

SANDRAMARA SASSO

EFEITOS DO EXTRATO AQUOSO DA FOLHA DA GRAVIOLA (*Annona muricata* Linn) EM MODELO EXPERIMENTAL DE OBESIDADE

Campo Grande

2017

SANDRAMARA SASSO

EFEITOS DO EXTRATO AQUOSO DA FOLHA DA GRAVIOLA (*Annona muricata* Linn) EM MODELO EXPERIMENTAL DE OBESIDADE

Defesa apresentada como requisito para obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Karine de Cássia Freitas.

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Rita de Cássia Avellaneda Guimarães.

Campo Grande

2017

SANDRAMARA SASSO

EFEITOS DO EXTRATO AQUOSO DA FOLHA DA GRAVIOLA (*Annona muricata* Linn) EM MODELO EXPERIMENTAL DE OBESIDADE

Defesa apresentada como requisito para obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

A banca examinadora, após a avaliação do trabalho, atribuiu ao candidato o conceito

Campo Grande, 30 de março de 2017

BANCA EXAMINADORA

CONCEITO

Karine de Cássia Freitas Gielow – CCBS – UFMS (coordenador)

Danielle Bogo – CCBS – UFMS

Fabiane La Flor Ziegler Sanches – CCBS – UFMS

Luana Silva Soares – CCBS – UFMS (suplente)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus pela vida e por mais esta conquista,

À Maria nossa mãe que me conduz e ajuda em todos os momentos difíceis,

Aos meus pais e minha irmã pelo exemplo de integridade, pelos valores repassados, amor e carinho imensuráveis, e por apostarem no meu sucesso, me apoiando sempre e incentivando incondicionalmente,

À minha orientadora Prof^a Dr^a Karine e coorientadora Prof^a Dr^a Rita meus exemplos de dedicação, competência, responsabilidade e seriedade. Agradeço por terem me acolhido como “Orientada”, pela disponibilidade em partilhar experiências e por todo ensinamento,

À Prof^a Dr^a Cláudia, Prof Dr Flavio, Prof^a Dr^a Luciane, Prof^a Dr^a Elisvânia, Prof^a Dr^a Giovana e a todos professores da UFMS, pelo apoio, atenção e disponibilidade em partilhar suas experiências e ajuda no meu trabalho,

À Lidiani, Bruna, Vivian, Fernanda, Priscila, Ângela, Luana e Larissa por todas as experiências vividas, aprendizados adquiridos, pela valiosa colaboração na realização dos experimentos e pelo incentivo nos momentos mais difíceis,

À Priscila por toda ajuda durante o projeto e cuidado com os animais,

À minhas tias, primas e amigos que entenderam minha ausência nesses anos e sempre me incentivaram a continuar minha caminhada. Vocês me mostraram que a distância não afasta as pessoas quando a amizade e o carinho são verdadeiros,

Às nutris Isis, Laura e Lidiane muito obrigada por todos momentos de diversão, risadas e estudos. Tenho muito orgulho de ser amiga de vocês!

Agradeço todos os animais, que cederam suas vidas em prol do desenvolvimento da pesquisa,

Ao senhor Deoclides Batistoti por me receber e apoiar esta pesquisa fornecendo as folhas de graviola utilizadas neste estudo,

A todos funcionários do Biotério Central, e da Pós-graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste e técnicos da UFMS que contribuíram na minha busca de novos conhecimentos,

À agência financiadora CAPES, pelo apoio financeiro para o desenvolvimento deste trabalho,

E a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho, o meu MUITO OBRIGADA!

Dedico este trabalho a toda minha família, em especial, para meu pai Ocidio, minha mãe Ivete e minha irmã Maiara pelo amor e esforço na minha formação pessoal e profissional.

“A persistência é o menor caminho do êxito”
(Charles Chaplin)

RESUMO

A obesidade é considerada um importante problema de saúde pública e contribui para o aumento de doenças crônicas. Para o tratamento de suas complicações alternativas farmacológicas ou não-farmacológicas são aplicadas, sendo que no Brasil, muitas plantas com potencial medicinal são utilizadas para este fim. A graviola (*Annona muricata* Linn) é a segunda planta mais citada pela população brasileira para perda de peso. Neste contexto, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do extrato aquoso da folha da graviola (EAG) em camundongos tratados com dieta hiperlipídica. Para tanto, durante 12 semanas, 55 camundongos C57BL6 machos foram tratados com dieta padrão AIN-93M (n=11) ou dieta hiperlipídica (n=44) elaborada com banha para indução de obesidade e suas comorbidades. Após esse período, os animais receberam via gavagem o tratamento com EAG ou salina por 12 semanas. Os animais tratados com dieta padrão receberam salina (grupo SHAM SALINA), e os tratados com dieta hiperlipídica (DLH) foram subdivididos em 4 grupos (n=11): DLH SALINA - Controle, EAG 50 mg/kg, EAG 100 mg/kg, EAG 150mg/kg. Foram avaliados peso corporal, ingestão alimentar e após eutanásia, foram coletados sangue para análises bioquímicas e coxins adiposos, sendo fígado, pâncreas e tecido adiposo epididimal para análise histológica. O perfil glicêmico foi avaliado. Os resultados mostram que os animais tratados com dieta hiperlipídica apresentaram aumento significativo de peso corporal ($p \leq 0,001$) na indução de obesidade, e ao final do tratamento com EAG, o grupo EAG 50 mg/kg apresentou menor ganho de peso, em relação ao grupo SHAM SALINA ($p=0,034$), enquanto o grupo EAG 100 mg/kg teve perda de peso corporal significativa em comparação ao SHAM SALINA ($p=0,003$) e DHL SALINA ($p=0,034$). O EAG não foi eficaz em reduzir significativamente a concentração da glicose plasmática, no entanto, o EAG na dose de 150 mg/kg diminuiu ($p \leq 0,05$) a glicemia no tempo de 15 minutos após a administração da glicose no teste de tolerância oral à glicose, bem como reduziu a flutuação da glicemia. Em relação ao perfil colesterolêmico, não foi observado efeito significativo do EAG sobre o colesterol total e HDL. No entanto, nota-se redução significativa nas concentrações de colesterol-LDL no grupo EAG 150 mg/kg ($p=0,038$) em relação ao grupo DHL SALINA, colesterol-VLDL nos grupos EAG 100 mg/kg ($p=0,031$) e 150 mg/kg ($p=0,030$), e triglicerídeos também nos grupos tratados com EAG 100 mg/kg ($p=0,026$) e 150 mg/kg ($p=0,025$) em comparação ao grupo SHAM. Ainda, o índice aterogênico do grupo EAG 150 mg/kg foi significativamente menor ($p=0,025$) que o grupo DHL SALINA. Não houve redução significativa da adiposidade visceral, no entanto, o extrato atenuou o acúmulo de gordura corporal, observado pela redução no percentual do peso dos coxins adiposos e redução significativa da área do tecido adiposo epididimal. Na histologia do fígado, o EAG não alterou significativamente o acúmulo de gordura hepática e lesões dos hepatócitos, no entanto, a balonização foi mais frequente no grupo DHL SALINA. A análise histológica do pâncreas também não evidenciou diferença entre os grupos. Conclui-se que no modelo estudado o EAG foi eficaz no combate da obesidade e suas alterações metabólicas.

Palavras-chave: Tecido adiposo, plantas medicinais, dieta hiperlipídica, camundongos.

ABSTRACT

Obesity is considered an important public health problem and contributes to the increase of chronic diseases. For the treatment of its complications, pharmacological or non-pharmacological alternatives are applied. In Brazil, many plants with medicinal potential are used for this purpose. Soursop (*Annona muricata* Linn) is the second most cited plant by the Brazilian population for the weight loss. In this context, the objective of this study was to evaluate the effect of aqueous extract of soursop leaf (EAG) in mice treated with high-fat diet. For that, over 12 weeks, 55 male C57BL6 mice were treated with AIN-93M standard diet (n=11) or a high-fat diet (n=44) made with fat to induce obesity and its comorbidities. After this period of time, the animals received gavage treatment with EAG or saline for 12 weeks. The animals treated with the standard diet received saline (SHAM SALINA group), and those treated with the high-fat diet (DLH) were subdivided into 4 groups (n=11): DLH SALINE - Control, EAG 50 mg/kg, EAG 100 mg/kg and EAG 150mg/kg. Body weight and food intake were evaluated and, after euthanasia, blood was collected for biochemical analysis and adipose tissue pads, being the liver, pancreas and epididymal adipose tissue for histological analysis. The glycemic profile was evaluated. The results showed that the animals treated with a high-fat diet had a significant increase in body weight ($p \leq 0.001$) in the induction of obesity and, at the end of the treatment with EAG, the group EAG 50 mg/kg presented lower weight gain compared to the SHAM SALINA group ($p=0.034$), while the EAG group 100 mg/kg had significant body weight loss compared to SHAM SALINA ($p=0.003$) and DHL SALINA ($p=0.034$). The EAG was not effective in significantly reducing plasma glucose concentration, however, EAG at doses of 100 mg/kg and 150 mg/kg decreased ($p \leq 0.05$) the glycemia in the time of 15 minutes after the administration of glucose in the oral glucose tolerance test, as well as reduced glucose fluctuation. Regarding the lipid profile, no significant effect of EAG on total cholesterol and HDL was observed. However, there was a significant reduction in LDL cholesterol levels in the EAG group 150 mg/kg ($p=0.038$) compared to the DHL SALINE group, VLDL cholesterol in the EAG 100 mg/kg ($p=0.031$) and 150 mg/kg ($p=0.030$), and triglycerides were also observed in the groups treated with EAG 100 mg/kg ($p=0.026$) and 150 mg/kg ($p=0.025$) compared to the SHAM group. Furthermore, the atherogen index of the EAG 150 mg/kg group was significantly lower ($p=0.025$) than the DHL SALINA group. There was no significant reduction in visceral adiposity, however, the extract attenuated lipid accumulation, observed by the reduction in the percentage of the weight of the adipose cushions and the area of the epididymal adipose tissue. In liver histology, the EAG did not significantly alter the hepatic fat accumulation and hepatocyte lesions, however, the ballooning was more frequent in the DHL SALINA group. The histological analysis of the pancreas also did not show any difference between the groups. It is concluded that in the studied model the EAG was effective in the fight against obesity and its metabolic changes.

Key words: Adipose tissue, medicinal plants, high-fat diet, mice.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Mecanismos inflamatórios do tecido adiposo na obesidade..	31
Figura 2 Via de sinalização da insulina e inflamação na obesidade.....	34
Figura 3 Patogênese da dislipidemia na hipertrigliceridemia, resistência à insulina, esteatose hepática e obesidade.....	39
Figura 4 - Gravioleira (A) (<i>Annona muricata</i> Linn) (B) folhas (C) flores e (D) frutos..	43
Figura 5 - Delineamento experimental	54
Figura 6 - Análise histológica do fígado e do pâncreas dos grupos corados com hematoxilina-eosina..	81
Figura 7 - Análise histológica do tecido adiposo epididimal corado com hematoxilina-eosina.....	82

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Risco de comorbidades de acordo com a classificação do IMC para adultos	25
Tabela 2 - Composição das dietas experimentais (g/kg ração).....	53
Tabela 3 - Quantificação de flavonoides (mg/g), fenóis totais (mg/g), taninos (mg/g) e atividade antioxidante (DPPH) do extrato aquoso das folhas da graviola, coletadas em junho/2015, em Campo Grande – MS	60
Tabela 4 - Peso inicial e final, ganho de peso e avaliação da ingestão alimentar durante indução de obesidade	63
Tabela 5 - Peso inicial e final, ganho de peso, ingestão alimentar de animais controles e tratados com extrato aquoso das folhas da graviola	64
Tabela 6 - Resultados ao Teste de Tolerância Oral à Glicose nos animais avaliados antes do início do tratamento de acordo com o grupo experimental, em cada tempo avaliado	70
Tabela 7 - Resultados referentes ao teste de tolerância oral à glicose dos animais avaliados ao final do tratamento, de acordo com o grupo experimental, em cada tempo avaliado	71
Tabela 8 - Resultados referentes ao teste de sensibilidade à insulina nos animais avaliados neste estudo, ao final do tratamento, de acordo com o grupo experimental, em cada tempo avaliado	73
Tabela 9- Efeito do extrato aquoso das folhas de graviola sobre os coxins adiposos, Índice de adiposidade e peso do fígado	76
Tabela 10 - Resultados referentes às alterações observadas no pâncreas dos animais, em cada um dos grupos experimentais.....	79
Tabela 11 - Resultados referentes às alterações observadas no fígado dos animais, em cada um dos grupos experimentais.....	80

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Efeito da dieta hiperlipídica e do extrato aquoso da folha de graviola na evolução ponderal, em gramas, dos animais avaliados durante a indução de obesidade e posteriormente no tratamento. (A) Peso corporal de animais alimentados com dieta padrão (SHAM) e dieta hiperlipídica (DHL) durante indução da obesidade por 12 semanas consecutivas (0 – indica peso inicial). (B) Peso de animais controles (SHAM SALINA – dieta padrão com salina, DHL SALINA – dieta hiperlipídica) e tratados com extrato aquoso das folhas de graviola (EAG) nas doses de 50, 100 e 150 mg/kg por 12 semanas (no gráfico representado de 1a dia de tratamento a 24a semana). Os valores representam a média $\pm$ erro padrão da média. * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$ e *** $p \leq 0,001$ vs SHAM SALINA. Teste t de Student e ANOVA seguido de pos test Tukey.65

Gráfico 2 - Avaliação dos parâmetros séricos (A) Glicose sanguínea (mg/dL); (B) Colesterol total (mg/dL); (C) LDL-colesterol (mg/dL); (D) HDL-colesterol (mg/dL); (E) VLDL-colesterol (mg/dL); (F) Triglicérides (mg/dL) e (G) Índice Aterogênico de animais controles (SHAM SALINA – dieta padrão com salina, DHL SALINA – dieta hiperlipídica com salina) e tratados com extrato aquoso das folhas de graviola (EAG) nas doses de 50, 100 e 150 mg/kg entre a 13^a e 24^a semana de estudo. Os valores representam a média $\pm$ erro padrão da média. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ vs SHAM SALINA; # $p < 0,05$ vs DHL SALINA. ANOVA seguido de pos test Tukey.68

Gráfico 3 Avaliação do perfil glicêmico antes e ao final do tratamento com extrato aquoso da folha de graviola (A) Teste de tolerância oral à glicose antes do início do tratamento (12^a semana) de acordo com o grupo experimental em cada tempo avaliado. DHL: Dieta hiperlipídica; EAG: Extrato aquoso de folha de graviola (B) Gráfico apresentando a área sob a curva (AUC), da glicemia dos animais avaliados antes do início do tratamento (12^a semana). * $p < 0,05$, vs SHAM SALINA. ANOVA seguido de pos test Tukey (C) Teste de tolerância oral à glicose no final do tratamento (24^a semana) de acordo com o grupo experimental em cada tempo avaliado. DHL: Dieta hiperlipídica; EAG: Extrato aquoso de folha de graviola (D) Gráfico apresentando a área sob a curva (AUC) da glicemia dos animais avaliados ao final do tratamento (24^a semana). Os valores representam a média $\pm$ erro padrão da média. ANOVA. .72

Gráfico 4 – Avaliação do perfil glicêmico ao final do tratamento com extrato aquoso da folha de graviola (A) Teste de sensibilidade à insulina nos animais avaliados neste estudo, ao final do tratamento, de acordo com o grupo experimental, em cada tempo avaliado. Cada símbolo representa a média e a barra o erro padrão da média. DHL: Dieta hiperlipídica; EAG: Extrato aquoso de folha de graviola (B) Área sob a curva (AUC), teste de sensibilidade à insulina nos animais avaliados neste estudo, ao final do tratamento, de acordo com o grupo experimental. Cada coluna representa a média e a barra, o erro padrão da média. ANOVA.74

Gráfico 5 – Avaliação do acúmulo ectópico de lipídeos, triglicerídeos e colesterol total hepático (A) Lipídeos hepáticos (mg/g); (B) Triglicerídeos hepáticos (mg/dL); (C) Colesterol total hepático (mg/dL) de animais controles (SHAM SALINA – dieta padrão com salina, DHL SALINA – dieta hiperlipídica com salina) e tratados com extrato aquoso das folhas de graviola (EAG) nas doses de 50, 100 e 150 mg/kg entre a 13^a e 24^a semana de estudo. Os valores representam a média $\pm$ erro padrão da média. ANOVA.....77

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µg/mL	Micrograma por mililitro
µL	Microlitro
µl/mL	Microlitro por mililitro
µm	Micrômetro
µm ²	Micrômetro quadrado
Acetil-CoA	Acetilcoenzima A
ADP	Adenosina Difosfato
AIN-93M	<i>American Institute of Nutrition</i>
AKT	Proteína quinase B
ALT	Aminotransferase de alanina
AP-1	Proteína ativadora-1
AST	Aminotransferase de aspartato
ATP	Adenosina trifosfato
AUC	Área sob a curva
CCBS	Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
CE	Colesterol éster.
CEA	Coeficiente de eficácia alimentar
CETP	Proteína de transferência de ésteres de colesterol
CEUA	Comissão de ética no uso de animais
CGPCC	Cálculo do coeficiente de ganho de peso por consumo calórico
Cm	Centímetro
DCNT	Doenças crônicas não transmissíveis
DHGNA	Doença hepática gordurosa não alcoólica
DHL	Dieta hiperlipídica
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPPH	1,1-difenil-2-picril-hidrazila
EAG	Extrato aquoso da folha da graviola
EAG 100 mg/kg	Extrato aquoso da folha de graviola - 100 mg/kg
EAG 150 mg/kg	Extrato aquoso da folha de graviola - 150 mg/kg
EAG 50 mg/kg	Extrato aquoso da folha de graviola - 50 mg/kg
EHNA	Esteatose hepática não alcoólica

ELISA	<i>Elise enzyme linked</i>
ENA	Esteatohepatite não alcoólica
ERO	Espécie reativa de oxigênio
FFA	<i>Free fatty acids</i> , Ácidos graxos livres.
g/kg	grama por quilograma
GLUT-4	Glicose tipo 4
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i>
HTGL	Lipase de triglicerídeos hepática
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IC ₅₀	Concentração inibitória média
IKK	IκB quinase
IL-10	Interleucinas -10
IL-1β	Interleucinas -1β
IL-6	Interleucina – 6
IMC	Índice de massa corporal
IRS-1	Substrato 1 do receptor da insulina
IRS-2	Substrato 2 do receptor da insulina
JKN	Via c-Jun N-terminal quinase
Kcal	Quilocalorias
kg	Quilogramas
kg/m ²	Quilograma por metro quadrado
L	Litro
LDL	Lipoproteínas de baixa densidade
LDL-ox	LDL oxidado
LHS	Lipase hormônio sensível
LLP	Lipase lipoproteica
LPS	Lipopolissacarídeos
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógenos
MCP-1	Proteína quimiotática de monócitos-1
MDA	Malondialdeído
mg	Miligrama
mg/dL	Miligrama por decilitro
mg/g	Miligrama por grama

mg/kg	Miligrama por quilograma
mg/min	Miligrama por minuto
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mmHg	Milímetro de mercúrio
Mo	Monócitos
mol L ⁻¹	Mol do soluto em um litro da solução
MTORC1	Proteína-alvo da rampamicina em mamíferos
NF-Kb	Fator nuclear kappa B
nm	Nanômetro
NO	Óxido nítrico
OECD	<i>Organisation for Economic Co-operation and Development</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
PI3K	Fosfatidilinositol 3-quinase
PKC	Proteína quinase C
PNS	Pesquisa Nacional de Saúde
PPAR α	Proteínas proliferadoras de peroxissomos ativadas por receptores alfa
PPAR γ	Proteínas proliferadoras de peroxissomos ativadas por receptores gamma
PPARs	Proteínas proliferadoras de peroxissomos ativadas por receptores
RCQ	Relação cintura quadril
RXR	Receptor retinóide X
S6K1	Proteína ribossomal S6 quinase 1
SM	Síndrome metabólica
SOCS	Supressor de sinalização de citocina
SRB1	<i>Scavenger receptors B, class 1</i>
SREBP-1c	Proteína de ligação ao elemento de resposta a esterol -1c
SUS	Sistema Único de Saúde
TLR4	Receptor tipo <i>toll</i> 4
TMB	Taxa de metabolismo basal
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
U/L	Unidade por litro

U/mL	Unidade por mililitro
UCP	Proteínas desacopladoras
UFMS	Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
UI/kg	Unidades internacionais por quilograma
VIGITEL	Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico
VLDL	Lipoproteínas de muito baixa densidade

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
2 REVISÃO DE LITERATURA	22
2.1 Obesidade	22
2.1.1 Epidemiologia e custos econômicos.....	22
2.1.2 Definição, classificação e risco de comorbidades da obesidade	24
2.1.3 Etiologia	27
2.1.5 Tecido adiposo	29
2.1.6 Mecanismos patogênicos e inflamatórios da obesidade.....	30
2.2 Plantas medicinais	41
2.3 Graviola.....	42
2.4 Modelo experimental de obesidade induzida por dieta	45
3 OBJETIVOS	47
3.1 Geral	47
3.2 Específicos	47
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	48
4.1 Obtenção da matéria prima	48
4.2 Preparação do extrato aquoso.....	48
4.3 Quantificação de antioxidantes e atividade antioxidante	48
4.3.1 Determinação fenóis totais.....	48
4.3.2 Determinação do teor de flavonoides totais	49
4.3.3 Determinação de taninos condensados.....	49
4.3.4 Ensaio da atividade antioxidante com o radical livre DPPH.....	50
4.3.5 Isolamento das substâncias do extrato da graviola.....	51
4.4 Protocolo experimental.....	51
4.4.1 Parâmetros éticos	51

4.4.2 Teste de toxicidade aguda.....	52
4.4.3 Composição das dietas	53
4.4.4 Delineamento experimental.....	54
4.4 Métodos analíticos	55
4.4.1 Controle do peso corporal.....	55
4.4.2 Avaliação da ingestão alimentar, eficácia alimentar e ganho de peso.....	55
4.4.3 Avaliação da gordura corporal e peso do fígado	56
4.4.4 Histologia do tecido adiposo epididimal, fígado e pâncreas	56
4.4.5 Determinação dos lipídeos totais, colesterol total e triglicerídeos hepáticos.....	57
4.5 Análises séricas	58
4.5.1 Perfil glicêmico: glicemia de jejum, teste de tolerância à glicose e sensibilidade à insulina	58
4.5.2 Perfil lipídico: triglicerídeos, colesterol total e frações e índice aterogênico	59
4.6 Análise estatística	59
5 RESULTADOS	60
5.1 Composição química do extrato aquoso da folha da graviola: Atividade antioxidante, compostos fenólicos, flavonoides totais, taninos, isolamento e identificação de compostos	60
5.2 Teste de Toxicidade Aguda	60
5.3 Efeitos do extrato aquoso da folha da graviola sobre o peso corporal e ingestão alimentar.....	61
5.4 Efeito do extrato aquoso da folha da graviola sobre o perfil lipídico e glicêmico.....	66
5.4.1 Análises Bioquímicas Séricas.....	66
5.4.2 Teste de Tolerância oral à Glicose	69
5.4.3 Teste de Sensibilidade à Insulina	73

5.5 Efeito do extrato aquoso da folha da graviola sobre os coxins adiposos e o peso do fígado.....	75
5.6 Efeitos do extrato aquoso da folha da graviola sobre o lipídeos totais, triglicerídeos e colesterol total hepático.....	77
5.7 Efeitos do extrato aquoso da folha da graviola sobre a análise histológica do fígado, pâncreas e tecido adiposo epididimal.....	78
5.7.1 Pâncreas	78
5.7.2 Fígado.....	78
5.7.3 Tecido adiposo epididimal	78
6 DISCUSSÃO	83
7 CONCLUSÃO.....	95
REFERÊNCIAS.....	96
ANEXO A - CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL- UFMS..	111
APÊNDICE A - TESTE HIPOCRÁTICO: TOXICIDADE DE DROGAS POR ANÁLISE COMPORTAMENTAL	113
APÊNDICE B - RESULTADOS DO TESTE DE TOXICIDADE AGUDA.....	115

1 INTRODUÇÃO

A obesidade é considerada um problema de saúde pública e o seu controle está inserido nas metas globais, visto que desde 1980 a obesidade mais que dobrou em todo mundo (ATAY; BEREKET, 2016). Em 2014, 39% das pessoas com 18 anos ou mais foram diagnosticadas com sobrepeso e 13% com obesidade (WHO, 2016c). Entre as crianças menores de 5 anos, o sobrepeso e obesidade aparecem em aproximadamente 41 milhões de crianças, e até 2020 o número de casos pode chegar a 60 milhões (ATAY; BEREKET, 2016; WHO, 2016c). No Brasil, a frequência de excesso de peso aparece em 52,2% dos brasileiros adultos com idade ≥ 19 anos. Assim como, em Campo Grande, capital do estado de Mato Grosso do Sul, mais da metade da população apresenta excesso de peso (54,5%) (BRASIL, 2015).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) (2016b), o sobrepeso e a obesidade estão definidos como o acúmulo excessivo de gordura corporal, podendo representar risco a saúde do indivíduo. Esse acúmulo, mais especificamente de tecido adiposo visceral é um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento de outras doenças crônicas não transmissíveis, como a hipertensão arterial, dislipidemias, doenças cardiovasculares, diabetes *mellitus*, esteatose hepática e câncer, relacionadas principalmente a proteínas pró-inflamatórias da obesidade, conhecidas como adipocinas, entre elas o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina-6 (IL-6), proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1), entre outras (ANTUNAS-PUENTE et al., 2008; NAVES, 2010; SOARES, 2012).

A etiologia da obesidade é complexa e multifatorial, resultando da interação de fatores genéticos, ambientais, emocionais e estilos de vida (ABESO, 2016). Embora os fatores genéticos sejam determinantes no desenvolvimento da obesidade, os fatores metabólicos e ambientais, principalmente aumento do consumo de alimentos de grande densidade energética proporcionam condições para o desenvolvimento deste distúrbio (WEINSIER et al., 1998).

Há várias razões pelas quais as plantas medicinais devem ser submetidas a estudos científicos. Em primeiro são uma poderosa fonte de componentes ativos para o tratamento de várias doenças, como para a obesidade e suas comorbidades, e pelo seu baixo custo. No entanto, também podem ter efeito tóxico (SIMÃO, 2013).

A graviola (*Annona muricata* Linn) tem uma longa história de uso na medicina nas áreas tropicais da América do Sul e do Norte e na África Ocidental. Praticamente

todas as partes morfológicas da *Annona muricata* Linn são úteis na medicina tradicional, como anti-hipertensivo, vasodilatador, antidiabético, hipolipidêmico e vários outros efeitos citados na literatura (ADEWOLE; OJEWOLE, 2009; FLORENCE et al., 2014). Ainda, as folhas são utilizadas popularmente como emagrecedor, sendo a segunda planta mais utilizada para este fim pela população brasileira. No entanto, não há base científica suficiente para recomendar esta planta para reduzir peso corporal em indivíduos com excesso de peso (CERCATO et al., 2015). Portanto, o presente estudo propõe estudar os efeitos do extrato aquoso da folha da graviola em camundongos com obesidade induzida por dieta hiperlipídica.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Obesidade

2.1.1 Epidemiologia e custos econômicos

Segundo a OMS (2014), as doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) são o maior desafio da saúde pública no século XXI, comprometendo o desenvolvimento social e econômico em todo o mundo. Aproximadamente 38 milhões de mortes no mundo, ou seja, 68% são causadas por DCNT, principalmente doenças cardiovasculares (37%), câncer (27%), doenças respiratórias crônicas (8%) e diabetes (4%) (WHO, 2013; WHO, 2016a), sendo que aproximadamente 40% das mortes aconteceram na faixa etária de 30 a 70 anos, consideradas pela OMS como mortes prematuras (WHO, 2014).

As mortes prematuras causadas por DCNT ocorrem principalmente nos países de baixa e média renda, resultando em perdas econômicas de 7 trilhões de dólares para os próximos 15 anos e consequentemente milhões de pessoas na miséria. Para o ano 2030, a OMS estima que o número de mortes por DCNT poderá aumentar para 55 milhões se nenhuma intervenção eficaz para prevenção e controle for aplicada (WHO, 2013; WHO, 2016c).

Após reconhecer os devastadores impactos das DCNT no desenvolvimento social, econômico e na saúde pública, dirigentes de muitos países elaboraram o Plano de Ação Mundial da OMS para a prevenção e controle de doenças não transmissíveis 2013-2020, que propõe intervenções nos principais fatores das DCNT, mediante nove metas globais para reduzir em 25% as mortes prematuras por doenças crônicas e detenção do aumento da obesidade global para coincidir com taxas do ano de 2010 (WHO, 2013).

Os fatores de riscos das DCNT são conhecidos e podem ser controlados, entre eles está o consumo de tabaco, sedentarismo, dieta pouco saudável e o uso nocivo do álcool. Estes fatores provocam alterações metabólicas e fisiológicas que levam ao aumento da pressão arterial, aumento do peso que conduz à obesidade, hiperglicemia e hiperlipidemia (WHO, 2012).

Desde 1970, o Brasil e muitos outros países tem enfrentado uma peculiar e rápida transição nutricional. A princípio apresentavam altas taxas de desnutrição e a

partir do ano de 2008 a maior parte da população foi diagnosticada com excesso de peso. Em razão ao risco de doenças associadas e velocidade de evolução, o excesso de peso é atualmente considerado um dos maiores problemas de saúde pública (BRASIL, 2016).

A Pesquisa Nacional de Saúde, 2013 (PNS) realizada pelo Ministério da Saúde em parceria com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) realizou aferições de peso, altura e circunferência da cintura de indivíduos entrevistados e os resultados demonstram que 56,9% da população com 18 anos ou mais está acima do peso, cerca de 82 milhões de pessoas, sendo que 55,6% correspondente aos homens e 58,2% às mulheres. Para a obesidade a PNS encontrou que 20,8% dos brasileiros apresentam algum grau de obesidade, indicando uma prevalência maior no sexo feminino com 24,4% dos diagnósticos e 16,8% entre o sexo masculino (IBGE, 2015).

Para avaliar o risco de doenças cardiometabólicas nos brasileiros a PNS 2013 aferiu a circunferência da cintura, sendo considerada aumentada quando a medida era $\geq$ a 88 cm para as mulheres e $\geq$ a 102 cm para os homens. A pesquisa encontrou uma prevalência de 37,7% de obesidade abdominal entre a população adulta avaliada, estando mais acentuada no sexo feminino (52,1%) contra 21,8% no sexo masculino (IBGE, 2015).

A Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico, VIGITEL (2015), realizada pelo Ministério da Saúde em todas as capitais brasileiras e no Distrito Federal monitorou a frequência e a distribuição dos fatores de riscos para DCNT. De acordo com a VIGITEL, a frequência de excesso de peso é de 52,2% dos brasileiros adultos com idade $\geq$ 19 anos, indicando Rio Branco como a capital com a maior frequência (60,8% da população adulta), e menor em Belo Horizonte com 47,8% (BRASIL, 2015).

Em 2013, a VIGITEL apontava Campo Grande como a capital com maior frequência do indicador excesso de peso, 56,3% da população adulta e, São Luiz como com a menor frequência (45,3%) (BRASIL, 2013). Do mesmo modo, na última pesquisa publicada, Campo Grande ainda aparece com mais da metade da população apresentando excesso de peso (54,5%), sendo 65,5% do sexo masculino e 46,0% do sexo feminino (BRASIL, 2015).

Entre jovens e crianças o excesso de peso e a obesidade também têm sido preocupante. Um estudo realizado com crianças na faixa etária de 5 a 9 anos de idade

mostrou que, o excesso de peso e a obesidade já atingem 33,5% e 14,3%, respectivamente, nesta população (BRASIL, 2011).

A obesidade está diretamente relacionada com o aumento dos gastos diretos na saúde pública global. Estudos mostram que, quanto maior o grau de obesidade de acordo com o índice de massa corporal (IMC) maior será os custos diretos da doença com diagnósticos e tratamentos. Estima-se, que os custos com cuidados de saúde em indivíduos com excesso de peso seja aproximadamente 10% maior quando comparado a um indivíduo adulto com peso normal, e cerca de 23%, 45% e 81% maior em indivíduos com obesidade grau I, II e III, respectivamente. As despesas em saúde podem ser de 65% a 113% maior em indivíduos com obesidade mórbida (LEHNERT et al., 2013).

