



UNIVERSIDADE REGIONAL DO CARIRI
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA BIOLÓGICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOPROSPECÇÃO MOLECULAR
MESTRADO ACADÊMICO EM BIOPROSPECÇÃO MOLECULAR

INFLUÊNCIA DA ADMINISTRAÇÃO DO ÓLEO FIXO DA POLPA DE
***Caryocar coriaceum* WITTM. SOBRE PARAMETROS BIOQUÍMICOS E**
HISTOPATOLÓGICOS DE RATOS

PATRÍCIA ROSANE LEITE DE FIGUEIREDO

CRATO – CE

2012

PATRÍCIA ROSANE LEITE DE FIGUEIREDO

**INFLUÊNCIA DA ADMINISTRAÇÃO DO ÓLEO FIXO DA POLPA DE
Caryocar coriaceum WITTM. SOBRE PARAMETROS BIOQUÍMICOS E
HISTOPATOLÓGICOS DE RATOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioprospecção Molecular da Universidade Regional do Cariri como requisito parcial para obtenção de título de mestre em Bioprospecção Molecular (Área de concentração: Bioprospecção de Produtos Naturais).

Orientadora:

Prof^ª. Dr^ª. Marta Regina Kerntopf

Co-orientador:

Prof. Dr. Cícero Francisco Bezerra Felipe

CRATO – CE

2012

Figueiredo, Patrícia Rosane Leite de.
F475i Influência da administração do óleo fixo da polpa de *Caryocar coriaceum* Wittm. sobre parâmetros bioquímicos e histopatológicos de ratos/ Patrícia Rosane Leite de Figueiredo. – Crato-CE, 2012.
148p.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioprospecção Molecular da Universidade Regional do Cariri – URCA.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Marta Regina Kerntopf

Co-orientador: Prof. Dr. Cícero Francisco Bezerra Felipe

1. *Caryocar coriaceum* Wittm; 2. Óleo de pequi; 3. Doenças cardiovasculares; 4. Dislipidemia; I. Título.

CDD: 581

Esta Dissertação foi submetida como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Bioprospecção Molecular / Área de Concentração em Bioprospecção de Produtos Naturais, outorgado pela Universidade Regional do Cariri, e encontra-se à disposição dos interessados na Biblioteca Central da referida Universidade.

A citação de qualquer trecho desta Dissertação é permitida, desde que seja feita de conformidade com as normas da ética científica.

Patrícia Rosane Leite de Figueiredo

Dissertação aprovada em: 25/10/2012

Examinadores:

Prof^ª. Dr^ª. Marta Regina Kerntopf – Orientadora
Universidade Regional do Cariri – URCA

Prof. Dr. Cícero Francisco Bezerra Felipe – Co-orientador
Universidade Federal da Paraíba – UFPB

Prof. Dr. Manassés Claudino Fonteles – Avaliador Externo
Universidade Estadual do Ceará– UECE

Prof. Dr. Irwin Rose Alencar de Menezes - Avaliador Interno
Universidade Regional do Cariri – URCA

*Dedico aos meus pais, **Josino Pereira de Figueiredo e Iraci Moreira Leite**, ao meu esposo **Tiago Norões Gomes**, por me apoiarem em todas as minhas escolhas e SEMPRE acreditarem em meus projetos. Ao meu filho **Tiago Norões Gomes Filho** com todo amor desta vida.*

AGRADECIMENTOS

À **Deus**, inteligência suprema e causa primária de todas as coisas. Obrigada Senhor por me dar forças quando precisei, por guiar e iluminar meus caminhos.

A toda minha família, especialmente meus irmãos, **Josino Pereira de Figueiredo Junior, Dayse Rafaella Leite de Figueiredo, Kelly Rejane Leite de Figueiredo**. Por serem meus maiores incentivadores mesmo diante das adversidades, compartilhando alegrias e tristeza. Ofertaram-me, por mais profundo amor, a vida que construí respaldada pelos ensinamentos, aos quais conduzo minha vida.

A minha orientadora, **Profa. Dra. Marta Regina Kerntopf**, tenho eterna gratidão pelos valiosos conhecimentos, dedicação, pela sapiência peculiar e oportuna.

Ao meu co-orientador, **Prof. Dr. Cícero Francisco Bezerra Felipe** da Universidade Federal da Paraíba (UFPB), por ter se disponibilizado gentilmente, contribuindo sempre com seus conhecimentos e grande incentivo.

Aos professores: **Prof. Dr. Irwin Rose de Alencar Menezes** e **Prof. Dr. José Galberto Martins da Costa**, pela suma importância do auxílio e conhecimento transferido nesse trabalho, pelo encorajamento e pela amizade.

À professora **Profa. Dra. Glauce Socorro de Barros Viana** da Faculdade de Medicina de Juazeiro do Norte (FMJ), pela generosidade, pelas sugestões pertinentes e pela concessão de linhagens de roedores, imprescindíveis à plena execução do trabalho.

Aos coordenadores do Programa de Pós-graduação em Bios prospecção Molecular da Universidade Regional do Cariri (URCA), **Prof. Dr. Waltécio de Oliveira Almeida** e **Prof. Dr. Allysson Pontes Pinheiro**, pela ajuda incondicional.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Bios prospecção Molecular, em especial: **Prof. Dr. Álamo Feitosa Saraiva, Prof. Dr. Alexandre Magno Rodrigues Teixeira, Prof. Dr. Diniz Maciel de Sena Júnior, Prof. Dr. José Galberto Martins da Costa, Prof. Dr. Henrique Douglas Melo Coutinho, Prof. Dr. Irwin Rose Alencar de Menezes, Profa. Dra. Maria Arlene Pessoa, Profa. Dra. Marta Maria de Almeida Souza, Profa. Dra. Marta Regina Kerntopf, Profa. Dra. Imeuda Peixoto Furtado e Profa. Dra. Sirleis Rodrigues Lacerda, Prof. Dr. Waltécio de Oliveira Almeida**, pelos conhecimentos transmitidos!

A banca examinadora de qualificação **Prof. Dr. Henrique Douglas Melo Coutinho, Prof. Dr. Irwin Rose Alencar de Menezes e Prof. Dr. José Galberto Martins da Costa**; e a banca examinadora oficial **Prof. Dr. Manasses Claudino Fonteles, Prof. Dr. Cícero Francisco Bezerra Felipe e Prof. Dr. Irwin Rose Alencar de Menezes** pela nobreza dos conhecimentos.

Ao Herbário Caririense Dárdano de Andrade-Lima, coordenado pela **Profa. Dra. Maria Arlene Pessoa**, pela catalogação da exsicata e identificação botânica da espécie em estudo.

Aos colegas do Programa de Pós-graduação em Bioprospecção Molecular, pelo companheirismo, experiências compartilhadas e palavras de conforto nos momentos difíceis que compartilhamos juntos;

Às secretárias **Maria Andecieli Rolim de Brito** e **Maria Lenira Pereira**, pela solicitude!

Aos funcionários desta IES e FMJ, que mantiveram o ambiente seguro e agradável.

Aos amigos do mestrado, **Ana Luiza de Albuquerque Siebra**, **Anita Oliveira Brito Pereira**, **Daniele Oliveira de Souza** e **Luiz Jardelino de Lacerda Neto**, por tornarem os momentos mais divertidos e pela amizade, pela ajuda; orgulho-me em fazer parte dessa turma;

Ao amigo **João Hallisson Lemos Carvalho**, diretor executivo do Laboratório Vicente Lemos, pela qualidade e excelência na realização das análises bioquímicas.

Ao. **Raimundo Pires Maia**, médico patologista do Laboratório CEDIA pela importante colaboração nas análises histopatológicas,

Ao **Prof. Dr. Joel Boechat de Moraes Junior** pela ajuda no estudo histopatológico.

Ao **Labteste** pela doação de alguns reagentes bioquímicos.

A Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico – **FUNCAP**, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – **CNPq** e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoas de Nível Superior – **CAPES**, pelo suporte financeiro;

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para concretização desse estudo, meus sinceros agradecimentos.

*“Não basta dar os passos que nos devem levar
um dia ao objetivo, cada passo deve ser ele
próprio um objetivo em si mesmo, ao mesmo
tempo que nos leva para diante.”*

Johann Goethe

SUMÁRIO

LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS.....	XII
LISTA DE FIGURAS	XIV
LISTA DE TABELAS.....	XV
RESUMO	XX
ABSTRACT	XXI
CAPÍTULO 1	22
1. INTRODUÇÃO.....	23
1.1. Apresentação.....	23
1.2. Dislipidemias - generalidades.....	25
1.2.1. Lipídeos e Lipoproteínas	25
1.2.2. Ácidos graxos.....	28
1.2.3. Ciclo exógeno.....	30
1.2.4. Ciclo endógeno.....	30
1.2.5. Lp (a), Lipoproteínas Modificadas e LDL densas.....	33
1.2.6. Distúrbio no metabolismo lipídico	34
1.2.7. Dislipidemias Primárias.....	35
1.2.8. Dislipidemias Secundárias	36
1.2.9. Aterogênese.....	38
1.2.10. Inflamação, doenças cardiovasculares e dislipidemias.....	40
1.2.11. Avaliação laboratorial das dislipidemias	41
1.2.12. Metas terapêuticas e reavaliação do risco	43
1.2.13. Tratamento não medicamentoso das dislipidemias	44
1.2.13.1. Terapia nutricional da hipercolesterolemia	44
1.2.13.2. Atividade Física	46
1.2.14. Tratamento medicamentoso das dislipidemias	46

1.3. O tratamento da hipercolesterolemia com plantas medicinais	48
1.3.1. Mecanismo de ação dos constituintes hipolipemiantes de plantas medicinais	49
1.4. Considerações botânicas sobre <i>Caryocar coriaceum</i> Wittm: pequi do nordeste	49
1.5. Uso popular e atividades biológicas do pequi	53
1.6. Etnofarmacologia das espécies de <i>Caryocar</i>	54
CAPÍTULO 2	57
2.OBJETIVOS	58
2.1. Objetivo geral	58
2.2. Objetivos específicos.....	58
CAPÍTULO 3	60
3. MATERIAIS E MÉTODOS	60
3.1. Herborização e identificação do espécime botânico	60
3.2. Aspectos Éticos da Pesquisa	60
3.3. Estudo químico	60
3.3.1. Obtenção do Óleo Fixo do <i>Caryocar coriaceum</i>	60
3.3.2. Obtenção dos ácidos graxos e ésteres metílicos correspondentes.....	61
3.3.3. Identificação dos ésteres metílicos	62
3.4. Testes biológicos.....	62
3.4.1. Animais experimentais	62
3.4.2. Drogas e reagentes	63
3.4.3. Metodologia e princípios bioquímicos para avaliação dos perfis glicêmicos e lipídicos	64
3.4.4. Avaliação dos Efeitos do OFCC sobre os Parâmetros Bioquímicos Nos Soros de Ratos e no Ganho de Peso Corporal, após Tratamento por via oral (v.o.) durante 7, 15 e 30 dias.	68
3.4.5. Avaliação do potencial hipolipemiante do OFCC em modelos de hipertrigliceridemia induzida por Triton WR-1339 em ratos.....	69

3.4.6. Avaliação do efeito anti-inflamatório do OFCC com tratamento por via oral: edema de pata induzido por carragenina em ratos Wistar.....	70
3.4.7. Análise do potencial antioxidante <i>in vitro</i> : redução do radical DPPH (2,2 difenil picril hidrazila)	71
3.4.8 Análise do potencial anti-inflamatório <i>in vitro</i> : medida da liberação da mieloperoxidase	73
3.5 Análise Estatística	74
CAPÍTULO 4	75
4. RESULTADOS	76
4.1 Identificação e quantificação dos ácidos graxos do Óleo Fixo <i>Caryocar coriaceum</i> (OFCC).....	76
4.2. Avaliação da toxicidade sub-crônica	76
4.3. Estudo histopatológico hepático, aórtico e cardíaco de ratos Wistar depois do tratamento oral com Óleo Fixo <i>Caryocar coriaceum</i> (OFCC).....	83
4.4. Atividade Hipolipemiante do Óleo Fixo do <i>Caryocar Coriaceum</i> (OFCC) em Ratos Submetidos à Dislipidemia Induzida por Tiloxapol	86
4.5. Efeito do Óleo Fixo do <i>Caryocar coriaceum</i> (OFCC) no edema de pata induzido por carragenina – tratamento subcrônico por via oral durante 7, 15 dias e 30 dias.....	92
4.6 Efeito do Óleo Fixo <i>Caryocar coriaceum</i> (OFCC) na redução do radical DPPH (2,2 difenil picril hidrazila)	98
4.7 Efeito do Óleo Fixo <i>Caryocar coriaceum</i> (OFCC) na atividade da enzima mieloperoxidase (MPO).....	98
CAPÍTULO 5	100
5. DISCUSSÃO	101
CAPÍTULO 6	116
6. CONCLUSÃO	117
REFERÊNCIAS	118
ANEXOS	139
APÊNDICE	144

LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

ABCA-1 proteína de ligação ao ATP 1
ADP adenosina difosfato
AGL ácido graxo livre
AGCM ácido graxo de cadeia média
AGCL ácido graxo de cadeia longa
AGM ácido graxo monoinsaturado
ALT alanina aminotransferase
Apo apoproteína
AST aspartato aminotransferase
ATP adenosina trifosfato
AVC acidente vascular cerebral
CAM molécula de adesão celular
CEPT proteína de transferência do colesterol esterificado
CG/EM cromatografia gasosa acoplado a espectrometria de massas
COX ciclooxigenase
CT colesterol total
DA doença aterosclerótica
DAC doença arterial coronariana
DCV doenças cardiovasculares
DHA ácido docosahexaenóico
DM diabete melito
DMSO dimetilsulfóxido
DPPH 2,2 difenil picril hidrazila
En endocarpo
EPA ácido eicosapentaenóico
Ep epicarpo
FABP proteínas transportadoras de ácidos graxos
HAS hipertensão arterial sistêmica
HDL lipoproteína de alta densidade
HDL-c HDL colesterol
HMG-CoA 3-hidroxi, 3-metilglutaril coenzima A

