UNIVERSIDADE DO SUL DE SANTA CATARINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE
ALINE MARTINS NUNES

Frutos liofilizados de *Leandra australis* e atividade em modelo animal de obesidade

TUBARÃO
2018

ALINE MARTINS NUNES

Frutos liofilizados de *Leandra australis* e atividade em modelo animal de obesidade

LINHA DE PESQUISA: ESTUDO DE EXTRATOS, FÁRMACOS E MEDICAMENTOS

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Luiz Alberto Kanis, Dr.

TUBARÃO

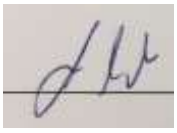
2018

ALINE MARTINS NUNES

Frutos liofilizados de *Leandra australis* e atividade em modelo animal de obesidade

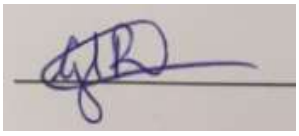
Esta Dissertação foi julgada adequada pelo Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde – Mestrado, para obtenção do título de Mestre (a) em Ciências da Saúde.

Tubarão (SC), 30 de abril de 2018.



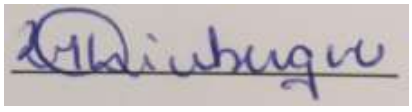
Orientador: Prof. Luiz Alberto Kanis, Dr.

Universidade do Sul de Santa Catarina



Profa. Gislaine Tezza Rezin, Dra.

Universidade do Sul de Santa Catarina



Profa. Valéria Maria Limberger Bayer, Dra.

Universidade Federal de Santa Maria

À Deus, que está comigo todas as horas; aos meus pais Gilmar Nunes e Maria do Carmo Martins Nunes, à minha irmã Amanda e a meu orientador e Luiz Alberto Kanis.

Nunes, Aline Martins, 1989-
N92 Frutos liofilizados de *Leandra australis* e atividade em modelo animal de obesidade / Aline Martins Nunes ; -- 2018.
101 f. : il. color. ; 30 cm

Orientador : Prof. Dr. Luiz Alberto Kanis.
Dissertação (mestrado)–Universidade do Sul de Santa Catarina, Tubarão, 2018.
Inclui bibliografias.

1. Plantas – Brasil – Pesquisa. 2. Melastomataceae – Uso terapêutico. 3. *Berries*. 4. Antocianinas. 5. Polifenóis. 6. Obesidade. I. Kanis, Luiz Alberto. II. Universidade do Sul de Santa Catarina – Mestrado em Ciências da Saúde. III. Título.

CDD (21. ed.) 615.32

Ficha catalográfica elaborada por Francielli Lourenço CRB 14/1435

AGRADECIMENTOS

Agradecer é, antes de tudo, um ato de humildade e de reconhecimento, pois o resultado dessa conquista se deu pelo envolvimento de muitas pessoas, sob vários aspectos.

Um sonho concretizado deve ser compartilhado. Portanto, gostaria de agradecer;

Primeiramente, à Deus, pelo dom especial da vida, pela luz da sabedoria, pela constante presença entre nós; por ter-me escutado e por permitir escutá-Lo. Isso me fez enxergar que as dificuldades existem para que possamos ver o quanto somos fortes e capazes:

Ao meu pai, Gilmar, pelo incentivo prestado durante esses anos, pelo carinho e atenção, e por ser muito mais do que um "simples pai";

À minha mãe, Maria do Carmo, por ter sido, em todo esse processo, a minha grande incentivadora, já que, sem o incessante incentivo dela, jamais eu estaria aqui; foi e é a minha luz, o meu guia... a minha mãe;

À minha irmã, Amanda Martins Nunes, por todas as conquistas, pela força e amor dedicados a mim;

À Jocelio Beltrame Furlan, Teresinha Monteiro Furlan e Tuan Monteiro Furlan por, gentilmente, além de ceder as amostras de Leandra australis, ajudaram em todo o período de coleta das mesmas.

À Cléia Demétrio, por, com tanto amor e carinho fazer a correção final desta dissertação.

Aos meus amigos, que torceram e torcem por mim, dando-me força para continuar seguindo, mesmo em momentos difíceis;

Aos colegas de laboratório, pela amizade e, em especial, aos que participaram auxiliando nas etapas e conclusão deste trabalho;

Aos professores/amigos, por terem compartilhado comigo seus conhecimentos, que deixam um legado de infinito valor; e ainda tiveram a paciência calorosa de atender aos meus apelos de ajuda aos quais, fazendo uso de toda humildade, agradeço de coração;

Ao orientador, professor Luiz Alberto Kanis, por fazer parte desta história tão significante em minha vida, por entender meus momentos de angústia, por responder

minhas mensagens em vários momentos fora do horário de trabalho e por acreditar em minha competência;

Finalmente, agradeço profundamente à todos que, direta ou indiretamente, me auxiliaram nessa longa e importante trajetória, ao mesmo tempo em que me comprometo a honrar a profissão por mim escolhida, priorizando, acima de tudo, o bem estar do ser humano, esforçando-me ao máximo para que minhas aptidões sejam reconhecidas e que meu ego esteja sempre fundamentado no interesse, no respeito e no valor que merece meu semelhante.

“Fiz da fé meu alicerce, da persistência os meus degraus, da perseverança minha escalada e do apoio recebido a minha conquista”.

RESUMO

Introdução: Entre plantas da biodiversidade brasileira destaca-se a *Leandra australis* (*L. australis*), que possui potencialidades químicas e nenhum estudo foi conduzido com fins de prospecção tecnológica desta espécie. Objetivo: Caracterizar botânica e quimicamente os frutos da espécie *Leandra australis* e avaliar o efeito da administração preventiva destes sobre peso corporal, parâmetros inflamatórios e de estresse oxidativo em modelo animal de obesidade. Materiais e Métodos: A *L. australis* foi coletada e caracterizada por botânico da UNISUL. Os frutos foram liofilizados (FLLA) e caracterizados quimicamente em termos de substâncias totais extraíveis, perfil cromatográfico, polifenóis totais, antocianinas totais, cinzas totais e insolúveis em ácido e teor de açúcares redutores (TAR). Os FLLA foram administrados em camundongos submetidos ao modelo animal de obesidade. Foram avaliados os efeitos sobre o peso total, de estruturas corporais, dano a lipídios e proteínas e defesa antioxidante em modelo animal de obesidade. Resultados: Uma exsicata *L. australis* identificada e confirmada por botânico da UNISUL foi depositada no Herbário *Laélia purpurata* sob o número SRS 773. A quantidade de STE em etanol, água e etanol 80% acidificado foi de 43,3, 47,3 e 34,4 % respectivamente. No perfil cromatográfico foi identificado antocianina CYN-3-GLU e mais 2 antocianinas, rutina e o ácido gálico. O FLLA apresentou 44,2 mg/g de PT; 3,12 mg/g de AT; 3,3 % de cinzas totais; 0,4 % de cinzas insolúveis em ácido clorídrico e 33 % de TAR. Em modelo animal de obesidade foi observado aumento no peso corporal, gordura mesentérica, fígado e baço do grupo controle obeso. O consumo diário de FLLA proporcionou a manutenção normal do peso do fígado e do baço de animais obesos. Os animais submetidos a dieta hiperlipídica apresentaram aumento nos danos a lipídios e proteínas, tanto na gordura mesentérica quanto no fígado. O consumo de FLLA proporcionou redução destes danos nos animais obesos. Conclusão: Os FLLA possuem quantidade de polifenóis e antocianinas semelhantes à de outros *berries*. Em modelo animal de obesidade a administração constante de FLLA foi capaz de proteger o fígado de uma possível esteatose, assim como reduziu danos oxidativos gerados pela obesidade.

Palavras-chave: Fruto brasileiro; *berrie*; antocianinas; polifenóis; obesidade.

ABSTRACT

Introduction: This dissertation presents the studies developed from the Leandra australis plant among the Brazilian biodiversity, which has chemical potential and no studies were conducted for the purpose of technological prospection of this species.

Objective: To characterize the botanical and chemical characteristics of L. australis fruits and evaluate the effect of the preventive administration of these on body weight, inflammatory parameters and oxidative stress in an obesity animal model.

Materials and Methods: Leandra australis was collected and characterized by UNISUL botanist. The fruits were lyophilized and characterized chemically in terms of total extractable substances, CCD chromatographic profile, total polyphenols, total anthocyanins, total ash and acid insoluble and reducing sugar content (TAR). FLLA were administered in mice submitted to an animal model of obesity. The effects on body weight, body structure, lipid and protein damage and antioxidant defense in an obesity animal model were evaluated.

Results: A L. selustris exsicata identified and confirmed by UNISUL botanist was deposited in the Laelia purpurata herbarium under the number SRS 773. The amount of STE in ethanol, water and 80% acidified ethanol was 43.3, 47.3% and 34.4% respectively. In the chromatographic profile, anthocyanin CYN-3-GLU and 2 unidentified anthocyanins, rutin and gallic acid were identified. FLLA had 44.2 mg / g PT; 3.12 mg / g AT; 3.3% of total ash; 0.4% ash insoluble in hydrochloric acid and 33% TAR. In an animal model of obesity, an increase in body weight, mesenteric fat, liver and spleen was observed in the obese control group. Daily consumption of FLLA provided normal maintenance of the liver and spleen weight of obese animals. The animals submitted to a hyperlipid diet presented increased lipid and protein damage in both mesenteric and liver fat. FLLA consumption provided these damages in obese animals.

Conclusion: FLLAs have similar amounts of polyphenols and anthocyanins as other berries. In an animal model of obesity the constant administration of FLLA was able to protect the liver from possible steatosis, as well as reduced oxidative damage generated by obesity.

Keywords: Leandra australis; obesity; anthocyanins; polyphenols.

LISTAS

Lista de abreviaturas

VIGITEL – Sistema de vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico
IMC – Índice de Massa Corporal
TNF–α – Fator de Necrose Tumoral-alfa (do inglês: *tumor necrosis factors - alpha*)
SNC – Sistema Nervoso Central
IL-6 – Interleucina 6
RBP4 – Proteína ligante de retinol (do inglês: *retinol binding protein 4*)
JNK – Jun N-terminal quinase
TLR4 – receptor do tipo toll - 4 (do inglês: toll-like receptors – 4)
NF-κB – Fator nuclear kappa B (do inglês: nuclear factor kappa B)
IL-1β – Interleucina 1 beta
CCL2 – Quimiocina ligante CC 2
IL-10 – Interleucina 10
IDO – Enzimas indolamina 2,3-dioxigenase
GTP-CH1 – Guanosina trifosfato-ciclohidrolase-1
KYN – Quinurenina
KA – Ácido quinurênico
QUIN – Ácido quinolínico
NMDA – Receptor N-metil-D-aspartato
LDL – lipoproteína de baixa densidade (do inglês: *low density lipoprotein*)
HDL – lipoproteína de alta densidade (do inglês: *high density lipoprotein*)
pH – potencial de Hidrogênio
HCl – ácido clorídrico
HSO_3 – ácido sulfurico
SO_2 – Dióxido de enxofre
Mv3glc – Malvidina-3-glucósideo
SGLT1 – co-transporte com o íon sódio (do inglês: *sodium-glucose linked transporter*)
DNA – Ácido desoxirribonucleico (do inglês: *deoxyribonucleic acid*)
COX_2 – Cicloxigenase tipo 2 (do inglês: Cyclooxygenase 2)

PCR – Proteína C-reativa

IFN-c – Interferon C

UNISUL – Universidade do Sul de Santa Catarina

FLLA – frutos liofilizados de *Leandra australis*

MI – massa inicial

MF – Massa final

STE – Substâncias totais extraíveis

VTE – volume total da extração

VC – Volume na capsula

MPV – Matéria Prima Vegetal

PT – Polifenóis totais

SD – Solução diluição

UV – Ultravioleta

AT – Antocianinas totais

KCl – cloreto de potássio

$CH_3CO_2Na_3H_20$ – acetato de sódio

rpm – Rotações por minuto

$KNaC_4H_4O_{6.4}$ H_2O – potássio tetrahidratado

DNS – ácido dinitrosalicílico

ABS – absorbância

CGO – Controle Grupo Obeso

FGO – Fruto Grupo Obeso

MIA – morte indolor assistida

ELISA – Ensaio de imunoabsorção enzimática (do inglês: *enzyme-linked immunosorbent assay*)

TBARS – substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (do inglês: *thiobarbituric acid reactive substances*)

DNPH – dinitrofenilidrazina

CAT – Catalase

H_2O_2 – água oxigenada

ANOVA – analise de variância multifatorial

CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais

DBCA – Diretrizes Brasileiras para o Cuidado e a Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos

CONCEA – Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

CYN-3-GLU – cianidinas-3-O-glicosideo

CCD – cromatografia em camada delgada

EROs – espécie reativa de oxigênio

Lista de figuras

Figura 1 - Composição celular do tecido adiposo.....15
Figura 2 - Alterações do tecido adiposo na obesidade.....15
Figura 3 - Infiltração de leucócitos no tecido adiposo.....16
Figura 4- Transformação do triptofano a partir da enzima IDO 18
Figura 5 - Estrutura básica Fenol 20
Figura 6 - Classificação dos compostos fenólicos.....21
Figura 7 - Estrutura básica dos polifenóis 22
Figura 8 - Estrutura básica antocianina.....24
Figura 9 - Mudanças estruturais das antocianinas em meio aquoso em função do pH.....26
Figura 10 - Vias de absorção, distribuição, metabolismo e excreção das antocianinas.....30
Figura 11 - Partes da espécie *L. australis:* A: folhas, B: Fruto, C: Flores. 36
Figura 12 - Delineamento do estudo. 39
Figura 13 - Desenho experimental. 49
Figura 14 - Exsicata da espécie *L. australis*. 55
Figura 15: Espécie vegetal *L. australis*. A: inflorescência, B: ramos, C: frutos maduros, D: arbusto, E: parte de cima da folha, F: parte de baixo da folha.....56
Figura 16: Perfil cromatográfico de FLLA para antocianinas.....59
Figura 17. Perfil cromatográfico para flavonoides e ácidos fenólicos.....60
Figura 18: Peso corpóreo, Ganho de peso, Consumo alimentar médio diário por semana em Kcal e em Kcal/g de camundongos submetidos a modelo de obesidade.. 63
Figura 19: Efeito da administração FLLA sob as gorduras epididimal, retroperitoneal, mesentérica e total de camundongos submetidos a modelo de obesidade.. 65
Figura 20: Efeito da administração FLLA sobre os órgãos estômago, coração e pulmão de camundongos submetidos a modelo de obesidade.....66

Figura 21: Efeito da administração do FLLA sob o peso dos órgãos fígado, rim e baço de camundongos submetidos a modelo de obesidade. 67
Figura 22: Efeito do FLLA sobre os danos a lipídios na gordura mesentérica e no fígado de camundongos submetidos a modelo de obesidade.....70
Figura 23: Efeito do FLLA sobre a carbonilação proteica na gordura mesentérica e no fígado de camundongos submetidos a modelo de obesidade. 71
Figura 24: Efeito dos FLLA sobre os níveis de tióis livres na gordura mesentérica e no fígado de camundongos submetidos a modelo de obesidade. 72
Figura 25: Efeito do consumo do FLLA sobre os sobre os níveis da enzima antioxidante CAT na gordura mesentérica de camundongos submetidos a modelo de obesidade.....73
Figura 26: Efeito do consumo do FLLA sobre os sobre os níveis de IL-6, IL-1β e IL-10 no hipotálamo e no baço de camundongos submetidos a modelo de obesidade. 75

Lista de quadros

Quadro 1 - Pontos de corte para classificação do estado nutricional pelo IMC.....13
Quadro 2 - Pontos de corte para circunferência abdominal e para relação circunferência abdominal/quadril. 13
Quadro 3 - Classificação dos flavonóides 22
Quadro 4: Nomes e grupos substituintes de antocianidinas mais frequentes na natureza. 25
Quadro 5 - Composição e valor calórico das dietas utilizadas 49
Quadro 6 - Percentual de macronutrientes das dietas utilizadas. 50
Quadro 7 – Classificação das variáveis. 53

Lista de tabelas

Tabela 1: Teor de umidade nos frutos de *L. australis.* .**Erro! Indicador não definido.**
Tabela 2: Substâncias totais extraíveis a partir dos FLLA.....61

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....11
1.1 REFERENCIAL TEÓRICO 12
1.1.1 Obesidade.....12
1.1.1.1 Fisiopatologia da Obesidade.....14
1.1.1.2 Inflamação e SNC 17
1.1.2 Plantas e o controle da obesidade 19
1.1.3 Compostos fenólicos.....19
1.1.3.1 Antocianinas.....24
1.1.3.1.1 Estabilidade química das antocianinas.....27
1.1.3.1.2 Extração das antocianinas 27
1.1.3.1.3 Quantificação das antocianinas.....28
1.1.3.1.4 Farmacocinética das antocianinas 29
1.1.3.1.5 Atividades biológicas das antocianinas 31
1.1.4 Melastomataceae.....33
1.1.5 *Leandra Raddi*.....34
1.1.6 *Leandra australis*.....35
2. OBJETIVOS 37
2.1 OBJETIVO GERAL 37
2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO 37
3. MÉTODOS.....38
3.1 TIPO DE ESTUDO.....38
3.2 MATERIAIS.....38
3.3 DELINEAMENTO DO ESTUDO 39
3.4 COLETA E CARACTERIZAÇÃO BOTÂNICA DA MATÉRIA PRIMA VEGETAL (MPV) 39
3.5 LIOFILIZAÇÃO DOS FRUTOS DE *L.australis*.....40
3.6 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA.....40
3.6.1 Perfil cromatográfico 40
3.6.2 Determinação de substâncias totais extraíveis nos FLLA 41
3.6.3 Determinação de polifenóis totais nos FLLA 42
3.6.3.1 Preparo da curva analítica de ácido gálico.....42
3.6.3.2 Determinação dos PT nos FLLA.....43

3.6.4 Determinação de antocianinas totais nos FLLA 44
3.6.4.1 Preparo das soluções tampão para quantificação de antocianinas por pH diferencial 44
3.6.4.2 Quantificação espectrofotométrica de antocianinas totais por pH diferencial..... 44
3.6.5 Determinação de cinzas totais 45
3.6.6 Determinação de cinzas insolúveis em ácido clorídrico 46
3.6.7 Teor de açúcar 46
3.6.7.1 Preparo de Soluções 46
3.6.7.2 Curva de Calibração 47
3.6.7.3 Analise de açúcar no fruto 47
3.7 AVALIAÇÃO DO CONSUMO DO FRUTO LIOFILIZADO EM MODELO ANIMAL DE OBESIDADE 47
3.7.1 Animais 47
3.7.2 Local de realização 48
3.7.3 Desenho experimental 48
3.7.4 Consumo alimentar 50
3.7.5 Peso corporal 51
3.7.6 Procedimento de Morte Indolor Assistida (MIA) 51
3.7.7 Retirada das estruturas 51
3.7.8 Determinação de parâmetros inflamatórios e estresse oxidativo 51
3.7.8.1 Parâmetros de inflamação .....**Erro! Indicador não definido.**
3.7.8.2 Dano oxidativo a lipídeos 52
3.7.8.3 Dano oxidativo em proteínas 51
3.7.8.4 Concentração de tióis livres *52*
3.7.8.5 Dosagens de Proteínas 53
3.7.8.6 Atividade da enzima antioxidante Catalase 53
3.8 VARIÁVEIS 53
3.9 ANÁLISE DE DADOS 54
3.10 ASPECTOS ÉTICOS 54
4. RESULTADO E DISCUSSÃO 55
4.1 CARACTERIZAÇÃO BOTÂNICA DA ESPÉCIE *L. australis* 55
4.2 LIOFILIZAÇÃO DOS FRUTOS DE *L. australis* .... **Erro! Indicador não definido.**
4.3 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DOS FLLA 57

4.4 AVALIAÇÃO DA ADMINISTRAÇÃO DO FLLA EM MODELO ANIMAL DE OBESIDADE 63
4.4.1 Avaliação do efeito do consumo FLLA sob parâmetros de estresse oxidativo em modelo animal de obesidade 69
4.4.2 Avaliação do FLLA sob sobre a Catalase 72
4.4.3 Avaliação do FLLA sob sobre os níveis de citocinas em modelo animal de obesidade 72
5. CONCLUSÃO 77
5.1 PERSPECTIVAS FUTURAS 72

1. INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, o aumento na expectativa de vida, somado a diminuição da prática de atividades físicas e aumento da ingestão de alimentos com alta densidade calórica elevaram os índices de obesidade tornando-a um sério problema de saúde pública mundial[1]. Estudos realizados com objetivo de mapear os índices de obesidade brasileira demonstraram que mais da metade da população está acima do peso ou obesa, condição semelhante ao que ocorre na maioria dos países[2].

O desequilíbrio energético presente na obesidade resulta no armazenamento excessivo de triacilglicerol[3] em células denominadas adipócitos, que formam o tecido adiposo branco[4]. O aumento deste tecido eleva a produção de citocinas pró-inflamatórias[5], caracterizando a obesidade como uma inflamação crônica de baixo grau[6]. Os níveis destas citocinas também encontram-se elevados no cérebro de animais submetidos a dieta hiperlipídica[7] ocasionando alterações (como comprometimento cognitivo e a demência)[8], principalmente no hipotálamo[6], que está associado ao centro da saciedade[7].

Cada vez mais a diversidade biológica é reconhecida como um dos principais elementos no desenvolvimento e bem-estar da humanidade e grande responsável pelo equilíbrio ambiental global[9]. Apenas uma pequena parte de seus componentes foi devidamente estudada e as vantagens oferecidas por eles não estão completamente conhecidas. Sua capacidade de gerar impactos socioeconômicos positivos, como matéria-prima para diferentes áreas, vem, com frequência, despertando interesse principalmente na indústria farmacêutica[9,10].

Dentre as várias substâncias existentes em produtos de origem vegetal que tem demonstrado potencial para prevenir os danos gerados pela obesidade, como diminuição da pressão arterial, da glicemia e as dislipidemias, e, também na redução da absorção e acúmulo de gordura, estão os compostos fenólicos, mais especificamente as antocianinas[11]. Estas substâncias presentes nas plantas, porém, com composição e em quantidades distintas, tem comprovado uma variedade de efeitos biológicos[11–14] como redução da lipogênese[15,16], antioxidante[17,18] e anti-inflamatória[19], fato que as torna substrato para desenvolvimento de produtos para a prevenção e o tratamento da obesidade.

Uma planta da biodiversidade brasileira com potencial para o desenvolvimento de novos produtos farmacêuticos é a *Leandra australis* (*L. australis*). Esta espécie,

que pertence à família Melastomataceae destaca-se pela presença de flavonoides, taninos hidrolisáveis e principalmente antocianinas[20,21]. Caracteriza-se como pioneira (ou primaria) por possuir um alto percentual de adaptação em ocupações de áreas que, por algum motivo, a vegetação original foi profundamente alterada e também por apresentar uma baixa exigência nutricional para sobreviver, favorecendo sua adaptação e cultivo nos mais diversos tipos de solo[22]. Mesmo com estas potencialidades químicas e agronômicas, até o momento, nenhum estudo foi conduzido com fins de prospecção tecnológica desta planta[22–24].

Frente às alegações expostas de potencialidade para cultivo da espécie *L. australis*, levando-se em consideração marcadores químicos como as antocianinas e o grande problema de saúde mundial que é a obesidade, estudar alternativas para prevenção e tratamento desta doença é de extrema importância para a sociedade. Assim, este estudo pretende caracterizar botânica e quimicamente os frutos da espécie *L. australis*, como também avaliar seu efeito em modelo animal de obesidade.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Obesidade

Obesidade é uma doença crônica caracterizada pelo excesso de gordura corporal, que causa prejuízos à saúde do indivíduo[25] e pode ser avaliada pelo Índice de Massa Corporal (IMC) igual ou superior 30 kg/m^2, calculado a partir do peso corporal em quilos dividido pelo quadrado da altura em metros[25]. Apesar de ser um método muito utilizado, o IMC não é capaz de distinguir massa gorda (gordura) de massa magra (músculo). Para o diagnóstico da obesidade é necessário a utilização de outros métodos concomitantes ao IMC[26], como por exemplo, medida da circunferência abdominal e relação circunferência abdominal/quadril, que são de baixo custo e fácil acesso[27]. Nos Quadros 1 e 2 estão descritos os pontos de corte para estes métodos.

Quadro 1 - Pontos de corte para classificação do estado nutricional pelo IMC

Índice de massa corporal (IMC)	
IMC (kg/m²)	*Classificação*
< 18,5	Baixo peso
15,5 – 24,9	Peso normal
≤ 25	Sobrepeso
25,0 – 29,9	Pré-obeso
30,0 – 34,9	Obeso grau I
35,0 – 39,9	Obeso grau II
≥ 40,0	Obeso grau III

Fonte: ABESO, 2016[26].

Quadro 2 - Pontos de corte para circunferência abdominal e para relação circunferência abdominal/quadril.

Circunferência abdominal (cm)		
Risco de complicação metabólica	*Homens*	*Mulheres*
Aumentado	≥ 94	≥ 80
Aumentado substancialmente	≤ 102	≤ 88
Relação circunferência abdominal / quadril		
Risco de comorbidades	*Homens*	*Mulheres*
Ponto de corte	< 0,90	< 0,85

Fonte: ABESO, 2016[26].

Em 2006, cerca de 47% das pessoas apresentaram excesso de peso, aproximadamente 82 milhões de pessoas, sendo 38,5% no sexo feminino e 47,5% no sexo masculino, sendo que, com o avanço da idade (superior a 55 anos), a prevalência de obesos para 62,4%[2]. Na última pesquisa realizada pela VIGITEL, cerca de 53,8% dos brasileiros estavam acima do peso e que percentual de obesos cresceu cerca de 60% nos últimos 10 anos[2].

A obesidade interfere na qualidade de vida e é um forte fator de risco para o desenvolvimento das doenças crônicas não transmissíveis que afetam significativamente as taxas de morbidade e mortalidade no Brasil[30]Em 2007, 72% das

mortes no país foram atribuídas a doenças não transmissíveis[30], sendo que, a grande maioria destes óbitos corresponde a quatro grupos de doenças: cardiovasculares, câncer, doença respiratória crônica e diabetes mellitus tipo 2[31]. O custo total anual de internações e procedimentos ambulatoriais no Brasil no período entre 2009 e 2011 relacionadas a doenças crônicas associadas ao excesso de peso, foi de 2,1 bilhões de dólares. Cerca de 10% deste custo foi atribuída ao excesso de peso e obesidade[32].

O aumento da expectativa de vida[33], diminuição na prática de atividade física e a facilidade de acesso e baixo custo de alimentos com alta densidade calórica, fizeram com que a prevalência da obesidade aumentasse significativamente em todo o mundo[2]. Contudo, outros fatores estão envolvidos para o aumento da prevalência de sobrepeso e obesidade[26,34–36].

1.1.1.1 Fisiopatologia da Obesidade

A etiologia da obesidade é complexa e multifatorial[26]. Aspectos genéticos[34], psicológicos[26], virais[35] e hormonais[36] estão envolvidos no ganho de peso, contribuindo para um desequilíbrio energético positivo, onde as calorias ingeridas são superiores as calorias gastas diariamente[4], resultando no armazenamento excessivo de triacilglicerol[3] em células denominadas adipócitos, que formam o tecido adiposo branco[4].

O tecido adiposo branco (Figura 1) é composto principalmente por adipócitos que são fundamentais para o armazenamento de energia e para síntese e secreção de hormônios[37]. Nesse tecido outras células compõem a fração vascular do estroma, como células vasculares, associadas com o fluxo adequado de nutrientes e oxigénio aos adipócitos; macrófagos e células T, importantes no estado imune; e a matriz extracelular, que proporcionam suporte mecânico[37].

A expansão do tecido adiposo (Figura 2) para armazenar o excesso de triglicerídeos, estimula a diferenciação de pré-adipócitos em adipócitos. Ao tornarem-se maduros respondem rapidamente ao aumento do consumo de nutrientes pela hipertrofia e hiperplasia dos adipócitos[38]. Desse modo, a obesidade pode ser definida como a expansão do tecido adiposo para armazenamento de ácidos graxos[39] (Figura 2).

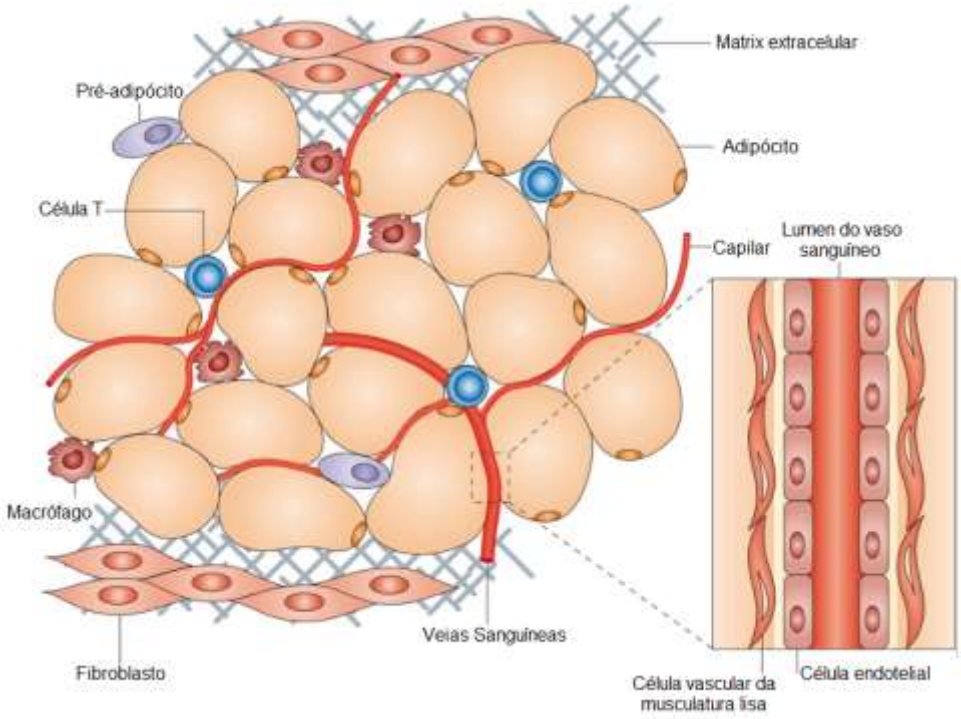


Figura 1 - Composição celular do tecido adiposo.

Fonte: Adaptado de Ouchi e colaboradores [37].

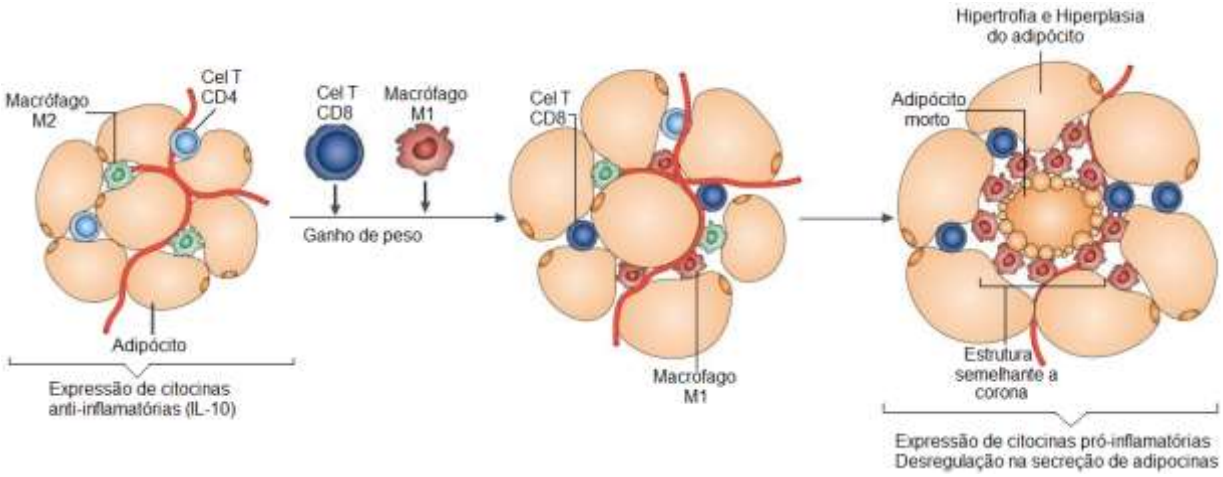


Figura 2 - Alterações do tecido adiposo na obesidade.