Os custos econômicos indiretos da obesidade estão relacionados à redução da produtividade, menor capacidade de executar trabalhos que demandam força física, presenteísmo, absenteísmo, pensões por invalidez e morte prematura (LEHNERT et al., 2013).

Bahia e colaboradores (2012) identificaram em seu estudo a carga econômica do sobrepeso e obesidade para a saúde brasileira. Segundo os autores os custos totais anuais estimados com todas as doenças atribuíveis ao sobrepeso e à obesidade são 221 milhões de dólares; sendo 163,1 milhões de dólares relacionados a internações e 57,9 milhões de dólares as consultas médicas, exames e procedimentos. Estes valores correspondem a aproximadamente 10% dos custos totais estimados anualmente com todas as doenças relacionadas com sobrepeso e obesidade.

Estudos demonstram que nos Estados Unidos os custos da obesidade duplicaram entre 1998 a 2008, de 78,5 bilhões para 147 bilhões de dólares. Sendo que este último valor corresponde a 9,1% de todas as despesas de saúde no ano de 2008. Ainda, os custos com absenteísmo no trabalho e morte prematura relacionados a obesidade em 2007 foram estimados em 6,38 e 30,15 bilhões de dólares respectivamente (LEHNERT et al., 2013).

2.1.2 Definição, classificação e risco de comorbidades da obesidade

Sobrepeso e obesidade estão caracterizados como o acúmulo excessivo de gordura corporal, que pode ter impacto negativo na saúde do indivíduo e são resultantes de um desequilíbrio energético, no qual a ingestão de energia é maior do que a gasta pelo organismo. Para o diagnóstico e classificação do sobrepeso e da obesidade em adultos o parâmetro mais utilizado é o índice de massa corporal (IMC) - peso do indivíduo em quilogramas dividido pela sua altura em metros ao quadrado (kg/m^2) -, principalmente por sua rapidez e facilidade de cálculo (WHO, 2016c; WHO, 2016b). Em 1998, a OMS revisou a classificação pelo IMC e passou a adotar a associação entre o IMC e risco de doenças crônicas ou mortalidade (Tabela 1) (NAVES, 2010).

Tabela 1 - Risco de comorbidades de acordo com a classificação do IMC para adultos

IMC (KG/M^2)	CLASSIFICAÇÃO	OBESIDADE GRAU/CLASSE	RISCO DE COMORBIDADES
< 18,5	Baixo peso	0	Normal ou elevado
18,5 – 24,9	Peso normal	0	Normal
25,0 – 29,9	Sobrepeso ou pré-obeso	0	Pouco elevado
30,0 – 34,9	Obesidade	I	Elevado
35,0 – 39,9	Obesidade	II	Muito elevado
≥40,0	Obesidade grave	III	Muitíssimo elevado

Fonte: WHO (2000); ABESO (2016).

O IMC é um bom indicador para estimar a prevalência de obesidade. No entanto, não distingue a massa magra e adiposidade, nem a distribuição da gordura corporal. Assim, o IMC para indivíduos adultos pode ser subestimado em idosos, devido a sua perda de massa magra e consequentemente perda de peso corporal, e superestimado em atletas (ABESO, 2009; ABESO, 2016).

Para a classificação do estado nutricional em crianças e adolescentes, encontram-se o IMC, assim como as curvas de acompanhamento e diagnóstico nutricional, sendo o Escore z e o percentil os mais utilizados. O Escore z é o mais indicado para estudos científicos de grupos populacionais e representa o número de desvio padrão de peso/estatura, peso/idade, e a estatura/idade abaixo ou acima da mediana da população de referência. O percentil reflete em que posição se coloca o peso/estatura, peso/idade, ou a estatura/idade da criança em relação à distribuição

normal (Percentis 50), sendo este o instrumento mais utilizado na prática clínica. As curvas por percentis e escore Z utilizadas para classificação do estado nutricional estão subdivididas em faixa etária do nascimento a 5 anos, 5 a 10 anos e 10 a 19 anos de idade (VITOLLO, 2008).

Além dos métodos de avaliação antropométricos citados, existem na atualidade outras ferramentas úteis para avaliar a adiposidade e sua distribuição corporal em determinadas situações clínicas ou pesquisas científicas, como a medição da espessura das pregas cutâneas, bioimpedância, ultrassonografia, tomografia, ressonância magnética, circunferência da cintura e a relação circunferência abdominal/quadril (RCQ) (WHO, 2000; ABESO, 2009).

Os indivíduos obesos acumulam o excesso de gordura em distintos compartimentos no organismo e este representa diferentes riscos à saúde. A compartimentalização da gordura corporal pode ser classificada em *ginecoide*, localizado na região inferior corpo, podendo levar ao desenvolvimento de complicações vasculares e ortopédicas, como varizes, celulites e dificuldade de locomoção pelo excesso de peso corporal e *androide*, que é o excesso de gordura localizado predominantemente nos depósitos intra-abdominais, associado a importantes consequências adversas à saúde, como o desenvolvimento de DCNT. Portanto, a medida da circunferência da cintura é um método simples para a identificação de indivíduos com um risco aumentado para doenças crônicas. (BUSNELLO; SANTOS, 2009). Para homens, o ponto de corte para risco é uma circunferência de cintura $\geq$ a 94 cm. Se $>$ que 102 cm representa risco substancialmente aumentado. Nas mulheres o ponto de corte da medida da circunferência da cintura é $\geq$ a 80 cm e se $>$ que 88 cm representa risco substancialmente aumentado (WHO, 2000; NAVES, 2010).

Por tanto, a obesidade é um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento de outras DCNT, onde podemos destacar: hipertensão arterial, dislipidemias, doenças cardiovasculares, diabetes *mellitus*, hiperuricemia, cálculos biliares, esteatose hepática e até mesmo alguns tipos de câncer (BUSNELLO; SANTOS, 2009; NAVES, 2010; GURNANI; BIRKEN; HAMILTON, 2015).

Ainda, o excesso de peso é o principal fator de risco para o desenvolvimento da síndrome metabólica (SM), assim como a resistência à insulina geralmente está associada à obesidade. Em 1988, Reaven propôs a denominação de síndrome X, que originou a definição atual de SM, sendo essa um complexo de origem metabólica,

relacionado a deterioração do metabolismo da glicose e lipídeos, obesidade visceral e alterações hemodinâmicas, levando a um aumento do risco cardiovascular e consequentemente da mortalidade (OLIVEIRA; VENCIO, 2016).

2.1.3 Etiologia

A obesidade é uma condição complexa e multifatorial, resultando da interação de fatores genéticos, ambientais, sociais, emocionais e culturais (RIBEIRO, 2015). Segundo Guarani e colaboradores (2015) fatores pré-natais, como peso pré-gestacional, diabetes *mellitus* gestacional, tabagismo e obesidade materna estão correlacionados com aumento da incidência de obesidade infantil. Estas condições são capazes de provocar alterações na expressão genética relacionada à obesidade em algum momento do desenvolvimento embrionário.

No que se refere a fatores genéticos, estima-se que estes possam responder por 24 a 40% da adiposidade, por codificarem os componentes moleculares do sistema neuroendócrino que regula a taxa de metabolismo basal (TMB) individual, fatores hormonais e neuronais, que influenciam na saciedade e à regulação do peso corporal (RIBEIRO, 2015). Variância do IMC também pode ser explicada por fatores hereditários, como a correlação entre excesso de peso de pais e filhos, estimada entre 30 e 50% (RIBEIRO, 2015; ATAY; BEREKET, 2016). Em anos recentes, foram identificados 18 genes da “obesidade”, no entanto, o mapa gênico da obesidade está em constante evolução, à medida que as pesquisas avançam (QUEIROZ et al., 2015; ATAY; BEREKET, 2016).

O polimorfismo de um único gene que resultará em obesidade é raro e quando existente afeta a regulação do circuito leptina-melanocortina (GURNANI; BIRKEN; HAMILTON, 2015). Algumas mutações de genes já foram correlacionadas a este circuito, no entanto, apenas as mutações nos receptores 4 de melanocortina são comuns, representando cerca de 4% dos casos de obesidade grave na infância (GURNANI; BIRKEN; HAMILTON, 2015). Algumas síndromes genéticas também estão associadas à obesidade, entre elas a de Prader-Willi, Bardet-Biedl, Alstrom, WAGR (tumor de Wilms, aniridia, anomalias geniturinárias, retardo mental), e geralmente estão associadas a algum grau de atraso neurocognitivo e características dismórficas (GURNANI; BIRKEN; HAMILTON, 2015; ATAY; BEREKET, 2016).

Darmasseelane e colaboradores (2014), após revisão sistemática encontraram uma forte associação entre cesarianas e excesso de peso/obesidade no indivíduo adulto. Estudos correlacionam às diferenças encontradas na microbiota intestinal entre os tipos de partos como possível causa do excesso de peso. Assim, a cesariana parece favorecer o crescimento de diferentes bactérias patogênicas no intestino e desse modo altera o metabolismo energético, o qual influenciará no desenvolvimento de uma inflamação generalizada. Ainda, o aleitamento materno exclusivo nos primeiros 6 meses de vida correlaciona-se positivamente a uma menor incidência de obesidade infantil (DARMASSEELANE et al., 2014; GURNANI; BIRKEN; HAMILTON, 2015).

Distúrbios endócrinos também podem contribuir para o desenvolvimento da obesidade, como o hipotireoidismo, deficiência do hormônio do crescimento, hipogonadismo em homens e ovariectomia em mulheres, síndrome de Cushing e síndrome dos ovários policísticos (GURNANI; BIRKEN; HAMILTON, 2015; RIBEIRO, 2015).

Estudos mostram o papel do desenvolvimento econômico e do processo de urbanização como potencialidades colaboradoras para explicar o grande aumento das taxas de obesidade em todo mundo nas últimas décadas, entre elas a adoção de hábitos alimentares conhecidos como “ocidentais”, que consistem em um elevado consumo de alimentos calóricos, principalmente alimentos ricos em gorduras, açúcar refinado e baixo consumo de frutas e vegetais. Além disso, comer enquanto assiste televisão, pular o café da manhã, comer rápido, baixa qualidade do sono, estresse crônico, baixos níveis de atividade física e mudanças na microbiota intestinal. Ainda, a baixa ingestão de produtos lácteos está associada à obesidade infantil. Além disso, as comodidades oferecidas pelo mundo moderno como aparelhos de televisões, telefones sem fio, computadores, entre outros, têm favorecido o comportamento sedentário com baixo nível de atividade física (ENES; SLATE, 2010; GURNANI; BIRKEN; HAMILTON, 2015; ATAY; BEREKET, 2016).

Embora os fatores genéticos sejam determinantes no desenvolvimento da obesidade, os fatores metabólicos e ambientais, principalmente hábitos alimentares e sedentarismo proporcionam condições para o desenvolvimento deste distúrbio (WEINSIER et al., 1988).

2.1.5 Tecido adiposo

O tecido adiposo possui uma grande capacidade de remodelação de tamanho e volume, sendo considerado o mais flexível dos tecidos presentes no corpo, e anatomicamente classifica-se em: tecido adiposo visceral, localizado próximo ou no interior das vísceras abdominais (epididimal, mesentérico, retroperitoneal, omental e perirrenal) e tecido adiposo subcutâneo, encontrado nos depósitos abaixo da pele (glúteo-femoral e inguinal), sendo estas as regiões mais referidas na literatura (VALE; LISBOA, 2013; BELEZA, 2014). O tecido adiposo visceral está associado a um maior risco de doenças associadas à obesidade e suas complicações, e tem relação com a adiposidade total ou quantidade de tecido adiposo subcutâneo (CATTA-PRETA, 2011).

De acordo com a sua composição e funções fisiológicas o tecido adiposo divide-se principalmente em: tecido adiposo marrom e tecido adiposo branco (LOPES, 2015). O tecido adiposo branco é o tipo de gordura predominante, sendo responsável pelo armazenamento do excesso de caloria consumida na dieta na forma de triglicerídeos nos seus adipócitos (VALE; LISBOA, 2013; LOPES, 2015). Os triglicerídeos podem ocupar 85% a 90% do citoplasma do adipócito e uma das consequências será o deslocamento do núcleo para a periferia da célula (VALE; LISBOA, 2013; BELEZA, 2014). Além dos adipócitos, o tecido adiposo branco está composto por matriz de tecido conjuntivo, tecido nervoso, nódulos linfáticos, macrófagos, linfócitos, fibroblastos, células endoteliais e pré-adipócitos (VALE; LISBOA, 2013).

A princípio, o tecido adiposo branco foi considerado apenas um órgão com papel regulador da homeostase de triglicerídeos no organismo, porém, atualmente, este tecido é considerado um órgão endócrino com capacidade de comunicar-se com outras estruturas, como o sistema nervoso central e o trato gastrointestinal, desempenhando funções autócrinas, parácrinas e endócrinas principalmente na resposta inflamatória (VALE; LISBOA, 2013; BELEZA 2014).

Ao longo de todo o desenvolvimento de um indivíduo o tecido adiposo branco passa por períodos de alterações em sua celularidade, ou seja, poderá ocorrer aumento do tamanho e do número de adipócitos. Na infância e na adolescência a obesidade é caracterizada por uma hiperplasia e hipertrofia do tecido adiposo branco. No indivíduo adulto a hipertrofia dos adipócitos na obesidade predomina, e independente das flutuações de peso corporal o número de adipócitos parece

permanecer constante na vida adulta. Isso indica que o número de adipócitos parece ser definido durante a infância e adolescência, enquanto apenas cerca de 10% das células de gordura são renovadas anualmente em humanos adultos (SPALDING et al., 2008; VALE; LISBOA, 2013; HYVÖNEN; SPALDING, 2014).

O processo que envolve o aumento do número de células do tecido adiposo branco é conhecido como adipogênese e depende da diferenciação dos pré-adipócitos em células maduras. A linhagem adiposa proveniente de células-tronco mesenquimais multipotentes se desenvolve em adipoblastos. O comprometimento destes adipoblastos dá origem a pré-adipócitos, que em resposta a estímulos de vários agentes extracelulares é capaz de adquirir as características de adipócitos maduros, acumulando gotas lipídicas metabolicamente ativas (VALE; LISBOA, 2013).

O tecido adiposo branco sintetiza e/ou secreta várias proteínas descritas como adipocinas, sendo estas altamente diversificadas em termos de estrutura proteica e funções fisiológicas (LOPES, 2015). De uma forma geral, têm efeitos autócrinos, parácrinos e endócrinos e podem influenciar no funcionamento de órgãos, como músculo, pâncreas, fígado e sistema nervoso central (VALE; LISBOA, 2013; LOPES 2015). Entre as adipocinas secretadas pelo tecido adiposo branco podemos ressaltar as adipocinas relacionadas à homeostase energética (leptina, resistina, adiponectina e visfatina), proteínas de fase aguda (haptoglobina, metalotioneína e amiloide A sérica), citocinas (fator de necrose tumoral- α , interleucina-6, interleucina-1 β , interleucina-8 e interleucina-10), fatores hemostáticos e hemodinâmicos (inibidor do ativador de plasminogênio-1, angiotensinogênio) e quimiocinas (proteína quimiotática de monócito-1 e fator inibidor de migração de macrófago) (NASCIMENTO; RIBEIRO; OYAMA, 2013).

Em indivíduos com excesso de peso ocorre um aumento da expressão e secreção de adipocinas e indução a um quadro de inflamação crônica subclínica, representando risco a saúde do indivíduo, principalmente para o desenvolvimento de DCNT pela desregulação de componentes orgânicos (BELEZA, 2014).

2.1.6 Mecanismos patogênicos e inflamatórios da obesidade

No quadro de obesidade, o desequilíbrio energético faz com que ocorra um aumento da massa adiposa pelo acúmulo intracelular de triglicerídeos e de ácidos

graxos livres na circulação (GUILHERME et al., 2008; PERESI, 2010). Os ácidos graxos livres são metabólitos que reduzem a captação e metabolismo da glicose e se ligam diretamente a receptores de membrana, induzindo o aumento da expressão de vias inflamatórias (CARNEIRO et al., 2011; FREITAS; CESCHINI; RAMALLO, 2014) (Figura 1).

Assim, a resistência à insulina pode ser definida como redução da capacidade da insulina circulante em captar, metabolizar o armazenar a glicose nos músculos e tecido adiposo, devido a alterações na membrana lipídica (SILVEIRA et al., 2008; CARNEIRO et al., 2011). Sendo que, na obesidade esta ocorre principalmente pelo excesso de ácidos graxos livres circulantes, síntese e liberação de citocinas e acúmulo de ácidos graxos no músculo, fígado e pâncreas (YAMAZAKI, 2010).

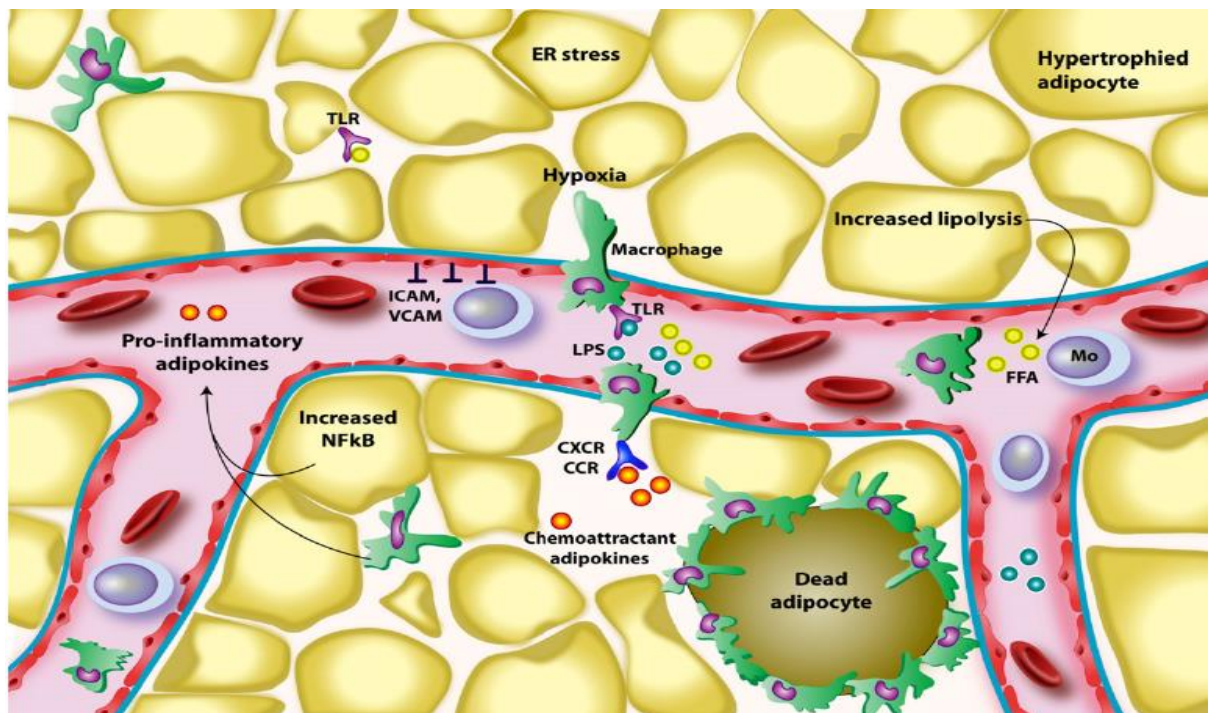


Figura 1 - Mecanismos inflamatórios do tecido adiposo na obesidade. O acúmulo de lipídeos leva a hipertrofia de adipócitos, iniciando um estado de estresse celular e ativação de vias pró-inflamatórias, como o fator nuclear kappa B (NF-κB) e consequentemente produção aumentada de adipocinas pró-inflamatórias, entre elas estão as quimiocinas (proteína quimiotática de monócito-1) que se ligam a receptores específicos (CCR e CXCR) para monócitos (Mo) -macrófagos para recrutá-los para o tecido adiposo. A maioria dos macrófagos infiltrados dispõem-se em torno dos adipócitos mortos em forma de coroa ou “crown like-structure” para eliminação de detritos de adipócitos. Ainda, a obesidade é capaz de induzir mudanças nos macrófagos no tecido adiposo e estes uma vez ativados secretam adipocinas pró-inflamatórias. Adicionalmente, ocorre aumento da lipólise e endotoxemia metabólica (Lipopolissacarídeos circulantes aumentados, LPS) que também contribuem para a

inflamação. Os ácidos graxos livres (FFA) e LPS ligam-se ao receptor tipo *toll 4* (TLR4) de adipócitos e macrófagos e também ativam o NF- κ B. Além disso, a hipóxia no tecido adiposo pode aumentar o estresse e a inflamação. Este processo inflamatório no tecido adiposo poderá desencadear uma inflamação sistêmica. CCR e CXCR: receptores de quimiocinas.

Fonte: MAURY; BRICHARD (2010).

Randle e colaboradores (1963), demonstraram em seu estudo que o aumento de ácidos graxos livres diminui a utilização da glicose no músculo. Segundo os autores o aumento de ácidos graxos livres na circulação parece induzir a β -oxidação, aumentando a produção de acetilcoenzima A (acetil-CoA), inibindo a oxidação do piruvato pelo bloqueio da enzima piruvato desidrogenase. Ainda, o acúmulo de acetil-CoA proveniente de ácido graxos é difundido para o citoplasma na forma de citrato resultante da reação entre oxaloacetato e acetil-CoA. No citossol, o citrato é desviado pela enzima citratoliase (altamente estimulada pela insulina) para formar oxalacetato e acetil-CoA. Nesse momento, a acetil-CoA é convertida pela carboxilase-1 acetil-CoA em malonil-CoA, o qual é utilizado na síntese de novo ácido graxo em um processo conhecido como lipogênese. Isso ocorre quando as concentrações de citrato estão elevadas na mitocôndria e a produção de adenosina trifosfato (ATP) no ciclo de Krebs excede a demanda energética (MARTINS, 2014; RIZZO, 2014).

Ainda, a elevada produção de citrato juntamente com a razão ATP/ adenosina Difosfato (ADP) elevada, inibem a enzima fosfofrutoquinase-1, resultando em redução da via glicolítica e consequentemente bloqueiam a reação de glicose-6-fosfato a frutose-6-fosfato. Além disso, o acúmulo de glicose-6-fosfato leva à inibição da atividade da hexoquinase, causando acúmulo de glicose intracelular. Assim os ácidos graxos livres reduzem a captação e fosforilação da glicose, resultando em resistência à insulina (MARTINS, 2014; RIZZO, 2014).

Além dos efeitos dos ácidos graxos descritos no metabolismo da glicose, estes também afetam mecanismos intracelulares de sinalização à insulina, como a ativação da via c-Jun N-terminal quinase (JKN) e fosforilação do substrato 1 do receptor da insulina (IRS-1) e substrato 2 do receptor da insulina (IRS-2) em resíduos de serina, bloqueando toda via da sinalização de insulina e impedindo sua associação a fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K), que por sua vez não realizará a fosforilação de outras proteínas quinases em cascata, como a proteína quinase C (PKC) e a proteína quinase B (AKT). A AKT em circunstâncias fisiológicas realiza a translocação do

transportador de glicose tipo 4 (GLUT-4) para a membrana plasmática, resultando assim em resistência à insulina (MARTINS, 2014; SIILVEIRA et al., 2008) (Figura 2).

Outro mecanismo que afeta diretamente o metabolismo celular influenciando no desenvolvimento da resistência à insulina está relacionado com a ativação do receptor de membrana TLR 4, induzindo a ativação de vias inflamatórias como a JKN e NF-kB (CARNEIRO et al., 2011; FREITAS; CESCHINI; RAMALLO, 2014; CASTOLDI, 2015). Ainda, os ácidos graxos utilizam o receptor TLR 4 para induzir a expressão de citocinas pró-inflamatórias em macrófagos, adipócitos e no fígado (GUILHERME et al., 2008) (Figura 2).

A hipertrofia dos adipócitos na obesidade favorece a secreção aumentada de proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1) por células endoteliais, aumento da secreção de leptina pelos adipócitos e o dano oxidativo que estimulam o recrutamento de macrófagos infiltrados no tecido adiposo. Por sua vez, os macrófagos estimulam a produção de outras citocinas, como interleucinas IL-1 β , IL-6 e fator de necrose tumoral- α (GUILHERME et al., 2008; YAMAZAKI, 2010; NELSON; COX, 2014).

Os ácidos graxos ao se ligarem ao receptor TLR 4 ativam a I κ B quinase (IKK), que por sua vez pode induzir diretamente a fosforilação em serina do IRS-1 e acionar uma cascata de sinalização intracelular com a fosforilação de IKB e consequentemente ativação de NF-kB (FREITAS; CESCHINI; RAMALLO, 2014). A translocação do NF-kB do citoplasma para o núcleo da célula ativa citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , IL-6 e TNF- α) e também anti-inflamatórias (IL-10), com o objetivo de regular o processo inflamatório. No entanto, a intensidade de ativação dessas citocinas é que irá conduzir a intensidade da resposta inflamatória (CINTRA, 2008; FREITAS; CESCHINI; RAMALLO, 2014) (Figura 2).

A fosforilação do IRS-2 em serina e o aumento da expressão de interleucina-1 (IL-1) dentro das ilhotas, produzida pelos elevados níveis de TNF- α e IL-6 podem induzir apoptose de células β no pâncreas e, consequentemente diabetes *mellitus* tipo 2. As células β ficam mais desprotegidas quando o IRS-2 está fosforilado em serina, desse modo ocorre a falência destas células (GOSTTSCHAL; BUSNELLO, 2009).

Um mecanismo de contenção da sobrecarga de nutrientes, como o excesso de glicose e aminoácidos, e da elevada ativação do receptor da insulina envolve a sinalização de mTORC1/S6K1 (proteína-alvo da rampamicina em mamíferos/proteína ribossomal S6 quinase 1) (HIRABARA; LELLIS-SANTOS; CURI, 2013). A ativação da

S6K1 na sobrecarga de nutrientes está associada a fosforilação em serina e inibição da transcrição do IRS-1, relacionados ao desenvolvimento de resistência à insulina (UM; D'ALESSIO; THOMAS, 2006). Além disso, a ativação da S6k1 leva a aumento da síntese proteica, crescimento da célula β -pancreática e supressão da lipólise e da oxidação de ácidos graxos nos músculos esqueléticos, ambos favorecendo o acúmulo de substratos energéticos no organismo (HIRABARA; LELLIS-SANTOS; CURI, 2013).

Além dos mecanismos descritos no metabolismo da glicose e metabolismo intracelular de sinalização à insulina existe uma via que regula a expressão gênica e o crescimento celular, conhecida como via da proteína quinase ativada por mitógenos (MAPK) (YAMAZAKI, 2010). Ainda que esta via não possua papel nas respostas metabólicas descritas, o aumento da atividade basal de MAPK como, por exemplo, pela ativação do TNF- α , afetará processos fisiológicos, como a lipólise nos adipócitos através da fosforilação da lipase hormônio sensível (LHS) e regulação negativa da ação da perilipina, permitindo o acesso da LHS ao triglicerídeo intracelular (GEHRKE; PEREIRA, 2007, GUILHERME et al., 2008). A atividade da LHS está aumentada na resistência à insulina, contribuindo para a hidrólise dos triglicerídeos, liberando ácidos graxos livres e glicerol para corrente sanguínea (GUILHERME et al., 2008) (Figura 2).

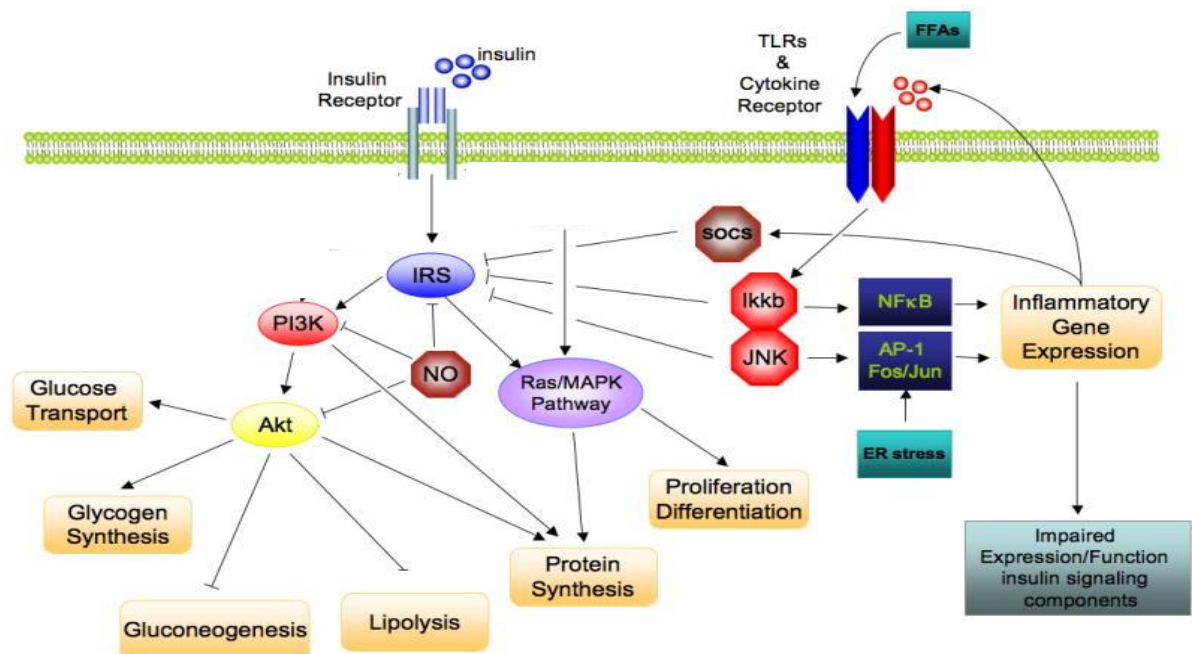


Figura 2 - Via de sinalização da insulina e inflamação na obesidade. A via PI3K /AKT controla a ação da insulina no metabolismo dos nutrientes, incluindo a captação de glicose. No entanto, a via MAPK está relacionada com a expressão gênica, mas também interage com via PI3K /AKT para controlar o crescimento e diferenciação celular. A ativação do receptor de insulina conduz à fosforilação de tirosina e IRS-1

iniciando a transdução de sinal. No entanto, ativação em IKKB e JNK conduz a ativação de NF- κ B e proteína ativadora-1(AP-1), reduzindo a capacidade de sinalização de IRS-1. Outros reguladores negativos relacionados com a inflamação inclui o óxido nítrico (NO) e o supressor de sinalização de citocina (SOCS) que degradam a IRS na inflamação. Ainda, o NO é capaz de reduzir a atividade de PI3K/AKT. FFAS: ácidos graxos livres.

Fonte: DE LUCA; OLEFSKY, 2008

O aumento da LHS inibe a enzima lipase lipoproteica (LLP) e, por conseguinte sua ação sobre os quilomícrons para o depósito de ácidos graxos nos adipócitos, principalmente visceral, estará prejudicada. A desregulação das funções fisiológicas da LHS e LLP favorecerá a translocação de ácidos graxos livres para fígado e consequentemente aumento da síntese de glicose, em um processo conhecido como gliconeogênese hepática, e de lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL) (BOGIOLO; FILHO, 2012).

Na obesidade, em resposta ao consumo calórico aumentado, ácidos graxos de cadeia longa ativam as proteínas proliferadoras de peroxissomos ativadas por receptores (PPARs) que regulam o metabolismo das gorduras e carboidratos por meio de proteínas membros de receptores nucleares, como PPAR α , PPAR δ e PPAR γ , que formam heterodímeros com o receptor nuclear RXR (receptor retinóide X) (HOTAMISLIGIL, 2006; NELSON; COX, 2014).

As PPAR α ativas por ácidos graxos no fígado induzem proteínas desacopladoras (UCP) e enzimas da β -oxidação no interior da mitocôndria, microssomos e peroxissomos com maior dissipação de energia (NELSON; COX, 2014). No entanto, a sobrecarga hepática gerada pela ingestão excessiva de energia aumenta a síntese de triglicerídeos (lipogênese), regulada pela ativação das PPAR α , desempenhando um papel relevante no fator de transcrição proteína de ligação ao elemento de resposta a esterol -1c (SREBP-1c), que ativa genes para a lipogênese no ácido desoxirribonucleico (DNA), desse modo, há aumento de VLDL e de acúmulo de ácidos graxos no fígado, e consequentemente, a esteatose hepática (BOGIOLO; FILHO, 2012).