13-HODE ácido 13-hidroxi-octadecaenoico
IDL lipoproteína de densidade intermediária
LCAT lecitina colesterol aciltransferase
LDL lipoproteína de baixa densidade
LDL ox lipoproteína de baixa densidade oxidada
LLP lipase lipoproteica
Lp lipoproteína
LXR receptor nuclear LXR
MCP proteínas quimiotáticas de monócitos
Me mesocarpo externo
MEV mudança de estilo de vida
Mi mesocarpo interno
MPO mieloperoxidase
MUFA ácidos graxos monoinsaturados
NCEP/ATP III Programa de Educação Nacional em Colesterol/ Painel de Tratamento em Adulto III.
NEFA ácidos graxos não esterificados
NO óxido nítrico
OFCC Óleo fixo do *Caryocar coriaceum*
PBS solução tampão fosfato salino
PMA 13 acetato forbol 12- miristato
PPAR- α receptor ativado por proliferadores de peroxissoma alfa
ROS espécie reativa de oxigênio
R-VLDL remanescente lipoproteína de muito baixa densidade
Se semente
TNF- α fator de necrose tumoral alfa
VLDL lipoproteína de muito baixa densidade

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1** – Estrutura das Lipoproteínas Formada por um Núcleo de Lipídios Hidrofóbicos (Colesterol e seus Ésteres, Triglicerídeos) e uma Camada Externa Composta de Fosfolipídios, Colesterol Livre e Apoproteínas 26
- FIGURA 2** – Representação Química dos Principais Lipídios Presentes no Plasma. (A) Notar a Longa Cadeia Carbônica Alifática e o Grupo Carboxila ($-\text{COOH}$) Em uma das Extremidades. Ácidos Graxos Saturados:Ácido Esteárico. Ácidos Graxos Monoinsaturados: Ácido Oleico. Ácidos Graxos Poli-Insaturados: Ácido Linoleico. (B) Triglicerídeos Formados por uma Molécula de Glicerol Unida por Ligação Éster a Três Ácidos Graxos.(C) Fosfolípidios Formados por Duas Cadeias ;,de Ácidos Graxos (D) Colesterol ($\text{C}_{27}\text{H}_{46}\text{O}$) Formado por 4 Anéis De Hidrocarbonetos Ligados a um Grupo Hidroxila e a uma Cauda de Hidrocarbonetos nas Extremidades 27
- FIGURA 3** – Metabolismo Endógeno e Exógeno dos Lipídeos e Lipoproteínas. Ciclo Exógeno: Absorção do Material Lipídico Proveniente da Alimentação, Síntese dos Qm, Captação pelos Linfáticos e Entrada na Circulação. Ciclo Endógeno: Síntese VLDL, Formação de IDL e VLDL Remanescentes, estas Absorvidas pelo Fígado e Transformadas em LDL. 31
- FIGURA 4** – Ciclo Reverso do HDL-c. Transporte do Colesterol Endógeno até o Fígado Via HDL, Excreção Via Ácidos Biliares, Liberação no Intestino para Emulsificar as Gorduras Absorvidas na Dieta 33
- FIGURA 5** – Árvore de *Caryocar coriaceum* Wittm (Pequi). Localizada numa área de cerrado da Chapada do Araripe. Crato-CE. Março de 2009. 51
- FIGURA 6** – Aspecto das Folhas, Frutos e Flor de *C. coriaceum* Wittm. A folha é trifoliolada e glabra (A e B). As flores (B) são amareladas, com estames avermelhados e reunidas em cachos terminais. Os frutos são drupáceos. Notar os aspectos externo (A e C) e interno (D, E e F, corte mediano sagital) dos frutos. Ep – epicarpo; Me – mesocarpo externo; Mi – mesocarpo interno (polpa); En – endocarpo (com acúleos ou espinhos); Se – semente (amêndoa) 52

- FIGURA 7** – Fluxograma de Obtenção do Óleo Fixo do *Caryocar coriaceum* (OFCC).). A polpa descascada manualmente, submetida a cozimento intensivo. O óleo secado com sulfato de sódio anidro. Rendimento: 1 litro de óleo/7400 g da polpa 61
- FIGURA 8** – Protocolo de Avaliação do Efeito do Óleo Fixo do *Caryocar coriaceum* (OFCC) na Dislipidemia Induzida por Tiloxapol..... 70
- FIGURA 9** – Níveis de aspartato aminotransferase (AST) de Ratos *Wistar* depois do Tratamento Oral por 7, 15 e 30 Dias nas Doses 2000 Mg/Kg/Dia, 1000 mg/Kg/dia e 500 mg/Kg/dia do OFCC (Óleo Fixo Do *Caryocar Coriaceum*) ou Salina 0,9% (0,1 mL/Kg). ... 78
- FIGURA 10** – Níveis de alanina aminotransferase (ALT) de Ratos *Wistar* depois do Tratamento Oral por 7, 15 e 30 dias nas Doses 2000 mg/Kg/dia, 1000 mg/Kg/dia e 500 mg/Kg/dia do OFCC (Óleo Fixo do *Caryocar coriaceum*) ou Salina 0,9% (0,1 mL/Kg). 79
- FIGURA 11** – Perfil Glicêmico de Ratos *Wistar* depois do Tratamento Oral por 7, 15 e 30 dias nas Doses 2000 mg/Kg/dia, 1000 mg/Kg/dia e 500 mg/Kg/dia do OFCC (Óleo Fixo do *Caryocar coriaceum*) ou Salina 0,9% (0,1 mL/Kg). 80
- FIGURA 12** – Níveis de Colesterol Total (CT) de Ratos *Wistar* depois do Tratamento Oral por 7, 15 e 30 dias nas Doses 2000 mg/Kg/dia, 1000 mg/Kg/dia e 500 mg/Kg/dia do OFⁱ (Óleo Fixo do *Caryocar coriaceum*) ou Salina 0,9% (0,1 mL/Kg). 81
- FIGURA 13** – Níveis de Triglicérides (TG) de Ratos *Wistar* depois do Tratamento Oral por 7, 15 e 30 dias nas Doses 2000 mg/Kg/dia, 1000 mg/Kg/dia e 500 mg/Kg/dia do OFCC (Óleo Fixo do *Caryocar coriaceum*) ou Salina 0,09% (0,1 mL/Kg). 82
- FIGURA 14** – Níveis de Colesterol HDL (HDL-c) de Ratos *Wistar* depois do Tratamento Oral por 7, 15 e 30 dias nas Doses 2000 mg/Kg/dia, 1000 mg/Kg/dia e 500 mg/Kg/dia do OFCC (Óleo Fixo do *Caryocar coriaceum*) ou Salina 0,09% (0,1 mL/Kg). 83
- FIGURA 15** – HE 40X - Coração histologicamente normal (Ventrículo esquerdo- a esquerda/Ventrículo direito - a direita). Tratamento com OFCC por 30 dias na dose de 2000 mg/Kg 84

- FIGURA 16** – HE 40X - Artéria histologicamente normal em corte longitudinal. Tratamento com OFCC por 30 dias na dose de 2000 mg/Kg. Ti= túnica íntima; Tm= túnica média; Ta= túnica adventícia 84
- FIGURA 17** – HE 400x - Fígado histologicamente normal. *Representação de espaço-porta no centro da figura. Tratamento com OFCC por 30 dias na dose de 2000 mg/Kg. Ah= ramo da artéria hepática; Vp= veia porta; Db= ducto bilífero; He= hepatócito; Si: sinusóide 85
- FIGURA 18** – HE 40X - Esteatose macrogoticular focal (*Em), a esquerda da veia centro-lobular hepática Tratamento com OFCC por 30 dias na dose de 2000 mg/Kg. Vcl= veia centro-lobular; Si= sinusóide; Hp= hepatócito. 85
- FIGURA 19** – Em (A), Observa-se o Efeito do Óleo Fixo do *Caryocar coriaceum* (OFCC) na Hipertrigliceridemia Induzida por Tiloxapol (400 mg/Kg) após 24 horas da Indução. No painel (B), Verifica-se o Efeito do Óleo Fixo do *Caryocar coriaceum* (OFCC) na Hipertrigliceridemia Induzida por Tiloxapol (Triton; 400 mg/Kg) após 48 horas da Indução, (n=10/grupo). 87
- FIGURA 20** – Em (A), Observa-se o Efeito do Óleo Fixo do *Caryocar coriaceum* (OFCC) na Hipercolesterolemia Induzida por Tiloxapol (400 mg/Kg) após 24 horas da Indução. No Painel (B), Verifica-se o Efeito do Óleo Fixo do *Caryocar coriaceum* (OFCC) Hipercolesterolemia Induzida por Tiloxapol (Triton; 400 mg/Kg) após 48 horas da Indução, (n=10/grupo). 89
- FIGURA 21** – Em (A), Observa-se o Efeito do Óleo Fixo do *Caryocar coriaceum* (OFCC) nos Níveis de HDL-c após 24 horas da Indução por Tiloxapol (400 mg/Kg). No Painel (B), Verifica-se o Efeito do Óleo Fixo do *Caryocar coriaceum* (OFCC) nos Níveis de HDL-c após 48 horas da Indução por Tiloxapol (Triton; 400 mg/Kg), (n=10/grupo). 91
- FIGURA 22** – Curva tempo-resposta do efeito do OFCC por 7 dias sobre o edema de pata induzido por carragenina em ratos *Wistar*. Durante período de 15 dias, os animais foram tratados com doses de OFCC 2000, 1000 e 500 mg/Kg e com salina a 0,9%. Após tratamento, foi administrada salina, indometacina ou OFCC nas doses 2000, 1000, 500 mg/kg e após 1 hora, receberam a administração intraplantar de carragenina... 93
- FIGURA 23** – Curva tempo-resposta do efeito do OFCC por 15 dias sobre o edema de pata induzido por carragenina em ratos *Wistar*. Durante período de 15 dias, os animais foram

tratados com doses de OFCC 2000, 1000 e 500 mg/Kg e com salina a 0,9%. Após tratamento, foi administrada salina, indometacina ou OFCC nas doses 2000, 1000, 500 mg/kg e após 1 hora, receberam a administração intraplantar de carragenina... 95

FIGURA 24 – Curva tempo-resposta do efeito do OFCC por 30 dias sobre o edema de pata induzido por carragenina em ratos *Wistar*. Durante período de 15 dias, os animais foram tratados com doses de OFCC 2000, 1000 e 500 mg/Kg e com salina a 0,9%. Após tratamento, foi administrada salina, indometacina ou OFCC nas doses 2000, 1000, 500 mg/kg e após 1 hora, receberam a administração intraplantar de carragenina... 97

FIGURA 25 – Efeito do Óleo Fixo do *Caryocar coriaceum* (OFCC; 1, 10, 50, 100 e 200 µg/mL), sobre a Atividade da Enzima Mieloperoxidase (MPO). Animais tratados com o veículo (DMSO – 1% em água) e indometacina (35,7 µg/mL, fármaco padrão). Os valores estão expressos percentagem (%) ± padrão da média (E.P.M.). 99

FIGURA 26 – HE 40X Coração histologicamente normal (ventrículo esquerdo (*Ve)/ventrículo direito (*Vd)). (A) Controle (B) 2000mg/dL (C) 1000 mg/dL (D) 500 mg/dL 146

FIGURA 27 – HE 400x – *Representação de espaço-porta hepático. Ah= artéria hepática; Vp= veia porta; Db= ducto bilífero; He= hepatócito; Vcl= veia centro-lobular; Esteatose macrofocular focal (*Em). (A) Controle (B) 2000mg/dL (C) 1000 mg/dL (D) 500 mg/dL. 147

FIGURA 28 – HE 40x – Artéria histologicamente normal em corte longitudinal. Ti= túnica íntima; Tm= túnica média; Ta= túnica adventícia. (A) Controle (B) 2000mg/dL (C) 1000 mg/dL (D) 500 mg/dL. 148

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Características das Principais Lipoproteínas	28
TABELA 2 – Classificação Fenotípica das Dislipidemias Primárias (Fredrickson), segundo a Expressão Clínico-Laboratorial	37
TABELA 3 – Principais causas das dislipidemias primárias e sua incidência na população .	38
TABELA 4 – Classificação dos Níveis de Lipídios Plasmáticos em Adultos, segundo o NCEP/ATP III	42
TABELA 5 – Meta dos Lipídeos para Pacientes com Alto Risco de Doença Arterial Coronariana	43
TABELA 6 – Percentual de ácidos graxos saponificáveis no óleo fixo da polpa do <i>C. coriaceum</i> e <i>C.brasiliense</i>	56
TABELA 7 – Grupos Experimentais Selecionados para Avaliação dos Efeitos nos Parâmetros Bioquímicos, após Tratamento oral com OFCC, durante 7, 15 e 30 dias.....	68
TABELA 8 – Grupos Experimentais Selecionados para a Verificação do Óleo Fixo do <i>Caryocar coriaceum</i> (OFCC) na Dislipidemia Induzida por Tiloxapol (n=10/cada grupo) ...	69
TABELA 9 – Constituintes Químicos Identificados no Óleo da Polpa de <i>C. coriaceum</i>	76
TABELA 10 – Ganho de Peso Corporal de Ratos, ao fim de 7 dias de Tratamento com OFCC nas Doses de 2000 mg/Kg, 1000 mg/Kg e 500 mg/Kg.....	77
TABELA 11 – Ganho de Peso Corporal de Ratos, ao Fim de 15 dias de Tratamento com OFCC nas Doses de 2000 mg/Kg, 1000 mg/Kg e 500 mg/Kg.....	77
TABELA 12 – Ganho de Peso Corporal de Ratos, ao Fim de 30 dias de Tratamento com OFCC nas Doses de 2000 mg/Kg, 1000 mg/Kg e 500 mg/Kg.....	77
TABELA 13 – Avaliação dos Efeitos Sobre os Parâmetros Bioquímicos nos Soros de Ratos e no Ganho de Peso Corporal, após Tratamento por via oral (v.o.) com Óleo Fixo <i>Caryocar coriaceum</i> (OFCC) Durante 7 dias	144