Fonte: Adaptado de Ouchi e colaboradores[37].

O aumento de tecido adiposo em pessoas obesas tem como consequência a produção anormal de citocinas, chamadas adipocinas, e a ativação de vias de sinalização pró-inflamatórias, resultando na síntese de marcadores de inflamação e vários hormônios, como a leptina[5]. Por meio da descoberta deste hormônio que regula

a ingestão de alimentos e o balanço energético, e a confirmação da secreção de proteínas envolvidas na regulação do metabolismo, como o TNF-α (do inglês: *tumor necrosis factor – alpha*, identificado como um regulador negativo da transdução do sinal de insulina), que o tecido adiposo branco passou a ser considerado um órgão secretor[40].

O tecido adiposo possui, além de capacidade de regulação do armazenamento e da distribuição de gordura, comunicação com o sistema nervoso central (SNC) e o trato gastrintestinal, desempenhando importante papel na resposta inflamatória em condições tanto autócrinas quanto parácrinas ou endócrinas[41]. Alguns estudos mostram que a hipertrofia dos adipócitos ocasiona uma infiltração e ativação de macrófagos no tecido adiposo aumentando o processo inflamatório crônico de baixa intensidade (Figura 3)[39–42].

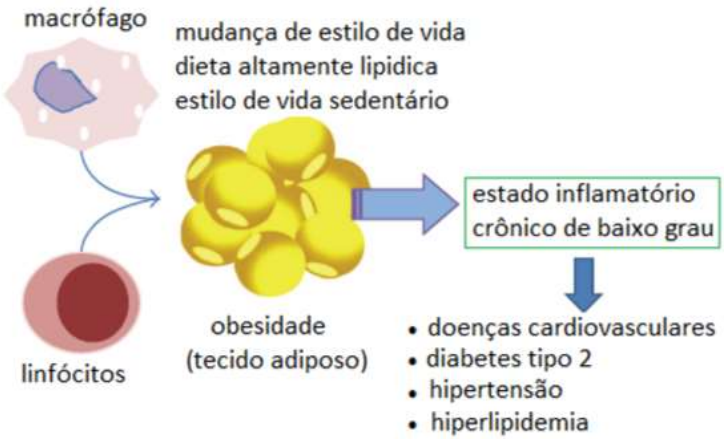


Figura 3 - Infiltração de leucócitos no tecido adiposo.

Fonte: Adaptado de Fuentes e colaboradores[42].

A produção aumentada de adipocinas pró-inflamatórias como TNF-α e Interleucina – 6 (IL-6) é acompanhada por um aumento da liberação de ácidos graxos livres e desregulação da secreção de leptina, adiponectina, resistina e proteína ligante de retinol (RBP4) provocando um aumento de ingestão alimentar, diminuição do gasto energético através de ações no hipotálamo, além da alteração na homeostase de tecidos periféricos, como músculo e fígado através do aumento ectópico da deposição de lipídeos[39].

Enos e colaboradores[43] identificaram a presença de mediadores inflamatórios em ratos submetidos a dieta rica em gordura saturada por um longo período de tempo gerando estresse oxidativo no tecido adiposo. Os ácidos graxos saturados que foram

gerados levaram a ativação de proteínas Jun N-terminal quinase (JNK) e marcadores inflamatórios como receptores do tipo *Toll like* receptor-4 (TLR4) e fator nuclear kappa B (NF-κB). A dieta rica em gordura saturada eleva os níveis de TNF-α e outras adipocinas pró-inflamatórias incluindo as interleucinas 6 e interleucinas 1-β (IL-1β), quimiocina ligante CC 2 (CCL2), entre outras[40]. Em contrapartida, diminui dos níveis de adipocinas anti-inflamatórias, como a interleucina 10 (IL-10)[44].

As citocinas pró-inflamatórias geradas na obesidade, propaga-se para o SNC, principalmente para o hipotálamo e o hipocampo. Essa propagação acontece a partir da ativação de células da glia, como as micróglias (macrófagos presentes no SNC) e citocinas pró-inflamatórias (liberadas pelo tecido adiposo), através de rotas humorais, neurais e celulares[8].

1.1.1.2 Inflamação e SNC

O aumento de citocinas pró-inflamatórias e a diminuição de citocinas anti-inflamatórias na obesidade[6] gera uma resposta neuroinflamatória que pode ocasionar prejuízos na função sináptica e morte neuronal, o que resultando no desenvolvimento de várias doenças neurológicas[45,46]. As citocinas liberadas induzem a síntese das enzimas indolamina 2,3-dioxigenase (IDO) e guanosina trifosfato-ciclohidrolase-1 (GTP-CH1) em macrófagos e células dendríticas, ocasionando alterações na síntese de serotonina e dopamina[45,47] e também induzem a produção de outras citocinas pró-inflamatórias, incluindo TNF-α , IL-1β, IL-6 e diminuem a produção de citocinas anti-inflamatórias como a IL-10[45]. A IDO aumenta a produção de metabólitos do glutamato gerando morte celular. A inibição desta enzima está associada a proteção contra comportamentos de ansiedade e depressão, possivelmente como resultado do impacto disso sobre neurotransmissores envolvidos na regulação do humor, da cognição e do controle da impulsividade[6].

De acordo com na figura 4, as citocinas estimulam a enzima IDO que transformam o triptofano (aminoácido precursor da serotonina) em quinurenina (KYN) e esta é convertida em ácido quinurênico (KA) nos astrócitos e em ácido quinolínico (QUIN) na micróglia. O KA inibi a liberação do glutamato, que por sua vez inibi a liberação de dopamina. Em contrapartida, o QUIN promove a liberação de glutamato através da ativação de receptores N-metil-D-aspartato (NMDA), induzindo ao estresse

oxidativo e excitotoxicidade no SNC[47]. O aumento das concentrações de KYN, KA e QUIN no líquor pode estar associado a disfunções neurológicas[45,46].

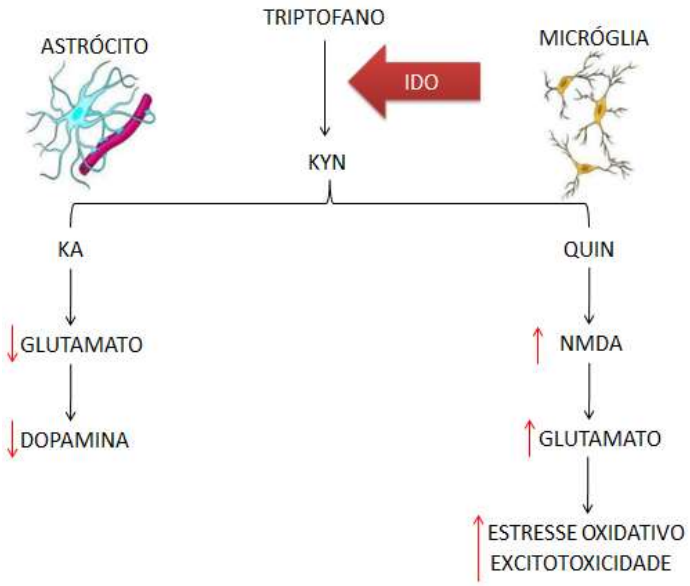


Figura 4- Transformação do triptofano a partir da enzima IDO (indolamina 2,3-dioxigenase). KYN (quinurenina); KA (ácido quinurênico); QUIN (ácido quinolínico); NMDA (N-metil-D-aspartato).

Fonte: Adaptado de Capuron[47].

Considerando que a obesidade causa uma inflamação sistêmica que repercute no SNC, pode-se presumir que ela seja um fator causal de disfunções neurológicas por meio da ativação de fatores pró-inflamatório[46]. Estudos realizados com animais[48–50] e humanos[51] demonstraram que o aumento no consumo de dietas hiperlipídica ocasionou um desempenho negativo nos testes de aprendizado e memória quando comparados aos grupos que apresentaram peso adequado e mantiveram uma dieta mais equilibrada. Com isso, a obesidade contribui significativamente para o declínio cognitivo[52].

Como já mencionado, a obesidade possui uma etiologia multifatorial e está pode contribuir para o aparecimento de diversas patologias. Porém, nem sempre o tratamento farmacológico é a primeira opção terapêutica, este deve, antes, ser pautado numa abordagem multidisciplinar[53].

1.1.2 Plantas e o controle da obesidade

O Tratamento da obesidade normalmente é feito com restrição alimentar, atividade física e/ou terapia medicamentosa, como a sibutramina e orlistate[26]. No entanto, atualmente, o emprego de plantas no controle e tratamento da obesidade vem sendo bastante utilizado. Já foi demonstrado que plantas compostas por flavonoides, incluindo flavonóis, glicosilados ou não, antocianinas, pró-antocianinas e isoflavonas inibem a digestão dos carboidratos, reduzindo a disponibilidade calórica de açúcares, proporcionado, desta forma, perda de peso e uma diminuição da glicemia[54].

Plantas como a *Camelia sinensis* (chá verde) além de reduzirem a adipogênese em humanos[55–57] são capazes de reduzir as concentrações de leptina no soro sanguíneo inibindo a absorção de ácidos graxos[56]. Em um estudo realizado por Yang e colaboradores[58] foi evidenciado também que a administração da planta *Morus alba L.* (rica em flavonoides e antocianinas) em ratos com obesidade induzida ocasionou na diminuição da concentração de colesterol e triglicerídeos.

Outro efeito positivo das plantas no tratamento da obesidade foi evidenciado por Kumar e colaboradores[59,60]. A utilização de *Gymnema sylvestre* reduziu significativamente os níveis de lipídeos, leptina, insulina, glicose, apolipoproteína-B e lipoproteína de baixa densidade (LDL em inglês: *Low Density Lipoprotein*) de ratos *Wistar* com obesidade induzida. Em contrapartida houve aumento nos níveis de lipoproteína de alta densidade (HDL em inglês: *High Density Lipoprotein*), apolipoproteína-A1 e enzimas antioxidantes do fígado.

O principal componente com efeito antiobesidade nas plantas são os compostos fenólicos, com composição e em quantidades distintas. De acordo com alguns autores, além de terem efeitos sobre a obesidade, esses compostos podem reduzir também o risco de desenvolvimento de diversas patologias, como diabetes *mellitus* tipo 2, osteoporose e doenças neurodegenerativas[61–63].

1.1.3 Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos são substâncias complexas largamente distribuídas na natureza. Estão presentes em uma variedade de vegetais, frutas e produtos industrializados.

Os compostos fenólicos são originados da capacidade das plantas de sintetizar uma grande diversidade de compostos com baixo peso molecular, conhecida como metabolismo secundário[64]. deste metabolismo, essenciais para o crescimento e reprodução das mesmas plantas. Estes são metabolizados em condições de estresse como, infecções, ferimentos e radiações UV[63,65].

Constituindo um dos mais numerosos e amplamente distribuídos grupos de substâncias no reino vegetal[66], os compostos fenólicos são definidos como substâncias que possuem anel aromático (Figura 5), com um ou mais substituintes hidroxílicos, incluindo seus grupos funcionais. Possuem estrutura variável e com isso, são multifuncionais[67]. Existe uma enorme variedade de fenóis, estimando-se em cerca de cinco mil, destacando-se os flavonoides, ácidos fenólicos, fenóis simples, cumarinas, taninos, ligninas e tocoferóis[68]. Os fenólicos englobam desde moléculas simples até moléculas com alto grau de polimerização. Estão presentes nos vegetais na forma livre ou ligados a açúcares (glicosídeos) e proteínas[69]. Atuam como agente antipatogênico e são responsáveis pela cor, adstringência, aroma e estabilidade oxidativa[65], não somente pela sua habilidade em doar hidrogênio ou elétrons, mas também em virtude de seus radicais intermediários estáveis, que impedem a oxidação de vários ingredientes do alimento, particularmente de lipídeos[70].

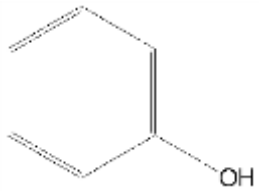


Figura 5 - Estrutura básica Fenol.

Fonte: Al-Hassan[71].

Os compostos fenólicos são considerados interruptores de radicais livres, eficientes na prevenção da autoxidação[72]. A ação antioxidante destes compostos presentes nas plantas, possuem um papel importante na redução da oxidação lipídica em tecidos, vegetal e animal, pois quando incorporado na alimentação humana não conserva apenas a qualidade do alimento, mas também reduz o risco de desenvolvimento de patologias, como arteriosclerose, câncer, doenças cardiovasculares, diabetes mellitus tipo 2, osteoporose e doenças neurodegenerativas[61–63].

Na estrutura dos compostos fenólicos apresenta-se vários grupos benzênicos característicos, tendo como substituintes grupamentos hidroxilas[73]. Os átomos de hidrogênio dos grupos hidroxila adjacentes (orto-difenóis), localizados em várias posições dos anéis A, B e C, as duplas ligações dos anéis benzênicos e a dupla ligação da função oxo (-C=O) de algumas moléculas de flavonoides garantem a esses compostos sua alta atividade antioxidante[68].

Existe uma grande diversidade de compostos fenólicos (Figura 6) dividindo-se em flavonoides (polifenóis) e não-flavonoides (fenóis simples ou ácidos)[65]. Os não-flavonoides correspondem aos compostos fenólicos mais simples, tais como os ácidos benzoicos (C6 – Cl) p-hidroxibenzóico, protocatéico, vanílico, gálico e siríngico; e ácidos cinâmicos, p-cumárico, caféico e ferúlico, portadores de cadeia lateral insaturada (C6 — C3) e outros derivados fenólicos de grande importância como os estilbenos, destacando-se o resveratrol e a fitoalexina[68]. Estes compostos apresentam atividades na prevenção de diversas enfermidades como cardiovasculares, cancerígenas e neurológicas[74].

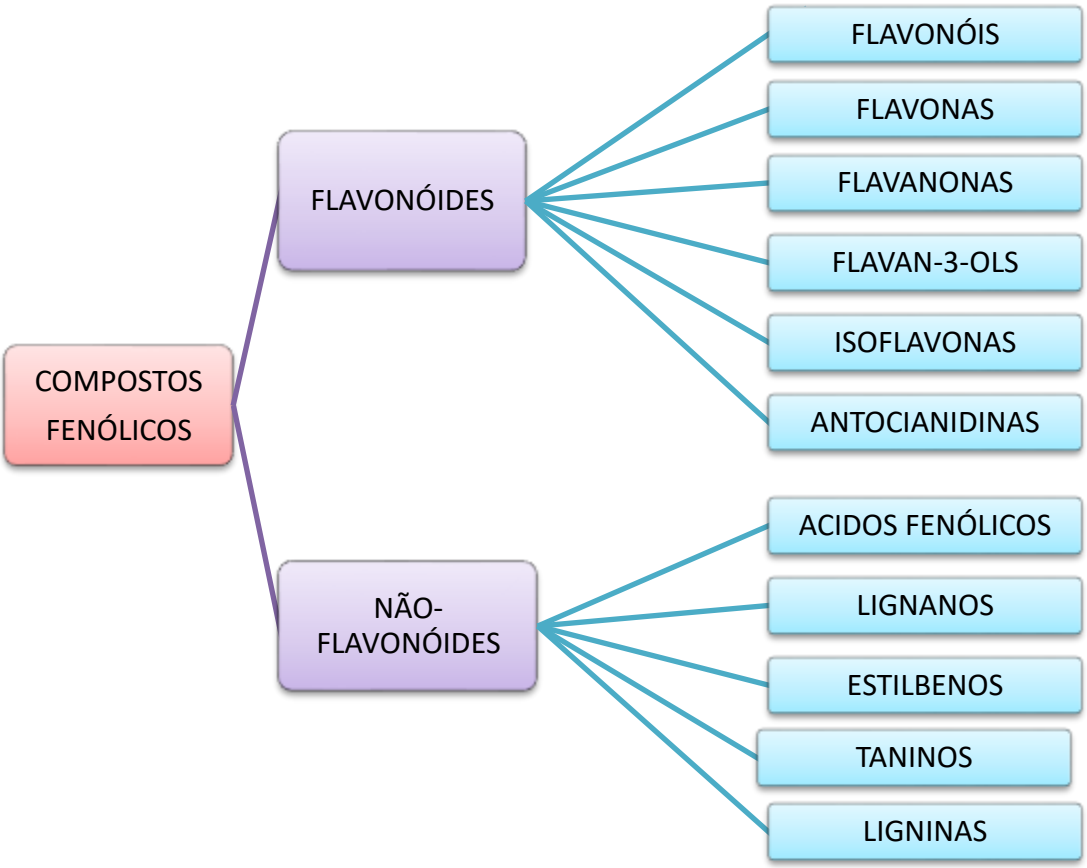


Figura 6 - Classificação dos compostos fenólicos
Fonte: Dzialo e colaboradores[75].

Os flavonoides, cuja síntese não ocorre em seres humanos[76], constituem o grupo mais estudado de polifenóis[76]. São compostos de baixo peso molecular, consistindo de 15 átomos de carbono (Figura 7) arranjados em uma configuração C6-C3-C6[77]. Este grupo tem uma estrutura base comum que consiste em dois anéis aromáticos ligados por três átomos de carbono que formam um heterociclo oxigenado[63,78]. O anel aromático A é derivado da via metabólica do acetato/malonato, enquanto que o anel B é derivado da fenilalanina através da via metabólica do shikimato[77].

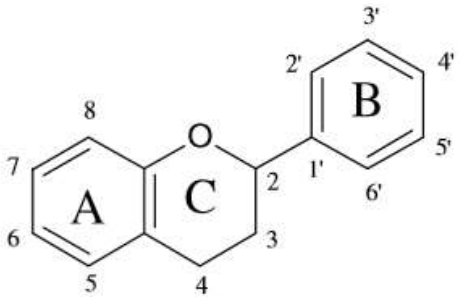
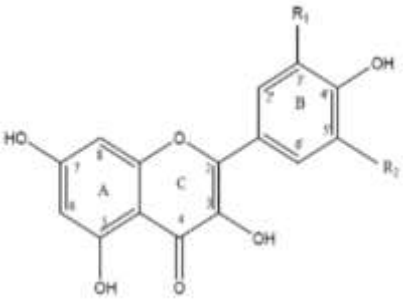


Figura 7 - Estrutura básica dos polifenóis

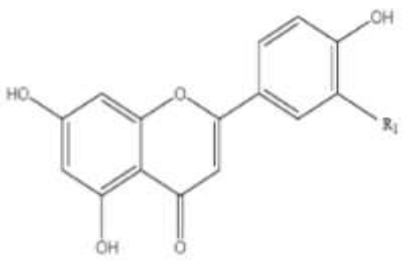
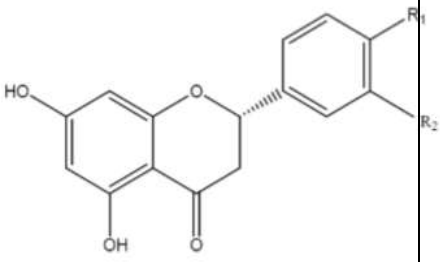
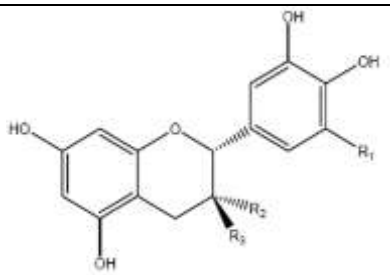
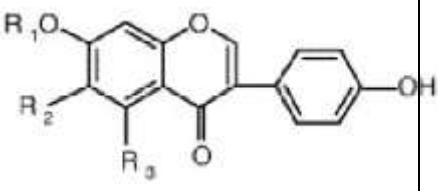
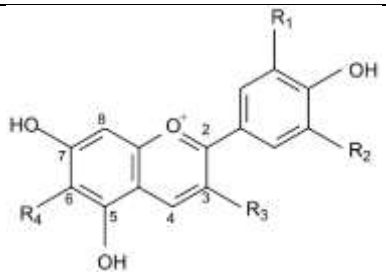
Fontes: Balasundram e colaboradores[77].

Com base na variação do tipo de heterociclo envolvido, os flavonoides podem ser divididos em seis subclasses como é mostrado no Quadro 3[65,75,78]. As diferenças individuais dentro de cada grupo resultam da variação no número e a disposição dos grupos hidroxilo e o seu grau de alquilação e/ou glicosilação[63,75,78]. O potencial antioxidante dos flavonoides é dependente do número e da posição dos grupos de hidrogênio e suas conjugações, e também à presença de elétrons nos anéis benzênicos[68].

Quadro 3 - Classificação dos flavonoides *Inicio*

Subclassificação	Estrutura química	Tipos	R1	R1	R3
Flavonól		Quercetina Campferol Mircetina	OH H OH	H H OH	-

Continuação

Flavonas		Apigenina Luteolina	H OH	-	-
Flavanonas		Hesperetina Naringenina	OH H	OH OH	-
Flavan-3-óis		Catequinas Epicatequinas	H H	H OH	O H H
Isoflavonas		Daidzeína Genísteína	H H	H H	H O H
Antocianidinas		Cianidina Delfinidina Peonidina	OH OH OH	H OH H	-

Fonte: Ghasemzadeh e colaboradores[78].

A maioria das antocianidinas possuem grupos hidroxilas nas posições 3, 5 e 7. Já as antocianinas, derivadas das antocianidinas, possuem grupos açúcares em uma ou mais posições, sendo os mais comuns glicose, xilose, arabinose, ramnose, galactose ou dissacarídeos constituídos por esses açúcares, aos quais podem estar ligados ácidos fenólicos, como p-coumárico, cafêico, fenílico e vanílico[79].

Ensaios biológicos usando combinações isoladas revelaram que os flavonóides exibem uma grande ação sobre os sistemas biológicos demonstrando efeitos como antimicrobiano, antiviral, antioxidante, antihipertensivo, hipolipidêmico, anti-inflamatório, antiplaquetário[80]. Também demonstrou aumento na permeabilidade capilar, inibição da exsudação proteica e migração de leucócitos[80,81]. Dentre os flavonóides já identificados, destaca-se as antocianinas. Estes compostos são responsáveis pelas cores atraentes das flores, frutos e folhas[79] e muito conhecidas pelo alto potencial antioxidante[17,18] e antiinflamatório[19].

1.1.3.1 Antocianinas

O termo antocianina, derivado do grego (anthos = flores; kianos = azul), foi definido por Marquart em 1853 para se referir aos pigmentos azuis das flores[79]. As antocianinas são compostos da família dos flavonóides[82,83] solúveis em água[66,84], que constituem grupo de pigmentos responsáveis pelas várias tonalidades entre laranja, vermelho e azul[85] de grande parte das flores, frutas, folhas, caules e raízes de plantas[82,85]. Com a mesma origem biosintética da sua família, estes compostos são estruturalmente caracterizadas pela presença do esqueleto contendo 15 átomos de carbono, conforme a Figura 8, porém, elas absorvem fortemente na região visível do espectro, conferindo uma infinidade de cores, dependendo do meio de ocorrência[79].

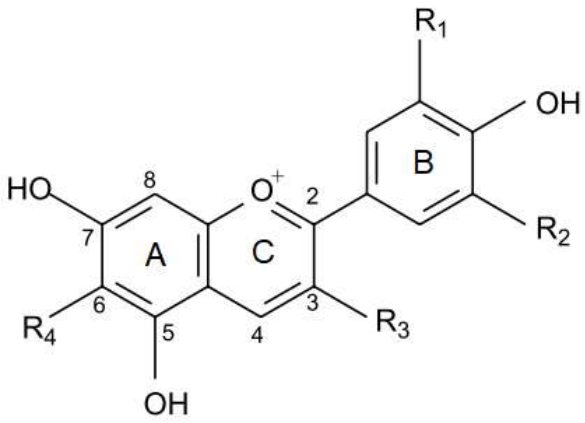


Figura 8 - Estrutura básica antocianina
Fonte: Guimarães e colaboradores[86].

As antocianinas são glicosídeos que, por hidrólise ácida, liberam agliconas também denominadas de antocianidinas e, dentre as encontradas na natureza,

apenas seis estão presentes em alimentos (Quadro 4), que diferem entre si quanto ao número de hidroxilas e grau de metilação, presentes no anel B[85] (Figura 8).

As diferentes estruturas ligadas aos radicais (R1, R2, R3, R4) podem variar entre hidrogênio, hidroxilas ou metoxilas[87]. Os açúcares mais comumente ligados à estrutura molecular central, em geral nas hidroxilas das posições 3, 5 e 7, são monossacarídeos como glicose, galactose, arabinose, raminose, porém, podem apresentar-se também na forma de dissacarídeos e trissacarídeos[88].

As variações estruturais das antocianinas denotam diferentes açúcares ligados, polimerização e nos modos ou posições de hidroxilação e metilação. Em alguns casos, os açúcares apresentam-se acilados pelos ácidos p-coumárico, cafêico, fenílico e vanílico[87].

Quadro 4: Nomes e grupos substituintes de antocianidinas mais frequentes na natureza.

Agliconas	R1	R2	R3	R4
Cianidina	OH	H	OH	H
Delfinidina	OH	OH	OH	H
Malvidina	OCH_3	OCH_3	OH	H
Pelargonidina	H	H	OH	H
Peonidina	OCH_3	H	OH	H
Petunidina	OCH_3	OH	OH	H

Fonte: Guimarães e colaboradores[86].

As antocianinas possuem a propriedade de apresentarem cores diferentes dependendo do pH (potencial de hidrogênio) do meio em que se encontram, o que as torna de interesse para uso como indicadores de pH. As mudanças estruturais das moléculas ocorridas mediante a variação do pH, permitem a obtenção de soluções incolores ou coloridas, podendo ser vermelha, violeta, azul ou amarela[88]. A Figura 9 representa as alterações que ocorrem na estrutura das antocianinas dependentes do pH.

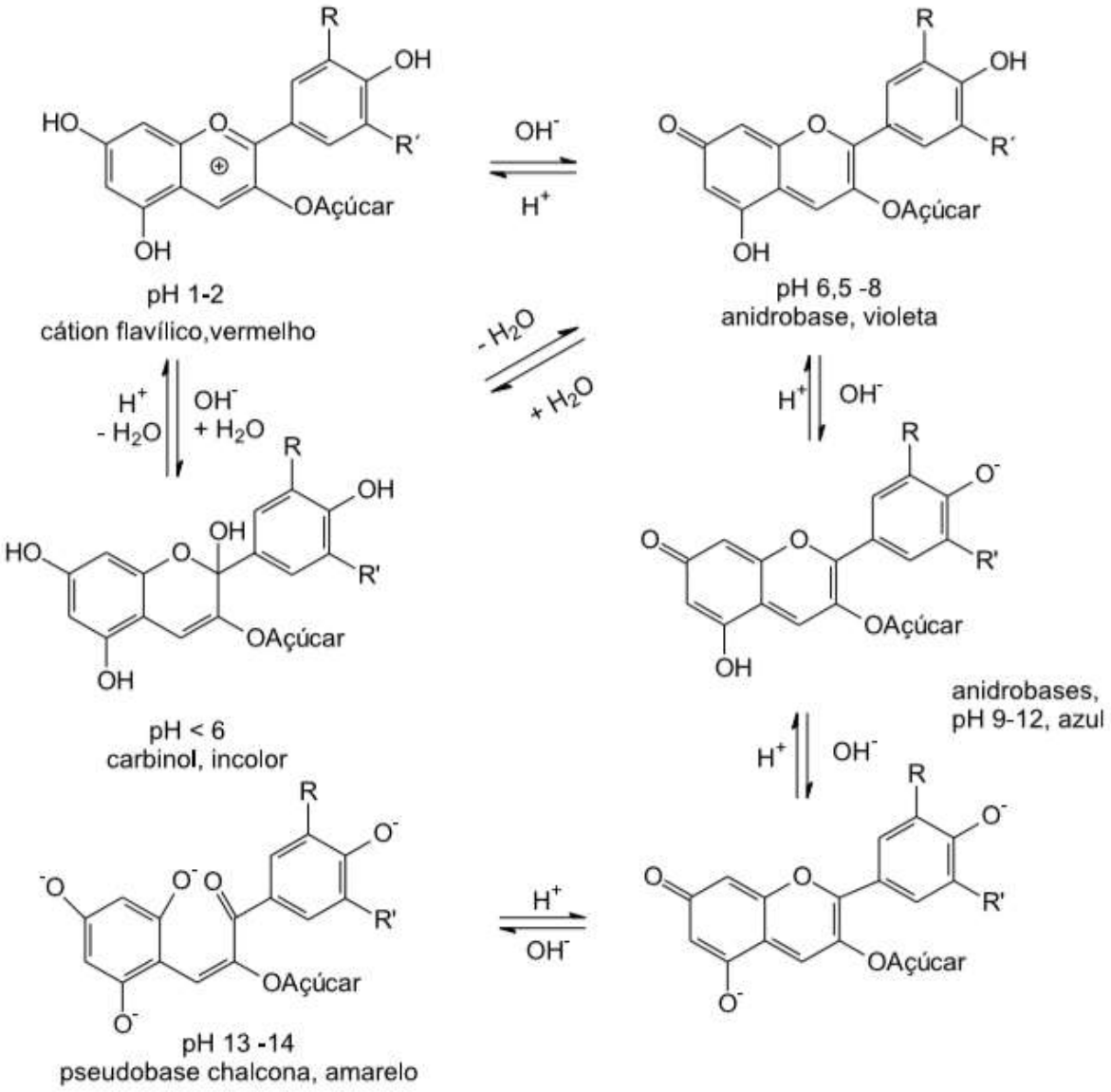


Figura 9 - Mudanças estruturais das antocianinas em meio aquoso em função do pH.
Fonte: Terci e colaboradores[88].

Além de conferir coloração característica aos vegetais, as antocianinas apresentam propriedades que associam sua ingestão a hábitos saudáveis de alimentação[89]. No entanto, a utilização de antocianinas apresenta restrições em função de limitações, como a disponibilidade de matéria-prima na quantidade e qualidade requerida, as dificuldades envolvendo processos de obtenção, e, principalmente, a baixa estabilidade apresentada pelas antocianinas.

1.1.3.1.1 Estabilidade química das antocianinas

A aplicação das antocianinas em produtos farmacológicos, deve ser monitorado após processamento para garantir a sua eficácia[90]. A estabilidade deste composto é afetada por diversos fatores como pH[82], luz[79], temperatura[79,90], metais[79] e oxigênio[82], enzimas endógenas[91], dentre outros fatores.

Fatores estruturais da molécula são também responsáveis pela estabilidade das antocianinas. Como exemplo, destaca-se o grau de substituição do anel B (R1 e R3) e a natureza e número de açúcares ligados à molécula que geram uma diminuição atividade biológica[91,92].

A estabilidade das antocianinas ao descoramento é aumentada consideravelmente pela presença de ácidos fenólicos. O mesmo efeito é observado pela presença de flavonóides não-antociânicos, especialmente os flavonóis, como por exemplo a rutina[79]. Compostos como o acetaldeído, aminoácidos, taninos, dentre outros, também conferem aumento na estabilidade da molécula. Esse aumento na estabilidade é atribuído à copigmentação[79,82], ou seja, associação entre antocianina e flavonol por ligações de hidrogênio, de modo que o flavonol venha a formar uma estrutura protetora envolvendo a antocianina[79]. Essas associações químicas aumentam a estabilidade das antocianinas e ampliam as suas propriedades antioxidantes[93].

