FONTE: Modificado de ZARZECKI *et al.* (2014).

A hiperlipidemia induzida pela administração intraperitoneal de tyloxapol promove o aumento de radicais livres no organismo e, por consequência, aumento do quadro de estresse oxidativo. O dano oxidativo está associado à fisiopatologia de muitas doenças, incluindo a hiperlipidemia, hipercolesterolemia, diabetes, câncer, entre outras (POPA-WAGNER *et al.*, 2013). Quanto aos efeitos do tyloxapol, estudos anteriores sugerem aumento significativo nos marcadores de dano oxidativo, como a peroxidação lipídica, acompanhado de uma deterioração da capacidade antioxidante enzimática e não enzimática em roedores, após administração intraperitoneal do tyloxapol (OH *et al.*, 2006; DA ROCHA *et al.*, 2009).

Os modelos animais experimentais usados para induzir obesidade, dislipidemia e doença hepática gordurosa não alcoólica, em sua maioria, 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). Por outro lado, existem modelos agressivos para induzir dislipidemia em ratos e camundongos não obesos que mimetizam o observado em humanos não obesos, com o intuito de compreender melhor sobre o metabolismo de lipídeos e dislipidemia na fisiologia do

organismo por meio do uso de agentes dislipidêmicos em roedores (DE SOUSA *et al.*, 2017; FERNÁNDEZ-MARTÍNEZ *et al.*, 2019).

### 2.15 Abordagem terapêutica da dislipidemia

A abordagem terapêutica consiste em mudança de estilo de vida, administração via oral de fibratos, ômega 3, ácido nicotínico, inibidores da absorção de colesterol, sequestradores de ácidos biliares e LDL-áferese (KASPER *et al.*, 2017).

Os polifenóis são fitoquímicos encontrados em uma ampla gama de alimentos, os quais apresentam atividades antioxidante, anti-inflamatória e imunomoduladora, entre outros benefícios adicionais. Os efeitos promotores da saúde observados em modelos animais de várias DCNT explicam o crescente interesse nessas moléculas. Em particular, alguns estudos *in vitro* e em animais relataram uma atenuação de distúrbios lipídicos em resposta a polifenóis (FELDMAN *et al.*, 2021). Podendo ser observada a classificação dos polifenóis em detalhe na figura 13.

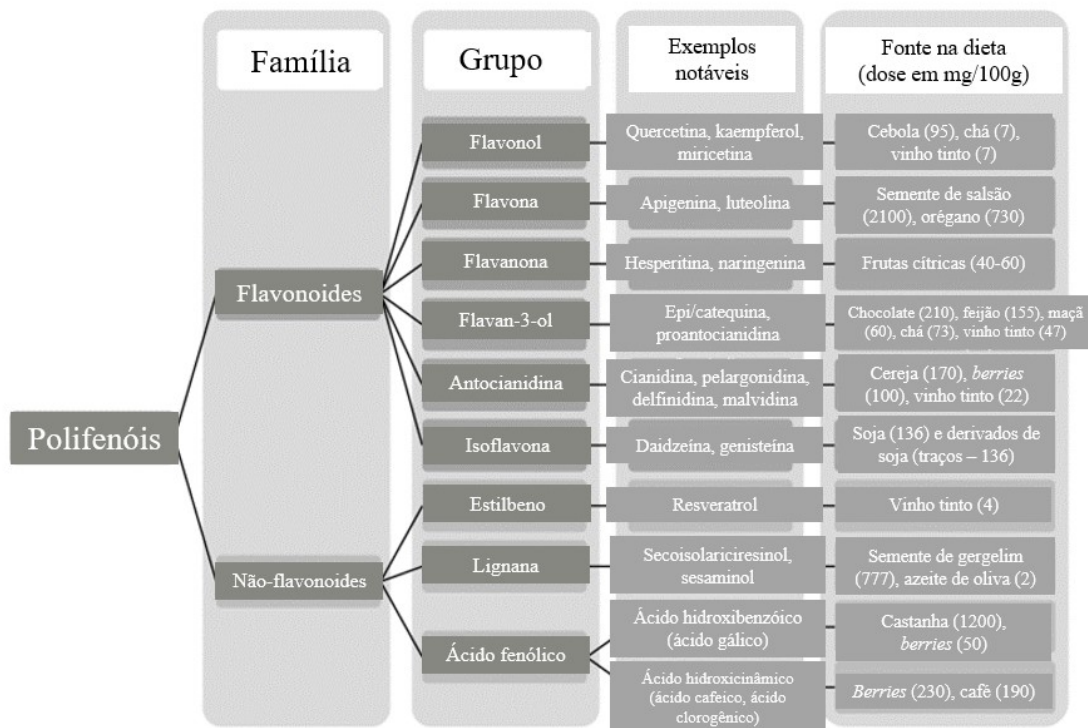


Figura 13: Classificação de polifenóis. FONTE: Modificado de FELDMAN *et al.* (2021).

Em uma revisão sistemática, dados de numerosos estudos epidemiológicos evidenciaram que as proantocianidinas oferecem proteção contra DCV, bem como reduz a carga de radicais livres em humanos. Entretanto, apenas dados limitados estão disponíveis sobre o envolvimento de proantocianidinas no metabolismo da gordura, obesidade e doenças associadas. As proantocianidinas são pertencentes a uma família de polifenóis e existem onipresentes em muitas fontes vegetais comestíveis, incluindo cevada, lúpulo, milho, maçã, uva, morango, cacau, amêndoa, canela, amendoim e chá (NIE; STÜRZENBAUM, 2019).

Os polifenóis, devido à sua estrutura química e propriedades de eliminação de EROs, têm sido comumente identificados como antioxidantes diretos. Suas propriedades têm sido extensivamente documentadas ao longo dos anos, principalmente através de numerosos estudos *in vitro*. No entanto, uma crítica comum é que o modelo experimental depende muito de concentrações elevadas de polifenóis inalterados, que podem não refletir com precisão as condições *in vivo*. De fato, a baixa biodisponibilidade, a modificação química durante a digestão no lúmen intestinal (ou seja, de glicosilação), a pós-absorção no fígado (conjugação de metil, glucuronil e sulfato), a bioacessibilidade duvidosa e a meia-vida biológica curta tornam essa alta dosagem experimental irrealista e até criam uma brecha entre condições experimentais *in vitro* e *in vivo* (FELDMAN *et al.*, 2021).

No entanto, polifenóis específicos atraíram interesse devido à sua alta biodisponibilidade e, conseqüentemente, concentrações plasmáticas relativamente altas. Exemplos primordiais, como o resveratrol ou flavonoides combinados e estilbeno de uvas vermelhas, mostraram evidências clínicas de melhora direta do desequilíbrio redox, restaurando os níveis de  $\alpha$ -tocoferol ou prevenindo sua degradação pelo primeiro encontro inicial de EROs (FELDMAN *et al.*, 2021), podendo ser observado esquematicamente na figura 14.

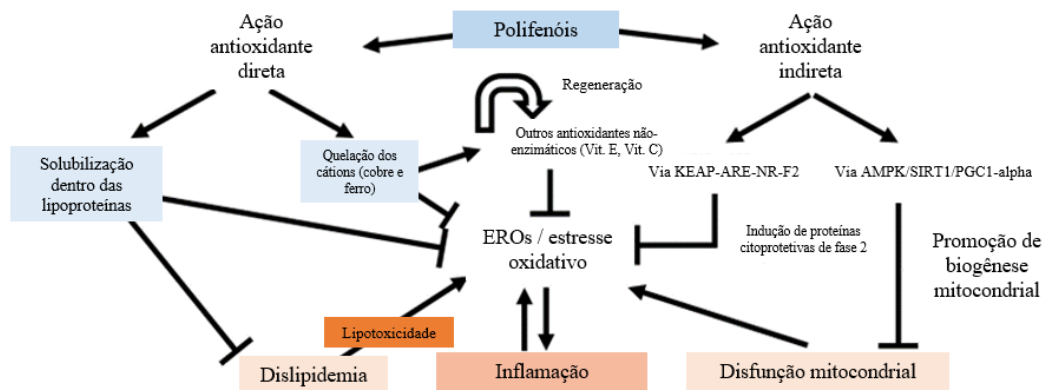


Figura 14. Proteção antioxidante e ações metabólicas da suplementação de polifenóis na dislipidemia. Legenda: AMPK, proteína quinase ativada por monofosfato de adenosina; ARE, elemento de resposta antioxidante, KEAP, proteína associada a ECH semelhante a Kelch; NR-F2, fator nuclear derivado de eritróide 2-like 2; PGC1- $\alpha$ , coativador-1 alfa do receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama; EROs, espécies reativas de oxigênio; SIRT1, sirtuína 1. FONTE: Modificado de FELDMAN *et al.* (2021).

Os polifenóis podem proteger contra o estresse oxidativo através de mecanismos antioxidantes diretos ou indiretos. No primeiro, os polifenóis podem eliminar e neutralizar as EROs antes da ocorrência de danos oxidativos aos lipídeos, proteínas e DNA. Além disso, os polifenóis também têm a capacidade de promover a proteção regenerando antioxidantes exógenos adicionais, como tocoferol e ácido ascórbico. A solubilização e o transporte de polifenóis por lipoproteínas, como quilomícron ou partículas de HDL/LDL, podem prevenir especificamente estresse oxidativo derivado de dislipidemia e complicações cardiometabólicas, notadamente aterosclerose.

Indiretamente, os polifenóis estimulam antioxidantes endógenos, incluindo a via reguladora KEAP-ARE-Nrf2, a fim de aumentar a síntese de enzimas citoprotetoras de fase 2 (por exemplo,  $\gamma$ -glutamylcisteína sintetase, GPx, GR, glutathione S-transferase, NAD(P)H:quinona oxidoreductase 1, tioredoxina, tioredoxina redutase, CAT e SOD). Além disso, os polifenóis podem estimular a via AMPK/SIRT1/PGC-1 $\alpha$  para a prevenção da disfunção mitocondrial (FELDMAN *et al.*, 2021).

Pensando em estratégias nutricionais e antioxidantes, um grupo de adultos europeus com excesso de peso foi suplementado com componentes alimentares anti-inflamatórios e

antioxidantes, que incluíam alfa-tocoferol, ácido ascórbico, resveratrol, licopeno, extrato de chá verde, ácidos graxos eicosapentaenoicos (EPA) e docosahexaenóico (DHA). Os indivíduos exibiram melhora no perfil lipídico e efeitos benéficos na função endotelial, na formação de plaquetas e em marcadores inflamatórios. Também houve redução potencial do estresse oxidativo e aumento das concentrações plasmáticas de vitamina E (BAKKER *et al.*, 2010). Nesse sentido, pensando em estratégias de baixo custo e levantamento de um recurso fitoterápico, este estudo elegeu o araticum como espécime rico em polifenóis em sua casca para análise de suas possíveis propriedades antioxidantes.

## **2.16 Araticum**

Uma das maiores biodiversidades do mundo (20 a 22% do total) encontra-se no Brasil, abrigando um grande número de espécies vegetais com potencial medicinal. No bioma Cerrado brasileiro existem mais de 600 plantas medicinais, (segundo maior bioma do Brasil, representando aproximadamente 25% do território brasileiro) entre as quais podemos destacar a ACM. ACM é uma árvore frutífera nativa do Cerrado brasileiro, ver Figura 15, amplamente espalhada pelos estados de Minas Gerais, São Paulo, Bahia, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso, Tocantins, Goiás, Maranhão, Piauí, Pará e Distrito Federal e seu fruto é popularmente conhecido como "araticum", "ariticum", "articum", "marolo", "bruto", "cabeça-de-negro", "cascudo", "pana", "pinha-do-cerrado" e "pasmada" (ARRUDA; PASTORE, 2019).



Figura 15: *Annona crassiflora* Mart. Legenda: A, árvore; B, tronco; C, tronco e galhos; D, folhas; E, botões de flores; F, flor; G, flor com pétalas; H, fruta verde; I, fruta madura; J, secção transversal de fruta; K, carpelos; L, sementes. FONTE: ARRUDA; PASTORE (2019).

O araticum mostrou ser uma fonte excepcional de compostos fenólicos, incluindo flavonoides e proantocianidinas. ACM tem sido usada na medicina tradicional para o tratamento de reumatismo, artrite, feridas, doenças venéreas, piolhos, picadas de cobra e infecções microbianas (ALMEIDA; SILVA; RIBEIRO, 1987; ALMEIDA; PROENÇA; RIBEIRO, 1994; SILVA *et al.*, 2014). Estudos anteriores mostraram atividades antioxidantes *in vitro* e *in vivo* de extratos e frações de diferentes partes botânicas de ACM. Extratos hidroetanólicos da polpa e casca do fruto apresentaram alta capacidade antioxidante *in vitro* e extratos etanólicos de semente de ACM também foi capaz de inibir a peroxidação lipídica em fígado de ratos (JUSTINO *et al.*, 2017). Além disso, Roesler e colaboradores (2007) e Ramos e colaboradores (2021) mostraram os efeitos hepatoprotetores da casca do fruto *A. crassiflora*, na prevenção da peroxidação lipídica e manutenção de enzimas antioxidantes hepáticas.

Os compostos bioativos encontrados na ACM apresentam diversas atividades biológicas e foram avaliados por meio de testes *in vitro* e *in vivo* incluindo atividades antioxidante, hepatoprotetora, anti-inflamatória, analgésica, antidiabética, cicatrizante, antidiarreica, antimicrobiana, antiparasitária, inseticida e herbicida. Esses achados sugerem que ACM pode



ser uma fonte potencial de ingredientes de valor agregado para uso em aplicações farmacêuticas, médicas, cosméticas, agrícolas, embalagens, ração e alimentos (ARRUDA; PASTORE, 2019).

O fruto é uma excelente fonte de vitamina A, fibra dietética, cobre e manganês, já que 100 g de polpa de fruto representa cerca de 116, 86, 46 e 22% da ingestão diária recomendada, respectivamente. Portanto, os frutos da ACM podem ser uma alternativa alimentar para o manejo/prevenção de complicações associadas à hipovitaminose A e doenças gastrointestinais. O fruto também se mostrou uma boa fonte de potássio, magnésio, zinco, vitamina C e folatos, contribuindo com aproximadamente 11, 8, 5, 9 e 7% da ingestão diária recomendada, respectivamente. Apesar da pequena contribuição da ACM para suprir as recomendações diárias de cálcio, ferro e vitamina E, deve-se notar que essa contribuição tem um valor biológico significativo, uma vez que esse fruto é consumido principalmente por indivíduos de famílias socialmente vulneráveis residentes em áreas rurais (CARDOSO *et al.*, 2013).

Diferentes partes botânicas de ACM (polpa de frutos, casca de frutos, sementes, folhas, caule e raiz) contêm uma variedade de compostos bioativos, como fenólicos, alcaloides, acetogeninas anôceos, carotenoides, tocols e fitoesteróis. Outras partes vegetais (especialmente as folhas) e principalmente subprodutos de frutos (casca e sementes) também são partes importantes da ACM porque são fontes potenciais de compostos de valor agregado, como óleos (sementes), óleos essenciais (folhas), fenólicos (casca de frutos e folhas), alcaloides (casca e folhas de frutos) e acetogeninas anôneas (sementes e casca de frutos) (ARRUDA; PASTORE, 2019).

A casca de frutos de *A. crassiflora* foi recentemente mostrada pelo nosso grupo como fonte de alcaloides e polifenóis, com base em um particionamento líquido-líquido de seu extrato de etanol. A maioria dos polifenóis como ácido clorogênico, (epi) catequina, procianídeos, cafeína-hexosídeos e feruloil-hexosídeos se concentraram na fração n-butanol, contribuindo para sua maior capacidade antioxidante e menor citotoxicidade quando comparados com as outras frações e extrato bruto (JUSTINO *et al.*, 2017).

No entanto, a análise antioxidante utilizando a casca de frutos de *A. crassiflora* foi realizada *in vitro*. Assim, o presente estudo teve como objetivo avaliar se uma fração enriquecida com polifenóis da casca do fruto *A. crassiflora* (PF<sub>Ac</sub>) diminui o estresse oxidativo e nitrosativo cardíaco causado pela hiperglicemia em ratos diabéticos, examinando parâmetros

bioquímicos do soro e capacidade antioxidante cardíaca, peroxidação lipídica, carbonilação de proteínas e nitração, bem como de GPx, SOD, CAT, GR, Glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH), glutathiona reduzida (GSH) e iNOs. Além disso, foi realizada a avaliação dos perfis de absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade dos principais compostos do PFAc.

### 3. Objetivo

Avaliar parâmetros de estresse oxidativo e perfil antioxidante do tecido cardíaco de camundongos com o uso do extrato etanólico da casca do fruto da ACM e fração enriquecida de polifenóis por acetato de etila em modelo animal de hiperlipidemia aguda induzida por Triton WR-1339.

### 4. Metodologia

O material deste estudo consiste em corações de camundongos sob hiperlipidemia aguda induzida por tyloxapol. Os corações foram coletados após eutanásia e congelados em nitrogênio líquido e, posteriormente, armazenados à -80°C. Os animais citados foram concedidos pelo Centro de Bioterismo e Experimentação Animal da Universidade Federal de Uberlândia (CBEA/UFU), mediante aprovação do projeto de pesquisa pelo Comitê de Ética na Utilização de Animais - CEUA/UFU, protocolo nº039/19. A 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*. 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: CEAc e PFAc. Em conformidade à escolha dos compostos, os animais foram divididos em cinco grupos. Os grupos *naive* e grupos veículo foram compostos por animais que não seriam tratados. Os outros três grupos foram alinhados

com três doses dos compostos CEAc e PFAc: 10 mg, 30 mg ou 100 mg de extrato/fração por kg de peso animal.

#### **4.1 Preparo do extrato e frações de *Annona crassiflora* Mart**

##### **4.1.1 Preparo do extrato etanólico**

A planta ACM foi identificada por André Vito Scatigna do Instituto de Biologia da Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia-MG, Brasil. Tendo sido depositado um espécime de comprovante no *Herbarium* Uberlandense com o registro HUFU68467. A casca do araticum, coletada previamente de acordo com os termos de deliberação 246/2009, autorizada pelo Conselho de Gestão do Patrimônio Genético nº 010743/2015-4 (**Anexo 1**), foi pesada e em sequência submetida à extração pelo método de maceração à temperatura ambiente, sob proteção da luz. Foram adicionados 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 (Bunchi Rotavapor R-210, Suíça). Sendo que, esse processo foi realizado repetidas vezes até a exaustão da extração. Por fim, o CEAc foi congelado à -20°C e, posteriormente, desidratado e liofilizado para subseqüentes análises.