TABELA 14 – Avaliação dos Efeitos Sobre os Parâmetros Bioquímicos nos Soros de Ratos e no Ganho de Peso Corporal, após Tratamento por via oral (v.o.) com Óleo Fixo <i>Caryocar coriaceum</i> (OFCC) Durante 15 dias	144
TABELA 15 – Avaliação dos Efeitos Sobre os Parâmetros Bioquímicos nos Soros de Ratos e no Ganho de Peso Corporal, após Tratamento por via oral (v.o.) com Óleo Fixo <i>Caryocar coriaceum</i> (OFCC) durante 30 dias	144
TABELA 16 – Avaliação do Potencial Hipolipemiante do Óleo Fixo do <i>Caryocar coriaceum</i> (OFCC) em Modelos de Hipertrigliceridemia Induzida por Triton WR-1339 em Camundongos	145

RESUMO

INFLUÊNCIA DA ADMINISTRAÇÃO DO ÓLEO FIXO DA POLPA DE *Caryocar coriaceum* WITTM. SOBRE PARAMETROS BIOQUÍMICOS E HISTOPATOLÓGICOS DE RATOS

Caryocar coriaceum Wittm., conhecida popularmente como pequi, é encontrada no sul do Estado do Ceará, exercendo importante papel socioeconômico na Chapada do Araripe. Seu fruto é usado como alimento e na medicina popular, como anti-inflamatório e cicatrizante. As doenças cardiovasculares (DCV) constituem a principal causa de morbi-mortalidade entre os adultos ocidentais. Os fatores de risco para o seu desenvolvimento são hipertensão arterial, tabagismo, dislipidemia e diabetes tipo 2. A substituição isocalórica da dieta dos ácidos graxos saturados por ácidos graxos poli-insaturados tem potencial efeito cardioprotetor. Dentro deste contexto, o trabalho tem com objetivos avaliar os efeitos do óleo fixo do *Caryocar coriaceum* (OFCC) em parâmetros bioquímicos e histopatológicos de roedores. A análise dos ésteres metílicos do OFCC através de CG/EM identificou a presença dos ácidos graxos insaturados (64,2%) como componente majoritário. O tratamento com dose elevadas (2000, 1000 e 500 mg/Kg) durante 7, 15 e 30 dias não revelou alterações no peso dos animais e nas transaminases. Porém com o tratamento de 30 dias, observou-se aumento na glicose nas doses de 2000 mg/Kg e 1000 mg/Kg/, além de esteatose hepática macrogoticular na dose de 2000 mg/Kg. Os níveis de colesterol T e triglicerídeos reduziram no tratamento por 30 dias na dose de 2000 mg/Kg . O tratamento com o OFCC durante 15 e 30 dias aumentou significativamente os níveis HDL-c nas doses de 2000 mg/Kg/dia, 1000 mg/Kg/dia e 500 mg/Kg/dia. Os valores séricos de colesterol total e triglicerídeos reduziram a níveis semelhantes ao controle gemfibrozila, tanto nas primeiras 24 horas, como depois de 48 horas da indução da dislipidemia com Tiloxapol. E na dose de 1000 mg/Kg, houve aumento significativo do HDL-c. O tratamento por via oral do OFCC durante 7, 15 e 30 dias reduziu significativamente o edema de pata induzido por carragenina em todas as doses estudadas. Foi demonstrada atividade antioxidante do *Caryocar coriaceum* avaliada pelo método de DPPH (2,2-difenil-1-picril hidrazila), com IC50 de 20,1 µ/mL. OFCC reduziu a atividade da enzima mieloperoxidase (MPO), nas concentrações de de 1 µg/mL e 0,1 µg/mL, semelhante a indometacina. Este trabalho não revelou toxicidade sub-crônica em doses elevadas nos parâmetros avaliados, além de evidenciar atividade anti-inflamatória e anti-oxidante do OFCC. Sendo o primeiro trabalho a relatar uma provável atividade hipolipemiante e hipotriglicéridica da espécie *coriaceum*, que lhe confere potencialidades farmacológicas no tratamento das doenças cardiovasculares.

Palavras chaves: *Caryocar coriaceum* Wittm, óleo de pequi, doenças cardiovasculares, dislipidemia, ácidos graxos monoinsaturados, inflamação.

ABSTRACT

INFLUENCE OF DIRECTORS OF FIXED OIL OF PULP *Caryocar coriaceum* WITTM. ON BIOCHEMICAL AND HISTOPATHOLOGICAL PARAMETERS OF RATS

Caryocar coriaceum Wittm., Popularly known as pequi, is found in the southern state of Ceara, playing an important socioeconomic role in the Araripe Region. Its fruit is used as food and in folk medicine as anti-inflammatory and healing. Cardiovascular diseases (CVD) are the leading cause of morbidity and mortality among adults Westerners. Risk factors for its development are hypertension, smoking, dyslipidemia and type 2 diabetes. The isocaloric replacement of dietary saturated fatty acids with polyunsaturated fatty acids have potential cardioprotective effect. Within this context, the work is for purposes of evaluating the effects of the fixed oil *Caryocar coriaceum* (OFCC) in biochemical and histopathological parameters of rodents. The analysis of the methyl esters of OFCC by GC / MS identified the presence of unsaturated fatty acids (64,2%) as the major component. The treatment with high dose (2000, 1000 and 500 mg / kg) for 7, 15 and 30 days revealed no change in animal weight and transaminase. But with treatment 30 days, we observed an increase in glucose at doses of 2000 mg / kg and 1000 mg / Kg /, and hepatic steatosis macrogoticular at a dose of 2000 mg / kg. T cholesterol levels and triglyceride decreased by 30 days treatment at a dose of 2000 mg / kg. Treatment with OFCC for 15 and 30 days significantly increased HDL-C levels at doses of 2000 mg / kg / day, 1000 mg / Kg / day and 500 mg / kg / day. Serum values of total cholesterol and triglyceride decreased to levels similar to the control gemfibrozila both the first 24 hours and after 48 hours induction with dyslipidemia Tyloxapol. And at the dose of 1000 mg / kg, significant increase of HDL-c. The oral treatment of OFCC for 7, 15 and 30 days significantly reduced the paw edema induced by carrageenan at all doses studied. Was demonstrated antioxidant activity *Caryocar coriaceum* evaluated by the method of DPPH (2,2-diphenyl-1-picryl hidrazila) with IC50 of 20.1 μ / mL. OFCC reduced the activity of the enzyme myeloperoxidase (MPO) at a concentration of 1 mg / mL and 0.1 mg / mL, like indomethacin. This work revealed no sub-chronic toxicity at high doses in the evaluated parameters, besides showing anti-inflammatory and anti-oxidant OFCC. Being the first study to report a probable lipid-lowering activity and hipotriglicerídica species coriaceum, which gives potential pharmacological treatment of cardiovascular diseases.

Keywords: *Caryocar coriaceum* Wittm, oil pequi, cardiovascular disease, dyslipidemia, monounsaturated fatty acids, inflammation.

Capítulo

1

Introdução

1.1. Apresentação

O pequi é uma árvore originária do Brasil, conhecida popularmente pelos nomes de “pequi”, “piqui”, “pequá”, “amêndoa do espinho”, “grão de cavalo” ou “amêndoa do Brasil”. Dentre as espécies do gênero *Caryocar*, destacam-se no Brasil: *C. brasiliense*, *C. villosum*, *C. coriaceum*, *C. cuneatum* e *C. glabrum* (PRANCE & SILVA, 2007). O nome *Caryocar* vem do grego *caryon* (= núcleo, noz) e *kara* (= cabeça), referindo-se ao fruto globoso (BARROSO *et al.*, 2002). Já o nome “pequi” tem origem indígena (*py-qui*, *py* = pele, casca; *qui* = espinho), significando “casca espinhenta”, decorrente dos espinhos do endocarpo (BRAGA, 1960). A espécie *Caryocar coriaceum* Wittm. é encontrada na Chapada do Araripe, exercendo importante papel socioeconômico na região. (BATISTA *et al.*, 2010; SARAIVA *et al.*, 2011). Seu fruto é usado com alimento e na medicina popular, como anti-inflamatório e cicatrizante (SARAIVA *et al.*, 2011).

O consumo de gordura monoinsaturada de origem vegetal é extensamente utilizado na medicina popular brasileira devido ao seu efeito benéfico na redução do risco de desenvolver doenças cardiovasculares (LU, 2010). O óleo fixo do *Caryocar coriaceum* (OFCC), assim como o azeite de oliva e outros óleos vegetais são ricos em ácido oléico, uma gordura insaturada utilizada como coadjuvante no tratamento das hiperlipemias, com potencial efeito cardioprotetor (SALGADO *et al.*, 2008). Apesar de ser descrito o uso do óleo do pequi no tratamento de ampla variedade de doenças, não se observaram, na literatura pesquisada, estudos que avaliem os efeitos do *Caryocar coriaceum* Wittm. no perfil lipídico e sua possível atividade como agente hipolipemiante oral.

Por outro lado, as doenças cardiovasculares (DCV) apresentam elevada prevalência na população mundial, com a perspectiva para 2020 de 25 milhões de casos, constituem a principal causa de morbi e mortalidade entre os adultos ocidentais (KIVIMÄKI *et al.*, 2011).

A dislipidemia é um importante fator de risco cardiovascular, sendo caracterizada por níveis séricos elevados da lipoproteína de baixa densidade (LDL-c) e triglicerídeos (TG), e diminuição da lipoproteína de alta densidade (HDL-c) (KABAKCI *et al.*, 2008). Hipolipemiantes orais fazem parte do arsenal terapêutico dos pacientes com doenças cardiovasculares e representam maior parcela do custo destes medicamentos (ZIMMET *et al.*, 2001). As plantas medicinais com atividade na dislipidemia são alternativas de baixo custo para utilização no sistema de saúde, após validação e determinação de segurança (MATOS, 2000).

Segundo, o *National Cholesterol Education Program* (NCEP) o principal alvo para redução de risco de DCV é a queda nos níveis séricos do LDL-c. Entretanto, muitos estudos têm mostrado uma associação positiva entre TG sérico e risco de doença arterial coronariana (DAC) (KABAKCI *et al.*, 2008; AUSTIN, 1991; HOKANSON & AUSTIN, 1996). O *Framingham Heart Study* concluiu que níveis reduzidos de HDL-c constituem fator de risco independente para doença arterial coronariana (DAC) (AI *et al.*, 2010). A hipertrigliceridemia está frequentemente associada a outros fatores aterogênicos, tais como obesidade centrípeta, baixos níveis de HDL-c, partículas de LDL-c densas e pequenas, elevação da pressão arterial e da resistência à insulina. Este transtorno complexo, representado por um conjunto de fatores de risco cardiovasculares, é conhecido como síndrome metabólica (ECKEL *et al.*, 2005; SHEPHERD *et al.*, 2005).

Dentro deste contexto, os efeitos dos antioxidantes naturais na redução de morbidades como o câncer, doenças cardiovasculares e outros problemas degenerativos associados ao envelhecimento são bem definidos. O dano celular é normalmente causado por radicais livres, que são átomos ou moléculas com um ou mais elétrons livres. Os radicais livres derivados do oxigênio (ROS) e a peroxidação lipídica estão envolvidas em muitas condições patológicas

severas, como o câncer e doenças inflamatórias (HENRY *et al.*, 2002). A produção excessiva de ROS pode induzir dano aos lipídios, proteínas, membranas e ácidos nucleicos e também serve como um importante sinalizador intracelular que amplifica respostas inflamatórias. Inúmeros estudos demonstram o envolvimento de ROS nos processos inflamatórios, como na patogênese de doenças crônicas, como aterosclerose (KNOOPS *et al.*, 2004). Por outro lado, há mais de seis décadas, sabe-se que a gordura da dieta alimentar aumenta o risco de doença cardiovascular. Concomitantemente, o consumo superior a 30% das calorias na forma de gordura eleva a incidência de aterosclerose. Está estabelecida uma forte associação entre obesidade, diabetes e inflamação, assim como, o metabolismo e imunidade são condições interdependentes e que, bem como, o excesso de ingestão alimentar induz maior risco para doenças inflamatórias (LOTTENBERG, 2009).

1.2. Dislipidemias – generalidades

As dislipidemias são definidas com qualquer alteração nos níveis de lipídios séricos, em relação aos valores de referência da população estudada. Os distúrbios do metabolismo lipídico têm uma forte relação com as doenças cardiovasculares, e no caso da hipertrigliceridemia severa, há um risco potencial de pancreatite aguda grave (MAHLEY *et al.*, 2008; MALLOY *et al.*, 2004).

1.2.1. Lipídios e Lipoproteínas

Os lipídios são substâncias orgânicas geralmente insolúveis em água, porém solúveis em solventes apolares. Os lipídios principais no plasma são o colesterol, ésteres de colesterol, triglicerídeos (TG), fosfolipídios e os ácidos graxos não esterificados (NEFA). Os TG têm papel fisiológico de transporte de energia para células. O colesterol é um componente das membranas celulares e participa da síntese dos ácidos biliares e hormônios esteroides (MALLOY *et al.*, 2004).

As lipoproteínas transportam lipídios insolúveis em água em seu núcleo. Estes complexos solúveis têm forma esférica com um núcleo constituído por lipídios hidrofóbicos, principalmente colesterol e seus ésteres, triglicerídeos, e uma camada externa composta de fosfolípidios, colesterol livre e apoproteínas, sendo solúveis no plasma devido à natureza hidrófila da parte proteica (Figuras 1 e 2). Com base na densidade, as lipoproteínas plasmáticas são classificadas em: quilomícrons, lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL), lipoproteínas de baixa densidade (LDL), lipoproteína de densidade intermediária (IDL) e lipoproteínas de alta densidade (HDL) (MAHLEY *et al.*, 2008) (tabela 1).