1.1.3.1.2 Extração das antocianinas

Na maioria das frutas e hortaliças, as antocianinas encontram-se em células próximas à superfície, o que permite que eles atuem como filtro a radiações ultravioleta nas folhas, melhorem e regulem a taxa de fotossíntese[90]. Dessa maneira, encontram-se dissolvidos na seiva das células e sua extração geralmente envolve o uso de solventes específicos, como por exemplo, solventes ácidos, que rompem a membrana celular do tecido e dissolvem os pigmentos[90].

As antocianinas, muito solúveis em água[66,84] são facilmente extraídas de plantas utilizando-se soluções polares. Métodos convencionais de extração para quantificação de antocianinas usualmente empregam metanol contendo 0,001% de ácido Clorídrico (HCl)[82]. Porém o HCl é corrosivo e o metanol é tóxico para o ser

humano, portanto recomenda-se a utilização de ácidos orgânicos mais fracos como o ácidos cítrico, tartárico, fórmico, acético e propiônico[94].

Métodos extrativos de antocianinas que serão utilizadas com fins nutracêuticos e farmacêuticos normalmente empregam a utilização de água como solvente extrator contendo ácidos orgânicos como ácido acético, cítrico, tartárico e hidroclorídrico[94]. A utilização de dióxido de enxofre (SO_2) no lugar do ácido também é bastante eficaz. Uma das possíveis razões para a melhora na extração está na interação das antocianinas com os íons HSO_3 - , os quais aumentam a solubilidade e difusão das antocianinas através da parede celular[95].

As antocianinas podem ser extraídas através de métodos convencionais como por exemplo a destilação, infusão, ultrassom, fracionamento e maceração [96]. Alguns processos são fundamentais para a extração e conservação das antocianinas, como a desidratação dos frutos através da liofilização para reduzir a degradação enzimática, assim como favorecer a trituração dos mesmos afim de aumentar a área de contato[96]. De acordo com Rockenbach e colaboradores[97], diversos métodos e sistemas de solventes são utilizados para a extração destes compostos, em que o rendimento e a composição dependem tanto do solvente utilizado como do método aplicado, que pode ser baseado em mecanismos químicos diferentes.

1.1.3.1.3 Quantificação das antocianinas

Considerando que existem aproximadamente 400 tipos de antocianinas[98] presentes em diversas plantas como uva, cereja, morango, amora, maçã, azeitona, figo, marmelo, jabuticaba, cacau, repolho roxo, rabanete, berinjela, feijão, entre outras[84], poucas delas apresentam-se como fonte comercial desse pigmento[90].

A porcentagem de antocianinas nos alimentos é geralmente proporcional à intensidade da cor e pode alcançar valores de 2-4 g/kg de peso fresco em groselhas e amoras, valores que, em regra, aumentam à medida que o fruto amadurece[99]. Encontram-se, preferencialmente, na pele, embora algumas também existam na polpa, como exemplo os frutos vermelhos (morangos e cerejas)[100].

Segundo Falcão e colaboradores[101], as antocianinas presentes em uvas estão concentradas principalmente na casca, com exceção de poucas variedades cuja polpa também é pigmentada, e apresentam como pigmentos antociânicos majoritários malvidina-3-glicosídio, petunidina-3-glicosídio, cianidina-3-glicosídio, delfinidina-3-

glicosídio, peonidina3-glicosídio[102,103], podendo alcançar até 750 mg/100 gramas de fruta madura[84]. O vinho contém entre 100 a 1000 mg de antocianinas/L sendo que estas são transformadas em várias estruturas complexas à medida que o vinho envelhece[100].

Diferentemente da grande parte dos flavonóides, que absorvem luz na região entre 350 e 380nm, as antocianinas são capazes de absorver fortemente luz na região do visível, compreendida entre 496 e 550nm[104]. Essa característica particular permite a quantificação das antocianinas por métodos espectrofotométricos em medições simples de absorbância em comprimentos de onda adequados[105]. Existe a técnica de análise direta da absorbância, comparativa a uma solução padrão de uma determinada antocianina e a técnica pH diferencial, que consiste em efetuar leitura espectrofotométrica da solução em tampão pH 1,0 e pH 4,5, baseando-se na sensibilidade destes compostos ao pH[106]. Elevando-se o pH para 4,5 estabelece-se condição em que as antocianinas praticamente não apresentam coloração, apresentando menor absorção de energia. Por outro lado, abaixando-se o pH para em torno de 1,0, os pigmentos exibem coloração intensa. A diferença de absorbância observada espectrofotometricamente possibilita, por diferença direta, estimar a fração real de antocianina presente[105,107].

1.1.3.1.4 Farmacocinética das antocianinas

A ingestão de antocianinas varia de acordo com os hábitos alimentares estando a sua atividade biológica ligada à respectiva absorção e metabolismo. Em países ocidentais, o consumo de antocianinas estimado fica entre 180-215 mg/dia[108]. Estima-se que uma dose diária de 50 mg de antocianinas seria suficiente para promover alguma atividade biológica[109].

Como é ilustrado na figura 10, as antocianinas são rapidamente absorvidas, em maior ou menor grau, no estômago e no intestino, tanto em animais[110,111] como em humanos[112,113]. Chegam a circulação sistémica e na urina, na forma metilada, como derivados glucoronidos e/ou formas sulfoconjugadas, alcançando o pico de concentração plasmática entre 0.5 e 3 horas após consumo, tempo inferior a outras subclasses de flavonóides[108,114]. Os processos de conjugação, principalmente a metilação, sulfatação e glucoronidação, no intestino delgado ou no fígado, facilitam a

sua eliminação através da bílis e da urina, uma vez que aumentam o seu carácter hidrofílico[115].

Outros estudos revelaram que, após a sua rápida absorção, são atingidas concentrações plasmáticas máximas de 1–100nmol/L após ingestão de doses entre 0.7–11mg/kg, apresentando uma *clearance* plasmático de cerca de 6 horas[116,117].

De acordo com Garcia Alonso e colaboradores[113], após ingestão de 90 mg de antocianina malvidina-3-glucósideo (Mv3glc) por voluntários saudáveis, os níveis plasmáticos inalterados foram cerca de 4nM. O tempo de meia vida plasmático das antocianinas é variável sendo, por exemplo, de 2 horas, para a Mv3glc e de 3,3 horas para o seu rutinósideo.

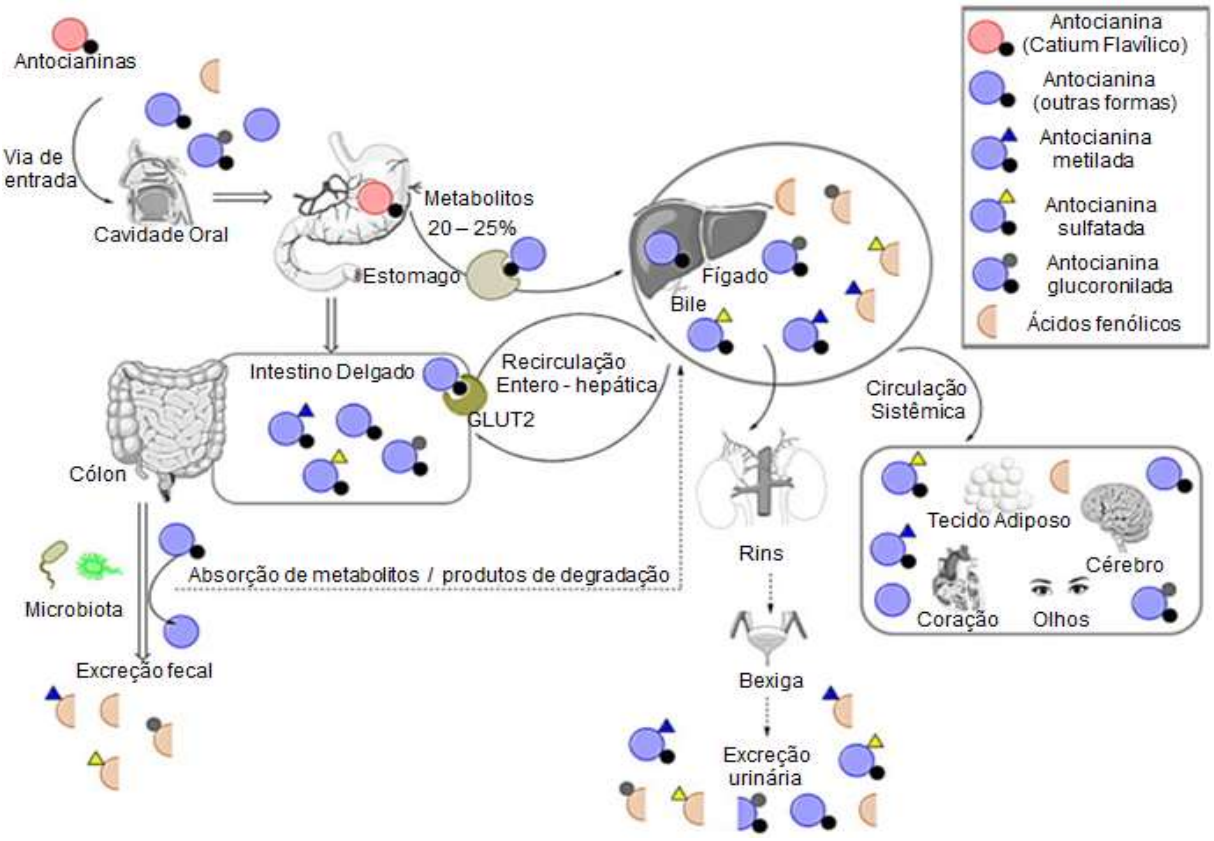


Figura 10 - Vias de absorção, distribuição, metabolismo e excreção das antocianinas.
Fonte: Fernandes e colaboradores[118].

Alguns estudos indicam que a absorção gástrica das antocianinas, com o pH baixo do estômago, acontece por meio de um mecanismo mediado pela bilitranslocase, uma proteína transportadora expressa na mucosa gástrica[119–121]. As células endoteliais humanas e de rato expressam igualmente a bilitranslocase e este transportador específico da bilirrubina implica diretamente no transporte das

antocianinas para o interior das células[120,121]. Após a absorção gástrica, as antocianinas entram na circulação sistémica, depois de passarem pelo fígado que são parcialmente metabolizadas por reações de metilação e glucoronidação, sendo alguns desses metabolitos transportados para o intestino através da bílis[119].

Ao atingirem o intestino delgado, as antocianinas não absorvidas no estômago, são convertidas, devido ao pH mais elevado, em uma combinação de hemicetal, chalcona e formas quinoidais. Existem dois mecanismos para a sua absorção. O primeiro mecanismo acontece a partir do transporte de glucósidos para o interior dos enterócitos através de transportadores da glucose dependentes do sódio SGLT1 (co-transporte com o íon sódio, do inglês: *sodium-glucose linked transporter*)[122,123] onde são hidrolisados pelas β-glicosidades citosólicas[124]. O outro mecanismo acontece pela hidrólise extracelular através de uma glicosidase (lactase-floricina hidrolase), presente na membrana da bordadura em escova do intestino delgado, e a sua posterior difusão através das microvilosidases[125].

Segue-se para circulação sistémica após metabolização hepática. Por fim, as antocianinas que alcançam o cólon são expostas à microflora entérica, podendo ser degradadas por hidrólise, catalisada por enzimas bacterianas como a β-glicosidase, em glicose e componente fenólico[126,127]. Este último pode ainda ser convertido, por ruptura do anel C, em ácidos fenólicos e aldeídos. Tais produtos poderão ter também efeitos benéficos ao atuarem diretamente no trato gastrointestinal ou após absorção sistémica. No intestino distal, os metabolitos conjugados das antocianinas excretados pela bílis podem igualmente ser submetidos à ação das enzimas bacterianas e reabsorvidos através do ciclo enterohepático, permitindo uma presença mais prolongada no organismo[128].

As antocianinas e os seus metabolitos persistem na urina até 24 horas mantendo a sua estrutura básica[129,130]. Para Mazza[131], os glicosídeos e os derivados glucoronidos são os mais prevalentes no plasma nas primeiras 5 horas, sendo progressivamente metilados, podendo desta forma reduzir a sua bioatividade, ao longo do tempo.

1.1.3.1.5 Atividades biológicas das antocianinas

Existe um grande interesse no estudo das antocianinas em diversas áreas, entre estas a saúde, devido ao seu grande potencial terapêutico. Nos últimos anos,

pesquisas têm demonstrado que as antocianinas e suas respectivas agliconas são compostos bioativos que possuem vários efeitos fisiológicos, como atividade anticarcinogênicas[11] e antivirais[12], promovem vaso-dilatação[132], atuam na prevenção da hiperglicemia[13], estimulam a secreção de insulina[14], melhoram a adaptação da visão noturna, previnem a fadiga visual[133] e principalmente possuem capacidade antioxidante[17,18] e propriedade antiinflamatória[19].

Por possuírem propriedades de óxido-redução, as antocianinas desempenham um papel importante na neutralização de radicais livres[134], demonstrando grande eficiência no combate de vários tipos de moléculas oxidantes que estão envolvidos em danos no DNA (ácido desoxirribonucleico) e promoção de tumores[135].

As antocianinas apresentam estruturas químicas conjugadas (ligadas ao anel B de sua estrutura), ricas em grupos hidroxilas, que reagem e inativam ânions superóxido, oxigênio singleto, radicais peróxido de lipídeos e/ou estabilizam radicais livres envolvidos no processo oxidativo através da hidrogenação ou complexação com espécies oxidantes[136]. Após a doação de grupos hidroxila e metila pelas antocianinas os radicais livres perdem sua reatividade, dessa forma não são capazes de atacar biomoléculas do organismo[135].

Em um estudo realizado com feijão preto[137], ricos em antocianina, foi observado que o mesmo teve potencial de inibição de enzimas degradantes como α-glucosidase, α-amilase, dipeptidil peptidase-IV, e também diminuição de espécies reativas de oxigênio e a absorção de glicose. Além disso, as antocianinas também possuem ação sobre citocinas pró inflamatórias. Rupasinghe e colaboradores[138] observaram uma correlação negativa entre o teor de antocianinas de haskap (*Lonicera caerulea*) e as citocinas pró-inflamatórias IL-6, TNF-α, prostaglandina, e a enzima COX-2 (ciclo-oxigenase – 2) em uma linha celular monocítica humana THP-1, derivadas de macrófagos estimulados por lipopolissacarídeo.

A suplementação da dieta com antocianinas, pode ainda, modular os processos de inflamação[139–141]. Karlsen e colaboradores[142] realizaram um estudo controlado randomizado (n=62), em que avaliaram o consumo do suco de mirtilo, durante 4 semanas. Neste período foi observado a diminuição das concentrações plasmáticas de proteína C-reativa (PCR), IL-6, IL-15 (interleucina-15), e monocinas induzida pelo INF-c (interferon-c). Em contrapartida houve um aumento na concentração plasmática de TNF-α.

A visão da obesidade como doença inflamatória tem despertado interesse para manipulação terapêutica da inflamação[4]. Decorrente disso, várias pesquisas estão sendo realizadas avaliando os potenciais efeitos antiobesidade das antocianinas.

Duffey e colaboradores[143] avaliaram os efeitos do aumento do consumo do suco de cranberry, rico em antocianinas e procianidinas[144] e concluíram que os consumidores obtiveram tendência há peso normal, menor circunferência da cintura, diminuição nos níveis de triacilgliceróis e de PCR (proteína C-reativa). Em outro estudo[145] a associação do consumo do suco de cranberry por um período de 8 semanas diminuiu o risco de doenças cardiovasculares em adultos, incluindo níveis de triglicerídeos séricos em jejum, proteína C reativa e glicose, resistência à insulina e pressão arterial diastólica.

Em humanos, o consumo de antocianinas reduz o conjunto de biomarcadores inflamatórios (IL-6, IL-10, TNF-α) e de estresse oxidativo[146]. No estudo realizado por Tsuda e colaboradores[147,148], em camundongos do tipo C57BL/6J, foi demonstrado que as antocianinas presentes na dieta, normalizaram a hipertrofia dos adipócitos no epidídimo e tecido adiposo branco, além de amenizar a hiperglicemia induzida pela dieta alimentar rica em gordura. Além disso, as antocianinas possuem a capacidade de regular a obesidade e a sensibilidade à insulina associada com o controle da secreção de adiponectina e leptina[148]. O grande número de estudos com antocianinas realizados é indicativo de que a suplementação da dieta com fontes ricas em antocianinas torna-se uma boa estratégia para prevenção e tratamento da obesidade.

Na dieta humana, uma das principais fontes de antocianina são as frutas[149], e, dentre estas destacam-se as da família Melastomataceae, por serem frutos ricos em flavonóides e antocianinas[20,21,150].

1.1.4 Melastomataceae

Dentro da vasta biota brasileira encontra-se a família Melastomataceae, que pertence à ordem Myrtales[151]. Foi estabelecida por Jussieu em 1789 e está subdividida em três subfamílias: Melastomoideae com 11 tribos[152] e, Memecyloideae e Astronoideae, com apenas 1 tribo cada[151]. Atualmente são reconhecidas cerca de 4.570 espécies com distribuição pantropical[153,154], com aproximadamente 3.000 espécies nos neotrópicos[153], em que 150 a 166 gêneros de distribuição pantropical[154–

[156], sendo que a Melastomeae, Miconieae e Microlicieae são consideradas as mais importantes para o Brasil[157,158].

No Brasil é a sexta maior família de Angiospermas, com cerca de 68 gêneros[153,155] e mais de 1.500 espécies[159,160,] e que representam uma das principais famílias da flora brasileira[153]**,** a Miconia Ruiz & Pav., Leandra Raddi e Tibouchina Aubl. os gêneros mais representativos e com um alto grau de endemismo[156]**.** Encontram-se distribuídas desde a Amazônia até o Rio Grande do Sul, presentes em praticamente todas as formações vegetacionais, com um número variável de espécies[159].

As espécies apresentam grande diversidade de hábitos, desde herbáceo até arbustivo, ocorrendo muito comumente espécies arbóreas, e, mais raramente trepadeiras e epífitas, que permitem a ocupação de ambientes distintos e diversificados[159].

Do ponto de vista químico, a família Melastomataceae destaca-se pela presença de hidrocarbonetos, ácidos graxos, triterpenos, flavonóides, taninos hidrolisáveis e antocianinas[20,21,150]. Um estudo quimiotaxonômico realizado em folhas de espécies de Melastomataceae, pertencentes aos gêneros Lavoisiera, Microlicia e Trembleya, resultou na identificação de 116 flavonóides, compreendendo 69 flavonóis e 47 flavonas[161].

As espécies de Microlicia descritas no trabalho de Bomfim-Patrício (2001)[162], apresentaram, predominantemente, derivados da classe dos flavonóis, com ampla diversidade estrutural de derivados glicosilados da quercetina e do canferol[161]. Dentre espécies de Melastomataceae que contém taninos podemos citar *Leandra australis* (Cham.) Cogn. (LA) em que foram isolados flavonóides e antocianinas[162].

1.1.5 Leandra Raddi

O gênero Leandra Raddi. pertence à tribo Miconieae[163] e apresenta cerca de 200 espécies, distribuídas desde o México e Antilhas, até o sul do Brasil e Argentina[154]. No Brasil, o gênero está representado por cerca de 150 espécies e pode ser reconhecido pelas folhas destituídas de formicários, inflorescências terminais e/ou pseudo-axilares. A coloração do cálice varia de verde a avermelhado e as pétalas, triangulares, variam de brancas a rosadas[163] com ápice agudo/acuminado. O ovário é ínfero e 3-5-locular[154] e frutos carnosos[154].

Leandra é um gênero claramente parafilético[163]. Recentes análises filogenéticas[164] mostram que o gênero é constituído por três grandes blocos. O primeiro grupo é formado pelas espécies da seção *Secundiflorae Cogn*., que ocorrem na América Central e Caribe, o segundo constituído pelas espécies da seção *Tschudya Cogn*., encontradas no Norte da América do Sul e do Brasil, e, o terceiro com a seção Niangae, na qual está inserida a espécie *L. australis*[165], que ocorrem no Sudeste e Sul do Brasil[154].

Nas folhas de diversas espécies amazônicas do gênero *Leandra* não foi detectada glicosídeos cianogênicos[166]. Seus frutos maduros, adocicados e muito saborosos, são fontes potenciais de antocianinas negligenciados pela fruticultura nacional e portanto, pela nutrição[167]. Estes frutos são usados para a fabricação de geleias, sucos, sorvetes, licores e, especialmente, polpa congelada. Mais, os frutos limpos são congelados inteiros em pequenos potes, como já vem sendo feito com outras pequenas frutas (fisális, mirtilo, amora-preta, morango, framboesa)[167]. Entretanto, carecem de análises fitoquímica e bromatológicas, especialmente em relação as vitaminas e pigmentos. São necessários também experimentos de propagação sexuada e assexuada[167].

1.1.6 *Leandra australis*

Espécie arbustiva ou subarbustiva de 1 a 2 metros de altura com folhas inteiras e opostas, ocorrendo em capoeiras[23]. A espécie *L. australis*, figura 11, é conhecida popularmente como pixirica ou mexirico. As folhas são utilizadas para produção de chás por meio de infusão[168,169]. Esta espécie é caracterizada como pioneira (primária) por possuir um alto percentual de adaptação em ocupações de áreas onde, por algum motivo, a vegetação original foi profundamente alterada e também por apresentar baixa exigência nutricional para sobreviver nestes locais, característica que favorece sua adaptação e cultivo nos diversos tipos de solo[22–24].

Os frutos de *L.australis* são utilizados para combater a diarreia e as folhas para males da bexiga[170]. Um estudo qualitativo com a finalidade de avaliar a presença de metabólitos secundários nas folhas desta espécie, identificou a presença de taninos, saponinas, esteróides e triterpenóides[168]. Entretanto, ainda não foram encontrados na literatura estudos que determinassem a composição química dos frutos, assim como sua potencial aplicação.

Figura 11 - Partes da espécie *L. australis:* A: folhas, B: Fruto, C: Flores.
Fonte: Chaves[171].

Durante os últimos anos, um número significativo de pessoas estão voltando a utilizar plantas por causa de insatisfação e falta de confiança em medicamentos convencionais[172]. A busca por produtos naturais com potencial para tratamento e prevenção de doenças crônicas não transmissíveis é, atualmente, tema chave de muitos laboratórios e indústrias[173]. Embora suas ações terapêuticas sejam conhecidas pela população, evidências científicas são necessárias para assegurar a eficácia e segurança do produto[174].

Já foi evidenciado de que o consumo diário de *berries* (bagas roxas) ricos em antocianinas e polifenóis, como amora[175], blueberry[175–177], cranberry[178,179], blackberry[180], jabuticaba[181–183], uva[184–186], framboesa[186], açaí[176,187] e morango[175,188], entre outros, atuam na prevenção e tratamento da obesidade ou ainda previnem os danos gerados por ela. Em estudos preliminares com os frutos de *L. australis* no Laboratório de Tecnologia Farmacêutica (TECFARMA), da Universidade do Sul de Santa Catarina (UNISUL), foi evidenciado que os frutos desta espécie, possuem algumas características que se assemelham aos *berries*, levantando-se a hipótese de que o consumo diário dos frutos liofilizados de *Leandra australis* (FLLA) poderiam ter efeitos benéficos na prevenção e tratamento da obesidade ou ainda atenuar os danos gerados por ela. Portanto, este estudo pretende caracterizar botânica e quimicamente os FLLA e avaliar o consumo destes na prevenção da obesidade e nos danos gerados por ela.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar botânica e quimicamente os frutos da espécie *L. australis* e avaliar o efeito da administração preventiva destes sobre peso corporal, parâmetros de estresse oxidativo e inflamatórios em modelo animal de obesidade.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar botanicamente amostras da espécie *L. australis*.
- Liofilizar os frutos maduros de *L. australis*;
- Avaliar o perfil cromatográfico para antocianinas, flavonóides e ácidos fenólicos dos frutos liofilizados de *L. australis*.
- Quantificar os níveis de polifenóis totais nos frutos liofilizados de *L. australis*;
- Quantificar os níveis de antocianinas totais nos frutos liofilizados de *L. australis*;
- Quantificar os níveis de cinzas totais e insolúveis em ácido clorídrico nos frutos liofilizados de *L. australis*;
- Quantificar os níveis de açúcares redutores totais nos frutos liofilizados de *L. australis*;
- Avaliar em modelo animal de obesidade o efeito do consumo preventivo dos frutos liofilizado de *L. australis* no ganho de peso corporal, consumo alimentar e gordura visceral;
- Avaliar em modelo animal de obesidade o efeito do consumo preventivo dos frutos liofilizado de *L. australis* sobre peso dos órgãos;
- Avaliar em modelo animal de obesidade o efeito do consumo preventivo dos frutos liofilizado de *L. australis* sobre parâmetros de estresse oxidativo (dano oxidativo a lipídios e proteínas e atividade da enzima catalase).

3. METODOS

3.1 TIPO DE ESTUDO

Este estudo contou com a pesquisa experimental de desenvolvimento tecnológico. Como modelo animal de obesidade válido, foram utilizados camundongos com obesidade induzida por dieta hiperlipídica. Os mesmos apresentavam efeitos de obesidade também observados em seres humanos, como aumento de peso corporal correspondendo a validade de face, resistência à insulina e alteração no perfil lipídico correspondendo a validade de constructo e redução de peso corporal quando se é administrado a tratamentos farmacológicos como a sibutramina, que afeta o apetite, correspondendo a validade preditiva[189].

3.2 MATERIAIS

Reagentes: Para análises de caracterização química e processo extrativo foram utilizados Ácido Clorídrico P.M. 36,46 (Sigma Aldrich), Acetato de Sódio P.M. 82,03 (Synth), Ácido Galico P.M. 188,1 (Sigma), Folin & Ciocalteu's Phenols P.M. (Sigma – Aldrich), Cloreto de Sódio P.M. 58,44 (Veic), Álcool Etílico Absoluto P.A. ACS P.M. 46,07 (Êxodo Científica), Ácido Cítrico Anidro P.A. P.M. 192,13 (Synth), Ácido Fórmico 85% P.A. P.M. 46,03 (Dinâmica), Acetato de Etila P.A. P.M. 88,11 (Vetec), Ácido Acético Glacial P.A. ACS P.M. 60,05 (Fmaia). Para análise de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico - TBARS foram utilizados 1,1,3,3-tetrametoxipropano (Sigma-Aldrich) e ácido tricloroácetico 10% (Vetec). Para as análises de carbonil foram utilizados dinitrofenilhidrazina (Sigma-Aldrich), ácido tricloroácetico 20% (Vetec), dinitrofenilhidrazina (Sigma-Aldrich). Para análise das enzimas Superóxido dismutase – SOD foram utilizados adrenalina (Sigma-Aldrich) e glicina-NaOH (Synth).

Equipamentos: agitador magnético (752A, Fisatom), balança analítica (M214A, BEL engeening), banho-maria (DeLeo equipamentos laboratoriais), espectrofotômetro (NOVA1103, Novainstruments), espectrofotômetro (U2010, Hitachi), estufa de secagem (DeLeo), Freezer (F21, Eletrolux), homogeneizador potter (Marconi), leitor de microplaca (TP reader, Thermo Plate), medidor de pH (pHB500, ION),

microcentrífuga refrigerada (NT805, Novatecnica), osmose reversa (RO/0520, Permution), refrigerador (R270, Eletrolux), Vortex (Biomixer).

3.3 DELINEAMENTO DO ESTUDO

O estudo envolveu duas etapas que foram importantes no processo da pesquisa. A primeira etapa ocorreu a coleta, caracterização botânica dos frutos de *L. australis*, seguido de liofilização dos mesmos e a caracterização química dos FLLA. A segunda etapa consistiu em avaliar o efeito preventivo dos FLLA em modelo animal de obesidade, como demonstra a figura 12.

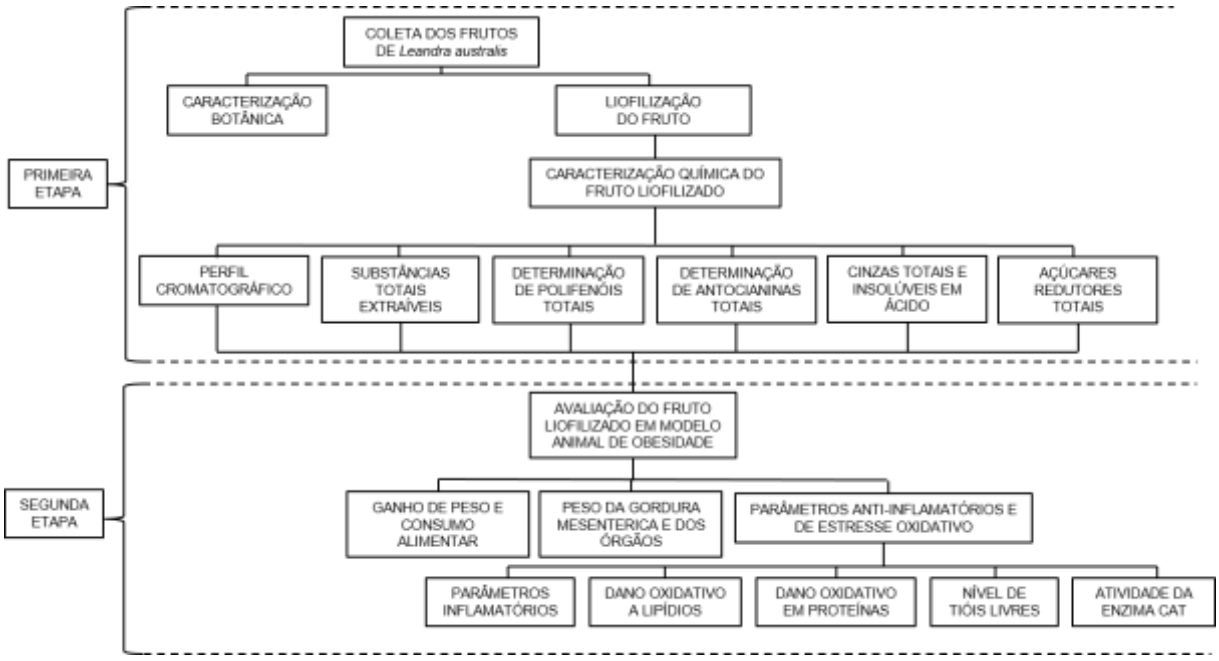


Figura 12 - Delineamento do estudo.

3.4 COLETA E CARACTERIZAÇÃO BOTÂNICA DA MATÉRIA PRIMA VEGETAL (MPV)

A espécie vegetal foi coletada na região de Orleans – Santa Catarina (28º16’36.5”S 49º13’08.6”W) e identificada pelo botânico da UNISUL Japser José Zanco e uma exsicata foi depositada no Herbário *Laelia purpurata* na UNISUL.

Os frutos foram coletados e imediatamente colocados sob refrigeração em isopor com gelo para posteriormente serem congelados a -20ºC.

3.4.1 LIOFILIZAÇÃO DOS FRUTOS

Os frutos da espécie *L. australis* congelados a temperatura inferior a -10ºC, foram levados ao liofilizador Enterprise I Terroni e mantidos sob pressão inferior a 120 µHg. A temperatura do condensador variou de – 43ºC a – 46ºC. Os frutos foram mantidos no liofilizador até tornarem-se quebradiços.

O teor de umidade dos frutos liofilizados foi realizado através do método gravimétrico[190], em que 0,2 g de fruto liofilizado e triturados de *L. australis* foram adicionados a cápsulas de porcelana previamente taradas e levados a estufa por 1 hora. Após este período, as cápsulas de porcelana foram colocadas em dessecador provido de sílica até resfriamento, para serem novamente pesadas e levadas novamente a estufa. Este procedimento foi realizado até que não houvesse diferença superior a 2% entre as pesagens. O teor de umidade foi calculado a partir da equação 1, onde MI= massa inicial da cápsula, MF= massa final da cápsula.

$$TU(\%) = \left(\frac{(MI-MF)\times 100}{MI}\right) - 100 \qquad \text{Eq. (01)}$$

O teor de umidade dos frutos *in natura* de *L. australis* foi realizado de acordo com a descrição acima, utilizado 50 g de fruto picado.