##### **4.1.2.1 Preparo da fração acetato de etila**

O extrato bruto etanólico foi utilizado para realizar a partição líquido-líquido. Para isso, 30 gramas do CEAc foi solubilizado em 225,0 mL de solução metanol:água na proporção de 9:1; v/v. Posteriormente, o extrato foi filtrado e submetido à partição com o auxílio de um funil de separação de acordo com o protocolo proposto por JUSTINO e colaboradores (2018) usando n-hexano, diclorometano, acetato de etila e n-butanol. Foram utilizados os solventes em ordem crescente de polaridade. 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 foi escolhida para a realização dos testes.

#### 4.2 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, além de ração balanceada (**Anexo 3**) *ad libitum*. Diariamente era feita a limpeza das gaiolas e a reposição de água e comida. Os testes experimentais ocorreram quando os camundongos completaram sete semanas de idade.

Foram utilizados 50 camundongos, divididos em 10 grupos de cinco animais/cada. Os grupos experimentais foram organizados de acordo com o tipo de composto da *A. crassiflora* que seria suplementado: CEAc e PFAc. Os grupos *naive* e grupos veículo foram compostos por animais que não seriam tratados. O grupo veículo recebeu apenas o agente dislipidêmico. Em conformidade à dose dos compostos, os animais foram divididos em grupos menores, sendo administradas as seguintes dosagens dos compostos CEAc e PFAc: 10 mg, 30 mg ou 100 mg de extrato/fração por kg de peso animal, conforme ilustrado na Figura 16.

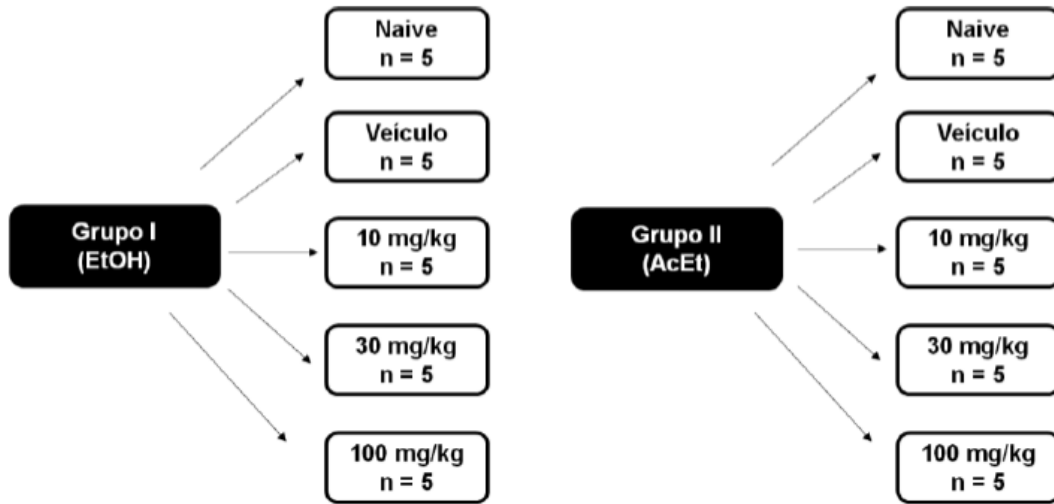


Figura 16: Delineamento experimental dos camundongos C57BL/6 tratados e não tratados com os compostos (CEAc e PFAc). FONTE: imagem criada pela autora (2022).

O pré-tratamento dos animais teve duração de 12 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  $\mu$ L dos compostos. A agulha foi levemente empurrada pelo esôfago dos camundongos para garantir a administração oral.

Os animais dos grupos *naive* receberam apenas água destilada por gavagem e ração. Os animais do grupo veículo receberam água destilada por gavagem, ração e posteriormente, injeção intraperitoneal de tyloxapol. Os demais subgrupos receberam ração, as doses de extrato/frações destinadas a cada subgrupo e posteriormente, a injeção de intraperitoneal de tyloxapol. Ao final do dia, as fezes dos animais foram coletadas para análises posteriores.

No 13.º 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 (tyloxapol), com exceção dos camundongos do grupo *naive*. Após 24 horas de aplicação do tyloxapol, foi realizada a terceira coleta de sangue para avaliar o perfil

bioquímico plasmático. Concluída às 26 horas da injeção de tyloxapol foi administrada a última dose dos compostos bioativos nos grupos tratados (ver linha do tempo do delineamento experimental, Figura 17).

A administração de uma última dose teve como objetivo avaliar possíveis alterações nos parâmetros de lipídeos deste modelo experimental, visando uma possível utilização das amostras de CEAc e PFAc do ACM em modelos de hiperlipidemia crônica e possível benefício na intervenção terapêutica pós-indução de dislipidemia em camundongos.

Ao final de 48 horas após administração do tyloxapol, 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 desenho experimental deste estudo está detalhado na Figura 17.



Figura 17: Linha do tempo do delineamento experimental. FONTE: imagem criada pela autora (2022).

### 4.3 Amostras de sangue e tecidos

Após jejum de 10 horas, as amostras de sangue foram coletadas em quatro momentos: no início do experimento, após 12 dias de pré-tratamento com os extratos/frações, após a indução da dislipidemia por injeção intraperitoneal de tyloxapol e pré-eutanásia. Os animais

foram anestesiados para a coleta de sangue, foi realizado um pequeno corte na cauda e utilizados 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 TG e CT, sendo a análise de TG feita no mesmo dia da coleta.

Os corações foram coletados após eutanásia. Antes da retirada dos órgãos, os animais foram perfundidos com 10 mL de solução fosfato-salina (PBS). Os órgãos foram retirados e imediatamente congelados em nitrogênio líquido e armazenados no ultrafreezer à -80°C para as análises de estresse oxidativo.

#### **4.4 Avaliação do perfil lipídico**

##### **4.4.1 Dosagem de colesterol total plasmático**

Para a dosagem do CT 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 CT 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 de CT em mg/mL.

##### **4.4.2 Dosagem de triglicerídeos plasmáticos**

A concentração de TG plasmáticos foi obtida por kit comercial *Interkit* para dosagem de TG, 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 de TG em mg/mL.

#### **4.4.3 Quantificação de lipídeos fecais**

Os lipídeos totais fecais foram extraídos segundo o método de Folch (FOLCH; LEES; STANLEY, 1957). Primeiramente as amostras foram homogeneizadas em uma solução de clorofórmio: metanol (2:1) e, em seguida, metanol. As mesmas foram centrifugadas à 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 à 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 CT e dos TG, em conformidade aos ensaios já elucidados.

#### **4.5 Determinação de proteínas totais**

O presente estudo utilizou os corações dos camundongos que foram mantidos congelados. O tecido cardíaco foi homogeneizado, com auxílio de homogeneizador de tecidos em tampão fosfato 900µL pH 7,4 50mM EDTA, 5mM, na proporção 1:10 (massa do coração: volume do tampão). A solução foi centrifugada a 10000g durante 15 minutos à 4°C. Em seguida, o sobrenadante foi coletado e utilizado para as análises de estresse oxidativo e o *pellet* descartado. Em seguida, foi realizada a determinação de proteínas totais do sobrenadante pelo ensaio de Bradford, quantificadas espectrofotometricamente à 595 nm (BRADFORD, 1976).

#### **4.6 Análise do estresse oxidativo**

Os parâmetros de dano oxidativo do tecido cardíaco foram analisados por meio dos seguintes parâmetros: peroxidação lipídica, carbonilação de proteínas e conteúdo de tióis. Além de avaliação do potencial antioxidante, por meio da avaliação da atividade das enzimas SOD, CAT, GPx, GR e G6PDH e da capacidade antioxidante total (FRAP) e conteúdo de GSH.

##### **4.6.1 Peroxidação lipídica ou Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)**

Dentre os produtos derivados da peroxidação lipídica decorrente do ataque dos radicais livres aos lipídeos de membrana, esta análise quantificou o MDA, que foi liberado no coração dos camundongos. Durante o teste TBARS, uma molécula de MDA reage com duas moléculas



de ácido tiobarbitúrico em pH baixo e altas temperaturas para formar o "aduto TBA-MDA" de cor rosa (YAGI, 1982).

Para isso, as amostras foram incubadas com ácido tricloroacético (TCA 10%) e TBA 0,67%, sendo posteriormente agitadas e aquecidas em banho-maria por 2 horas à 40 °C. Após o resfriamento, as mesmas foram diluídas em 5 mL de n-butanol e centrifugadas à 5000xG durante 3 minutos. O sobrenadante foi analisado em fluorescência da fase orgânica a 515 nm<sub>ex</sub> e 553 nm<sub>em</sub> (Perkin-Elmer LS 55, Massachusetts, EUA) e um valor de fluorescência do branco (de poços sem homogeneizado de coração) foi subtraído de todos os valores de fluorescência. Uma curva padrão de 1,1,3,3-tetrametoxipropano (TMP) em tampão fosfato de sódio com KCl pH 7,4 foi construída para o cálculo de TBARS por regressão linear.

#### **4.6.2 Carbonilação de proteínas**

A formação de carbonilas nas proteínas é um importante marcador de dano oxidativo. A detecção de grupos carbonílicos protéicos no ensaio de base ou 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 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 solubilizada em HCl 2,5 N e aquecimento em banho-maria à 37°C por 5 minutos. Uma curva padrão de albumina de soro bovino (BSA) foi construída para a quantificação das proteínas presentes à 280 nm. Para determinar a carbonilação foi realizada a leitura na microplaca UV à 370 nm. Para o branco da amostra, a carbonilação das proteínas foi determinada de acordo com o espectro de diferença entre a amostra tratada com DNPH em HCl e a amostra tratada apenas com HCl (LEVINE *et al.*, 1990).

#### **4.6.3 Conteúdo de tióis (sulfidrilas totais)**

Marcadores detectáveis de oxidação de proteínas incluem mudanças no conteúdo de carbonilas proteicas, nitrotirosinas, produtos finais de glicação e alterações no conteúdo de tiol

de proteínas. Nesse contexto, as sulfidrilas totais são quantificadas para compreender o potencial antioxidante das amostras, já que determinam os tióis totais. Neste ensaio, o reagente de cor conhecido como *Ellman's* (ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico) (ELLMAN, 1959) é reduzido por tióis, gerando um derivado amarelo, o 5-tio-2-nitrobenzoico (TNB), lido espectrofotometricamente à 412 nm. 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 (AKSENOV; MARKESBERY, 2001).

#### **4.7 Perfil antioxidante**

##### **4.7.1 Superóxido dismutase**

A SOD é uma enzima que catalisa a reação de dismutação de dois radicais  $\bullet\text{O}_2^-$  em  $\text{H}_2\text{O}_2$  e  $\text{O}_2$ , sendo uma defesa primária contra o estresse oxidativo. O princípio desse ensaio baseia-se na inibição da reação do radical  $\bullet\text{O}_2^-$  com o pirogalol. Como o  $\bullet\text{O}_2^-$  é gerado pela auto-oxidação do pirogalol em meio básico, a SOD presente na amostra compete pelo radical.

A auto-oxidação do pirogalol leva à formação de um composto colorido, detectado no espectrofotômetro a 420 nm (MARKLUND; MARKLUND, 1974). 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-HCl (pH 8,2) 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 à 420 nm durante 10 minutos em um intervalo de 15 em 15 segundos.

##### **4.7.2 Catalase**

A atividade da catalase foi medida através da degradação do  $\text{H}_2\text{O}_2$  pela variação de absorvância à 240nm (AEBI, 1984). A CAT é uma enzima capaz de converter  $\text{H}_2\text{O}_2$  em  $\text{O}_2$  e água. Inicialmente, as amostras foram incubadas com Triton X-100 a 10% no gelo por 15 minutos. Em seguida, foi adicionado  $\text{H}_2\text{O}_2$  0,2% em tampão fosfato de potássio 10 mM, pH 7,0. 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 (Perkin-Elmer LS 55, Massachusetts, EUA) (AEBI, 1984).

#### **4.7.3 Capacidade antioxidante total (FRAP)**

O ensaio FRAP foi utilizado para mensurar a capacidade antioxidante total do tecido cardíaco. Basicamente, as espécies antioxidantes reduzem  $\text{Fe}^{3+}$  a  $\text{Fe}^{2+}$ . O ferro ( $\text{Fe}^{2+}$ ) presente nas amostras é inicialmente quelado pela 2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ), formando o complexo  $\text{Fe}^{2+}$ -TPTZ. Este complexo é reduzido para a forma ferrosa, gerando uma coloração azul intensa quantificável em um comprimento de onda de 593 nm (Molecular Devices, Menlo Park, CA, EUA) (BENZIE; STRAIN, 1996).

Para a análise, os sobrenadantes foram incubados com o reagente de FRAP (10 volumes de tampão acetato 0,3 M pH 3,6, 1 volumes de solução de TPTZ 10 mM e 1 volume de solução de cloreto férrico 20 mM) à 37 °C durante 10 minutos e, posteriormente submetidos à leitora de microplacas. As concentrações foram obtidas por meio de uma curva padrão de trolox (10 – 200  $\mu\text{M}$ ), um análogo da vitamina E, por regressão linear. Um valor de absorvância do branco (de poços sem homogeneizado de coração) foi subtraído de todos os valores de absorvância (BENZIE & STRAIN, 1996).

#### **4.7.4 Glutathiona reduzida**

A 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 transferase (BROWNE; ARMSTRONG, 1998). Os homogeneizados de proteínas do coração foram previamente precipitados com ácido metafosfórico (MPA) na proporção de 1:1. Em seguida, foram centrifugadas a 7000xg durante 10 minutos. O sobrenadante incubado em 100 mM de tampão fosfato de sódio, pH 8,0, 5mM de EDTA e 1 mg/mL de ortoftalaldeído diluído em metanol foi utilizado para as análises.

Neste protocolo, o intuito é avaliar a reação do GSH presente no sobrenadante com o ortoftalaldeído (OPT 1 mg/mL de metanol) diluído em tampão fosfato de sódio monobásico, descrito acima. A leitura foi feita em um fluorímetro com excitação de 350 nm e emissão de 420 nm (Perkin-Elmer LS 55, Massachusetts, EUA). Um valor de fluorescência do branco)

foi subtraído de todos os valores de fluorescência. Uma curva padrão de GSH (0,001-0,1 mM) foi construída para quantificar as amostras usando regressão linear (BROWNE; ARMSTRONG, 1998).

#### **4.7.5 Atividade da glutathiona peroxidase**

A GPx catalisa a redução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por GSH e neste método, a sua atividade foi medida de acordo com a redução de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) pela glutathiona redutase, que reduziu uma ponte dissulfeto de glutathiona criada pela GPx presente nas amostras. Os homogeneizados de coração foram incubados com tampão fosfato de potássio a 100 mM, pH 7,7, 1 mM de EDTA, 40 mM de azida de sódio, 100 mM de GSH diluída em MPA a 5%, 4,5 U de GR (GPx diluído em tampão), 2 mM NADPH diluído em bicarbonato de sódio a 5% e 0,5 mM de terc-butil. A decomposição do NADPH foi avaliada por 10 minutos em espectrofotômetro a 340 nm (Molecular Devices, Menlo Park, CA, EUA) (MANNERVIK, 1985).

#### **4.7.6 Atividade da glutathiona redutase**

A GR é responsável por manter o suprimento de GSH, um dos tióis redutores mais abundantes na maioria das células. Em sua forma reduzida, a glutathiona desempenha papéis fundamentais no controle celular de EROs e determina as condições mais adequadas para o controle redox dentro de uma célula ou para a ativação da morte celular programada (COUTO; WOOD; BARBER, 2016). O ensaio da GR foi realizado para quantificar a atividade enzimática de acordo com o consumo de NADPH nas amostras, usando glutathiona oxidada (GSSG) como substrato. Os homogeneizados de coração foram incubados com 200 mM de tampão fosfato de sódio, pH 7,5, 6,3 mM de EDTA, 10 mM de GSSG e 3 mM de NADPH. O decaimento da concentração de NADPH foi avaliado por 10 minutos a 340 nm (Molecular Devices, Menlo Park, CA, EUA) (CARLBERG; MANNERVIK, 1985).

#### **4.7.7 Atividade da glicose 6-fosfato desidrogenase**

A atividade da G6PDH foi medida por uma modificação do método de Langdon (1966), em que o tecido cardíaco foi homogeneizado em 100mM-Tris/HCl, pH 7,5; 10mM-MgCl<sub>2</sub>; 0,5mM-NADP<sup>+</sup>; 0,1% (v/v) Triton X-100. A reação foi iniciada com 1 mM de glicose-6-fosfato e a cinética do ensaio foi monitorada por 10 min (Molecular Devices, Menlo Park, CA, EUA).

A atividade da G6PDH foi monitorada pela produção de NADPH com um consequente aumento na absorbância a 340 nm (LEONG; CLARK, 1984).

#### **4.8 Análise estatística**

Ao final, análises estatísticas foram realizadas sobre os resultados obtidos de cada um dos parâmetros utilizando o *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 realizou-se a análise de variância (ANOVA) one-way, test de Dunnett e Test T, sendo considerado o nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ). A correlação de Pearson foi utilizada para analisar as relações lineares entre os resultados, considerando um único valor após a eutanásia. A normalidade na distribuição dos dados foi avaliada por meio do teste Kolmogorov-Smirnov.

### **5.RESULTADOS**

#### **5.1 Avaliação dos parâmetros lipídicos**

##### **5.1.1 Lipídeos plasmáticos**

##### **5.1.1.1 Colesterol total**

As variações dos níveis de CT plasmático podem ser observadas na tabela 1 (RAMOS *et al.*, 2021). Os valores plasmáticos de colesterol antes e após a eutanásia não apresentaram diferença estatística entre os grupos, em comparação à primeira coleta de sangue e segunda coleta após o pré-tratamento de 12 dias dos grupos com 10, 30 ou 100 mg/kg de CEAc e PFAc. No entanto, após a administração intraperitoneal de 400 mg/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.

(mg/dL)	CEAc						PFAc		
	Naive	Veículo	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	
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	
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	
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	

Tabela 1: Variação dos níveis de colesterol total plasmático, em mg/dL. Início do experimento (primeira coleta); animais após pré-tratamento por 12 dias de Extrato Bruto (CEAc) e Acetato de Etila (PFAc) 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 (Adaptado de Ramos *et al.*, 2021).

### 5.1.1.2 Triglicerídeos

Os valores de TG plasmáticos antes e após a eutanásia estão representados na tabela 2 (Ramos *et al.*, 2021). Não houve diferença estatística de TG entre os grupos em comparação à primeira e a segunda coleta de sangue. Entretanto, os valores de TG plasmático foram expressivamente maiores após 24 horas de administração de tyloxapol nos camundongos do grupo veículo (2990,9 ± 436,3) em comparação aos animais do grupo *naive* (65,9 ± 4,1). Não houve reversão dos níveis de TG plasmático nos grupos tratado com CEAc e PFAC.