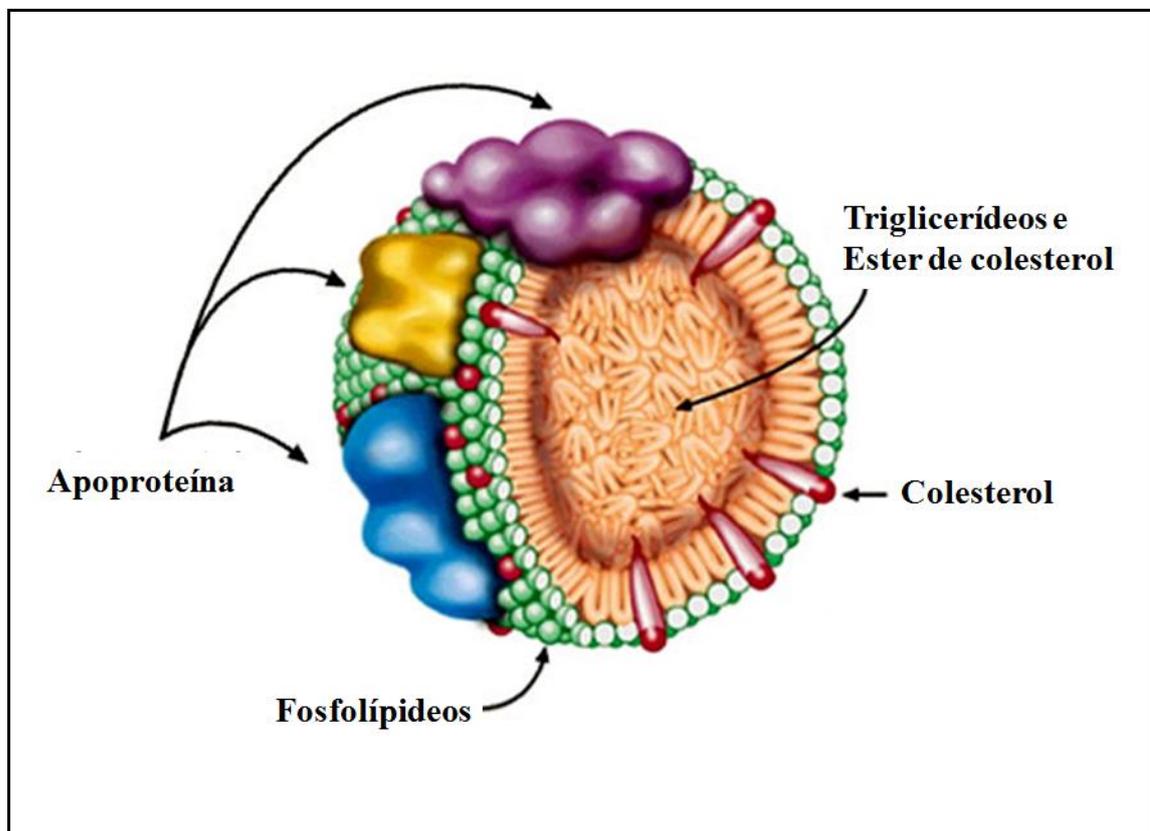


FIGURA 1- Estrutura das lipoproteínas formada por um núcleo de lipídios hidrofóbicos (colesterol e seus ésteres, triglicerídeos) e uma camada externa composta de fosfolípidios, colesterol livre e apoproteínas. Disponível em: <vilamulher.terra.com.br>.

TABELA 1 - Características das Principais Lipoproteínas

Lp	Densidade g/ml	Tamanho nm	Mobilidade eletroforética	Principal Apo
Qm	0,930	75-1200	Origem	ApoB-48
R-Qm	0,930-1,006	30-80	Pré- β lenta	ApoB-48
VLDL	0,930-1,006	30-80	Pré- β	ApoB-100
IDL	1,006-1,019	25-35	Pré- β lenta	ApoB-100
LDL	1,019-1,063	18-35	β	ApoB-100
HDL	1,063-1,210	5-12	α	ApoA-I
Lp (a)	1,050-1,120	25	Pré- β	ApoB-100

Lp= lipoproteína; Qm= quilomícrons; R-Qm= remanescente quilomícrons; VLDL= lipoproteína de muito baixa densidade; IDL= lipoproteína de densidade intermediária; LDL= lipoproteína de baixa densidades; HDL= lipoproteína de alta densidade; Apo= apoproteína.
Fonte: MALLOY *et al.*, 2004

1.2.2. Ácidos Graxos

Os triglicerídeos são formados por uma molécula de glicerol, esterificada a três ácidos graxos. São denominados ácidos graxos todos os ácidos monocarboxílicos alifáticos ($R - CO_2H$, onde $R =$ alquil, alquenil ou alquinil), constituídos por cadeias lineares, com números pares de átomos de carbono. A cadeia alquil pode ser saturada ou insaturada (MALLOY *et al.*, 2004).

Os ácidos graxos saturados não possuem duplas ligações, são geralmente sólidos à temperatura ambiente, presentes principalmente na gordura de origem animal. Podem ser classificados em ácidos graxos cadeia média (AGCM) e de cadeia longa (AGCL). Os AGCM

são absorvidos na forma não esterificada, ligam-se à albumina e são transportados ao fígado, sendo rapidamente metabolizados. Não elevam os lipídios no plasma pelo fato de não serem transportados nos quilomícrons e podem ser utilizados na dieta, em substituição aos ácidos graxos de cadeia longa, nos indivíduos hiperquilomicronêmicos. Como exemplo de AGCL, temos o ácido palmítico (C16: 0), cuja principal fonte é o óleo de palma, o mirístico (C14:0), encontrado no leite e derivados, e o esteárico (C18:0), presente na gordura do cacau (ASSAKURA *et al.*, 2000).

Os ácidos graxos insaturados possuem uma ou mais duplas ligações, sendo classificados em mono ou poliinsaturados, e a dupla ligação, quando ocorre em um AG natural, é sempre do tipo "cis". São geralmente líquidos à temperatura ambiente e estão presentes principalmente nos óleos vegetais. O nome sistemático do ácido graxo vem do hidrocarboneto correspondente, tendo seus carbonos numerados de duas formas: a partir da carboxila a numeração é delta – “D” e do grupamento metil terminal a identificação é ômega – “ ω ” (ω -3, ω -6 e ω -9). O ácido oleico (C18: 1), série ω -9, é ácido graxo monoinsaturado mais frequentemente encontrado na natureza, sendo as principais fontes o óleo de oliva e canola. O ácido linoleico (C18: 2), pertencente à série ω -6, presente principalmente nos óleos de milho e girassol. Na série ω -3, temos como representantes os ácidos graxos eicosapentaenoico (C20:5) e docosaexaenoico (C22:6), encontrados na gordura dos peixes de águas frias e profundas (ASSAKURA *et al.*, 2000).

O metabolismo dos lipídios está subdividido em síntese interna (ciclo endógeno) e a alimentação (ciclo exógeno).

1.2.3. Ciclo Exógeno

Tem início com a absorção de material lipídico proveniente da dieta na forma de colesterol livre, ácidos graxos e monoacilglicerol. Após serem reesterificados, os TG e os ésteres de colesterol são incorporados aos quilomícrons (Qm) sintetizados pelas células intestinais (MALLOY *et al.*, 2004).

Os Qm entram na circulação linfática e ganham a corrente sanguínea pelo ducto torácico. Posteriormente a secreção, os Qm interagem com o HDL, captam apoproteínas (apo-CII, CIII e E) e colesterol. Nos capilares, quando adquirem a apo-CII, os Qm entram em contato com a enzima lipase lipoproteica (LLP) que, ativada pela apo C-11, hidrolisa os TG, retira os ácidos graxos e torna-os partículas de menor tamanho (remanescentes de quilomícrons: R-Qm).. Os R-Qm são removidos da circulação pelo fígado, sendo então metabolizados, e, em condições normais, só devem ser encontrados no período pós-prandial (SCARTEZINI *et al.*, 2003). Durante a hidrólise inicial dos triglicerídeos de quilomícrons pela LLP, a apoA-1 e os fosfolípidos soltam-se da superfície dos Qm e permanecem no plasma. Este é um dos mecanismos pelos quais ocorre a geração de HDL nascente (MALLOY *et al.*, 2004).

1.2.4. Ciclo Endógeno

O ciclo endógeno envolve o transporte dos lipídios para os tecidos periféricos e, daí, de volta para o fígado. Tem início com a síntese hepática das VLDL, que transportam principalmente TG e as apos B 100, E e C, captadas do HDL. Na circulação capilar, sob ação da LLP, as VLDL, são hidrolisadas, dando origem aos remanescentes de VLDL (R-VLDL) ou IDL. Essas partículas seguem dois caminhos: podem ser captados no fígado (via receptor de apo B/E) ou sofrem ação da lipase hepática, formando as LDL. Ressalta-se que as LDL são as

principais carreadoras de colesterol plasmático em jejum. Uma vez no interior das células, essas lipoproteínas são fragmentadas, liberando colesterol e aminoácidos. O colesterol não esterificado resultante deste processo atravessa a membrana lipossomal e acumula no citoplasma celular, inibindo a atividade da enzima 3-hidroxi, 3-metilglutaril coenzima e finalmente, diminuem a síntese de colesterol e a expressão do receptor da LDL a nível celular (MALLOY *et al.*, 2004) (Figura 3).

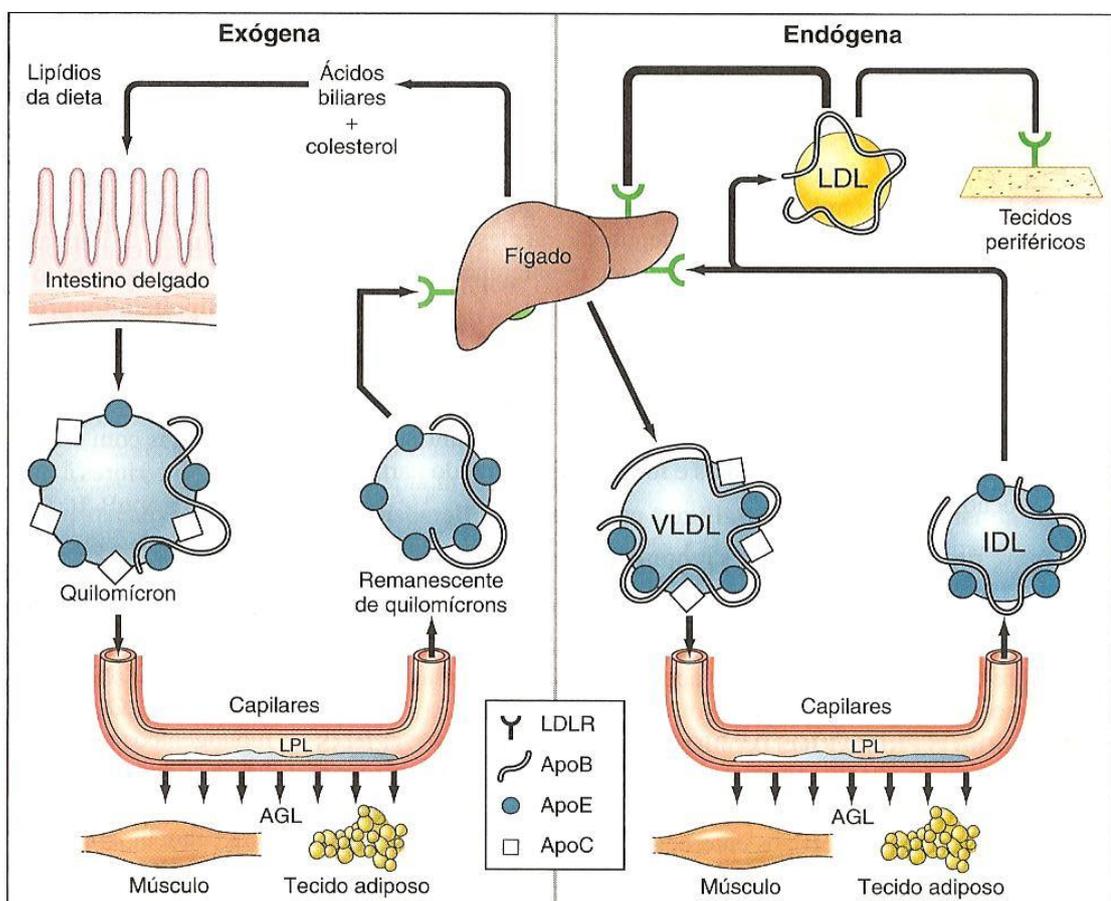


FIGURA 3 - Metabolismo Endógeno e Exógeno dos Lipídios e Lipoproteínas. Ciclo exógeno: absorção do material lipídico proveniente da alimentação, síntese dos Qm, a captação pelos linfáticos e a entrada na circulação. Ciclo endógeno: síntese VLDL, formação de IDL e VLDL remanescentes, estas absorvidas pelo fígado e transformadas em LDL. Lp= lipoproteína; VLDL= lipoproteína de muito baixa densidade; IDL= lipoproteína de densidade intermediária; LDL= lipoproteína de baixa densidades; HDL= lipoproteína de alta densidade; Apo= apoproteína; AGL= ácidos graxos livres; LLP= lipase lipoproteica. Fonte: LONGO *et al.*, 2012

Parte do material liberado, pela ação da LLP sobre os Qm e as VLDL, é utilizada na fabricação de outra lipoproteína: HDL. As partículas de HDL (sintetizadas no intestino e no fígado) têm como componentes principais a apo AI (adquirida principalmente no fígado) e os fosfolípides. Essas partículas, maiores e mais ricas em lipídios são denominadas HDL₂, e as menores e mais densas HDL₃. As primeiras têm grande importância no transporte de colesterol dos tecidos periféricos para o fígado (transporte reverso de colesterol) (SCARTEZINI *et al.*, 2003).