3.5 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA

3.5.1 Perfil cromatográfico

O perfil cromatográfico foi obtido em placas para HPTLC de vidro, cobertas com Sílica Gel 60, espessura da camada de 0,2 mm (Merck). Amostras dos frutos liofilizados e triturados foram previamente solubilizadas em etanol acidificado com 1 % de ácido cítrico por 2 horas e em seguida aplicadas na placa com auxílio de seringa CAMAG 100 µL utilizando um aplicador Linomat S. Como fase móvel foi utilizado uma mistura de ácido acético glacial: ácido fórmico: água purificada: acetato de etila (11:11:27:100)[191]. O desenvolvimento da placa ocorreu em tanque Camag ACD 2, sendo o mesmo saturado com a fase móvel durante 10 minutos. O comprimento total

do desenvolvimento da placa foi de 7 cm. Subsequente ao desenvolvimento, a placa passou por processo de secagem no mesmo tanque, em corrente de ar, durante 10 minutos e em capela de exaustão por mais 20 minutos.

Como revelador foi utilizado, primeiramente, reagente natural, que aumentam o pH da placa mudando a coloração dos compostos antociânicos e dos flavonóides. Após secagem do primeiro revelador, a placa de vidro foi colocada em contato com vapores de ácido clorídrico que diminuem o pH da placa de vidro fazendo com que os compostos antociânicos retornem a coloração inicial[105]. Uma segunda cromatografia foi realizada afim de identificação de flavonóides e ácidos fenólicos. para tal, foi utilizado como revelador o reagente natural, indicado para flavonoides[192].

3.5.2 Determinação de substâncias totais extraíveis nos FLLA

Para determinação de substâncias totais extraíveis (STE)[190] foi utilizado 0,5g de fruto liofilizado e triturado de *L. australis* e 20 mL de água, etanol ou etanol 80% acidificado com 1% de ácido cítrico como solvente extrator, mantidos sob agitação (260 rpm) por 24 horas. Após este período, as soluções preparadas foram filtradas. Alíquotas de 15 mL das soluções foram colocadas em cápsulas de porcelana devidamente taradas. As amostras ficaram em estufa a 100°C por 2 horas. Após resfriamento em dessecador provido de sílica, as cápsulas de porcelana foram pesadas e novamente colocadas em estufa por mais 1 hora. Este procedimento foi repetido até que não houvesse variação superior a 2% entre duas pesagens. As análises foram feitas em triplicata.

As STE, expressas em porcentagem, foram calculadas utilizando equação 2, onde MF= massa final da cápsula, MI= massa inicial da cápsula, VTE= volume total no momento da extração, VC= volume adicionado na cápsula e MPV = quantidade de matéria-prima vegetal adicionada no momento da extração.

$$STE(\%) = \frac{\left(\frac{(MF-MI)\times VTE}{VC}\right)\times 100}{MPV} \qquad \text{Eq. (02)}$$

3.5.3 Determinação de polifenóis totais nos FLLA

A determinação de polifenóis totais (PT) foi realizada de acordo com o método Folin-Ciocalteu descrito por Everette e colaboradores[193]. De acordo com o método citado, as soluções foram preparadas conforme descrito abaixo:

1 - Solução Diluição metanol: água (60: 40) (SD): 40 mL de água destilada foram transferidas para um balão volumétrico de 100 mL e completado o volume com metanol.

2 - Solução Folin-Ciocalteu 10%: 10 mL do reagente Folin-Ciocalteu foram transferidos para um balão volumétrico de 100 mL e completado o volume com água destilada.

3 - Solução Carbonato de Sódio 7,5%: 7,5 g de carbonato de sódio foram dissolvidos em um béquer com água destilada, transferidos para um balão volumétrico de 100 mL e completado o volume com água destilada.

4 - Solução-mãe Padrão a 0,1 mg/mL de ácido gálico: foi dissolvido imediatamente antes do uso 0,100 g de ácido gálico em balão volumétrico com 100 mL de solução de diluição metanol: água (60:40). Foi transferido 1 mL desta solução para um balão volumétrico de 10 mL, e completado o volume com solução de diluição metanol: água (60:40).

3.5.3.1 Preparo da curva analítica de ácido gálico

A quantificação do total de fenóis foi realizada através de uma curva padrão preparada com ácido gálico e expressa como equivalente de ácido gálico nas concentrações determinadas[193]. As soluções de ácido gálico para preparo da curva padrão foram preparadas conforme descrito abaixo:

- Solução a 0,0080 mg/mL: 0,040 mL da solução-mãe padrão a 0,1 mg/mL + 0,460 mL de água destilada, totalizando 0,500 mL.
- Solução a 0,0160 mg/mL: 0,080 mL da solução-mãe padrão a 0,1mg/mL + 0,420 mL de água destilada, totalizando 0,500 mL.
- Solução a 0,0240 mg/mL: 0,120 mL da solução-mãe padrão a 0,1mg/mL + 0,380 mL de água destilada, totalizando 0,500 mL.
- Solução a 0,0320 mg/ mL: 0,160 mL da solução-mãe padrão a 0,1 mg/mL + 0,340 mL de água destilada, totalizando 0,500 mL.

- Solução a 0,0400 mg/mL: 0,200 mL da solução-mãe padrão a 0,1 mg/mL + 0,300 mL de água destilada, totalizando 0,500 mL.
- Solução a 0,0500 mg/mL: 0,250 mL da solução – mãe padrão a 0,1 mg/mL de ácido gálico + 0,250 mL de água destilada, totalizando 0,500 mL.

Para reação com Folin-Ciocalteu, foram adicionados em eppendorf de 2,5 mL, 0,500 mL das soluções padrões de ácido gálico, 0,750 mL da solução de Folin-Ciocalteu 10% e 0,250 mL da solução de carbonato de sódio 7,5%, mantidos em banho termostatizado a 50°C por 10 minutos. A leitura da absorbância foi realizada utilizando espectrofotômetro de absorção UV-Visível (LGS 53) a 760 nm. Com os valores das absorbâncias e da concentração das soluções foi obtido uma reta de calibração. A partir da reta, foi possível determinar a equação da reta e o valor de coeficiente de correlação que foram utilizados nas análises de PT das amostras de *L. australis*.

3.5.3.2 Determinação de PT nos FLLA

Para a determinação dos PT foi utilizado 0,250 g de fruto liofilizado e triturado adicionados a 10 mL de etanol 80% acidificado com 1% de ácido cítrico, mantidos sob agitação (260 rpm) por 24 horas. Após este período a solução foi filtrada e diluídas em uma proporção de 1:96 (amostra pura: água). Para a reação com Folin-Ciocalteu[193] foram adicionados em eppendorf de 2,5 mL, 0,500 mL das amostras diluídas, 0,750 mL da solução Folin-Ciocalteu 10% e 0,250 mL da solução de carbonato de sódio 7,5%. Essa mistura mantida em banho termostatizado a 50ºC por 10 minutos. Imediatamente, após o aquecimento, foi realizada a leitura da absorbância a 760 nm através de um espectrofotômetro de Absorção UV-Visível (LGS 53). Com o branco foi utilizado 0,500 mL de água, 0,250 mL de solução a 10% de carbonato de sódio e 0,750 mL de solução a 10% de Folin-Ciocalteu. Os valores de absorbância foram aplicados na equação da reta produzida com ácido gálico e multiplicados pelo fator de diluição da amostra. O teor de PT foi expresso em miligrama de ácido gálico por grama de fruto. Todas as análises foram feitas em triplicata.

3.5.4 Determinação de antocianinas totais nos FLLA

A determinação antocianinas totais (AT) nos FLLA foi realizada de acordo método pH diferencial[106]. Pigmentos de antocianina podem sofrer transformações estruturais reversíveis com uma alteração no pH que se manifestam por diferentes espectros de absorção[82]. A coloração na forma oxonium (cátion positivo de oxigênio que possui três ligações) predomina a pH 1,0 e a forma de hemicetal incolor em pH 4,5. O método de pH diferencial baseia-se nesta reação e permite a medição precisa e rápida das AT, mesmo na presença de pigmentos degradados polimerizado e outros compostos interferentes.

3.5.4.1 Preparo das soluções tampão para quantificação de antocianinas por pH diferencial

As soluções tampão foram preparadas de acordo com Lee e colaboradores[106]. Para o tampão de pH 1,0 foi pesado cerca de 0,465 g de cloreto de potássio (KCl) em uma proveta e adicionado água de osmose reversa até cerca de 245 mL, e, em seguida 1,57 mL de HCl P.A. O pH foi medido e ajustado a 1,0 (± 0,05) com solução de HCl 0,1 M. A solução foi transferida para um balão volumétrico de 250 mL e diluída até o volume total do balão com água de osmose reversa.

Para o tampão de pH 4,5 foi pesado cerca de 13,6075 g acetato de sódio ($CH_3CO_2Na \cdot _3H_2O$) em uma proveta e adicionado água de osmose reversa até cerca de 240 mL. O pH foi medido e ajustado a 4,5 (± 0,05) com HCl 0,001 M. A solução foi transferida para um balão volumétrico de 250 mL e diluída até ao volume total do balão com água de osmose reversa.

3.5.4.2 Quantificação espectrofotométrica de antocianinas totais por pH diferencial

Para quantificação de AT, 0,250 g de FLLA, foram adicionados a 10 mL de etanol 80% acidificado com 1% de ácido cítrico e mantidos sob agitação (260 rpm) por 2 horas[82].

Quanto as amostras com pH 1,0, alíquota de 2 mL da solução dos frutos foram transferidos para balão volumétrico de 10 mL. O volume do balão foi completado com

solução tampão pH 1,0. Imediatamente, após a mistura, foi realizada a medida espectrofotométrica entre 360 e 800 nm.

Para as amostras com pH 4,5, 2 mL da solução dos frutos foram transferidos para balão volumétrico de 10 mL. O volume do balão foi completado com solução tampão pH 4,5. Logo após a mistura foi realizada a medida espectrofotométrica entre 360 e 800 nm.

A fim de não exceder a capacidade do tampão, a amostra não excedeu 20% do volume total. Por meio da equação 03, foi determinado a absorbância, onde $A_{\lambda vis-max}$ foi o pico de absorbância encontrada na faixa de 420 nm e A_{800} foi a absorbância encontrada na faixa de 800 nm.

$$A = (A_{\lambda \mathrm{vis-max}} - A_{800})pH1{,}0 - (A_{\lambda \mathrm{vis-max}} - A_{800})pH4{,}5 \qquad \text{Eq. (03)}$$

A concentração de AT foi de acordo com Giusti[105], determinada pela equação 04. Onde MW é o peso molecular (449,2), A é a absorbância (Eq. 3), FD é o fator de diluição, e ε é a absortividade molar (26,900). O MW e ε usada nesta fórmula correspondem à antocianina cianidina-3-glicosídeo. A equação apresentada abaixo assume um caminho óptico de 1 cm.

$$AT(mg/g) = \frac{MW \times A \times FD}{\varepsilon} \qquad \text{Eq. (04)}$$

3.5.5 Determinação de cinzas totais

Para a determinação das cinzas totais, que incluem cinzas fisiológicas e cinzas não fisiológicas[190], foi pesado 1 g de fruto liofilizado e triturado em cápsulas de porcelana previamente taradas. As cápsulas foram levadas a mufla sob temperatura de 600 ± 25ºC por 4 horas. Após resfriamento em dessecador provido de sílica, as cápsulas foram pesadas e levadas novamente a mufla por 30 minutos. Este procedimento foi realizado até que não houvesse variação superior a 1% entre as pesagens. A porcentagem de cinzas totais foi realizada em relação a massa inicial do fruto (1 g).

3.5.6 Determinação de cinzas insolúveis em ácido clorídrico

Para a determinação de cinzas insolúveis em ácido clorídrico, o resíduo obtido na determinação de cinzas totais foi fervido durante 5 minutos com 25 mL de ácido clorídrico a 7% em Becker coberto com vidro de relógio. Após este período, o vidro de relógio foi lavado com 5 mL de água quente, juntando a água de lavagem ao Becker. A solução foi filtrada com papel de filtro isento de cinza. O papel de filtro contendo o resíduo foi transferido para a cápsula de porcelana e levado a mufla a temperatura de 500ºC ± 25ºC até obtenção de peso constante. A porcentagem de cinzas insolúveis em ácido clorídrico foi calculada em relação ao fruto adicionado (1 g).

3.5.7 Teor de açúcar

O teor de açúcares redutores foi determinado através da metodologia de Mendonça e colaboradores[194] com modificações.

3.5.7.1 Preparo de Soluções

1- Solução padrão de glicose ou frutose a 10,0 g/L: Foi pesado em balança analítica 0,5 g de glicose, em seguida dissolvido em aproximadamente 20 mL de água destilada sob agitação constante, transferido para um balão volumétrico de 50 mL e o volume completado com água destilada e homogeneizado. Esta solução foi preparada e utilizada no dia da análise.

2- Reagente ácido dinitrossalicílico (DNS): Para o preparo do reagente DNS, inicialmente foi pesado 0,2245 g de ácido 3,5 dinitrossalicílico e 0,419 g de NaOH e dissolvido em 30 mL de água destilada. A solução foi agitada e armazenada em frasco âmbar em refrigerador.

3 - Solução de tartarato duplo de sódio e potássio: Foi pesado 1,51 g de tartarato duplo de sódio e potássio tetrahidratado ($KNaC_4H_4O_6.4H_2O$) e dissolvido em 100mL de água destilada. A solução foi armazenada em frasco âmbar em temperatura ambiente.

4 - Preparo dos FLLA (2 g/L): Alíquota de 0,05 g de FLLA foi adicionado em balão volumétrico de 25 mL e o volume foi completado com água destilada. A amostra diluída foi colocada em agitador magnético por 15 minutos a 200 rpm

centrifugada a 15.000 rpm por 15 minutos. Alíquota de 1,0 mL do sobrenadante foi utilizado no teste de DNS.

3.5.7.2 Curva de Calibração

A análise de açúcares redutores dos FLLA foi realizada através de uma curva padrão preparada com glicose. As soluções de glicose foram preparadas nas concentrações entre 1,0 g/L – 6,0 g/L a partir da solução padrão de glicose a 10,0 g/L e a absorbância das mesmas foi verificada a 540 nm. As concentrações das soluções de glicose (g/L) foram plotadas no eixo Y e a absorbância (ABS) das soluções no eixo X, e calculado a equação da reta.

3.5.7.3 Análise de açúcares redutores nos FLLA

Alíquota de 1,0 mL da amostra preparada no item foi transferida para tubo de ensaio e adicionado 1,0 mL do reagente DNS. A solução foi agitada e aquecida em banho maria a 100°C por 5 minutos. O tubo de ensaio foi resfriado em banho de gelo por 5 minutos. Após resfriamento, foi adicionado 16 mL da solução de tartarato duplo de sódio e potássio. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro a 540 nm, após zerar o aparelho com o branco. O branco consiste na substituição do volume de amostra ou solução de glicose por água destilada (1,0 mL). A partir da equação da reta, obtida na determinação da curva-padrão, foi calculado a concentração de açúcares redutores na amostra.

3.7 AVALIAÇÃO DO EFEITO DO CONSUMO DE FLLA EM MODELO ANIMAL DE OBESIDADE

3.7.1 Animais

Foram utilizados 60 camundongos Swiss machos (*Mus musculus*) com 28 dias de idade, pesando inicialmente em média 30 g. Os camundongos tiveram livre acesso à água e ração e foram mantidos em ciclos claro/escuro de 12 horas cada e temperatura de 23 ± 1°C.

3.7.2 Local de realização

O procedimento experimental foi realizado no Laboratório de Neurobiologia de Processos Inflamatórios e Metabólicos, Bloco da Saúde, UNISUL, Tubarão/SC.

3.7.3 Desenho experimental

Foi avaliado o efeito preventivo da administração dos FLLA em modelo animal de obesidade de acordo como delineamento apresentado na Figura 13. Camundongos Swiss machos (n= 40) foram recebidos no biotério com 28 dias de idade, dois dias antes do início do experimento para ambientação e minimização do estresse dos animais. Esses animais foram pesados e separados em 4 grupos: grupo controle não obeso – CGC (n= 10); grupo controle obeso – CGO (n=10); grupo fruto controle – FGC (750 mg/Kg) (n=10) e grupo fruto obeso – FGO (750 mg/Kg) (n=10). A administração diária de salina (grupo controle) e de FLLA (< 250 µm), equivalente a 2,34 mg/Kg de antocianinas, foi realizada através de gavagem.

A partir do quadragésimo dia, a dieta normolipídica dos grupos obesos (CGO e FGO) foi substituída por dieta hiperlípidica (*ad libitum*) por 56 dias para a indução da obesidade. A administração de salina e FLLA foram realizadas até o último dia de experimento[195–199], em que todos os animais tiveram livre acesso à água e ração (padrão ou hiperlipídica) durante o experimento.

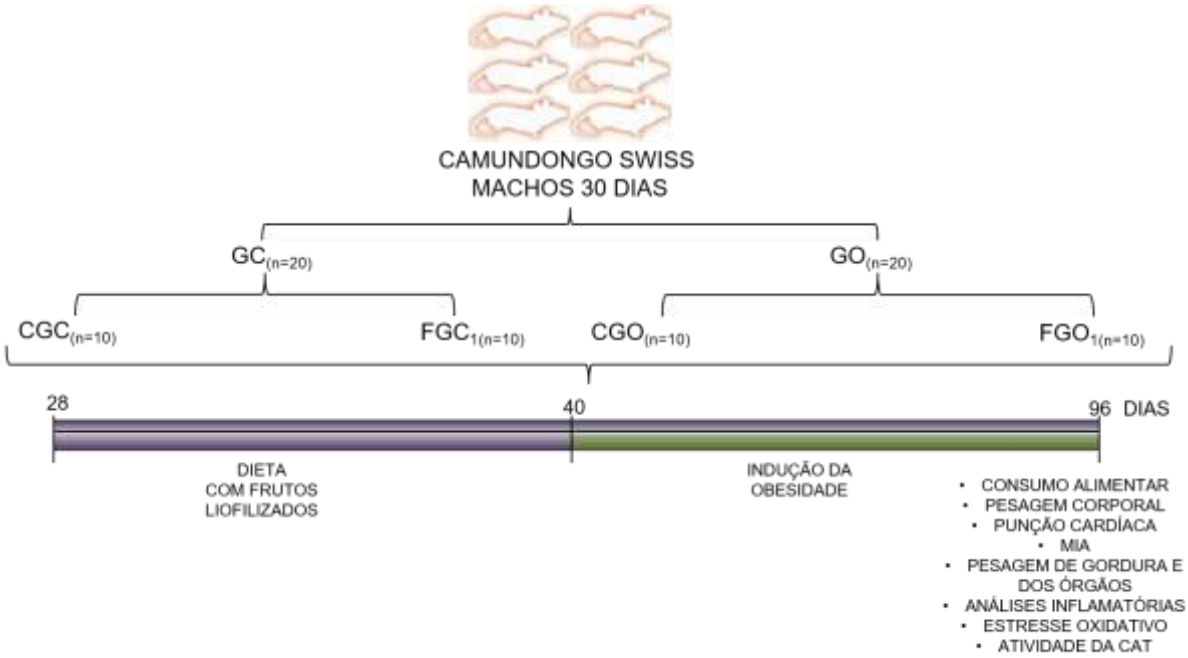


Figura 13 - Desenho experimental.

Legenda: GC: Grupo Controle não Obeso; GO: Grupo Controle Obeso; CGC: Grupo Controle Salina; FGC: Grupo Fruto Controle; CGO: Grupo Salina Obeso; FGC: Grupo Fruto Obeso.

As rações padrão e hiperlipídica dos animais foram adquiridas da mesma empresa especializada em desenvolvimento e produção de dietas padronizadas para experimentação animal (PragSoluções Biociências – PragSoluções Comércio e Serviços Ltda – ME), pois os ingredientes e a quantidade de micronutrientes da ração poderiam variar de uma marca para outra e isso poderia interferir nos resultados do estudo. A diferença entre as rações foi a adição de 60% de banha de porco na ração hiperlipídica, fonte de gordura saturada[200], utilizada para induzir obesidade.

As informações de macronutrientes e valor calórico dos ingredientes das rações estão descritas nos Quadros 6 e 7, valores estes baseados nos laudos fornecidos pelo fabricante e em estudos realizados por Cintra e colaboradores[197] e Razolli e colaboradores[196].

Quadro 5 - Composição e valor calórico das dietas utilizadas *Início*

Composição e valor calórico a cada 1000g (1kg) de ração				
	Ração controle		*Ração hiperlipídica*	
Ingredientes	*g/kg*	*Kcal/kg*	*g/kg*	*Kcal/kg*
Amido de milho	427,5	1710	115,5	462

Continuação

Caseína	200	800	200	800
Amido dextrinizado	100	400	100	400
Óleo de soja	40	360	40	360
Banha de porco	-	-	312	2808
Celulose	50	-	50	-
Mix de minerais	35	-	35	-
Mix de vitaminas	10	-	10	-
L-Cistina	3	-	3	-
Bitartarato de colina	2,5	-	2,5	-
Butil hidroxitolueno (BHT)	0,028	-	0,028	-
Total	**1000,028**	**3798**	**1000,028**	**5358**

Fonte: Adaptado de Cintra e colaboradores e Razolli e colaboradores[196,197]

Quadro 6 - Percentual de macronutrientes das dietas utilizadas.

Percentual de macronutrientes		
	Ração controle (%)	*Ração hiperlipidica (%)*
Carboidratos	69	26
Proteínas	21	15
Lipídios	10	59

Fonte: adaptado de Cintra e colaboradores e Razolli e colaboradores[196,197]

3.7.4 Consumo alimentar

O consumo alimentar foi verificado a cada dois dias e calculado por meio da diferença entre a ração ofertada e as sobras[201]. Essa avaliação foi realizada durante todo o experimento para acompanhar a aceitação da dieta hiperlipídica. Sendo assim, foi possível detectar alterações e influências ambientais, bem como acompanhar a relação com a evolução do peso. O consumo alimentar médio diário foi expresso em kcal e kcal/g.

3.7.5 Peso corporal

O peso corporal dos animais foi calculado semanalmente onde foram avaliadas as diferenças estatísticas significativas entre os grupos. Estes dados foram importantes para a verificação do efeito preventivo dos frutos liofilizados da espécie *L. australis* em relação a indução da obesidade. O peso corporal dos animais foi expresso em grama (g) e o guanho de peso dos mesmos foi expresso em porcentagem (%).

3.7.6 Procedimento de Morte Indolor Assistida

No dia do procedimento de morte indolor assistida (MIA) os animais foram pesados e anestesiados com xilasia e ketamina para a realização da punção cardíaca do sangue. Após a punção foi realizado a decapitação. O procedimento foi realizado por médico veterinário responsável pelo biotério na UNISUL, campus de Tubarão.

3.7.7 Retirada de estruturas

3.7.8 Posterior ao procedimento de MIA, a cavidade abdominal foi aberta e a gordura visceral foi retirada de acordo com os métodos de Johnson e Hirsch[202]. O tecido adiposo das regiões mesentérica, epididimal e retroperitoneal foram pesados em balança de alta precisão e os valores somados corresponderam a quantidade de gordura visceral (g)[203]. O hipotálamo, estomago, coração, pulmão, fígado, rim e baço também foram dissecados, pesados e armazenados a – 80°C para serem utilizadas nas análises de parâmetros inflamatórios e estresse oxidativo. **Determinação de parâmetros de estresse oxidativo e inflamatórios**

Os parâmetros de estresse oxidativo e inflamatórios foram realizados no Laboratório de Neurociência Experimental - LANEX, da UNISUL – Pedra Branca - Palhoça.

3.7.8.1 Dano oxidativo em lipídeos

O dano oxidativo em lipídeos foi avaliado de acordo com os métodos de Draper e Hadley[204205] através da formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS do inglês – *Thiobarbituric acid reactive substances*). Para tal, foram utilizadas amostras de fígado e gordura mesentérica dos camundongos submetidos a modelo animal de obesidade. As amostras foram misturadas com 1 mL de ácido tricloroacético 10% e 1 mL de ácido tiobarbitúrico 0,67 %. Posteriormente, foram aquecidas em banho de água fervente (100ºC) durante 30 minutos. Os equivalentes de malondialdeído foram determinados pela absorbância em 532 nm, utilizando-se 1,1,3,3-tetrametoxipropano como padrão externo. Os resultados foram expressos em nmol / mg de proteína.

3.7.8.2 Dano oxidativo em proteínas

O dano oxidativo em proteínas teciduais foi determinado pela medida de grupos carbonil conforme descrito por Levine e colaboradores[206]. Para tal, foram utilizadas amostras de fígado e gordura mesentérica dos camundongos submetidos a modelo animal de obesidade. As amostras foram precipitadas em adição de ácido tricloroacético 20% e as proteínas foram dissolvidas com dinitrofenilidrazina (DNPH). O conteúdo dos grupamentos carbonil foi medido pela absorbância em 370 nm através do espectrofotômetro. Os resultados foram expressos em nmol/mg de proteína.

3.7.8.3 Concentração de tióis livres

A concentração de tióis livres foi determinada através do método de Puhl e colaboradores[207]. Para tal, foram utilizadas amostras de fígado e gordura mesentérica dos camundongos submetidos a modelo animal de obesidade. As amostras foram precipitadas com TCA a 10%, centrifugado, e o sobrenadante foi adicionada a DTNB (5,599 -ditiobis-2- nitrobenzóico - 1,7 M) e Tampão Tris-HCl (30 mM, contendo ácido etilenodiamino tetra-acético ácido-3 mM de EDTA, pH 8,9). Os resultados foram expressos em Tiol (e = 1.4156104M21cm21) em nmol/mg de proteína. Os resultados foram expressos em nmol/mg de proteína.

3.7.8.4 Dosagens de Proteínas

As proteínas foram determinadas pelo método de Lowry[208] e a albumina sérica bovina foi utilizada como padrão.

3.7.8.5 Atividade da enzima antioxidante Catalase

A determinação da atividade da enzima antioxidante Catalase (CAT) foi realizada através da mensuração da taxa de decaimento da absorbância do H_2O_2 em 240nm. Para tal, foram utilizadas amostras de gordura mesentérica dos camundongos submetidos a modelo animal de obesidade. De acordo com Aebi[209] a técnica baseia-se na homogeneização dos tecidos em tampão fosfato (pH 7,4) e centrifugação durante 10 minutos. Na sequência, a um meio de reação é adicionado uma alíquota de amostra e 1mL de substrato contendo H_2O_2 e tampão fosfato. Os resultados foram expressos em µm/mg de proteína.

3.7.8.6 Parâmetros de inflamação

Como parâmetros de inflamação foram avaliados os níveis de IL-1β lL-6, e IL-10, no hipotálamo e no baço, através da técnica de imunoadsorção ligado a enzima (ELISA do inglês – *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) em leitor de microplacas com a utilização de kit comercial, conforme as recomendações do fabricante. Os resultados foram expressos em picogramas por mililitro (pg/mL).

3.8 VARIÁVEIS

Quadro 7 – Classificação das variáveis. *Início*

VARIÁVEL	TIPO	NATUREZA	UNIDADE
Concentração de Polifenóis totais	Dependente	Quantitativa Contínua	mg/g
Concentração de antocianinas	Dependente	Quantitativa Contínua	mg/g
Concentração de cinzas totais	Dependente	Quantitativa Contínua	%
Concentração de cinzas insolúveis HCl	Dependente	Quantitativa Contínua	%
Concentração de açúcares redutores	Dependente	Quantitativa Contínua	%
Peso	Dependente	Quantitativa Contínua	mg/g

Continuação

Consumo de alimentos	Dependente	Quantitativa Contínua	g/dia
Níveis de IL-1β	Dependente	Quantitativa Contínua	pg/mL
Níveis de IL-6	Dependente	Quantitativa Contínua	pg/mL
Níveis de IL-10	Dependente	Quantitativa Contínua	pg/mL
Dano oxidativo em lipídeos	Dependente	Quantitativa Contínua	pg/mL
Dano oxidativo em proteína	Dependente	Quantitativa Contínua	U/mg
Atividade da enzima antioxidante Catalase	Dependente	Quantitativa Contínua	U/mg
Níveis de tióis		Quantitativa Contínua	

3.9 ANÁLISE DE DADOS

Nas duas fases do estudo, as análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa *Statistical Package for Social Science* - SPSS 21, através da análise descritiva, análise de variância multifatorial (ANOVA) seguido pelo *post hoc* de Tukey. Os resultados foram apresentados em média ± desvio padrão e a significância estatística será considerada para valores de $p < 0,05$.

3.10 ASPECTOS ÉTICOS

O estudo foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade do Sul de Santa Catarina. A utilização dos animais seguiu a Diretriz Brasileira Para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica (DBCA), publicada em 2016, pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), conforme o Registro 16.044.4.01.

4. RESULTADO E DISCUSSÃO

4.1 CARACTERIZAÇÃO BOTÂNICA DA ESPÉCIE *L. australis*

Fotos da exsicata depositada no herbário assim como das amostras de *L. australis*, coletadas na região de Orleans/SC estão apresentadas na figura 14 e 15 respectivamente.

Figura 14 - Exsicata da espécie *L. australis*.

A espécie coletada foi identificada e confirmada como sendo a espécie *L. australis* e um exemplar com número SRS 773 depositado no Herbário *Laelia purpurata* da UNISUL – Pedra Branca / SC.

Nativa não endêmica do Brasil, a *L. australis* é encontrada nas regiões Sudeste (Minas Gerais, Espírito Santo, São Paulo e Rio de Janeiro) e Sul (Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul)[171]. Habita frequentemente sub-bosques de florestas maduras, geralmente em orla de matas e capoeiras[154]. O período de florescimento desta espécie é de outubro a março, frutificando entre janeiro e abril. A espécie *L. australis* é considerada como apomítica, processo adotado por algumas espécies que

desenvolvem, a partir do tecido que circunda o saco embrionário, gemas que originam suas sementes sem fertilização floral, ou seja, assexuadamente[210].

Figura 15: Espécie vegetal *L. australis*. A: Arbusto, B parte de cima da Folha; C: parte de baixo da Folha, D: Ramos, E: Inflorescência, F: Fruto.

A *L. australis* é um arbusto pequeno (Figura 15 A), medindo entre 0,5 a 3 metros de altura. Os ramos desta espécie (Figura 15 D) são cilíndricos, com cobertura repleta de pelos grossos, possuindo tricomas estrelados medindo entre 3 a 4,5 mm[24]. Suas folhas possuem base oval e ápice aguda (Figura 15 B) com uma coloração verde escura e nervura basal ou curtamente suprabasal (Figura 15 C). Possuem pecíolos com comprimento entre 0,8 a 2,4 cm, lâmina entre 6,5 a 10,5 X 3,0 a 6,0 cm, com forma e consistência de membrana. As margens são denticuladas, com base obtusa, com 5 nervuras ou 5 + 2 basais a curtamente suprabasais[24]. A face das folhas é

adaxial (com indumento estrigoso, moderado a denso e tricomas medindo entre 2,0 a 3,3 mm) e abaxial (com indumento pubescente, esparso a moderado e tricomas medindo entre 1,5 a 2,0 mm, estrelado e moderadamente denso)[24].