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 ± 112,7) foi aproximadamente 40 vezes maior que o dos animais do grupo *naive* (34,6 ± 5,6).

mg/dL	CEAc			PFAC				
	Naive	Veículo	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
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
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
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

Tabela 2: Variação dos níveis de TG plasmático, em mg/dL. Início do experimento (Primeira coleta); que receberam pré-tratamento por 12 dias de Extrato Bruto (CEAc) e Acetato de Etila (PFAC) 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 test de Dunnett. Valores expressos como média ± erro padrão \*p<0,05 e \*\* p<0,01 versus grupo veículo (adaptado de Ramos *et al.*, 2021).

### 5.1.2 Lipídeos fecais

Os resultados de lipídeos totais fecais, TG e CT fecais antes e após a administração intraperitoneal de Triton WR-1339, estão descritos na tabela 3 (Ramos *et al.*, 2021). Após a administração de tyloxapol, apenas os camundongos não tratados apresentaram aumento no conteúdo fecal de lipídeos totais ( $13,5 \pm 1,6$ – $23,0 \pm 2,3$  mg/g,  $p < 0,01$ ). O PFAC na dose de 100 mg/kg foi capaz de reduzir os lipídeos totais nas fezes após 12 dias de pré-tratamento ( $9,0 \pm 0,5$  mg/g), quando comparado ao grupo veículo ( $13,5 \pm 1,6$  mg/g) ( $p < 0,05$ ). Com relação aos TG fecais, todos os grupos apresentaram aumento no nível de TG após administração de tyloxapol ( $p < 0,01$ ).

Já os grupos pré-tratados com CEAc nas doses de 10 e 100 mg/kg apresentaram diferenças no conteúdo de TG ( $6,8 \pm 0,2$  mg/g) em relação ao grupo veículo ( $7,7 \pm 0,2$  mg/g) ( $p < 0,05$ ). Também o teor de CT nas fezes aumentou após administração de tyloxapol ( $> 5,5$  mg/g,  $p < 0,05$ ), com exceção dos camundongos tratados com PFAC a 30 mg/kg. Além disso, este grupo também apresentou menor teor de CT ( $5,4 \pm 0,1$  mg/g) do que o veículo ( $5,9 \pm 0,1$  mg/g) após injeção de tyloxapol ( $p < 0,01$ ).

(mg/g)	CEAc			PFAc				
	Naive	Veículo	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*
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
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
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##
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
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#

Tabela 3: Níveis de lipídeos totais fecais, colesterol total fecal e TG fecais, em mg/g, sendo estes coletados antes da administração intraperitoneal de Triton WR-1339 (LIP fecal A.T.) e após administração intraperitoneal de Triton WR-1339 (LIP fecal P.T.) seguido dos seus níveis de TG e CT 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 (CEAc) Acetato de Etila (PFAc) 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 próprio grupo (Adaptado de Ramos *et al.*, 2021).

### 5.3 Análise de marcadores de estresse oxidativo

#### 5.3.1 Peroxidação lipídica

Os camundongos hiperlipidêmicos induzidos por tyloxapol apresentaram maior peroxidação lipídica cardíaca do que os camundongos não hiperlipidêmicos. Sendo que, todas as doses de PFAc (10, 30 e 100 mg/kg) foram capazes de reduzir a peroxidação lipídica induzida pela hiperlipidemia ( $p < 0,05$ ), em comparação com o grupo veículo (Figura 18).

As figuras 18 a 27 apresentaram o *naive* como controle negativo, definido como grupo usado para comparação que recebeu apenas placebo. Enquanto que o grupo veículo, destacado na cor preta, foi definido como controle positivo, sendo o grupo usado para comparação que recebeu apenas o detergente tyloxapol para indução de hiperlipidemia aguda, sem recebimento de pré-tratamento.



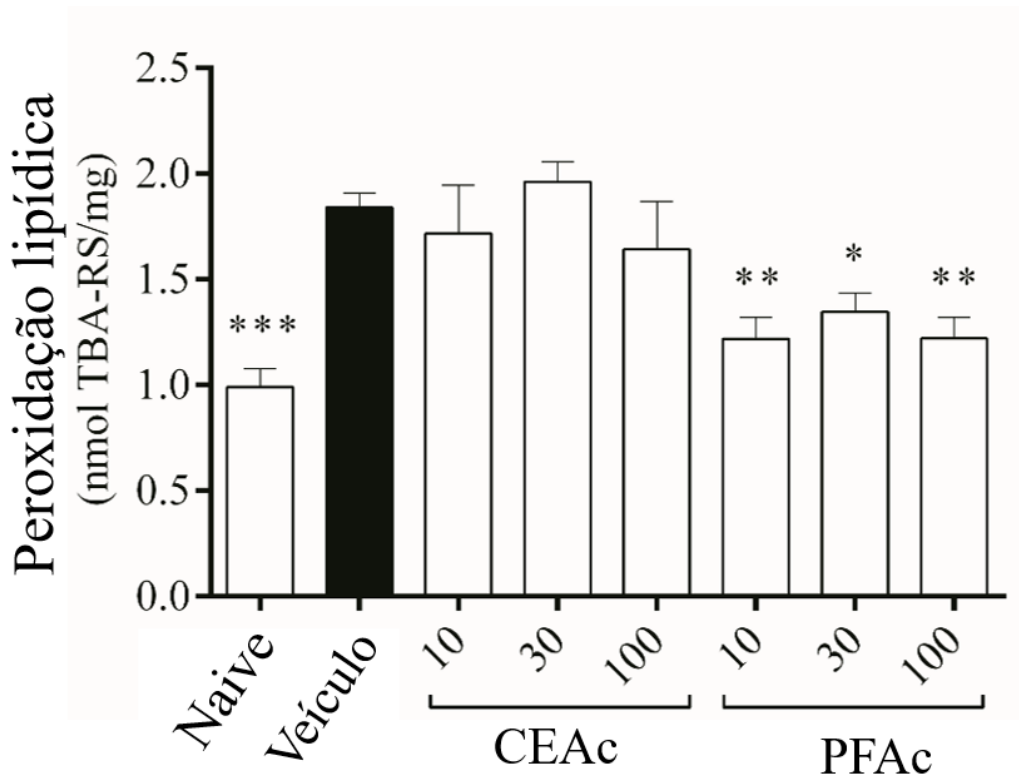


Figura 18: Peroxidação lipídica. Peroxidação lipídica do tecido cardíaco dos camundongos do grupo *naive* (água destilada); Veículo (água destilada e administração intraperitoneal de 400mg/kg Triton WR-1339); e grupos que receberam pré-tratamento por 12 dias e uma dose após administração intraperitoneal de 400mg/kg Triton WR-1339 de Extrato Bruto (CEAc) e Acetato de Etila (PFAc) 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.

### 5.3.2 Carbonilação de proteínas

A hiperlipidemia induzida por tyloxapol induziu carbonilação de proteínas cardíacas, como mostrado na figura 19. O tratamento com PFAc a 30 e 100 mg/kg mostrou redução no teor de proteína carbonila ( $p < 0,05$ ).

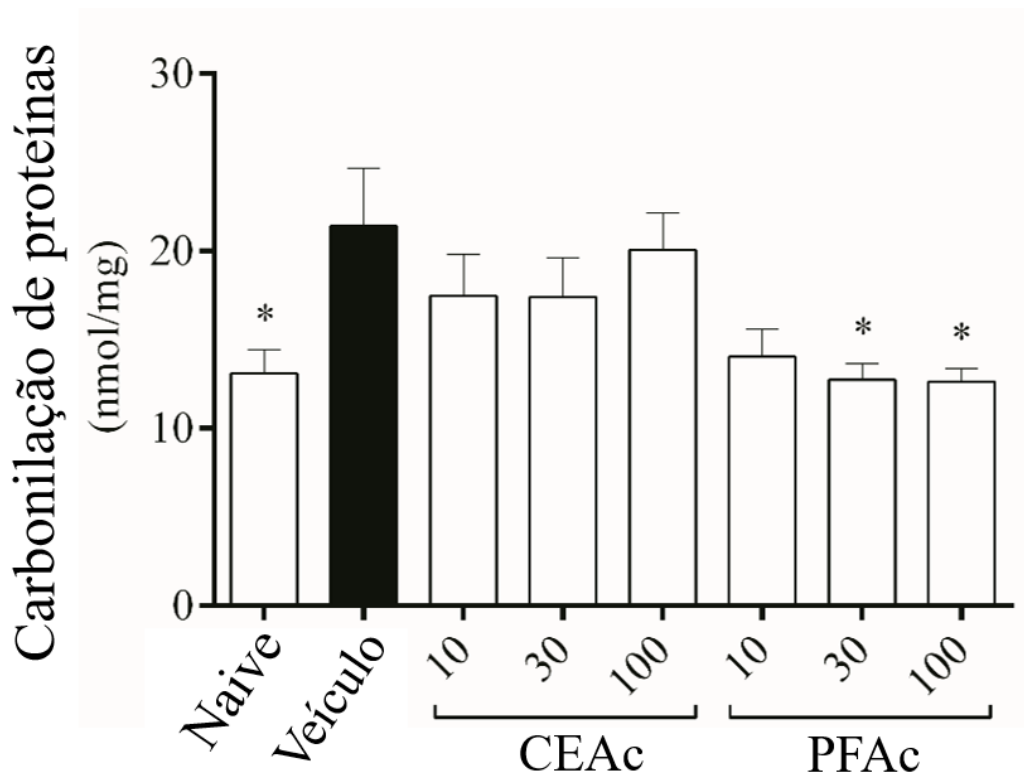


Figura 19: Carbonilação de proteínas. Conteúdo de proteínas carboniladas do tecido cardíaco dos camundongos do grupo *naive* (água destilada); Veículo (água destilada e administração intraperitoneal de 400mg/kg Triton WR-1339); e grupos que receberam pré-tratamento por 12 dias e uma dose após administração intraperitoneal de 400mg/kg Triton WR-1339 de Extrato Bruto (CEAc) e Acetato de Etila (PFAc) 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.

### 5.3.3 Conteúdo de tióis

Os níveis de tióis totais no coração de dislipidemia induzida por tyloxapol não foram alterados (Figura 20).

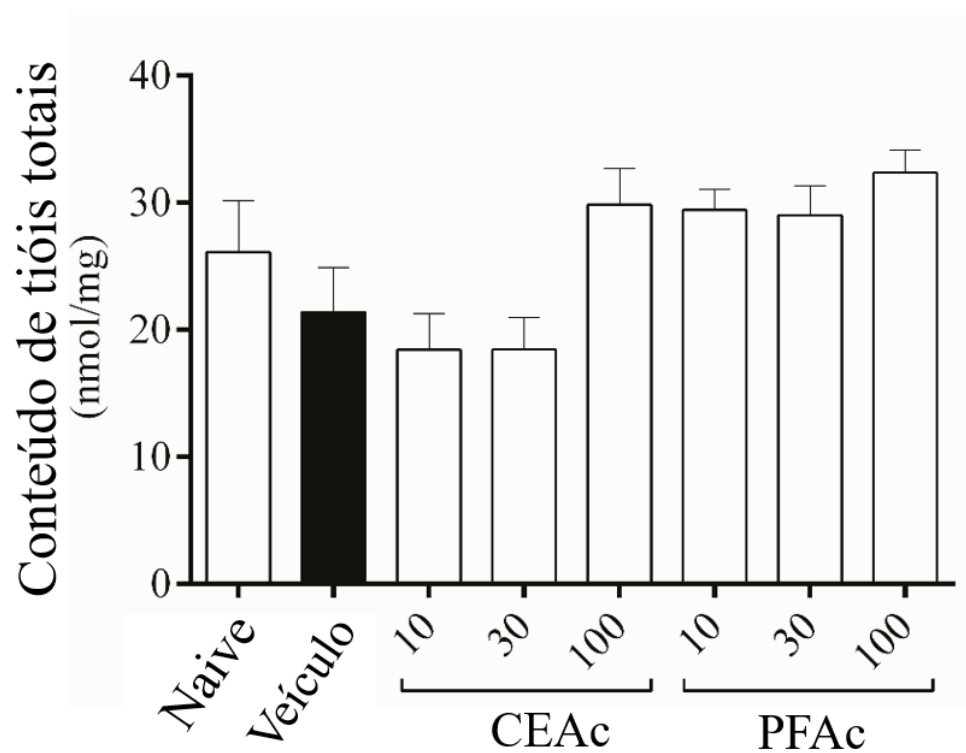


Figura 20: Conteúdo de tióis. Análise de conteúdo de tióis totais do tecido cardíaco dos camundongos do grupo *naive* (água destilada); Veículo (água destilada e administração intraperitoneal de 400mg/kg Triton WR-1339); e grupos que receberam pré-tratamento por 12 dias e uma dose após administração intraperitoneal de 400mg/kg Triton WR-1339 de Extrato Bruto (CEAc) e Acetato de Etila (PFAc) em concentrações de 10, 30 e 100mg/kg. Teste: ANOVA *one-way* test de Dunnett.

#### 5.4 Avaliação do perfil antioxidante

Os camundongos hiperlipidêmicos não tratados apresentaram aumento das atividades das enzimas CAT, SOD, G6PDH, GR e GPx quando comparados aos camundongos do grupo *naive* ( $p < 0,05$ ), além de redução do teor de GSH.

##### 5.4.1 Atividade da Superóxido dismutase

A atividade da SOD cardíaca não se elevou quando expostos a CEAc e PFAc a 30 e 100 mg/kg em camundongos hiperlipidêmicos ( $p < 0,005$ ) (Figura 21).

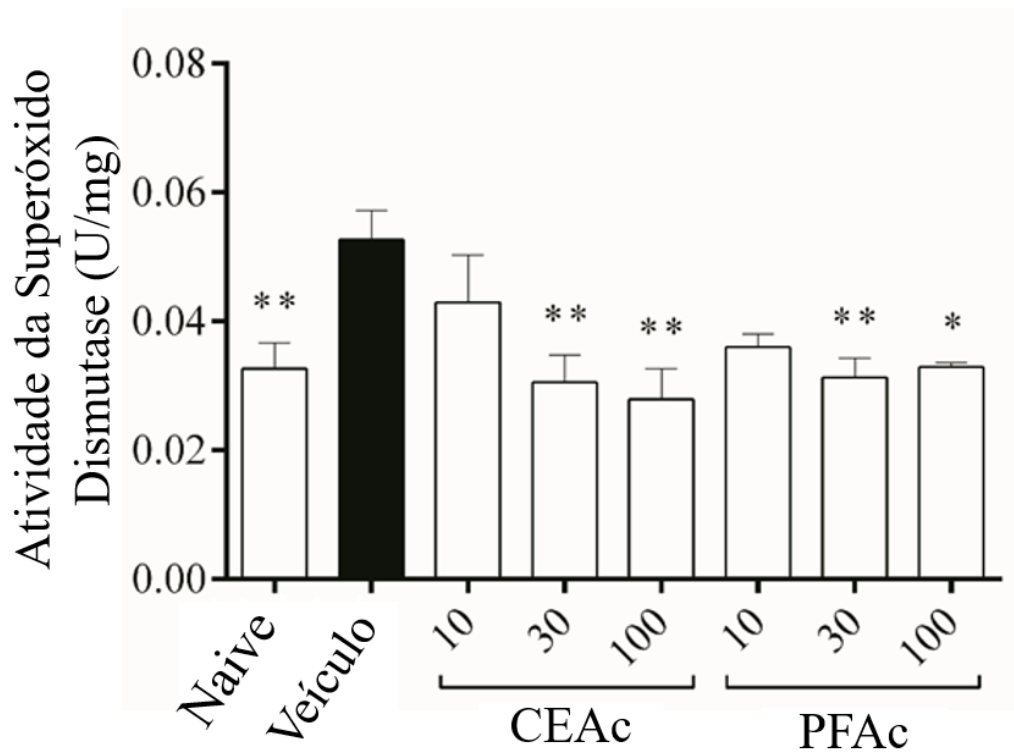


Figura 21: Atividade da enzima superóxido dismutase. Atividade da superóxido dismutase do tecido cardíaco dos camundongos do grupo *naive* (água destilada); Veículo (água destilada e administração intraperitoneal de 400mg/kg Triton WR-1339); e grupos que receberam pré-tratamento por 12 dias e uma dose após administração intraperitoneal de 400mg/kg Triton WR-1339 de Extrato Bruto (CEAc) e Acetato de Etila (PFAc) 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 \*\* $p < 0,01$  versus grupo veículo.

### 5.4.2 Atividade da catalase

Todas as doses de PFAc (10, 30 e 100 mg/kg), bem como a dose de 100 mg/kg de CEAc foram capazes de manter a atividade da CAT menor do que no grupo veículo ( $p < 0,05$ ) (Figura 22).

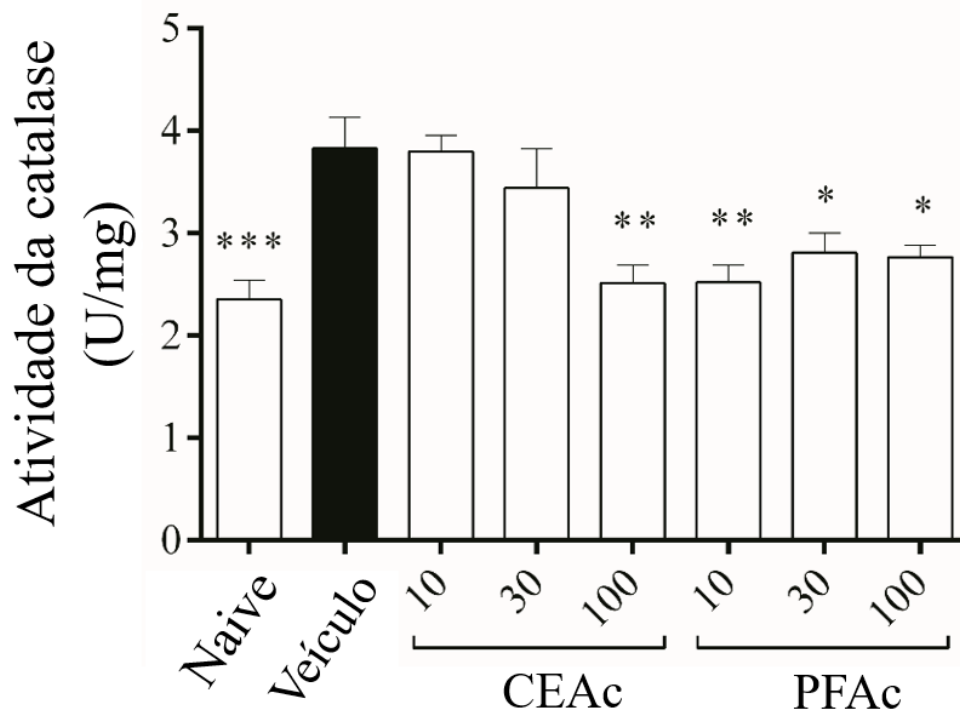


Figura 22: Atividade da enzima catalase. Atividade da catalase do tecido cardíaco dos camundongos do grupo *naive* (água destilada); Veículo (água destilada e administração intraperitoneal de 400mg/kg Triton WR-1339); e grupos que receberam pré-tratamento por 12 dias e uma dose após administração intraperitoneal de 400mg/kg Triton WR-1339 de Extrato Bruto (CEAc) e Acetato de Etila (PFAc) 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.