O retorno ao fígado ocorre diretamente ou transferindo os ésteres de colesterol para as VLDL ou IDL, sob a ação da enzima CETP (proteína de transferência do colesterol esterificado). Uma vez no fígado, o colesterol proveniente dos tecidos pode ser reaproveitado, ao sofrer ação da enzima lecitina colesterol aciltransferase (LCAT), sendo esterificado com transferência de um ácido graxo da fosfatidilcolina (Figura 4). A segunda via de efluxo do colesterol é determinada pela Apo-A1 livre ou associada as HDL com transportador de membrana ABCA-1. Este processo produz as partículas nascentes de HDL (discoidal), que são convertidas em HDL esféricas pela LCAT. As HDL de forma esférica são a forma dominante de HDL no plasma e são removidas no fígado por receptores *scavenger* classe B, tipo I (SR-BI), que medeiam a captação seletiva do éster de colesterol (MAHLEY *et al.*, 2008).

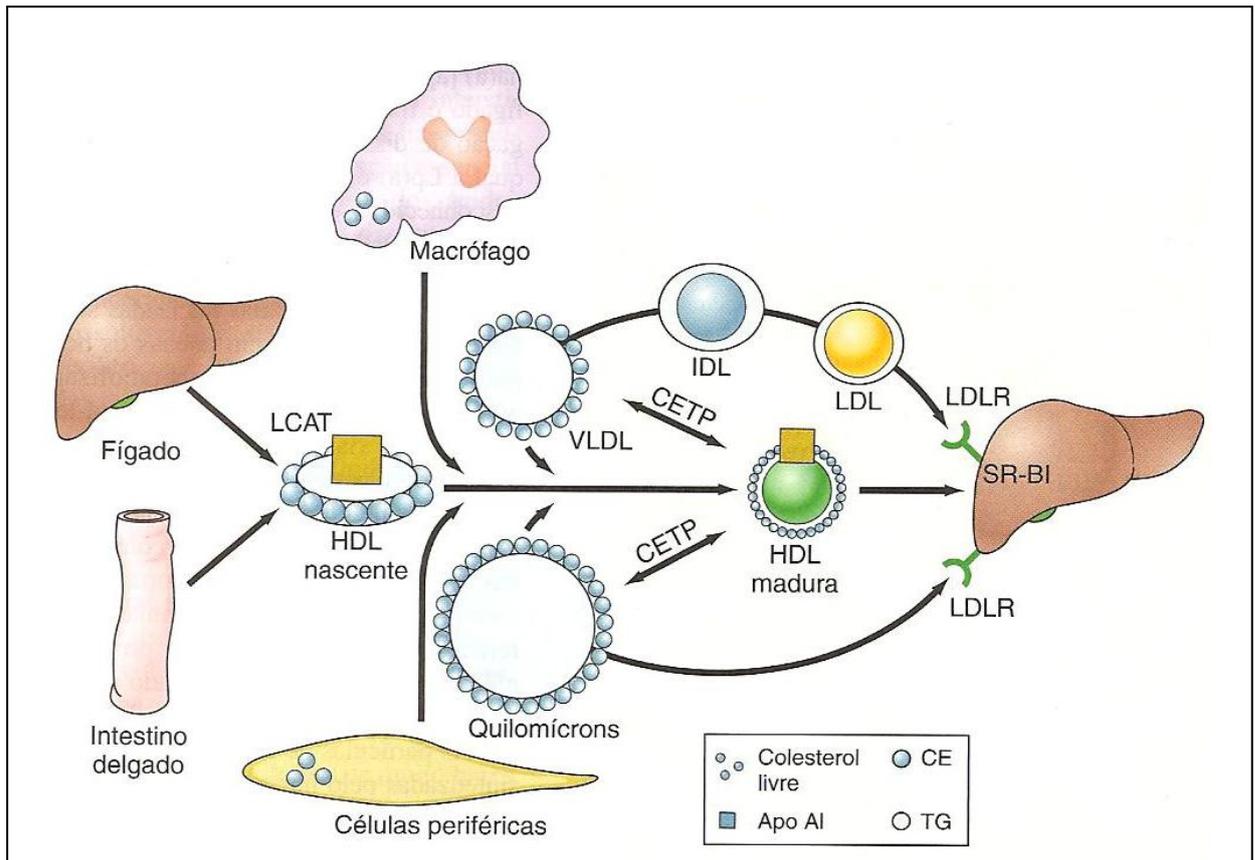


FIGURA 4 - Ciclo Reverso do HDL-c. Transporte do colesterol endógeno até o fígado via HDL, excreção via ácidos biliares, liberação no intestino para emulsificar as gorduras absorvidas na dieta. LCAT= lectina-colesterol-aciltransferase; CEPT= proteína de transferência do colesterol esterificado; ABCA1= proteína de ligação ao ATP1; RLDL= receptor de LDL. Fonte: LONGO *et al.*, 2012.

1.2.5. Lp (a), Lipoproteínas Modificadas e LDL Densas

A Lp (a) é uma lipoproteína com estrutura básica semelhante à da LDL, da qual difere pela apo (a) ligada à apo B-100. Esta apo(a) apresenta semelhança estrutural com a molécula do plasminogênio tecidual. Vários estudos têm sugerido que valores séricos elevados de Lp (a) constituem fator de risco independente para doença aterosclerótica (DA) (MAHLEY *et al.*, 2008).

As partículas de lipoproteínas podem sofrer oxidação ou apresentar heterogeneidade numa mesma classe, com diferentes significados na patogênese da aterosclerose. As partículas

de LDL, quanto menores e mais densas, parecem ser mais aterogênicas e mais suscetíveis à oxidação (MALLOY *et al.*, 2004).

1.2.6. Distúrbios no metabolismo lipídico

Há mais de 40 anos, Fredrickson propôs uma classificação fenotípica das dislipidemias primárias de acordo com a sua expressão laboratorial, a qual até hoje é básica para estudo e compreensão das dislipidemias. O termo dislipidemia é utilizado para caracterizar qualquer tipo de distúrbio no metabolismo dos lipídios. Outras denominações também são usadas: a hiperlipoproteinemia refere-se à alteração nas lipoproteínas, levando ao aumento da concentração do colesterol e/ou triglicerídeos; e a hiperlipidemia quando o colesterol e os triglicerídeos estão simultaneamente aumentados (COX, 2003).

A hipertrigliceridemia ocorre pelo acúmulo de quilomícrons e/ou de VLDL no plasma e pela diminuição da hidrólise dos triglicerídeos destas lipoproteínas pela LLP ou pelo aumento da síntese de VLDL. Variantes genéticas das enzimas ou apolipoproteínas relacionadas a estas lipoproteínas podem causar ambas as alterações metabólicas, aumento de síntese ou redução da hidrólise (MAHLEY *et al.*, 2008).

O acúmulo de lipoproteínas no compartimento plasmático como a LDL resulta em hipercolesterolemia. Este acúmulo pode ocorrer por doenças monogênicas, em particular, por defeito no gene do receptor de LDL ou no gene da apo B100. Centenas de mutações no receptor de LDL foram detectadas em portadores de hipercolesterolemia familiar, algumas causando redução de sua expressão na membrana, outras, levando a deformações na sua estrutura e função (MALLOY *et al.*, 2004).

Mutação no gene que codifica a apo B100 pode também causar hipercolesterolemia através da deficiência no acoplamento da LDL ao receptor celular. Mais comumente, a

hipercolesterolemia resulta de mutações em múltiplos genes envolvidos no metabolismo lipídico, as hipercolesterolemias poligênicas. Nestes casos, a interação entre fatores genéticos e ambientais determina o fenótipo do perfil lipídico (MAHLEY *et al.*, 2008).

As dislipidemias são classificadas em primárias, quando são resultantes de distúrbios genéticos; e em secundárias, quando decorrentes de outras patologias ou de determinados tipos de medicamentos. Desde 1967, Fredrickson propôs uma classificação fenotípica das dislipidemias primárias, de acordo com a sua expressão laboratorial (Tabela 2) (MALLOY *et al.*, 2004).

1.2.7. Dislipidemias Primárias

As dislipidemias primárias ou sem causa aparente podem ser classificadas genotipicamente e fenotipicamente através de análises bioquímicas. Didaticamente, são classificadas como metabolismo dos triglicerídeos, colesterol LDL (LDL-c) ou colesterol HDL (HDL-c) (Tabela 3). Na classificação genotípica, as dislipidemias se dividem em monogênicas ou poligênicas. A classificação fenotípica ou bioquímica considera os valores do CT, LDL-c, TG e HDL-c e compreende quatro tipos principais bem definidos (SMIT & DIAMANT, 2004).

a) Hipercolesterolemia isolada

Elevação isolada do LDL-c (≥ 160 mg/dL).

b) Hipertrigliceridemia isolada

Elevação isolada dos TG (≥ 150 mg/dL), que reflete o aumento do volume de partículas ricas em TG como VLDL, IDL e quilomícrons.

c) Hiperlipidemia mista

Valores aumentados de ambos LDL-c (≥ 160 mg/dL) e TG (≥ 150 mg/dL).

d) HDL-c baixo

Redução do HDL-c (homens <40 mg/dL e mulheres <50 mg/dL) isolada ou em associação com aumento de LDL-c ou de TG.

1.2.8. Dislipidemias Secundárias

As dislipidemias secundárias estão associadas a determinadas patologias, tais como *diabetes mellitus* (DM), hipotireoidismo, síndrome nefrótica e alcoolismo; ou devido ao uso de medicações (glicocorticóides, estrogênio-terapia, tamoxifeno, diuréticos) que podem interferir no metabolismo de uma ou mais lipoproteínas, levando ao aumento do colesterol e/ou TG séricos. Podem, também, exacerbar significativamente as alterações lipídicas das dislipidemias primárias e os pacientes estão susceptíveis às mesmas complicações induzidas pelas dislipidemias genéticas, ou seja, aterosclerose prematura, pancreatites e xantomatose. O tratamento dessas dislipidemias consiste em controlar a doença de base (SMIT & DIAMANT, 2004).

A dislipidemia observada em diabéticos caracteriza-se por hipertrigliceridemia, redução do HDL-c e aumento do número de partículas de LDL pequenas e densas, as quais são mais aterogênicas. Este padrão típico é também observado em pacientes com síndrome metabólica (MALLOY *et al.*, 2004).

TABELA 2 - Classificação Fenotípica das Dislipidemias Primárias (Fredrickson), segundo a Expressão Clínico-Laboratorial.

Fenótipo	Alteração Lipoproteica	Alteração Lipídica	Valor do perfil lipídico (mg/dL)	Aparência do plasma
I	↑ Qm	Hipertrigliceridemia	CT: 160-400 TG: 1500-5000	Sobrenadante cremoso
IIa	↑ LDL	Hipercolesterolemia	CT>240 TG<200	Transparente
IIb	↑ LDL+↑VLDL	Hipertrigliceridemia+ Hipercolesterolemia	CT: 240-500 TG: 200-500	Turvo
III	↑ IDL	Hipercolesterolemia+ Hipertrigliceridemia	CT: 300-600 TG: 300-600	Turvo
IV	↑ VLDL	Hipertrigliceridemia	TG: 300-1000 CT ≤ 240	Turvo
V	↑ Qm; ↑ VLDL	Hipertrigliceridemia	CT: 160-400 TG: 1500-5000	Sobrenadante cremoso

CT= colesterol total; TG= triglicérides; LDL= lipoproteína de baixa densidade; VLDL= lipoproteína de muito baixa densidade; IDL= lipoproteína de densidade intermediária; Qm= quilomicrons. Fonte: MALLOY *et al.*, 2004.

TABELA 3- Principais Causas das Dislipidemias Primárias e sua Incidência na População

	Causas	Incidência
Hipercolesterolemia	Hipercolesterolemia familiar	Heterozigótica 0,2%
		Homozigótica 0,001%
	Apo B100 defeituosa	0,1%
	Hipercolesterolemia poligênica	1-5%
	Hipercolesterolemia autossômica recessiva	Raríssima
Hipertrigliceridemia	Hiperlipemia familiar combinada	1-2%
	Hipertrigliceridemia familiar	0,33%
	Hiperquilomicronemia	0,0001%
Dislipidemia mista	Hiperlipemia familiar combinada	1-2%
	Disbetalipoproteinemia ou tipo III	Raríssima

Fonte: SMIT & DIAMANT, 2004.

1.2.9. Aterogênese

A aterosclerose é uma doença inflamatória crônica de origem multifatorial que ocorre em resposta à agressão endotelial, acometendo principalmente a camada íntima de artérias de médio e grande calibre, do início até um evento final, como por exemplo, a rotura de uma placa aterosclerótica. Além disto, o endotélio influencia o tônus vascular, através da produção de substâncias promotoras e inibidoras do seu crescimento, assim como o balanço entre fatores pró-trombóticos e antitrombogênicos na interface lúmen-parede do vaso, mas tem a importante função de regular o processo inflamatório na parede vascular (LIBBY *et al.*, 2002).

Esta agressão à parede vascular sofre ação direta de fatores de risco, como hipercolesterolemia (elevação das LDL, IDL, VLDL, remanescentes de quilomícrons),

tabagismo e hipertensão arterial, e sua suscetibilidade parece ter caráter hereditário (SPOSITO *et al.*, 2007).

A disfunção endotelial aumenta a permeabilidade da íntima às lipoproteínas plasmáticas, que ficam retidas no espaço subendotelial, sofrendo oxidação e sendo expostas aos diversos neo-epítomos, tornando-as imunogênicas. O papel potencial dos processos oxidativos no desenvolvimento de várias doenças também foi estudado. Em particular, o aumento de espécies reativas de oxigênio (ROS) no stress oxidativo desempenha um papel central na oxidação de LDL, um passo chave no desenvolvimento da aterosclerose. Além do aumento da permeabilidade às lipoproteínas, as partículas de LDL oxidada (LDL ox) induzem a síntese de moléculas quimiotática de monócitos e da expressão de moléculas de adesão endoteliais, que conduz à atração e migração subsequente dessas células na íntima. As moléculas de adesão atraem monócitos e linfócitos para a parede arterial. Induzidos por quimiotaxia, os monócitos migram para o espaço subendotelial onde se diferenciam em macrófagos, capturando as LDL oxidadas. O acúmulo excessivo de ésteres de colesterol no interior dos macrófagos leva à formação de "células espumosas", e são o principal componente das estrias gordurosas, lesões macroscópicas iniciais da aterosclerose (MALLOY *et al.*, 2004).