As PPAR γ são essencialmente lipogênicas e participam na estimulação de genes envolvidos na síntese de lipídios e seu armazenamento em adipócito. Assim, este receptor nuclear ativa a enzima LLP e os triglicerídeos e a lipoproteína VLDL circulante são liberados para serem armazenados nos adipócitos. No entanto, TNF- α reduz a atividade dos PPAR γ e contribui para a resistência à insulina (GUILHERME et al.,

2008). Ainda, os PPAR γ estão envolvidos na patogênese da esteatose hepática e na síntese aumentada de VLDL pela transcrição de SREBP-1c (BOGIOLO; FILHO, 2012; NELSON; COX, 2014).

As alterações na secreção e ação da insulina na obesidade também são responsáveis pela dislipidemia, caracterizada pelo aumento de lipoproteínas ricas em triglicerídeos, redução de lipoproteínas de alta densidade (HDL) e elevação da concentração das partículas de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) pequenas e densas. Ainda, ocorre a superprodução de VLDL no fígado pelo aumento da oferta de glicose e ácido graxos livres, e consequentemente acúmulo de VLDL na circulação sanguínea, devido síntese e vida média aumentada (PATRÍCIO, 2010) (Figura 3).

Outros mecanismos estão envolvidos na dislipidemia na obesidade, como a síntese aumentada de VLDL sem apolipoproteína E e com muitas moléculas de apolipoproteína C-III, resultando em aumento da LDL. Em condições fisiológicas a apolipoproteína C-III controla a ação da lipase lipoproteica para que os triglicerídeos de lipoproteínas sejam hidrolisados gradualmente nos tecidos, e a apolipoproteína E promove o reconhecimento e o catabolismo de lipoproteínas e apolipoproteína C-III nos hepatócitos (SACKS, 2015). Além disso, no fígado a atividade da enzima lipase hepática também aumentada na resistência à insulina hidrolisa a VLDL e esta é convertida em uma partícula mais densa e aterogênica, a LDL, assim também ocorre hidrólise de LDL e HDL, gerando partículas com características altamente aterogênicas (SIQUEIRA; ABDALLA; FERREIRA, 2006; PATRICIO, 2010). Ainda, a ação da lipase hepática sobre a HDL rica em triglicerídeos facilita a interação com os receptores SRB1 (*scavenger receptors B, class 1*) no fígado, degradando esta lipoproteína. Assim, o transporte reverso do colesterol estará prejudicado, uma vez que este é formado pelas vias SRB1 e proteína de transferência de ésteres de colesterol (CETP) (FORTI; DIAMENT, 2006) (Figura 3).

A CETP em estado fisiológico modula a troca de colesterol ésteres e triglicérides entre o HDL, VLDL e LDL, para remoção do colesterol dos tecidos periféricos para o fígado. No entanto, na resistência à insulina sua ação está aumentada por regulação de SREBP-1c e RXR, portanto, a transferência de triglicerídeos da VLDL para a LDL e HDL em troca de colesterol ésteres é elevada, reduzindo assim o colesterol das HDL e enriquecendo estas de triglicerídeos. Ainda, Níveis baixos de HDL acompanhado por hipertrigliceridemia ou hipercolesterolemia (principalmente se a relação colesterol total/HDL estiver aumentada) e aumento da concentração das lipoproteínas

remanescentes e de LDLs pequenas e densas, são alterações que podem estar vinculadas às doenças cardiovasculares e SM (FORTI; DIAMENT, 2006) (Figura 3).

Os ácidos graxos livres, os macrófagos e citocinas, como o $\text{TNF-}\alpha$ e o desequilíbrio das defesas antioxidantes em situações como obesidade são acompanhadas por aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), como o ânion superóxido, o peróxido de hidrogênio, a hidroxila e NO, promovendo o estado de estresse oxidativo, envolvido em alterações metabólicas como a resistência à insulina e doenças cardiovasculares (MARREIRO, 2013).

A produção de EROs induz a expressão de proteínas pró-inflamatórias e resistência à insulina pela ativação de PKC, JNK, NF-KB e peroxidação lipídica no metabolismo das lipoproteínas, resultando em LDL oxidado (LDL-ox) (SIQUEIRA; ABDALLA; FERREIRA, 2006; YE, 2013). O acúmulo de LDL-ox em células endoteliais de vasos sanguíneos é responsável pelo desenvolvimento de placa de ateroma (SIQUEIRA; ABDALLA; FERREIRA, 2006; MARREIRO, 2013). O malondialdeído (MDA) é um dos produtos da peroxidação lipídica e sua quantificação nos sistemas biológicos é um parâmetro importante para avaliação do estresse oxidativo celular (FRANÇA et al., 2013).

A obesidade juntamente com o aumento de ácido graxos livres circulantes, sobrecarga do sistema de β -oxidação mitocondrial, desregulação do metabolismo das lipoproteínas, presença de citocinas pró-inflamatórias, expressão aumentada do PPAR- γ , resistência à insulina e o estresse oxidativo tem papel importante na deposição excessiva de triglicerídeos nos hepatócitos, conhecida como doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) (CINTRA, 2008; SCHILD; SANTOS; ALVES, 2013). A DHGNA possui diferentes estágios, variando do acúmulo simples de gordura no fígado, conhecida como esteatose hepática não alcoólica (EHNA), a qual poderá evoluir para um acúmulo com inflamação, conhecido como esteatohepatite não alcoólica (ENA) e posteriormente para fibrose, cirrose ou hepatocarcinoma (SCHILD; SANTOS; ALVES, 2013).

No fígado, os ácidos graxos são a maior fonte de estresse oxidativo, sendo este considerado o principal gatilho na evolução da EHNA para suas formas mais graves. Os ácidos graxos induzem a desregulação da cadeia respiratória mitocondrial e das lipooxigenases microssomais P450-2E1 e P450-4, resultando na produção de radicais livres, peroxidação lipídica das membranas dos hepatócitos e alteração funcionais dos peroxissomos e da mitocôndria (CINTRA, 2008).

A deficiência de enzimas como, da enzima acil-CoA oxidase na via de β -oxidação peroxissomal reduz oxidação de ácidos graxos, levando a esteatose microvesicular e esteato-hepatite (CINTRA, 2008). Na deposição de lipídeos microvesicular ocorre numerosos e menos volumosos vacúolos, mantendo a localização central do núcleo. No entanto, na deposição macrovesicular ocorre distensão da célula por um único e volumoso vacúolo e deslocamento do núcleo para a periferia do hepatócito (SILVA; ESCANHOELA, 2009). Esta está relacionada a distúrbios crônicos no metabolismo de ácidos graxos e em alguns indivíduos pode estar associada ao desenvolvimento de ENA (SILVA; ESCANHOELA, 2009).

A sobrecarga na mitocôndria dos hepatócitos gerada pela captação, oxidação e exportação de ácidos graxos produz EROs, levando a peroxidação lipídica com ativação de MDA e 4-hidroxinonenal. Estas duas substâncias induzem um processo inflamatório no local com morte celular, formação do corpúsculo hialino de *Mallory* e ativam a síntese de colágeno no parênquima hepático, que poderá levar a fibrose no órgão (CINTRA, 2008).

A esteatohepatite não alcoólica (ENA) é caracterizada pela presença da esteatose com outras lesões dos hepatócitos, como balonização (alteração morfológica da célula por retenção de fluido (água), devido a distúrbios metabólicos da célula, como disfunção da bomba de sódio e da diminuição de secreção de proteínas), infiltrado inflamatório portal, caracterizado por um misto de neutrófilos mononucleares e polimorfonucleares, e corpúsculos de *Mallory* (inclusões homogêneas formadas por proteínas do citoesqueleto agregadas por ação de radicais livres, eosinófilos promovendo o acúmulo de neutrófilos ao redor do hepatócito). Ainda, corpos acidofílicos densamente eosinofílicos resultantes de hepatócitos apoptóticos (BERENSTEIN, 2007).

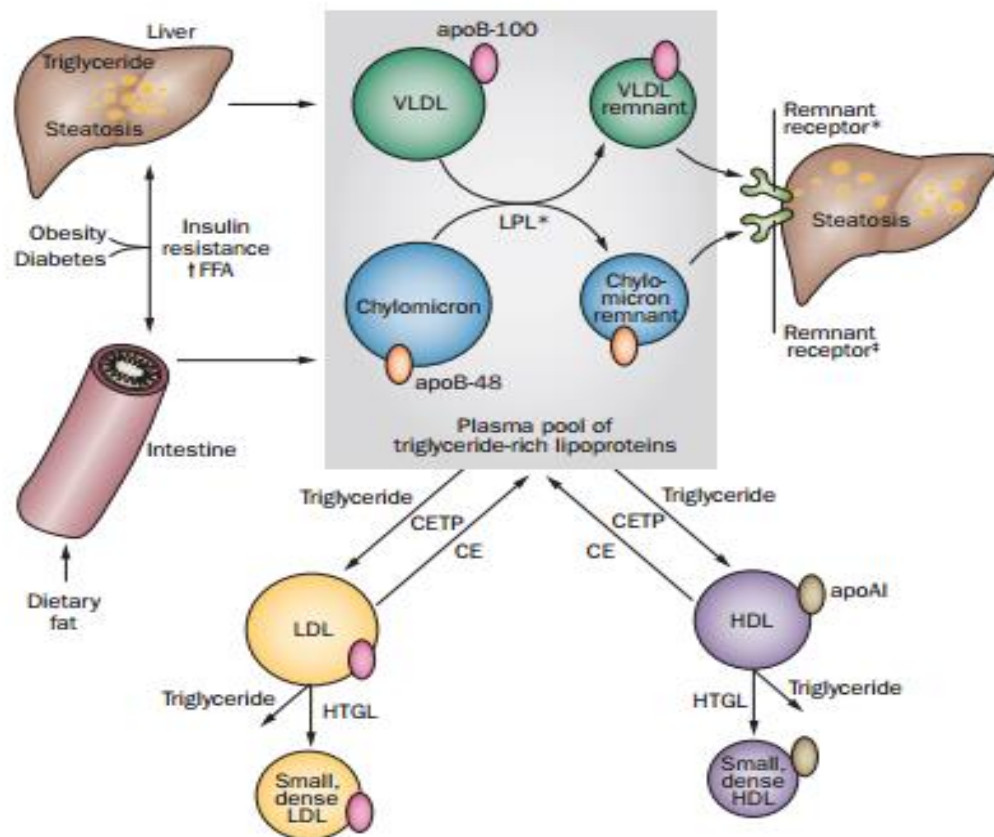


Figura 3 - Patogênese da dislipidemia na hipertrigliceridemia, resistência à insulina, esteatose hepática e obesidade. A superprodução de VLDL e quilomícrons pelo fígado e intestino, juntamente com a diminuição do catabolismo aumenta o *pool* de lipoproteínas ricas em triglicerídeos circulantes, incluindo lipoproteínas remanescentes. Consequentemente, ocorre uma maior interação entre lipoproteínas ricas em triglicerídeos através da CETP, resultando em partículas de LDL e HDL menores e mais densas. Ainda, a atividade da LPL é diminuída no músculo esquelético e no tecido adiposo, assim como a atividade do receptor remanescente hepático. CE: colesterol éster. FFA: ácidos graxos livres. HTGL: lipase de triglicerídeos hepática

Fonte: WATTS; OOI; CHAN (2013).

Ainda, o Sistema Nervoso Central controla o apetite e gasto energético a partir de órgãos periféricos relacionados à absorção de nutrientes no trato gastrointestinal, utilização ou armazenamento de energia no tecido adiposo, fígado e músculo. Peptídeos produzidos na periferia, principalmente alguns hormônios do tecido adiposo, como a leptina, adiponectina e resistina e do trato gastrointestinal, são os principais sinais aferentes com capacidade de comunicar-se com receptores no hipotálamo e controlar a ingestão alimentar (MOURA; OLIVEIRA, 2013)

Na obesidade níveis elevados de leptina circulante sugere resistência à ação da leptina. O mecanismo de resistência à leptina na obesidade não está totalmente

esclarecido, no entanto, alguns estudos sugerem a ocorrência de mutações nos receptores de leptina. Além disso, um defeito no transporte da leptina ao sistema nervoso central ou também um defeito pós-receptor, levando a uma falha na ativação dos mediadores neuroendócrinos reguladores do peso corporal (GUIMARÃES et al., 2007; SANTOS; TORRENT, 2010; MAURY; BRICHARD, 2010). Os níveis da resistina também aumentam na obesidade e seu efeito pró-inflamatório inicia-se por sua ligação ao receptor TLR4 com ativação da via NF- κ B, MAPK e produção de ERO. Níveis elevados de resistina circulante estão correlacionados positivamente com o IMC e resistência à insulina (GOSTTSCHALL; BUSNELLO, 2009; VALE; LISBOA, 2013).

Em indivíduos obesos, os níveis séricos da adiponectina estão diminuídos quando comparados a indivíduos magros. A adiponectina melhora a sensibilidade à insulina, aumenta a oxidação muscular de triglicerídeos e reduz a concentração de glicose plasmática através do AMPK, que estimula a translocação do transportador de glicose tipo 4 (GLUT-4) e reduz gliconeogênese (VALE; LISBOA, 2013).

2.1.7 Tratamento da obesidade

O tratamento da obesidade por sua complexidade requer acompanhamento multidisciplinar, focando principalmente na modificação dos hábitos de vida. O tratamento individualizado exige mudanças na alimentação, ou seja, reeducação alimentar com o objetivo de diminuir a ingestão calórica. Em adultos, a atividade física e um planejamento dietético com um déficit de 500 a 1.000 Kcal é recomendado dentro de um programa para perda de peso, objetivando uma diminuição de 0,5 a 1kg por semana. A terapia cognitivo-comportamental também está indicada para modificar transtornos de comportamentos associados ao estilo de vida do paciente, e dessa forma facilitar a adesão ao tratamento, evitando recaídas (ABESO, 2016).

O tratamento medicamentoso está indicado para indivíduos com IMC $\geq$ a 30 kg/m² e IMC $\geq$ a 25 ou 27 kg/m² na presença de comorbidades. No Brasil, os medicamentos sibutramina, orlistate e liraglutida 3,0 mg estão aprovados para o tratamento da obesidade com o objetivo de prevenir a progressão da doença e suas complicações, no entanto, deve-se realizar mudanças de estilo de vida concomitantemente ao uso de fármacos (ABESO, 2016).

Em 2016 a Anvisa aprovou no Brasil o registro do Belviiq® (cloridrato de lorcasserina hemihidratado). Este medicamento está indicado como adjuvante no controle de peso em pacientes adultos obesos (ANVISA, 2016). Taylor e colaboradores (2013) descreveram em seu estudo que, este novo medicamento parece atuar como agonista nos receptores centrais do subtipo 2C da serotonina localizados em receptores neuronais pró-opiomelanocortina, resultando em diminuição da ingestão de alimentos e aumento da saciedade. No entanto, os autores ressaltam que os mecanismos de ação envolvidos no controle da obesidade não estão totalmente esclarecidos.

Nos casos de falha no tratamento clínico (dietoterapia, psicoterapia, tratamento farmacológico e atividade física) a cirurgia bariátrica para melhorar a qualidade de vida e diminuir o risco de mortalidade poderá ser indicada. Sendo, indivíduos com idade de 18 a 65 anos, IMC maior a 40 kg/m² ou 35 kg/m², com uma ou mais comorbidades graves relacionadas com a obesidade alguns dos critérios para a indicação da cirurgia bariátrica (ABESO, 2016).

Ainda, no Brasil, o uso de plantas medicinais representam um recurso terapêutico para o tratamento da obesidade e de suas comorbidades, pelo seu baixo custo, não necessita de prescrição médica e culturalmente a população acredita que esse tipo de tratamento não acarreta efeitos colaterais (SIMÃO, 2013).

2.2 Plantas medicinais

O Brasil possui uma das maiores diversidades de espécies de plantas do mundo, no entanto, estima-se que apenas 0,4% da flora têm sido estudada em relação às propriedades farmacológicas. Sendo que, aproximadamente 25% de todos os medicamentos modernos são derivados diretamente ou indiretamente de plantas medicinais (BRASIL, 2012).

As plantas medicinais são aquelas capazes de aliviar ou curar enfermidades e utilizadas pelo conhecimento tradicional entre povos e comunidades. Estas são consideradas um importante instrumento da assistência farmacêutica, já que 70% a 90% da população nos países em vias de desenvolvimento e em alguns países industrializados utilizam plantas no cuidado à saúde. No entanto, a população de países emergentes depende delas, devido aos serviços de saúde limitados e nos países industrializados as plantas medicinais são utilizadas como um recurso

complementar, concomitantemente a medicina tradicional. No Brasil, aproximadamente 82% da população utiliza plantas medicinais nos seus cuidados com a saúde (WHO, 2011; BRASIL, 2012).

Em 2006, foi publicada no Brasil a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos por meio do Decreto nº 5.813/2006 que visa garantir à população brasileira o acesso seguro a plantas medicinais, fitoterápicos e serviços relacionados à fitoterapia mediante a inserção destes no Sistema Único de Saúde (SUS), fomentando a pesquisa para o desenvolvimento de tecnologias e inovações nas diversas fases da cadeia produtiva, entre outras propostas (BRASIL, 2006). O estudo de plantas pode ser baseado a partir de um ou mais critérios relacionados ao conhecimento das sociedades tradicionais, conhecido como etnofarmacologia, na composição química, toxicidade ou ainda na seleção ao acaso (BRASIL, 2012).

Dutra e colaboradores (2016) após uma revisão encontraram um aumento significativo em publicações sobre plantas medicinais em estudos realizados por pesquisadores brasileiros nos últimos 28 anos (entre os anos de 1987 e 2015). Em 2011 e 2013 foram publicados aproximadamente 34.614 manuscritos sobre plantas medicinais, sendo que pesquisadores brasileiros publicaram mais de 10.000 artigos científicos sobre este tópico.

Como citado anteriormente, um dos fins da utilização de plantas medicinais é o tratamento da obesidade, uma vez que, a diminuição de 3% a 5% do peso corporal está associada a redução de alguns fatores de risco cardiovasculares (OLIVEIRA; VENCIO; 2011). Assim, se tem um aumento no incentivo a pesquisas para determinar a segurança e eficácia de plantas consideradas popularmente como anti-obesogênicas, paralelo a uma maior procura destas pela população (SIMÃO, 2013).

Os mecanismos pelos quais as plantas medicinais podem auxiliar no tratamento da obesidade estão relacionados à diminuição da absorção de lipídios e carboidratos, aumento do gasto energético, diminuição da diferenciação e proliferação de pré-adipócitos, diminuição da lipogênese e aumento da lipólise. Ainda, estas plantas podem conter compostos bioativos com capacidade anti-inflamatória e antioxidante, colaborando na diminuição da inflamação crônica e do estresse oxidativo (MANENTI, 2010; PORT´S, 2011).

2.3 Graviola

A gravioleira (*Annona muricata* Linn) é uma planta que pertence à família Annonaceae. De pequeno porte, ereta, de 5-8 metros de altura e folhas inteiras, ovadas, de pecíolos curtos, largas de cor verde escuro, de aparência tenra e brilhante (ADEWOLE; OJEWOLE, 2009; SILVA; ANTUNES; CATÃO, 2011). A floração e frutificação são contínuas durante o ano, com ligeiro pico de floração entre setembro a janeiro, necessitando de um período de estiagem para favorecer a fecundação das flores e formação dos frutos (NASCIMENTO; GAZEL FILHO; SANTOS, 2002). O fruto da *Annona muricata* Linn também conhecido popularmente como “graviola” possui cor amarelo esverdeada, espesso e comestível, apresentando entre 15-23 cm de largura. O peso pode chegar até 10 kg, em forma de coração, com polpa mucilagínosa branca e bastante aromática, de sabor agradável, levemente ácida (SILVA; ANTUNES; CATÃO, 2011; FREITAS, 2012).

Nativa da América Central foi trazida para o Brasil pelos colonizadores portugueses no século XIV, e atualmente é encontrada em todos estados brasileiros (SILVA; ANTUNES; CATÃO, 2011; FREITAS, 2012). A graviola é amplamente cultivada em estados da região Norte, Nordeste e Centro-Oeste. Entretanto, a Bahia, é considerada o maior produtor mundial de graviola (FREITAS, 2012).

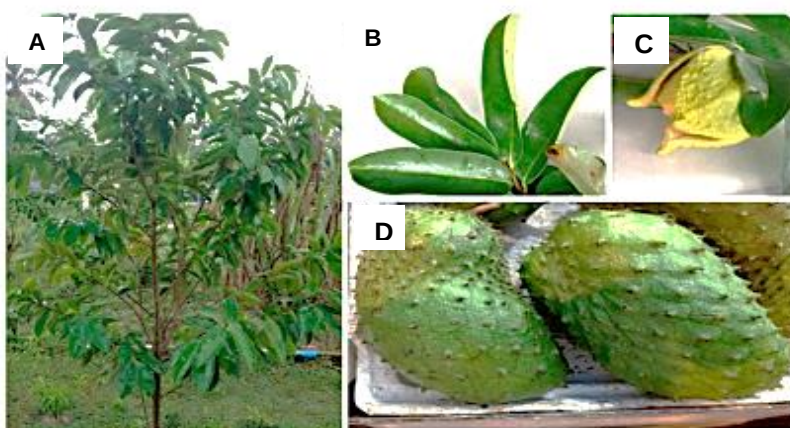


Figura 4 - Graviola (A) (*Annona muricata* Linn) (B) folhas (C) flores e (D) frutos
Fonte: Moghadamtousi et al., (2015)

Apesar da *Annona muricata* Linn ser consumida como fruta *in natura* pela população em geral, ela destaca-se entre as várias espécies de plantas de interesse medicinal, a qual tem raízes, fruto e folhas utilizados na medicina popular em várias regiões do mundo (SILVA; ANTUNES; CATÃO, 2011).

Estudos fitoquímicos realizados com várias partes morfológicas da *Annona muricata* Linn revelaram a presença de compostos químicos, como acetogeninas,

alcalóides, cumarinas, antraquinonas, taninos, glicosídeos cardíacos, flavonóides, fitosteróis, saponinas, terpenóides, lactonas, entre outros, sendo as folhas e as sementes as mais estudadas, devido seu uso tradicional (NAWWAR et al., 2012; CORIA- TÉLLEZ et al., 2016; GAVAMUKULYA et al., 2014).

Moghadamtousi e colaboradores (2015) descrevem em sua revisão sistemática o potencial antioxidante nas folhas, sementes e na casca do caule da *Annona muricata* Linn. Em posterior análise foi encontrado efeito protetor contra toxicidade induzida por peróxido de hidrogênio, redução da peroxidação lipídica e antioxidantes enzimáticos (catalase e superóxido dismutase) e não enzimáticos (vitamina C).

No que diz respeito a estudos farmacológicos, os mesmos demonstram os vários benefícios da *Annona muricata* Linn, como anti-hipertensivo, vasodilatador, antiespasmódico, antidiabético, hipolipidêmico, antibacteriano, antiparasitários, antiviral e sedativo. Ainda, é utilizada no tratamento de febre, vômitos, asma, dor, tosse, ferida da pele, antioxidante e vários outros efeitos citados na literatura. As folhas são utilizadas popularmente como emagrecedor. Além disso, a *Annona muricata* Linn foi descrita recentemente como "*The cancer killer*", ou seja, assassina do câncer. O caule, as cascas e folhas tem se revelado antiproliferativa notável contra as células cancerígenas sem afetar células normais (ADEWOLE; OJEWOLE, 2009; FLORENCE et al., 2014).

Cercato e colaboradores (2015) após revisão sistemática sobre espécies de plantas utilizadas pela população brasileira para reduzir o peso corporal, encontraram que as espécies mais citadas foram *Baccharis trimera* (Less.) DC, *Annona muricata* Linn e *Hancornia speciosa*. No entanto, os autores ressaltam que não há base científica suficiente para recomendar estas plantas para reduzir peso corporal em indivíduos com excesso de peso.

Apesar da *Annona muricata* Linn conter estas propriedades químicas capazes de induzir efeitos biológicos, sob nosso conhecimento, não há estudos que recomendam a utilização das folhas de graviola para redução de peso e melhora de alterações metabólicas em modelo experimental tratado com dieta obesogênica. Do mesmo modo, a presença de compostos, quantidade e possível ação sinérgica das propriedades presentes nas folhas de graviola na promoção da saúde estão interrogadas (CERCATO et al., 2015).

Florence e colaboradores (2014) avaliaram em seu estudo os efeitos antidiabético e antioxidante do extrato aquoso da folha da graviola nas concentrações

de 100 mg/kg e 200 mg/kg em ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina. Em seus resultados, a concentração de 100 mg/kg apresentou melhores respostas em relação à redução dos níveis de glicose no sangue em 75% em uma única administração do extrato, redução na ingestão de alimentos em 45,43% e redução dos níveis séricos de triglicérides (52,95%), colesterol total (31,51%) e colesterol LDL (81,22%).

Apesar de estudos toxicológicos com esta planta em diferentes concentrações não foram encontrados efeitos tóxicos. A atividade antidiabética do extrato aquoso da *Annona muricata* Linn pode ser explicada pelo seu efeito hipolipidêmico, e pela ação antioxidante e protetora nas células- β pancreáticas e, conseqüentemente, melhora o metabolismo da glicose. Ainda, em estudos, a *Annona muricata* Linn causou significativa redução da pressão arterial, através de mecanismos periféricos envolvendo antagonismo de cálcio (FLORENCE et al., 2014).

2.4 Modelo experimental de obesidade induzida por dieta

Pesquisas científicas com modelos experimentais promovem o desenvolvimento de medidas profiláticas e tratamentos de enfermidades que acometem os seres humanos (PELUZIO; ABRANCHES; ROSA, 2014). O uso de ratos e/ou camundongos em estudos científicos sobre doenças metabólicas são amplamente utilizados, devido baixo custo de manutenção, tamanho corporal pequeno e são geneticamente e biologicamente parecidos com os humanos (PANCHAL; BROWN, 2011). Na nutrição a utilização de modelos selvagens ou modificados por cruzamento espontâneo ou geneticamente contribui para o entendimento dos efeitos de nutrientes na fisiologia e doenças metabólicas humanas, tais como a obesidade e SM (PANCHAL; BROWN, 2011; PELUZIO; ABRANCHES; ROSA, 2014). Os modelos experimentais de obesidade em camundongos das linhagens isogênicas ou *inbred* (C57BL/6, C57BL/6J, AKR/J, A/J) são os mais amplamente utilizados (WHITE et al., 2013).

Assim, os modelos experimentais dietéticos podem imitar em roedores às alterações fisiopatológicas humanas, no entanto não há uma composição e duração estabelecidas na literatura. Em geral, as dietas com alto teor de gordura e a inatividade física utilizadas nestes modelos também são os principais fatores de riscos encontrados em humanos (PANCHAL; BROWN, 2011; KAKIMOTO; KOWALTOWSKI, 2016). Na literatura, diferentes tipos de dietas ricas em gorduras

são utilizados com uma variação entre 20% a 60% de energia da dieta como gorduras de origem animal, como banha ou sebo de carne, ou óleos vegetais como óleo de coco (PANCHAL; BROWN, 2011).

Estudos encontrados na literatura mostram que camundongos C57BL/6 são susceptíveis no desenvolvimento da obesidade, quando induzida por dieta hiperlipídica, acrescida com banha (TEIXEIRA, 2010)

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar os efeitos do extrato aquoso da folha da graviola (*Annona muricata* Linn) em modelo experimental de obesidade.

3.2 Específicos

Quantificar teor de fenóis, flavonoides, taninos e capacidade antioxidante do extrato aquoso da folha da graviola (*Annona muricata* Linn);

Identificar compostos presentes no extrato aquoso da folha da graviola (*Annona muricata* Linn);

Avaliar a toxicidade aguda do extrato aquoso da folha da graviola (*Annona muricata* Linn);

Avaliar nos animais tratados com o extrato, a ingestão alimentar e eficiência alimentar;

Avaliar nos animais alimentados com o extrato aquoso da folha da graviola as alterações na composição corporal, como: o ganho de peso corporal e adiposidade;

Avaliar nos animais alimentados com o extrato aquoso da folha da graviola as alterações metabólicas no soro, como: perfil lipídico (triglicerídeos, colesterol total e frações e índice aterogênico) e perfil glicêmico (glicemia de jejum e sensibilidade à insulina).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Obtenção da matéria prima

As folhas da graviola (*Annona muricata* Linn) foram coletadas no período de junho/2015 de um espécime adulto, localizada no município de Campo Grande (georreferenciamento: 22°29'42,6" S e 054°37'1,6" W), no estado de Mato Grosso do Sul. A planta foi identificada pelo biólogo Prof. Dr. Flávio Macedo Alves e depositada no "Herbário CGMS" da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, exsicata n° 53.928.

Após a coleta, as folhas foram submetidas à secagem em estufa por 24 horas, a uma temperatura máxima de 45°C. Após completa secagem o material foi armazenado em sacos de papel e conduzido ao Departamento de Química da Universidade Estadual do Mato Grosso do Sul (UEMS), Dourados-MS.

4.2 Preparação do extrato aquoso

Para obtenção do extrato aquoso, o material vegetal seco em estufa foi triturado em moinho de facas até a obtenção de um pó fino (granulometria igual ou menor que 1mm). Em seguida, o extrato aquoso foi preparado por imersão de 1 kg do pó em 3 L de água destilada por 48 horas e filtrado em papel de filtro qualitativo. Posteriormente o material foi liofilizado até a obtenção de um pó seco, em seguida, foi armazenado em recipiente de polietileno com tampa em temperatura ambiente e protegido da luz até a utilização do mesmo. O rendimento foi de 50 g de extrato, sendo o rendimento final de 5% (FLORENCE et al., 2014).

4.3 Quantificação de antioxidantes e atividade antioxidante

4.3.1 Determinação fenóis totais

Para a determinação de fenóis o extrato de graviola em pó foi dissolvido em água destilada em uma concentração de 50 µg mL⁻¹.

A cada 100 µL de amostra (50 µg mL⁻¹) adicionaram-se 1,50 mL de solução aquosa de carbonato de sódio 2%, 0,5 mL de reagente Folin-Ciocalteu (1:10 v/v) e 1

mL de água destilada. Esta solução reagiu-se por 30 minutos. Em seguida, fez-se a leitura no espectrofotômetro no comprimento de onda de 760 nm. O mesmo procedimento foi realizado para o branco, sendo substituído 100 µL de amostra por 100 µL de água destilada para as amostras (DJERIDANE et al., 2006). Para calcular a concentração de fenóis foi preparada uma curva analítica empregando o ácido gálico como padrão nas concentrações de 1,0; 5,0; 10,0; 15,0; 30,0; 40,0 µg mL⁻¹. O resultado foi expresso mg de ácido gálico por g de extrato. Todos os testes foram realizados em triplicata. A equação da reta ($y=a+bx$) para o ácido gálico apresentou os seguintes valores de coeficiente angular (b)=2,345 e de coeficiente linear (a)=0,0045, com coeficiente de correlação (r)=0,9996.

4.3.2 Determinação do teor de flavonoides totais

Para a determinação de fenóis o extrato de graviola em pó foi dissolvido em água destilada em uma concentração de 50 µg mL⁻¹.

A cada 500 µL da amostra (50 µg mL⁻¹) adicionaram-se 1,50 mL de álcool etílico 95%, 0,10 mL de cloreto de alumínio 10% (AlCl₃.6H₂O), 0,10 mL de acetato de sódio (NaC₂H₃O₂.3H₂O) (1 mol L⁻¹) e 2,80 mL de água destilada. Deixou-se reagir à temperatura ambiente por 40 minutos. Fez-se a leitura no espectrofotômetro em comprimento de onda de 415 nm. O mesmo procedimento foi realizado para o branco, sendo substituídos 500 µL de amostra por 500 µL de água destilada (LIN; TANG, 2007). Para calcular a concentração de flavonoides foi preparada uma curva analítica empregando a quercetina como padrão nas concentrações 2,5; 5,0; 10,0; 20,0; 25,0; 50,0 µg mL⁻¹ empregando a quercetina como padrão. O resultado foi expresso em mg de quercetina por g de extrato. Todos os testes foram realizados em triplicata. A equação da reta ($y = a+bx$) para a quercetina apresentou os seguintes valores de coeficiente angular (b) = 3,456 e de coeficiente linear (a) = 0,0056, com coeficiente de correlação (r) = 0,9994.