### 5.4.3. Capacidade antioxidante total

A capacidade antioxidante total cardíaca foi aumentada com a administração de doses de PFAc (10, 30 e 100 mg/kg) (Figura 23).

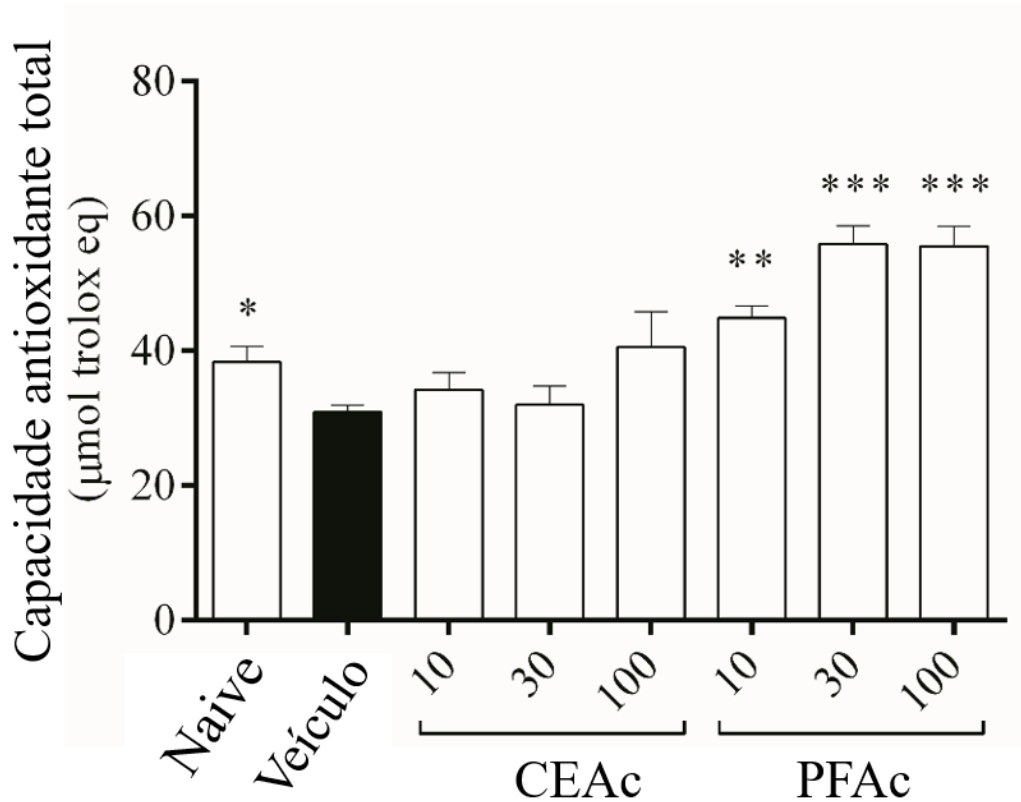


Figura 23: Capacidade antioxidante total. Análise da capacidade antioxidante total do tecido cardíaco dos camundongos do grupo *naive* (água destilada); Veículo (água destilada e administração intraperitoneal de 400mg/kg Triton WR-1339); e grupos que receberam pré-tratamento por 12 dias e uma dose após administração intraperitoneal de 400mg/kg Triton WR-1339 de Extrato Bruto (CEAc) e Acetato de Etila (PFAc) 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.

#### 5.4.4 Glutaciona reduzida

Os camundongos pré-tratados com 30 mg/kg de CEAc e PFAc (30 e 100 mg/kg) aumentaram o teor de GSH (Figura 24).

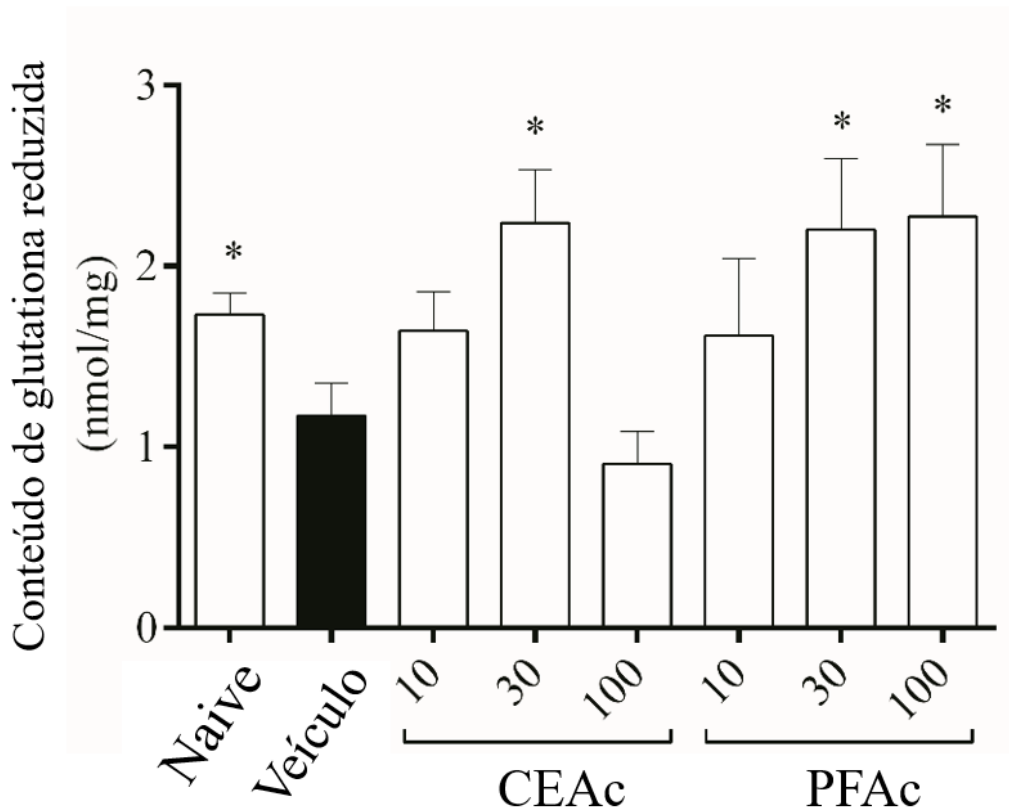


Figura 24: Conteúdo de glutaciona reduzida. Atividade do conteúdo de Glutaciona reduzida (GSH) do tecido cardíaco dos camundongos do grupo *naive* (água destilada); Veículo (água destilada e administração intraperitoneal de 400mg/kg Triton WR-1339); e grupos que receberam pré-tratamento por 12 dias e uma dose após administração intraperitoneal de 400mg/kg Triton WR-1339 de Extrato Bruto (CEAc) e Acetato de Etila (PFAc) 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.

### 5.4.5 Glutationa peroxidase

O tratamento dos camundongos hiperlipidêmicos com 100 mg/kg de CEAc mostrou diminuição da atividade da GPx ( $P < 0,05$ ).

Os camundongos hiperlipidêmicos pré-tratados com CEAc não apresentaram diferenças no G6PDH e GR em relação ao grupo veículo. O grupo tratado com PFAc não mostrou diferença para o grupo de veículos na atividade de GPx (Figura 25).

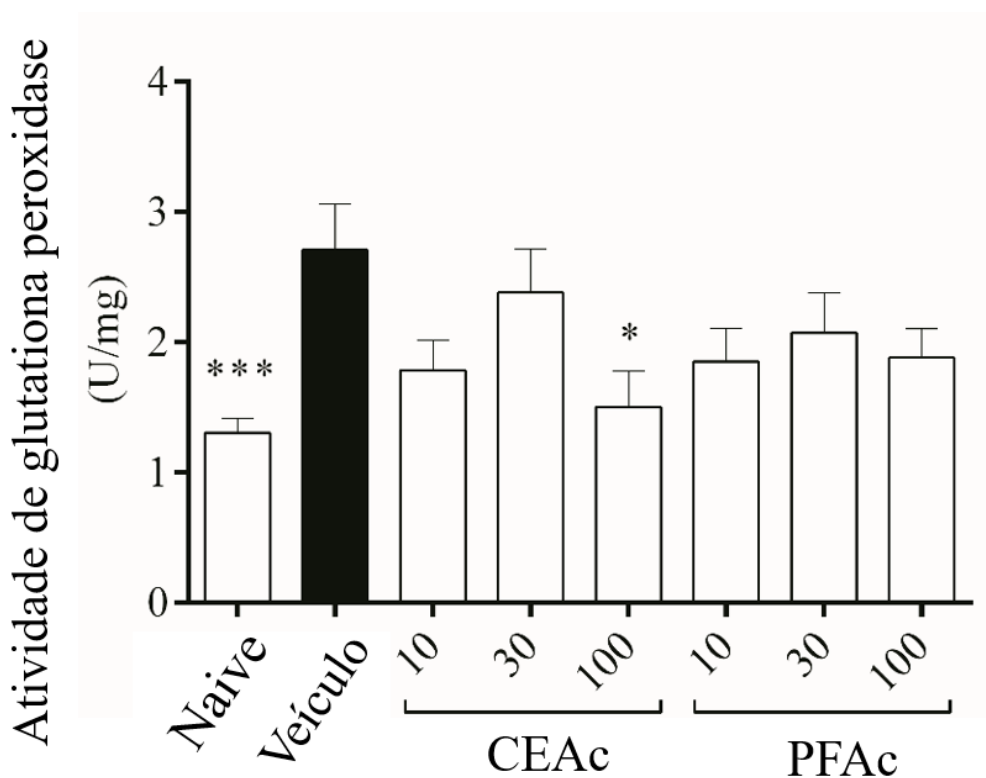


Figura 25: Atividade da enzima glutatona peroxidase. Legenda: Atividade da glutatona peroxidase do tecido cardíaco dos camundongos do grupo *naive* (água destilada); Veículo (água destilada e administração intraperitoneal de 400mg/kg Triton WR-1339); e grupos que receberam pré-tratamento por 12 dias e uma dose após administração intraperitoneal de 400mg/kg Triton WR-1339 de Extrato Bruto (CEAc) e Acetato de Etila (PFAc) 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.



### 5.4.6 Glutationa redutase

Todas as doses de PFAc apresentaram diminuição na atividade da GR ( $p < 0,001$ ) (Figura 26).

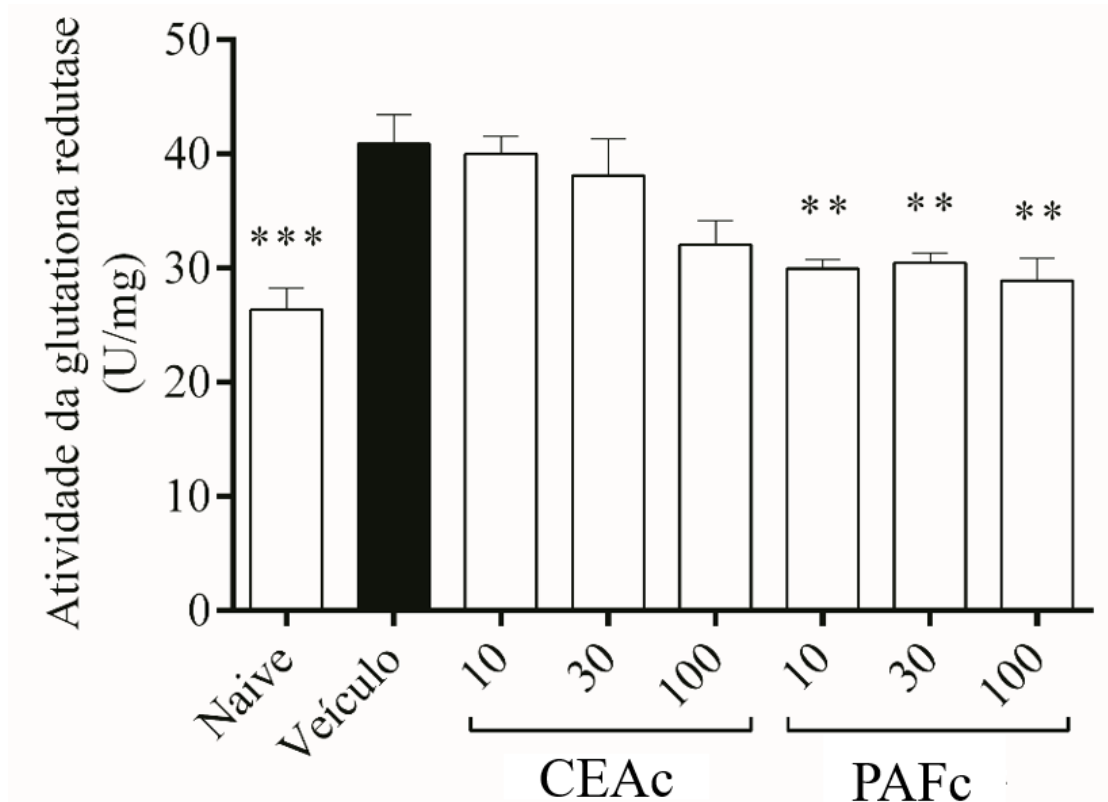


Figura 26: Atividade da enzima glutatona redutase. Atividade da glutatona redutase do tecido cardíaco dos camundongos do grupo *naive* (água destilada); Veículo (água destilada e administração intraperitoneal de 400mg/kg Triton WR-1339); e grupos que receberam pré-tratamento por 12 dias e uma dose após administração intraperitoneal de 400mg/kg Triton WR-1339 de Extrato Bruto (CEAc) e Acetato de Etila (PFAc) em concentrações de 10, 30 e 100mg/kg. Teste: ANOVA one-way test de Dunnett. Valores expressos como média  $\pm$  erro padrão \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$  versus grupo veículo.

### 5.4.7 Atividade de glicose-6-fosfato desidrogenase

O tratamento com 100 mg/kg de PFAc recuperou a atividade da G6PDH (Figura 27).

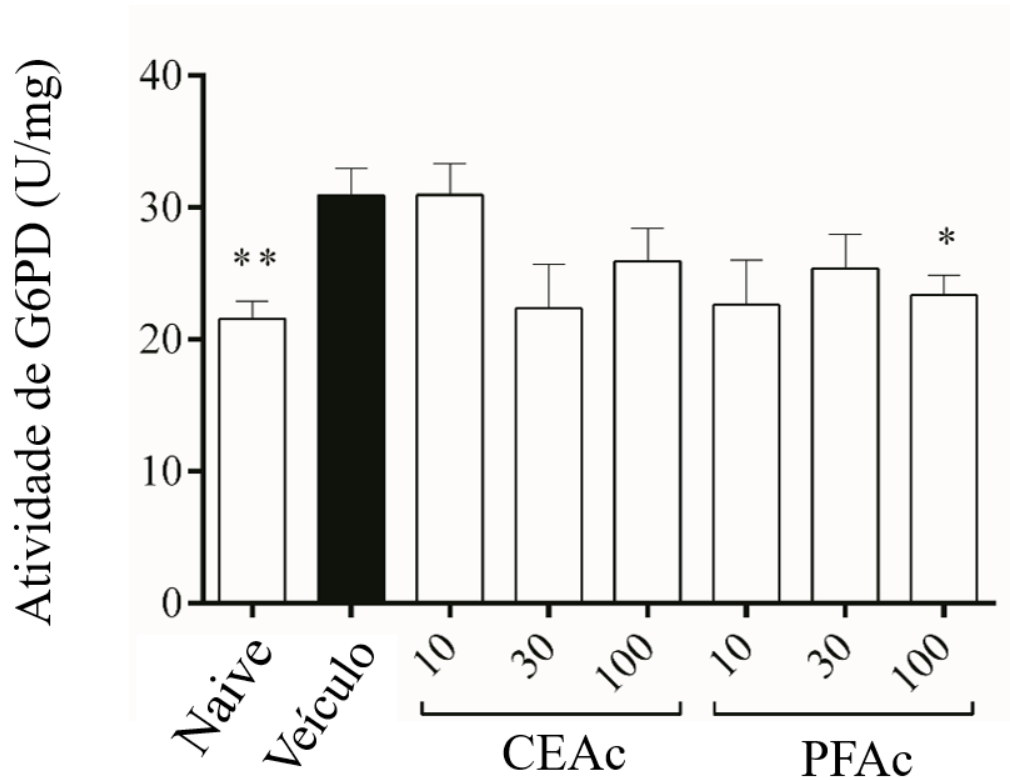


Figura 27: Atividade da enzima Glicose 6-fosfato desidrogenase. Atividade da glicose 6-fosfato desidrogenase do tecido cardíaco dos camundongos do grupo *naive* (água destilada); Veículo (água destilada e administração intraperitoneal de 400mg/kg Triton WR-1339); e grupos que receberam pré-tratamento por 12 dias e uma dose após administração intraperitoneal de 400mg/kg Triton WR-1339 de Extrato Bruto (CEAc) e Acetato de Etila (PFAc) 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 \*\* $p < 0,01$  versus grupo veículo.

## 5.5 Correlação de Pearson

A correlação: consiste na associação de duas variáveis quantitativas, cujas variações obedecem a uma função, não fazendo julgamento sobre se uma é causa ou consequência de outra. As duas variáveis podem aumentar o valor paralelamente (correlação positiva) ou de forma antagônica (correlação negativa). Quando o coeficiente de correlação se aproxima de 1, nota-se um aumento no valor de uma variável quando a outra também aumenta, ou seja, há uma relação linear positiva. Quando o coeficiente se aproxima de -1, também é possível dizer que as variáveis são correlacionadas, mas nesse caso quando o valor de uma variável aumenta e o da outra diminui, considerada correlação negativa ou inversa (HAZRA; GOGTAY, 2016).

### 5.5.1 Triglicerídeos plasmáticos, colesterol plasmático e lipídeos fecais

Todos os parâmetros apresentaram uma correlação positiva entre si (Figura 28).