As inflorescências da *L. australis* (Figura 15 E) possuem indumento vermelho escuro a negro, e flores com corola alva e estames amarelos. O hipanto das flores (receptáculo tubular) mede entre 3,5 a 4,3 X 2,0 a 3,0 mm, com formato campanulado e indumento provido de pelos grossos, moderado e espalhado. O cálice com tubo mede entre 0,3 a 0,5 mm com lacínias internas, medindo entre 1,0 a 1,5 mm, com formato triangular e ápice agudo e lacínias externas medindo entre 2,3 a 3,0 mm, com formato linear e ápice aristado[24]. As pétalas medem entre 3,3 a 4,3 X 1,0 a 1,4 mm, com estame (órgão masculino) espessado, apendiculado com conectivo medindo 2,5 a 3,8 mm e antera com comprimento de 2,5 a 3,8 mm com coloração amarela[24]. O ovário das flores mede entre 1,8 a 2,6 X 1,3 a 1,7 mm, com 3 lóculos, com ápice desprovido de pelos e estilete (prolongamento do ovário) medindo entre 7,0 a 10,0 mm, com ausência de pelos. As panículas medem de 10,5 a 16,5 X 4,5 a 8,5 cm com brácteas (porção distal) entre 2,0 a 4,3 X 0,6 a 1,0 mm (lineares a lanceoladas e ápice aristado) e bractéolas medindo entre 0,8 a 1,5 X 0,4 a 0,6 mm (oblongas a lanceoladas e ápice aristado)[24]. Os frutos da *L. australis* (Figura 15 F) são do tipo *berry*, pequenos e suculentos, do tipo bacídio e polispérmicos, medindo entre 5,0 a 6,0 X 4,0 a 4,5 mm e possuem entre 150 a 300 sementes, medindo entre 1,0 a 1,2 X 0,5 a 0,7 mm, com formato piramidal a reniformes[24] e quando maduros possuem coloração roxo escuro (Figura 15 F).

4.2 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DOS FLLA

4.2.1 Liofilização dos frutos de *L. australis*

O alto teor de umidade nas frutas pode causar deterioração rápida após a colheita. A liofilização é um método recomendado para frutas e vegetais que contenham componentes antioxidantes sensíveis ao calor, tais como tocoferóis, ácido ascórbico, carotenóides e antocianinas[211]. Esta técnica é utilizada também, para melhorar a estabilidade dos frutos, diminuindo a atividade da água e atividade microbiológica para minimizar as reações físicas e químicas que podem ocorrer durante o armazenamento[212].

A liofilização envolve o congelamento dos frutos e vácuo sob pressão reduzida fazendo com que os cristais de gelo sublimem rapidamente, transformando-se em vapor de água, sem alterar as propriedades nutricionais[213]. Este processo remove a água mais eficientemente do que outros tipos de secagem sem alterar a estrutura do material[212].

De acordo com Gava e colaboradores[214], as propriedades químicas e sensoriais praticamente não são alteradas, pois esse processo é realizado à baixa temperatura e na ausência de ar atmosférico, e quando reconstituído ou reidratado, assemelha-se teoricamente ao produto natural. Na tabela 1 estão apresentadas o teor de umidade do fruto da espécie *L. australis in natura* e após liofilização.

Tabela 1: Teor de umidade nos frutos de *L. australis.*

FRUTO	**%**
In natura	85,29 ± 1,12
Liofilizado	12,75 ± 0,13

O teor de umidade encontrado para o fruto *in natura* de *L. australis* foi de 85,29%*,* valor semelhante ao encontrado em frutos como a pitanga (85,06%)[215], blackberry (amora) (84,13 - 87,92%)[175,180], blueberry (mirtilo) (87,70%)[175,176], raspberry (framboesa) (88,60%)[175], açaí (85,36%)[176], morango (92,68%)[175], cereja (86,43%)[175] e cranberry (oxicoco) (68,37%)[178].

Após o processo de liofilização os frutos de *L. australis* apresentaram teor de umidade (Tabela 1) equivalente a 12,75%. Este valor é semelhante com o teor de umidade de outros estudos com frutos liofilizados considerados *berries*, como o blueberry 11,25%[176], açaí 18,77%[216] e jabuticaba 15,33%[217].

Frutos de coloração roxa como a espécie *L. australis*, em geral, são ricos em antocianinas[218,219]. Entre as principais existentes, em grande parte dos frutos, se encontram as cianidinas, sendo a cianidinas-3-O-glicosideo (CYN-3-GLU) a mais comum[218–220]. Na figura 16 é apresentado a cromatografia em camada delgada (CCD) do FLLA e do padrão de antocianina CYN-3-GLU*.*

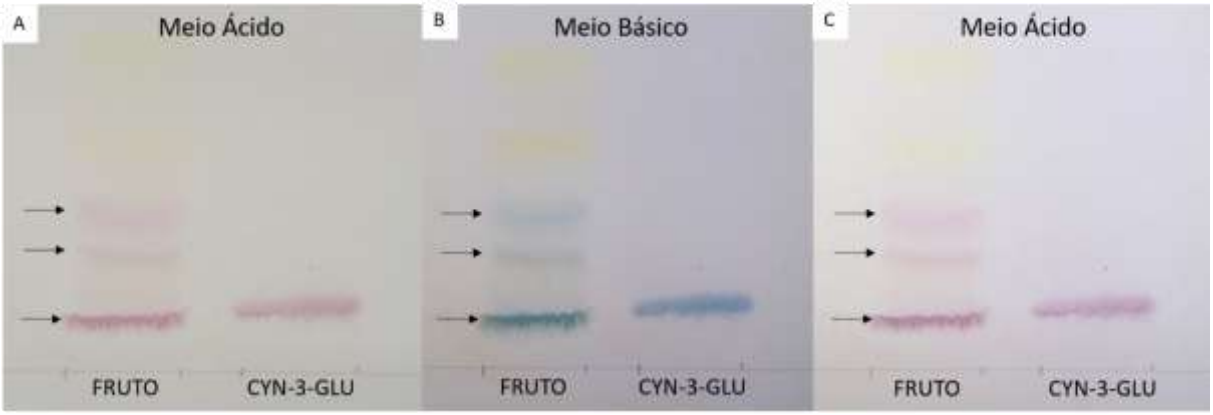


Figura 16: Perfil cromatográfico de FLLA para antocianinas: (A) sem revelador, (B) revelador reagente natural e (C) ácido clorídrico 38%. (Setas indicam as bandas de antocianinas). Legenda: CYN-3-GLU: cianidina – 3 – glicosídeo.

Ao fim da passagem da fase móvel pela placa de CCD, as antocianinas aparecem com coloração rosa (Figura 16 A). As antocianinas podem apresentar-se em diversas colorações de acordo com o pH do meio em que se encontram, da sua concentração, temperatura de armazenamento assim como da presença de oxigênio, luz e co-pigmentação[221].

Quando em meios básicos, como o reagente natural utilizado na revelação da placa (Figura 16 B), as antocianinas alteram sua coloração de rosa para azul. Quando estes compostos entram em contato com meios ácidos, como vapores de ácido clorídrico 38% (Figura 16 C), a presença de grupos metoxila no lugar de hidroxila, reverte a coloração azulada das antocianinas para a original[222]. Desta forma é possível comprovar a presença de antocianinas no FLLA.

Através da figura 16 é possível observar que a antocianina de coloração mais intensa foi identificada como sendo a CYN-3-GLU e através da intensidade da coloração, esta seja, provavelmente, a antocianina majoritária. Outras duas antocianinas, de coloração menos intensa, também foram observadas, porém, ainda não foram identificadas. Wu e Prior[220] também avaliaram as antocianinas presentes em *berries* liofilizados como framboesa preta, amora, blueberry, uva, cranberry, marionberry, framboesa, uva vermelha, morango e cereja doce por HPLC-MS/MS e concluíram que CYN-3-GLU foi encontrada em todas as amostras analisadas.

Uma segunda CCD foi realizada (Figura 17) a fim de identificar outros compostos existentes nos FLLA. Para tal, foram utilizados os padrões rutina, catequina, epicatequina e quercetina e ácido gálico.

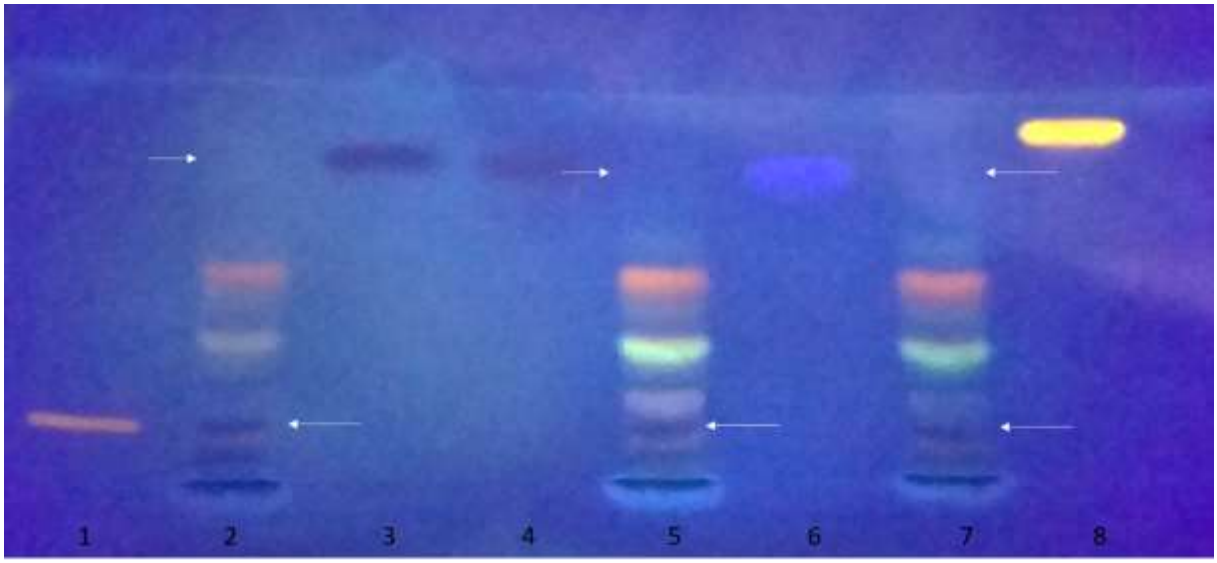


Figura 17. Perfil cromatográfico para flavonoides e ácidos fenólicos. Sendo (1) rutina, (2) fruto liofilizado, (3) catequina, (4) epicatequina, (5) fruto liofilizado, (6) ácido gálico, (7) fruto liofilizado e (8) quercetina.

Conforme a figura 17 é possível observar a presença de uma variedade de compostos, e dentre os padrões utilizados, não foi identificado a presença de catequina, epicatequina e quercetina nos FLLA. Entretanto, foram identificados rutina e ácido gálico, porém a qualidade na captação da imagem e provavelmente da reduzida concentração de rutina e ácido gálico não fica evidente na figura 17.

Como um flavonol glicosídico, a rutina pertence a uma importante classe dos flavonoides, sendo extensamente encontrados na natureza e possui efeitos antidiabéticos[182], anti-inflamatórios[223] e antioxidante[224]. Também é encontrada em frutas como uva[184], jabuticaba[181] e *blueberry*[177]. Já o ácido gálico, pertencente a classe dos ácidos benzoicos[225], possui propriedades antineoplásicas, bacteriostáticas, antimelanogênica e antioxidantes[226] e é comumente encontrado em frutos roxos, como uva[185], Goji berry[227], morango[188], açaí[187] e mirtilo[228].

Na tabela 2 estão apresentados o teor de Substâncias totais extraíveis, Polifenóis Totais, Antocianinas totais, Cinzas Totais, Cinzas insolúveis em Ácido Clorídrico e Teor de Açúcar dos frutos liofilizados de *L. australis*.

Tabela 2: Substâncias totais extraíveis a partir dos FLLA.

		FLLA
STE (% ± dp)	ETH	43,3 ± 0,1[a]
	H_2O	47,3 ± 0,7[b]
	ETH80AC	34,4 ± 0,7[c]
PT (mg/g ± dp)		44,2 ± 2,6
AT (mg/g ± dp)		3,12 ± 0,7
CT (% ± dp)		3,3 ± 0,3
CIA (% ± dp)		0,4 ± 0,08
TA (% ± dp)		33 ± 0,02

Legenda: FLLA: Fruto liofilizado de *L. australis*, STE: Substâncias Totais Extraíveis, ETH: Etanol, H_2O: Água, ETH80AC: Etanol 80% acidificado com 1% de ácido cítrico, PT: polifenóis totais, AT: Antocianinas totais, CT: Cinzas Totais, CIA: Cinzas Insolúveis em Ácido Clorídrico e TA: teor de açúcar. Letras diferentes diferem estatisticamente entre si.

Para verificar a concentração de STE dos FLLA, foram utilizados os solventes etanol 99%, água e etanol 80% acidificado com 1% de ácido cítrico. Este último solvente foi selecionado devido a sua propriedade de aumentar a estabilidade das antocianinas[82].

O solvente utilizado influenciou diretamente no conteúdo final da extração. A utilização de água proporcionou maior percentual de STE do fruto liofilizado enquanto o etanol acidificado foi o que menor quantidade extraiu.

Os frutos liofilizados possuem elevadas concentrações de açúcares, os quais apresentam elevada solubilidade em água, fato que pode justificar a maior extração ocorrida com este solvente[229]. Entretanto, a redução do pH ocasionada pela adição de ácido cítrico no etanol 80% promoveu uma significativa redução de STE que pode ser atribuída a modificação do grau de ionização de componentes químicos existentes nos frutos, como por exemplo os ácidos fenólicos assim como ácido ascórbico os quais apresentam menor solubilidade em pH reduzidos[230].

A quantificação do teor de polifenóis em alimentos agrega conhecimento científico sobre a composição nutricional dos mesmos e seus benefícios na prevenção de doenças. As ações fisiológicas exercidas pelos polifenóis já foram relacionadas à prevenção de doenças cardiovasculares, neurodegenerativas, câncer, entre outras, principalmente em função da elevada capacidade antioxidante[231]. O FLLA apresentou 44,2 mg/g de PT (Tabela 2), valor superior ao crambrerry (22,5 mg/g)[179], jabuticaba

(31,6 mg/g)[182], framboesa (34,33mg/g)[186] e inferior a uva (65,48 mg/g)[186], blueberry (65,52 mg/g)[176], amora (76,63mg/g)[186] e frutos do sabugueiro (92,90 mg/g)[186].

Um dos principais polifenóis existentes em frutos são as antocianinas[79]. Estas apresentam grande importância na dieta humana, podendo ser consideradas como agentes terapêuticos, por possuírem efeito antioxidante [17,18] e anti-inflamatório[19]. Os valores de AT, equivalentes a CYN-3-GLU, foram de 3,12 mg/g de FLLA (Tabela 2). Outros estudos realizados com frutos roxos liofilizados relatam concentrações de AT inferiores ao encontrado para os FLLA, como para a framboesa 0,82 mg/g[186] e também valores superiores como para o cranberry 4.1 mg/g[179], fruto do sabugueiro 11,73 mg/g[186], amora 12,93 mg/g[186] e blueberry 13,48 mg/ g[176].

A determinação de cinzas totais e cinzas insolúveis em ácido clorídrico verifica a quantidade de resíduo mineral presente no fruto[232], ou seja, maiores teores de cinzas retratam maiores teores de cálcio, magnésio, ferro, fósforo, sódio e outros componentes minerais nos frutos[233]. Indicam também, as impurezas inorgânicas não-voláteis que podem estar presentes como contaminantes[190]. Os FLLA apresentaram teor de cinzas totais e cinzas insolúveis em ácido clorídrico de 3,3% e de 0,4%, respectivamente, valor superior ao *Saskatoon berry* liofilizados que apresentam teores de cinzas totais em torno de 1,80% [176] e 1,11% [234] respectivamente inferior a jabuticaba, que apresentam teores de cinzas totais entre de 3,52% [217] e 4,4% [235].

Os açúcares são componentes solúveis abundantes em *berries*, especialmente glicose e frutose[176]. Como esses monossacarídeos são açúcares redutores, os valores de açúcares totais e de redução são semelhantes[217]. Os teor de açúcares redutores nos FLLA foi de 33 % (Tabela 2), valor inferior ao encontrado para a jabuticaba (49,46%)[217] e blueberry (70,65 – 63,08%)[176] liofilizados. O valor correspondente para o fruto *in natura* de *L. australis* é de 4,95 g / 100 g, inferior ao quantificado para berries produzidos no Brasil como blackberry (10,81 g / 100 g)[175], red raspberry (framboesa vermelha) (9,88 g / 100 g)[175], strawberry (morango) (6,30 g / 100 g)[175], blueberry (11,54 g / 100 g)[175] e cherry (cereja) (11,94 g / 100 g)[175]. O consumo frequente de frutos como a *L. australis* pode vir a ser um hábito extremamente saudável, por possuírem vários compostos bioativos, como polifenóis, principalmente as antocianinas, assim como baixo teor de açúcar. Contudo, o baixo teor de açúcar diminui a palatabilidade dos mesmos, fato que pode diminuir o

consumo, além do que, na produção caseira de geleias e sucos, será necessário a adição de açúcar.

4.3 AVALIAÇÃO DA ADMINISTRAÇÃO DO FLLA EM MODELO ANIMAL DE OBESIDADE

Neste estudo foi avaliado a administração de 750 mg/Kg de FLLA sobre o peso corporal, ganho de peso, consumo alimentar, peso da gordura visceral, peso dos órgãos fígado, rim, baço, estomago, coração e pulmão, dano a lipídios e proteínas e atividade da enzima CAT e parâmetros inflamatórios, em camundongos submetidos a modelo de obesidade induzida por dieta hiperlipídica. Na figura 18 é apresentado o peso corpóreo (Figura 18 A), ganho de peso (Figura 18 B) e o consumo alimentar semanal em kcal (Figura 18 C) e kcal/g (Figura 18 D) dos animais submetidos a modelo de obesidade.

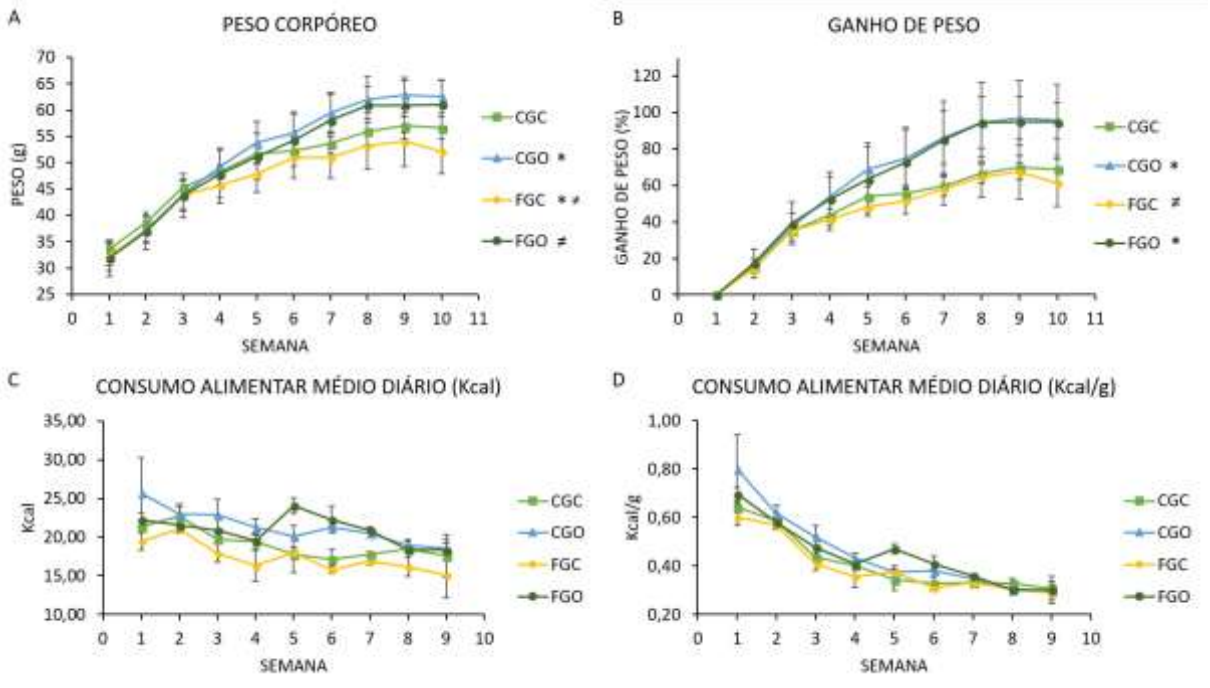


Figura 18: Efeito da administração de FLLA no peso corpóreo (A), ganho de peso (B), consumo alimentar médio diário por semana em Kcal (C) e em Kcal/g (D) de camundongos submetidos a modelo de obesidade. Valores expressos em média ± desvio padrão, (n = 10). * *versus* Salina Controle e ≠ *versus* Salina Obeso; $p < 0,05$. (ANOVA de uma via,

seguido pelo teste de Tukey). Legenda: CGC: Controle Grupo Controle, CGO: Controle Grupo Obeso, FGC: Fruto Grupo Controle, FGO: Fruto Grupo Obeso.

Os resultados relacionados com peso corpóreo (Figura 18 A) e ganho de peso (Figura 18 B) demonstraram que os grupos com dieta hiperlípidica tiveram aumento de peso quando comparados com animais de dieta normolipídica. Este fato comprova a indução da obesidade e valida o método utilizado. Com isso, a administração de 750 mg/kg FLLA (equivalentes a 33,15 mg/kg de polifenóis e 2,34 mg/kg de antocianina) não proporcionou redução destes parâmetros em nenhum grupo tratado. Em relação ao consumo alimentar, os resultados demonstraram que a administração preventiva de FLLA não influenciou estatisticamente na quantidade de kcal e kcal/g ingerida pelos animais em todo o estudo.

Alguns estudos relatam que administração de antocianinas purificadas desempenham um papel importante na redução de peso de animais submetidos a modelo de obesidade[236,237]. Entretanto, em outros estudos, o consumo de frutos liofilizados como fonte de antocianinas adicionados à dieta rica em gordura também não promoveu efeitos sobre ganho de peso e gordura corporal em modelos animais[236,238]. Este diferente comportamento pode ser explicado devido a presença de outros compostos nos frutos que podem retardar ou impedir a absorção destas[236], ou ainda pela dosagem de antocianina administrada no presente estudo (2,34 mg/g de antocianina), concentração muito inferior do que a utilizada em estudos com antocianinas puras que foram utilizadas doses de 10 g/kg de antocianina[237].

O peso da gordura visceral (epididimal, retroperitoneal e mesentérica) também pode ser utilizado como indicador de obesidade[137]. Na figura 19 é apresentado o efeito da administração do fruto sobre o peso das gorduras epididimal (Figura 19 A), retroperitoneal (Figura 19 B), mesentérica (Figura 19 C) e total (Figura 19 D) de camundongos submetidos a modelo de obesidade.

Observa-se na figura 19 que não houve diferenças estatísticas entre os grupos para os pesos de gordura epididimal (Figura 19 A), gordura retroperitoneal (Figura 19 B) e gordura total (Figura 19 D). Porém, ao avaliar a gordura mesentérica dos animais (Figura 19 C), pode-se observar que os grupos alimentados com dieta hiperlipídica obtiveram peso superior ao grupo alimentado com dieta normolipídica (grupo controle). Entretanto, a administração preventiva de 750mg/Kg de FLLA na dieta dos

grupos não foi suficiente para reverter, estatisticamente o conteúdo de gordura mesentérica.

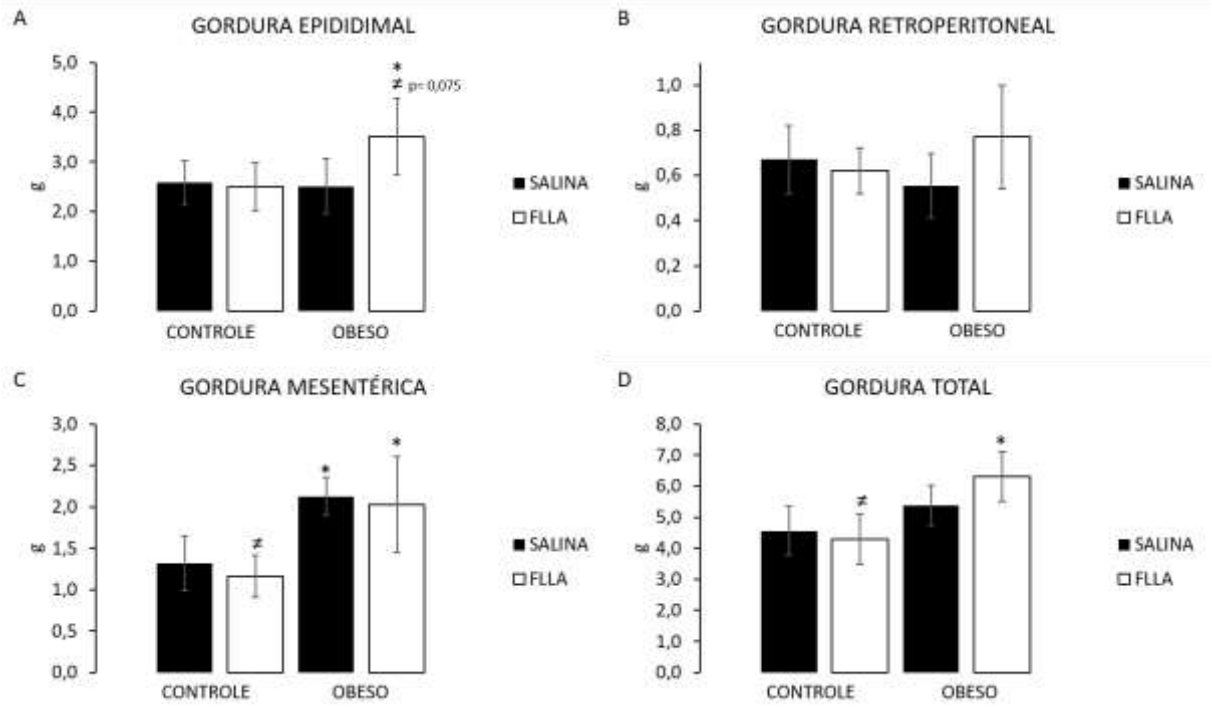


Figura 19: Efeito da administração do FLLA sob as gorduras epididimal (A), retroperitoneal (B), mesentérica (C) e total (D) de camundongos submetidos a modelo de obesidade. Valores expressos em média ± desvio padrão, (n = 10). * *versus* Salina Controle e ≠ *versus* Salina Obeso; p < 0,05. (ANOVA de uma via, seguido pelo teste de Tukey). Legenda: FLLA: Fruto Liofilizado de *L. australis*.

O acúmulo de gordura[183] na obesidade pode ocorrer em tecidos como o coração[239], pulmão[240] e estômago[240] prejudicando a função normal desses órgãos. Alguns estudos correlacionam a utilização de frutas com alto teor em flavonóides e antocianinas, como cranberry e a jabuticaba, com um melhor funcionamento destes órgãos por possuírem atividades anti-inflamatórias e antioxidantes[239–242]. O resultado do efeito do consumo de FLLA sobre o peso do coração, pulmão e estômago também foram avaliados e os resultados estão apresentados na figura 20.

A obesidade induzida por dieta hiperlipídica não ocasionou aumento de peso nestes órgãos, assim como os FLLA, também não produziram alterações quantificáveis gravimetricamente.

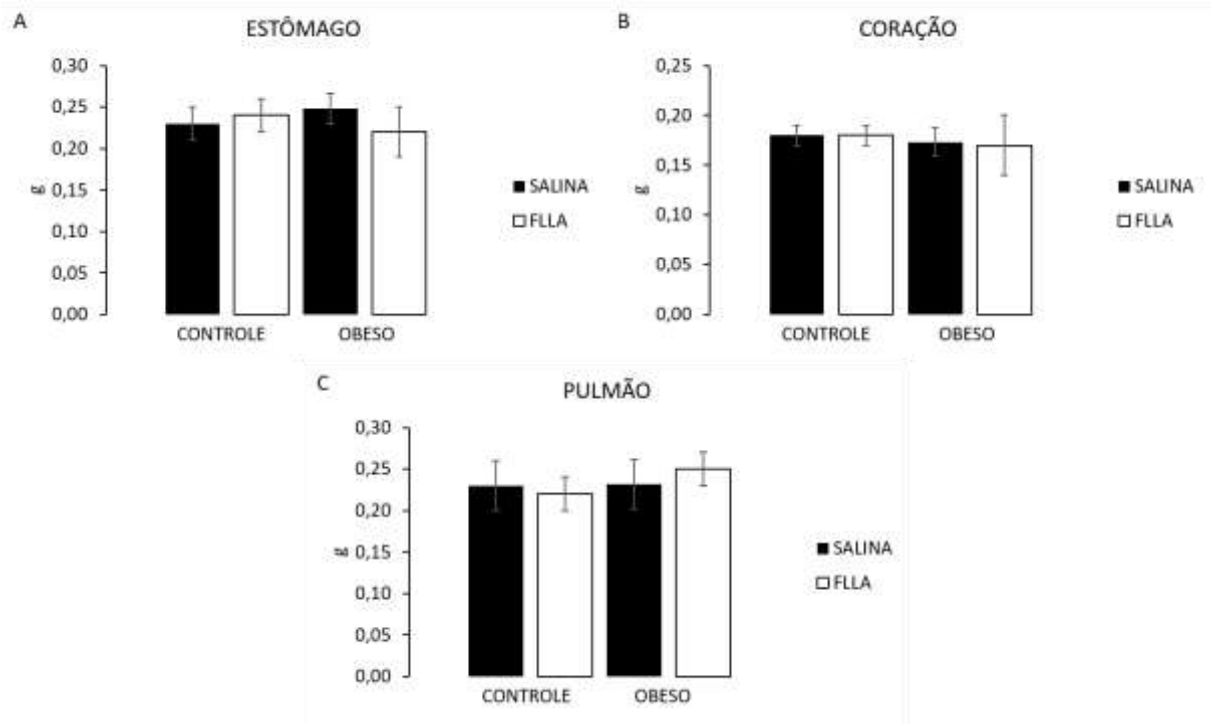


Figura 20: Efeito da administração do fruto sobre os órgãos estômago (A), coração (B) e pulmão (C) de camundongos submetidos a modelo de obesidade. Valores expressos em média ± desvio padrão, (n = 10). (ANOVA de uma via, seguido pelo teste de Tukey). Legenda: FLLA: Fruto Liofilizado de *L. australis*.

Os órgãos fígado, rim e baço são responsáveis por diversas etapas metabólicas e/ou de manutenção da homeostase do organismo animal e humano. Alterações de peso destes órgãos podem ser indicativos de sobrecarga, mal funcionamento ou de acumulo de gordura nos mesmos[118,243–249].

O fígado é o único órgão responsável pela síntese de gorduras e de reserva de provenientes do excesso de carboidratos da dieta[243,244]. A alteração no peso deste órgão pode estar associada ao acumulo de gordura e sobrecarga do mesmo através da diminuição da síntese de triacilglicerol[147] ou pela oxidação e secreção de lipoproteínas[250], influenciada pela dieta rica em lipídeos[243,244], levando a ativação da inflamação, gerando a esteatose hepática[251], ou pode ser indicativo da toxicidade da dieta[118]. Na figura 21 estão apresentadas as variações de peso do fígado, baço e rim dos animais após a administração de dieta normo e hiperlípidica associada ou não com FLLA.