4.3.3 Determinação de taninos condensados

O teste de taninos condensados foi realizado conforme método de Broadhurst e Jones (1978), adaptado por Agostini-Costa et al. (1999), e envolve a reação da

vanilina. Foram pesados 100 mg de extrato de graviola em pó e solubilizado em 10 mL de metanol HPLC (*High performance liquid chromatography*), em seguida 1 mL desta solução foi misturado a 5 mL de reagente de vanilina em tubos de ensaio com tampa com rosca. Em seguida, a reação foi mantida em banho maria a 30 °C por 20 minutos; a leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro em 510 nm. Para calcular a concentração de taninos foi preparada uma curva analítica empregando a catequina como padrão nas concentrações 1,0; 5,0; 10,0; 20,0; 25,0; 50,0 µg mL⁻¹. Os resultados foram expressos em mg equivalentes de catequina por g de extrato. Todos os testes foram realizados em triplicata. A equação da reta ($y = a+bx$) para a catequina apresentou os seguintes valores de coeficiente angular (b) = 2,674 e de coeficiente linear (a) = 0,0034, com coeficiente de correlação (r) = 0,9996.

4.3.4 Ensaio da atividade antioxidante com o radical livre DPPH

O teste de atividade antioxidante com o radical livre DPPH (1,1-difenil-2-picril-hidrazila) foi realizado utilizando amostras nas concentrações de 0,01-20 µg mL⁻¹. Preparou-se uma solução de DPPH (40 µg/mL) em água. Adicionou-se 1,00 mL da solução de DPPH para cada 0,50 mL de amostra. Deixou-se reagir por 30 minutos antes de se fazer a leitura em espectrofotômetro a 517 nm. Fez-se o mesmo procedimento para o branco. O percentual de inibição (PI) foi calculado através dos valores absorbâncias, demonstrado na equação (1) (KUMARAN; KARUNAKARAN, 2006). A curva padrão foi preparada com quercetina nas concentrações de 0,01-20 µg mL⁻¹

$$\text{Porcentagem da atividade de inibição (\%)} = [(A_0 - A_1)/A_0]100 \quad (1)$$

Equação utilizada para verificação do percentual de inibição, onde (PI) é o percentual de inibição, (A_1) corresponde à absorbância da amostra contendo apenas DPPH decorridos 30 minutos de reação e (A_0) corresponde à absorbância da amostra contendo DPPH e o extrato decorridos 30 minutos de reação. Posteriormente, foi calculada a concentração inibitória média (IC₅₀). Este cálculo reflete a quantidade de antioxidante necessária para reduzir em 50% o radical DPPH. Assim, quanto maior o consumo de DPPH por uma amostra, menor será a sua IC₅₀ e maior a sua atividade antioxidante (NEGRI et al., 2009).

4.3.5 Isolamento das substâncias do extrato da graviola

O extrato liofilizado foi fracionado por XAD-2 (Supelco, Bellefonte, PA, EUA) em cromatografia em coluna (30 cm x 3 cm). O extrato (3,16 g) foi eluído com 0,5 L de água, seguido por 0,5 L de metanol e eluído com 0,2 L de acetato de etila. Uma alíquota de 0,89 g da fração metanólica foi dissolvida em 50 mL de metanol e fracionado por cromatografia em Sephadex LH-20 (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Suécia) em cromatografia de coluna (70 cm x 3 cm) a uma taxa de 0,2 mL min⁻¹ e foram coletadas 25 frações de 2 mL. As frações foram combinadas de acordo com o seu comportamento químico em cromatografia em camada fina (placas de sílica gel) empregando como eluente (fase superior) acetato de etila:n- propanol:água (123:7:70 v/v/v). A fração 2-4, 6-8 e 11-14 foram purificadas utilizando polivinilpolipirrolidona (Sigma, St. Louis, MO, EUA) em cromatografia em coluna (10 x 2 cm) eluindo com metanol, resultando na identificação dos compostos, **1** (1 mg), **2** e **3** (2 mg), respectivamente. Uma alíquota de 0,54 g da fração acetato de etila, foi dissolvida em 10 mL de metanol e fracionado por cromatografia em Sephadex LH - 20 (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Suécia) em cromatografia de coluna (80 cm x 2 cm), eluída com metanol, a uma taxa de 0,3 mL min⁻¹ e foram coletadas 28 frações de 5 mL. As frações foram combinadas de acordo com o seu comportamento químico por meio de cromatografia em camada fina (placas de sílica gel), utilizando acetato de etila:metanol (60:40 v/v) como eluente. As frações 10-13, 18-19 e 22-25 resultaram no isolamento dos compostos **4** (2 mg), **5** (2 mg) e **6** (5 mg), respectivamente. A identificação dos compostos foi realizada empregando ressonância magnética nuclear ¹H e ¹³C (Avance 300 MHz, Bruker, Ettlingen, Alemanha) e espectrometria de massas (Shimadzu, Kyoto, Japão) e suas estruturas químicas foram confirmadas pela comparação com dados da literatura (AGRAWAL, 1989; HARBORNE, 1995; BERRONDO ET AL., 2003).

4.4 Protocolo experimental

4.4.1 Parâmetros éticos

Todos os procedimentos realizados com os animais neste estudo foram submetidos e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da

Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS) (Protocolo nº682/2015 – ANEXO A). A pesquisa corresponde a um estudo experimental desenvolvido na sala de experimentação do Biotério Central e no Centro de Ciências Biológicas e da Saúde (CCBS), UFMS, em Campo Grande, Mato Grosso do Sul.

4.4.2 Teste de toxicidade aguda

Primeiramente foi realizado o teste de toxicidade aguda com o extrato aquoso da folha em ratos *Wistar* albinos da espécie *Rattus norvegicus*, fêmeas, de 8 a 12 semanas, nulíparas e não-prenhas, as quais permaneceram por período de adaptação de 5 dias, sob as condições ambientais controladas, sendo temperatura de $22\pm 2^{\circ}\text{C}$, umidade relativa do ar 50-60% e ciclo claro/escuro invertido de 12 horas.

O teste de toxicidade aguda do extrato aquoso da graviola foi baseado na OECD (*Organisation for Economic Co-operation and Development*) – *Guidelines* 425. Para o teste de toxicidade do extrato aquoso da graviola, os animais foram distribuídos em 2 grupos (n=5): Controle que recebeu salina, e o grupo tratado com extrato aquoso da *Annona muricata* Linn na dose 2000 mg/kg (EAG 2000 mg/kg) via oral, pelo método de gavagem. Após o tratamento, os animais foram observados nos primeiros 30 minutos, 1h, 2h, 3h, 4h, 6h, 12h, 24h, e periodicamente durante 14 dias (OECD, 2008).

Simultaneamente foi realizado o teste de *screening* hipocrático (ANEXO B) com a finalidade de quantificar efeitos do extrato aquoso da folha de graviola sobre o estado de consciência e disposição, coordenação motora, tônus muscular, reflexos, atividade do sistema nervoso central, atividade do sistema nervoso autônomo, sugerido por Malone e Robichaud (1962). Ainda, alterações de peso corporal, ingestão hídrica e alimentar, assim como produção de excretas também foram avaliados (OECD, 2008).

Ao final dos 14 dias os animais foram submetidos a eutanásia, sendo inicialmente anestesiados (Ketamina e Xilazina, 75 e 10 mg/kg, respectivamente), seguido de exsanguinação. Os seus órgãos (coração, pulmão, fígado, baço, pâncreas e rins) foram retirados, pesados e analisados macroscopicamente para averiguar uma possível alteração. Ainda, o sangue foi coletado para análises bioquímicas (aminotransferase de alanina (ALT), aminotransferase de aspartato (AST), creatinina

e ureia) por meio do kit enzimático Labtest® (Lagoa Santa, Minas Gerais, Brasil), seguindo as instruções do fabricante (SILVA et al., 2016).

4.4.3 Composição das dietas

Durante o período experimental os animais foram alimentados *ad libitum* com água e dieta para camundongos adultos, segundo o *American Institute of Nutrition* (AIN-93M) (Tabela 2) (REEVES; NIELSEN; HFAHEY, 1993).

A ração hiperlipídica utilizada neste estudo foi baseada na AIN-93M acrescida de banha em substituição de alguns ingredientes, principalmente o amido, com o objetivo de aumentar o teor calórico da dieta e induzir o ganho de peso e alterações metabólicas em animais. A composição da dieta hiperlipídica utilizada neste estudo foi adaptada do modelo experimental proposto por Lenquiste e colaboradores (2015).

Tabela 2 - Composição das dietas experimentais (g/kg ração)

	Dieta AIN-93M	Dieta Hiperlipídica
Ingredientes (g/kg)		
Amido	620,692	320,692
Caseína (≥85% de proteína)	140,00	140,00
Banha	-	320,00
Açúcar	100,00	100,00
Óleo de soja	40,00	20,00
Celulose	50,00	50,00
Mix minerais*	35,00	35,00
Mix vitaminas**	10,00	10,00
L-cistina	1,80	1,80
Bitartarato de colina	2,50	2,50
Tertbutil hidroquinona	0,008	0,008
Energia (Kcal/kg)	3.802,8	5.302,8
Carboidratos (%)	75,81%	31,73%
Proteínas (%)	14,73%	10,56%
Lipídeos (%)	9,47%	57,71%
Calorias/g dieta	3,80	5,30

*Vitaminas e **Minerais presentes no mix estão de acordo com a AIN-93M.

4.4.4 Delineamento experimental

Para execução deste projeto foram utilizados camundongos C57bl/6, machos, adultos, fornecidos pelo Biotério Central/CCBS/UFMS, mantidos em temperatura em torno de $22\pm 2^{\circ}\text{C}$, umidade relativa do ar em 50-60%, com ciclo claro-escuro de 12 horas.

Inicialmente para indução da obesidade os animais foram divididos em dois grupos homogêneos quanto ao peso, da seguinte forma: grupo SHAM (n=11), tratado com dieta AIN-93M, e grupo DHL (n=44), com dieta hiperlipídica.

Após 12 semanas de consumo das dietas citadas anteriormente, os animais do grupo DHL foram divididos em 4 grupos homogêneos quanto ao peso e glicemia de jejum, da seguinte forma: grupo DHL SALINA (dieta hiperlipídica + salina) (n=11), grupo EAG 50mg/kg (dieta hiperlipídica + extrato aquoso da folha de graviola - 50 mg/kg) (n=11), grupo EAG 100 mg/kg (dieta hiperlipídica + extrato aquoso da folha de graviola - 100 mg/kg) (n=11), grupo EAG 150 mg/kg (dieta hiperlipídica + extrato aquoso da folha de graviola - 150 mg/kg) (n=11). O grupo SHAM também recebeu salina nesta etapa do estudo (Figura 5).

Ao final do período experimental os camundongos foram anestesiados (Quetamina e xilazina, 75 e 10 mg/kg, respectivamente) e submetidos a eutanásia por exsanguinação por meio de punção cardíaca após jejum de 8 horas. O sangue foi coletado e o soro foi separado por centrifugação para análise bioquímica.

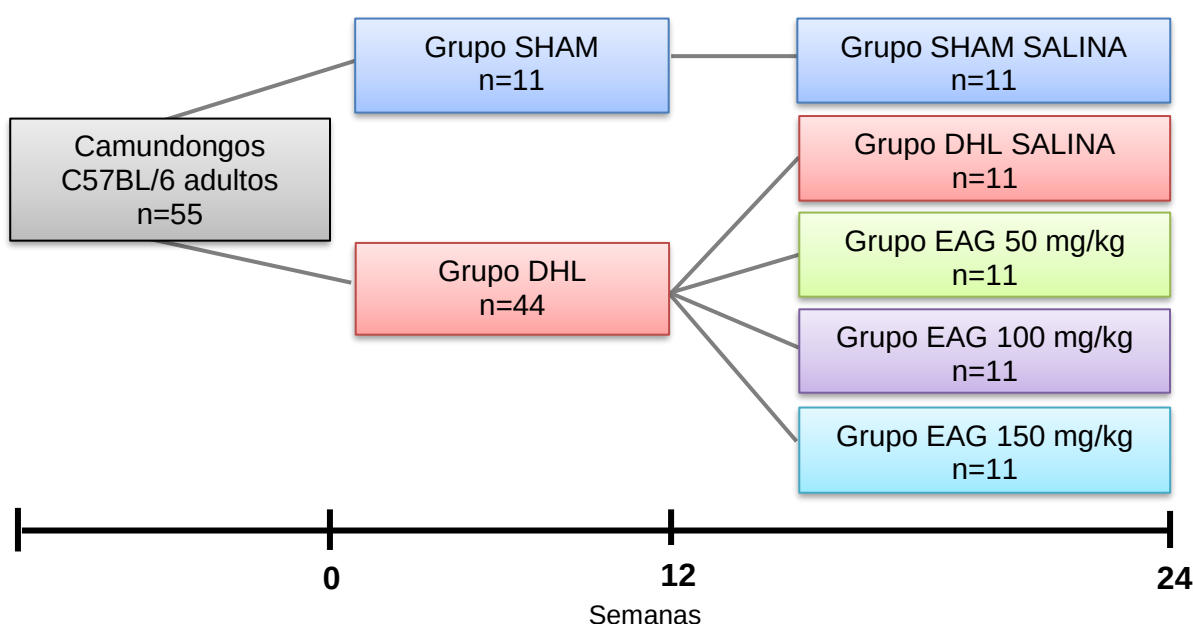


Figura 5 - Delineamento experimental

4.4 Métodos analíticos

4.4.1 Controle do peso corporal

Os camundongos foram pesados semanalmente para observar a evolução ponderal, utilizando balança digital Luxor® e peso corporal expresso em gramas.

A evolução do peso corporal dos animais estudados foi acompanhada durante as semanas de indução da obesidade e também no período de estudo do efeito do extrato da graviola.

4.4.2 Avaliação da ingestão alimentar, eficácia alimentar e ganho de peso

O controle da ingestão de dieta foi monitorado 3 vezes na semana, verificando a quantidade de dieta oferecida aos animais e a quantidade restante, expressa em g/por animal consumida diariamente. A ingestão energética, expressa em Kcal/dia, foi calculada neste estudo pela multiplicação da quantidade de dieta ingerida pelo valor densidade energética de cada dieta.

Foi calculado o coeficiente de eficácia alimentar (CEA), com a finalidade de determinar quanto um grama de ração ingerida promove em aumento de peso corporal, obedecendo a seguinte equação (2):

$$CEA = (PF - PI) / TA \quad (2)$$

Onde, PF é peso corporal final em gramas, PI equivale ao peso corporal inicial em gramas e TA representa quantidade total de alimento ingerido em gramas (NERY et al., 2011; SALERNO, 2014).

O cálculo do coeficiente de ganho de peso por consumo calórico (CGPCC), foi realizado com o objetivo de analisar a capacidade do animal em converter energia alimentar consumida em peso corporal, obedecendo a seguinte equação (3):

$$CGPCC = (PF - PI) / \text{Kcal ingerida} \quad (3)$$

Onde, PF representa o peso corporal final em gramas, PI equivale ao peso corporal inicial em gramas e Kcal ingerida é o valor calórico da dieta ingerida (NERY et al., 2011; SALERNO, 2014).

A ingestão alimentar dos animais estudados foi avaliada durante as semanas de indução da obesidade e também no período de administração do extrato da folha da graviola.

4.4.3 Avaliação da gordura corporal e peso do fígado

Após a eutanásia, o fígado e os sítios de gorduras omental, epididimal, retroperitoneal, perirrenal, e do mesentérico de cada animal foram totalmente removidos e pesados em balança semi-analítica (Bel®), para comparação entre os grupos estudados. Os valores de peso corporal foram expressos em gramas.

O índice de adiposidade foi calculado como a soma total dos sítios de tecido adiposo branco visceral (g) dividido pelo peso corporal final do animal x 100 e foi expresso em percentual de adiposidade (WHITE et al., 2016).

4.4.4 Histologia do tecido adiposo epididimal, fígado e pâncreas

Após a retirada e pesagem do fígado e tecido adiposo epididimal, fragmentos destes órgãos e o pâncreas foram fixados em solução de formalina a 10% por 24 horas e depois mantidos em álcool 70% até o processamento histológico. Após a fixação, os espécimes foram desidratados em baterias de álcool e xilol, incluídos em parafina, cortados em micrótomo com espessura de 5 µm cada e corados por hematoxilina-eosina (TEIXEIRA et al., 2006; MORAIS, 2013).

A análise histológica do fígado e do pâncreas foi realizada por patologista com experiência na área. Para as análises do efeito do tratamento nos hepatócitos utilizou-se o sistema de Kleiner (2005), onde avaliou-se o grau de esteatose (< 5%, 5 a 33%, 34 a 66%, > 66%), esteatose microvesicular (ausente ou presente), inflamação lobular (Ausente, < 1 foco/campo, 2-4 focos/campo ou > 4 focos/campo), balonização (ausente, poucas células ou muitas células), hialino de Mallory (ausente ou presente), núcleo glicogenado (nenhum/raros ou alguns) e apoptose (ausente ou presente). Na avaliação da arquitetura do pâncreas avaliou-se alterações nas Ilhotas de Langerhans

(sem alteração, atrofia discreta, atrofia, hipertrofia discreta e hipertrofia), ácinos pancreáticos (sem alteração, necrose/atrofia), e inflamação pela presença de células inflamatórias internamente (insulite) e na periferia (perinsulite) das ilhotas de langerhans (PASINI, 2012; WANG et al., 2014; CHANDRAN et al., 2016).

Para a análise da área dos adipócitos do tecido adiposo epididimal, inicialmente foi realizada a captura de imagens utilizando o sistema de câmera digital LEICA DFC 495 (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany,), integrado ao microscópio LEICA DM 5500B (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany,) com aumento de 20x. As imagens foram analisadas com auxílio do *software* LEICA *Application Suite* versão 4.0 (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany,) e a média da área de 100 adipócitos por amostra foi determinada (PEREIRA et al., 2012).

4.4.5 Determinação dos lipídeos totais, colesterol total e triglicerídeos hepáticos

Os lipídeos totais hepáticos foram extraídos com o uso de solventes orgânicos de acordo com o método de Folch e colaboradores (1957). Inicialmente 50 mg de tecido hepático macerado foram homogeneizados em tubos de vidro tampado com 1900 µL de solução clorofórmio: metanol (2:1) por 3 minutos. Após a homogeneização foram adicionados 400 µL de metanol, jato forte, e os tubos foram centrifugados a 3000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante foi então transferido para tubos limpos previamente pesados. A seguir foram acrescentados 800 µL de clorofórmio e 640 µL de NaCl 0,73%, jato forte e realizada homogeneização lenta. A seguir as amostras foram novamente centrifugados por 10 minutos a 3000 rpm. A fase superior foi desprezada e a parede interior de cada tubo foi lavada 3 vezes com 600 µL (por vez) de solução de Folch (3% de clorofórmio, 48% de metanol, 47% de água destilada e 2% de NaCl 0,2%). Em seguida, os tubos foram colocados para secar em estufa a 60°C. A quantidade de lipídeos extraída foi calculada por diferença de peso entre o tubo após secagem (com lipídeos) e o tubo vazio (antes do experimento).

Para a determinação do colesterol total e triglicerídeos hepáticos, os extratos lipídicos foram suspensos novamente em 500 µL de isopropanol para a determinação dos níveis de colesterol total e triglicerídeos utilizando o kit enzimático Labtest® (Lagoa Santa, Minas Gerais, Brasil). A análise foi realizada em tubos de ensaios, onde foram transferidos 10 µL de soro, adicionados de 1000 µL do reagente utilizado. Para a determinação do padrão foi substituído 10 µL de amostra por 10 µL do padrão. Após

banho maria de 10 minutos a 37°C, a absorbância foi lida a 505 nm em espectrofotômetro (Biochrom, Libra S60PC) (JASCOLKA, 2010).

4.5 Análises séricas

4.5.1 Perfil glicêmico: glicemia de jejum, teste de tolerância à glicose e sensibilidade à insulina

O teste oral de tolerância a glicose foi realizado um dia antes de iniciar o tratamento com o extrato aquoso de graviola ou salina nos grupos controle e 3 dias antes da eutanásia dos animais, após 6 horas em jejum. Posteriormente, foi feita a verificação da glicemia de jejum via caudal (tempo 0), com o uso de um glicosímetro G-Tech® (G-TECH Free, Infopia Co., Ltd Coréia do Sul), os animais receberam solução de D-glicose (Sigma Aldrich, Duque de Caxias, Rio de Janeiro, Brasil), 2 g/kg de peso corporal, por gavagem. A leitura da glicemia foi realizada nos tempos 15, 30, 60 e 120 minutos após a aplicação da glicose (SANTOS et al., 2008).

O teste de sensibilidade à insulina foi realizado 5 dias antes da eutanásia. Com os animais em estado alimentado foi verificada a glicemia (tempo 0). Em seguida, foi injetado intraperitonealmente 0,75 unidade de insulina (NovoRapid – 100 U/mL, Novo Nordisk, Bagsvaerd, Dinamarca) por kg de peso do animal. A leitura da glicemia foi realizada nos tempos 15, 30 e 60 minutos, com auxílio de um glicosímetro G-Tech® (G-TECH Free, Coréia) (SANTOS et al., 2008).

As concentrações plasmáticas de glicose foram dosadas ao final do período experimental, utilizando o kit enzimático Labtest® (Lagoa Santa, Minas Gerais, Brasil). A análise foi realizada em uma microplaca de 96 poços, onde foram transferidos 2 µL de soro em duplicata e adicionados 200 µL do reagente utilizando uma micropipeta multicanal, inclusive no poço do branco. Para a determinação do padrão foi substituído 2 µL de amostra por 2 µL do padrão. Após incubação de 10 minutos a 37°C, a absorbância foi lida a 505 nm, realizada em leitor de ELISA (TP Reader, Thermo Plate, Brasil).

Para o cálculo da concentração de glicose (mg/dL) foi utilizada a fórmula: (Média da absorbância da amostra/média da absorbância do padrão) x 100.

4.5.2 Perfil lipídico: triglicerídeos, colesterol total e frações e índice aterogênico

As concentrações plasmáticas de triglicerídeos, colesterol total e colesterol HDL foram dosados ao final do período experimental, utilizando o kit enzimático Labtest®, (Lagoa Santa, Minas Gerais, Brasil). Para as análises de colesterol total e triglicerídeo foram realizados os mesmos procedimentos descritos para a análise das concentrações plasmáticas de glicose. Para o cálculo da concentração de colesterol total e triglicerídeos (mg/dL) foi utilizada a fórmula: (Média da absorbância da amostra/média da absorbância do padrão) x 200.

Para a dosagem de colesterol-HDL é necessário a precipitação das lipoproteínas de muita baixa e de baixa densidade, realizada por meio de centrifugação, assim o colesterol ligado às lipoproteínas de alta densidade, ou seja, colesterol-HDL é determinado no sobrenadante. Após a centrifugação, a dosagem de colesterol-HDL é realizada utilizando o reagente para determinação do colesterol total seguindo procedimento semelhante as demais análises bioquímicas citadas. Para o cálculo da concentração de colesterol-HDL (mg/dL) foi utilizada a fórmula: (Média da absorbância da amostra/média da absorbância do padrão) x 40.

As concentrações de Colesterol VLDL e LDL (mg/dL) foram calculadas utilizando as seguintes fórmulas: Colesterol VLDL = Triglicérides / 5, e para Colesterol LDL = Colesterol Total - (HDL + VLDL).

A determinação do índice aterogênico foi calculada entre o colesterol total e o colesterol-HDL (FLORENCE et al., 2014).

4.6 Análise estatística

Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média. Para comparação múltipla de resultados paramétricos foi utilizado ANOVA seguido de pós teste Tukey e, para comparação de dois grupos, teste t de Student. O teste do qui-quadrado foi utilizado para avaliação da associação em análises histológicas. O nível de significância adotado foi $p < 0,05$. Para a realização da análise estatística foi utilizado o *software* Jandel SigmaStat, versão 3.5 (Systat software, Inc., USA) e o SigmaPlot, versão 12.5 (Systat Software Inc., USA).

5 RESULTADOS

5.1 Composição química do extrato aquoso da folha da graviola: Atividade antioxidante, compostos fenólicos, flavonoides totais, taninos, isolamento e identificação de compostos

Os resultados obtidos da avaliação do potencial de inibição de DPPH (expresso como IC₅₀), flavonoides totais, fenóis totais e taninos (mg/g) do extrato aquoso das folhas de graviola estão demonstrados na Tabela 3.

Tabela 3 - Quantificação de flavonoides (mg/g), fenóis totais (mg/g), taninos (mg/g) e atividade antioxidante (DPPH) do extrato aquoso das folhas da graviola, coletadas em junho/2015, em Campo Grande – MS

Extrato aquoso das folhas de graviola (<i>Annona muricata</i> Linn)	Valores
Flavonoides totais	92,07±1,8 mg/g
Fenóis totais	156,37±1,2 mg/g
Taninos	42,99±0,6 mg/g
Atividade antioxidante-IC ₅₀	12±0,1 µg.mL ⁻¹

Os valores representam a média ± erro padrão da média

No extrato aquoso das folhas da graviola foram isolados e identificados 6 compostos: **(1)** kaempferol-3-O- α -l-ramnopiranosídeo (1 mg), **(2)** quercetina 3-O-rutinosídeo (2 mg), **(3)** kaempferol 3-O-rutinosídeo (2 mg), **(4)** β -sitosterol-3-O- β -D-glicopiranosídeo (2 mg), **(5)** luteolina (2 mg) e **(6)** quercetina (5 mg), respectivamente. A confirmação de suas estruturas químicas foi realizada pela comparação com dados da literatura.

5.2 Teste de Toxicidade Aguda

O extrato aquoso das folhas da graviola foi submetido ao teste de toxicidade aguda, administrado via gavagem na concentração de 2000 mg/kg em ratos *Wistar* fêmeas. Os resultados (APÊNDICE B) evidenciaram não haver sinais de toxicidade sistêmica, não ocasionando alterações no peso corporal, consumo de água, ingestão alimentar, excreção de urina e fezes. Ainda, nenhuma alteração no teste *Screening*

Hipocrático (APÊNDICE A) foi observada, como alteração motora e/ou sensorial, neurológica, assim como não houve morte de nenhum animal.

A pesagem do fígado, baço, pâncreas, pulmões, coração e rins não apresentaram diferença significativa entre os grupos, bem como alterações macroscópicas nos órgãos dos animais não foram encontradas.

Resultados das análises bioquímicas (ALT, AST, creatinina e ureia – APÊNDICE B) não demonstraram alterações relacionadas à disfunção orgânica ou toxicológica.

Portanto, presume-se que a DL_{50} (dose letal 50% - dose que mata 50% dos animais) do extrato aquoso da graviola seja superior a 2000 mg/kg de peso corporal.

5.3 Efeitos do extrato aquoso da folha da graviola sobre o peso corporal e ingestão alimentar

Durante a indução da obesidade, os animais do grupo DHL não apresentaram diferença significativa do peso corporal inicial quando comparados aos animais do grupo controle ($p=0,971$). No entanto, a evolução do peso semanal dos animais evidenciou um maior ganho de peso corporal no grupo DHL, com manutenção da diferença significativa a partir da 4ª semana ($p=0,005$) até a 12ª semana quando comparado ao grupo controle ($p\leq 0,001$). Os dados são apresentados na Gráfico 1A e na Tabela 4.

Os animais dos grupos tratados com dieta hiperlipídica, DHL SALINA ($p=0,022$), EAG 50 mg/kg ($p=0,029$), EAG 100 mg/kg ($p=0,033$) e EAG 150 mg/kg ($p=0,044$) iniciaram o tratamento na 12ª semana com diferença significativa de peso corporal em relação ao grupo SHAM SALINA. No entanto, esta diferença não se manteve durante todo o tratamento, chegando ao final da 24ª semana com o peso corporal estatisticamente semelhantes entre os grupos. Os dados são apresentados na Gráfico 1B e na Tabela 5.

Ainda, é importante destacar que no início do tratamento (12ª semana) não havia diferença significativa de peso corporal entre os grupos DHL SALINA, EAG 50 mg/kg, EAG 100 mg/kg e EAG 150 mg/kg ($p=0,995$).

Ao final do período experimental, foi calculado o ganho de peso, pela diferença entre o peso corporal final e inicial dos animais. Os grupos EAG 50 mg/kg e EAG 100 mg/kg apresentaram perda de peso em comparação aos outros grupos, como apresentado na Tabela 5, sendo que, o grupo EAG 50 mg/kg apresentou diferença

estatística em relação ao grupo SHAM SALINA ($p=0,034$), enquanto o grupo EAG 100 mg/kg teve perda de peso corporal significativa em comparação ao SHAM SALINA ($p=0,003$) e DHL SALINA ($p=0,034$).

Dessa forma, o tratamento com EAG na dose de 100 mg/kg pode reduzir peso corporal em animais obesos alimentados com dieta hiperlipídica por um período prolongado.

A ingestão alimentar foi monitorada semanalmente durante a indução à obesidade e tratamento com extrato. Nota-se que durante o período de indução, o grupo SHAM ingeriu quantidade de ração diária maior que o grupo DHL ($p\leq 0,001$). Entretanto, a ingestão calórica diária foi significativamente maior no grupo DHL que no grupo SHAM ($p\leq 0,001$), assim como para o CEA e CGPCC, como visto na Tabela 4.

Como mostrado na Tabela 5, resultados semelhantes foram observados durante o período de tratamento, onde o grupo SHAM SALINA apresentou maior ingestão alimentar diária (gramas) que os grupos DHL SALINA ($p\leq 0,001$), EAG 50 mg/kg ($p\leq 0,001$), EAG 100 mg/kg ($p\leq 0,001$) e EAG 150 mg/kg ($p\leq 0,001$). Ainda, a ingestão calórica diária foi significativamente maior nos grupos tratados EAG 50 mg/kg ($p=0,007$), EAG 100 mg/kg ($p=0,048$) e EAG 150 mg/kg ($p\leq 0,001$) em comparação ao grupo SHAM SALINA. Apesar do maior consumo calórico destes grupos, nota-se no Gráfico 1B tendência a um menor ganho de peso quando comparado ao grupo DHL SALINA.

Os parâmetros analisados como o CEA e CGPCC demonstram inclinação a um menor acúmulo de massa corporal nos animais tratados com EAG em relação aos grupos SHAM SALINA e DHL SALINA. Adicionalmente, o CEA foi significativamente menor no grupo EAG 100 mg/kg quando comparado ao grupo SHAM SALINA ($p=0,021$) e DHL SALINA ($p=0,035$). Para o parâmetro CGPCC, o grupo EAG 50 mg/kg apresentou redução significativa em relação ao grupo SHAM SALINA ($p=0,014$), assim como, o EAG 100 mg/kg em comparação aos grupos SHAM SALINA ($p=0,002$) e DHL SALINA ($p=0,047$) (Tabela 5).

Tabela 4 - Peso inicial e final, ganho de peso e avaliação da ingestão alimentar durante indução de obesidade

Parâmetros	Grupos experimentais	
	SHAM (n=11)	DHL (n=44)
Peso inicial (g)	26,55±0,55	26,52±0,28
Peso final (g)	32,91±0,99	37,87±0,60***
Ganho de peso (g)	6,36±0,95	11,34±0,68**
Ingestão alimentar (g/dia)	3,47±0,05	2,73±0,03***
Ingestão alimentar (kcal/dia)	13,18±0,19	14,54±0,16***
CEA	0,0216±0,0031	0,0501±0,0033***
CGPCC	0,0057±0,0008	0,0095±0,0006***

Peso inicial e final, ganho de peso, ingestão alimentar (g/dia), ingestão alimentar (Kcal/dia), Coeficiente de eficácia alimentar (CEA) e peso por consumo calórico (CGPCC) de animais durante indução de obesidade (SHAM – dieta padrão e DHL– dieta hiperlipídica) entre a 11a e 12a semana. Os valores representam a média ± erro padrão da média. * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$ e *** $p \leq 0,001$ vs SHAM SALINA. Teste t de Student.