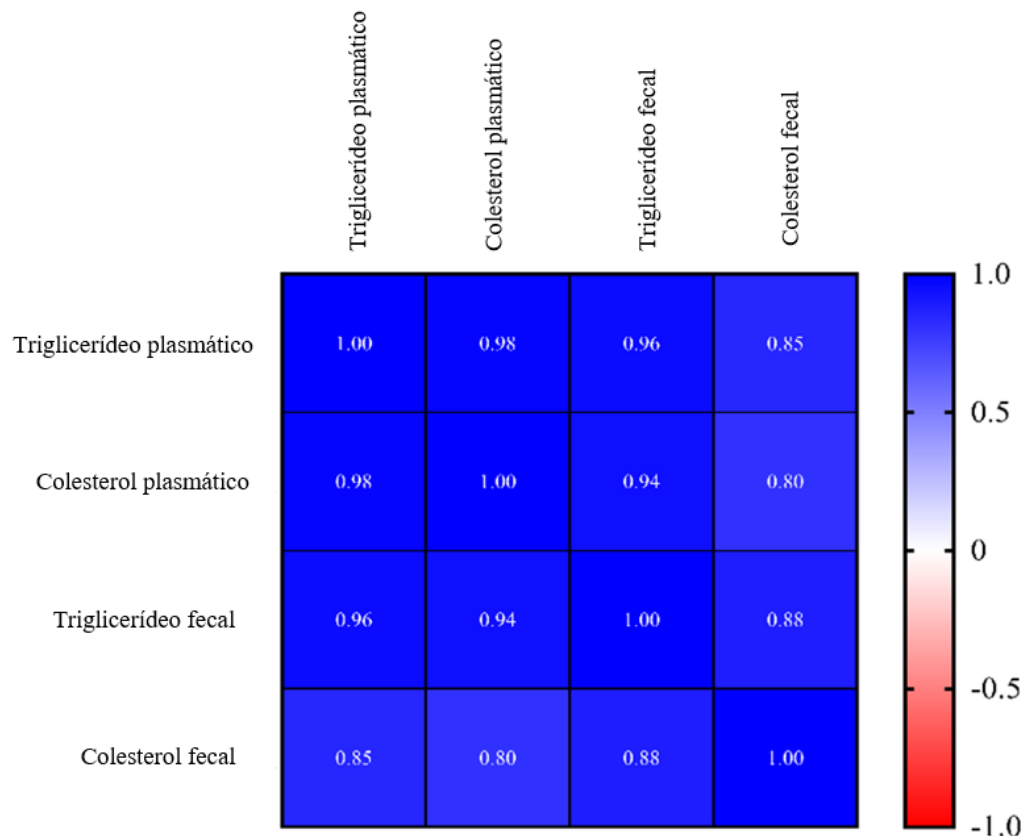


Figura 28: Correlação de Pearson entre triglicerídeos plasmáticos, colesterol plasmático e lipídeos fecais.

### 5.5.2 Parâmetros lipídicos plasmáticos, dano oxidativo e perfil antioxidante

Os quadrantes destacados em azul indicam correlação positiva e os destacados em vermelho apresentam correlação negativa (Figura 29).

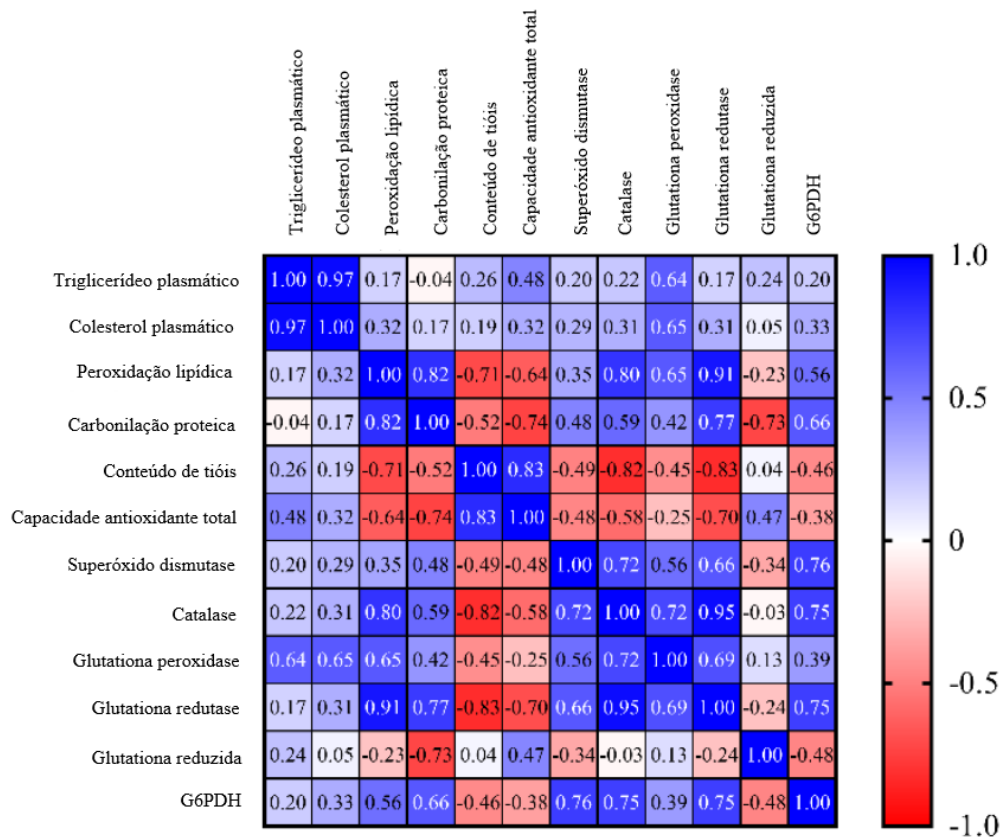


Figura 29: Correlação de Pearson entre parâmetros lipídicos plasmáticos, dano oxidativo e perfil antioxidante.

## 6. Discussão

O significado clínico das propriedades benéficas dos polifenóis vegetais foi relatado pela primeira vez em 1950, levando à inclusão na Farmacopeia Europeia do extrato alcoólico a 80% de folhas de oliveira, contendo oleuropeína, ácido cafeico, tirosol, apigenina e verbascoside. Os biofenóis também podem ser usados para desenvolver novos medicamentos úteis para combater condições inflamatórias crônicas, o risco de trombose, estados relacionados a DCV, como aterosclerose, câncer, também em combinação com drogas anticancerígenas, bem como para reduzir a deposição de amiloide associada ao DM2 e estados relacionados ao

envelhecimento, como a neurodegeneração, incluindo propriedades antioxidante, antimicrobiana, anti-hipertensiva, hipoglicêmica e efeitos vasodilatadores. Demonstrou-se que o poder antioxidante envolve modulação de vias oxidativas, ação direta sobre enzimas, proteínas, receptores e várias vias de sinalização, bem como a interferência sobre modificações epigenéticas (LERI *et al.*, 2020).

Neste estudo, avaliamos a possibilidade de efeito antioxidante da casca do fruto ACM a partir das amostras de CEAc e PFAc sobre o coração de camundongos. Uma série de substâncias fenólicas, incluindo (epi) catequina, quercetina-glicosídeo, ácido quínico e procianidina B2, foram encontradas em CEAc e PFAc nos estudos anteriores por caracterização de fitoconstituintes por Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massa sequencial de ionização por electrospray (HPLC-ESI/MSn) (LAGE *et al.*; PIMENTA *et al.*, 2014; JUSTINO *et al.*, 2016).

Devido ao seu alto teor fenólico e ao fato de que a maior parte da fração rica em polifenóis é composta por proantocianidinas, a casca do fruto ACM pode ser considerada um potencial recurso antioxidante (JUSTINO *et al.*, 2019). As proantocianidinas têm a capacidade de criar moléculas estáveis e operar como sequestradores de radicais doadores de hidrogênio, de  $O_2$  *singlet* e, além de serem agentes doadores de elétrons graças à disposição de seus hidrogênios fenólicos (GONÇALVES; DINIS; BATISTA, 2005; ZHOU *et al.*, 2014).

Estudos em modelos animais utilizando agentes específicos capazes de induzir dislipidemia são realizados com o objetivo de descobrir novos produtos naturais ou drogas com potencial terapêutico para dislipidemia. A seleção de Triton WR-1339 como agente dislipidêmico foi baseado em outros estudos que avaliaram a atividade hipolipidêmica farmacológica de plantas em um paradigma experimental induzido por Triton (KHANNA; RIZVI; CHANDER, 2002; ZARZECKI *et al.*, 2014; IBRAHIM *et al.*, 2016).

O tyloxapol é um detergente não iônico (surfactante) utilizado para causar dislipidemia grave ou crônica em animais por meio da inibição da LPL, que por sua vez aumenta a atividade da HMG-CoA redutase, enzima responsável pela biossíntese do colesterol, estimulando o aumento de CT e TG plasmático (FERNÁNDEZ-MARTÍNEZ *et al.*, 2019). Na indução de hiperlipidemia por tyloxapol, o pico de ação apresenta-se em 24 horas e uma queda do colesterol plasmático após 72 horas do uso da droga em ratos (LEVINE; SALTZMAN, 2007) e em camundongos pode observar queda dos níveis de colesterol plasmático após 48 horas (XIE *et al.*, 2007), podendo os níveis atingirem valores comparáveis aos basais, entretanto se houver

intervalos de tempo com níveis lipídicos normais, será possível a ocorrência de infecção ou regressão das lesões ateromatosas (BERTGES, *et al.*, 2011; LEVINE; SALTZMAN, 2007).

A linhagem C57BL/6 dos camundongos machos serviu como modelo animal do estudo. Após 24 horas de injeção intraperitoneal de 400 mg/kg de Triton WR-1339, o modelo foi eficaz na indução de dislipidemia grave, uma vez que os animais do grupo veículo claramente sofreram alterações nos perfis lipídicos plasmáticos e fecais. Em outros estudos doses iguais ou até mesmo menores de tyloxapol foram utilizadas na indução da dislipidemia em ratos Wistar (JASIM *et al.*, 2018; KHLIFI *et al.*, 2019) e camundongos (OH; LEE; LIM, 2006).

Os resultados das coletas de sangue evidenciaram elevação significativa nas concentrações plasmáticas de CT e TG após administração de tyloxapol. Saravanan e colaboradores (2011), bem como Ibrahim e colaboradores (2016), demonstraram elevação nos níveis de TG e CT. Foi demonstrado pelo Método de Folch para quantificação de lipídeos nas fezes que não apenas os lipídeos totais, mas também o conteúdo de CT e TG foram elevados após a injeção de tyloxapol. 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 cardíaco.

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; MIRMIRAN; AZIZI, 2013; DEY; LAKSHMANAN, 2013; ZEKA *et al.*, 2017), sendo que o acesso pode se tornar mais viável se forem utilizadas plantas inteiras ou misturas/extratos de plantas em vez de 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). As propriedades antioxidantes dos polifenóis parecem estar relacionadas ao aumento da capacidade antioxidante endógena induzida através da sinalização através da via Nrf2, do fator nuclear derivado de eritróide 2. Os polifenóis também parecem possuir propriedades anti-inflamatórias e demonstraram melhorar a função vascular através de mecanismos mediados por NO (BOWTELL; KELLY, 2019).

A hipertrigliceridemia e hipercolesterolemia estão associadas com mudanças funcionais e estruturais no tecido cardíaco, incluindo aumentos nos níveis de EROs (YAO; LI; ZENG, 2020; D'ORIA, 2020). O estresse oxidativo como um importante contribuidor de vários estados

patológicos, como DCV, 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).

Os resultados deste estudo mostraram elevação de peroxidação lipídica e na carbonilação de proteínas, indicando que o modelo de dislipidemia utilizando tyloxapol foi capaz de gerar EROs que são fatores que desencadeiam a patogênese da hiperlipidemia. Esses níveis aumentados podem ser atribuídos ao aumento da produção de EROs e/ou deficiência do sistema de defesa antioxidante endógeno (YANG *et al.*, 2008).

As enzimas SOD, GPx e CAT e os antioxidantes não enzimáticos, como a 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). Como os lipídeos são particularmente vulneráveis ao ataque de EROs e nitrogênio, é bem sabido que o estresse oxidativo e a geração de radicais livres aumentam a reação em cadeia de peroxidação lipídica (Niki, 2008).

Nesse sentido, a peroxidação lipídica é consequente ao estresse oxidativo que ocorre quando a dinâmica em equilíbrio entre o mecanismo pró-oxidante e antioxidante é prejudicado (KUMARI; MENON, 1988). Sabe-se que estados hiperlipidêmicos estão associados a alterações de propriedades físicas das membranas celulares podendo facilitar o escape de radicais livres da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial (ENGELMANN *et al.*, 1992). A formação de equivalentes de MDA foi menor nos camundongos tratados com todas as doses testadas da fração PFAc, ou seja, nossos resultados também mostraram um aumento na peroxidação lipídica, indicando que a hiperlipidemia aguda induzida pelo tyloxapol foi capaz de reduzir o FRAP e gerar MDA. Todas as concentrações de PFAc foram capazes de proteger o tecido miocárdico da peroxidação lipídica.

Pesquisas anteriores demonstraram o potencial dos flavonoides, como as proantocianidinas, na redução da peroxidação lipídica e na melhora do perfil antioxidante *in vitro* e em ratos diabéticos (LEE *et al.*, 2007; JUSTINO *et al.*, 2019). A própria quercetina, componente polifenólico do PFAc, foi avaliado em outro estudo com capacidade de diminuir

os sinais de inflamação aguda nos animais tratados de forma dose-dependente através da supressão do recrutamento de leucócitos, diminuição dos níveis de quimiocinas e níveis do produto final de peroxidação lipídica, MDA, e aumento da atividade enzimática antioxidante em modelo experimental de ratos (DONG *et al.*, 2014).

Proteínas também podem ser danificadas por EROs (SUZUKI; CARINI; BUTTERFIELD, 2010). A oxidação é o principal mecanismo molecular de dano proteico, caracterizada pela formação de carbonilas e a perda de grupos tiol (LEVINE *et al.*, 1990; SUZUKI; CARINI; BUTTERFIELD, 2010). A carbonilação proteica 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 proteica derivada de doença (DALLE-DONNE *et al.*, 2003). A carbonilação proteica foi identificada no coração dos camundongos do grupo veículo, sendo as doses de 30 e 100 mg/kg de PFAc capazes de reduzir a carbonilação de proteínas cardíacas nos camundongos com dislipidemia. Um estudo prévio mostrou que as procianidinas da casca do fruto ACM reduziram o teor de carbonilação proteica no tecido hepático sob um ambiente oxidado (JUSTINO *et al.*, 2017), o que corrobora com os resultados observados na presente investigação.

Em estudo com células PC12 também houve um declínio no nível de carbonilação de proteínas, juntamente com um aumento no status de tiol, evidenciando o potencial antioxidante do epigalocatequina-3-galato (EGCG) *in vitro*. A EGCG reduziu o dano oxidativo da célula e restaurou a integridade mitocondrial no mesmo estudo. (SRIVIDHYA; KALAISELVI, 2012). As catequinas são abundantes em chás, cacau e frutos, estando presente também na casca da ACM (JUSTINO *et al.*, 2016).

Outro estudo realizado por Tabassum e colaboradores (2007) mostrou que a catequina, um flavonoide previamente identificado em PFAc, foi capaz de evitar a carbonilação de proteínas no fígado, indicando seu potencial em inibir a formação de proteínas carboniladas. O kaempferol também presente na fração PFAc, mostrou a redução da carbonilação de proteínas pelo flavonoide (FILOMENEI *et al.*, 2012).

Neste estudo, os tióis não apresentaram modificação após administração intraperitoneal de tyloxapol, nem alteração em sua concentração após o pré-tratamento com CEAc ou PFAc. Geralmente, a dislipidemia está relacionada com redução dos níveis de tióis e alterações no status redox de tiol/ dissulfeto (KINSCHERF *et al.*, 2003), isso quer dizer, quando há dano oxidativo, os tióis podem ser convertidos em dissulfetos (AKSENOV; MARKESBERY, 2001).



GSH, cisteína, homocisteína e N-acetilcisteína são tióis protetores naturais contra o estresse oxidativo (LUBOS; HANDY; LOSCALZO, 2008), sendo observado em alguns estudos uma capacidade dos flavonoides em restauração sobre o conteúdo de tióis (DIETZMANN *et al.*, 2002; JUSTINO *et al.*, 2019). Entretanto, neste caso, como este parâmetro não mudou após indução de hiperlipidemia, não foi possível avaliar esse efeito no presente estudo.

O sistema de defesa depende de enzimas antioxidantes para limitar a formação de EROs e reparar danos oxidativos (DEY; LAKSHMANAN, 2013). As principais enzimas envolvidas no processo de remoção de EROs, particularmente o  $\bullet\text{O}^{2-}$  e  $\text{H}_2\text{O}_2$ , são SOD e CAT, respectivamente (BAKALA *et al.*, 2012; BIRBEN *et al.*, 2012); no qual SOD desmuda  $\bullet\text{O}^{2-}$  formando  $\text{H}_2\text{O}_2$  que é convertido em  $\text{H}_2\text{O}$  e  $\text{O}_2$  por CAT (BIRBEN *et al.*, 2012). Na análise da atividade da SOD, houve um aumento da atividade dessa enzima no grupo veículo. A dislipidemia gera aumento na liberação de EROs como o  $\bullet\text{O}^{2-}$ , de modo que houve uma solicitação de sobrecarga de SOD, o que pode ter contribuído para o aumento desta enzima no grupo veículo (BIRBEN *et al.*, 2012). Na presente investigação, o CEAc e PFAc nas doses de 30 mg/kg e 100 mg/kg foram capazes de reduzir a atividade da SOD, corroborando com a hipótese de menor presença de  $\bullet\text{O}^{2-}$  nesses grupos de camundongos.

Como esperado, a atividade da CAT também aumentou no veículo, a fim de reduzir o  $\text{H}_2\text{O}_2$  formado pela via SOD induzida por dislipidemia no miocárdio. A enzima CAT teve sua atividade reduzida quando os camundongos foram tratados com 100 mg/kg de CEAc e em todas as doses de PFAc. Essa demanda de CAT pode ter sido diminuída no tecido cardíaco tratado devido à presença de compostos fenólicos presentes na casca do fruto, os quais, como mencionado previamente, apresentam capacidade de eliminação e neutralização de EROs, pelas propriedades de eliminação de  $\bullet\text{O}^{2-}$  das proantocianidinas (ZHOU *et al.*, 2014; JUSTINO *et al.*, 2019).

Em um modelo animal de lesão tecidual cardíaca com doxirrubicina, os extratos das plantas *Phyllanthus amarus* e *Mormodica charantia* também reduziram a atividade de SOD e CAT, tendo kaempferol, catequina, (epi)catequina como componentes fenólicos semelhantes aos da casca do ACM (SALIU *et al.*, 2019).

O FRAP aumentou em todos as doses de PFAc, podendo observar também que o FRAP foi reduzido no grupo veículo indicando um consumo dos antioxidantes nesse modelo de hiperlipidemia aguda, tendo ocorrido o mesmo com o conteúdo de GSH que teve a sua concentração diminuída no grupo veículo. Nesse sentido, seria interessante avaliar o conteúdo

de GSSG para os próximos estudos, como foi feito pelo grupo de Albuquerque e colegas (2015) na avaliação de inflamação de neutrófilos em ratos obesos, no qual apresentou aumento da proporção de GSH/GSSG dos animais tratados com EGCG.