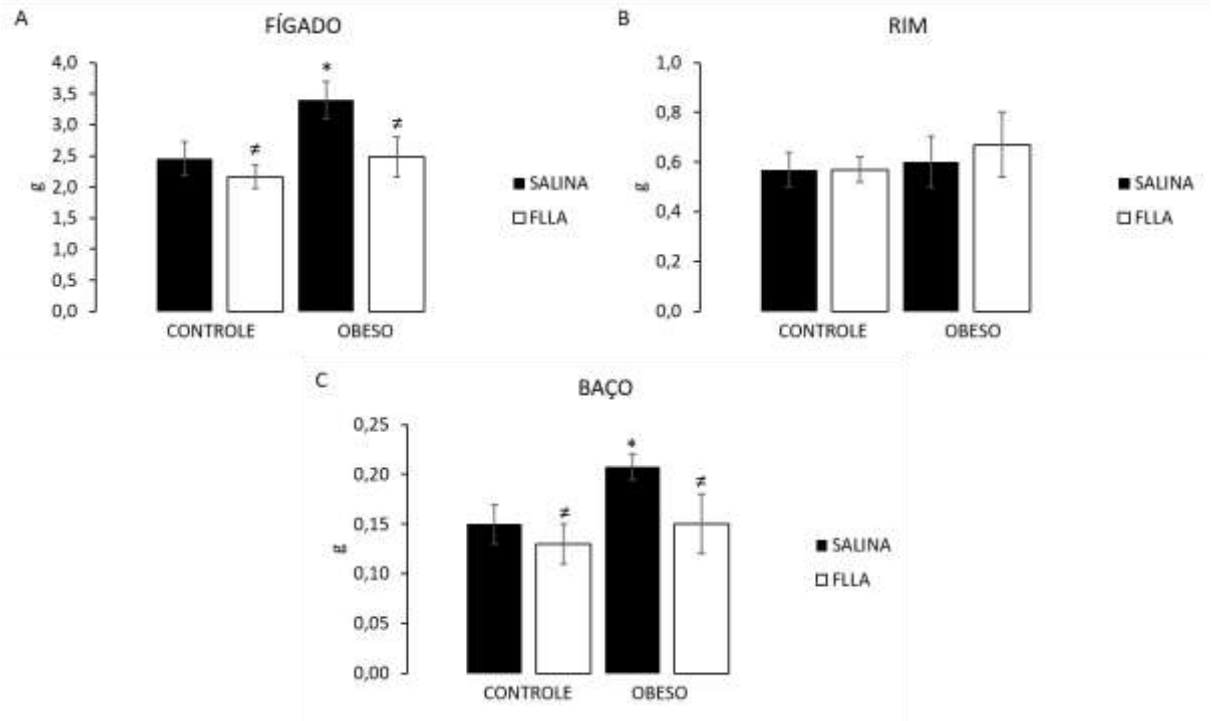


Figura 21: Efeito da administração do FLLA sob o peso dos órgãos fígado (A), rim (B) e baço (C) de camundongos submetidos a modelo de obesidade. Valores expressos em média ± desvio padrão, (n = 10). * *versus* Salina Controle e ≠ *versus* Salina Obeso; $p < 0,05$. (ANOVA de uma via, seguido pelo teste de Tukey). Legenda: FLLA: Fruto Liofilizado de *L. australis*.

A administração dos FLLA não proporcionou alteração significativa no peso do fígado nos animais que foram submetidos a dieta normolípidica e FLLA, quando comparado com os animais do grupo controle (Figura 21 A), indicativo de que a dieta normolípidica, assim como a dose de fruto liofilizado, não causou sobrecarga ou danos visíveis a este órgão. Assim, para os animais que receberam dieta hiperlipídica sem FLLA apresentaram um aumento significativo ($p<0,05$) no peso deste órgão. A administração concomitante da dieta hiperlípidica com FLLA proporcionou a manutenção do peso normal do fígado. Outros estudos realizados com frutos roxos liofilizados também obtiveram o efeito de redução no peso do fígado de animais obesos, como *Lonicera caerulea* berry[252], blueberry[253,254] e a framboesa preta[253,254].

Evidências crescentes sugerem que os polifenóis têm um potencial significativo na redução do peso/tamanho do fígado (esteatose) em animais submetidos à modelo de obesidade[255–260]. Van Hul e colaboradores[256] avaliaram o efeito do consumo de casca de canela (2 g/kg) e bagaço de uva (8,2 g/kg), em camundongos C57BL/6J (9 semanas de idade) alimentados com uma dieta rica em gordura por 8 semanas. Os autores relataram que houve diminuição do peso corporal e da inflamação do tecido

adiposo. Estes efeitos foram associados com a diminuição da esteatose hepática e pela diminuição dos níveis plasmáticos de ácidos graxos gerados pelo consumo de polifenóis provenientes da casca da canela e do bagaço da uva.

Rodríguez-González e colaboradores[255] avaliaram o efeito do consumo diário de polifenóis (230,83 e 140,41 mg/kg de peso corporal/dia) provenientes do bagaço de pêssego sobre a resistência à insulina e esteatose hepática em ratos submetidos a modelo de obesidade. O consumo de polifenóis promoveu diminuição nos níveis de esteatose hepática assim como a diminuição de triglicerídeos no fígado.

Alguns trabalhos relatam ainda que as antocianinas (polifenol encontrado nos FLLA), presentes nos frutos foram encontradas no fígado, tanto na forma intacta ou metabolizada[245–247], e que estas podem modular o metabolismo lipídico e a deposição de gordura neste órgão[147,261], e, ainda podem reduzir o acúmulo de lipídios hepatocelulares[262–266] através da inibição da lipogênese[267] e promovendo a lipólise[262–264].

As antocianinas são, em parte, metabolizadas e excretadas pela via renal[118,245–247], sendo assim a administração dos FLLA juntamente com a administração da dieta hiperlipídica poderia ocasionar uma sobrecarga deste órgão. Contudo, o consumo preventivo dos FLLA pelos camundongos, submetidos a modelo de obesidade desde a idade jovem (40º dia de vida)[175] até a velhice (96º dia de vida)[175], não gerou diferenças estatísticas na pesagem dos rins (Figura 21 B) entre os grupos. Este dado pode ser utilizado também como indicativo de segurança no uso continuo dos FLLA.

Em relação ao baço (Figura 21 C), os animais obesos apresentaram aumento de peso significativo quando comparado com o controle ($p<0,001$). A administração do fruto liofilizado aos animais obesos proporcionou a manutenção do peso semelhante ao grupo controle.

O baço é o principal órgão linfoide do organismo e possui papel crucial na resposta imunológica[248,249]. A esplenomegalia (aumento no peso do baço) e a lipólise já foram relacionados com inflamação sistêmica correlacionando esses eventos com o aumento de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1β e IL-6[268] e diminuição de citocinas anti-inflamatórias como a IL-10[248,269], em patologias com fator inflamatório envolvido[268].

Compreende-se desse modo, que a obesidade gera um processo inflamatório crônico de baixo grau[39–42], que tem sido associada à indução de distúrbios imunológicos[270] e até modificar o peso do baço. A esplenomegalia pode ocorrer

também devido a efeitos tóxicos de algumas substâncias sobre células sanguíneas, gerando hemólise[271], e, consequentemente, aumentar a produção de células sanguíneas pelo baço. Com isso, o aumento no volume do baço pode ocorrer devido a alterações bioquímicas, fisiológicas e imunológicas necessárias para manter a homeostasia orgânica como resposta às infecções ou outro tipo de agressão[272].

O peso do baço também foi avaliado por Batista e colaboradores[183], em que a casca liofilizada da jabuticaba, rica em antocianinas[273], foi administrada (1 – 4 % na dieta) em ratos alimentados com dietas ricas em gordura. Contudo, os autores observaram um efeito inverso com a administração dos FLLA. Os ratos alimentados com dieta hiperlipídica apresentaram tamanho/peso de baço menor do que o grupo controle, e a administração da casca liofilizada de jabuticaba não teve efeito neste parâmetro. Os autores sugeriram a atrofia do baço foi decorrente da obesidade e que este dado poderia estar aliado a mudanças nas funções fisiológicas, como a reciclagem de células imunológicas.

4.3.1 Avaliação do efeito do consumo FLLA sob parâmetros de estresse oxidativo em modelo animal de obesidade

O excesso de peso e a obesidade tornaram-se problemas de saúde pública e a prevalência de doenças crônicas relacionadas está aumentando em todo o mundo[1]. Como já sinalizado, o aumento dos adipócitos na obesidade gera um processo inflamatório de baixo grau, ocasionando um desequilíbrio entre a superprodução de espécies reativas de oxigênio (EROs) e antioxidantes circulantes[42,47,183]. Quando há um desequilíbrio entre a geração de EROs e a capacidade antioxidantes do organismo, é gerado um estado de estresse oxidativo[274] que danifica as proteínas, os lipídios e, consequentemente, as células[275].

Além da pesagem das estruturas dos camundongos foi avaliado também o dano oxidativo a lipídios na gordura mesentérica (Figura 22 A) e no fígado (Figura 22 B) dos mesmos. Estas estruturas foram selecionadas, visto que apresentaram diferenças de peso entre os grupos que receberam dieta normolípidica quando comparadas com os animais que receberam dieta hiperlipídicas.

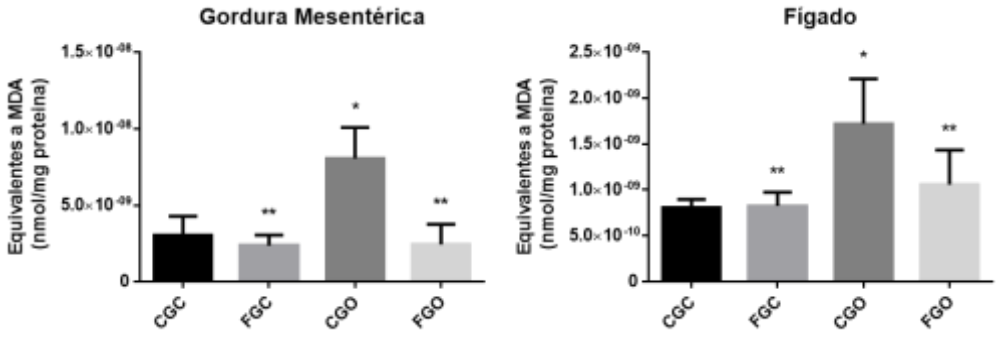


Figura 22: Efeito do FLLA sobre os danos a lipídios na gordura mesentérica (A) e no fígado (B) de camundongos submetidos a modelo de obesidade. Valores expressos em média ± desvio padrão, (n = 4). * *versus* Salina Controle e ** *versus* Salina Obeso; p < 0,05. (ANOVA de uma via, seguido pelo teste de Tukey). Legenda: CGC: Controle Grupo Controle, CGO: Controle Grupo Obeso, FGC: Fruto Grupo Controle, FGO: Fruto Grupo Obeso.

Como pode se observar na figura 22, os camundongos que ingeriram dieta hiperlípidica tiveram um aumento nos danos a lipídios, tanto na gordura mesentérica quanto no fígado. A administração preventiva de 750mg/g de FLLA (33,15 mg/kg de polifenóis e 2,34 mg/kg de antocianina) protegeu de forma significativa estes danos.

Em outros trabalhos, os compostos fenólicos, como as antocianinas[183,276], provenientes de frutos, também foram associados a redução de danos a lipídios[147]. Trabalhos realizados com a administração da casca liofilizada da jabuticaba em modelo animal de obesidade evidenciaram a redução significativa dos níveis de TBARS no soro de ratos[183] e também um aumento do potencial antioxidante plasmático[276].

Em determinadas situações, a quantidade elevada de oxigênio reativo liberado gera danos cruciais em determinadas moléculas, tais como a peroxidação lipídica e a carbonilação de proteínas[274]. Com isso, há a perda da atividade catalítica e integridade estrutural da molécula[274], que provoca a perda da função e fragmentação das estruturas proteicas, resultando na proteína carbonil[274]. Seu conteúdo é, atualmente, usado como marcador de oxidação, e suas alterações de concentrações estão sendo utilizadas na identificação de processos inflamatórios[277], como na obesidade[39–42].

A figura 23 reflete o efeito do consumo de FLLA sobre os níveis de carbonilação proteica na gordura mesentérica e no fígado em modelo animal de obesidade.

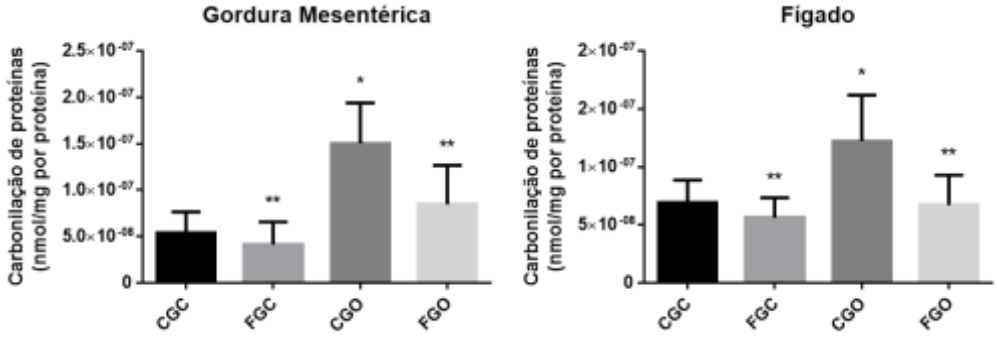


Figura 23: Efeito do FLLA sobre a carbonilação proteica na gordura mesentérica (A) e no fígado (B) de camundongos submetidos a modelo de obesidade. Valores expressos em média ± desvio padrão, (n = 4). * versus Salina Controle e ** versus Salina Obeso; $p < 0,05$. (ANOVA de uma via, seguido pelo teste de Tukey). Legenda: CGC: Controle Grupo Controle, CGO: Controle Grupo Obeso, FGC: Fruto Grupo Controle, FGO: Fruto Grupo Obeso.

A obesidade gerada pela alimentação hiperliídica em modelo animal elevou significativamente os danos a proteínas na gordura mesentérica (Figura 23 A) e no fígado (Figura 23 B), quando comparado com o grupo controle. A administração do FLLA preveniu significativamente os danos gerados, mantendo os níveis próximos ao do grupo controle.

Em relação aos danos oxidativo em proteínas, há relatos de que frutos liofilizados ricos em antocianinas são potentes antioxidantes, reduzindo significativamente os níveis de danos oxidativo em proteínas[241,278]. Ao adicionar pó de *cranberry* na dieta aterogênica de ratos, Kim e colaboradores[278] reduziram significativamente o nível de dano oxidativo em proteínas no fígado. A suplementação de açaí também promoveu melhora na capacidade antioxidante, diminuindo o nível de proteína carbonil e substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico no fígado e no soro de animais submetidos a dieta hipercolesterolêmica[241].

O estresse oxidativo produzido pela obesidade contribui para o dano ao DNA celular, lipídios e proteínas, em que ocorre uma ação citotóxica por parte dos radicais livres em desequilíbrio com os antioxidantes[274,275,279]. As proteínas estão entre os principais alvos de oxidação podendo sofrer alterações funcionais e, em particular, uma perda de propriedades metabólicas, enzimáticas e imunológicas[279]. Os grupos tióis das proteínas são os mais susceptíveis a oxidação. Estes grupos atuam como antioxidantes capazes de remover oxidantes responsáveis pelo início da peroxidação, e são, quantitativamente, a maior manifestação dos danos proteicos oxidativo[279].

Conforme demonstra a figura 24, os níveis de tióis livres na gordura mesentérica e no fígado de animais submetidos a dieta hiperlípidica.

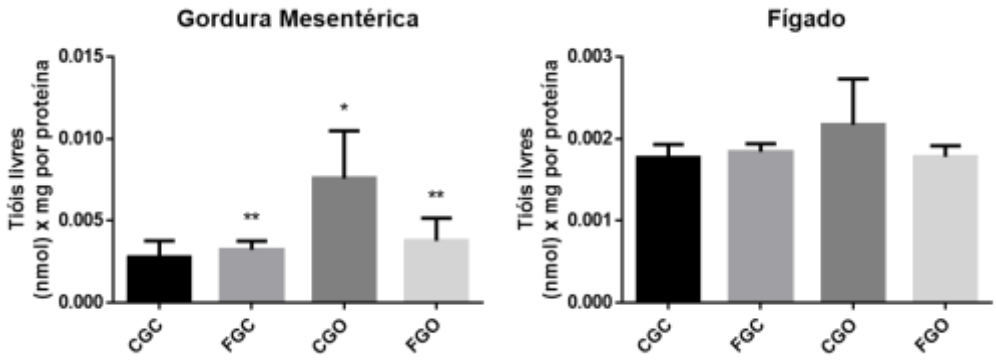


Figura 24: Efeito dos FLLA sobre os níveis de tióis livres na gordura mesentérica (A) e no fígado (B) de camundongos submetidos a modelo de obesidade. Valores expressos em média ± desvio padrão, (n = 4). * versus Salina Controle e ** versus Salina Obeso; p < 0,05. (ANOVA de uma via, seguido pelo teste de Tukey). Legenda: CGC: Controle Grupo Controle, CGO: Controle Grupo Obeso, FGC: Fruto Grupo Controle, FGO: Fruto Grupo Obeso.

No que se refere ao nível de tióis livres na gordura mesentérica (Figura 24 A), pode-se observar que o grupo controle obeso apresentou um nível elevado de tióis livres em relação ao grupo controle. A administração de 750mg/Kg de FLLA manteve os níveis de tióis livres próximo aos níveis do grupo controle, diferindo estatisticamente do grupo controle obeso. Em relação ao nível de tióis livres no fígado (Figura 24 B), não foi observado diferença estatística entre os grupos testados. A administração dos FLLA não gerou efeito neste tecido.

Alguns alimentos específicos ricos em polifenóis e antocianinas podem desempenhar um papel importante na prevenção e controle de complicações decorrentes do estresse oxidativo[183,217,276]. Além disso, estes compostos promovem o aumento da atividade de enzimas antioxidantes[217,276], que são capazes de neutralizar EROs[280]. Estes resultados sugerem que frutos com alto teor de polifenóis e antocianinas, como os FLLA, são um ótimo aliado à defesa antioxidante do organismo.

4.3.2 Avaliação do FLLA sob sobre a Catalase

Vale reiterar que o aumento dos adipócitos gera um processo inflamatório de baixo grau, ocasionando um aumento de EROs[42,47]. Contudo, o organismo é capaz

de equilibrar os danos gerados através da ação de enzimas antioxidantes, como a enzima CAT[281].

A figura 25 apresenta o efeito do consumo do FLLA sobre os sobre a atividade da enzima antioxidante CAT na gordura mesentérica de camundongos submetidos a modelo de obesidade.

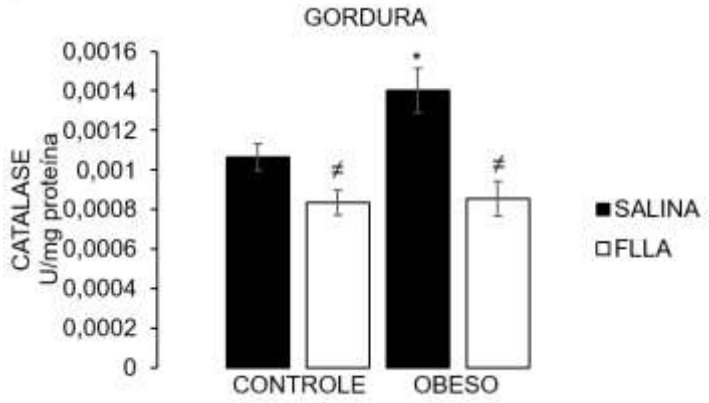


Figura 25: Efeito do consumo do FLLA sobre os sobre os níveis da enzima antioxidante CAT na gordura mesentérica de camundongos submetidos a modelo de obesidade. Valores expressos em média ± desvio padrão, (n = 4). Valores expressos em média ± desvio padrão, (n = 4). * versus Salina Controle e ≠ versus Salina Obeso; $p < 0,05$. (ANOVA de uma via, seguido pelo teste de Tukey). Legenda: FLLA: Fruto Liofilizado de *L. australis*.

De acordo com a figura 25, pode-se observar que a obesidade induzida por dieta hiperlipídica não gerou diferença estatística na atividade da enzima CAT na gordura mesentérica entre o grupo controle salina e controle obeso. Porém o consumo de FLLA reduziu significativamente os níveis da enzima CAT em relação ao grupo controle obeso. O real comportamento da CAT na obesidade ainda não está totalmente esclarecido, alguns estudos indicam uma redução da atividade[282], entretanto, alguns autores sugerem aumento da atividade[283].

Lee e colaboradores[283] demonstraram que a suplementação da dieta com casca da uva liofilizada, rica em antocianinas, não alterou os níveis de CAT em modelo animal de obesidade. De Assis e colaboradores[257] avaliaram o consumo de ômega-3 em ratos Wistar adultos com diabetes mellitus induzida. A suplementação com ômega 3 reduziu significativamente a atividade da SOD e da CAT que estavam aumentadas em fígado de ratos alimentados com dieta rica em gordura.

Um estudo realizado com o flavonoide hisperidina em cultura de células e em animais demonstrou que a hisperidina promoveu aumento das enzimas antioxidantes, como a CAT e superóxido dismutase, responsáveis pela redução dos radicais livres e aumento da capacidade antioxidante[284]. Estes dados comprovam que os polifenóis provenientes de alimentos promovem a neutralização de EROS diminuindo os níveis de enzimas antioxidantes, como a catalase[285].

4.3.3 Avaliação dos FLLA sob sobre os níveis de citocinas em modelo animal de obesidade

Compreende-se que a obesidade[286–288] e o estresse oxidativo gerado[289–291] estão relacionados com a ativação de diversas vias inflamatórias[5,40,44,45], por meio de mediadores como a IL-6 e IL-1β[292]. Este processo favorece o estado pró-inflamatório[42,47,293], resultado de respostas celulares e humorais com o objetivo de proteger o organismo contra vários insultos, na tentativa de resgatar a homeostase tecidual[292,294]. Com o aumento de tecido adiposo há também a diminuição da produção de citocinas anti-inflamatórias como a IL-10[292]. Este estado inflamatório ocorre tanto nos órgãos periféricos quanto no SNC[293,295,296]. Baseado nestas informações é esperado que o grupo de animais submetidos a dieta hiperlípidica apresente maior nível de IL-1β e IL-6 e redução dos níveis de IL-10.

Além da pesagem das estruturas e de danos a lipídios e proteínas, o efeito do consumo preventivo de FLLA também foi avaliado em modelo animal de obesidade sobre os níveis de citocinas pró-inflamatórias (IL-6 e IL-1β) e anti-inflamatórias (IL-10) no hipotálamo (Figura 26 A) e no baço (Figura 26 B), estrutura que apresentou esplenomegalia em relação ao grupo controle, fato associado a um processo inflamatório instalado (Figura 26 C).

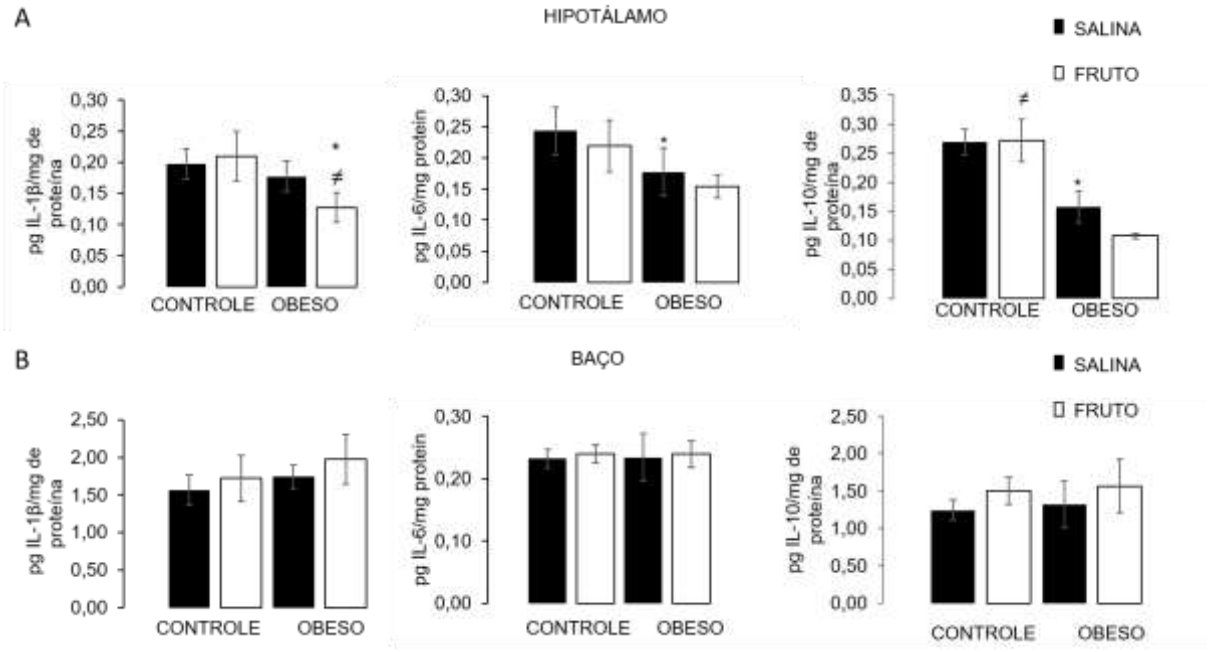


Figura 26: Efeito do consumo do FLLA sobre os sobre os níveis de IL-1β IL-6, e IL-10 no hipotálamo (A) e no baço (B) de camundongos submetidos a modelo de obesidade. Valores expressos em média ± desvio padrão, (n = 4). * versus Salina Controle e ≠ versus Salina Obeso; $p < 0,05$. (ANOVA de uma via, seguido pelo teste de Tukey).

De acordo com a figura 26 A, que apresenta os resultados da avaliação do efeito dos FLLA sobre os níveis de citocinas pró-inflamatórias no hipotálamo de animais submetidos a modelo de obesidade, foi observado diferença estatística apenas nos níveis de IL-6 entre os grupos controle não obeso e obeso. No entanto, não foi observado uma elevação dos níveis de citocinas pró-inflamatórias IL-1β e IL-6 nos grupos obesos quando comparados aos grupos controles, comportamento esperado para o modelo de indução de obesidade utilizado[297,298]. O consumo preventivo de FLLA reduziu significativamente apenas os níveis da citocina pró-inflamatória IL-1β quando comparado com o grupo controle obeso. Em relação a citocina anti-inflamatória IL-10 foi observado o comportamento esperado para o modelo. Uma diminuição da citocina IL-10 ocorreu no grupo obeso, diferindo estatisticamente do grupo controle não obeso. Entretanto, a administração dos FLLA não promoveu um aumento dos níveis desta interleucina.

O efeito dos FLLA sobre os níveis de citocinas no baço de animais submetidos a modelo de obesidade está apresentado na figura 26 B. É possível observar que a obesidade induzida por dieta hiperlipídica não gerou diferenças estatísticas entre os grupos controle não obeso e obeso tanto nos níveis de citocinas pró-inflamatórias

quanto anti-inflamatória. O consumo preventivo de FLLA também não promoveu diferenças estatísticas nos níveis destas citocinas entre os grupos.

Os resultados obtidos para os níveis de citocinas no baço não estão de acordo com o esperado para o modelo animal de indução de obesidade utilizado. Segundo a literatura a expectativa era o de ocorrer um aumento dos níveis de IL-1β e IL-6, assim como uma redução de IL-10 nas estruturas estudadas[297,298]. Este fato fez com que fosse reavaliado todos os resultados de densidade ótica adquiridos espectrofotometricamente nas placas de ELISA. Ao avaliar estes dados foi constatado que mais de 70% das densidades óticas coletadas estavam abaixo do limite de quantificação da curva de calibração estabelecida para o método analítico. Isto compromete todos os resultados obtidos, pois densidades óticas inferiores ao limite de quantificação podem apresentar erro elevado, além do que, a sensibilidade do método apresenta-se reduzida[299]. Como as estruturas utilizadas dos camundongos são muito pequenas, não existe mais amostras para a repetição desta análise.

5. CONCLUSÃO

A amostra vegetal coletada na região de Orleans-SC foi confirmada como sendo a espécie *L. australis*, pertencente à família Melastomataceae. Os frutos *in natura* desta espécie apresentaram 85,29% de teor de umidade e após o processo de liofilização apresentaram cerca de 12%, valor característico para frutos considerados *berries* como blueberry, açaí e jabuticaba.

A composição química da *L. australis* a caracteriza como *berrie* brasileiro por conter quantidades de polifenóis (44,2 mg/g) e antocianinas (3,12 mg/g), principalmente a cianidina-3-O-glicosídeo, próximas a de frutos já conhecidos como o blueberry, cranberry, jabuticaba, framboesa, uva e amora.

O teor de cinzas totais e insolúveis em ácido clorídrico dos FLLA (3,3 e 0,4% respectivamente) são superiores ao encontrado para frutos como o blueberry, o que pode indicar quantidade superior de minerais e/ou impurezas inorgânicas.

Os frutos de *L. australis* apresentam uma quantidade de açúcar redutor inferior à de frutos como a jabuticaba e o blueberry, propriedade que indica a mesma como promissora ao desenvolvimento de produtos com baixo teor de açúcar.

Em modelo animal de obesidade, o consumo dos FLLA não afetou o consumo alimentar dos animais, assim como não foi capaz de evitar ou reduzir o ganho de peso nos animais submetidos a dieta hiperlípidica, comportamento semelhante foi encontrado para o peso de gordura visceral.

Contudo, o consumo diário dos FLLA pelos animais do grupo obeso, foi capaz de manter o peso do fígado e do baço próximos ao grupo controle, que possuem funções importantes no metabolismo e/ou no sistema imunológico.

Em relação aos danos a lipídios e proteínas (estresse oxidativo), o consumo diário de *L. australis* preveniu os danos gerados pela obesidade no fígado e na gordura mesentérica, mantendo os níveis normais em todos os parâmetros, com exceção dos níveis de tióis na gordura mesentérica que não apresentou diferença estatística entre os grupos. A atividade da enzima antioxidante CAT na gordura mesentérica foi reduzida pelo consumo diário dos FLLA, tanto no grupo controle quanto no grupo obeso. A diminuição de danos a lipídios e proteínas assim como a diminuição da atividade da enzima CAT nos grupos que receberam a administração dos FLLA são indicativos de que os mesmos diminuíram a produção de EROs atenuando os danos gerados pela obesidade em modelo animal.

5.1 PERSPECTIVAS FUTURAS

Como perspectivas futuras propõem-se a produção de um extrato rico em antocianinas através dos FLLA e a avaliação do consumo diário do extrato em modelo animais de obesidade, de modo a avaliar os parâmetros de peso corporal e peso de estruturas internas, bem como avaliar o efeito do consumo do mesmo nos danos gerados pela obesidade, como estresse oxidativo e parâmetros inflamatórios.

6. REFERÊNCIAS

1. Swinburn BA, Sacks G, Hall KD, McPherson K, Finegood DT, Moodie ML, et al. The global obesity pandemic: shaped by global drivers and local environments. Lancet. 2011 Aug 27;378(9793):804–14.

2. VIGITEL. Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico. Ministério da Saúde. 2016. p. 02–37.

3. Martínez de Morentin PB, Varela L, Fernø J, Nogueiras R, Diéguez C, López M. Hypothalamic lipotoxicity and the metabolic syndrome. Biochim Biophys Acta. 2010 Mar;1801(3):350–61.

4. Leite LD, Rocha ÉD de M, Brandão-Neto J. Obesidade: uma doença inflamatória. Ciência & Saúde. 2010;2(2):85–95.

5. Bastien M, Poirier P, Lemieux I, Després J-P. Overview of epidemiology and contribution of obesity to cardiovascular disease. Prog Cardiovasc Dis. 2013;56(4):369–81.

6. Goktas Z, Moustaid-Moussa N, Shen C-L, Boylan M, Mo H, Wang S. Effects of bariatric surgery on adipokine-induced inflammation and insulin resistance. Front Endocrinol (Lausanne). 2013;4:69.

7. Pistell PJ, Morrison CD, Gupta S, Knight AG, Keller JN, Ingram DK, et al. Cognitive impairment following high fat diet consumption is associated with brain inflammation. J Neuroimmunol. 2010 Feb 26;219(1–2):25–32.

8. Geijselaers SLC, Sep SJS, Stehouwer CDA, Biessels GJ. Glucose regulation, cognition, and brain MRI in type 2 diabetes: a systematic review. lancet Diabetes Endocrinol. 2015 Jan;3(1):75–89.

9. Ferro AFP, Bonacelli MBM, Assad ALD. Oportunidades tecnológicas e estratégias concorrenciais de gestão ambiental: o uso sustentável da biodiversidade brasileira. Gestão & Produção. 2006;13:489–501.

10. Junior CJFO, Cabreira PP. Sistemas agroflorestais : potencial econômico da biodiversidade vegetal a partir do conhecimento tradicional ou local. Rev Verde Agroecol e Desenvolv Sustentável. 2012;7(1):212–24.