Tabela 5 - Peso inicial e final, ganho de peso, ingestão alimentar de animais controles e tratados com extrato aquoso das folhas da graviola

Parâmetros	Grupos experimentais				
	SHAM SALINA	DHL SALINA	EAG 50	EAG 100	EAG 150
Peso inicial (g)	32,89±0,94	38,09±1,42*	37,91±1,09*	37,82±0,91*	37,64±1,43*
Peso final (g)	35,91±1,26	40,27±1,42	37,82±1,05	36,82±1,33	38,27±1,94
Ganho de peso (g)	3,09±0,60	2,18±0,26	-0,09±0,53*	-1,00±1,14** [#]	0,64±0,92
Ingestão alimentar (g/dia)	3,40±0,43	2,62±0,62***	2,76±0,05***	2,70±0,98***	2,83±0,07***
Ingestão alimentar (Kcal/dia)	12,89±0,16	13,89±0,33	14,65±0,25**	14,30±0,52*	14,99±0,37***
CEA	0,0109±0,0021	0,010±0,00128	-0,0006±0,0023	-0,0036±0,0050* [#]	0,0031±0,0040
CGPCC	0,0029±0,0055	0,0019±0,0002	-0,0001±0,0004*	-0,00068±0,0009** [#]	0,0006±0,0008

Peso inicial e final, ganho de peso, ingestão alimentar (g/dia), ingestão alimentar (kcal/dia), Coeficiente de eficácia alimentar (CEA) e peso por consumo calórico (CGPCC) de animais controles (SHAM SALINA – dieta padrão com salina, DHL SALINA – dieta hiperlipídica) e tratados com extrato aquoso de folhas de graviola (EAG) nas doses de 50, 100 e 150 mg/kg, entre a 13^a e 24^a semana de estudo. Os valores representam a média ± erro padrão da média. Na mesma linha, * p ≤ 0,05, ** p ≤ 0,01 e *** p ≤ 0,001 vs SHAM SALINA, [#] p ≤ 0,05 vs DHL SALINA. ANOVA seguido de *pos test Tukey*.

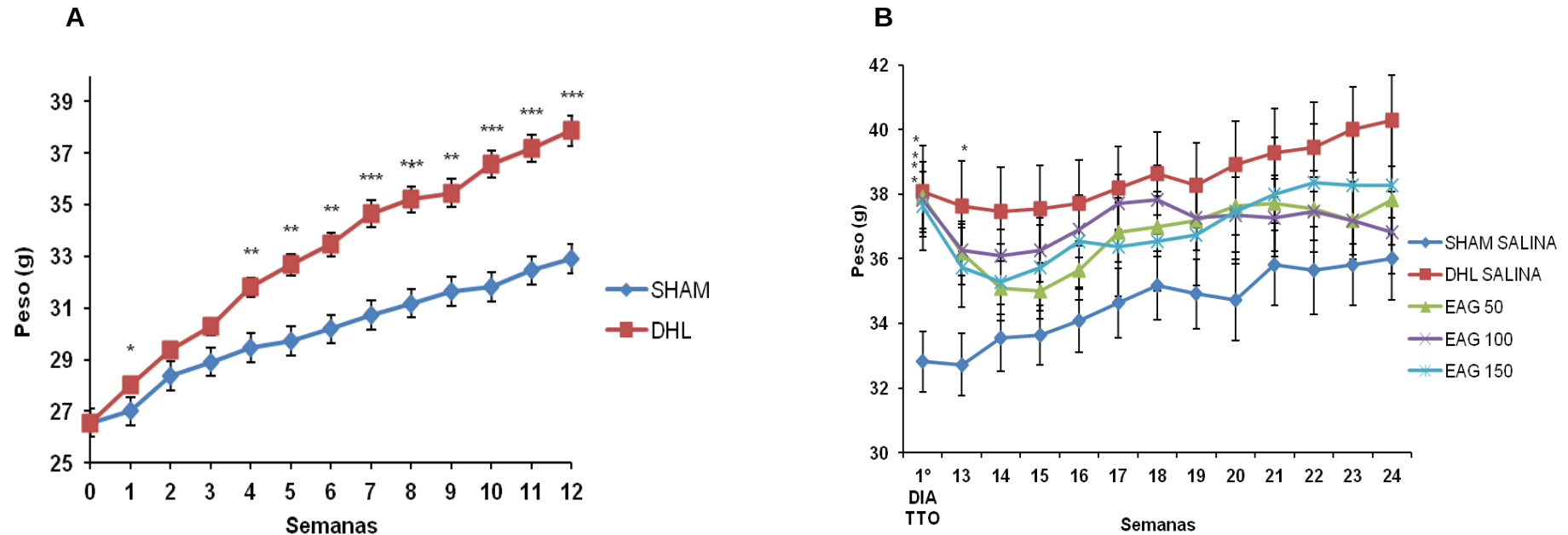


Gráfico 1 - Efeito da dieta hiperlipídica e do extrato aquoso da folha de graviola na evolução ponderal, em gramas, dos animais avaliados durante a indução de obesidade e posteriormente no tratamento. **(A)** Peso corporal de animais alimentados com dieta padrão (SHAM) e dieta hiperlipídica (DHL) durante indução da obesidade por 12 semanas consecutivas (0 – indica peso inicial). **(B)** Peso de animais controles (SHAM SALINA – dieta padrão com salina, DHL SALINA – dieta hiperlipídica) e tratados com extrato aquoso das folhas de graviola (EAG) nas doses de 50, 100 e 150 mg/kg por 12 semanas (no gráfico representado de 1ª dia de tratamento a 24ª semana). Os valores representam a média $\pm$ erro padrão da média. * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$ e *** $p \leq 0,001$ vs SHAM SALINA. Teste *t* de Student e ANOVA seguido de pos test Tukey.

5.4 Efeito do extrato aquoso da folha da graviola sobre o perfil lipídico e glicêmico

5.4.1 Análises Bioquímicas Séricas

Em relação à concentração sérica de glicose de jejum (Gráfico 2A), não foi observado nenhum efeito do extrato aquoso da folha de graviola nas diferentes doses estudadas ($p=0,242$), sendo que os cinco grupos apresentaram concentrações plasmáticas semelhantes estatisticamente, principalmente entre os animais tratados com dieta hiperlipídica, sendo SHAM SALINA ($108,45 \pm 8,56$ mg/dL), DHL SALINA ($140,38 \pm 10,68$ mg/dL), EAG 50 mg/kg ($134,28 \pm 8,59$ mg/dL), EAG 100 mg/kg ($139,62 \pm 7,64$ mg/dL) e EAG 150 mg/kg ($138,60 \pm 18,02$ mg/dL).

No Gráfico 2B e D observa-se que, a oferta diária do EAG também não foi capaz de alterar significativamente a concentração sérica de colesterol total e HDL. Para os valores séricos de colesterol-HDL nota-se um aumento de sua concentração no grupo tratado com EAG 150 mg/kg ($61,57 \pm 6,47$ mg/dL,) em relação ao grupo SHAM SALINA ($54,00 \pm 4,63$ mg/dL) e, especialmente sobre os grupos DHL ($42,88 \pm 5,40$ mg/dL), EAG 50 mg/kg ($44,85 \pm 6,91$ mg/dL), EAG 100 mg/kg ($43,74 \pm 5,24$ mg/dL). Entretanto, não houve diferença significativa entre os grupos ($p=0,113$).

Verifica-se que o colesterol total sérico foi estatisticamente maior ($p=0,018$) nos animais que receberam dieta hiperlipídica e salina, DHL SALINA ($211,24 \pm 16,33$ mg/dL), em relação ao grupo tratado com dieta normolipídica e salina, SHAM SALINA ($153,96 \pm 14,46$ mg/dL). No entanto, entre os grupos que receberam dieta hiperlipídica e o extrato aquoso da folha de graviola não houve diferença estatística nas concentrações de colesterol total dos grupos EAG 50 mg/kg ($200,84 \pm 8,30$ mg/dL), EAG 100 mg/kg ($167,85 \pm 8,22$ mg/dL) e EAG 150 mg/kg ($174,30 \pm 13,10$ mg/dL), em comparação ao grupo DHL SALINA. Apesar disso, observamos uma redução no percentual do colesterol total nos grupos tratados com EAG, sendo de 4,92% no EAG 50 mg/kg, 20,54% no EAG 100 mg/kg e de 17,49% no EAG 150 mg/kg, em comparação ao grupo DHL SALINA.

No Gráfico 2C verifica-se que a dieta hiperlipídica também é capaz de aumentar as concentrações de colesterol-LDL, em relação ao grupo alimentado

com dieta normolipídica, com diferença estatística entre os grupos DHL SALINA ($145,90 \pm 18,17$ mg/dL) e EAG 50 mg/kg ($132,48 \pm 8,56$ mg/dL), em relação ao grupo SHAM SALINA ($74,24 \pm 38,59$ mg/dL). Além disso, observa-se que o tratamento com extrato aquoso das folhas de graviola pode ser eficaz na redução plasmática de colesterol-LDL, estando essa redução diretamente associada à dose administrada, ou seja, quanto maior a dose de extrato aquoso das folhas de graviola maior será a redução do colesterol-LDL, como observado neste estudo EAG 50 mg/kg ($132,48 \pm 8,56$ mg/dL), EAG 100 mg/kg ($101,02 \pm 12,37$ mg/dL) e EAG 150 mg/kg ($91,40 \pm 12,98$ mg/dL). No grupo EAG 150 mg/kg foi encontrado diferença significativa ($p=0,038$) em relação ao grupo DHL SALINA.

O tratamento prolongado com dieta normolipídica, no entanto, rica em carboidratos, foi capaz de aumentar as concentrações de triglicerídeos para níveis semelhantes aos grupos tratados com dieta hiperlipídica, sendo DHL SALINA ($114,76 \pm 4,27$ mg/dL) e EAG 50 mg/kg ($117,73 \pm 6,27$ mg/dL) em relação ao grupo SHAM SALINA ($128,64 \pm 19,92$ mg/dL). Entretanto, houve redução significativa nos grupos tratados com EAG nas doses de 100 mg/kg ($p=0,026$) e 150 mg/kg ($p=0,025$) em comparação ao grupo SHAM, $106,23 \pm 3,26$ mg/dL e $106,23 \pm 3,63$ mg/dL, respectivamente (Gráfico 2F).

Para o cálculo de colesterol-VLDL utiliza-se a concentração plasmática de triglicerídeos. Desta forma, como nos resultados apresentados para triglicerídeos também foi encontrado redução significativa de colesterol-VLDL (Gráfico 2E) nos grupos tratados com EAG nas doses de 100 mg/kg ($p=0,031$) e 150 mg/kg ($p=0,030$), em comparação ao grupo SHAM SALINA ($25,73 \pm 1,20$ mg/dL), DHL SALINA ($21,25 \pm 0,65$ mg/dL) e EAG 50 mg/dL ($21,33 \pm 0,91$ mg/dL), respectivamente.

Ao calcular o índice aterogênico, para avaliar risco de desenvolvimento de doença cardiovascular, o grupo EAG 150 mg/kg ($3,07 \pm 0,34$) apresentou valores significativamente mais baixos ($p=0,025$) que o grupo DHL SALINA ($6,15 \pm 1,15$). Ainda, o grupo DHL apresentou valor significativamente maior em relação ao grupo SHAM SALINA ($2,87 \pm 0,20$) (Gráfico 2G).

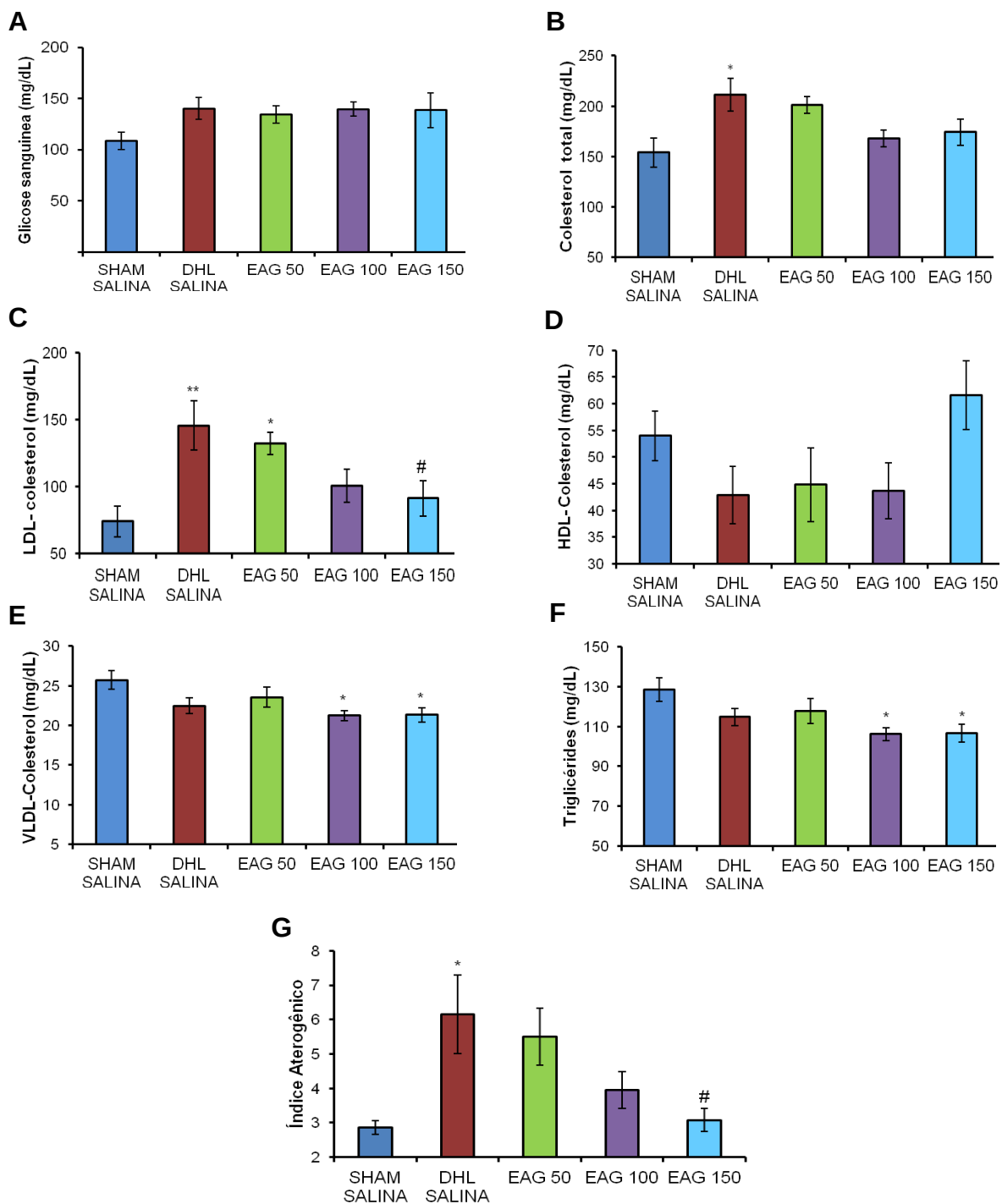


Gráfico 2 - Avaliação dos parâmetros séricos **(A)** Glicose sanguínea (mg/dL); **(B)** Colesterol total (mg/dL); **(C)** LDL-colesterol (mg/dL); **(D)** HDL-colesterol (mg/dL); **(E)** VLDL-colesterol (mg/dL); **(F)** Triglicérides (mg/dL) e **(G)** Índice Aterogênico de animais controles (SHAM SALINA – dieta padrão com salina, DHL SALINA – dieta hiperlipídica com salina) e tratados com extrato aquoso das folhas de graviola (EAG) nas doses de 50, 100 e 150 mg/kg entre a 13^a e 24^a semana de estudo. Os valores representam a média $\pm$ erro padrão da média. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ vs SHAM SALINA; # $p < 0,05$ vs DHL SALINA. ANOVA seguido de *pos test* Tukey.

5.4.2 Teste de Tolerância oral à Glicose

No teste realizado antes do início do tratamento não foi observado aumento significativo da glicemia de jejum entre os grupos tratados com dieta hiperlipídica e normolipídica. No entanto, houve um aumento significativo ($p \leq 0,05$) na glicemia dos animais no tempo de 15 minutos nos grupos DHL SALINA e EAG 150 mg/kg, em relação ao grupo SHAM SALINA e no tempo de 30 minutos, onde todos os grupos foram alimentados com dieta hiperlipídica (DHL SALINA, EAG 50 mg/kg, EAG 100 mg/kg e EAG 150 mg/kg) apresentaram aumento significativo da glicemia em relação ao grupo SHAM SALINA, demonstrado na Tabela 6 e Gráfico 3A e B. Ainda, ao calcular a área sob a curva do teste de tolerância oral à glicose inicial verifica-se aumento significativo ($p \leq 0,05$) do grupo EAG 150 mg/kg em comparação ao grupo SHAM, sendo importante destacar que neste momento os tratamentos com extrato nas diferentes doses ainda não haviam sido iniciado.

Após realizar o teste de tolerância oral à glicose no final do experimento verifica-se que o extrato aquoso da folha de graviola na dose de EAG 150 mg/kg foi capaz de diminuir significativamente ($p \leq 0,05$) a glicemia apenas no tempo 15 minutos em relação aos grupos SHAM SALINA, DHL SALINA e EAG 50 mg/kg. Ainda, como apresentado na Tabela 7 quanto maior a dose de extrato, maior a diminuição da glicemia neste tempo, no entanto, não houve diferença significativa entre EAG 100 mg/kg e EAG 150 mg/kg. Com relação à área sob a curva do teste de tolerância oral à glicose realizada ao final do tratamento com EAG, não houve redução significativa, ressaltando-se que não foi encontrado a diferença significativa entre os grupos EAG 150 mg/kg e SHAM SALINA, observada antes do início do tratamento (Gráfico 3B e D).

Tabela 6 - Resultados ao Teste de Tolerância Oral à Glicose nos animais avaliados antes do início do tratamento de acordo com o grupo experimental, em cada tempo avaliado

Grupos experimentais	Tempo (minutos)				
	0	15	30	60	120
SHAM SALINA	211,00±16,25Ba	333,55±32,41Ab	222,91±27,02Bb	203,82±15,41Ba	163,91±12,12Ba
DHL SALINA	213,18±14,33Ca	420,00±19,13Aa	331,09±30,98Ba	251,00±17,74Ca	203,09±17,92Ca
EAG 50 mg/kg	207,27±9,14Ca	392,36±30,57Aab	313,91±28,25Ba	253,27±13,45BCa	201,64±7,13Ca
EAG 100 mg/kg	192,00±9,92Ca	402,00±25,55Aab	331,73±32,35Ba	246,00±23,07Ca	188,46±14,42Ca
EAG 150 mg/kg	216,64±13,43Ba	421,73±18,43Aa	369,18±36,30Aa	254,18±15,04Ba	211,82±16,30Ba

Os resultados estão apresentados em média±erro padrão da média. Letras maiúsculas diferentes na linha indicam diferença significativa entre os tempos de análise (pós-teste de Tukey, $p<0,05$). Letras minúsculas diferentes na coluna indicam diferença significativa entre os grupos experimentais (pós-teste de Tukey, $p<0,05$). DHL: Dieta hiperlipídica; EAG: Extrato aquoso de folha de graviola.

Tabela 7 - Resultados referentes ao Teste de Tolerância Oral à Glicose dos animais avaliados ao final do tratamento, de acordo com o grupo experimental, em cada tempo avaliado

Grupo experimental	Tempo (minutos)				
	0	15	30	60	120
SHAM SALINA	187,91±9,93Ba	356,73±22,17Aa	192,00±19,50Ba	164,55±6,83Ba	148,36±9,94Ba
DHL SALINA	186,46±7,20Ba	348,46±8,31Aa	209,27±17,14Ba	188,91±11,37Ba	163,27±9,71Ba
EAG 50 mg/kg	190,73±9,92Ba	337,82±11,62Aa	191,91±17,69Ba	177,73±10,55Ba	163,73±9,27Ba
EAG 100 mg/kg	182,64±7,27BCa	321,82±14,15Aab	227,64±18,15Ba	189,46±11,23BCa	159,27±10,97Ca
EAG 150 mg/kg	201,73±13,29Ba	280,18±24,10Ab	197,82±14,71Ba	185,64±14,08Ba	160,73±16,46Ba

Os resultados estão apresentados em média±erro padrão da média. Letras maiúsculas diferentes na linha indicam diferença significativa entre os tempos de análise (pós-teste de Tukey, $p<0,05$). Letras minúsculas diferentes na coluna indicam diferença significativa entre os grupos experimentais (pós-teste de Tukey, $p<0,05$). DHL: Dieta hiperlipídica; EAG: Extrato aquoso de folha de graviola.

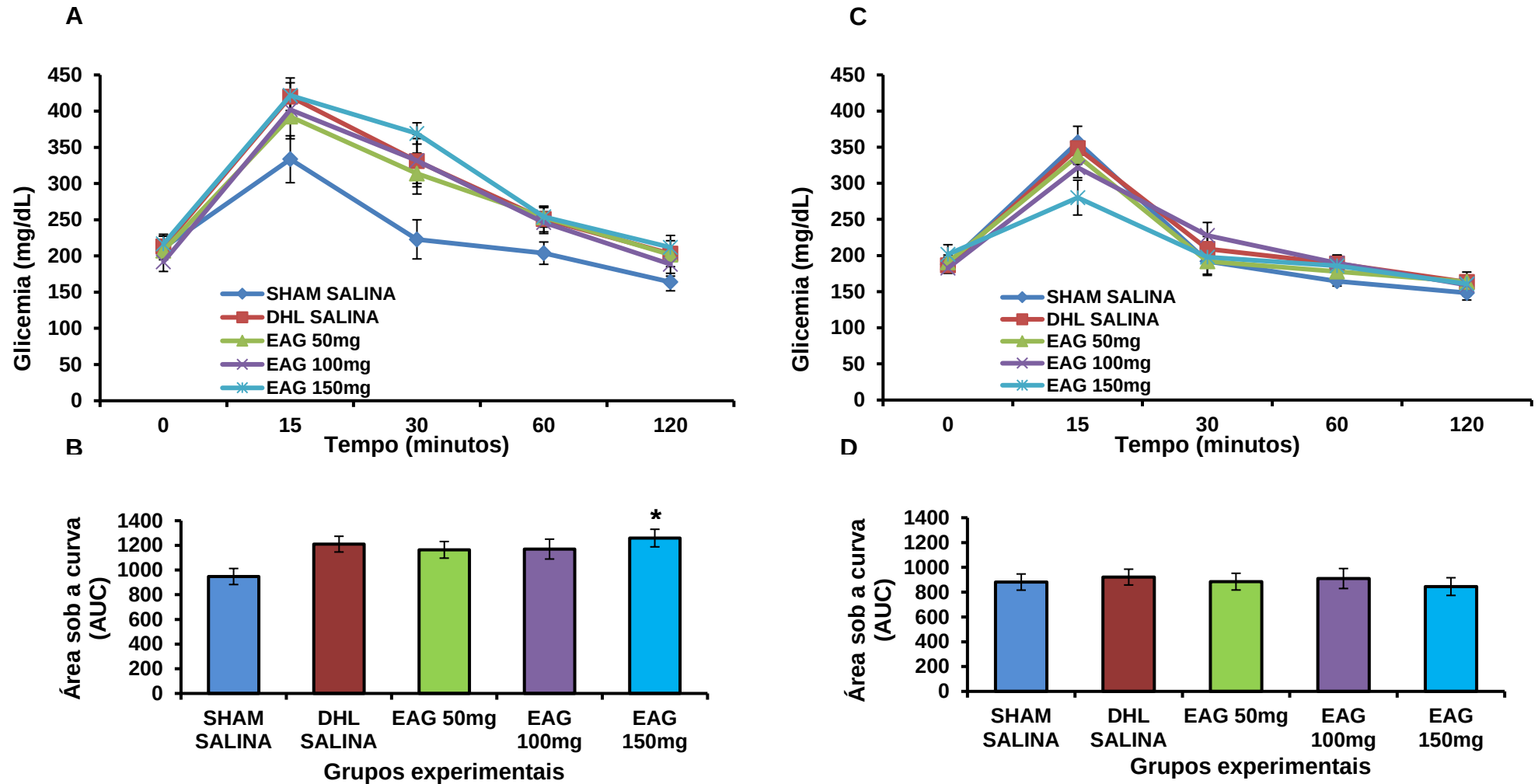


Gráfico 3 Avaliação do perfil glicêmico antes e ao final do tratamento com extrato aquoso da folha de graviola **(A)** Teste de tolerância oral à glicose antes do início do tratamento (12^a semana) de acordo com o grupo experimental em cada tempo avaliado. DHL: Dieta hiperlipídica; EAG: Extrato aquoso de folha de graviola **(B)** Gráfico apresentando a área sob a curva (AUC), da glicemia dos animais avaliados antes do início do tratamento (12^a semana). * $p < 0,05$, vs SHAM SALINA. ANOVA seguido de *pos test* Tukey **(C)** Teste de tolerância oral à glicose no final do tratamento (24^a semana) de acordo com o grupo experimental em cada tempo avaliado. DHL: Dieta hiperlipídica; EAG: Extrato aquoso de folha de graviola **(D)** Gráfico apresentando a área sob a curva (AUC) da glicemia dos animais avaliados ao final do tratamento (24^a semana). Os valores representam a média $\pm$ erro padrão da média. ANOVA.

5.4.3 Teste de Sensibilidade à Insulina

O teste de sensibilidade à insulina foi realizado apenas no final do tratamento e não houve diferença em relação ao tempo após administração de insulina e a área total sob a curva entre os animais que receberam o extrato ou SALINA durante o período experimental (Tabela 8; Gráfico 4).

Os resultados de glicemia de jejum, tolerância à glicose e sensibilidade à insulina em conjunto demonstram apenas um efeito de ação rápida do extrato sobre a glicemia no modelo estudado, com melhor resposta em concentrações mais elevadas de extrato aquoso da folha da graviola.

Tabela 8 - Resultados referentes ao teste de sensibilidade à insulina nos animais avaliados neste estudo, ao final do tratamento, de acordo com o grupo experimental, em cada tempo avaliado

Grupos experimentais	Tempo (minutos)			
	0	15	30	60
SHAM SALINA	186,91±8,58	96,09±10,58	86,64±4,17	136,73±12,15
DHL SALINA	190,55±8,08	91,55±8,93	83,00±6,49	121,46±11,75
EAG 50 mg/kg	182,73±9,56	82,09±4,83	77,55±2,93	115,46±7,42
EAG 100 mg/kg	201,18±8,76	101,64±5,56	93,00±7,05	125,09±6,92
EAG 150 mg/kg	183,36±14,51	82,18±4,12	76,64±4,73	109,27±7,37
	A	C	C	B

Os resultados estão apresentados em média±erro padrão da média. Letras maiúsculas diferentes na linha indicam diferença significativa entre os tempos de análise (pós-teste de Tukey, $p < 0,05$), independente do grupo experimental (Teste ANOVA de duas vias de medidas repetitivas, Efeito do grupo: $p = 0,056$; Efeito do tempo: $p < 0,001$; Interação entre grupo e tempo: $p = 0,985$). DHL: Dieta hiperlipídica; EAG: Extrato aquoso de folha de graviola.

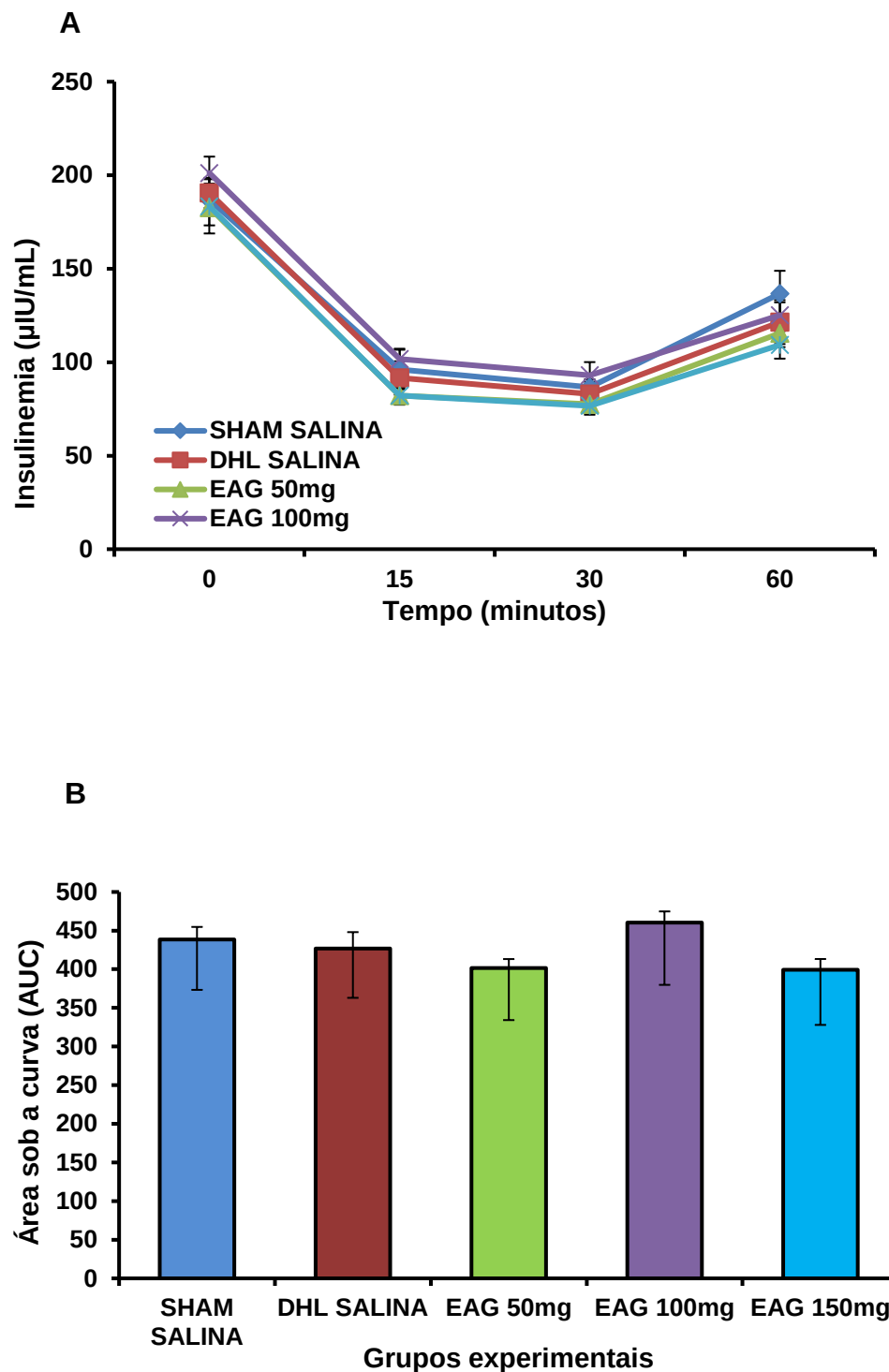


Gráfico 4 – Avaliação do perfil glicêmico ao final do tratamento com extrato aquoso da folha de graviola **(A)** Teste de sensibilidade à insulina nos animais avaliados neste estudo, ao final do tratamento, de acordo com o grupo experimental, em cada tempo avaliado. Cada símbolo representa a média e a barra o erro padrão da média. DHL: Dieta hiperlipídica; EAG: Extrato aquoso de folha de graviola **(B)** Área sob a curva (AUC), teste de sensibilidade à insulina nos animais avaliados neste estudo, ao final do tratamento, de acordo com o grupo experimental. Cada coluna representa a média e a barra, o erro padrão da média. ANOVA.

5.5 Efeito do extrato aquoso da folha da graviola sobre os coxins adiposos e o peso do fígado

A avaliação de coxins de tecido omental, epididimal, perirrenal, retroperitoneal e mesentérico foram avaliados ao final do tratamento. O extrato aquoso da folha da graviola nas doses estudadas não foi capaz de reduzir significativamente a adiposidade visceral nos animais, como mostrado na Tabela 9. No entanto, podemos observar redução do peso dos coxins adiposos dos grupos tratados com extrato de graviola sendo, EAG 50 mg/kg: omental (22,22%), mesentérico (6,79%), retroperitoneal (8,79%), perirrenal (9,41%); EAG 100 mg/kg: omental (11,11%), epididimal (14,34%), mesentérico (21,36%), retroperitoneal (31,04%) e EAG 150: mg/kg omental (33,33%), epididimal (6,17%), mesentérico (6,08%), retroperitoneal (3,16%), perirrenal (22,35%) em relação ao grupo DHL SALINA.