Quanto a normalização do conteúdo de GSH em relação ao tratamento com CEAc 30 mg/kg e PFAc 30 e 100 mg/kg sabe-se que os polifenóis, principalmente as proantocianidinas, têm a capacidade de reduzir o estresse oxidativo, levando à menor depleção e/ou necessidade de uso de GSH (LEE *et al.*, 2007; AL-NUMAIR *et al.*, 2015).

A quercetina remove os radicais livres e fortalece os sistemas de defesa antioxidante no corpo. Estudos em animais e células revelaram que a quercetina induz a síntese de GSH em células de câncer de mama humano, células derivadas de rim de macaco e linhagem celular de hepatoma humano (HepG2) (LAVOIE *et al.*, 2009; XU *et al.*, 2019). O aumento nos níveis de GSH induzido por esta substância em vários tipos de células é provavelmente devido à indução de enzimas de detoxificação de genes de fase II e proteínas antioxidantes. Concentrações não tóxicas de quercetina induzem a síntese de GSH em astrócitos, mas não em neurônios (LAVOIE *et al.*, 2009).

No processo de desintoxicação de  $H_2O_2$ , a GSH pode eliminar diretamente os radicais livres ou servir como substrato para a GPx. A produção de GSSG por GPx pode levar à retro-redução de GSSG para GSH por GR usando NADPH como redutor (MASELLA *et al.*, 2005). A síntese de NADPH, que é importante para a reciclagem de GSH por GR, pode sofrer com a diminuição da atividade de G6PDH (BIRBEN *et al.*, 2012). Isso pode ter contribuído para a diminuição do teor de GSH dos animais com hiperlipidemia e para o aumento da atividade das enzimas GPx, G6PDH e GR.

Entretanto, em um modelo de cardiopatia crônica de insuficiência cardíaca, foi evidenciado que o dinucleotídeo de nicotinamida adenina ( $NAD^+$ ), juntamente com o seu dinucleotídeo reduzido (NADH), foram fundamentais na condução de reações de oxidação-redução envolvidos na produção de energia. Além disso,  $NAD^+$  é um precursor do par de dinucleotídeos fosforilados  $NADP^+/NADPH$ , que desempenha um papel importante na desintoxicação da EROs. Em vários modelos de insuficiência cardíaca, uma redução nos níveis de  $NAD^+$  tem sido observado, podendo ser um marcador relevante para os próximos estudos de hiperlipidemia induzida em camundongos (VAN DER POL *et al.*, 2018).

Van der Pol e colaboradores (2018) também ressaltam a falha terapêutica da abordagem de insuficiência cardíaca pela inibição exógena sobre a produção de EROs ou suplementação de antioxidantes exógenos, tendo como proposta duas abordagens para manejo de estresse oxidativo em doenças cardíacas: aumentar a capacidade endógena antioxidante e aumentar a expressão/atividade de enzimas produtoras de antioxidantes.

Classicamente, sabemos que a GSH é a principal molécula antioxidante endógena e está presente em concentrações significativas em todos os compartimentos celulares, o que explica por quê o FRAP e o sistema de glutathione estão intimamente conectados (BIRBEN *et al.*, 2012). Os teores de FRAP e GSH diminuíram no subgrupo veículo e aumentaram com o pré-tratamento dos subgrupos PFAc. No entanto, na análise de conteúdo do GSH, o subgrupo veículo utilizou o GSH como meio de controle dos radicais livres. Os níveis de GSH foram, portanto, maiores nas proporções de CEAc 30 mg/kg e PFAc 30 e 100 mg/kg, indicando que esses grupos não utilizaram todas as fontes endógenas de antioxidantes.

A atividade da G6PDH leva à formação do NADPH, que é utilizado pelo GR para converter a forma GSSG em GSH (COUTO; WOOD; BARBER, 2016). A enzima G6PDH estava em maior demanda para produzir mais NADPH nos grupos veículo. O PFAc na dose de 100 mg/kg foi capaz de controlar o uso de G6PDH, possivelmente devido à menor concentração de GSSG neste subgrupo cardíaco. A atividade de GR foi alta no grupo veículo e menos ativa em todos os subgrupos de concentrações de PFAc. A GPx tem o mesmo efeito que a CAT, ambas trabalham para eliminar a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (MITTAL *et al.*, 2014). A atividade da GPx, no subgrupo veículo, aumentou provavelmente devido à alta quantidade de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Esta enzima foi menos utilizada no grupo tratado com CEAc 100 mg/kg, possivelmente devido à menor formação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Ensaio pré-clínicos em modelos animais relataram que o consumo de dieta rica em polifenóis pode ser significativamente benéfico na prevenção e tratamento de DCV devido às suas ações antioxidantes, anti-inflamatórias, antiplaquetárias e outras ações pleiotrópicas (BEHL *et al.*, 2020). Os polifenóis tendem a melhorar os níveis de TG, LDL e VLDL, o que resulta na redução das complicações cardiovasculares, bem como diminuir o risco de comorbidades associadas (BEHL *et al.*, 2020). Neste estudo, os parâmetros lipídicos e os efeitos antioxidantes de extratos ricos em polifenóis sobre os indicadores de balanço redox em camundongos hiperlipidêmicos foram medidos a fim de avaliar os potenciais efeitos preventivos cardiovasculares da casca de frutos ACM.

Uma vantagem significativa das plantas medicinais é o seu alto perfil de segurança (GUTIERREZ; BAEZ, 2009). Além disso, eles demonstraram ter benefícios positivos em uma variedade de condições médicas, incluindo hipertensão, dislipidemia, aterosclerose e insuficiência cardíaca crônica, bem como para a redução geral do risco cardiovascular (CHANG *et al.*, 2020). O extrato vegetal é uma maneira mais fácil do que a obtenção de moléculas isoladas; além disso, os efeitos biológicos aumentam na interação sinérgica ou efeitos multifatoriais entre compostos presentes em extratos de ervas (WAGNER *et al.*, 2009).

Neste estudo, os potenciais efeitos protetores cardiovasculares da casca de frutos ACM foram avaliados medindo os parâmetros lipídicos e os efeitos antioxidantes de extratos ricos em polifenóis sobre marcadores de equilíbrio redox em camundongos hiperlipidêmicos. Misturas/extratos/frações vegetais são um caminho mais fácil do que a obtenção de moléculas isoladas e os efeitos biológicos aumentam na interação sinérgica ou efeitos multifatoriais entre compostos presentes em extratos fitoterápicos (WAGNER *et al.*, 2009). Para confirmar o efeito protetor da ACM *in vivo*, o modelo de camundongos hiperlipidêmicos agudos foi estabelecido usando Triton WR-1339, um inibidor da LPL (ZHAO *et al.*, 2015).

Em nosso estudo, os animais hiperlipidêmicos não tratados apresentaram aumentos na carbonilação proteica, peroxidação lipídica e na atividade das enzimas CAT, SOD, G6PDH, GR e GPx. Além disso, houve redução nos níveis de FRAP e GSH no grupo veículo. Vale ressaltar que a PFAc apresentou os maiores efeitos nos parâmetros de estresse oxidativo e perfil antioxidante, com destaque para as doses de 30 mg/kg na redução da peroxidação lipídica, carbonilação de proteínas e atividade das enzimas SOD, CAT e GR, além do aumento da FRAP e conteúdo de GSH.

Na dose de 100 mg/kg, além dos parâmetros descritos modificou a atividade de G6PDH também. Isso pode ser explicado pela presença de proantocianidinas e flavonoides como quercetina e kaempferol mais concentrados na fração PFAc do que no CEAc, contribuindo para o aumento da sua capacidade antioxidante, como demonstrado de forma *in vitro* por Justino e colaboradores (2016), indicando assim 30 e 100 mg/kg de PFAc como as doses mais promissoras para cardioproteção e projeção para novos estudos em camundongos (Tabela 4).

Resultado com valor significativo no dano oxidativo e perfil antioxidante							
	<i>Naive</i>	CEAc			PFAc		
		10 mg/kg	30 mg/kg	100 mg/kg	10 mg/kg	30 mg/kg	100 mg/kg
PL	***				**	*	**
CP	*					*	*
Tióis							
SOD	**		**	**		**	*
CAT	***			**	**	*	*
FRAP	*				**	***	***
GSH	*		*			*	*
GPx	***			*			
GR	***				**	**	**
G6PDH	**						*

Tabela 4: Resultados dos parâmetros de danos oxidativos e perfil antioxidantes nos camundongos que receberam CEAc e PFAc após indução de hiperlipidemia aguda por tyloxapol. Teste: ANOVA *one-way* test de Dunnett. Valores expressos como média  $\pm$  erro padrão \* $p < 0,05$  versus grupo veículo, \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$  versus grupo veículo. Legenda: PL, peroxidação lipídica; CP, carbonilação de proteínas; SOD, superóxido dismutase; CAT, catalase; FRAP, poder antioxidante de redução do íon férrico; GSH, glutatona reduzida; GPx, glutatona peroxidase; GR, glutatona redutase; G6PDH, glicose-6-fosfato desidrogenase.

Nas análises realizadas sobre parâmetros de dano oxidativo e perfil antioxidante, pode-se observar que houve correlação estatística ( $p < 0,05$ ) entre TG sanguíneos e peroxidação lipídica, CAT, GPx e GR, corroborando o efeito do modelo agudo de hiperlipidemia prejudicando o perfil antioxidante endógeno (Rony *et al.*, 2014; CSONKA *et al.*, 2016).

## 7. Conclusão

Com o levantamento dos estudos desta breve revisão de literatura, foi possível correlacionar alguns possíveis mecanismos de lesão tecidual cardíaca a partir da hiperlipidemia aguda causando dano oxidativo. Sendo a dislipidemia uma doença complexa que afeta a estrutura e a função cardiológica, mesmo que toda a fisiopatologia ainda não tenha sido esclarecida, alguns estudos recentes indicam que os efeitos diretos dos lipídeos séricos na função cardíaca são independentes da aterosclerose. A presença de lipídeos séricos no coração tem sido correlacionada com a indução de estresse oxidativo, fibrose cardíaca inflamatória, diminuição da autofagia e da densidade microvascular com alteração da função mitocondrial dos cardiomiócitos, tornando o miocárdio vulnerável a danos e levando à disfunção cardíaca.

Em suma, o modelo estudado de indução aguda de hiperlipidemia por tyloxapol em camundongos demonstrou aumento nas taxas de peroxidação lipídica e carbonilação de proteínas, como marcadores de dano oxidativo. Ademais, o tratamento com PFAc apresentou efeitos antioxidantes mais relevantes do que o CEAc. Tomados em conjunto, o pré-tratamento com ACM no modelo de hiperlipidemia aguda em camundongos melhorou as atividades de SOD, CAT, GPx, G6PDH e GR e conteúdo de GSH e FRAP, demonstrando aprimoramento do perfil de algumas vias de defesa antioxidante. Além disso, a casca do fruto ACM apresentou capacidade de diminuir o teor de carbonila e o status de peroxidação lipídica. Essas descobertas apoiam uma investigação mais aprofundada sobre modelos de hiperlipidemia crônica e ensaios clínicos para um potencial tratamento preventivo e terapêutico da hiperlipidemia e DCV relacionadas.

## 8. Referência bibliográfica

ABDOU, H. M.; WAHBY, M. M. Neuroprotection of Grape Seed Extract and Pyridoxine against Triton-Induced Neurotoxicity. **Oxidative Medicine And Cellular Longevity**, Alexandria, v. 2016, p. 1-8, 2016.

Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1155/2016/8679506>>. Acesso em: 10/11/2022

AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods in Enzymology**, v. 105, p. 121-126, 1984. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(84\)05016-3](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(84)05016-3)>. Acesso em: 10/11/2022

AFONSO, C. B.; SPICKETT, C. M. Lipoproteins as targets and markers of lipoxidation. **Redox Biology**, Birmingham, v. 23, p. 1-16, 2019.

Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.redox.2018.101066>>. Acesso em: 10/11/2022

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. **Neuroscience Letters**, Lexington, v. 302, n. 2-3, p. 141-145, 2001.

Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/s0304-3940\(01\)01636-6](https://doi.org/10.1016/s0304-3940(01)01636-6)>. Acesso em: 10/11/2022

ALMEIDA, S. P.; PROENÇA, C. E. B.; RIBEIRO, J. F. **Cerrado: espécies vegetais úteis**. Planaltina: Embrapa-CPAC, 1994.

ALMEIDA, S. P.; SILVA, J. A.; RIBEIRO, J. F. **Aproveitamento alimentar de espécies nativas dos cerrados: araticum, barú, cagaita e jatobá**. 1ª ed., Planaltina: Embrapa-CPAC, 1987.

AL-NUMAIR, K. S. *et al.* Ameliorative effect of kaempferol, a flavonoid, on oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats. **Redox Report**, Riyadh, v. 20, n. 5, p. 198-209, 2015.

Disponível em: <<https://doi.org/10.1179/1351000214y.0000000117>>. Acesso em: 10/11/2022

ALBUQUERQUE, K. F. F. S. *et al.* Green tea polyphenol extract in vivo attenuates inflammatory features of neutrophils from obese rats. **European Journal of Nutrition**, São Paulo, v. 55, n. 3, p. 1261-1274, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00394-015-0940-z>>. Acesso em: 10/11/2022

ANDRADE, A. Z. *et al.* Marcadores séricos de estresse oxidativo em mulheres inférteis com endometriose. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, Riberirão Preto, v. 32, n. 6, p. 279-285, 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/s0100-72032010000600005>>.

Acesso em: 10/11/2022

ARRUDA, H. S.; PASTORE, G. M. Araticum (*Annona crassiflora* Mart.) as a source of nutrients and bioactive compounds for food and non-food purposes: a comprehensive review. **Food Research International**, Campinas, v. 123, p. 450-480, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.05.011>>. Acesso em: 10/11/2022

ASHWELL, M.; GUNN, P.; GIBSON, S. Waist-to-height ratio is a better screening tool than waist circumference and BMI for adult cardiometabolic risk factors: systematic review and meta-analysis. **Obesity Reviews**, Oxford, v. 13, n. 3, p. 275-286, 2011. Disponível em:

<<https://doi.org/10.1111/j.1467-789x.2011.00952.x>>. Acesso em: 10/11/2022

AYDIN, Suleyman *et al.* Today's and yesterday's of pathophysiology: biochemistry of metabolic syndrome and animal models. **Nutrition**, Elazig, v. 30, n. 1, p. 1-9, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.nut.2013.05.013>>. Acesso em: 10/11/2022

BAHADORAN, Z.; MIRMIRAN, P.; AZIZI, F. Dietary polyphenols as potential nutraceuticals in management of diabetes: a review. **Journal of Diabetes & Metabolic Disorders**, Tehran, v. 12, n. 1, p. 1-9, 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/2251-6581-12-43>>. Acesso em: 10/11/2022

BAKALA, H. *et al.* Catalase, a target of glycation damage in rat liver mitochondria with aging. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease**, Paris, v. 1822, n. 10, p. 1527-1534, 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2012.05.016>>. Acesso em: 10/11/2022

BAKKER, G. C. M. *et al.* An antiinflammatory dietary mix modulates inflammation and oxidative and metabolic stress in overweight men: a nutrigenomics approach. **The American Journal of Clinical Nutrition**, Leidedn, v. 91, n. 4, p. 1044-1059, 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.3945/ajcn.2009.28822>>. Acesso em: 10/11/2022

BARBOSA, K. B. F. *et al.* Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, Viçosa, v. 23, n. 4, p. 629-643, 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/s1415-52732010000400013>>. Acesso em: 10/11/2022

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, Salvador, v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/s0100-40422006000100021>>. Acesso em: 10/11/2022

BATISTA, E. S.; COSTA, A. G. V.; PINHEIRO-SANT'ANA, H. M. Adição da vitamina E aos alimentos: implicações para os alimentos e para a saúde humana. **Revista de Nutrição**, Viçosa, v. 20, n. 5, p. 525-535, 2007. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/s1415-52732007000500008>>. Acesso em: 10/11/2022

BEHL, T. *et al.* Pleotropic effects of polyphenols in cardiovascular system. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, Punjab, v. 130, p. 1-17, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110714>>. Acesso em: 10/11/2022

BENZIE, I. F.; STRAIN, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. **Analytical Biochemistry**, Hong Kong, v. 239, n. 1, p. 70-76, 1996. Disponível em: <<https://doi.org/10.1006/abio.1996.0292>>. Acesso em: 10/11/2022

BERTGES, L. C. *et al.* Hiperlipidemia induzida por Triton WR-1339 (tyloxapol) em ratos Wistar. **Revista Brasileira de Ciências Médicas e da Saúde**, Juiz de Fora, v. 1, n. 1, p. 29-31, 2011. Disponível em: <<http://www.acadmedmg.org.br/trabalho/hiperlipidemia-induzida-por-triton-wr-1339-tyloxapol-em-ratos-wistar-luiz-carlos-bertges/>>. Acesso em: 10/11/2022

BIRBEN, E. *et al.* Oxidative stress and antioxidant defense. **World Allergy Organization Journal**, Ankara, v. 5, n. 1, p. 9-19, 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.1097/wox.0b013e3182439613>>. Acesso em: 10/11/2022



- BOWTELL, J.; KELLY, V. Fruit-Derived polyphenol supplementation for athlete recovery and performance. **Sports Medicine**, Exeter, v. 49, S1, p. 3-23, 22 jan. 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s40279-018-0998-x>>. Acesso em: 10/11/2022
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, Georgia, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)>. Acesso em: 10/11/2022
- BROWN, J. M.; HAZEN, S. L. Microbial modulation of cardiovascular disease. **Nature Reviews Microbiology**, Ohio, v. 16, n. 3, p. 171-181, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.149>>. Acesso em: 10/11/2022
- BROWNE R.W.; ARMSTRONG D. Reduced glutathione and glutathione disulfide. **Methods Mol Biol.**; New York, v. 108, p. 347-52. 1998. . Disponível em: <<https://doi.org/10.1385/0-89603-472-0:347>>. Acesso em: 10/11/2022
- BURTON, G. J.; JAUNIAUX, E. Oxidative stress. **Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology**, Cambridge, v. 25, n. 3, p. 287-299, 2011. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2010.10.016>>. Acesso em: 10/11/2022
- CARDOSO, L. M. *et al.* Araticum (*Annona crassiflora* Mart.) from the Brazilian Cerrado: chemical composition and bioactive compounds. **Fruits**, Viçosa, v. 68, n. 2, p. 121-134, 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1051/fruits/2013058>>. Acesso em: 10/11/2022
- CARLBERG, I.; MANNERVIK, B. Glutathione reductase. **Methods in Enzymology**. Stockholm, v. 113, p. 484-490, 1985. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(85\)13062-4](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(85)13062-4)>. Acesso em: 10/11/2022
- CASTELO-BRANCO, V. N.; TORRES, A. G. Capacidade antioxidante total de óleos vegetais comestíveis: determinantes químicos e sua relação com a qualidade dos óleos. **Revista de Nutrição**, Rio de Janeiro, v. 24, n. 1, p. 173-187, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/s1415-52732011000100017>. Acesso em: 10/11/2022
- CATANIA, A. S.; BARROS, C. R.; FERREIRA, S. R. G. Vitaminas e minerais com propriedades antioxidantes e risco cardiometabólico: controvérsias e perspectivas. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, São Paulo, v. 53, n. 5, p. 550-559, 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/s0004-27302009000500008>>. Acesso em: 10/11/2022
- CHANG, X. *et al.* Natural drugs as a treatment strategy for cardiovascular disease through the regulation of oxidative stress. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, Beijing, v. 2020, p. 1-20, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1155/2020/5430407>>. Acesso em: 10/11/2022
- CHEN, J. *et al.* Physical exercise, gut, gut microbiota, and atherosclerotic cardiovascular diseases. **Lipids in Health and Disease**, Hunan, v. 17, n. 1, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s12944-017-0653-9>>. Acesso em: 10/11/2022
- CHEN, Z. *et al.* A vicious circle between insulin resistance and inflammation in nonalcoholic fatty liver disease. **Lipids in Health and Disease**, Nanchang, v. 16, n. 1, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s12944-017-0572-9>>. Acesso em: 10/11/2022