Alguns mediadores da inflamação estimulam a migração e proliferação das células musculares lisas da camada média arterial. Estas, ao migrarem para a íntima, passam a produzir citocinas, fatores de crescimento e matriz extracelular que formará parte da capa fibrosa da placa aterosclerótica (núcleo lipídico, rico em colesterol e a capa fibrosa, rica em colágeno). As placas estáveis caracterizam-se por predomínio de colágeno, enquanto as instáveis apresentam intensa atividade inflamatória, com grande atividade proteolítica, núcleo lipídico proeminente e capa fibrótica singular. A ruptura desta capa expõe material lipídico

altamente trombogênico, levando à formação de um trombo sobrejacente. Este processo, também conhecido por aterotrombose, é um dos principais determinantes das manifestações clínicas da aterosclerose (SPOSITO *et al.*, 2007).

1.2.10. Inflamação, doenças cardiovasculares e dislipidemia.

Obesidade, *diabetes mellitus* e dislipidemia são condições pró-aterogênicas, com participação dos macrófagos e adipócitos na fisiopatogênese. Por terem origem embrionária comum, são capazes, em situações especiais, de produzir os mesmos componentes. Em condições normais, os adipócitos armazenam lípidios e regulam a homeostase metabólica, enquanto os macrófagos relacionam-se com a resposta inflamatória. Na obesidade, ocorre sobreposição das vias metabólicas e inflamatórias. Assim, a expressão de genes torna-se similar em ambas às células. Os macrófagos passam a expressar proteínas normalmente produzidas pelo adipócito, como as FABP (proteínas transportadoras de ácidos graxos), com simultaneamente os macrófagos podem produzir citocinas inflamatórias, como o TNF- α , interleucina- 6, e MCP (proteínas quimiotáticas de monócitos). As FABP modulam o acúmulo de lípidios no adipócito e de colesterol no macrófago (HOTAMISLIGIL, 2005).

Desta forma, os lipídeos participam, concomitantemente, da regulação de vias metabólicas e de processos inflamatórios. Por meio das FABP, ativam quinases intracelulares, como “*inhibitor-kappa B quinase*” (IKK), “*c-jun N-terminal kinase*” (JNK) e proteína C quinase (PKC), que também podem ser ativadas através do *stress* do retículo endoplasmático. As quinases ativadas impedem a sinalização do receptor de insulina e, simultaneamente, induzem a produção de biomarcadores inflamatórios, como o TNF- α e interleucinas, pela ativação do “*nuclear-factor NF-kappa B*”. Além da sua ação na via inflamatória, os lipídeos ativam o PPAR (receptor ativado por proliferadores de peroxissoma) e o LXR (receptor

nuclear), ambos envolvidos no transporte e na síntese de nutrientes, bem como no efluxo de colesterol do macrófago (WELLEN, 2005).

A ingestão de gordura *trans* e ácidos graxos saturados tem uma forte associação com marcadores inflamatórios, aumentando a concentração de interleucina-6, proteína C reativa selectina-e, além de estar relacionada com a lipotoxicidade em diversos órgãos e o aumento do risco para diabetes e doenças cardiovasculares em consequência de sua forte relação com inflamação e resistência à insulina (HOTAMISLIGIL, 2005).

1.2.11. Avaliação Laboratorial das Dislipidemias

O perfil lipídico é definido pelas determinações bioquímicas do CT, HDL-c, LDL-c, após jejum de 12 a 14 horas. O LDL-c pode ser calculado pela equação de Friedewald ($LDL-c = CT - HDL-c - TG/5$), onde TG/5 representa o colesterol ligado ao VLDL-c, ou diretamente mensurado no plasma. Em pacientes com hipertrigliceridemia ($TG > 400 \text{ mg/dL}$), hepatopatia colestática crônica, *diabetes mellitus* ou síndrome nefrótica, a equação é imprecisa (OLIVEIRA, 2005).

Segundo o NCEP/ATP III, níveis desejáveis para os adultos incluem $CT < 200 \text{ mg/dL}$, $TG < 150 \text{ mg/dL}$, $LDL-c < 130 \text{ mg/dL}$ ($< 100 \text{ mg/dL}$ em pacientes com doença arterial coronariana (DAC) ou com risco elevado), $HDL-c < 40 \text{ mg/dL}$. Valores de $HDL-c \geq 60 \text{ mg/dL}$ são considerados protetores contra DAC (Tabela 4).

Os fatores de risco para doenças arteriais coronarianas clássicas ou tradicionais são hipercolesterolemia, hipertensão, tabagismo, *diabetes mellitus*, HDL-c baixo ($< 40 \text{ mg/dL}$), e história familiar de DAC prematura. Nos últimos anos, novos marcadores séricos surgiram com fatores de risco emergentes ou não clássicos e incluem níveis de proteína C reativa ultrasensível (PCRus), Lp (a), homocisteína, partículas de LDL densas e pequenas,

apolipoproteínas, fatores homeostáticos, glicemia de jejum alterada ou intolerância oral à glicose (OLIVEIRA, 2005).

Recomenda-se a avaliação do perfil lipídico para pacientes com DAC estabelecida ou outra doença vascular aterosclerótica; assintomáticos, porém com alto risco (HAS, DM, obesidade), com história familiar de DAC ou outra doença vascular aterosclerótica, com estigmas de hiperlipidemia ou com pancreatite, quando o álcool e doença do trato biliar forem excluídos (SPOSITO *et al.*, 2007).

TABELA 4 - Classificação dos Níveis de Lipídios Plasmáticos em Adultos, segundo o NCEP/ATP III

Colesterol total	Classificação
< 200	Desejável
200-239	Elevado limítrofe
≥ 240	Alto
HDL-c	
<40	Baixo (< 50 mulheres)
>60	Alto
LDL-c	
< 100	Ótimo
100-129	Quase ótimo
130-159	Elevado limítrofe
160-189	Alto
≥ 190	Muito alto
Triglicerídeos	
< 150	Normal
150-199	Elevado limítrofe
200-499	Alto
≥ 500	Muito alto

Fonte: NCEP/ATP III, 2001

1.2.12. Metas Terapêuticas e Reavaliação do Risco

Todos os pacientes com dislipidemia isolada e aqueles com risco cardiovascular aumentado devem ser orientados para a instituição de medidas não farmacológicas relacionadas à mudança do estilo de vida (MEV). O tratamento farmacológico está indicado, nos pacientes de risco baixo após seis meses de MEV ou nos de risco intermediário após três meses de MEV, caso não atinjam as metas preconizadas (Tabela 5). Nos indivíduos de alto risco as medidas não farmacológicas e o tratamento com hipolipemiantes devem ser iniciados simultaneamente. Nos pacientes com doença aterosclerótica significativa, de acordo com evidências atuais, a obtenção do nível de LDL-c igual ou inferior a 70 mg/dL traz redução adicional da incidência de eventos cardiovasculares. (SPOSITO *et al.*, 2007).

TABELA 5 - Meta dos Lipídios para Pacientes com Alto Risco de DAC

Parâmetros	Meta
CT, mg/dL	<200
LDL-c, mg/dL	<100; <70 (pacientes de alto risco)
HDL-c, mg/dL	>40
TG, mg/dL	<150
Apo B, mg/dL	<90 (pacientes de risco DCV, incluindo DM). <80 (pacientes com DAC estabelecida ou DM com \geq 1 FR adicional)

CT= colesterol total; TG= triglicerídeos; LDL-c= LDL colesterol; HDL= HDL colesterol; Apo B= apolipoproteína B; DAC= doença arterial coronariana. Fonte: JELLINGER, 2012

1.2.13. Tratamentos não Medicamentosos das Dislipidemias

1.2. 13.1. Terapias Nutricionais da Hipercolesterolemia

a) Colesterol e ácidos graxos saturados

Para reduzir a ingestão de colesterol, deve-se diminuir o consumo de alimentos de origem animal ou ricos em gorduras saturadas, em especial as vísceras, leite integral e seus derivados, embutidos, frios, pele de aves e frutos do mar (camarão, ostra, marisco, polvo, lagosta), de polpa e leite de coco e de alguns óleos vegetais, como os de dendê (SPOSITO *et al.*, 2007).

b) Ácidos graxos insaturados

Os ácidos graxos insaturados reduzem o CT e o LDL-c plasmáticos. Os ácidos graxos poli-insaturados possuem o inconveniente de induzir maior oxidação lipídica e diminuir o HDL-c quando utilizados em grande quantidade. Os ácidos graxos monoinsaturados (oléico) exercem o mesmo efeito sobre a colesterolemia, sem, no entanto, diminuir o HDL-c e provocar oxidação lipídica. Suas principais fontes dietéticas são o óleo de oliva, óleo de canola, azeitona, abacate e oleaginosas (amendoim, castanhas, nozes, amêndoas) (SPOSITO *et al.*, 2007).

c) Ácidos graxos *trans*

Os ácidos graxos *trans* são sintetizados durante o processo de hidrogenação dos óleos vegetais. Os ácidos graxos *trans* aumentam o LDL-c e reduzem o HDL-c, aumentando assim a razão LDL-c/HDL-c e, da mesma forma que outros ácidos graxos, aumentam os TG. A principal fonte de ácidos graxos *trans* na dieta é a gordura vegetal hidrogenada, utilizada no preparo de sorvetes cremosos, chocolates, pães recheados, molhos para salada, sobremesas cremosas, biscoitos recheados, alimentos com consistência crocante (*nuggets*, *croissants*,

tortas), bolos industrializados, margarinas duras e alguns alimentos produzidos em redes de *fast-foods* (SPOSITO *et al.*, 2007).

d) Fibras

As fibras solúveis são representadas pela pectina (frutas) e pelas gomas (aveia, cevada e leguminosas: feijão, grão de bico, lentilha e ervilha). Estas fibras reduzem o tempo de trânsito gastrointestinal e a absorção enteral do colesterol (SPOSITO *et al.*, 2007).

e) Fitosteróis

Os fitosteróis são encontrados apenas nos vegetais e desempenham funções estruturais análogas ao colesterol em tecidos animais (DEMONTY *et al.*, 2006). O β -sitosterol, extraído dos óleos vegetais é o principal fitosterol encontrado nos alimentos. Reduzem a colesterolemia por competirem com a absorção do colesterol da luz intestinal (MALLOY *et al.*, 2004).

f) Proteína de soja

A ingestão de proteína da soja (25 gramas /dia) pode reduzir o colesterol plasmático (6% do LDL-c) e, portanto, pode ser considerada como auxiliar no tratamento da hipercolesterolemia (JELLINGER, 2012).

g) Antioxidantes

Os antioxidantes, dentre eles os flavonoides, presentes na dieta podem potencialmente estar envolvidos na prevenção da aterosclerose por inibirem a oxidação das LDL, diminuindo sua aterogênese e, conseqüentemente, o risco de DAC. Os flavonoides são antioxidantes polifenólicos encontrados nos alimentos, principalmente nas verduras, frutas (acerola,

pitanga, seriguela, uva, morango), grãos, sementes, castanhas, condimentos e ervas e também em bebidas como vinho, suco de uva e chá (JELLINGER, 2012).

1.2. 13.2. Atividade física

A atividade física regular constitui medida auxiliar para o controle das dislipidemias e tratamento da DAC. A prática de exercícios físicos aeróbios promove redução dos níveis plasmáticos de TG, aumento dos níveis de HDL-c, porém sem alterar o LDL-c. Os exercícios devem ser realizados de três a seis vezes por semana, com duração média de 30 a 60 minutos, respeitando a *performance* cardiovascular de cada paciente (JELLINGER, 2012).

1.2.14. Tratamentos Medicamentosos das Dislipidemias

a) Estatinas ou inibidores da HMG-CoA redutase

As estatinas atuam primariamente no fígado, inibindo competitivamente a HMG-CoA redutase, uma das enzimas chave na síntese intracelular do colesterol. Sua inibição reduz o conteúdo intracelular de colesterol e, como consequência, removem mais VLDL, IDL e LDL da circulação para repor o colesterol intracelular (DAVIDSON & TOTH, 2004). As estatinas reduzem a mortalidade cardiovascular e a incidência de eventos isquêmicos coronários agudos, necessidade de revascularização do miocárdio e AVC. São exemplos de estatinas: sinvastatina, lovastatina, pravastatina, fluvastatina, atorvastatina, rosuvastatina (FODOR *et al.*, 2000).

b) Resinas de troca

São fármacos que reduzem a absorção intestinal de sais biliares e, conseqüentemente, de colesterol. Com a redução da absorção, reduz-se o colesterol intracelular no hepatócito e, por este motivo, aumenta-se o número de receptores de alta afinidade para LDL nas

membranas dos hepatócitos, propiciando a redução dos níveis séricos de LDL-c. A colestiramina é único inibidor disponível no Brasil (SPOSITO *et al.*, 2007).

c) Ezetimiba

A ezetimiba é um inibidor de absorção do colesterol alimentar e biliar que atua na borda em escova das células intestinais inibindo a ação da proteína transportadora do colesterol. Usada isoladamente, reduz cerca de 20 % o LDL-c. Entretanto, tem sido mais frequentemente empregada em associação com as estatinas, em função da potenciação da redução do colesterol intracelular (JELLINGER, 2012).

d) Fibratos

São fármacos derivados do ácido fíbrico, um etil éster do p-clorofenoxiisobutirato. A genfibrozila é um ácido fenoxipentanóico não-halogenado e, portanto, distinta dos fibratos halogenados. Existem vários análogos do ácido fíbrico (fenofibrato, bezafibrato, ciprofibrato). Os fibratos agem estimulando os receptores nucleares denominados “receptores alfa ativados de proliferação dos peroxissomas” (PPAR- α), expressos no fígado e em outros tecidos. Esse estímulo leva a aumento da produção e ação da lipase lipoproteica (LLP), responsável pela hidrólise intravascular dos TG, e redução da Apo CIII, responsável pela inibição da LLP. A ocorrência de um aumento da síntese da LDL pode aumentar a depuração de lipoproteínas ricas em triglicérides. O estímulo do PPAR- α pelos fibratos também leva a maior síntese da Apo AI, e conseqüentemente, de HDL. Reduzem os níveis de triglicérides de 30 a 60%. Aumentam o HDL-c de 7 a 11%. Sua ação sobre o LDL-c é variável, podendo diminuí-lo, não modificá-lo ou até aumentá-lo (JELLINGER, 2012).

e) **Ácido nicotínico**

O ácido nicotínico ou niacina é uma medicação que exerce efeitos favoráveis sobre as concentrações plasmáticas de todas as lipoproteínas, reduz a ação da lipase tecidual nos adipócitos, levando à menor liberação de ácidos graxos livres para a corrente sanguínea. Como consequência, reduz-se a síntese de TG pelos hepatócitos. Reduz o LDL-c em 5% a 25%, aumenta o HDL-c em 15 a 35% e diminui os triglicerídeos em 20 a 50% (JELLINGER, 2012).