Neste estudo foi observado aumento significativo do tecido adiposo retroperitoneal do grupo DHL SALINA ($p=0,031$), quando comparado ao grupo SHAM SALINA.

Do mesmo modo, não houve diferença significativa entre os grupos estudados e o peso do fígado dos animais (Tabela 9).

Tabela 9 - Efeito do extrato aquoso das folhas de graviola sobre os coxins adiposos, Índice de adiposidade e peso do fígado

Parâmetros	Grupos experimentais				
	SHAM SALINA	DHL SALINA	EAG 50	EAG 100	EAG 150
Peso omental (g)	0,028±0,009	0,018±0,005	0,014±0,004	0,016±0,004	0,012±0,004
Peso epididimal (g)	1,068±0,127	1,506±0,112	1,543±0,783	1,290±0,149	1,413±0,169
Peso mesentérico (g)	0,496±0,634	0,707±0,092	0,659±0,049	0,556±0,122	0,664±0,136
Peso retroperitoneal (g)	0,360±0,053	0,728±0,087*	0,664±0,053	0,502±0,090	0,705±0,125
Peso perirrenal (g)	0,198±0,039	0,255±0,039	0,231±0,026	0,275±0,061	0,198±0,036
Índice de adiposidade (%)	6,080±0,514	10,893±0,481***	11,620±0,387***	10,212±0,797***	10,713±0,779***
Fígado (g)	1,225±0,066	1,236±0,056	1,213±0,030	1,200±0,058	1,185±0,047

Valores representam a média ± erro padrão da média. *p<0,05, **p<0,001 vs SHAM SALINA. ANOVA seguido de *pos test* Tukey.

5.6 Efeitos do extrato aquoso da folha da graviola sobre o lipídeos totais, triglicerídeos e colesterol total hepático.

A ingestão de extrato por 12 semanas não foi capaz de reduzir significativamente ($p=0,742$) no fígado o acúmulo ectópico de lipídeos totais nos grupos estudados: SHAM SALINA ($27,70\pm3,56$ mg/dL), DHL SALINA ($29,71\pm2,80$ mg/dL), EAG 50 mg/kg ($26,08\pm1,81$ mg/dL), EAG 100 mg/kg ($21,77\pm2,08$ mg/dL) e EAG 150 mg/kg ($26,02\pm3,62$ mg/dL) (Gráfico 5A). Também não foi observado diferença significativa ($p=0,316$) no colesterol total hepático dos grupos SHAM SALINA ($0,027\pm0,002$ mg/dL), DHL SALINA ($0,028\pm0,050$ mg/dL), EAG 50 mg/kg ($0,026\pm0,006$ mg/dL), EAG 100 mg/kg ($0,033\pm0,004$ mg/dL) e EAG 150 mg/kg ($0,032\pm0,004$ mg/dL) (Gráfico 5C).

Ainda, o extrato não diminuiu os triglicerídeos hepáticos ($p=0,068$) de camundongos dos grupos SHAM SALINA ($258,40\pm32,24$ mg/dL), DHL SALINA ($453,45\pm52,22$ mg/dL), EAG 50 mg/kg ($237,09\pm27,93$ mg/dL), EAG 100 mg/kg ($301,18\pm69,81$ mg/dL) e EAG 150 mg/kg ($311,08\pm72,72$ mg/dL) (Gráfico 5B).

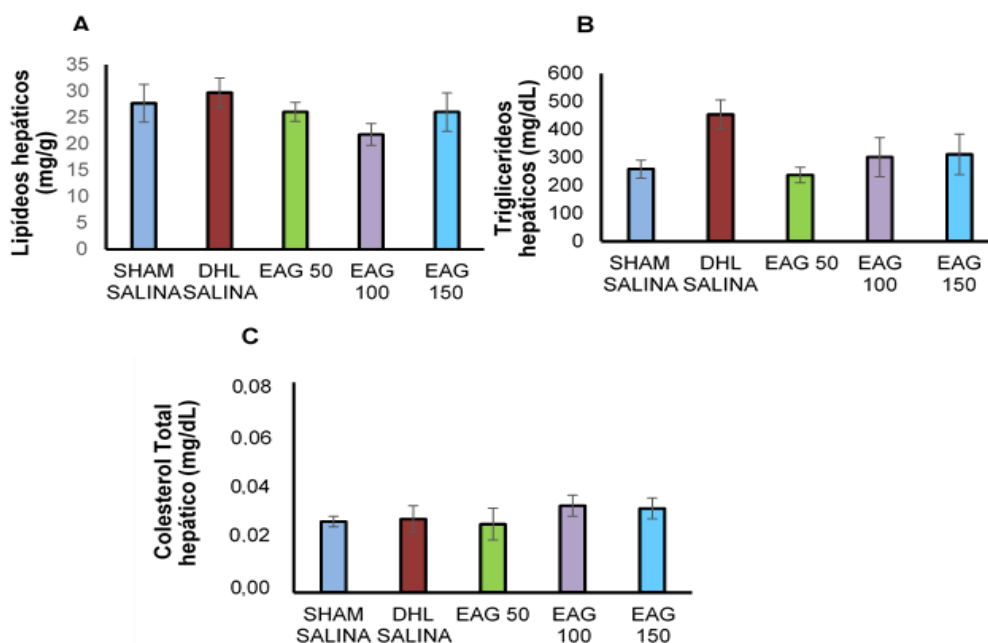


Gráfico 5 – Avaliação do acúmulo ectópico de lipídeos, triglicerídeos e colesterol total hepático **(A)** Lipídeos hepáticos (mg/g); **(B)** Triglicerídeos hepáticos (mg/dL); **(C)** Colesterol total hepático (mg/dL) de animais controles (SHAM SALINA – dieta padrão com salina, DHL SALINA – dieta hiperlipídica com salina) e tratados com extrato aquoso das folhas de graviola (EAG) nas doses de 50, 100 e 150 mg/kg entre a 13^a e 24^a semana de estudo. Os valores representam a média ± erro padrão da média. ANOVA.

5.7 Efeitos do extrato aquoso da folha da graviola sobre a análise histológica do fígado, pâncreas e tecido adiposo epididimal

5.7.1 Pâncreas

A análise histológica do pâncreas não evidenciou diferenças entre os grupos, quando os ácinos pancreáticos, Ilhota de *Langerhans* e inflamação foram observados (Tabela 10 e Figura 6). No entanto, nota-se uma tendência a redução da atrofia/necrose nos animais tratados com extrato aquoso da folha da graviola, principalmente no grupo EAG 100 mg/kg.

5.7.2 Fígado

A quantificação da esteatose, esteatose microvesicular, inflamação lobular, balonização, Hialino de *Mallory*, apoptose e núcleo glicogenado está representada na Tabela 11. A análise hepática mostrou que o tratamento com extrato aquoso da folha da graviola não alterou significativamente as variáveis analisadas em relação ao acúmulo de gordura hepática e lesões dos hepatócitos que caracterizam a EHNA. No entanto, a balonização foi mais frequente no grupo DHL SALINA, em relação aos grupos que receberam extrato nas diferentes concentrações estudadas, alimentados também com dieta hiperlipídica, ou seja, o extrato parece ser capaz de proteger os hepatócitos de alterações morfológicas devido a distúrbios metabólicos.

Ainda, a esteatose hepática foi igualmente frequente nos grupos (DHL SALINA, EAG 50mg/kg, EAG 100mg/kg e EAG 150mg/kg) que receberam dieta hiperlipídica, em relação ao grupo SHAM, alimentado com dieta normolipídica, no entanto, rica em carboidratos (Tabela 11 e Figura 6).

5.7.3 Tecido adiposo epididimal

Em relação aos adipócitos, observamos em nosso estudo que houve um aumento significativo da área dos adipócitos do tecido adiposo epididimal no

grupo DHL SALINA ($6675,10 \pm 736,87 \mu\text{m}^2$), quando comparado aos grupos SHAM SALINA ($4062,45 \pm 376,77 \mu\text{m}^2$), EAG 100 mg/kg ($4682,52 \pm 476,91 \mu\text{m}^2$) e EAG 150 mg/kg ($4410,536 \pm 426,735 \mu\text{m}^2$). Não houve redução significativa do tecido adiposo visceral no grupo EAG 50 mg/kg ($5133,61 \pm 435,06 \mu\text{m}^2$), demonstrado na Figura 7.

Tabela 10 - Resultados referentes às alterações observadas no pâncreas dos animais, em cada um dos grupos experimentais

Variável	Grupos experimentais				
	SHAM SALINA (n=11)	DHL SALINA (n=11)	EAG 50 mg/kg (n=11)	EAG 100 mg/kg (n=10)	EAG 150 mg/kg (n=11)
Alterações no pâncreas					
Ilhota de Langerhans (p=0,291)					
Sem alteração	36,4 (4)	45,5 (5)	72,7 (8)	80,0 (8)	54,5 (6)
Atrofia discreta	9,1 (1)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)	9,1 (1)
Atrofia	18,2 (2)	36,4 (4)	9,1 (1)	0,0 (0)	0,0 (0)
Hipertrofia discreta	18,2 (2)	9,1 (1)	0,0 (0)	20,0 (2)	27,3 (3)
Hipertrofia	18,2 (2)	9,1 (1)	18,2 (2)	0,0 (0)	9,1 (1)
Ácinos pancreáticos (p=0,400)					
Sem alteração	81,8 (9)	72,7 (8)	90,9 (10)	100,0 (10)	90,9 (10)
Necrose/Atrofia	18,2 (2)	27,3 (3)	9,1 (1)	0,0 (0)	9,1 (1)
Células inflamatórias (p=0,458)					
Sem alteração	90,9 (10)	81,8 (9)	90,9 (10)	100,0 (10)	100,0 (11)
Insulite	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)
Perinsulite	9,1 (1)	18,2 (2)	9,1 (1)	0,0 (0)	0,0 (0)

Os dados estão apresentados em frequência relativa (frequência absoluta). Valor de p no teste do qui-quadrado.

Tabela 11 - Resultados referentes às alterações observadas no fígado dos animais, em cada um dos grupos experimentais

Variável	Grupos experimentais				
	SHAM SALINA (n=11)	DHL SALINA (n=11)	EAG 50 mg/kg (n=11)	EAG 100 mg/kg (n=10)	EAG 150 mg/kg (n=11)
Alterações no fígado					
Esteatose (p=0,881)					
< 5%	54,5 (6)	36,4 (4)	54,5 (6)	60,0 (6)	54,5 (6)
5 a 33%	36,4 (4)	36,4 (4)	36,4 (4)	10,0 (1)	36,4 (4)
34 a 66%	9,1 (1)	18,2 (2)	9,1 (1)	20,0 (2)	9,1 (1)
> 66%	0,0 (0)	9,1 (1)	0,0 (0)	10,0 (1)	0,0 (0)
Esteatose microvesicular (p=0,501)					
Ausente	45,5 (5)	18,2 (2)	54,5 (6)	40,0 (4)	36,4 (4)
Presente	54,5 (6)	81,8 (9)	45,5 (5)	60,0 (6)	63,6 (7)
Inflamação lobular (p=0,919)					
Ausente	63,6 (7)	72,7 (8)	81,8 (9)	70,0 (7)	72,7 (8)
< 1 foco/campo	36,4 (4)	27,3 (3)	18,2 (2)	30,0 (3)	27,3 (3)
2-4 focos/campo	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)
> 4 focos/campo	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)
Balonização (p=0,192)					
Ausente	72,7 (8)	36,4 (4)	81,8 (9)	70,0 (7)	72,7 (8)
Poucas células	27,3 (3)	63,6 (7)	18,2 (2)	30,0 (3)	27,3 (3)
Muitas células	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)
Hialino de Mallory (p=0,408)					
Ausente	100,0 (11)	100,0 (11)	100,0 (11)	100,0 (10)	90,9 (10)
Presente	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)	9,1 (1)
Apoptose					
Ausente	100,0 (11)	100,0 (11)	100,0 (11)	100,0 (10)	100,0 (11)
Presente	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)
Núcleo glicogenado (p=0,408)					
Nenhum/raros	100,0 (11)	100,0 (11)	100,0 (11)	100,0 (10)	90,9 (10)
Alguns	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)	9,1 (1)

Os dados estão apresentados em frequência relativa (frequência absoluta). Valor de p no teste do qui-quadrado.

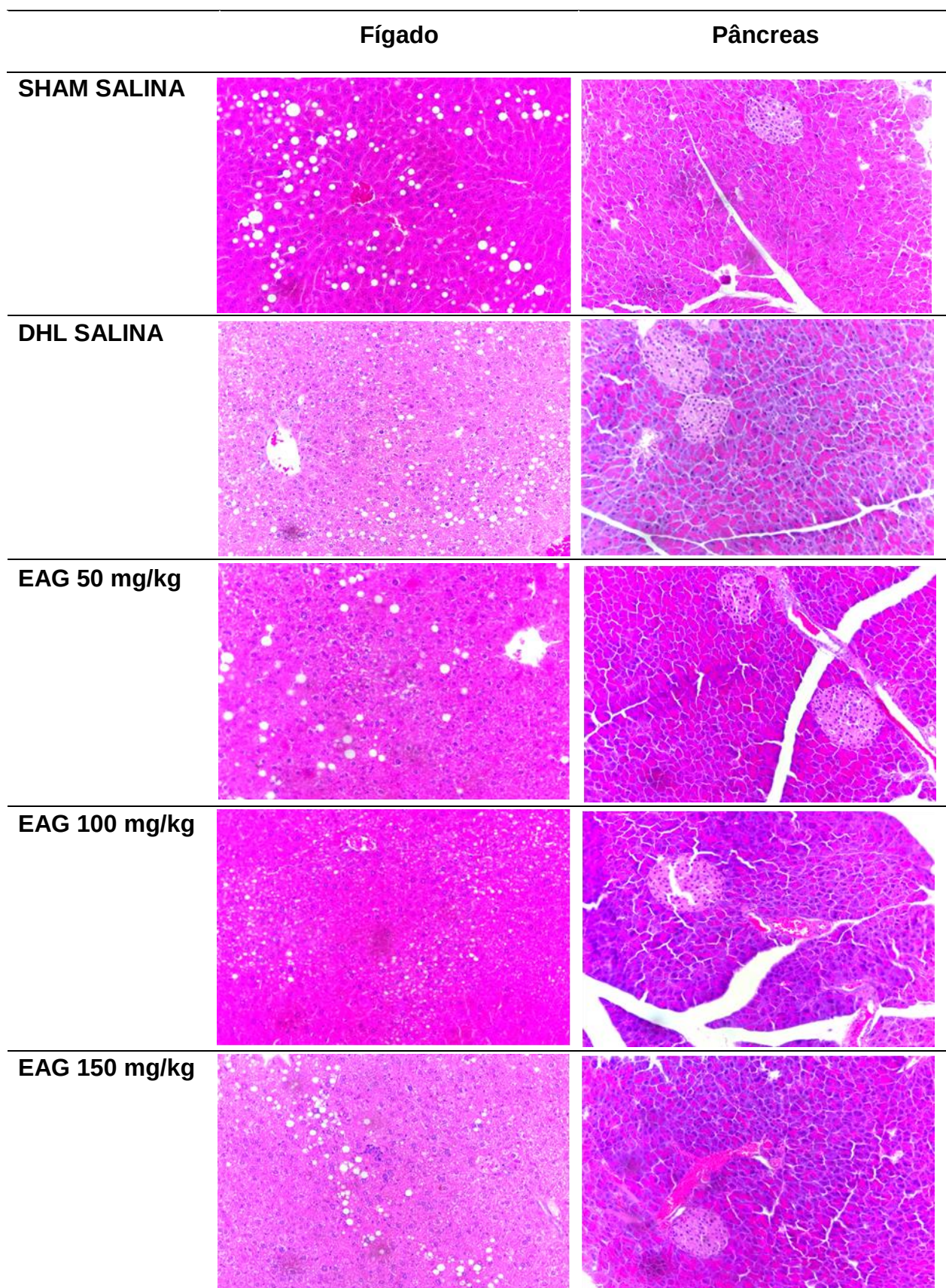


Figura 6 - Análise histológica do fígado e do pâncreas dos grupos corados com hematoxilina-eosina. Aumento de 20x e escala da barra: 100 μ m.

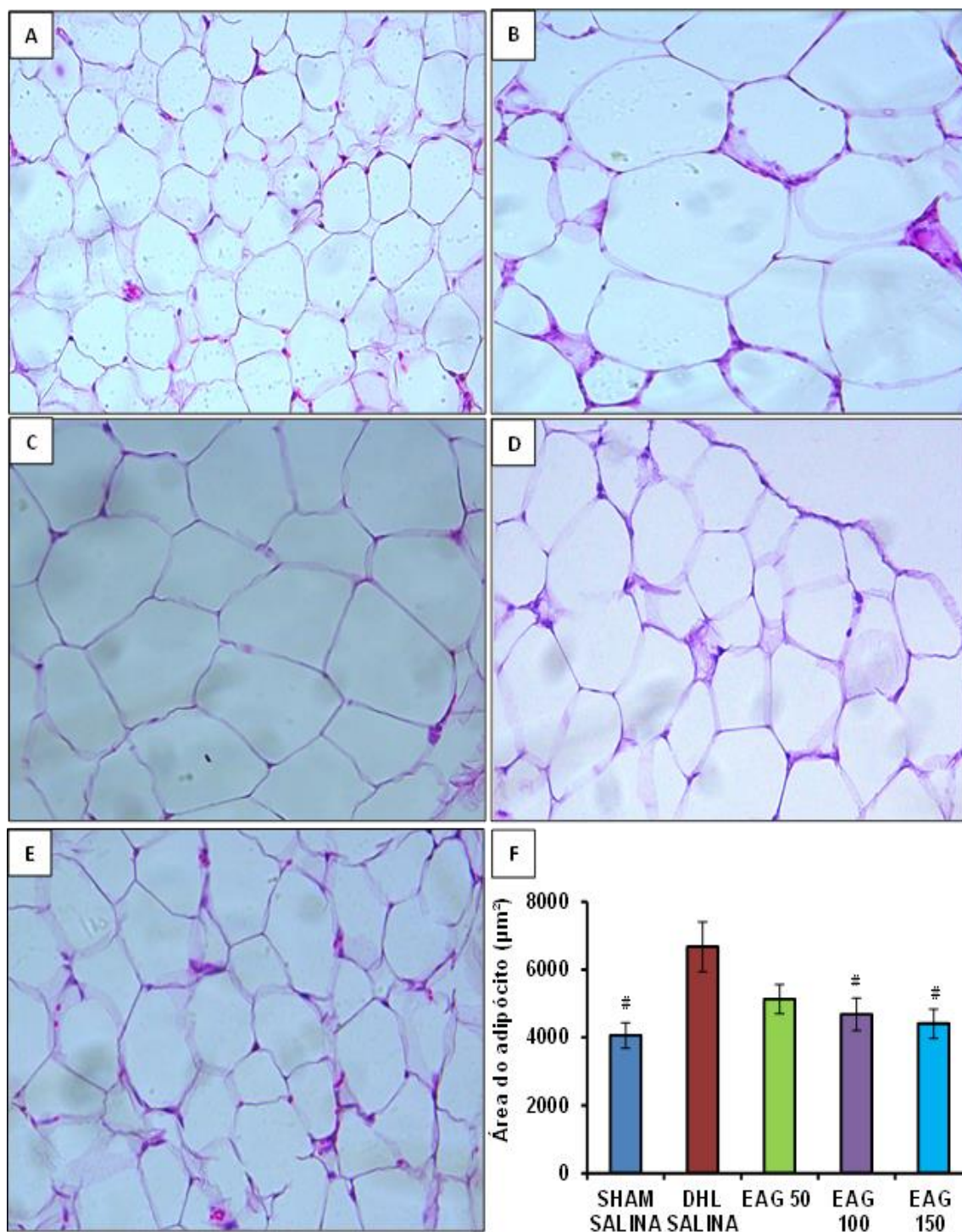


Figura 7 - Análise histológica do tecido adiposo epididimal corado com hematoxilina-eosina. Aumento de 20x e escala da barra: 100 μ m. **(A)** grupo SHAM SALINA; **(B)** grupo DHL SALINA; **(C)** grupo EAG 50 mg/kg; **(D)** grupo EAG 100 mg/kg; **(E)** grupo EAG 150 mg/kg; e **(F)** área do adipócito (μ m²) dos grupos estudados. Os valores representam a média $\pm$ erro padrão da média. # $p < 0,05$ vs DHL SALINA. ANOVA seguido de *pos test* Tukey.

6 DISCUSSÃO

O estilo de vida e dieta pouco saudável induzem alterações metabólicas em humanos bem conhecidas, como a obesidade, DCNT e SM. Assim, pesquisas relacionadas ao conhecimento de fisiopatologia, progressão e tratamento de obesidade e suas comorbidades são importantes para reduzir sua prevalência entre crianças, adolescentes, adultos e idosos em todo o mundo (PANCHAL; BROWN, 2011; KAKIMOTO; KOWALTOWSKI, 2016).

Os roedores têm sido utilizados por muitos anos como modelos experimentais de doenças metabólicas humanas, tais como a obesidade e SM. Panchal e Brown (2011), em um estudo de revisão descreveram que, em um modelo dietético constituído de alto teor de gordura, o aumento do peso corporal é significativo após 2 semanas de tratamento e após 4 semanas de indução este modelo apresenta fenótipos de obesidade. No entanto, os autores ressaltam que a indução em longo prazo leva ao desenvolvimento de comorbidades relacionadas à obesidade como hiperglicemia moderada e intolerância à glicose.

Em nosso estudo, oferecemos a camundongos C57BL/6 uma dieta com 58% de lipídios durante 12 semanas para induzir a obesidade. Após este período, nossos resultados demonstram aumento significativo do peso do grupo DHL em relação ao grupo SHAM (Tabela 4 e Gráfico 1A). O ganho de peso no grupo DHL é condizente com a maior ingestão calórica, evidenciado pelo CEA e CGPCC, demonstrado na Tabela 4.

Ao final do período experimental do nosso estudo, verificamos aumento significativo do colesterol total e LDL e do índice aterogênico do grupo DHL em relação ao grupo controle.

Hoffler e colaboradores (2009) avaliaram o impacto do envelhecimento em camundongos obesos tratados com dieta hiperlipídica (60% do conteúdo energético sob forma de gordura) por 30 semanas, até os mesmos completarem 40 semanas de vida. Ao final do estudo os autores demonstraram que o efeito da idade exacerbou os efeitos do consumo de uma dieta rica em gordura, os quais desenvolveram ao decorrer das semanas estudadas aumento do peso corporal

e colesterol, aumento dos níveis séricos de insulina, esteatose hepática com evolução à esteatohepatite e lesão hepática, lesões renais e diabetes tipo II.

Após comprovar que obtivemos um modelo obeso que reflete o desenvolvimento da obesidade em humanos (Gráfico 1B e Tabela 5), fundamentado em estudos encontrados na literatura, onde o efeito da dieta nas alterações metabólicas está relacionado a idade do animal, tempo de tratamento e tipo de dieta utilizada, nosso próximo objetivo foi estudar no modelo dietético desenvolvido o efeito do extrato da folha da graviola (*Annona muricata* Linn) na obesidade e suas alterações metabólicas.

A escolha da *Annona muricata* Linn em nosso estudo fundamentou-se no fato de que esta planta é utilizada popularmente para redução de peso, tratamento da obesidade e suas comorbidades, no entanto, não há base científica suficiente para recomendar esta planta ao uso humano (CERCATO et al., 2015).

Estudos indicam que duzentos e doze compostos bioativos já foram identificados na *Annona muricata* Linn. Sendo que, os compostos fenólicos são considerados os principais fitoquímicos responsáveis pela atividade antioxidante da *Annona muricata* Linn. George e colaboradores (2014) em seu estudo identificaram elevada concentração de taninos, média concentração de flavonoides e saponinas ausentes no extrato aquoso da folha de graviola coletadas na Índia em outubro de 2010. Ainda, a concentração de compostos fenólicos encontrados foi de $06,9 \pm 0,08$; $08,4 \pm 0,09$, $10,3 \pm 0,06$; $14,0 \pm 0,09$ e $19,1 \pm 0,14$ μg equivalente de ácido gálico nas seguintes concentrações de extrato 25, 50, 100, 200 e 400 μg . No entanto, Gavamukulya e colaboradores (2014) identificaram baixa concentração de flavonoides, elevada concentração de taninos, alcaloides, fenóis, saponinas e fitoesteróis no extrato aquoso da folha de graviola coletadas na África em agosto de 2013. Os compostos fenólicos totais no extrato aquoso foram de $683,69 \pm 0,09$ $\mu\text{g/mL}$ equivalente de ácido gálico e a atividade antioxidante avaliada nas concentrações 0, 250, 500, 750, 1000 e 1250 $\mu\text{g/mL}$ de extrato foi de IC_{50} 0,9077 mg/mL.

Port's e colaboradores (2013) avaliaram a infusão de folhas de graviola coletadas na região amazônica brasileira no mês de julho de 2009, janeiro e julho

de 2010 e não encontraram diferença significativa nas concentrações de fenóis totais $36,01 \pm 0,60$ (julho de 2009); $32,06 \pm 0,14$ (janeiro de 2010); $29,77 \pm 0,36$ mg (julho de 2010) equivalente de ácido gálico por grama de folha de graviola seca e na capacidade antioxidante- IC_{50} $426,85 \pm 27,97$ (julho de 2009), $210,73 \pm 15,17$ (janeiro de 2010) e $322,91 \pm 13,53$ $\mu\text{g/mL}$ (julho de 2010) nos diferentes períodos avaliados. No entanto, a concentração total de flavonoides foi menor na amostra coletada no mês de julho de 2010 ($4,32 \pm 0,19$ mg de equivalente de catequina por grama de folha de graviola seca) em comparação ao mês de julho de 2009 ($5,24 \pm 0,47$) e semelhante ao mês de janeiro de 2010 ($5,68 \pm 0,97$).

Gobbo-Neto e Lopes (2007) após um estudo de revisão descrevem que as variações sazonais, ritmo circadiano, temperatura, disponibilidade hídrica, radiação ultravioleta, nutrientes, altitude, poluição atmosférica, ataque de patógenos, idade e o desenvolvimento da planta podem afetar as concentrações de praticamente todas as classes de metabólitos secundários, como ácidos fenólicos, flavonoides, cumarinas, saponinas, alcaloides, taninos entre outros. Assim, as diferentes concentrações de flavonoides totais, fenóis totais, taninos, capacidade antioxidante (IC_{50}) das folhas da graviola (infusão ou extrato aquoso) encontradas na literatura e em nosso estudo (Tabela 3) podem estar relacionadas a vários fatores.

Ainda, alguns estudos como de Nawwar e col (2012), Moghadamtousi e col. (2015) e Coria-Téllez e col. (2016) apresentam compostos bioquímicos identificados nas folhas de *Annona muricata* Linn, como o ácido gálico, epicatequina, quercetina 3-O-glucoside, e campferol. Entre os identificados também em nosso estudo estão o kaempferol-3-O- α -l-ramnopiranosídeo, quercetina 3-O-rutinosídeo, kaempferol 3-O-rutinosídeo, β -sitosterol-3-O- β -D-glicopiranosídeo, luteolina e quercetina.

O kaempferol-3-O- α -l-ramnopiranosídeo também encontrado na literatura como Afzilina (PUBCHEM, 2017) ou ainda como kaempferol-3-O-ramnopiranosídeo. Este último identificado em extrato etanólico aquoso da folha da graviola por Nawwar e colaboradores (2012).

Kim e colaboradores (2016) demonstraram em seu estudo que os compostos quercetina 3-O-rutinosídeo e Kaempferol 3-O-rutinosídeo isolados da folha da

graviola podem estimular o sistema imunológico pela ativação da via MAPK. Ainda, Rodrigues e colaboradores (2012) relatam em seu estudo que os compostos quercetina 3-O-rutinosídeo e Kaempferol 3-O-rutinosídeo são conhecidos pelas suas propriedades antioxidantes e gastroprotetora.

Os compostos luteolina e a quercitina também identificados neste estudo podem reduzir o colesterol no sangue através da inibição da absorção intestinal de colesterol mediada (NEKOHASHI et al., 2014). Ainda, Hoek-van Den Hil e colaboradores (2013) verificaram que a quercetina elevou a oxidação de lipídio hepático e reduziu níveis de lipídeos circulantes em camundongos.

Plantas medicinais eficientes na perda de peso apresentam dentre seus constituintes químicos, compostos fenólicos, entre eles os flavonoides que modulam o metabolismo lipídico e aumentam a taxa de metabolismo basal através da modulação da LHS, acetil-coA carboxilase, carnitina aciltransferase e PPARs (RUPASINGHE et al., 2016).

Testes de toxicidade aguda e subaguda utilizando extrato aquoso das folhas da graviola encontrados na literatura corroboram com os resultados apresentados. Florence e colaboradores (2014) demonstraram em seu estudo após a administração de dose única 2000mg/kg e 5000 mg/kg de extrato aquoso das folhas da graviola em ratos que este não foi capaz de induzir modificações no comportamento dos animais, mortalidade ou alterações macroscópicas visíveis em órgãos após eutanásia dos animais no 14º dia, concluindo que a DL₅₀ do extrato estudado deve ser superior a 5000 mg/kg. No teste de toxicidade subaguda estes autores dividiram ratos fêmeas em grupos e administraram doses 200, 400 e 800 mg/kg de extrato aquoso das folhas da graviola por gavagem e no final das 4 semanas de observação não foi identificado sinais de toxicidade, como morte de animais e alteração ponderal significativa.

A obtenção da matéria prima para o preparo do extrato aquoso da folha da graviola utilizada no estudo de Florence e colaboradores (2014) foi realizada na capital de Camarões, em Iauendé. E a matéria prima utilizada neste estudo foi coletada na cidade de Campo Grande, Brasil. A utilização de matéria prima coletada em regiões distintas pode impactar na disponibilidade e produção de metabólitos secundários das plantas conforme descrito no estudo de Gobbo-

Neto e Lopes (2007) e justificam a realização do teste de toxicidade neste estudo.

Na literatura, sob nosso conhecimento, até o presente momento este é o primeiro estudo que avaliou os efeitos do extrato da folha da graviola (*Annona muricata* Linn) na obesidade e suas alterações metabólicas em modelo experimental de obesidade induzido por dieta hiperlipídica.

Souza (2010) demonstrou em um estudo os efeitos do chá de folhas de graviola e do seu componente β -sitosterol em ratos alimentados com dieta hipercalórica após 42 dias de tratamento. Em seus resultados, tanto o chá de folhas de graviola, quanto o β -sitosterol diminuíram a glicemia de jejum nos tempos 60, 90 e 120 minutos no teste oral de tolerância a glicose, diminuíram os níveis de colesterol total, colesterol-LDL, e aumentaram as concentrações de colesterol-HDL. Entretanto, não foi observado nenhum efeito sobre o colesterol-VLDL e triglicerídeos.

Florence e colaboradores (2014) avaliaram em seu estudo os efeitos antidiabético e antioxidante do extrato aquoso da folha da graviola (EAG) nas concentrações de 100 mg/kg e 200 mg/kg em ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina. Nos resultados, o tratamento com EAG na concentração de 100 mg/kg apresentou melhores respostas em relação à redução dos níveis de glicose no sangue em 75% em uma única administração do extrato, redução na ingestão de alimentos em 45,43% e redução dos níveis séricos de triglicérides (52,95%), colesterol total (31,51%) e colesterol LDL (81,22%). Ainda, esta dose de EAG foi capaz de reduzir significativamente a glicemia dos animais após 14 dias de tratamento, quando comparado com a glicemia inicial e ao grupo controle diabético.

Neste mesmo estudo, verificou-se um aumento de peso significativo ($p \leq 0,001$) no grupo tratado com 100 mg/kg de extrato quando comparado ao grupo controle diabético. Paralelamente, a ingestão alimentar reduziu 45,43% e 31,34% nos grupos 100 e 200 mg/kg respectivamente, em relação ao grupo controle diabético (FLORENCE et al., 2014).

Estes estudos citados representam os modelos experimentais encontrados na literatura, bem como os resultados promissores do tratamento com a folha da graviola.