- CHIN, S. F. *et al.* Tocotrienol rich fraction supplementation improved lipid profile and oxidative status in healthy older adults: a randomized controlled study. **Nutrition & Metabolism**, Kuala Lumpur, v. 8, n. 1, p. 42, 2011. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/1743-7075-8-42>>. Acesso em: 10/11/2022
- COUTO, N.; WOOD, J.; BARBER, J. The role of glutathione reductase and related enzymes on cellular redox homeostasis network. **Free Radical Biology and Medicine**, Manchester, v. 95, p. 27-42, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.02.028>>. Acesso em: 10/11/2022
- CSONKA, C. *et al.* Modulation of hypercholesterolemia-induced oxidative/nitrative stress in the heart. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, Szeged, v. 2016, p. 1-23, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1155/2016/3863726>>. Acesso em: 10/11/2022
- D'ORIO, R. *et al.* The role of oxidative stress in cardiac disease: from physiological response to injury factor. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, Bari, v. 2020, p. 1-29, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1155/2020/5732956>>. Acesso em: 10/11/2022
- DA ROCHA, J. T. *et al.* Hypolipidaemic activity of orally administered diphenyl diselenide in Triton WR-1339-induced hyperlipidaemia in mice. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, Santa Maria, v. 61, n. 12, p. 1673-1679, 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.1211/jpp.61.12.0013>>. Acesso em: 10/11/2022
- DA SILVA-SANTI, L. *et al.* Liver fatty acid composition and inflammation in mice fed with high-carbohydrate diet or high-fat diet. **Nutrients**, Maringá, v. 8, n. 11, p. 682, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/nu8110682>>. Acesso em: 10/11/2022
- DALLE-DONNE, I. *et al.* Protein carbonylation in human diseases. **Trends in Molecular Medicine**, Milan, v. 9, n. 4, p. 169-176, 2003. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/s1471-4914\(03\)00031-5](https://doi.org/10.1016/s1471-4914(03)00031-5)>. Acesso em: 10/11/2022
- DE SOUSA, J. A. *et al.* Evaluation of DNA damage in Wistar rat tissues with hyperlipidemia induced by tyloxapol. **Experimental and Molecular Pathology**, Canoas, v. 103, n. 1, p. 51-55, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2017.06.009>. Acesso em: 10/11/2022
- DEY, A.; LAKSHMANAN, J. The role of antioxidants and other agents in alleviating hyperglycemia mediated oxidative stress and injury in liver. **Food & Function**, Chennai, v. 4, n. 8, p. 1148, 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1039/c3fo30317a>>. Acesso em: 10/11/2022
- DIETZMANN, J. *et al.* Thiol-inducing and immunoregulatory effects of flavonoids in peripheral blood mononuclear cells from patients with end-stage diabetic nephropathy. **Free Radical Biology and Medicine**, Madgeburg, v. 33, n. 10, p. 1347-1354, 2002. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(02\)01043-2](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(02)01043-2)>. Acesso em: 10/11/2022
- DOLZHENKO, M. M. *et al.* Management of dyslipidemia in individuals with low-to-moderate cardiovascular risk: role of nutraceuticals. **Advances in Therapy**, Kyiv, v. 37, n. 11, p. 4549-4567, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s12325-020-01490-z>>. Acesso em: 10/11/2022

- DONG, Y. *et al.* Protective effect of quercetin against oxidative stress and brain edema in an experimental rat model of subarachnoid hemorrhage. **International Journal of Medical Sciences**, Xi'an, v. 11, n. 3, p. 282-290, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.7150/ijms.7634>>. Acesso em: 10/11/2022
- ELLMAN, G. L. Tissue sulfhydryl groups. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, Michigan, v. 82, n. 1, p. 70-77, 1959. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/0003-9861\(59\)90090-6](https://doi.org/10.1016/0003-9861(59)90090-6)>. Acesso em: 10/11/2022
- ENGELMANN, B. *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**, München, v. 1165, n. 1, p. 32-37, 1992. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/0005-2760\(92\)90072-4](https://doi.org/10.1016/0005-2760(92)90072-4)>. Acesso em: 10/11/2022
- FALUDI, A. A. *et al.* Atualização da diretriz brasileira de dislipidemias e prevenção da aterosclerose. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, Rio de Janeiro, v. 109, n. 1, p. 13, 2017. Disponível em: <[http://publicacoes.cardiol.br/2014/diretrizes/2017/02\\_DIRETRIZ\\_DE\\_DISLIPIDEMIA\\_S.pdf](http://publicacoes.cardiol.br/2014/diretrizes/2017/02_DIRETRIZ_DE_DISLIPIDEMIA_S.pdf)>. Acesso em: 10/11/2022
- FÄNDRIKS, L. Roles of the gut in the metabolic syndrome: an overview. **Journal of Internal Medicine**, Gothenburg, v. 281, n. 4, p. 319-336, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/joim.12584>>. Acesso em: 10/11/2022
- FANG, Y. Z.; YANG, S.; WU, G. Free radicals, antioxidants, and nutrition. **Nutrition**, Texas, v. 18, n. 10, p. 872-879, 2002. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/s0899-9007\(02\)00916-4](https://doi.org/10.1016/s0899-9007(02)00916-4)>. Acesso em: 10/11/2022
- FELDMAN, F. *et al.* Efficacy of polyphenols in the management of dyslipidemia: a focus on clinical studies. **Nutrients**, Montreal, v. 13, n. 2, p. 1-42, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/nu13020672>>. Acesso em: 10/11/2022
- FERNÁNDEZ-MARTÍNEZ, E. *et al.* Dietary chia seeds (*Salvia hispanica*) improve acute dyslipidemia and steatohepatitis in rats. **Journal of Food Biochemistry**, Pachuca de Soto, v. 43, n. 9, p. 1-17, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/jfbc.12986>>. Acesso em: 10/11/2022
- FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, Botucatu, v. 43, n. 1, p. 61-68, 1997. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/s0104-42301997000100014>>. Acesso em: 10/11/2022
- FILOMENI, G. *et al.* Neuroprotection of kaempferol by autophagy in models of rotenone-mediated acute toxicity: possible implications for Parkinson's disease. **Neurobiology of Aging**, Rome, v. 33, n. 4, p. 767-785, 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2010.05.021>>. Acesso em: 10/11/2022
- FOLCH, J.; LEES, M.; STANLEY, G. H. S. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. **Journal of Biological Chemistry**, Boston, v. 226, n. 1, p. 497-509, 1957. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)64849-5](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)64849-5)>. Acesso em: 10/11/2022

- FONSECA-ALANIZ, M. H. *et al.* O tecido adiposo como centro regulador do metabolismo. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, São Paulo, v. 50, n. 2, p. 216-229, 2006. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/s0004-27302006000200008>>. Acesso em: 10/11/2022
- GIANAZZA, E. *et al.* Lipoxidation in cardiovascular diseases. **Redox Biology**, Milan, v. 23, p. 1-22, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.redox.2019.101119>>. Acesso em: 10/11/2022
- GOMES, F. S. Carotenóides: uma possível proteção contra o desenvolvimento de câncer. **Revista de Nutrição**, rio de Janeiro, v. 20, n. 5, p. 537-548, 2007. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/s1415-52732007000500009>>. Acesso em: 10/11/2022
- GONÇALVES, C.; DINIS, T.; BATISTA, M. Antioxidant properties of *Uncaria tomentosa* of bark decoction: a mechanism for anti-inflammatory activity. **Phytochemistry**, Coimbra, v. 66, n. 1, p. 89-98, 2005. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2004.10.025>>. Acesso em: 10/11/2022
- GROTTO, D. *et al.* Avaliação da estabilidade do marcador plasmático do estresse oxidativo: malondialdeído. **Química Nova**, Santa Maria, v. 31, n. 2, p. 275-279, 2008. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/s0100-40422008000200016>>. Acesso em: 10/11/2022
- HAZRA, A.; GOGTAY, N. Biostatistics series module 6: correlation and linear regression. **Indian Journal of Dermatology**, Kolkata, v. 61, n. 6, p. 593, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.4103/0019-5154.193662>>. Acesso em: 10/11/2022
- HU, Y. *et al.* Protective effects of tartary buckwheat flavonoids on high TMAO diet-induced vascular dysfunction and liver injury in mice. **Food & Function**, Xi'an, v. 6, n. 10, p. 3359-3372, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1039/c5fo00581g>>. Acesso em: 10/11/2022
- IBRAHIM, A. Y. *et al.* Evaluation of hypolipidemic *Marrubium vulgare* effect in Triton WR-1339-induced hyperlipidemia in mice. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, Cairo, v. 9, n. 5, p. 453-459, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.apjtm.2016.03.038>>. Acesso em: 10/11/2022
- IZAR, M. C. O. *et al.* Posicionamento sobre o Consumo de Gorduras e Saúde Cardiovascular – 2021. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, São Paulo, v. 116, n. 1, p. 160-212, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.36660/abc.20201340>>. Acesso em: 10/11/2022
- JUSTINO, A. B. *et al.* Peel of araticum fruit (*Annona crassiflora* Mart.) as a source of antioxidant compounds with  $\alpha$ -amylase,  $\alpha$ -glucosidase and glycation inhibitory activities. **Bioorganic Chemistry**, Uberlândia, v. 69, p. 167-182, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2016.11.001>>. Acesso em: 10/11/2022
- JUSTINO, A. B. *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**, Uberlândia, v. 65, n. 22, p. 4428-4438, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b01355>>. Acesso em: 10/11/2022
- JUSTINO, A. B. *et al.* *Annona muricata* Linn. leaf as a source of antioxidant compounds with in vitro antidiabetic and inhibitory potential against  $\alpha$ -amylase,  $\alpha$ -glucosidase, lipase, non-enzymatic glycation and lipid peroxidation. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, Uberlândia,

v. 100, p. 83-92, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.01.172>>. Acesso em: 10/11/2022

JUSTINO, A. B. *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**, Uberlândia, v. 9, n. 1, p. 1-15, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41598-019-55779-3>>. Acesso em: 10/11/2022

KANIA-DOBROWOLSKA, M.; BARANIAK, J. Dandelion (*Taraxacum officinale* L.) as a source of biologically active compounds supporting the therapy of co-existing diseases in metabolic syndrome. **Foods**, Poznan, v. 11, n. 18, p. 2858, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/foods11182858>>. Acesso em: 10/11/2022

KASPER, D. L. *et al.* **Medicina Interna de Harrison**. 19. ed. Porto Alegre: AMGH Editora, 2017.

KHANNA, A. K.; RIZVI, F.; CHANDER, R. Lipid lowering activity of *Phyllanthus niruri* in hyperlipemic rats. **Journal of Ethnopharmacology**, Lucknow, v. 82, n. 1, p. 19-22, 2002. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/s0378-8741\(02\)00136-8](https://doi.org/10.1016/s0378-8741(02)00136-8)>. Acesso em: 10/11/2022

KHLIFI, R. *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**, Monastir, v. 107, p. 1-9, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2019.104404>>. Acesso em: 10/11/2022

KINSCHERF, R. *et al.* Cholesterol levels linked to abnormal plasma thiol concentrations and thiol/disulfide redox status in hyperlipidemic subjects. **Free Radical Biology and Medicine**, Heidelberg, v. 35, n. 10, p. 1286-1292, 2003. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2003.07.001>>. Acesso em: 10/11/2022

KNAUS, U. G. Oxidants in physiological processes. In: Schmidt, H.H.H.W., Ghezzi, P., Cuadrado, A. Reactive Oxygen Species. **Handbook of Experimental Pharmacology**, vol 264. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2020. Disponível em: <[https://doi.org/10.1007/164\\_2020\\_380](https://doi.org/10.1007/164_2020_380)>. Acesso em: 10/11/2022

KUMAR, G. *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**, New Delhi, v. 4, n. 3, p. 165-170, 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.4103/0975-9476.118707>>. Acesso em: 10/11/2022

KUMARI, S. S.; MENON, V. P. Effect of carnitine administration on levels of lipid peroxides and activities of superoxide dismutase and catalase in isoproterenol-induced myocardial infarction in rats. **Journal of Biosciences**, Trivandrum, v. 13, n. 3, p. 257-262, 1988. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/bf02712149>>. Acesso em: 10/11/2022

KOLOVOU, G. D. Pathophysiology of dyslipidaemia in the metabolic syndrome. **Postgraduate Medical Journal**, Athens, v. 81, n. 956, p. 358-366, 2005. Disponível em: <<https://doi.org/10.1136/pgmj.2004.025601>>. Acesso em: 10/11/2022

LAGE, G. A. *et al.* The first report on flavonoid isolation from *Annona crassiflora* Mart. **Natural Product Research**, Belo Horizonte, v. 28, n. 11, p. 808-811, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/14786419.2014.885518>>. Acesso em: 10/11/2022

- LANGDON, R. G. Glucose 6-phosphate dehydrogenase from erythrocytes. *In*: LANGDON, Robert G. **Carbohydrate metabolism**. Charlottesville: Elsevier, 1966. p. 126-131. ISBN 9780121818098. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/0076-6879\(66\)09030-x](https://doi.org/10.1016/0076-6879(66)09030-x)>. Acesso em: 10/11/2022
- LAVOIE, S. *et al.* Curcumin, quercetin, and tBHQ modulate glutathione levels in astrocytes and neurons: importance of the glutamate cysteine ligase modifier subunit. **Journal of Neurochemistry**, Lausanne, v. 108, n. 6, p. 1410-1422, 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2009.05908.x>>. Acesso em: 10/11/2022
- LEE, Y. A. *et al.* Ameliorative effects of proanthocyanidin on oxidative stress and inflammation in streptozotocin-induced diabetic rats. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Toyama, v. 55, n. 23, p. 9395-9400, 2007. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/jf071523u>>. Acesso em: 10/11/2022
- LERI, M. *et al.* Healthy effects of plant polyphenols: molecular mechanisms. **International Journal of Molecular Sciences**, Florence, v. 21, n. 4, p. 1250, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/ijms21041250>>. Acesso em: 10/11/2022
- LEONG, S. F.; CLARK, J. B. Regional enzyme development in rat brain. Enzymes associated with glucose utilization. **Biochemical Journal**, London, v. 218, n. 1, p. 131-138, 1984. Disponível em: <<https://doi.org/10.1042/bj2180131>>. Acesso em: 10/11/2022
- LEVINE, R. L. *et al.* Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. **Methods in Enzymology**, Bethesda, v. 186, p. 464-478, 1990. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/0076-6879\(90\)86141-H](https://doi.org/10.1016/0076-6879(90)86141-H)>. Acesso em: 10/11/2022
- LEVINE, S.; SALTZMAN, A. A procedure for inducing sustained hyperlipemia in rats by administration of a surfactant. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, New York, v. 55, n. 2, p. 224-226, 2007. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.vascn.2006.05.009>>. Acesso em: 10/11/2022
- LIBBY, P. *et al.* Atherosclerosis. **Nature Reviews Disease Primers**, Boston, v. 5, n. 1, p. 1-18, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41572-019-0106-z>>. Acesso em: 10/11/2022
- LIU, K.; LUO, M.; WEI, S. The bioprotective effects of polyphenols on metabolic syndrome against oxidative stress: evidences and perspectives. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, Wuhan, v. 2019, p. 1-16, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1155/2019/6713194>>. Acesso em: 10/11/2022
- LUBOS, E.; HANDY D.E.; LOSCALZO J. Role of oxidative stress and nitric oxide in atherothrombosis. **Frontiers in Bioscience**, Boston, v. 13, p. 5323, 2008. Disponível em: <<https://doi.org/10.2741/3084>>. Acesso em: 10/11/2022
- MAKHMUDOVA, U. *et al.* Phytosterols and cardiovascular disease. **Current Atherosclerosis Reports**, Jena, v. 23, n. 11, p. 1-8, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s11883-021-00964-x>>. Acesso em: 10/11/2022

- MALESZA, I. J. *et al.* High-Fat, western-style diet, systemic inflammation, and gut microbiota: a narrative review. **Cells**, Poznań, v. 10, n. 11, p. 1-31, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/cells10113164>>. Acesso em: 10/11/2022
- MANNERVIK, B. Glutathione peroxidase. **Methods in enzymology**. Stockholm, v. 113, p. 490-495, 1985. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(85\)13063-6](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(85)13063-6)>. Acesso em: 10/11/2022
- MANZOOR, M. F. *et al.* Oxidative stress and metabolic diseases: relevance and therapeutic strategies. **Frontiers in Nutrition**, Punjab, v. 9, p. 1-11, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.3389/fnut.2022.994309>>. Acesso em: 10/11/2022
- MARKLUND, S.; MARKLUND, G. Involvement of the superoxide anion radical in the auto-oxidation of pyrogallol and convenient assay for superoxide dismutase. **European Journal Biochemistry**, Umeå, v.47, p. 417-628, 1974. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1974.tb03714.x>>. Acesso em: 10/11/2022
- MASELLA, R. *et al.* Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, Rome, v. 16, n. 10, p. 577-586, 2005. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2005.05.013>>. Acesso em: 10/11/2022
- MITTAL, Manish *et al.* Reactive oxygen species in inflammation and tissue injury. **Antioxidants & Redox Signaling**, Chicago, v. 20, n. 7, p. 1126-1167, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1089/ars.2012.5149>>. Acesso em: 10/11/2022
- NATESAN, V.; KIM, S. J. Lipid metabolism, disorders and therapeutic drugs - review. **Biomolecules & Therapeutics**, Seoul, v. 29, n. 6, p. 596-604, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.4062/biomolther.2021.122>>. Acesso em: 10/11/2022
- NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2012.
- NIE, Y.; STÜRZENBAUM, S.R. Proanthocyanidins of natural origin: molecular mechanisms and implications for lipid disorder and aging-associated diseases. **Advances in Nutrition**, London, v. 10, n. 3, p. 464-478, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1093/advances/nmy118>>. Acesso em: 10/11/2022
- NIKI, E. Lipid peroxidation products as oxidative stress biomarkers. **BioFactors**, Ikeda, v. 34, n. 2, p. 171-180, 2008. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/biof.5520340208>>. Acesso em: 10/11/2022
- OH, P. S.; LEE, S. J.; LIM, K. T. 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**, Gwangju, v. 70, n. 2, p. 447-456, 2006. Disponível em: <<https://doi.org/10.1271/bbb.70.447>>. Acesso em: 10/11/2022
- OLIVEIRA, C. C. *et al.* Anti-inflammatory and antinociceptive properties of the hydroalcoholic fractions from the leaves of *Annona crassiflora* Mart. in mice. **Inflammopharmacology**, Belo Horizonte, v. 27, n. 2, p. 397-408, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s10787-017-0426-0>>. Acesso em: 10/11/2022