11. Hagiwara A, Miyashita K, Nakanishi T, Sano M, Tamano S, Kadota T, et al. Pronounced inhibition by a natural anthocyanin, purple corn color, of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP)- associated colorectal carcinogenesis in male F344 rats pretreated with 1,2-dimethylhydrazine. Cancer Lett. 2001;171(1):17–25.

12. Kapadia GJ, Balasubramanian V, Tokudab H, Iwashimab A, Nishinob H. Inhibition of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate induced Epstein virus early antigen activation by natural colorants. Cancer Lett. 1997;115:173–8.

13. Matsui T, Ebuchi S, Kobayashi M, Fukui K, Sugita K, Terahara N, et al. Anti-Hyperglycemic effect of Diacylated Anthosianin Derived from Ipomoea batatas cultivar Ayamurasaki can be Achieved through the Alpha-Glucosidase Inhibitory Action. J Agric Food Chem. 2002;50(25):7244–8.

14. Jayaprakasam B, Vareed SK, Olson LK, Nair MG. Insulin secretion by bioactive anthocyanins and anthocyanidins present in fruits. J Agric Food Chem. 2005;53(1):28–31.

15. Byun MR, Jeong H, Bae SJ, Kim AR, Hwang ES, Hong J-H. TAZ is required for the osteogenic and anti-adipogenic activities of kaempferol. Bone. 2012 Jan;50(1):364–72.

16. Torrezan R, Gomes RM, Ferrarese ML, Melo FB-H de, Ramos AMD, Mathias PCF, et al. O tratamento com isoflavonas mimetiza a ação do estradiol no acúmulo de gordura em ratas ovariectomizadas. Arq Bras Endocrinol Metabol. 2008 Dec;52(9):1489–96.

17. Kähkönen MP, Heinonen M. Antioxidant activity of anthocyanins and their aglycons. J Agric Food Chem. 2003;51(3):628–33.

18. Wang CJ, Wang JM, Lin WL, Chu CY, Chou FP, Tseng TH. Protective effect of Hibiscus anthocyanins against tert-butyl hydroperoxide-induced hepatic toxicity in rats. Food Chem Toxicol. 2000;38(5):411–6.

19. Seeram NP, Momin RA, Nair MG, Bourquin LD. Cyclooxygenase inhibitory and antioxidant cyanidin glycosides in cherries and berries. Phytomedicine. 2001;8(5):362–9.

20. Lowry JB. Anthocyanins of the Melastomataceae, Myrtaceae and some allied families. Phytochemistry. 1976;15(4):513–6.

21. Cunha WR, Silva MLA e n, Turatti ICC, Ferreira D da S, Betarello HL. Avaliação da atividade analgésica de Miconia ligustroides (Melastomataceae) utilizando o teste de contorção abdominal em camundongos. Rev Bras Farmácia. 2003;84(2):47–9.

22. Pitelli RA. O termo planta-daninha. Soc Bras da Ciência das Plantas Daninhas. 2015;33(3):622–3.

23. Boeger MRT, Kaehler M, Júnior JCF de M, Gomes MZ, Oliveira L da S, Chaves CRM, et al. Estrutura Foliar de Seis Espécies do Subosque de um Remanescente de Floresta Ombrófila Mista. Hoehnea. 2016;33(March):521–31.

24. Camargo EA De. O gênero Leandra. seções Carassanae, Niangae e Secundiflorae (melastomataceae) no Paraná. 2008.

25. Obesity and overweight. WHO. World Health Organization; 2016.

26. ABESO. ABESO. Diretrizes brasileiras de obesidade. 2009/2010. 2016. p. 9–43.

27. Fernanda M, Resende Guimarães B, Da MR, Pinto C, Santos RG, Raid C, et al. Which is the best cutoff of body mass index to identify obesity in female patients with rheumatoid arthritis? A study using dual energy X-ray absorptiometry body composition. Rev Bras Ortop (English Ed. 2017;57:279–85.

28. Jaime PC, da Silva ACF, Gentil PC, Claro RM, Monteiro CA. Brazilian obesity prevention and control initiatives. Obes Rev. 2013 Nov;14 Suppl 2:88–95.

29. Arbex AK, Rocha DRTW, Aizenberg M, Ciruzzi MS. Obesity Epidemic in Brazil and Argentina: A Public Health Concern. J Health Popul Nutr. 2014;32(2):327–34.

30. Schmidt MI, Duncan BB, e Silva GA, Menezes AM, Monteiro CA, Barreto SM, et al. Chronic non-communicable diseases in Brazil: burden and current challenges. Lancet. 2011 Jun;377(9781):1949–61.

31. Duncan BB, Chor D, Aquino EML, Bensenor IM, Mill JG, Schmidt MI, et al. Doenças Crônicas Não Transmissíveis no Brasil: prioridade para enfrentamento e investigação. Rev Saúde Pública. 2012;46:126–34.

32. Bahia L, Coutinho ESF, Barufaldi LA, Abreu G de A, Malhão TA, de Souza CPR, et al. The costs of overweight and obesity-related diseases in the Brazilian public health system: cross-sectional study. BMC Public Health. 2012;12:440.

33. Haslam D. Obesity: a medical history. Obes Rev. 2007 Mar;8 Suppl 1:31–6.

34. Barouch LA, Gao D, Chen L, Miller KL, Xu W, Phan AC, et al. Cardiac myocyte apoptosis is associated with increased DNA damage and decreased survival in murine models of obesity. Circ Res. 2006 Jan 6;98(1):119–24.

35. Ponterio E, Gnessi L. Adenovirus 36 and Obesity: An Overview. Viruses. 2015 Jul;7(7):3719–40.

36. Baboota RK, Bishnoi M, Ambalam P, Kondepudi KK, Sarma SM, Boparai RK, et al. Functional food ingredients for the management of obesity and associated co-morbidities – A review. J Funct Foods. 2013;5(3):997–1012.

37. Ouchi N, Parker JL, Lugus JJ, Walsh K. Adipokines in inflammation and metabolic disease. Nat Rev Immunol. 2011 Feb;11(2):85–97.

38. Halberg N, Wernstedt-Asterholm I, Scherer PE. The adipocyte as an endocrine cell. Endocrinol Metab Clin North Am. 2008 Sep;37(3):753–68, x–xi.

39. Kershaw EE, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. J Clin Endocrinol Metab. 2004 Jun;89(6):2548–56.

40. Gregor MF, Hotamisligil GS. Inflammatory Mechanisms in Obesity. Annu Rev Immunol. 2011 Apr 23;29(1):415–45.

41. Heber D. An integrative view of obesity. Am J Clin Nutr. 2010 Jan;91(1):280S–

283S.

42. Fuentes E, Fuentes F, Vilahur G, Badimon L, Palomo I. Mechanisms of chronic state of inflammation as mediators that link obese adipose tissue and metabolic syndrome. Mediators Inflamm. 2013;2013:136584.

43. Enos RT, Velázquez KT, Murphy EA. Insight into the impact of dietary saturated fat on tissue-specific cellular processes underlying obesity-related diseases. J Nutr Biochem. 2014 Jun;25(6):600–12.

44. Arslan N, Erdur B, Aydin A. Hormones and cytokines in childhood obesity. Indian Pediatr. 2010 Oct;47(10):829–39.

45. Castanon N, Lasselin J, Capuron L. Neuropsychiatric comorbidity in obesity: role of inflammatory processes. Front Endocrinol (Lausanne). 2014;5:74.

46. Glass CK, Saijo K, Winner B, Marchetto MC, Gage FH. Mechanisms underlying inflammation in neurodegeneration. Cell. 2010 Mar 19;140(6):918–34.

47. Capuron L, Miller AH. Immune system to brain signaling: neuropsychopharmacological implications. Pharmacol Ther. 2011 May;130(2):226–38.

48. Greenwood CE, Winocur G. Glucose Treatment Reduces Memory Deficits in Young Adult Rats Fed High-Fat Diets. Neurobiol Learn Mem. 2001 Mar;75(2):179–89.

49. Heyne A, Kiesselbach C, Sahún I, McDonald J, Gaiffi M, Dierssen M, et al. An animal model of compulsive food-taking behaviour. Addict Biol. 2009 Oct;14(4):373–83.

50. Abildgaard A, Solskov L, Volke V, Harvey BH, Lund S, Wegener G. A high-fat diet exacerbates depressive-like behavior in the Flinders Sensitive Line (FSL) rat, a genetic model of depression. Psychoneuroendocrinology. 2011 Jun;36(5):623–33.

51. Elias MF, Elias PK, Sullivan LM, Wolf PA, D'Agostino RB. Obesity, diabetes and cognitive deficit: The Framingham Heart Study. Neurobiol Aging. 2005 Dec;26(1):11–6.

52. Qiu C, De Ronchi D, Fratiglioni L. The epidemiology of the dementias: an update. Curr Opin Psychiatry. 2007 Jul;20(4):380–5.

53. Vasques F, Martins FC, Azevedo AP de. Aspectos psiquiátricos do tratamento da obesidade. Rev Psiquiatr Clínica. 2004;31(4):195–8.

54. Souza SP, Pereira LLS, Souza AA, Santos CD. Seleção de extratos brutos de plantas com atividade antiobesidade. Rev Bras Plantas Med. 2012;14(4):643–8.

55. Yang X, Yin L, Li T, Chen Z. Green tea extracts reduce adipogenesis by decreasing expression of transcription factors C/EBPα and PPARγ. Int J Clin

Exp Med. 2014;7(12):4906–14.

56. Xu Y, Zhang M, Wu T, Dai S, Xu J, Zhou Z. The anti-obesity effect of green tea polysaccharides, polyphenols and caffeine in rats fed with a high-fat diet. Food Funct. 2015 Jan;6(1):297–304.

57. Sae-tan S, Rogers CJ, Lambert JD. Decaffeinated green tea and voluntary exercise induce gene changes related to beige adipocyte formation in high fat-fed obese mice. Vol. 14, Journal of Functional Foods. 2015.

58. Yang X, Yang L, Zheng H. Hypolipidemic and antioxidant effects of mulberry (Morus alba L.) fruit in hyperlipidaemia rats. Food Chem Toxicol. 2010;48(8–9):2374–9.

59. Kumar V, Bhandari U, Tripathi CD, Khanna G. Evaluation of antiobesity and cardioprotective effect of Gymnema sylvestre extract in murine model. Indian J Pharmacol. 2012;44(5):607–13.

60. Kumar V, Bhandari U, Tripathi CD, Khanna G. Anti-obesity effect of Gymnema sylvestre extract on high fat diet-induced obesity in Wistar rats. Drug Res (Stuttg). 2013 Dec;63(12):625–32.

61. Angelo PM, Jorge N. Compostos fenólicos em alimentos - uma breve revisão. Rev Inst Adolfo Lutz. 2007;66(1):01–9.

62. Sousa CM de M, Silva HR e, Vieira-Jr. GM, Ayres MCC, Costa CLS da, Araújo DS, et al. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. Quim Nova. 2007 Apr;30(2):351–5.

63. Pandey KB, Rizvi SI. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. Oxid Med Cell Longev. 2009;2(5):270–8.

64. Rockenbach II. Compostos fenólicos, ácidos graxos e capacidade antioxidante do bagaço da vinificação de uvas tintas. 2008.

65. Silva MLC, Costa RS, Santana A dos S, Koblitz MGB. Compostos fenólicos, carotenóides e atividade antioxidante em produtos vegetais. Semin Ciências Agrárias. 2010;31(3):669–82.

66. Bravo L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. Nutr Rev. 1998 Nov;56(11):317–33.

67. Lee S-J, Umano K, Shibamoto T, Lee K-G. Identification of volatile components in basil (Ocimum basilicum L.) and thyme leaves (Thymus vulgaris L.) and their antioxidant properties. Food Chem. 2005;91(1):131–7.

68. Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. Free Radic Biol Med. 1996;20(7):933–56.

69. Soares SE. Phenolic acids as antioxidants. Rev Nutr. 2002;15(151):71–8171.

70. Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. LWT - Food Sci Technol. 1995;28(1):25–30.

71. Al-hassan MI. Conversion of 19-Nortestosterone to β-Estradiol. Synth Commun. 1989 Feb 23;19(3–4):453–61.

72. Shahidi F, Janitha PK, Wanasundara PD. Phenolic antioxidants. Crit Rev Food Sci Nutr. 1992 Jan;32(1):67–103.

73. Ángel MH, González EAP. Plantas que contienen polifenoles. Antioxidantes dentro del estilo de vida. Rev Cuba Investig Biomédicas. 1999;18(1):12–4.

74. Sanchez-Moreno C. Review: methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. Food Sci Technol Int. 2002 Jun 1;8(3):121–37.

75. Dzialo M, Mierziak J, Korzun U, Preisner M, Szopa J, Kulma A. The potential of plant phenolics in prevention and therapy of skin disorders. Int J Mol Sci. 2016 Feb 18;17(2):160.

76. Flambó DFALP. Atividades biológicas dos flavonoides : atividade antimicrobiana. 2013.

77. Balasundram N, Sundram K, Samman S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. Food Chem. 2006;99(1):191–203.

78. Ghasemzadeh A, Ghasemzadeh N. Flavonoids and phenolic acids: Role and biochemical activity in plants and human. J Med Plants Res. 2011;5(31):6697–703.

79. Março PH, Poppi RJ, Scarminio IS. Procedimentos analíticos para identificação de antocianinas presentes em extratos naturais - Revisão. Quim Nova. 2008;31(5):1218–23.

80. Machado H, Nagem TJ, Peters VM, Fonseca CS, Oliveira TT de. Flavonóides e seu potencial terapêutico. Bol do Cent Biol da Reprodução. 2010;27(1/2).

81. Guardia T, Rotelli AE, Juarez AO, Pelzer LE. Anti-inflammatory properties of plant flavonoids. Effects of rutin, quercetin and hesperidin on adjuvant arthritis in rat. Farmaco. 2001;56(9):683–7.

82. Lopes TJ, Xavier MF, Gabriela M, Quadri N, Quadri MB. Antocianinas : Uma Breve Revisão Das Características Estruturais e da Estabilidade. Rev Bras Agrociência. 2007;13(3):291–7.

83. Robards K, Prenzler PD, Tucker G, Swatsitang P, Glover W. Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. Food Chem. 1999;66(4):401–36.

84. Malacrida CR, Motta S da. Antocianina em suco de uva:composição e estabilidade. Cent Pesqui Process Aliment. 2006;24(1):59–82.

85. Lima VLAG De, Pinheiro IO, Nascimento MS Do, Gomes PB, Guerra NB. Identificação de antocianidinas em acerolas do banco ativo de germoplasma da universidade federal rural de Pernambuco. Ciência e Tecnol Aliment. 2006;26(4):927–35.

86. Guimarães W, Alves MIR, Antoniosi Filho NR. Antocianinas em extratos vegetais: aplicação em titulação ácido-base e identificação via cromatografia líquida/espectrometria de massas. Quim Nova. 2012;35(8):1673–9.

87. Okumura F, Soares MHFB, Cavalheiro ÉTG. Identificação de pigmentos naturais de espécies vegetais utilizando-se cromatografia em papel. Quim Nova. 2002 Jul;25(4):680–3.

88. Terci DBL, Rossi AV. Indicadores naturais de pH: usar papel ou solução? Quim Nova. 2002 Jul;25(4):684–8.

89. Falcão LD, Barros DM, Gauche C, Bordignon Luiz MT. Copigmentação intra e intermolecular de antocianinas: uma revisão. Bol do Cent Pesqui Process Aliment. 2003 Dec 31;21(2).

90. Teixeira LN, Stringheta PC, Oliveira FA De. Comparação de métodos para quantificação de antocianinas. Rev Ceres. 2008;55(4):297–304.

91. Malien-Aubert C, Dangles O, Amiot MJ. Color stability of commercial anthocyanin-based extracts in relation to the phenolic composition. Protective effects by intra- and intermolecular copigmentation. J Agric Food Chem. 2001 Jan;49(1):170–6.

92. Wrolstad RE, Durst RW, Lee J. Tracking color and pigment changes in anthocyanin products. Trends Food Sci Technol. 2005;16(9):423–8.

93. Reyes LF, Cisneros-Zevallos L. Degradation kinetics and colour of anthocyanins in aqueous extracts of purple- and red-flesh potatoes (Solanum tuberosum L.). Food Chem. 2007;100(3):885–94.

94. Harborne JB, Williams CA. Advances in flavonoid research since 1992. Phytochemistry. 2000;55(6):481–504.

95. Gao L, Mazza G. Extraction of Anthocyanin Pigments from Purple Sunflower Hulls. J Food Sci. 1996 May;61(3):600–3.

96. Andreo D, Jorge N. ANTIOXIDANTES NATURAIS: TÉCNICAS DE EXTRAÇÃO. Bol do Cent Pesqui Process Aliment. 2006 Dec 31;24(2).

97. Rockenbach II, Lessa G, Silva D, Rodrigues E, Kuskoski EM, Fett R. Influência do solvente no conteúdo total de polifenóis, antocianinas e atividade antioxidante de extratos de bagaço de uva (Vitis vinifera) variedades Tannat e Ancelota. Ciência e Tecnol Aliment. 2008;28(111):238–44.

98. Kong J-M, Chia L-S, Goh N-K, Chia T-F, Brouillard R. Analysis and biological activities of anthocyanins. Phytochemistry. 2003;64:923–33.

99. Es-Safi N-E, Cheynier V, Moutounet M. Interactions between Cyanidin 3- O - Glucoside and Furfural Derivatives and Their Impact on Food Color Changes. J Agric Food Chem. 2002 Sep;50(20):5586–95.

100. Andlauer W, Stumpf C, Frank K, Furst P. Absorption and metabolism of anthocyanin cyanidin-3-glucoside in the isolated rat small intestine is not influenced by ethanol. Eur J Nutr. 2003 Aug 1;42(4):217–23.

101. Falcão AP, Chaves ES, Kuskoski EM, Fett R, Falcão LD, Bordignon-Luiz MT. Índice De Polifenóis, Antocianinas Totais E Atividade Antioxidante De Um Sistema Modelo De Geléia De Uvas. Ciência e Tecnol Aliment. 2007;27(3):637–42.

102. Kelebek H, Canbas A, Selli S, Saucier C, Jourdes M, Glories Y. Influence of different maceration times on the anthocyanin composition of wines made from Vitis vinifera L. cvs. Boğazkere and Öküzgözü. J Food Eng. 2006;77(4):1012–7.

103. Rizzon LA, Miele A, Meneguzzo J. Avaliação da uva cv. Isabel para a elaboração de vinho tinto. Ciência e Tecnol Aliment. 2000 Apr;20(1):115–21.

104. Brouillard R. The in vivo expression of anthocyanin colour in plants. Phytochemistry. 1983;22(6):1311–23.

105. Giusti, M. y Wrolstad R. Characterization and measurement of anthocyanins by UV- Visible spectroscopy. Curr Protoc Food Anal Chem. 2005;19–31.

106. Lee J, Durst RW, Wrolstad RE. Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by the pH differential method: Collaborative study. J AOAC Int. 2005;88(5):1269–78.

107. Rufino M do SM, Alves RE, de Brito ES, Pérez-Jiménez J, Saura-Calixto F, Mancini-Filho J. Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. Food Chem. 2010 Aug 15;121(4):996–1002.

108. Prior RL, Wu X. Anthocyanins: structural characteristics that result in unique metabolic patterns and biological activities. Free Radic Res. 2006 Oct;40(10):1014–28.

109. Kalt W, Hanneken A, Milbury P, Tremblay F. Recent research on polyphenolics in vision and eye health. J Agric Food Chem. 2010 Apr 14;58(7):4001–7.

110. Wu X, Pittman HE, McKay S, Prior RL. Aglycones and sugar moieties alter anthocyanin absorption and metabolism after berry consumption in weanling pigs. J Nutr. 2005 Oct;135(10):2417–24.

111. He J, Wallace TC, Keatley KE, Failla ML, Giusti MM. Stability of black raspberry anthocyanins in the digestive tract lumen and transport efficiency into gastric and small intestinal tissues in the rat. J Agric Food Chem. 2009 Apr 22;57(8):3141–8.

112. McGhie TK, Ainge GD, Barnett LE, Cooney JM, Jensen DJ. Anthocyanin Glycosides from Berry Fruit Are Absorbed and Excreted Unmetabolized by Both Humans and Rats. J Agric Food Chem. 2003 Jul;51(16):4539–48.

113. Garcia-Alonso M, Minihane A-M, Rimbach G, Rivas-Gonzalo JC, de Pascual-Teresa S. Red wine anthocyanins are rapidly absorbed in humans and affect monocyte chemoattractant protein 1 levels and antioxidant capacity of plasma. J Nutr Biochem. 2009 Jul;20(7):521–9.

114. Kay CD, Mazza GJ, Holub BJ. Anthocyanins exist in the circulation primarily as metabolites in adult men. J Nutr. 2005 Nov;135(11):2582–8.

115. Wu X, Beecher GR, Holden JM, Haytowitz DB, Gebhardt SE, Prior RL. Concentrations of Anthocyanins in Common Foods in the United States and Estimation of Normal Consumption. J Agric Food Chem. 2006 May;54(11):4069–75.

116. Prior RL. Fruits and vegetables in the prevention of cellular oxidative damage. Am J Clin Nutr. 2003 Sep;78(3 Suppl):570S–578S.

117. Mullen W, Edwards CA, Serafini M, Crozier A. Bioavailability of pelargonidin-3-O-glucoside and its metabolites in humans following the ingestion of strawberries with and without cream. J Agric Food Chem. 2008 Feb 13;56(3):713–9.

118. Fernandes I, Faria A, Calhau C, de Freitas V, Mateus N. Bioavailability of anthocyanins and derivatives. J Funct Foods. 2014;7:54–66.

119. Passamonti S, Vrhovsek U, Vanzo A, Mattivi F. The stomach as a site for anthocyanins absorption from food. FEBS Lett. 2003 Jun 5;544(1–3):210–3.

120. Maestro A, Terdoslavich M, Vanzo A, Kuku A, Tramer F, Nicolin V, et al. Expression of bilitranslocase in the vascular endothelium and its function as a flavonoid transporter. Cardiovasc Res. 2010 Jan 1;85(1):175–83.

121. Ziberna L, Tramer F, Moze S, Vrhovsek U, Mattivi F, Passamonti S. Transport and bioactivity of cyanidin 3-glucoside into the vascular endothelium. Free Radic Biol Med. 2012 May 1;52(9):1750–9.

122. Hollman PC, de Vries JH, van Leeuwen SD, Mengelers MJ, Katan MB. Absorption of dietary quercetin glycosides and quercetin in healthy ileostomy volunteers. Am J Clin Nutr. 1995 Dec;62(6):1276–82.

123. Gee JM, DuPont MS, Rhodes MJ, Johnson IT. Quercetin glucosides interact with the intestinal glucose transport pathway. Free Radic Biol Med. 1998 Jul 1;25(1):19–25.

124. O'Leary KA, Day AJ, Needs PW, Mellon FA, O'Brien NM, Williamson G. Metabolism of quercetin-7- and quercetin-3-glucuronides by an in vitro hepatic model: the role of human beta-glucuronidase, sulfotransferase, catechol-O-methyltransferase and multi-resistant protein 2 (MRP2) in flavonoid metabolism. Biochem Pharmacol. 2003 Feb 1;65(3):479–91.

125. Day AJ, Cañada FJ, Díaz JC, Kroon PA, Mclauchlan R, Faulds CB, et al. Dietary flavonoid and isoflavone glycosides are hydrolysed by the lactase site of lactase phlorizin hydrolase. FEBS Lett. 2000 Feb 25;468(2–3):166–70.

126. González-Barrio R, Borges G, Mullen W, Crozier A. Bioavailability of anthocyanins and ellagitannins following consumption of raspberries by healthy humans and subjects with an ileostomy. J Agric Food Chem. 2010 Apr 14;58(7):3933–9.

127. González-Barrio R, Edwards CA, Crozier A. Colonic catabolism of ellagitannins, ellagic acid, and raspberry anthocyanins: in vivo and in vitro studies. Drug Metab Dispos. 2011 Sep;39(9):1680–8.

128. Manach C, Williamson G, Morand C, Scalbert A, Rémésy C. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. Am J Clin Nutr. 2005 Jan;81(1 Suppl):230S–242S.

129. Wiczkowski W, Romaszko E, Piskula MK. Bioavailability of cyanidin glycosides from natural chokeberry (Aronia melanocarpa) juice with dietary-relevant dose of anthocyanins in humans. J Agric Food Chem. 2010 Dec 8;58(23):12130–6.

130. Stalmach A, Edwards CA, Wightman JD, Crozier A. Identification of (poly)phenolic compounds in concord grape juice and their metabolites in human plasma and urine after juice consumption. J Agric Food Chem. 2011 Sep 14;59(17):9512–22.

131. Mazza GJ. Anthocyanins and heart health. Ann dell'Istituto Super di sanità. 2007;43(4):369–74.

132. Burns J, Gardner PT, O'Neil J, Crawford S, Morecroft I, McPhail DB, et al. Relationship among antioxidant activity, vasodilation capacity, and phenolic content of red wines. J Agric Food Chem. 2000;48(2):220–30.

133. Nakaishi H, Matsumoto H, Tominaga S, Hirayama M. Effects of black currant anthocyanoside intake on dark adaptation and VDT work-induced transient refractive alteration in healthy humans. Altern Med Rev. 2000;5(6):553–62.

134. Pietta PG. Flavonoids as antioxidants. J Nat Prod. 2000 Jul;63(7):1035–42.

135. Kumar S, Pandey AK. Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. ScientificWorldJournal. 2013 Dec 29;2013:162750.

136. Birt DF, Hendrich S, Wang W. Dietary agents in cancer prevention: flavonoids and isoflavonoids. Pharmacol Ther. 2001;90(2–3):157–77.

137. Cesaretti MLR, Kohlmann Junior O. Modelos experimentais de resistência à insulina e obesidade: lições aprendidas. Arq Bras Endocrinol Metabol. 2006 Apr;50(2):190–7.

138. Rupasinghe HPV, Boehm MMA, Sekhon-Loodu S, Parmar I, Bors B, Jamieson AR. Anti-Inflammatory Activity of Haskap Cultivars is Polyphenols-Dependent. Biomolecules. 2015;5(2):1079–98.

139. Määttä-Riihinen KR, Kamal-Eldin A, Mattila PH, González-Paramás AM, Törrönen AR. Distribution and Contents of Phenolic Compounds in Eighteen Scandinavian Berry Species. J Agric Food Chem. 2004;52(14):4477–86.

140. Kalt W, McDonald JE, Donner H. Anthocyanins, Phenolics, and Antioxidant Capacity of Processed Lowbush Blueberry Products. J Food Sci. 2000 Apr;65(3):390–3.

141. Nyman NA, Kumpulainen JT. Determination of Anthocyanidins in Berries and Red Wine by High-Performance Liquid Chromatography. J Agric Food Chem. 2001;49(9):4183–7.

142. Karlsen A, Paur I, Bøhn SK, Sakhi AK, Borge GI, Serafini M, et al. Bilberry juice modulates plasma concentration of NF-kappaB related inflammatory markers in subjects at increased risk of CVD. Eur J Nutr. 2010 Sep;49(6):345–55.

143. Duffey KJ, Sutherland LA. Adult cranberry beverage consumers have healthier macronutrient intakes and measures of body composition compared to non-consumers: National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) 2005-2008. Nutrients. 2013 Dec;5(12):4938–49.

144. Duarte S, Gregoire S, Singh AP, Vorsa N, Schaich K, Bowen WH, et al. Inhibitory effects of cranberry polyphenols on formation and acidogenicity of Streptococcus mutans biofilms. FEMS Microbiol Lett. 2006 Apr;257(1):50–6.

145. Novotny JA, Baer DJ, Khoo C, Gebauer SK, Charron CS. Cranberry juice consumption lowers markers of cardiometabolic risk, including blood pressure and circulating C-reactive protein, triglyceride, and glucose concentrations in adults. J Nutr. 2015 Jun;145(6):1185–93.

146. Cassidy A, Rogers G, Peterson JJ, Dwyer JT, Lin H, Jacques PF. Higher dietary anthocyanin and flavonol intakes are associated with anti-inflammatory effects in a population of US adults. Am J Clin Nutr. 2015 Jul;102(1):172–81.

147. Tsuda T, Horio F, Uchida K, Aoki H, Osawa T. Dietary Cyanidin 3-O-β-D-Glucoside-Rich Purple Corn Color Prevents Obesity and Ameliorates Hyperglycemia in Mice. J Nutr. 2003 Jul 1;133(7):2125–30.

148. Tsuda T, Ueno Y, Yoshikawa T, Kojo H, Osawa T. Microarray profiling of gene expression in human adipocytes in response to anthocyanins. Biochem Pharmacol. 2006 Apr 14;71(8):1184–97.

149. Ribeiro LDO, Mendes MF, Pereira CDSS. Avaliação da Composição Centesimal, Mineral e Teor de Antocianinas da Polpa de Juçaí (Euterpe edulis Martius). Rev Eletrônica TECCEN. 2016 Nov 17;4(3):5.

150. Chaturvedula VSP, Gao Z, Jones SH, Feng X, Hecht SM, Kingston DGI. A new ursane triterpene from Monochaetum vulcanicum that inhibits DNA polymerase beta lyase. J Nat Prod. 2004;67(5):899–901.

151. Reis CDOS, Bieras AC, Graças DAS. Anatomia foliar de Melastomataceae do Cerrado do Estado de São Paulo. Brazilian J Bot. 2005;2:451–66.

152. Clausing G, Renner SS. Molecular phylogenetics of melastomataceae and memecylaceae: Implications for character evolution. Am J Bot. 2001;88(3):486–98.

153. Rodrigues-lima AA, Affonso P. Miconia Ruiz & Pav. no Núcleo Curucutu, Parque Estadual da Serra do Mar, Estado de São Paulo, Brasil. Hoehnea. 2016;43(1):77–86.

154. Camargo EA, Souza CMF de, Caddah MK, Goldenberg R. O gênero Leandra, seções Carassanae, Chaetodon, Niangae, Oxymeris E Secundiflorae (Melastomataceae) no estado do Paraná. Rodriguésia. 2009;60:595–631.

155. Menezes C, Ramos L. A tribo Melastomeae (Melastomataceae juss.) na mata atlântica no nordeste oriental. 2013.

156. Renato Goldenberg JFAB& MLDRS. Taxonomia de Melastomataceae no Brasil: retrospectiva, perspectivas e chave de identificação para os gêneros. Rodriguésia. 2012;63(1):145–61.

157. Romero R. Revisão taxonômica de Microlicia sect . Chaetostomoides (Melastomataceae). Rev Bras Botânica. 2003;1:429–35.

158. Santos D, Cassiano A, Branco A, Regina T. Caracterização morfoanatômica de folhas e caules de Microlicia hatschbachii Wurdack , Melastomataceae. Rev Bras Farmacogn. 2010;20(April 2009):529–35.

159. Gerais M, Romero R, Martins AB. Melastomataceae do Parque Nacional da Serra da Canastra, Minas Gerais, Brasil. Rev Bras Botânica. 2002;3:19–24.

160. Chaetostoma O, Neste T, Chaetostoma T, We T, Chaetostoma K. A tribo Microlicieae (Melastomataceae) no estado do Paraná Resumo. Rodriguésia. 2015;66(1):155–65.

161. Bomfim-Patrício MC, Salatino A, Martins AB, Wurdack JJ, Salatino MLF. Flavonoids of Lavoisiera, Microlicia and Trembleya (Melastomataceae) and their taxonomic meaning. Biochem Syst Ecol. 2001;29(7):711–26.

162. Fallis A. Alelopatia em Miconia spp. Ruiz & Pavon (melastomataceae juss.) sobre a germinação, desenvolvimento e mitose de lactuca sativa l. J Chem Inf Model. 2013;53(9):1689–99.