1.3. O Tratamento da Hipercolesterolemia com Plantas Medicinais

Existem mais de 200 compostos puros, já identificados, produzidos por plantas, que apresentam atividade hipoglicemiante e/ou hipolipemiante. (KERNTOPF, 2004; BEVER, 1980; KHANNA *et al.*; 1981; IVORRA *et al.*, 1989; MOSSA e TARIQ, 1991). Referindo-se especificamente à atividade hipolipemiante, dentre os compostos puros, já identificados, produzidos por plantas destacam-se: β -caroteno, licopenos, cicloartenol, β -sitosterol, saponinas, proteínas da soja, polissacarídeos, propionato, mevinolin, flavonóides, niacina, terpenóides, dentre outros (WANG *et al.*, 1999).

Diversas plantas são utilizadas pela população para o tratamento das hipercolesterolemias, sendo que algumas já foram pesquisadas em ensaios pré-clínicos, como é o caso do *Ruta graveolens* L.(arruda), a *Fucus vesiculosus* L. (fucus), a *Commiphora mukul* Engl. (gum-gugul), a *Catharanthus roseus* L. (Boa noite, Boa noite branca ou Bom dia), *Zingiber Officinale* Roscoe (gingibre), a *Ficus carica* L. (figo), *Terminlia chebula* Retz., a *Achyranthes aspera* L. (carrapicho) e a *Bauhinia unguolata* (mororó) (KUPPURAJAN, et al., 1978, TSI *et al.*, 1994; MUKHERJEE *et al.*, 1995; CHANDER *et al.*, 1996).

1.3.1. Mecanismo de Ação dos Constituintes Hipolipemiantes de Plantas Medicinais

As ações mais conhecidas de plantas com atividade hipolipemiante envolvem a inibição da biossíntese de colesterol, aumento da excreção fecal de ácidos biliares, estímulo à atividade da lectina colesterol acil transferase plasmática, inibição da absorção de colesterol, assim como da atividade da HMG-CoA - redutase, aumento da síntese de HDL e do aumento do catabolismo do LDL e enzimas lipolíticas teciduais, entre outras (KERNTOPF, 2004; KHANNA *et al.*, 1981; MUKHERJEE *et al.*, 1995; CHANDER *et al.*, 1996).

1.4. Considerações Botânicas sobre *Caryocar coriaceum* Wittm: Pequi do Nordeste

A região do Cariri, localizada ao sul do Estado do Ceará, constitui um polo sociocultural, com destaque na dança, artes plásticas, música e literatura de cordel, que aliados ao extrativismo da madeira, geram renda, energia, alimento, plantas medicinais e área de lazer à comunidade local (AUGUSTO & GOES, 2007). O pequizeiro, planta nativa da região, pertencente à família *Caryocaraceae* e à ordem *Malpighiales*, representada por dois gêneros: *Caryocar* e *Anthodiscus*, com uma média de 25 espécies (BARROSO *et al.*, 2002). O *Caryocar* é uma árvore originária do Brasil, conhecida popularmente pelos nomes de pequi, piqui, pequá, amêndoa do espinho, grão de cavalo ou amêndoa do Brasil. Dentre as espécies do gênero *Caryocar*, destacam-se no Brasil as espécies: *C. brasiliense*, *C. villosum*, *C. coriaceum*, *C. cuneatum* e *C. glabrum* (PRANCE *et al.*, 2000).

A espécie *Caryocar coriaceum* Wittm. é encontrada na parte mais setentrional do Ceará, exercendo importante papel sócio-econômico na Chapada do Araripe e circunvizinhanças nos Estados do Ceará, Pernambuco e Piauí (BATISTA *et al.*, 2010; SARAIVA, *et al.*, 2011). Seu fruto é bastante apreciado na culinária regional, com importância econômica (FIGUEIREDO *et al.*, 1989).

Apresenta-se como árvore frondosa e engalhada, podendo alcançar até dez metros de altura e tronco de até 2 metros de diâmetro, revestido de casca escura, grossa e sulcada (Figura 5). As folhas são opostas, ternadas, de folíolos ovais, glabros (sem pelos), coriáceas, verde-luzentes e ricas em tanino, fornecendo substância tintorial. As flores são grandes, amareladas, com estames vermelhos, reunidas em cachos terminais (Figura 6B) (BRAGA, 1960). Seu fruto, de cheiro e sabor peculiares, é bastante apreciado pela população. Os frutos de *C. coriaceum* são ovoides, carnosos do tipo nuculânio, indeiscente, composto por quatro pirênios livres dispostos sobre o receptáculo floral. Seu epicarpo é bilaminar, tendo a porção mais externa uma coloração verde escura, medindo 0,1 cm de espessura e, a interna, de coloração verde clara com 0,8 cm de espessura. O mesocarpo carnoso de coloração amarelada é oleaginoso, possui forte odor característico, espessuras média de 1,0 cm, envolvendo o endocarpo de textura lenhosa, é recoberto externamente por acúleos apresentando em média 0,5 cm de comprimento, encravados na porção carnosa do mesocarpo, de coloração castanho escuro externamente e castanho escuro metálico internamente com 0,2 cm de espessura (Figura 6) (BRAGA, 1960; PAULA-JÚNIOR, 2004; SILVA & MEDEIROS-FILHO, 2006a).

O *Caryocar coriaceum* é explorado de forma extrativista, tem comportamento sazonal, a floração ocorre entre os meses de setembro e novembro e a safra entre os meses de dezembro e abril, período onde ocorre os altos índices pluviométricos na região (COSTA *et al.*, 2004). Durante a safra, o pequi representa uma importante fonte de renda, os frutos são vendidos *in natura*, devido ao preço acessível, constitui um precioso recurso alimentar para a população de baixa renda e, na entressafra, ocorre a extração do óleo da polpa e amêndoa, que tem maior valor comercial (LORENZI & MATOS, 2002).



FIGURA 5 - Árvore de *Caryocar coriaceum* Wittm (pequizeiro). Localizada numa área de cerrado da Chapada do Araripe. Crato-CE. Março de 2009. Fonte: SARAIVA, 2009.

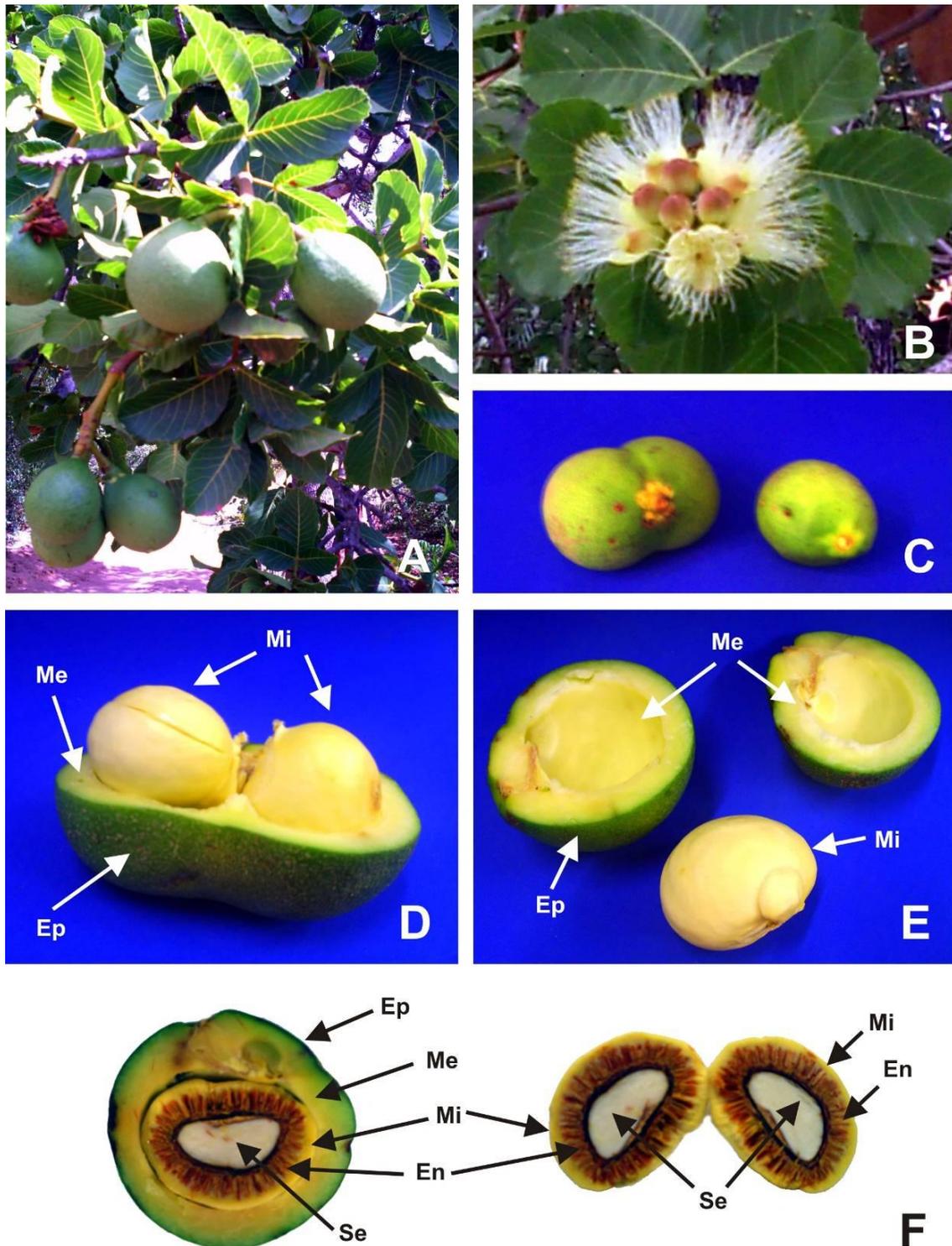


FIGURA 6 - Aspecto das folhas, frutos e flor de *C. coriaceum* Wittm. A folha é trifoliolada e glabra (A e B). As flores (B) são amareladas, com estames avermelhados e reunidas em cachos terminais. Os frutos são drupáceos. Notar os aspectos externo (A e C) e interno (D, E e F, corte mediano sagital) dos frutos. Ep – epicarpo; Me – mesocarpo externo; Mi – mesocarpo interno (polpa); En – endocarpo (com acúleos ou espinhos); Se – semente (amêndoa). Fonte: SARAIVA, 2009.

É no período da safra do pequi onde as comunidades próximas à chapada do Araripe realizam atividades extrativistas (em condições precárias de trabalho), coletando os frutos para comercialização (AUGUSTO & GÓES, 2007). A coleta não é feita com a retirada do fruto diretamente da árvore; espera-se que o fruto caia no chão para que se possa coletá-lo posteriormente, pois o sabor da polpa do fruto coletado “do chão” é mais agradável. A polpa e a amêndoa (porções oleaginosas comestíveis do fruto), por seu sabor característico e por ser fonte de lipídios e vitaminas antioxidantes (A e E), são bastante aproveitadas como alimento e na preparação de molhos e temperos, acompanhando pratos regionais e substituindo outras fontes de lipídios, como a banha ou o toucinho. Devido ao preço acessível, o pequi constitui um precioso recurso alimentar para a população de baixa renda (FIGUEIREDO et al., 1989; BRAGA, 1960; SILVA & MEDEIROS-FILHO, 2006b).

1.5. Uso Popular e Atividades Biológicas do Pequi

Na medicina popular, as cascas da árvore e dos frutos do pequi são utilizadas em infusões como antitérmicas e diuréticos. Ao fruto também é atribuído propriedades afrodisíacas e antiabortivas. As folhas são usadas no tratamento de resfriados, gripes, edemas e alterações menstruais (VIEIRA & MARTINS, 2000; BATISTA *et al.*, 2010).

Além destas aplicabilidades, o pequi também é aproveitado para a produção de óleo, sendo de grande versatilidade na culinária regional para preparação de molhos e temperos, na indústria cosmética para a produção de sabonetes e cremes (PIANOVSKI *et al.*, 2008), e na produção de combustíveis e lubrificantes (OLIVEIRA *et al.*, 2008). No âmbito da medicina popular, o óleo é utilizado no tratamento de queimaduras (VIEIRA & MARTINS, 2000), gripes, infecções bronco-pulmonares, úlceras cutâneas, inflamações na pele e dores osteomusculares (SARAIVA 2009). Analogamente, há relatos da sua utilização nas afecções

oftalmológicas relacionados à deficiência de vitamina A, pelo alto teor de carotenóides com atividade pró-vitamina A (SANTOS, 2007; OLIVEIRA *et al.*, 2008).

1.6. Etnofarmacologia das Espécies de *Caryocar*

O termo etnofarmacologia é utilizado para designar práticas médicas, especialmente remédios, usados em sistemas tradicionais de medicina (ELIZABETZKY, 1999). Em concordância ao exposto acima, o valor terapêutico do pequi atribuído à medicina popular vem sendo pesquisado e uma ampla variedade de estudos etnofarmacológicos e etnobotânicos atestam sua real eficácia (BATISTA *et al.*, 2010).