OLIVEIRA, K. J. F.; KOURY, J. C.; DONANGELO, C. M. Micronutrientes e capacidade antioxidante em adolescentes sedentários e corredores. **Revista de Nutrição**, Rio de Janeiro, v. 20, n. 2, p. 171-179, 2007. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/s1415-52732007000200006>>. Acesso em: 10/11/2022

OLIVEIRA, M. C.; SCHOFFEN, J. P. F. Oxidative stress action in cellular aging. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Bandeirantes, v. 53, n. 6, p. 1333-1342, 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/s1516-89132010000600009>>. Acesso em: 10/11/2022

OLIVEIRA, S. G. *et al.* Doenças do aparelho circulatório no Brasil de acordo com dados do Datasus: um estudo no período de 2013 a 2018. **Brazilian Journal of Health Review**, Fernandópolis, v. 3, n. 1, p. 832-846, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.34119/bjhrv3n1-066>>. Acesso em: 10/11/2022

OPAS/OMS. Doenças cardiovasculares. **OPAS/OMS | Organização Pan-Americana da Saúde**. Genebra, 2022. Disponível em: <<https://www.paho.org/pt/topicos/doencas-cardiovasculares>>. Acesso em: 10/11/2022

PACHER, P.; BECKMAN, J. S.; LIAUDET, L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. **Physiological Reviews**, Lausanne, v. 87, n. 1, p. 315-424, 2007. Disponível em: <<https://doi.org/10.1152/physrev.00029.2006>>. Acesso em: 10/11/2022

PAGE, I. H. *et al.* Atherosclerosis and the fat content of the diet. **Journal of the American Medical Association**, New York, v. 164, n. 18, p. 2048-2051, 1957. Disponível em: <<https://doi.org/10.1001/jama.1957.62980180004013>>. Acesso em: 10/11/2022

PARTHASARATHY, S.; STEINBERG, D.; WITZTUM, J. L. The role of oxidized low-density lipoproteins in the pathogenesis of atherosclerosis. **Annual Review of Medicine**, California, v. 43, n. 1, p. 219-225, 1992. Disponível em: <<https://doi.org/10.1146/annurev.me.43.020192.001251>>. Acesso em: 10/11/2022

PERCÁRIO, S. Prevenção do estresse oxidativo na síndrome de isquemia e reperfusão renal em ratos com suplementação nutricional com antioxidantes. **Revista de Nutrição**, Belém, v. 23, n. 2, p. 259-267, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/s1415-52732010000200009>. Acesso em: 10/11/2022

GUTIERREZ, R. P.; BAEZ, E. G. Cardioactive agents from plants. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, Ciudad de México, v. 9, n. 7, p. 878-899, 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.2174/138955709788452612>>. Acesso em: 10/11/2022

PIMENTA, L. P. S. *et al.* In vivo antimalarial efficacy of acetogenins, alkaloids and flavonoids enriched fractions from *Annona Crassiflora* Mart. **Natural Product Research**, Belo Horizonte, v. 28, n. 16, p. 1254-1259, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/14786419.2014.900496>>. Acesso em: 10/11/2022

POLJSAK, B.; ŠUPUT, D.; MILISAV, I. Achieving the balance between ROS and antioxidants: when to use the synthetic antioxidants. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, Ljubljana, v. 2013, p. 1-11, 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1155/2013/956792>>. Acesso em: 10/11/2022



POPA-WAGNER, A. *et al.* ROS and Brain Diseases: The Good, the Bad, and the Ugly. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, Rostock, v. 2013, p. 1-14, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1155/2013/963520>>. Acesso em: 10/11/2022

PRADO, W. L. *et al.* Obesidade e adipocinas inflamatórias: implicações práticas para a prescrição de exercício. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, Recife, v. 15, n. 5, p. 378-383, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/s1517-86922009000600012>. Acesso em: 10/11/2022

RAMOS, L. P.A. *et al.* Antioxidant compounds from *Annona crassiflora* fruit peel reduce lipid levels and oxidative damage and maintain the glutathione defense in hepatic tissue of Triton WR-1339-induced hyperlipidemic mice. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, Uberlândia, v. 142, p. 1-10, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.112049>>. Acesso em: 10/11/2022

RANA, A. *et al.* Health benefits of polyphenols: a concise review. **Journal of Food Biochemistry**, Winnipeg, v. 46, p. 102022, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/jfbc.14264>>. Acesso em: 10/11/2022

REIS, J. C. *et al.* Estresse Oxidativo: Revisão da sinalização metabólica no diabetes tipo 1. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, Belo Horizonte, v. 52, n. 7, p. 1096-1105, 2008. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/abem/a/CwVWysjFPY8vzZPxzKMtxHq/?lang=pt>>. Acesso em: 10/11/2022

REZNICK, A. Z.; PACKER, L. Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. **Methods in enzymology**. Los angeles, v. 233, p. 357-363, 1994. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(94\)33041-7](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(94)33041-7)>. Acesso em: 10/11/2022

ROCHA, R. S. *et al.* Analysis of the anti-inflammatory and chemopreventive potential and description of the antimutagenic mode of action of the *Annona crassiflora* methanolic extract. **Pharmaceutical Biology**, Campo Grande, v. 54, n. 1, p. 35-47, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.3109/13880209.2015.1014567>>. Acesso em: 10/11/2022

ROESLER, R. *et al.* Antioxidant activity of *Annona crassiflora*: characterization of major components by electrospray ionization mass spectrometry. **Food Chemistry**, Campinas, v. 104, n. 3, p. 1048-1054, 2007. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.01.017>>. Acesso em: 10/11/2022

RONCAL, C. *et al.* Trimethylamine-N-Oxide (TMAO) predicts cardiovascular mortality in peripheral artery disease. **Scientific Reports**, Pamplona, v. 9, n. 1, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41598-019-52082-z>>. Acesso em: 10/11/2022

RONY, K. A. *et al.* Hypolipidemic activity of *Phellinus rimosus* against triton WR-1339 and high cholesterol diet induced hyperlipidemic rats. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, Kerala, v. 37, n. 2, p. 482-492, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.etap.2014.01.004>>. Acesso em: 10/11/2022

ROSSI, J. L. S. *et al.* Metabolic syndrome and cardiovascular diseases: going beyond traditional risk factors. **Diabetes/Metabolism Research and Reviews**, Marília, v. 38, n. 3, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/dmrr.3502>>. Acesso em: 10/11/2022

ROTH, G. A. *et al.* Global, regional, and national age-sex-specific mortality for 282 causes of death in 195 countries and territories, 1980–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. **The Lancet**, Seattle, v. 392, n. 10159, p. 1736-1788, 2018.

Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(18\)32203-7](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(18)32203-7)>. Acesso em: 10/11/2022

SALIU, J. A. *et al.* Modulatory effects of stonebreaker (*Phyllanthus amarus*) and bitter gourd (*Momordica charantia*) on enzymes linked with cardiac function in heart tissue of doxorubicin-stressed rats. **Drug and Chemical Toxicology**, Akungba-Akoko, v. 45, p. 1-9, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/01480545.2019.1700271>>. Acesso em: 10/11/2022

SANTOS, V. P. *et al.* Arteriosclerose, aterosclerose, arteriolosclerose e esclerose calcificante da média de Monckeberg: qual a diferença? **Jornal Vascular Brasileiro**, Salvador, v. 20, p. 1-8, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/1677-5449.200211>>. Acesso em: 10/11/2022

SILVA, J. J. da *et al.* In vitro screening antibacterial activity of bidens pilosa linné and *Annona crassiflora* mart. against oxacillin resistant *Staphylococcus aureus* (orsa) from the aerial environment at the dental clinic. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, Alfenas, v. 56, n. 4, p. 333-340, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/s0036-46652014000400011>>. Acesso em: 10/11/2022

SCIPIONE, C. A.; CYBULSKY, M. I. Early atherogenesis: new insights from new approaches. **Current Opinion in Lipidology**, Toronto, v. 33, n. 5, p. 271-276, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1097/mol.0000000000000843>>. Acesso em: 10/11/2022

SHIBATA, T. *et al.* Adductome-based identification of biomarkers for lipid peroxidation. **Journal of Biological Chemistry**, Tokyo, v. 292, n. 20, p. 8223-8235, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1074/jbc.m116.762609>>. Acesso em: 10/11/2022

SRIVIDHYA, R.; KALAISELVI, P. Neuroprotective potential of epigallo catechin-3-gallate in PC-12 cells. **Neurochemical Research**, Kattankulathur, v. 38, n. 3, p. 486-493, 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s11064-012-0940-9>>. Acesso em: 10/11/2022

SUZUKI, Y. J.; CARINI, M.; BUTTERFIELD, D. A. Protein carbonylation. **Antioxidants & Redox Signaling**, Washington, v. 12, n. 3, p. 323-325, 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.1089/ars.2009.2887>>. Acesso em: 10/11/2022

TAN, H. Y. *et al.* Preclinical models for investigation of herbal medicines in liver diseases: update and perspective. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, Hong Kong, v. 2016, p. 1-26, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1155/2016/4750163>>. Acesso em: 10/11/2022

TCHERNOF, A.; DESPRÉS, J. P. Pathophysiology of human visceral obesity: an update. **Physiological Reviews**, Québec, v. 93, n. 1, p. 359-404, 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1152/physrev.00033.2011>>. Acesso em: 10/11/2022

VAN DER POL, Atze *et al.* Treating oxidative stress in heart failure: past, present and future. **European Journal of Heart Failure**, Groningen, v. 21, n. 4, p. 425-435, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/ejhf.1320>>. Acesso em: 10/11/2022

VIVARELLI, S. *et al.* Polyphenols: a route from bioavailability to bioactivity addressing potential health benefits to tackle human chronic diseases. **Archives of Toxicology**, Messina,

v. 97, p. 3-38, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00204-022-03391-2>>. Acesso em: 10/11/2022

WANG, K. *et al.* Remnant cholesterol and atherosclerotic cardiovascular disease: metabolism, mechanism, evidence, and treatment. **Frontiers in Cardiovascular Medicine**, Beijing, v. 9, p. 1-10, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.3389/fcvm.2022.913869>>. Acesso em: 10/11/2022

WAGNER, H.; ULRICH-MERZENICH, G. Synergy research: approaching a new generation of phytopharmaceuticals. **Phytomedicine**, Munich, v. 16, n. 2-3, p. 97-110, 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.phymed.2008.12.018>>. Acesso em: 10/11/2022

WEN, H. *et al.* Fatty acid-induced NLRP3-ASC inflammasome activation interferes with insulin signaling. **Nature Immunology**, North Carolina, v. 12, n. 5, p. 408-415, 2011. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/ni.2022>>. Acesso em: 10/11/2022

WHITE, B. C. *et al.* Brain ischemia and reperfusion: molecular mechanisms of neuronal injury. **Journal of the Neurological Sciences**, Detroit, v. 179, n. 1-2, p. 1-33, 2000. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/s0022-510x\(00\)00386-5](https://doi.org/10.1016/s0022-510x(00)00386-5)>. Acesso em: 10/11/2022

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Noncommunicable diseases. **The Global Health Observatory**. Genebra, 2022. Disponível em: <<https://www.who.int/data/gho/data/themes/noncommunicable-diseases/GHO/noncommunicable-diseases>>. Acesso em: 10/11/2022

XIE, W. *et al.* Hypolipidemic mechanisms of *Ananas comosus* L. leaves in mice: different from fibrates but similar to statins. **Journal of Pharmacological Sciences**, Beijing, v. 103, n. 3, p. 267-274, 2007. Disponível em: <<https://doi.org/10.1254/jphs.fp0061244>>. Acesso em: 10/11/2022

XU, D. *et al.* Antioxidant activities of quercetin and its complexes for medicinal application. **Molecules**, Tianjin, v. 24, n. 6, p. 1-15, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/molecules24061123>>. Acesso em: 10/11/2022

YAGI, K. Assay for serum lipid peroxide level and its clinical significance. **Lipid Peroxides in Biology and Medicine**, Nagoya, v. 1982, p. 223-242, 1982. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-768050-7.50020-2>>. Acesso em: 10/11/2022

YANG, R. L. *et al.* Increasing oxidative stress with progressive hyperlipidemia in human: relation between malondialdehyde and atherogenic index. **Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition**, Wuxi, v. 43, n. 3, p. 154-158, 2008. Disponível em: <<https://doi.org/10.3164/jcbn.2008044>>. Acesso em: 10/11/2022

YAO, Y. S.; LI, T. D.; ZENG, Z. H. Mechanisms underlying direct actions of hyperlipidemia on myocardium: an updated review. **Lipids in Health and Disease**, Guangzhou, v. 19, n. 1, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s12944-019-1171-8>>. Acesso em: 10/11/2022

ZARZECKI, M. S. *et al.* Hypolipidemic action of chrysin on Triton WR-1339-induced hyperlipidemia in female C57BL/6 mice. **Toxicology Reports**, Itaquí, v. 1, p. 200-208, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2014.02.003>>. Acesso em: 10/11/2022

ZEKA, K. *et al.* Flavonoids and their metabolites: prevention in cardiovascular diseases and diabetes. **Diseases**, Leicester, v. 5, n. 3, p. 19, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/diseases5030019>>. Acesso em: 10/11/2022

ZHANG, S. *et al.* Natural polyphenols in metabolic syndrome: protective mechanisms and clinical applications. **International Journal of Molecular Sciences**, Nanjing, v. 22, n. 11, p. 6110, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/ijms22116110>>. Acesso em: 10/11/2022

ZHANG, X.; GÉRARD, P. Diet-gut microbiota interactions on cardiovascular disease. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, Paris, v. 20, p. 1528-1540, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.csbj.2022.03.028>>. Acesso em: 10/11/2022


ZHAO, Y. *et al.* Effect of *Eclipta prostrata* on lipid metabolism in hyperlipidemic animals. **Experimental Gerontology**, Xiamen, v. 62, p. 37-44, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.exger.2014.12.017>>. Acesso em: 10/11/2022

ZHOU, Q. *et al.* Free radical-scavenging activities of oligomeric proanthocyanidin from *Rhodiola rosea* L. and its antioxidant effects *in vivo*. **Natural Product Research**, Baoding, v. 28, n. 24, p. 2301-2303, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/14786419.2014.921786>>. Acesso em: 10/11/2022

ZHOU, X. *et al.* H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced microvessel barrier dysfunction: the interplay between reactive oxygen species, nitric oxide, and peroxynitrite. **Physiological Reports**, Hershey, v. 7, n. 16, p. 1-17, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.14814/phy2.14206>>. Acesso em: 10/11/2022

## 9. Anexos

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

 <p><b>Autorização de Acesso e de Remessa de Componente do Patrimônio Genético</b></p> <p>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>Brasília, 02 de outubro de 2015</p> <p>Marcelo Marcos Moraes Diretor de Ciências Agrárias, Biológicas e da Saúde PO 513/2013</p>	<p>Processo: 010743/2015-4 Validade: 02/11/2015 a 02/11/2017 Instituição: UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA CNPJ: 256.483.870/0001-18 Pesquisador: Foued Salmen Espindola CPF: 242.039.476-34 RG: M1189277 - SSP / MG</p> <p><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 <a href="http://servicosweb.cnpq.br/visualizador">http://servicosweb.cnpq.br/visualizador</a> 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 (tiloxapol) 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 (tiloxapol) 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 Isoquênico
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 542 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: Material Suplementar da Correlação de Pearson

Parâmetros Lipídico Plasmáticos e fecais – Correlação de Pearson					
TG plasma x CT plasma	TG plasma x TG fecal	TG plasma x CT fecal	CT plasma x TG fecal	CT plasma x CT fecal	TG fecal x CT fecal
r = 0,978	r = 0,956	r = 0,849	r = 0,938	r = 0,805	r = 0,883
p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001

Tabela 5: Correlação entre triglicerídeos (TG) plasmático, colesterol total (CT) plasmático, triglicerídeos fecais e colesterol fecal. Todas as análises  $p < 0,001$ . Esses valores foram obtidos a partir de mais de uma medida.

Parâmetros lipídicos plasmáticos e parâmetros de dano oxidativo – Correlação de Pearson		
TG plasma x CT plasma	r = 0,822	p = 0,012
TG plasma x PL	r = 0,880	p = 0,004
TG plasma x CAT	r = 0,741	p = 0,035
TG plasma x GPx	r = 0,727	p = 0,041
TG plasma x GR	r = 0,806	p = 0,016
PL x PC	r = 0,819	p < 0,001
PL x TTC	r = -0,713	p = 0,047
PL x CAT	r = 0,796	p = 0,018
PL x GR	r = 0,914	p = 0,001
PC x FRAP	r = -0,738	p = 0,037
PC x GR	r = 0,77	p = 0,027
PC x GSH	r = -0,728	p = 0,04
TTC x FRAP	r = 0,834	p = 0,01
TTC x CAT	r = -0,823	p = 0,012
TTC x GR	r = -0,828	p = 0,011
TAC x GR	r = -0,696	p = 0,05
SOD x CAT	r = 0,725	p = 0,042
SOD x G6PDH	r = 0,764	p = 0,027
CAT x GPx	r = 0,72	p = 0,044
CAT x GR	r = 0,954	p < 0,001
CAT x G6PDH	r = 0,752	p = 0,031
GPx x G6PDH	r = 0,390	p < 0,001
GR x G6PDH	r = 0,755	p = 0,030

Tabela 6: Correlação entre triglicerídeos sanguíneos, colesterol sanguíneo e parâmetros de estresse oxidativo (peroxidação lipídica, carbonilação, TAC, SOD, CAT, GPx, GR, GSH e G6PD). Considerando um único valor após a eutanásia. Legenda: PL, peroxidação lipídica; PC, carbonilação de proteínas; GPx, glutathione peroxidase; CAT, catalase; GR, glutathione reductase; PC, Carbonilação de proteínas; TTC, conteúdo de tióis; FRAP, poder antioxidante de redução do íon férrico; GSH, glutathione reduzida; SOD: superóxido dismutase; G6PDH, glicose-6-fosfato desidrogenase.