Em nosso estudo, foi observado que o EAG nas doses de 50 mg/kg e 100 mg/kg sustentam a atribuição popular da graviola para perda de peso, sendo a dose de 100 mg/kg eficiente na redução de peso em modelo experimental tratado com dieta hiperlipídica. Apesar da redução de peso corporal observada, não foi verificada redução da ingestão calórica nos grupos tratados com extrato aquoso da folha de graviola durante o período experimental, conforme apresentado na Tabela 5.

Desse modo, a redução de peso neste estudo não está relacionada a uma menor ingestão calórica. Ainda, no estudo de Souza (2010) houve um aumento significativo da oxidação de lipídios em animais que receberam chá de graviola ($5,35 \pm 1,63$ mg/min), em relação ao grupo controle hipercalórico ($3,50 \pm 0,78$ mg/min). A redução da eficiência alimentar encontrada neste estudo no grupo que recebeu 100 mg/kg de EAG corrobora com os resultados de Souza (2010).

Souza (2010) após sete semanas de tratamento não observou diferença estatística no peso corporal final, bem como no ganho de peso e índice de Lee entre os grupos que receberam dieta hiperlipídica e tratamento com chá de graviola ou β -sitosterol. No entanto, a circunferência abdominal (cm) foi significativamente menor nos animais tratados com chá de graviola.

Ainda que o extrato aquoso da graviola seja capaz de induzir a redução significativa de peso no modelo experimental estudado, não foi observado redução significativa de adiposidade visceral, avaliada ao final do experimento pelo índice de adiposidade (Tabela 9), no entanto houve redução do peso de todos coxins avaliados, sem diferença significativa na comparação entre os grupos. Também foi possível observar em nosso estudo, diminuição significativa da área dos adipócitos epididimais nos animais tratados com extrato aquoso da folha de graviola (Figura 7). Desse modo, a redução de peso observada nos animais atenuou o acúmulo de gordura corporal.

O estudo de Wu e colaboradores (2013) apresentou após 12 semanas de oferta, que os sucos de mirtilo e amora foram capazes de inibir o acúmulo de

gordura e o ganho de peso corporal em camundongos C57BL/6, sem redução significativa do peso dos coxins adiposos, como ocorreu em nosso estudo. Ainda, pode-se acrescentar, que as folhas da graviola são utilizadas popularmente como diurético, podendo estar associado a redução de peso, no entanto, não há estudos que comprovem este efeito (TAYLOR, 2005).

Shin e colaboradores (2015) citam que a gordura corporal é redistribuída do tecido adiposo subcutâneo para o tecido adiposo visceral durante o envelhecimento, resultando em aumento da adiposidade visceral. Assim, podemos considerar que, pela idade dos animais ao final deste estudo (35 semanas de vida) este fator pode estar envolvido nos resultados encontrados em relação à adiposidade visceral.

Entre os flavonoides com efeito antiobesidade identificados no extrato aquoso da graviola citados na literatura e encontrados neste estudo destaca-se a quercetina e o kaempferol (GARAMBONE; ROSA, 2007; NAWWAR, et al., 2012). O efeito da quercetina sobre redução de peso foi estudada por Henagan e colaboradores (2014) em camundongos tratados com dieta hiperlipídica e após 8 semanas, a suplementação de 50 µg/dia de quercetina atenuou o ganho de peso e a adiposidade, no entanto, 600 µg/dia de quercetina aumentou a adiposidade, sem alterar o peso corporal.

Hoek-Van Den Hil e colaboradores (2013) concluíram em seu estudo que a quercetina elevou a oxidação de lipídio hepático e reduziu níveis de lipídeos circulantes em camundongos. No entanto, o efeito metabólico da quercetina na redução de peso e adiposidade em animais foi questionado por Hoek-Van Den Hil e colaboradores (2015) após os resultados obtidos de análises de oxidação de lipídeos, expressão de genes do metabolismo lipídico no fígado e tecido adiposo por não corresponderem à ação da quercetina.

Com estes estudos apresentados pode-se questionar a interação sinérgica e a concentração de componentes químicos para explicar a eficácia de plantas medicinais, assim como os efeitos da folha da graviola. Assim, novas pesquisas são fundamentais para verificar se o extrato bruto ou parcialmente purificado ou um único composto isolado são responsáveis pelos efeitos desejáveis na saúde obtidos neste estudo (WILLIAMSON, 2001; YANG et al., 2014).

Em relação ao perfil lipídico, não foi observado nenhum efeito significativo do extrato aquoso sobre o colesterol total e HDL. No entanto, nota-se um aumento de 30,35% do colesterol HDL no grupo tratado com EAG 150 mg/kg em relação ao grupo DHL SALINA e redução de 20,54% da concentração de colesterol total no grupo 100 mg/kg e 17,49% grupo 150 mg/kg em relação ao grupo DHL SALINA. Além disso, observou-se redução significativa nas concentrações de colesterol-LDL e colesterol-VLDL e diminuição dos triglicerídeos, conforme demonstrado no Gráfico 2.

Entre os resultados apresentados por Adewole e Ojewole (2009) em seu estudo observa-se que não houve diferença significativa de colesterol total, HDL, LDL e triglicerídeos em animais tratados com dieta padrão e 100 mg/kg de extrato aquoso da folha da graviola por 60 dias, em relação ao grupo controle.

O EAG foi capaz de reduzir significativamente todas as concentrações plasmáticas de lipídeos em ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina, em relação ao grupo controle. Entretanto, não houve diferença em relação ao grupo diabético tratado com 10 UI/kg de insulina (FLORENCE et al., 2014).

Ainda, a redução do colesterol total observada neste estudo pode estar relacionada com a presença de compostos no extrato em estudo, como citado anteriormente por Nekohashi e colaboradores (2014) e Hoek-van Den Hil e colaboradores (2013).

Adewole e Ojewole (2009) relatam que, os mecanismos de ação do extrato aquoso da graviola no metabolismo não estão totalmente esclarecidos. No entanto, vários estudos relatam compostos químicos isolados, como taninos, flavonoides, saponinas, cumarinas, entre outros constituintes já mencionados, sendo os responsáveis pelas propriedades hipoglicemiantes, hipolipidêmicas, hipotensoras, anti-inflamatória, pelas alterações nos tecidos hepáticos, entre outras propriedades. Ainda, após um estudo *in vitro*, Hardoko e colaboradores (2015) concluíram que os componentes químicos presentes folha da graviola são capazes de inibir a enzima α -glucosidase através de ligações de hidroxilação e assim atenuar a concentração plasmática de glicose.

Os compostos químicos das plantas medicinais desempenham as suas funções farmacológicas e bioquímicas pela regulação de enzimas, hormônios,

receptores, transportadores, entre outros mecanismos envolvidos no metabolismo, podendo assim reduzir a oxidação do LDL, aumentar a termogênese e o metabolismo lipídico, reduzir a absorção e aumentar a excreção de lipídeos, inibir enzimas responsáveis pela síntese hepática de colesterol, reduzir a diferenciação de adipócitos e induzir apoptose em adipócitos maduros (CICERO; COLLETTI, 2016; RUPASINGHE et al., 2016).

Na homeostase glicêmica, as plantas medicinais podem diminuir o transporte de glicose através do epitélio intestinal, aumentar a liberação de insulina das ilhotas pancreáticas, estimular a síntese, liberação e regeneração de células pancreáticas, exercer atividade semelhante à insulina e aumentar a utilização periférica de glicose. Ainda, os antioxidantes são eficazes contra radicais livres doando seus elétrons e diminuindo o estresse oxidativo. (MAZUMDER; RATHINAVELUSAMY; SASMAL, 2012; PATEL et al., 2012).

O aumento do estresse oxidativo na obesidade está envolvido em alterações metabólicas. O tratamento com extrato aquoso de graviola em ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina causou diminuição de biomarcadores de estresse oxidativo, como espécie reativa de oxigênio, glutathiona oxidada e malondialdeído e aumento da glutathiona peroxidase, catalase, superóxido dismutase e da glutathiona, protegendo os tecidos dos efeitos destrutivos da peroxidação lipídica e do estresse oxidativo (ADEWOLE; OJEWOLE 2009; MARREIRO, 2013; FLORENCE et al., 2014).

Em nosso estudo, foi observado diminuição do índice aterogênico (Gráfico 2G) após o tratamento com extrato aquoso da folha da graviola, estando diretamente relacionado com a diminuição do desenvolvimento de doenças cardiovasculares. Este resultado pode estar associado a uma possível diminuição de triglicerídeos, aumento do colesterol-HDL, diminuição do estresse oxidativo e/ou diminuição da peroxidação lipídica.

Como citado anteriormente, observamos em nosso estudo diminuição dos triglicerídeos nos grupos tratados com EAG nas maiores concentrações (Gráfico 2F). No entanto, houve um aumento significativo da concentração de triglicerídeos no grupo tratado com dieta AIN-93M, sendo importante destacar que a constituição desta dieta é rica em carboidratos e pobre em lipídeos

(REEVES et al., 1993). Este aumento pode estar associado ao tratamento prolongado com dieta rica em carboidrato de alto índice glicêmico e pobre em fibras. Ainda, sabe-se que dietas ricas em fibras e de baixo índice glicêmico estão associadas à diminuição da resistência à insulina, menor resposta insulinêmica pós-prandial, melhora da função das células β pancreática em longo prazo, modulação da expressão genética do tecido adiposo, da apoptose, estresse metabólico e inflamatório (LANKINEN et al., 2010; WOLEVER et al., 2013).

Wolever e colaboradores (2013) relatam redução da glicose e triglicerídeos pós-prandial em indivíduos que consumiram 40% versus 60% de carboidrato na dieta e ainda sugerem que mudanças no consumo de carboidratos e fibras modificam o metabolismo de carboidratos e lipídios a longo prazo, sendo de 6 a 12 meses o período de adaptação.

Coulston e colaboradores (1989) demonstraram aumento das concentrações plasmáticas e urinária de glicose e aumento da insulina ao longo do dia em pacientes que receberam dietas com 60% de carboidratos. Ainda, após 6 semanas de estudo observaram aumento significativo das concentrações de triglicerídeos e colesterol-VLDL, enquanto que as concentrações de colesterol-LDL e colesterol-HDL diminuíram consideravelmente. Estes resultados corroboram com o estudo de Garg e colaboradores (1994).

Ao observar a glicemia de jejum no teste de tolerância oral à glicose (Tabela 6) antes do início do tratamento com extrato aquoso com folha de graviola nota-se que não há diferença entre os grupos alimentados com dieta hiperlipídica e controle. Ainda, foi observado neste estudo valores semelhantes de glicose em jejum no teste de tolerância oral à glicose realizado ao final do tratamento entre os grupos estudados (Tabela 7). Hoffler e colaboradores (2009) relatam que os níveis séricos de insulina foram 4 vezes mais elevados em animais com 30 e 40 semanas de idade alimentados com dieta hiperlipídica. Assim, um possível aumento na secreção de insulina pelo pâncreas pode estar relacionado aos resultados encontrados, já que os animais ao final do estudo estavam com 35 semanas de vida.

Estudos como de Adewole e col (2009), Adeyemi e col (2009), Ahalya e col (2014) e Florence e col (2014) demonstraram redução significativa da concentração da glicose plasmática após o tratamento com extrato de graviola em animais diabéticos induzidos por estreptozotocina ou aloxano monohidratado.

Em nosso estudo, o extrato aquoso da folha da graviola não foi eficaz em reduzir significativamente a concentração da glicose plasmática (Gráfico 2A) assim como, no teste de sensibilidade (Tabela 8 e Gráfico 4) e área sob a curva da insulina. Sabe-se que a adiposidade visceral desempenha um papel relevante no desenvolvimento e manutenção da resistência à insulina, relacionado com uma inflamação sistêmica crônica. No entanto, os mecanismos específicos pelos quais a adiposidade visceral se torna fundamental no desenvolvimento da resistência à insulina não estão totalmente esclarecidos (SHIN et al., 2015; CRUJEIRAS et al., 2016). Desse modo, os resultados encontrados no teste de sensibilidade à insulina nos animais estudados, podem estar relacionados a adiposidade visceral verificada nos coxins adiposos (Tabela 9).

No teste de tolerância oral à glicose (Tabela 7 e Gráfico 3) houve redução dos níveis da glicemia no tempo de 15 minutos após a administração da glicose e esta resposta glicêmica parece estar diretamente relacionada com a concentração de extrato utilizado, ou seja, quanto maior a concentração do extrato menor o “pico glicêmico”. Ainda, ao calcularmos a área sob a curva ao final do experimento, observamos resultados muito próximos entre os grupos estudados.

Assim, os resultados encontrados em nosso estudo questionam o efeito do extrato da graviola na resistência à insulina e diabetes *mellitus* relacionados a uma alimentação inadequada e sedentarismo. No entanto, o impacto observado do extrato aquoso no “pico da glicose” do teste de tolerância oral à glicose (Tabela 7 e Gráfico 3), resultando em menor flutuação da glicemia, parece reduzir a disfunção endotelial e consequentemente o risco cardiovascular. Evidências mostram que, uma maior flutuação da glicemia induz a disfunção endotelial por meio de estresse oxidativo, devido ao aumento dos radicais livres (CERIELLO et al., 2008).

Neste modelo experimental o extrato aquoso das folhas da graviola nas doses estudadas não foi suficiente para evitar o acúmulo de gordura hepática e lesões dos hepatócitos (Tabela 11), assim como no pâncreas (Tabela 10). No entanto, a balonização dos hepatócitos foi menos frequente nos animais que receberam o tratamento com o extrato, assim como a necrose/atrofia dos ácinos pancreáticos.

Ainda, o extrato nas diferentes doses não foi capaz de reduzir o acúmulo ectópico gordura, avaliado pelos lipídeos totais e triglicerídeos hepáticos. Estes resultados corroboram com as análises histológicas do fígado (Gráfico 5).

Hoffler e colaboradores (2009) relatam que todos os animais alimentados com dieta hiperlipídica desenvolveram esteatose hepática com subsequente esteatohepatite após 30 semanas vida e lesão dos hepatócitos após 40 semanas. Assim, o tratamento com extrato aquoso da folha da graviola em nosso estudo não foi capaz evitar esta condição, no entanto, parece proteger os hepatócitos de alterações morfológicas, podendo estar relacionado a diminuição do estresse oxidativo.

Outro estudo (FLORENCE et al., 2014) apresentou resultado onde, o extrato aquoso da *Annona muricata* Linn foi capaz de proteger células- β pancreáticas e, conseqüentemente, melhorar o metabolismo da glicose, o que não foi visualizado em nossos resultados.

7 CONCLUSÃO

Com base nos resultados apresentados, conclui-se que o extrato aquoso da graviola pode ajudar a combater a obesidade e suas alterações metabólicas.

Após avaliar as concentrações de compostos bioativos no extrato aquoso da folha da graviola elaborado e comparar com resultados encontrados na literatura, verificou-se uma variação na concentração destes componentes, podendo estar associada a fatores ambientais e condições de desenvolvimento da planta. No entanto, os compostos isolados neste estudo são semelhantes aos relatados na literatura. Ainda, após teste de toxicidade aguda o modelo estudado não apresentou nenhuma alteração neurológica, comportamental ou mortalidade.

Em relação ao efeito do EAG na obesidade e suas comorbidades conclui-se que as doses de 50 mg/kg e 100 mg/kg sustentam a atribuição popular da graviola para redução de peso corporal. No entanto, essa redução não está relacionada a uma menor ingestão calórica. Além disso, o EAG foi capaz de atenuar o acúmulo de gordura corporal, diminuir concentrações plasmáticas de colesterol-LDL, colesterol-VLDL, triglicerídeos e o índice aterogênico, estando relacionado com a diminuição do risco cardiovascular. Ainda, em nosso modelo experimental, os efeitos benéficos do extrato aquoso da graviola no diabetes *mellitus* não puderam ser suportados. No entanto, a maior concentração do extrato estudado foi capaz de diminuir a flutuação da glicemia, estando relacionada a diminuição do risco cardiovascular.

Os resultados observados neste estudo são importantes para esclarecer, principalmente para a população, os efeitos desta planta medicinal e ainda para incorporar novos agentes com propriedades farmacológicas capazes de controlar a obesidade e suas comorbidades. No entanto, mais estudos são necessários para esclarecer os mecanismos de ação envolvidos nos resultados encontrados, bem como realizar isolamento e identificar as frações e/ou compostos do extrato que poderiam ser responsáveis pelos benefícios e ainda verificar se concentrações acima da dose de 150 mg/kg do extrato aquoso das folhas de graviola podem ser eficazes na redução da glicemia neste modelo experimental.

REFERÊNCIAS

- ADEWOLE, S. O.; OJEWOLE, J. A. O. Protective effects of *Annona Muricata* Linn. (Annonaceae) leaf aqueous extract on serum lipid profiles and oxidative stress in hepatocytes of streptozotocin-treated diabetic rats. **Africa Journal Traditional**, v. 6, n. 1, p. 30-41, oct. 2009.
- ADEYEMI, D. O.; KOMOLAFE, O. A.; ADEWOLE, O. S.; OBUOTOR, E. M.; ADENOWO, T. K. Antihyperglycemic activities of *Annona muricata* (Linn). **African Journal of Traditional, Complementary and Alternative medicines**, v. 6, n. 1, p. 62-69, oct. 2009.
- AGOSTINI-COSTA, T. S.; GARRUTI, D. S.; LIMA, L.; FREIRE, S.; ABREU, F. A. P.; FEITOSA, T. Avaliação de metodologias para determinação de taninos no suco de caju. **Boletim CEPPA**, v. 17, n. 2, p. 167-176, jul./dez. 1999.
- AGRAWAL, P. K. **Carbon-13 NMR of Flavonoids**. Amsterdam: Elsevier, 1989.
- AHALYA, B.; SHANKAR, K. R.; KIRANMAYI, G. V. N. Exploration of anti-hyperglycemic and hypolipidemic activities of ethanolic extract of annona muricata bark in alloxan induced diabetic rats. **International Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 25, n. 2, p. 21-27, mar./apr. 2014.
- ABESO. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA PARA O ESTUDO DA OBESIDADE E DA SÍNDROME METABÓLICA. **Diretrizes brasileiras de obesidade 2009/2010**- Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade e da Síndrome Metabólica. 3 ed. Itapevi, SP: AC Farmacêutica, 2009.
- _____. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA PARA O ESTUDO DA OBESIDADE E DA SÍNDROME METABÓLICA. **Diretrizes brasileiras de obesidade 2016**- Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade e da Síndrome Metabólica. 4 ed. São Paulo: Companygraf, 2016.
- ANTUNA-PUENTE, B.; FEVE, B.; FELLAHI, S.; BASTARD, J. P. Adipokines: the missing link between insulin resistance and obesity. **Diabetes & Metabolism**, v. 34, n. 1, p. 2-11, feb. 2008.
- ANVISA. **Novos tratamentos disponíveis: Agência aprova dois medicamentos inéditos**. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/noticias/-/asset_publisher/FXrpx9qY7FbU/content/anvisa-registra-novos-medicamentos/219201/pop_up?inheritRedirect=false>. Acesso em: 04 Mar. 2017
- ATAY, Z.; BEREKET, A. Current status on obesity in childhood and adolescence: Prevalence, etiology, co-morbidities and management. **Obesity Medicine**, v. 3, p. 1-9, set. 2016.

BAHIA, L.; COUTINHO, E. S.; BARUFALDI, L. A.; ABREU, G. D. E. A.; MALHÃO, T. A.; DE SOUZA, C. P.; ARAUJO, D. V. The costs of overweight and obesity-related diseases in the Brazilian public health system: cross-sectional study, **BMC Public Health**, v. 12, n. 440, p. 1-7, jun. 2012.

BELEZA, J. M. S. **Exercício físico e obesidade. Efeito da atividade física voluntária e do treino de endurance na funcionalidade de mitocôndrias de tecido adiposo**. 2014. 70 f. Dissertação (Mestrado em Atividade Física e Saúde) – Faculdade de esporte, Universidade do porto, 2014.

BERENSTEIN, C. K. **Doença hepática gordurosa não alcoólica: avaliação histopatológica em biópsias por agulha e concordância interobservador**. 2007. 97 f. Dissertação (Mestrado em Anatomia Patológica Médica) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2007.

BERRONDO, L. F.; GABRIEL, F.T.; FERNANDES, S. B. O.; MENEZES, F. S.; MOREIRA, D. L. Dirhamnosyl flavonoid and other constituents from *Brillantaisia palisatii*. **Química Nova**, v. 26, n. 6, p. 922-923, nov./dec. 2003.

BOGIOLO, L.; FILHO, G. B. **Bogliolo patologia**. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012.

BRASIL. Decreto nº 5.813, de 22 de junho de 2006. **Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos**, Ministério da Saúde, Brasília: Diário Oficial da União, Seção 1, n. 119, 2006

_____. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Saúde Suplementar. **Vigitel Brasil 2014: vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico**. Brasília: Ministério da Saúde, 2015. 165 p.

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Práticas integrativas e complementares: plantas medicinais e fitoterapia na Atenção Básica**. Brasília: Ministério da Saúde, 2012. 156p.

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Análise de Situação de Saúde. **Plano de ações estratégicas para o enfrentamento das doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) no Brasil 2011-2022**. Brasília: Ministério da Saúde, 2011. 160 p.

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância de Doenças e Agravos não Transmissíveis e Promoção de Saúde. **Vigitel Brasil 2012: vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito**. Brasília: Ministério da Saúde, 2013. 136 p.

_____. **Portal da saúde**. Disponível em:
<http://dab.saude.gov.br/portaldab/ape_pcan.php>. Acesso em: 03 out. 2016.

BROADHURST, R. B.; JONES, W. T. Analysis of condensed tannins using acidified vanillin. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 29, n. 9, p. 788-794, 1978.

BUSNELLO, F. M.; SANTOS, Z. A. Obesidade. In: GOSTTSCHALL, C. B. A.; BUSNELLO, F. M. (Org.). **Nutrição e síndrome metabólica**. São Paulo: Editora Atheneu, 2009. cap. 10, p. 10-110.

CARNEIRO, J.; CASIMIRO, L. G.; MIRANDA, M.; MENDES, M. A.; CARIDADE, T.; MONTEIRO, T.; SECO, H.; LOPES, C. Insulino-resistência e síndrome metabólica: perspectiva imunológica. **Revista Portuguesa de Endocrinologia, Diabetes e Metabolismo**, v. 6, n. 2, p. 91-100, 2011.

CATTA-PRETA, M. **Dietas hiperlipídicas alteram citocinas inflamatórias, adipocinas, tecido adiposo e fígado em camundongos**. 2011. 97 f. Tese (Doutorado em Biologia Humana e Experimental) – Instituto de biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2011.

CASTOLDI, A. **MyD88: Um modulador do perfil inflamatório e metabólico na obesidade experimental**. 2015. 37 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

CERCATO, L. M.; WHITE, P. A. S.; NAMPO, F. K.; SANTOS, M. R.V.; CAMARGO, E. A systematic review of medicinal plants used for weight loss in Brazil: Is there potential for obesity treatment?. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 176, n. 24, p. 286-296, dec. 2015.

CICERO, A. F. G.; COLLETTI, A. Combinations of phytomedicines with different lipid lowering activity for dyslipidemia management: The available clinical data. **Phytomedicine**, v. 23, n. 11, p. 1113–1118, oct. 2016.

CERIELLO, A.; ESPOSITO, K.; PICONI, L.; IHNAT, M., THORPE, J.; TESTA, R.; BONFIGLI, A. R.; GIUGLIANO, D. Glucose “peak” and glucose “spike”: Impact on endothelial function and oxidative stress. **Diabetes research and clinical practice**. v. 82, n. 2, p. 262-267, nov. 2008.

CHANDRAN, R.; PARIMELAZHAGAN, T.; SHANMUGAM, S.; THANKARAJAN, S. Antidiabetic activity of *Syzygium calophyllifolium* in streptozotocin-nicotinamide induced type-2 diabetic rats. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 82, p. 547-554, may 2016.

CINTRA, D. E. C. **Integração entre vias metabólicas e inflamatórias durante a esteatose hepática induzida por dieta hiperlipídica**. 2008.101 f. Tese (Doutorado em Ciências Básicas) - Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2008.

CORIA-TÉLLEZ, A. V.; MONTALVO-GÓNZALEZ, E.; YAHIA, E. M.; VÁZQUEZ, E. N. O. *Annona muricata*: A comprehensive review on its traditional medicinal uses, phytochemicals, pharmacological activities, mechanisms of action and toxicity *Annona muricata*. **Arabian Journal of Chemistry**, p. 1-30, jan. 2016.

CRUJEIRAS, A. B.; DIAZ-LAGARES, J. M.; MORENO-NAVARRETE, A.; SANDOVAL, J.; HERVAS, D.; GOMEZ, A.; CASANUEVA, F. F.; ESTELLER, M.; FERNANDEZ-REAL, J. M. Genome-wide DNA methylation pattern in visceral adipose tissue differentiates insulin-resistant from insulin-sensitive obese subjects. **Translational Research**, v. 178, p.13-24, dez. 2016.

COULSTON, A. M.; HOLLENBECK, C. B.; SWISLOCKI, A. L.; REAVEN, G. M. Persistence of hypertriglyceridemic effect of low-fat high-carbohydrate diets in NIDDM patients. **Diabetes Care**, v.12, n. 2, p. 94-10, feb. 1989.

DARMASSEELANE, K.; HYDE, M. J.; SANTHAKUMARAN, S.; GALE, C.; MODI, N. Mode of delivery and offspring body mass index, overweight and obesity in adult life: a systematic review and meta-analysis. **Plos One**, v. 9, n. 2, p. 1-15, fev. 2014.

DE LUCA, C.; OLEFSKY, J. M. Inflammation and Insulin Resistance. **FEBS letters**, v. 582, n. 1, p. 97–105, jan. 2008

DJERIDANE, A.; YOUSFI, M.; NADJEMI, B.; BOUTASSOUNA, D.; STOCKER, P.; VIDAL, N. Antioxidant activity of some algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. **Food Chemistry**, v. 97, n. 4, p. 654-660, aug. 2006.

DUTRA, R. C. ; CAMPOS, M. M.; SANTOS, A. R. S.; CALIXTOE, J. B. Medicinal plants in Brazil: Pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. **Pharmacological Research**, v. 112, p. 4–29, oct. 2016.

ENES, C. C.; SLATER, B. Obesidade na adolescência e seus principais fatores determinantes. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 13, n. 1, p. 163-171, fev. 2010.

FLORENCE, N. T.; BENOIT, M. Z.; JONAS, K.; ALEXANDRA, T.; DÉSIÉ, D. D. P.; PIERRE, K.; THÉOPHILE, D. Antidiabetic and antioxidant effects of *Annona muricata* (Annonaceae), aqueous extract on streptozotocin-induced diabetic rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 151, n. 2, p. 784–790, feb. 2014.

FORTI, N.; DIAMENT, J. Lipoproteínas de alta densidade: aspectos metabólicos, clínicos, epidemiológicos e de intervenção terapêutica. Atualização para os clínicos. **Arquivo Brasileiro de Cardiologia**, v. 87, n. 5, p. 614-622, nov. 2006.

FRANÇA, B. K.; ALVES, M. R. M.; SOUTO, F. M. S.; TIZIANE, L.; BOAVENTURA, R. F.; GUIMARÃES A.; JR ALVES, A. peroxidação lipídica e obesidade: métodos para aferição do estresse oxidativo em obesos. **Jornal Português de Gastreenterologia**, v. 20, n. 5, p. 199-206, set./oct. 2013.

FREITAS, A. L. G. E. **Caracterização da produção e do mercado da graviola (*Annona muricata* L.) no Estado da Bahia. Vitória da Conquista – BA: UESB. 2012. 108 f.** Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Vitória da Conquista, 2012.

FREITAS, M. C.; CESCHINI, F. L.; RAMALLO, B. T. Resistência à insulina associado à obesidade: Efeitos anti-inflamatórios do exercício físico. **Revista Brasileira de Ciência e Movimento**, v. 22, n. 3, p. 139-147, ago. 2014.

FOLCH, J.; LEES, M.; STANLEY, G. H. S. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 226, n. 1, p. 497-509, may. 1957.

GARAMBONE, E.; ROSA, G. Possíveis benefícios do ácido clorogênico à saúde. **Alimentos e Nutrição**, v. 18, n. 2, p. 229-235, abr./jun. 2007.

GARG, A.; BANTLE, J. P.; HENRY, R. R.; COULSTON, A. M.; GRIVER, K. A.; RAATZ S. K.; BRINKLEY, L.; CHEN, Y-D. I.; GRUNDY, S. M.; HUET, B. A.; REAVEN, G. M. Effects of Varying Carbohydrate Content of Diet in Patients With Non—Insulin-Dependent Diabetes Mellitus. **Jama: The Journal of the American Medical Association**, v. 271, n. 18, p. 1421-1428, may 1994.

GAVAMUKULYA, Y.; ABOU-ELELLA, F.; WAMUNYOKOLI, F.; AEL-SHEMY, H. Phytochemical screening, anti-oxidant activity and in vitro anticancer potential of ethanolic and water leaves extracts of *Annona muricata* (Graviola). **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 7, supl. 1, p. s355-s363, set. 2014.

GEHRKE, J.; PEREIRA, R. Z. Associação do fator de necrose tumoral-alfa (tnf- α) com a obesidade. **Revista Brasileira de Obesidade, Nutrição e Emagrecimento**, v. 1, n. 1, p. 1-10, jan./fev. 2007.

GEORGE, V. C.; KUMAR, D. R. N.; SURESH, P. K.; KUMAR, R. A. Antioxidant, DNA protective efficacy and HPLC analysis of *Annona muricata* (soursop) extracts. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, n. 4, p. 2328-2335, fev. 2014.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.

GOSTTSCHAL, C. B. A.; BUSNELLO, F. M. **Nutrição e síndrome metabólica**. São Paulo: Editora Atheneu, 2009.

GUILHERME, A.; VIRBASIS, J. V.; PURI, V.; CZECH, M. P. Adipocyte dysfunctions linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 9, n. 5, p. 367-377, maio 2008.

GUIMARÃES, D. E. D.; SARDINHA, F. L. C.; MIZURINI, D. M.; CARMO, M. G. T. Adipocitocinas: uma nova visão do tecido adiposo. **Revista de Nutrição**, v. 20, n. 5, p. 549-559, set./out. 2007.

GURNANI, M.; BIRKEN, C.; HAMILTON, J. Childhood obesity. **Pediatric Clinics of North America**, v. 62, n. 4, p. 821-840, ago. 2015.

HARBORNE J. B. The flavonoids. advances in research since 1986 (Harbone, J.B.). **Journal of Chemical Education**. v. 72, n. 3, p. A73, mar. 1995.

HARDOKO, H.; HALIM, Y.; WIJOYO, S. V. *In vitro* antidiabetic activity of “green tea” soursop leaves brew through α -glucosidase inhibition. **International Journal of PharmTech Research**, v. 8, n. 1, p. 30-37, jan. 2015.

HENAGAN, T. M.; LENARD, N. R.; GETTYS, T. W.; STEWART, L. K. Dietary Quercetin Supplementation in mice increases skeletal muscle PGC1 α expression, improves mitochondrial function and attenuates insulin resistance in a time-specific manner. **Plos One**, v. 9, n. 2, p. 1-11, fev. 2014.

HIRABARA, S. M.; LELLIS-SANTO, C.; CURI, R. Fluxo de metabólitos e balanço energético: Acúmulo e depleção de substratos. In: SAWAYA, A. AL.; LEANDRO, C. G.; WAITZBERG, D. L. **Fisiologia da Nutrição na saúde e na doença: da biologia molecular ao tratamento**. São Paulo: Editora Atheneu, 2013. cap. 9, p. 182-196

HOEK-VAN DEN HIL, E.F.; KEIJER, J.; BUNSCHOTEN, A.; VERVOORT, J. J. M.; STANKOVA B.; BEKKENKAMP, M.; HERREMAN, L.; VENEMA, D.; HOLLMAN, P. C. H.; TVRZICKA, E.; RIETJENS, I. M. C. M.; SCHOTHORST, EVERT, M. V. Quercetin induces hepatic lipid omega-oxidation and lowers serum lipid levels in mice. **Plos One**, v. 8, n. 1, p. 1-10, jan. 2013.