163. Fallis A. Variabilidade genética em populações de uma espécie apomítica, Leandra australis (cham.) Cogn., do estado do Paraná. J Chem Inf Model. 2013;53(9):1689–99.

164. Martin C V, Little DP, Goldenberg R. A phylogenetic evaluation of Leandra (Miconieae, Melastomataceae): a polyphyletic genus where the seeds tell the story, not the petals. Cladistics. 2007;24:315–27.

165. Martin C V., Michelangeli FA. Comparative seed morphology of Leandra (Miconieae, Melastomataceae). Brittonia. 2009;61(2):175–88.

166. Michelangeli FA, Rodriguez E. Absence of cyanogenic glycosides in the tribe Miconieae (Melastomataceae). Biochem Syst Ecol. 2005;33(4):335–9.

167. Kinupp VF. Plantas alimentícias não-convencionais da região metropolitana metropolitana de Porto Alegre, RS. 2007.

168. Piriz M. Medicinal plants in the supplementary treatment of diabetes mellitus. Rev Enferm UFPE line. 2011;5(7):1738–43.

169. Avancini CAM, Wiest JM. Etnomedicina veterinária, etnonosotaxia e etnoterapêutica de doenças de pele como referência para seleção e avaliação preliminar da atividade antibacteriana de plantas nativas no sul do Brasil. Rev Bras Plantas Med. 2008;10(1):21–8.

170. Schiavon DBA. Resgate etnobotânico de plantas medicinais e validação da sua atividade antibacteriana. J Chem Inf Model. 2015;53(9):1689–99.

171. Chaves ÓM, Rother MS. Leandra australis (Cham.) Cogn. Flora Digital UFRGS. 2012.

172. Chintamunnee V, Mahomoodally MF. Herbal medicine commonly used against non-communicable diseases in the tropical island of Mauritius. J Herb Med. 2012;2(4):113–25.

173. Arbex AK, Rocha DRTW, Aizenberg M, Ciruzzi MS. Obesity epidemic in Brazil and Argentina: a public health concern. J Health Popul Nutr. 2014 Jun;32(2):327–34.

174. Tukappa AN, Londonkar RL, Kumar SC. Standardization of extraction process for Rumex vesicarius L. Int J Sci Eng Res. 2014;5(8):1061–4.

175. Souza VR de, Pereira PAP, da Silva TLT, de Oliveira Lima LC, Pio R, Queiroz F. Determination of the bioactive compounds, antioxidant activity and chemical composition of Brazilian blackberry, red raspberry, strawberry, blueberry and sweet cherry fruits. Food Chem. 2014 Aug 1;156:362–8.

176. Reque PM, Steffens RS, Silva AM Da, Jablonski A, Flôres SH, Rios A de O, et al. Characterization of blueberry fruits (Vaccinium spp.) and derived products. Food Sci Technol. 2014 Dec;34(4):773–9.

177. Cho MJ, Howard LR, Prior RL, Clark JR. Flavonoid glycosides and antioxidant capacity of various blackberry, blueberry and red grape genotypes determined by high-performance liquid chromatography/mass spectrometry. J Sci Food Agric. 2004 Oct 1;84(13):1771–82.

178. Ross KA, Ehret D, Godfrey D, Fukumoto L, Diarra M. Characterization of Pilot Scale Processed Canadian Organic Cranberry (*Vaccinium macrocarpon*) and Blueberry (*Vaccinium angustifolium*) Juice Pressing Residues and Phenolic-Enriched Extractives. Int J Fruit Sci. 2017 Apr 3;17(2):202–32.

179. Zielinska M, Zielinska D, Markowski M. The Effect of Microwave-Vacuum Pretreatment on the Drying Kinetics, Color and the Content of Bioactive

Compounds in Osmo-Microwave-Vacuum Dried Cranberries (Vaccinium macrocarpon). Food Bioprocess Technol. 2017 Nov 29;1–18.

180. Lutz M, Hernández J, Henríquez C. Phenolic content and antioxidant capacity in fresh and dry fruits and vegetables grown in Chile. CyTA -Journal Food. 2015;134:541–7.

181. de Sá LZCM, Castro PFS, Lino FMA, Bernardes MJC, Viegas JCJ, Dinis TCP, et al. Antioxidant potential and vasodilatory activity of fermented beverages of jabuticaba berry (Myrciaria jaboticaba). J Funct Foods. 2014 May 1;8:169–79.

182. Reynertson KA, Yang H, Jiang B, Basile MJ, Kennelly EJ. Quantitative analysis of antiradical phenolic constituents from fourteen edible Myrtaceae fruits. Food Chem. 2008 Aug 15;109(4):883–90.

183. Batista ÂG, Lenquiste SA, Cazarin CBB, da Silva JK, Luiz-Ferreira A, Bogusz S, et al. Intake of jaboticaba peel attenuates oxidative stress in tissues and reduces circulating saturated lipids of rats with high-fat diet-induced obesity. J Funct Foods. 2014 Jan 1;6:450–61.

184. González-Neves G, Gil G, Favre G, Ferrer M. Potencial polifenólico de la uva: índices propuestos y posibles aplicaciones. Comun Sci. 2011;2(2):57–69.

185. Molina-Quijada DMA, Medina-Juárez LA, González-Aguilar GA, Robles-Sánchez RM, Gámez-Meza N. Compuestos fenólicos y actividad antioxidante de cáscara de uva (Vitis vinifera L.) de mesa cultivada en el noroeste de México Phenolic compounds and antioxidant activity of table grape (Vitis vinifera L.) skin from northwest Mexico. CyTA - J Food. 2010 May;8(1):57–63.

186. Cunha MMR, Ribeiro MM. Avaliação do perfil fenólico e atividade antioxidante de suplementos alimentares baseados em frutas e legumes. 2016.

187. Gordon A, Cruz APG, Cabral LMC, de Freitas SC, Taxi CMAD, Donangelo CM, et al. Chemical characterization and evaluation of antioxidant properties of Açaí fruits (Euterpe oleraceae Mart.) during ripening. Food Chem. 2012 Jul 15;133(2):256–63.

188. Li W, Hydamaka A, Lowry L, Beta T. Comparison of antioxidant capacity and phenolic compounds of berries, chokecherry and seabuckthorn. Open Life Sci. 2009 Jan 1;4(4):499–506.

189. Nilsson C, Raun K, Yan F, Larsen MO, Tang-Christensen M. Laboratory animals as surrogate models of human obesity. Acta Pharmacol Sin. 2012 Feb 3;33(2):173–81.

190. ANVISA. Farmacopéia Brasileira. 5th ed. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, editor. Brasília; 2010. 545 p.

191. Wagner H, Bladt S. Plant drug analysis : a thin layer chromatography atlas. Springer; 1996. 384 p.

192. Lima CAB de, Lima ÂRA, Mendonça CV, Lopes CV, Heck RM, Lima CAB de,

et al. O uso das plantas medicinais e o papel da fé no cuidado familiar. Rev Gaúcha Enferm. 2016;37(spe).

193. Everette JD, Bryant QM, Green AM, Abbey YA, Wangila GW, Walker RB. Thorough study of reactivity of various compound classes toward the Folin-Ciocalteu reagent. J Agric Food Chem. 2010 Jul 28;58(14):8139–44.

194. Mendonça JL de, Concórdia M, Panizzi C. Protocolo para determinação de açúcares totais em hortaliças pelo método de DNS. Comun Técnico. 2013;(1414–9850):4.

195. Farias JM de, Bom KF, Tromm CB, Luciano TF, Marques SO, Tuon T, et al. Effect of physical training on the adipose tissue of diet-induced obesity mice: interaction between reactive oxygen species and lipolysis. Horm Metab Res. 2013 Mar;45(3):190–6.

196. Razolli DS, Moraes JC, Morari J, Moura RF, Vinolo MA, Velloso LA. TLR4 expression in bone marrow-derived cells is both necessary and sufficient to produce the insulin resistance phenotype in diet-induced obesity. Endocrinology. 2015 Jan;156(1):103–13.

197. Cintra DE, Ropelle ER, Moraes JC, Pauli JR, Morari J, de Souza CT, et al. Unsaturated fatty acids revert diet-induced hypothalamic inflammation in obesity. Kowaltowski AJ, editor. PLoS One. 2012 Jan 18;7(1):e30571.

198. Rosini TC, da Silva ASR, Moraes C de. Obesidade induzida por consumo de dieta: modelo em roedores para o estudo dos distúrbios relacionados com a obesidade. Rev Assoc Med Bras. 2012 May 1;58(3):383–7.

199. White PAS, Cercato LM, Araújo JMD, Souza LA, Soares AF, Barbosa APO, et al. Modelo de obesidade induzida por dieta hiperlipídica e associada à resistência à ação da insulina e intolerância à glicose. Arq Bras Endocrinol Metabol. 2013 Jul;57(5):339–45.

200. Wang C-Y, Liao JK. A mouse model of diet-induced obesity and insulin resistance. Methods Mol Biol. 2012;821:421–33.

201. Mazon JN, de Mello AH, Ferreira GK, Rezin GT. The impact of obesity on neurodegenerative diseases. Life Sci. 2017 Aug 1;182:22–8.

202. Johnson PR, Hirsch J. Cellularity of adipose depots in six strains of genetically obese mice. J Lipid Res. 1972 Jan;13(1):2–11.

203. Hansen PA, Han DH, Nolte LA, Chen M, Holloszy JO. DHEA protects against visceral obesity and muscle insulin resistance in rats fed a high-fat diet. Am J Physiol. 1997 Nov;273(5 Pt 2):R1704-8.

204. Draper HH, Hadley M. Malondialdehyde determination as index of lipid Peroxidation. Methods Enzymol. 1990;186:421–31.

205. Draper HH, Hadley M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. Methods Enzymol. 1990;186:421–31.

206. Levine A, Tenhaken R, Dixon R, Lamb C. H2O2 from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. Cell. 1994 Nov 18;79(4):583–93.

207. Puhl H, Waeg G, Esterbauer H. Methods to determine oxidation of low-density lipoproteins. Methods Enzymol. 1994;233:425–41.

208. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem. 1951 Nov;193(1):265–75.

209. Aebi H. Catalase in vitro. Methods Enzymol. 1984;105:121–6.

210. Goldenberg R, Varassin IG. Sistemas reprodutivos de espécies de Melastomataceae da Serra do Japi, Jundiaí, São Paulo, Brasil. Rev Bras Botânica. 2001 Sep;24(3):283–8.

211. Shofian NM, Hamid AA, Osman A, Saari N, Anwar F, Dek MSP, et al. Effect of freeze-drying on the antioxidant compounds and antioxidant activity of selected tropical fruits. Int J Mol Sci. 2011;12(7):4678–92.

212. Corrêa PC, Resende O, Martinazzo AP, Goneli ALD, Botelho FM. Modelagem matemática para a descrição do processo de secagem do feijão (Phaseolus vulgaris L.) em camadas delgadas. Eng Agrícola. 2007 Aug;27(2):501–10.

213. Bourdoux S, Li D, Rajkovic A, Devlieghere F, Uyttendaele M. Performance of Drying Technologies to Ensure Microbial Safety of Dried Fruits and Vegetables. Compr Rev Food Sci Food Saf. 2016 Nov 1;15(6):1056–66.

214. Gava AJ, Silva CAB da, Frias JRG. Tecnologia de alimentos : princípios e aplicações. Nobel; 2008.

215. Gazola MB, Pegorini D, Lima VA de, Roncatti R, Teixeira SD, Pereira EA. Elaboração e caracterização de bebidas à base de extrato hidrossolúvel de soja com polpa de pitanga, amora e mirtilo. Bol Cent Pesqui Process Aliment. 2016;34(2):1–14.

216. Carvalho AV, Ferreira Ferreira da Silveira T, Mattietto R de A, Padilha de Oliveira M do S, Godoy HT. Chemical composition and antioxidant capacity of açaí (Euterpe oleracea) genotypes and commercial pulps. J Sci Food Agric. 2017 Mar 1;97(5):1467–74.

217. Lenquiste SA, Batista ÂG, Marineli R da S, Dragano NRV, Maróstica MR. Freeze-dried jaboticaba peel added to high-fat diet increases HDL-cholesterol and improves insulin resistance in obese rats. Food Res Int. 2012 Nov 1;49(1):153–60.

218. Schauss AG, Wu X, Prior RL, Ou B, Patel D, Huang D, et al. Phytochemical and Nutrient Composition of the Freeze-Dried Amazonian Palm Berry, *Euterpe oleraceae* Mart. (Acai). J Agric Food Chem. 2006 Nov 1;54(22):8598–603.

219. Sellappan S, Akoh CC, Krewer G. Phenolic compounds and antioxidant capacity of Georgia-grown blueberries and blackberries. J Agric Food Chem.

2002 Apr 10;50(8):2432–8.

220. Wu X, Prior RL. Systematic Identification and Characterization of Anthocyanins by HPLC-ESI-MS/MS in Common Foods in the United States: Fruits and Berries. J Agric Food Chem. 2005 Apr 6;53(7):2589–99.

221. Mazza G, Brouillard R. Recent developments in the stabilization of anthocyanins in food products. Food Chem. 1987 Jan;25(3):207–25.

222. Timberlake CF, Bridle P. Spectral Studies of Anthocyanin and Anthocyanidin Equilibria in Aqueous Solution. Nature. 1966 Oct 8;212(5058):158–9.

223. Lee W, Ku S-K, Bae J-S. Barrier protective effects of rutin in LPS-induced inflammation in vitro and in vivo. Food Chem Toxicol. 2012 Sep;50(9):3048–55.

224. Mahmoud AM. Influence of rutin on biochemical alterations in hyperammonemia in rats. Exp Toxicol Pathol. 2012 Nov;64(7–8):783–9.

225. Schneider ALS, Bertelli PR, Barreto ML, Abreu NV, Agostini F, Chwambach J. Caracterização química e atividade biológica de extratos aquosos de Brunfelsia cuneifolia. Rev Bras Plantas Med. 2015;17(4):1103–11.

226. Heleno SA, Martins A, Queiroz MJRP, Ferreira ICFR. Bioactivity of phenolic acids: Metabolites versus parent compounds: A review. Food Chem. 2015 Apr 15;173:501–13.

227. Donno D, Beccaro GL, Mellano MG, Cerutti AK, Bounous G. Goji berry fruit (Lycium spp.): antioxidant compound fingerprint and bioactivity evaluation. J Funct Foods. 2015 Oct 1;18:1070–85.

228. Molan AL, Lila MA, Mawson J. Satiety in rats following blueberry extract consumption induced by appetite-suppressing mechanisms unrelated to in vitro or in vivo antioxidant capacity. Food Chem. 2008 Apr 1;107(3):1039–44.

229. Oliveira VS, Afonso MRA, Costa JMC. Caracterização físico-química e comportamento higroscópico de sapoti liofilizado. Rev Ciência Agronômica. 2011 Apr 26;42(2):342–8.

230. Naczk M, Shahidi F. Extraction and analysis of phenolics in food. J Chromatogr A. 2004 Oct 29;1054(1–2):95–111.

231. Scalbert A, Johnson IT, Saltmarsh M. Polyphenols: antioxidants and beyond. Am J Clin Nutr. 2005 Jan 1;81(1 Suppl):215–7.

232. Lima A de JB, Corrêa AD, Dantas-Barros AM, Nelson DL, Amorim ACL. Sugars, organic acids, minerals and lipids in jabuticaba. Rev Bras Frutic. 2011 Jun;33(2):540–50.

233. Zheng W, Wang SY. Oxygen Radical Absorbing Capacity of Phenolics in Blueberries, Cranberries, Chokeberries, and Lingonberries. J Agric Food Chem. 2003 Jan 15;51(2):502–9.

234. Lachowicz S, Oszmiański J, Seliga Ł, Pluta S. Phytochemical Composition and Antioxidant Capacity of Seven Saskatoon Berry (Amelanchier alnifolia Nutt.) Genotypes Grown in Poland. Molecules. 2017 May 21;22(6):853.

235. Lima A de JB, Corrêa AD, Alves APC, Abreu CMP, Dantas-Barros AM. Caracterização química das jabuticabas (Myrciaria cauliflorara Berg) e respectivas frações. Arch Latinoam Nutr. 2008;58(4):416–21.

236. Prior RL, Wilkes S, Rogers T, Khanal RC, Wu X, Hager TJ, et al. Dietary Black Raspberry Anthocyanins Do Not Alter Development of Obesity in Mice Fed an Obesogenic High-Fat Diet †. J Agric Food Chem. 2010 Apr 14;58(7):3977–83.

237. Takikawa M, Inoue S, Horio F, Tsuda T. Dietary Anthocyanin-Rich Bilberry Extract Ameliorates Hyperglycemia and Insulin Sensitivity via Activation of AMP-Activated Protein Kinase in Diabetic Mice. J Nutr. 2010 Mar 1;140(3):527–33.

238. DeFuria J, Bennett G, Strissel KJ, Perfield JW, Milbury PE, Greenberg AS, et al. Dietary Blueberry Attenuates Whole-Body Insulin Resistance in High Fat-Fed Mice by Reducing Adipocyte Death and Its Inflammatory Sequelae. J Nutr. 2009 Aug 1;139(8):1510–6.

239. Andrade GF, de Almeida C das G, Espeschit ACR, Dantas MI de S, Benjamin L dos A, Ribeiro SMR, et al. The addition of whole soy flour to cafeteria diet reduces metabolic risk markers in wistar rats. Lipids Health Dis. 2013 Oct 11;12:145.

240. Wang SY, Chen H, Camp MJ, Ehlenfeldt MK. Flavonoid constituents and their contribution to antioxidant activity in cultivars and hybrids of rabbiteye blueberry (Vaccinium ashei Reade). Food Chem. 2012 May 15;132(2):855–64.

241. Oliveira de Souza M, Silva M, Silva ME, de Paula Oliveira R, Pedrosa ML. Diet supplementation with acai (Euterpe oleracea Mart.) pulp improves biomarkers of oxidative stress and the serum lipid profile in rats. Nutrition. 2010 Jul;26(7–8):804–10.

242. Borges LL, Conceição EC, Silveira D. Active compounds and medicinal properties of Myrciaria genus. Food Chem. 2014 Jun 15;153:224–33.

243. Brooks SPJ, Lampi BJ. The effect of changing dietary fat and carbohydrate on the enzymes of amino acid metabolism. J Nutr Biochem. 1995 Aug 1;6(8):414–21.

244. Soares Melo S, da Silva Chiarelli D, Luiza Laurentino M. Hibiscus cannabinus: efeitos nos parâmetros nutricionais e bioquímicos de ratos dislipidêmicos. O mundo da saúde. 2016;40(1):11–20.

245. McGhie TK, Ainge GD, Barnett LE, Cooney JM, Jensen DJ. Anthocyanin Glycosides from Berry Fruit Are Absorbed and Excreted Unmetabolized by Both Humans and Rats. J Agric Food Chem. 2003 Jul 30;51(16):4539–48.

246. Takikawa M, Inoue S, Horio F, Tsuda T. Dietary Anthocyanin-Rich Bilberry

Extract Ameliorates Hyperglycemia and Insulin Sensitivity via Activation of AMP-Activated Protein Kinase in Diabetic Mice1–3. J Nutr. 2010 Mar 1;140(3):527–33.

247. Ichiyanagi T, Shida Y, Rahman MM, Hatano Y, Konishi T. Bioavailability and Tissue Distribution of Anthocyanins in Bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) Extract in Rats. J Agric Food Chem. 2006 Sep 6;54(18):6578–87.

248. Gotoh K, Inoue M, Masaki T, Chiba S, Shimasaki T, Ando H, et al. A novel anti-inflammatory role for spleen-derived interleukin-10 in obesity-induced hypothalamic inflammation. J Neurochem. 2012 Mar;120(5):752–64.

249. Tarantino G, Scalera A, Finelli C. Liver-spleen axis: intersection between immunity, infections and metabolism. World J Gastroenterol. 2013 Jun 21;19(23):3534–42.

250. Cohen JC, Horton JD, Hobbs HH. Human Fatty Liver Disease: Old Questions and New Insights. Science (80-). 2011 Jun 24;332(6037):1519–23.

251. Valenti L, Riso P, Mazzocchi A, Porrini M, Fargion S, Agostoni C. Dietary anthocyanins as nutritional therapy for nonalcoholic fatty liver disease. Oxid Med Cell Longev. 2013 Oct 24;2013:145421.

252. Liu S, Wu Z, Guo S, Meng X, Chang X. Polyphenol-rich extract from wild Lonicera caerulea berry reduces cholesterol accumulation by mediating the expression of hepatic miR-33 and miR-122, HMGCR, and CYP7A1 in rats. J Funct Foods. 2018 Jan 1;40:648–58.

253. Choi M-H, Shim S-M, Kim G-H. Phenolic acids and quercetin from Korean black raspberry seed protected against acetaminophen-induced oxidative stress in mice. J Funct Foods. 2015 Dec 1;19:404–16.

254. Zhao M, Wang P, Zhu Y, Liu X, Hu X, Chen F. Blueberry anthocyanins extract inhibits acrylamide-induced diverse toxicity in mice by preventing oxidative stress and cytochrome P450 2E1 activation. J Funct Foods. 2015 Apr 1;14:95–101.

255. Rodríguez-González S, Pérez-Ramírez IF, Amaya-Cruz DM, Gallegos-Corona MA, Ramos-Gomez M, Mora O, et al. Polyphenol-rich peach (Prunus persica L.) by-product exerts a greater beneficial effect than dietary fiber-rich by-product on insulin resistance and hepatic steatosis in obese rats. J Funct Foods. 2018 Jun;45:58–66.

256. Van Hul M, Geurts L, Plovier H, Druart C, Everard A, Ståhlman M, et al. Reduced obesity, diabetes, and steatosis upon cinnamon and grape pomace are associated with changes in gut microbiota and markers of gut barrier. Am J Physiol Metab. 2018 Apr;314(4):E334–52.

257. Anhê FF, Varin T V., Le Barz M, Pilon G, Dudonné S, Trottier J, et al. Arctic berry extracts target the gut–liver axis to alleviate metabolic endotoxaemia, insulin resistance and hepatic steatosis in diet-induced obese mice. Diabetologia. 2018 Apr 21;61(4):919–31.

258. Anhê FF, Nachbar RT, Varin T V, Vilela V, Dudonné S, Pilon G, et al. A polyphenol-rich cranberry extract reverses insulin resistance and hepatic steatosis independently of body weight loss. Mol Metab. 2017 Dec;6(12):1563–73.

259. Braud L, Battault S, Meyer G, Nascimento A, Gaillard S, de Sousa G, et al. Antioxidant properties of tea blunt ROS-dependent lipogenesis: beneficial effect on hepatic steatosis in a high fat-high sucrose diet NAFLD obese rat model. J Nutr Biochem. 2017 Feb 1;40:95–104.

260. Li S, Tan HY, Wang N, Cheung F, Hong M, Feng Y. The Potential and Action Mechanism of Polyphenols in the Treatment of Liver Diseases. Oxid Med Cell Longev. 2018 Feb 4;2018:1–25.

261. Vendrame S, Daugherty A, Kristo AS, Klimis-Zacas D. Wild blueberry (Vaccinium angustifolium)-enriched diet improves dyslipidaemia and modulates the expression of genes related to lipid metabolism in obese Zucker rats. Br J Nutr. 2014 Jan 6;111(2):194–200.

262. Jia Y, Kim J-Y, Jun H, Kim S-J, Lee J-H, Hoang MH, et al. Cyanidin is an agonistic ligand for peroxisome proliferator-activated receptor-alpha reducing hepatic lipid. Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids. 2013 Apr;1831(4):698–708.

263. Chang J-J, Hsu M-J, Huang H-P, Chung D-J, Chang Y-C, Wang C-J. Mulberry Anthocyanins Inhibit Oleic Acid Induced Lipid Accumulation by Reduction of Lipogenesis and Promotion of Hepatic Lipid Clearance. J Agric Food Chem. 2013 Jun 26;61(25):6069–76.

264. Guo H, Liu G, Zhong R, Wang Y, Wang D, Xia M. Cyanidin-3-O-β-glucoside regulates fatty acid metabolism via an AMP-activated protein kinase-dependent signaling pathway in human HepG2 cells. Lipids Health Dis. 2012 Jan 13;11(1):10.

265. Guo H, Li D, Ling W, Feng X, Xia M. Anthocyanin inhibits high glucose-induced hepatic mtGPAT1 activation and prevents fatty acid synthesis through PKCζ. J Lipid Res. 2011 May;52(5):908–22.

266. Liu Y, Wang D, Zhang D, Lv Y, Wei Y, Wu W, et al. Inhibitory Effect of Blueberry Polyphenolic Compounds on Oleic Acid-Induced Hepatic Steatosis in Vitro. J Agric Food Chem. 2011 Nov 23;59(22):12254–63.

267. Hwang YP, Choi JH, Han EH, Kim HG, Wee J-H, Jung KO, et al. Purple sweet potato anthocyanins attenuate hepatic lipid accumulation through activating adenosine monophosphate–activated protein kinase in human HepG2 cells and obese mice. Nutr Res. 2011 Dec;31(12):896–906.

268. Arsenijevic D, Cajot J-F, Dulloo AG, Montani J-P. Uninephrectomy in rats on a fixed food intake results in adipose tissue lipolysis implicating spleen cytokines. Front Physiol. 2015 Jul 10;6:195.

269. Pestka S, Krause CD, Sarkar D, Walter MR, Shi Y, Fisher PB. I nterleukin -10

and R elated C ytokines and R eceptors. Annu Rev Immunol. 2004 Apr;22(1):929–79.

270. Martinez-Micaelo N, González-Abuín N, Mulero M, Pinent M, Ardévol A, Blay M. Procyanidins and docosahexaenoic acid suppress inflammation and boost immune system in cafeteria diet-fed rats. J Funct Foods. 2015 May 1;15:61–71.

271. Fernandes F de S. Estudo pré-clínico de toxicidade do extrato acetato de etila do fruto de Dillenia indica padronizado em ácido betulínico e administrado topicamente em camundongos. Universidade do Sul de Santa Catarina; 2017.

272. Tavares-Dias M, Martins ML, Moraes FR, Kronka SN. Fator de condição e relação hepato e esplenossomática em teleósteos de água doce naturalmente parasitados. Acta Sci Biol Sci. 2008 May 9;22(0):533–7.

273. Costa AGV, Garcia-Diaz DF, Jimenez P, Silva PI. Bioactive compounds and health benefits of exotic tropical red–black berries. J Funct Foods. 2013 Apr 1;5(2):539–49.

274. Oliveira MC de, Schoffen JPF. Oxidative stress action in cellular aging. Brazilian Arch Biol Technol. 2010 Dec;53(6):1333–42.

275. Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O. Oxidative Stress and Antioxidant Defense. World Allergy Organ J. 2012 Jan;5(1):9–19.

276. Leite A V., Malta LG, Riccio MF, Eberlin MN, Pastore GM, Maróstica Júnior MR. Antioxidant Potential of Rat Plasma by Administration of Freeze-Dried Jaboticaba Peel (Myrciaria jaboticaba Vell Berg). J Agric Food Chem. 2011 Mar 23;59(6):2277–83.

277. Hoepers A. Efeito do exercício físico aeróbio sobre a degeneração de tecido muscular e neuronal em um modelo animal de distrofia muscular de Duchenne. 2015;

278. Kim MJ, Jung HN, Kim KN, Kwak H-K. Effects of cranberry powder on serum lipid profiles and biomarkers of oxidative stress in rats fed an atherogenic diet. Nutr Res Pract. 2008;2(3):158–64.

279. Himmelfarb J, McMonagle E. Albumin is the major plasma protein target of oxidant stress in uremia. Kidney Int. 2001 Jul;60(1):358–63.

280. Vanzo A, Vrhovsek U, Tramer F, Mattivi F, Passamonti S. Exceptionally Fast Uptake and Metabolism of Cyanidin 3-Glucoside by Rat Kidneys and Liver. J Nat Prod. 2011 May 27;74(5):1049–54.

281. Lushchak VI. Glutathione Homeostasis and Functions: Potential Targets for Medical Interventions. J Amino Acids. 2012 Feb 28;2012:1–26.

282. de Assis AM, Rech A, Longoni A, Rotta LN, Denardin CC, Pasquali MA, et al. Ω3-Polyunsaturated fatty acids prevent lipoperoxidation, modulate antioxidant enzymes, and reduce lipid content but do not alter glycogen metabolism in the livers of diabetic rats fed on a high fat thermolyzed diet. Mol Cell Biochem.

2012 Feb 12;361(1–2):151–60.

283. Lee S-J, Choi S-K, Seo J-S. Grape skin improves antioxidant capacity in rats fed a high fat diet. Nutr Res Pract. 2009;3(4):279–85.

284. Wilmsen PK, Spada DS, Salvador M. Antioxidant Activity of the Flavonoid Hesperidin in Chemical and Biological Systems. J Agric Food Chem. 2005 Jun 15;53(12):4757–61.

285. Dos Santos DS, Farias Rodrigues MM, Rodrigues MMF. Atividades farmacológicas dos flavonoides: um estudo de revisão. Estação Científica (UNIFAP). 2017 Nov 6;7(3):29.

286. Johnson AR, Milner JJ, Makowski L. The inflammation highway: metabolism accelerates inflammatory traffic in obesity. Immunol Rev. 2012 Sep;249(1):218–38.

287. Lee H, Lee IS, Choue R. Obesity, Inflammation and Diet. Pediatr Gastroenterol Hepatol Nutr. 2013 Sep;16(3):143.

288. McArdle MA, Finucane OM, Connaughton RM, McMorrow AM, Roche HM. Mechanisms of Obesity-Induced Inflammation and Insulin Resistance: Insights into the Emerging Role of Nutritional Strategies. Front Endocrinol (Lausanne). 2013;4:52.

289. Roberts CK, Sindhu KK. Oxidative stress and metabolic syndrome. Life Sci. 2009 May 22;84(21–22):705–12.

290. Vincent HK, Taylor AG. Biomarkers and potential mechanisms of obesity-induced oxidant stress in humans. Int J Obes. 2006 Mar 22;30(3):400–18.

291. Bondia-Pons I, Ryan L, Martinez JA. Oxidative stress and inflammation interactions in human obesity. J Physiol Biochem. 2012 Dec 17;68(4):701–11.

292. Newton K, Dixit VM. Signaling in Innate Immunity and Inflammation. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2012 Mar 1;4(3):a006049–a006049.

293. Milanski M, Degasperi G, Coope A, Morari J, Denis R, Cintra DE, et al. Saturated fatty acids produce an inflammatory response predominantly through the activation of TLR4 signaling in hypothalamus: implications for the pathogenesis of obesity. J Neurosci. 2009 Jan 14;29(2):359–70.

294. Horng T, Hotamisligil GS. Linking the inflammasome to obesity-related disease. Nat Med. 2011 Feb 1;17(2):164–5.

295. Kleinridders A, Könner AC, Brüning JC. CNS-targets in control of energy and glucose homeostasis. Curr Opin Pharmacol. 2009 Dec;9(6):794–804.

296. Kälin S, Heppner FL, Bechmann I, Prinz M, Tschöp MH, Yi C-X. Hypothalamic innate immune reaction in obesity. Nat Rev Endocrinol. 2015 Jun;11(6):339–51.

297. de Mello AH, Uberti MF, de Farias BX, de Souza NAR, Rezin GT. n-3 PUFA and obesity: from peripheral tissues to the central nervous system. Br J Nutr. 2018 Mar 27;1–12.

298. Boitard C, Cavaroc A, Sauvant J, Aubert A, Castanon N, Layé S, et al. Impairment of hippocampal-dependent memory induced by juvenile high-fat diet intake is associated with enhanced hippocampal inflammation in rats. Brain Behav Immun. 2014 Aug;40:9–17.

299. Possas JL dos S, dos Santos JE, Nascimento MC do;, dos Santos PA, dos Anjos DWC, de Moura WC. Uso do conceito do erro total, dos perfis de exatidão e do índice de exatidão no pré-estudo de validação de ensaio imunoenzimático. Rev do Inst Adolfo Lutz. 2012;71(4):691–705.