HOEK-VAN DEN HIL, E. F.; SCHOTHORST, E. M. V.; STELT, I. V. D.; SWARTS, H. J. M.; VLIET, M. V.; AMOLO, T.; VERVOORT, J. J. M.; VENEMA, D.; HOLLMAN, P. C. H.; RIETJENS, I. M. C. M.; KEIJER, J. Direct comparison of metabolic health effects of the flavonoids quercetin, hesperetin, epicatechin, apigenin and anthocyanins in high-fat-diet-fed mice. **Genes & Nutrition**, v. 10, n. 4, p. 1-13, jul. 2015.

HOFFLER, U.; HOBBIE, K.; WILSON, R.; BAI, R.; RAHMAN, A.; MALARKEY, D.; TRAVLOS, G.; GHANAYEM, B. I. Diet-induced obesity is associated with hyperleptinemia, hyperinsulinemia, hepatic steatosis, and glomerulopathy in C57Bl/6J mice. **Endocrine**, v. 36, n. 2, p. 311-325, ago. 2009.

HOTAMISLIGIL, S. G. Review Article Inflammation and metabolic disorders. **Nature**, v. 444, n. 7121, p. 860-867, dez. 2006.

HYVÖNEN, M. T.; SPALDING, K. L. Maintenance of white adipose tissue in man. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 56, p. 123-132, nov. 2014.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Pesquisa Nacional de Saúde 2013**: percepção do estado de saúde, estilos de vida e doenças crônicas. Brasil, grandes regiões e unidades da federação. Rio de Janeiro: IBGE. 2015. 180p.

JASCOLKA, T. L. **Efeitos do Quefir no Perfil Lipídico, Estresse Oxidativo e Aterosclerose de Camundongos Deficientes em Apolipoproteína E**. 2010. 102 f. Dissertação. (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2010.

KAKIMOTO, P. A.; KOWALTOWSKI, A. J. Effects of high fat diets on rodent liver bioenergetics and oxidative imbalance. **Redox Biology**, v. 8, p. 216-225, ago. 2016.

KIM, G.-T.; TRAN, N. K. S.; CHOI, E.-H.; SONG, Y.-J.; SONG, J.-H.; SHIM, S.-M.; PARK, T.-S. Immunomodulatory efficacy of standardized *Annona Muricata* (graviola) leaf extract via activation of mitogen-activated protein kinase pathways in RAW 264.7 Macrophages. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 16, p. 1-10, nov. 2016.

KLEINER, D. E.; BRUNT, E. M.; VAN NATTA, M.; BEHLING, C.; CONTOS, M. J.; CUMMINGS, O. W.; FERRELL, L. D.; LIU, Y. C.; TORBENSON, M. S.; UNALP-ARIDA, A.; YEH, M.; MCCULLOUGH, A. J.; SANYAL, A. J. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. **Hepatology**, v. 41, n. 6, p. 1313-1321, jun. 2005.

KUMARAN, A.; KARUNAKARAN, R. J. Antioxidant and free radical scavenging activity of an aqueous extract of *Coleus aromaticus*. **Food Chemistry**, v. 97, n.1, p. 109-114, jul. 2006.

LANKINEN, M.; SCHWAB, U.; GOPALACHARYULU, P.V.; SEPPÄNEN-LAAKSO, T.; YETUKURI, L.; SYSI-AHO, M.; KALLIO, P.; SUORTTI, T.; LAAKSONEN, D. E.; GYLLING, H.; POUTANEN, K.; KOLEHMAINEN, M.; OREŠIČ, M. Dietary carbohydrate modification alters serum metabolic profiles

in individuals with the metabolic syndrome. **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases**, v. 20, n. 4, p. 249–257, may 2010.

LENQUISTE, S. A.; MARINELI, R. S.; MORAES, E. A.; DIONÍSIO, A. P.; BRITO, E. S.; JUNIOR, M. R. M. Jaboticaba peel and jaboticaba peel aqueous extract shows in vitro and in vivo antioxidant properties in obesity model. **Food Research International**, v. 77, n. 2, p. 162–170, nov. 2015.

LEHNERT, T.; SONNTAG, D.; KONNOPKA, A.; RIEDEL-HELLER, S.; KÖNIG H. Economic costs of overweight and obesity. **Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 27, n. 2, p. 105-115, abr. 2013.

LIN, J.; TANG, C. Determination of total phenolic and flavonoid contents in selected fruits and vegetables, as well as their stimulatory effects on mouse splenocyte proliferation. **Food Chemistry**, v. 101, n. 1, p. 140–147, 2007.

LOPES, W. A. **Treinamento combinado em adolescentes com excesso de peso: efeitos sobre a composição corporal, resistência à insulina e inflamação sistêmica**. 2015. 159 f. Tese (Doutorado em Educação Física) - Faculdade de Educação Física, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2015.

MALONE, M. H.; ROBICHAUD, R. C. A. hippocratic screen for pure or crude drug materiais. **Lloydia**, v. 25, n. 4, p. 320-332, dec. 1962.

MANENTI, A. V. **Plantas medicinais utilizadas no tratamento da obesidade: uma revisão**. 2010. 88 f. TCC (Bacharel em Nutrição) – Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma, 2010.

MARREIRO, D. N.: Obesidade: Bases bioquímicas e moleculares. In: COZZOLINO, S. M. F.; COMINETTI, C. (org.). **Bases bioquímicas e fisiológicas da nutrição. Nas diferentes fases da vida, na saúde e na doença**. Barueri, SP: Manole, 2013. cap. 42, p. 912-933.

MARTINS, A. R. **Efeitos da suplementação com óleo de peixe sobre a resistência à insulina e a função mitocondrial no músculo esquelético de camundongos alimentados com dieta hiperlipídica**. 2014. 141 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto Butantan, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

MAURY, E.; BRICHARD, S. M. Adipokine dysregulation, adipose tissue inflammation and metabolic syndrome. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 314, p. 1-16, jul. 2010.

MAZUMDER, P. M.; RATHINAVELUSAMY, P.; SASMAL, D. Role of antioxidants in phytomedicine with special reference to antidiabetic herbs. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, v. 2, supl. 2, p. S969-S979, 2012.

MOGHADAMTOUSI, S. Z.; FADAEINASAB, M.; NIKZAD, S.; MOHAN, G.; ALI, H. M.; KADIR, H. A. *Annona muricata* (Annonaceae): A review of its traditional uses, isolated acetogenins and biological activities. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 7, p. 15625–15658, jul. 2015.

MORAIS, C. M. **Avaliação das alterações inflamatórias e funcionais do pulmão no curso da pancreatite aguda experimental induzida por ceruleína**. 2013. 71 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2013.

MOURA, E. G.; OLIVEIRA, E. Regulação do comportamento alimentar. In: SAWAYA, A. A. L.; LEANDRO, C. G. WAITZBERG, D. L. (Org.). **Fisiologia da Nutrição na saúde e na doença: da biologia molecular ao tratamento**. São Paulo: Editora Atheneu, 2013. cap. 5, p. 95-110.

NASCIMENTO, C. O.; RIBEIRO, E. B.; OYAMA, L. M. Obesidade, adipocinas e mecanismos inflamatórios. In: SAWAYA, A. A. L.; LEANDRO, C. G. WAITZBERG, D. L. (Org.). **Fisiologia da Nutrição na saúde e na doença: da biologia molecular ao tratamento**. São Paulo: Editora Atheneu, 2013. cap. 24, p. 425-434.

NASCIMENTO, T. B.; GAZEL FILHO, A. B.; SANTOS, J. A. S. Fenologia da graviroleira (*Annona muricata*) em área de cerrado do Amapá, Brasil. **Acta Amazônica**, v. 32, n. 3, p. 367-376, abr. 2002.

NAVES, A. Fisiopatologia e Regulação Funcional da Obesidade. In: SILVA, S. M. C. S.; MURA, J. D. P. (Org.). **Tratado de alimentação, nutrição e dietoterapia**. 2. ed. São Paulo: Roca, 2010. cap. 37, p. 655-674.

NAWWAR, M.; AYOUB, N.; HUSSEIN, S.; HASHIM, A.; EL-SHARAWY, R.; WENDE, K.; HARMS, M.; LINDEQUIST, U. Flavonol triglycoside and investigation of the antioxidant and cell stimulating activities of *Annona muricata* linn. **Archives of Pharmacal Research**, v. 35, n. 5, p. 761-767, may 2012.

NEGRI, M. L. S.; POSSAMAI, J. C.; NAKASHIMA, T. Atividade antioxidante das folhas de espinheira-santa - *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss., secas em diferentes temperaturas. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 2B, p. 553-556, abr./jun. 2009.

NEKOHASHI, M.; OGAWA, M.; OGIHARA, T.; NAKAZAWA, K.; KATO, H.; MISAKA, T.; ABE, K.; KOBAYASHI, S. Luteolin and quercetin affect the cholesterol absorption mediated by epithelial cholesterol transporter niemann–pick c1-like 1 in caco-2 cells and rats. **Plos One**, v. 9, n. 5, may 2014.

NELSON, L. D.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.

NERY, C. S.; PINHEIRO, I. L.; MUNIZ, G. S.; VASCONCELOS, D. A. A.; FRANÇA, S. P.; NASCIMENTO, E. Medidas murinométricas e eficiência alimentar em ratos provenientes de ninhadas reduzidas na lactação e submetidos ou não ao exercício de natação. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 17, n. 1, p. 49-55, feb. 2011.

OECD. ORGANIZATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. **Guidelines. 425: Acute Oral Toxicity: Up-and-Down Procedure**, OECD, Paris, 2008. 27p.

OLIVEIRA, J. E. P.; VENCIO, S. (org.). **Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes (2015-2016)** - São Paulo: A.C. Farmacêutica, 2016.

PANCHAL, S. K.; BROWN, L. Rodent Models for Metabolic Syndrome Research. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, v. 2011, p.1-14, dec. 2011

PASINI, G. D. **Avaliação pancreática de animais submetidos à dieta hiperlipídica**. 2012. 78 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2012.

PATEL, D. K.; KUMAR, R.; LALOO, D.; HEMALATHA, O. S. Natural medicines from plant source used for therapy of diabetes mellitus: An overview of its pharmacological aspects. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, v. 2, n. 3, p. 239-250, mar. 2012.

PATRÍCIO, P. R. **A expressão da proteína de transferência de colesterol éster (CETP) modula a adiposidade e a expressão de genes envolvidos em lipólise e lipogênese**. 2010. 113 f. Tese (Doutorado em Biologia Funcional e Molecular) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2010.

PELUZIO, M. C. G. P.; ABRANCHES, M. V.; ROSA, D. D. Animais experimentais na pesquisa em nutrição. In: COSTA, N. M. B.; PELUZIO, M. C. G.; MARTINO, H. S. D.; HENRIQUES, G. S. **Nutrição Experimental: Teoria e Prática**, Rio de Janeiro: Editora Rubio, 2014. cap. 2, p. 25-45.

PEREIRA, S. S.; TEIXEIRA, L. G.; AGUILAR, E. C.; MATOSO, R. O.; SOARES, F.L. P.; FERREIRA, A. V. M.; ALVAREZ-LEITE, J. I. Differences in adipose tissue inflammation and oxidative status in C57BL/6 and ApoE^{-/-} mice fed high fat diet. **Animal Science Journal**, v. 83, n. 7, p. 549–555, jul. 2012.

PERESI, V. L. **Efeito da fibra dietética e do exercício físico de resistência na doença hepática gordurosa**. 2010. 95 f. Dissertação (mestrado em Fisiopatologia em Clínica Médica) – Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2010.

PORT'S, P. S. **Compostos fenólicos e potencial antioxidante de ervas consumidas na região amazônica brasileira**. 2011. 97 f. Dissertação (Mestrado em ciências dos alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2011.

PORT'S, P. S.; CHISTÉ, R. C.; GODOY, H. T.; PRADO, M. A. The phenolic compounds and the antioxidant potential of infusion of herbs from the Brazilian Amazonian region. **Food Research International**, v. 53, n. 2, p. 875-881 out. 2013.

PUBCHEM. **The PubChem project** <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>>. Acesso em: 25 fev. 2017

QUEIROZ, E. M.; CÂNDIDO, A. P. C.; CASTRO, I. M.; BASTOS, A. Q. A.; MACHADO-COELHO, G. L. L.; FREITAS, R. N. IGF2, LEPR, POMC, PPARG, and PPARGC1 gene variants are associated with obesity-related risk phenotypes in Brazilian children and adolescents. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 48, n. 7, p. 595-602, jul. 2015.

RANDLE, P. J.; GARLAND, P. B.; HALES, C. N.; NEWSHOLME, E. A. The glucose fatty-acid cycle. Its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. **Lancet**, v.1, n. 7285, p.785-789, apr. 1963.

REEVES, P. G.; NIELSEN, F. H.; FAHEY, G. C. JR. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. **Journal of Nutrition**, v. 123, n. 11, p. 1939-1951, nov. 1993.

RIBEIRO, S. M. L.T. **Avaliação de biomarcadores inflamatórios em mulheres adultas e idosas com sobrepeso/obesidade**. 2015. 89 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2015.

RIZZO, P. J. **Bioquímica da nutrição**. 2. ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2014.

RODRIGUES, P. A.; MORAIS, S. M.; SOUZA, C. M.; MAGALHÃES, D. V.; VIEIRA, Í. G. P; ANDRADE, G. M.; RAO, V. S.; SANTOS, F. A. Gastroprotective effect of Byrsonima sericea DC leaf extract against ethanol-induced gastric injury and its possible mechanisms of action. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 84, n. 1, p. 113-122, fev. 2012.

RUPASINGHE, H. P. V.; SEKHON-LOODU, S.; MANTSO, T.; PANAYIOTIDIS, M. I. Phytochemicals in regulating fatty acid β -oxidation: Potential underlying mechanisms and their involvement in obesity and weight loss. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 165, p. 153–163, set. 2016.

SACKS, F. M. The crucial roles of apolipoproteins E and C-III in apoB lipoprotein metabolism in normolipidemia and hypertriglyceridemia. **Current Opinion Lipidology**, v. 26, n. 1, p. 56–63, feb. 2015.

SALERNO, P. S. V. **Efeito da dieta de cafeteria em ratos submetidos ao Estresse Crônico Variado: análise de parâmetros bioquímicos e comportamentais**. 2014. 89 f. Dissertação (Mestrado em Nutrição e Alimentos) - Faculdade de Nutrição, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2014.

SANTOS, S. H. S.; FERNANDES, L. R.; MARIO, E. G.; FERREIRA, A. V. M.; PÔRTO, L. C. J.; ALVAREZ-LEITE, J. I.; BOTION, L. M.; BADER, M.; ALENINA, N.; SANTOS, R. A. S. Mas deficiency in FVB/N mice produces marked changes in lipid and glycemic metabolism. **Diabetes**, v. 57, n. 2, p. 340-347, 2008.

SANTOS, L. C.; TORRENT, I. F. O tecido adiposo e a produção de adipocinas **Revista Digital FAPAM**, v. 2, n. 2, p. 10-119, nov. 2010.

SCHILD, B. Z; SANTOS, L. N.; ALVES, M. K. Doença hepática gordurosa não alcoólica e sua relação com a síndrome metabólica no pré-operatório de pacientes submetidos à cirurgia bariátrica. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 59, n. 2, p.155-160, mar./abr. 2013.

SCHMID, H.; BRENNER, G. M. B, CHAGAS, J. K. C. Fisiopatologia da Síndrome metabólica. In: GOSTTSCHALL, C. B. A.; BUSNELLO, F. M. (Org.). **Nutrição e síndrome metabólica**. São Paulo: Editora Atheneu, 2009. cap. 1, p. 3-18.

SHIN, J. A.; JEONG, S. I.; KIM, M.; YOON, J. C.; KIM, H-S.; PARK, E-M. Visceral adipose tissue inflammation is associated with age-related brain changes and ischemic brain damage in aged mice. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 50, p. 221-231, nov. 2015.

SILVA, É. R. S.; SALMAZZO, G. R.; ARRIGO, J. S.; OLIVEIRA, R. J.; KASSUYA, C. A. L.; CARDOSO, C. A. L. Anti-inflammatory Evaluation and Toxicological Analysis of *Campomanesia xanthocarpa* Berg. **Inflammation**, v. 39, n. 4, p. 1462-1468, aug. 2016.

SILVA, F. R.; ANTUNES, R. M. P.; CATÃO R. M. R. Avaliação da atividade antibacteriana de extratos de *Annona Muricata* L. (annonaceae). **Revista de Biologia e Farmácia**, v. 06, n. 2, p. 27-36, 2011.

SILVA, G. H., ESCANHOELA, C. A. F. Doença hepática gordurosa não alcoólica: patogênese e achados histológicos com ênfase nas alterações mitocondriais. **Revista de Ciências Médicas**, v. 18. n. 5/6, p. 269-279, set./dez. 2009.

SILVEIRA, L. R.; FIAMONCINI, J.; HIRABARA, S. M.; PROCOPIO, J.; CAMBIAGHI, T. D.; PINHEIRO, C. H.; LOPES, L. R.; CURI, R. Updating the effects of fatty acids on skeletal muscle. **Journal of Cellular Physiology**, v. 217, n. 1, p. 1-12, oct. 2008.

SIMÃO, A. A. **Composição química, eficácia e toxicidade de plantas medicinais utilizadas no tratamento da obesidade**. 2013. 182 f. Tese (Doutorado em agroquímica) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2013.

SIQUEIRA, A. F. A.; ABDALLA, D. S. P.; FERREIRA, S. R. G. LDL: da síndrome metabólica à instabilização da placa aterosclerótica. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 50, n. 2, p. 334-343, abr. 2006.

SOARES, F. L. P. **Efeitos e mecanismos de ação da exclusão dietética de glúten de trigo na obesidade e resistência à insulina experimentais**. 2012. 104 f. Tese (Doutorado em Bioquímica e Imunologia) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2012.

SOUZA, G. A. **Efeitos da *Annona Muricata* (Graviola) e de seu componente β -sitosterol, sobre adiposidade abdominal, resposta glicêmica, metabolismo basal, estresse oxidativo e metabolismo energético no miocárdio de ratos submetidos à obesidade experimental**. 2010. 80 f. Dissertação (Mestrado em clínica médica) - Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual de São Paulo, Botucatu, 2010.

SPALDING, K. L.; ARNER, E.; WESTERMARK, P. O.; BERNARD, S.; BUCHHOLZ, B. A.; BERGMANN, O.; BLOMQVIST, L.; HOFFSTEDT, J.; NÄSLUND, E.; BRITTON, T.; CONCHA, H.; HASSAN, M.; RYDÉN, M.; FRISÉN, J.; ARNER, P. Dynamics of fat cell turnover in humans. **Nature**, v. 453, n. 7196, p. 783-787, maio 2008.

TAYLOR, J. R.; DIETRICH, E., POWELL, J. Lorcaserin for weight management. **Diabetes Metabolic Syndrome and Obesity**, v. 6, p. 209-216, jun. 2013.

TAYLOR, L. Technical Data Report on Graviola (TDRG). *Annona muricata*. **Sage Press. Austin**, p. 1-52, 2005.

TEIXEIRA, L. G. **Chá branco (*Camellia sinensis*) diminui estresse oxidativo e trigliceridemia em camundongos com obesidade induzida por dieta hiperlipídica**. 2010. 145 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Imunologia) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2010.

TEIXEIRA, H. M.; RIBAS-FILHO, J. M.; NASSIF, P. A. N.; DIETZ, U. A.; HENRIQUES, G. S.; AOKI, S.; PIZZOL, F. D. Avaliação morfométrica da mucosa do intestino grosso após derivação jejunoileal em ratos. **ABCD –**

Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva, v. 9, n. 4, p. 140-145, out./dez. 2006.

UM, S. H.; D'ALESSIO, D.; THOMAS, G. Nutrient overload, insulin resistance, Review and ribosomal protein S6 kinase 1, S6K1. **Cell Metabolism**, v. 3, n. 6, p. 393–402, jun. 2006.

VALE, M. I. C. A.; LISBOA, P. C. Papel do tecido adiposo no controle do armazenamento de energia e na composição corporal. In: SAWAYA, A. AL.; LEANDRO, C. G.; WAITZBERG, D. L. **Fisiologia da Nutrição na saúde e na doença: da biologia molecular ao tratamento**. São Paulo: Editora Atheneu, 2013. cap. 10, p. 199-211

VITOLO, M. R. Avaliação nutricional da criança. In: _____. **Nutrição: da gestação ao envelhecimento**. Rio de Janeiro: Editora Rubio, 2008. cap. 20, p. 171-189.

YAMAZAKI, R. K. **Efeito da suplementação com óleo de peixe sobre o metabolismo de glicose e lipídeos em ratos obesos**. 2010. 81 f. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.

YANG, Y.; ZHANG, Z.; LIA, S.; Yeb, X.; LIC, X.; HEA, K. Synergy effects of herb extracts: Pharmacokinetics and pharmacodynamic basis. **Fitoterapia**, v. 92, p.133-147, jan. 2014

YE, J. Mechanisms of Insulin Resistance in Obesity. **Frontiers of medicine**, v. 7, n. 1, p 14-24, fev. 2013.

WANG, H.; XUE, Y.; WANG, B.; ZHAO, J.; YAN, X.; HUANG, Y.; DU, M.; ZHU, M. J. Maternal obesity exacerbates insulinitis and type I diabetes in non-obese diabetic (NOD) mice. **Reproduction**, v. 148, n. 1, p. 73-79, jul. 2014.

WATTS, G. F.; OOI, E. M. M.; CHAN, D. C. . Demystifying the management of hypertriglyceridaemia. **Nature Reviews Cardiology**, v. 10, p. 648–661, set. 2013.

WEINSIER, R. L.; HUNTER, G. R.; HEINI, A. F.; GORAN, M. I.; SELL, S. M. The etiology of obesity: relative contribution of metabolic factors, diet, and physical activity. **The American Journal of Medicine**, v. 105, n. 2, p. 145-150, aug. 1998.

WHITE, P. A. S.; CERCATO, L. M.; ARAÚJO, J. M. D.; SOUZA, L. A.; SOARES, A. F.; BARBOSA, A. P. O.; NETO, J. M. R.; MARÇAL, A. C.; MACHADO, U. F.; CAMARGO, E. A.; SANTOS, M. R. V.; BRITO, L. C. Modelo de obesidade induzida por dieta hiperlipídica e associada à resistência à ação da insulina e intolerância à glicose. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 57, n. 5, p. 339-345, 2013

WHITE, P. A.; CERCATO, L. M.; BATISTA, V. S.; CAMARGO, E. A.; DE LUCCA W. JR.; OLIVEIRA, A. S.; SILVA, F. T.; GOES, T. C.; OLIVEIRA, E. R.; MORAES, V. R.; NOGUEIRA, P. C.; OLIVEIRA E SILVA, A. M.; QUINTANS-JUNIOR, L. J.; LIMA, B. S.; ARAÚJO, A. A.; SANTOS, M. R. Aqueous extract of *Chrysobalanus icaco* leaves, in lower doses, prevent fat gain in obese high-fat fed mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 179; p. 92-100, feb. 2016.

WILLIAMSON, E. M. Synergy and other interactions in phytomedicines. **Phytomedicine**, v. 8, n. 5, p.401-409, set. 2001.

WOLEVER, T. M. S.; GIBBS, A. L.; CHIASSON, J.-L.; CONNELLY, P. W.; JOSSE, R. G.; LEITER, L. A.; MAHEUX, P.; RABASA-LHORET, R.; RODGER, N. W.; RYAN, E. A. Altering source or amount of dietary carbohydrate has acute and chronic effects on postprandial glucose and triglycerides in type 2 diabetes: Canadian trial of Carbohydrates in Diabetes (CCD). **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases**, v. 23, n. 3, p. 227–234, mar. 2013.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Estadísticas sanitarias mundiales 2012**. Geneva: WHO, 2012. 176p.

_____. **Global action plan for the prevention and control of noncommunicable diseases 2013-2020**. Geneva: WHO, 2013. 103p.

_____. **Global status report on noncommunicable diseases 2014**. Geneva: WHO, 2014. 302 p.

_____. **Obesity: preventing and managing the global epidemic**. report of a World Health Organization Consultation. Geneva: WHO, 2000. 253p.

_____. **World health statistics 2016: monitoring health for the SDGs, sustainable development goals**. Geneva: WHO, 2016c. 121p.

_____. **Fact files: 10 facts on obesity**. Disponível em: <<http://www.who.int/features/factfiles/obesity/facts/en>>. Acesso em: 01 out. 2016d

_____. **Obesity and overweight**. Fact sheet. Updated June 2016. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>>. Acesso em: 01 out. 2016a

_____. **The world medicines situation 2011**: traditional medicines: global situation, issues and challenges. Geneva: WHO, 2011. 12p.

WU, T.; TANG, Q.; GAO, Z.; YU, Z.; SONG, H.; ZHENG, X.; CHEN, W. Blueberry and mulberry juice prevent obesity development in C57BL/6 mice. **Plos One**, v. 8, n. 10, oct. 2013.

**ANEXO A – CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE
ANIMAIS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL-
UFMS**



Serviço Público Federal
Ministério da Educação
Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UFMS



C E R T I F I C A D O

Certificamos que o projeto intitulado "Efeitos do extrato aquoso de folhas da graviola (*Annoma muricata* Linn) em camundongos com síndrome metabólica", Protocolo nº 682/2015 sob a responsabilidade de **Karine de Cássia Freitas Gielow** - que envolve a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata, para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul/UFMS, em reunião ordinária do dia 26 de maio de 2015.

Vigência do Projeto	01/08/2015 a 01/03/2017
Espécie/Linhagem ou Raça	<i>Mus musculus</i> / C57 BL/6 <i>Rattus norvegicus</i> / Wistar
Números de Animais	60 10
Peso/Idade	20 - 40g/12 semanas 12 semanas
Sexo	Macho Fêmea
Origem (fornecedor)	Biotério Central/CCBS/UFMS

M. Araújo
Maria Araújo Teixeira

Coordenadora da CEUA/UFMS
Campo Grande, 27 de maio de 2015.

Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA
<http://www.propp.ufms.br/ceua>
ceua.2000@gmail.com
fone (67) 3345-7186

**APÊNDICE A - TESTE HIPOCRÁTICO: TOXICIDADE DE DROGAS POR
ANÁLISE COMPORTAMENTAL**

Exemplo								
Droga: EAG Dose: 420 mg volume da gavagem: 1 mL Hora da gavagem:. 11:00h Data: 22/02/2016 Caixa: 04 Animal: 1 Peso: 210.g Data de nascimento: 12/12/2015								
Sintomas	Normal	Tempo						
		0	30 m	1,0 h	2,0 h	3,0 h	4,0 h	6,0 h
Aparência Normal	4	4	4	4	4	4	4	4
Frênico vocal	0	0	0	0	0	0	0	0
Irritabilidade	0	0	0	0	0	0	0	0
Resposta ao toque	4	4	4	4	4	4	4	4
Aperto da Cauda	4	4	4	4	4	4	4	4
Contorção	0	0	0	0	0	0	0	0
Trem posterior	0	0	0	0	0	0	0	0
Endireitamento	4	4	4	4	4	4	4	4
Tônus muscular	4	4	4	4	4	4	4	4
Força de agarrar	4	4	4	4	4	4	4	4
Ataxia	0	0	0	0	0	0	0	0
Reflexo auricular	4	4	4	4	4	4	4	4
Reflexo corneal	4	4	4	4	4	4	4	4
Tremores	0	0	0	0	0	0	0	0
Convulsões	0	0	0	0	0	0	0	0
Estimulações	4	4	4	4	4	4	4	4
Straub	0	0	0	0	0	0	0	0
Hipnose	0	0	0	0	0	0	0	0
Anestesia	0	0	0	0	0	0	0	0
Lacrimação	0	0	0	0	0	0	0	0
Ptose	0	0	0	0	0	0	0	0
Micção	4	4	4	4	4	4	4	4
Piloereção	0							
Defecação	4	4	4	4	4	4	4	4
Hipotermia	0							
Respiração	4	4	4	4	4	4	4	4
Cianose	0	0	0	0	0	0	0	0
Morte		0	0	0	0	0	0	0

Notas:

- Teste com anotação normal "0", a intensidade do efeito varia na escala de 1 à 4.
- Teste com anotação normal "4", a intensidade do efeito poderá variar de 0 à 3 quando ocorrer diminuição, 4 quando igual ao controle e de 5 à 8 quando ocorrer aumento.

Fonte: Adaptado (MALONE; ROBICHAUD, 1962)

APÊNCIDE B – RESULTADOS DO TESTE DE TOXICIDADE AGUDA

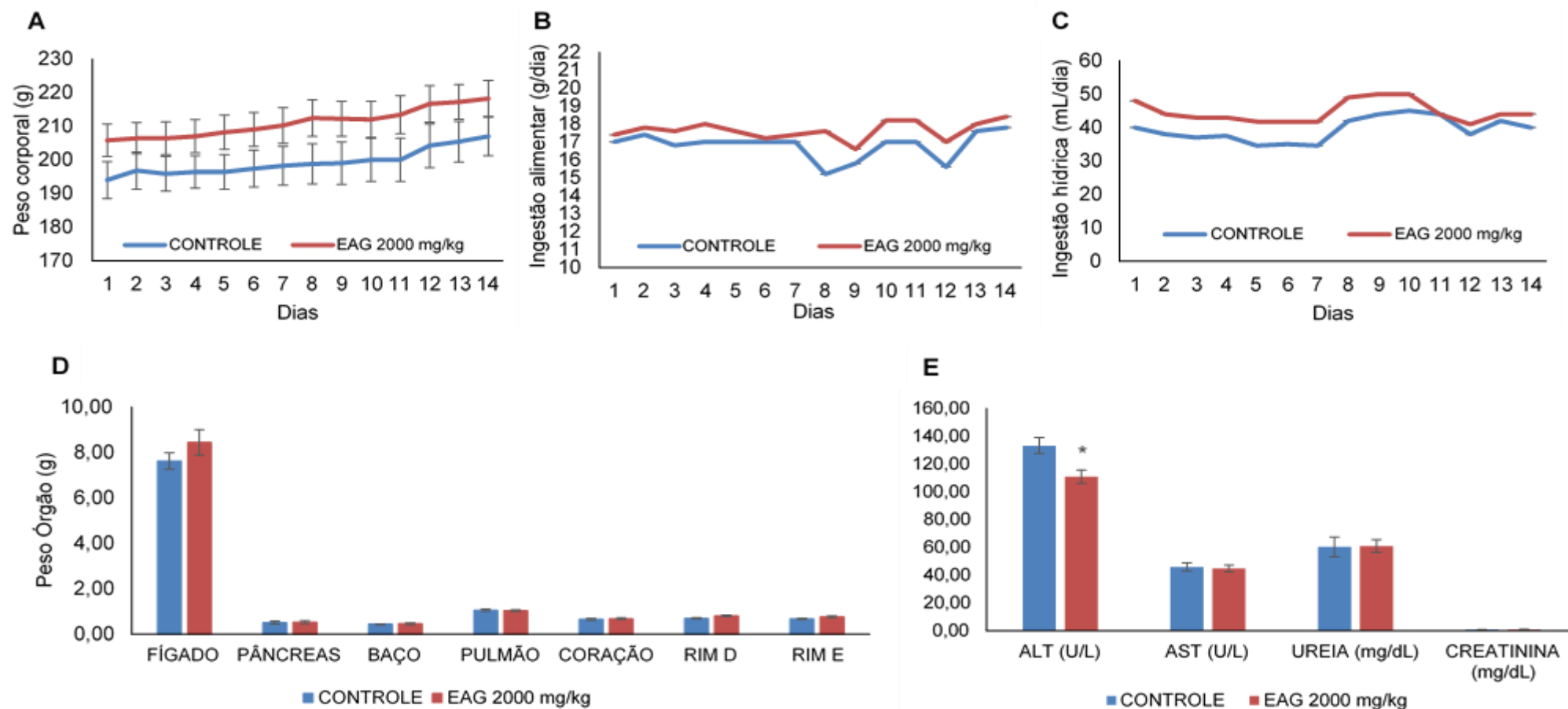


Gráfico – Teste de toxicidade aguda **(A)** Peso Corporal (g); **(B)** Ingestão alimentar (g/dia); **(C)** Ingestão hídrica (g/dia); **(D)** Peso de órgãos (g); **(E)** Análises bioquímicas séricas de animais controles e tratados com extrato aquoso das folhas de graviola (EAG) na dose de 2000 mg/kg por 14 dias. Os valores representam a média $\pm$ erro padrão da média. * $p \leq 0,05$ vs SHAM CONTROLE. Teste t de Student.