Estudos demonstram que o extrato das folhas do pequi apresenta atividade antifúngica, por inibir o crescimento de *Cryptococcus neoformans*, *Paracoccidioides brasiliensis* e *Candida albicans* (PASSOS *et al.*, 2002), ação moluscicida contra o *Biomphalaria glabrata* (vetor da esquistossomose) (BATISTA *et al.*, 2010), efeito leishmanicida por inibir a proliferação da forma promastigota da *Leishmania amazonensis* e atividade antimicrobiana por inibir o crescimento de enterobactérias (PAULA-JUNIOR *et al.*, 2010), *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* (ALVES *et al.*, 2000). O extrato da casca do pequi também demonstrou interferência sobre a curva de parasitemia do *Trypanosoma cruzi*, reduzindo o número de parasitos no sangue (HERZOG-SOARES *et al.*, 2002). Também foram observadas atividades antioxidantes e preventivas de tumores (PAULA-JÚNIOR, 2004; KHOURI *et al.*, 2007), efeitos contra o Sarcoma 180 em animais pelo conteúdo de ácido oleanólico e indícios de atividade proteásica e hemolítica de lectinas de *C. brasiliense*, bem como atividade enterotóxica *in vivo* em camundongos (PEREZ, 2004).

O óleo do pequi é fonte de vitamina C (BARBOSA *et al.*, 2011) e compostos fenólicos, como flavonóides (MIRANDA-VILELA *et al.*, 2008). Todos estes componentes têm propriedades antioxidantes, podendo contribuir para redução dos fatores de risco para

doenças cardiovasculares, como a oxidação do LDL(MIRANDA-VILELA *et al.*, 2008) (ALONSO, 2000).. Apresenta ainda, atenuação dos efeitos de agentes mutagênicos e cancerígenos (MIRANDA-VILELA *et al.*, 2008; TSENG *et al.*, 2004).

Ensaio pré-clínicos do óleo fixo de *C. coriaceum* apontam a atividade gastroprotetora em roedores com significativa redução de úlceras induzidas por etanol e aspirina (PENHA, 2007; QUIRINO, 2009) e cicatrizante (QUIRINO, 2009). O óleo fixo também possui efeito anti-inflamatório tópico em camundongos, e demonstrou eficácia na redução de inflamação cutânea, com tratamento crônico (SARAIVA, 2009).

O óleo fixo da polpa do *Caryocar coriaceum* (OFCC) tem como componente majoritário o ácido graxo insaturado oléico. Os ácidos graxos saturados aumentam a lipoproteína de baixa densidade (LDL) por inibição da atividade do receptor de LDL e aumentam a produção de apolipoproteína. A substituição de gordura saturada por gordura poli-insaturada tem reduzido os níveis de colesterol total (CT) e o LDL colesterol, por diminuição das taxas de produção de LDL colesterol e/ou aumento das taxas de depuração de LDL. Em contrapartida, há diminuição da lipoproteína de alta densidade (HDL), que juntamente com a redução do LDL-c, diminuem a razão LDL / HDL. Enquanto que gordura monoinsaturada também tem o mesmo efeito na colesterolemia, mas a magnitude da redução de HDL é menor quando comparada as gorduras poli-insaturadas (AGUILAR *et al.*, 2012).

TABELA 6 - Percentual de Ácidos Graxos Saponificáveis no Óleo Fixo da Polpa do
C. coriaceum e *C. brasiliense*

Ácidos Graxos	<i>Caryocar coriaceum</i>	<i>Caryocar brasiliense</i>
Palmítico (C16:0)	34,1	41,78
Palmitoléico (C16:1)	0,3	0,67
Esteárico (C18:0)	1,7	1,28
Oléico (C18:1)	55,8	54,28
Linoléico (C18:2)	1,8	1,36
Heptadecenóico (C17:1)	5,9	0,51
Licosenóico(C20:1)	0,4	0,22
Total	100.0	100.0

Fonte: OLIVEIRA *et. al*, 2008; MIRANDA-VILELA *et al.*, 2009.

Capítulo

2

Objetivos

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos gerais

- Determinar a influência da administração do óleo fixo da polpa de *Caryocar coriaceum* WITTM. sobre parâmetros bioquímicos e histopatológicos de ratos.

2.2. Objetivos específicos

- Identificar por CG/EM a composição química do óleo fixo do *Caryocar coriaceum*;
- Avaliar os efeitos da administração repetida (7, 15 e 30 dias) do OFCC em doses elevadas, sobre o peso, os parâmetros bioquímicos (glicose, AST, ALT, colesterol T, HDL-c e triglicerídeos) e histopatológicos de ratos.
- Determinar a eficácia do OFCC em reduzir os níveis plasmáticos de colesterol total, colesterol não-HDL e triglicerídeos em ratos com hiperlipidemia aguda, bem como em aumentar os níveis de HDL-c destes animais;
- Avaliar a atividade anti-inflamatória do OFCC *in vivo* através do modelo de edema de pata induzido por carragenina e *in vitro*, através da inibição da liberação de MPO (mieloperoxidase) por neutrófilos;
- Verificar a atividade anti-oxidante do óleo fixo do *Caryocar coriaceum* (OFCC) frente ao radical estável DPPH (2,2-difenil-1-picril hidrazila).

Capítulo

3

Materiais e Métodos

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Herborização e identificação do espécime botânico

Os frutos de *C. coriaceum* Wittm. foram coletados em outubro de 2010 (período de floração) na comunidade Cacimbas, situada no platô da Chapada do Araripe, a três quilômetros da rodovia estadual CE-060, no município de Jardim-CE (Latitude: 07° 34' 57" S Longitude: 39° 17' 53" W Altitude: 648m).

A exsicata foi depositada no Herbário Caririense Dárdano de Andrade-Lima, da Universidade Regional do Cariri (URCA).

3.2. Aspectos Éticos da Pesquisa

O trabalho foi realizado de acordo com as normas de bioética reconhecidas pela lei: 11.794/08, a qual regulamenta o uso de animais para procedimentos científicos; bem como cria as comissões de ética para uso de animais em instituições de pesquisa (GOLDIM *et al.*, 2008). Todos dos experimentos com animais obedeceram a protocolos experimentais aprovados, previamente pela Comissão de Experimentação e Uso de Animais da Universidade Regional do Cariri (CEUA/URCA), com parecer nº 05/2012 (ANEXO A).

3.3. Estudo Químico

3.3.1. Obtenção do Óleo Fixo do *Caryocar coriaceum* (OFCC)

A polpa *in natura* dos frutos de *C. coriaceum* foi submetida ao descasque e a despolpa manualmente utilizando facas, separando o mesocarpo interno do endocarpo. Em seguida, a polpa obtida foi submetida a um cozimento intensivo com água, separando o óleo sobrenadante. O óleo foi secado em fogo baixo, utilizando um recipiente metálico, até que o mesmo perdesse a opacidade devido à umidade. Neste processo, para a obtenção de 01 litro de

óleo necessitou-se de 7400 g da polpa do pequi. O óleo obtido foi filtrado em papel de filtro e secado com sulfato de sódio anidro (Figura 7).

Para posterior utilização nos testes e evitar oxidação, alíquotas de 10 ml do óleo foram estocadas em tubos de vidro com tampas plásticas e armazenadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

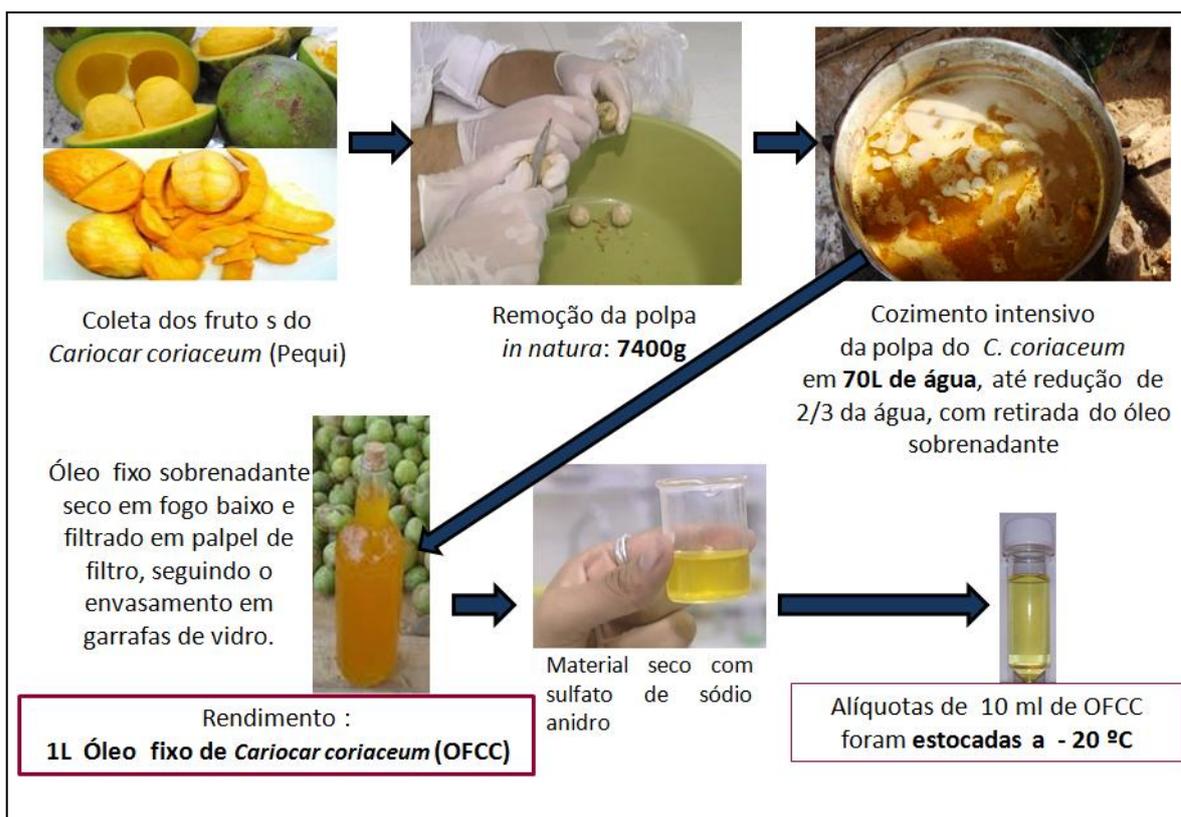


FIGURA 7 - Fluxograma de Obtenção do Óleo Fixo *Caryocar coriaceum* (OFCC). A polpa descascada manualmente, submetida a cozimento intenso. O óleo secado com sulfato de sódio anidro. Rendimento: 1 litro de óleo/7400 g da polpa. Fonte: arquivo pessoal

3.3.2. Obtenção dos Ácidos Graxos e Ésteres Metílicos Correspondentes

A determinação dos ácidos graxos foi feita indiretamente, por meio dos seus respectivos ésteres metílicos. O óleo (0,2 g) foi saponificado, por 30 min, sob refluxo, com solução de hidróxido de potássio metanólico, de acordo com a metodologia descrita por Hartman & Lago (1973). Após tratamento e ajuste de pH, os ácidos graxos livres foram metilados com metanol em catalise ácida, para obtenção de seus respectivos ésteres metílicos.

3.3.3. Identificação dos Ésteres Metílicos

As análises dos constituintes voláteis foram realizadas em equipamento CG/EM Hewlett-Packard, Modelo 5971 usando-se coluna capilar não-polar DB-1, de sílica fundida (30 m x 0,25 mm i.d., película de 0,25 µm); carregado por gás hélio; velocidade de fluxo 0,8 mL/min e modo de divisão. A temperatura do injetor e do detector foram 250 °C e 200 °C, respectivamente. A temperatura da coluna foi programada de 35 °C para 180 °C em 4 °C/min e em seguida 180 °C para 250 °C em 10 °C/min. Os espectros de massas foram gravados a partir de 30 - 450 m/z. Componentes individuais foram identificados por correspondência de seus espectros de massa, 70 eV, com os da base de dados usando a biblioteca construída através do espectrômetro Wiley e outros dois computadores utilizando índices de retenção como uma pré-seleção (ALENCAR *et al.*, 1984; 1990), bem como por comparação visual da fragmentação padrão com aqueles relatados na literatura (STENHAGEN *et al.*, 1974; ADAMS, 2001).

3.4. Testes Biológicos

3.4.1. Animais Experimentais

Os ratos (*Rattus norvegicus*) da linhagem Wistar utilizados neste trabalho foram obtidos no Biotério da Faculdade de Medicina Estácio do Juazeiro do Norte (Estácio/FMJ). Os animais foram acondicionados em caixas de polipropileno, à temperatura ambiente de 22-24°C, com ciclos claro/escuro de 12 horas, recebendo ração padrão e água *ad libitum* (GOLDIM & RAYMUNDO, 2008). Todos os procedimentos utilizados seguiram as normas da ética em pesquisa.

3.4.2. Drogas e Reagentes

Todas as drogas e reagentes utilizados neste trabalho foram de padrão analítico, obtidas das companhias Sigma (St. Louis, MO, E.U.A.), Merck (Darmstadt, Germany), Reagen (Rio de Janeiro, RJ, Brasil) e Synth (Diadema, São Paulo, Brasil).

O indutor de dislipidemia, tiloxapol® (Triton WR 1339, Sigma/Aldrich) e a droga hipolipemiante gemfibrozil (Lopid® -Ache Laboratórios Farmacêuticos S. A., São Paulo, S.P) foram mantidas como solução estoque de 400 mg/mL e 100 mg/mL, respectivamente e estocadas em *freezer* a -20 °C e descongeladas no momento do uso.

Para o teste de oxidação foi utilizado o radical DPPH (2,2-Diphenyl-1-picryl-hidrazil) (PM = 394,3).

3.4.3. Metodologia e Princípios Bioquímicos para Avaliação dos Perfis Glicêmicos e Lipídicos

3.4.3.1. Glicose

A determinação do nível de glicose plasmática foi realizada pelo método enzimático (Glicose GOD-ANA LABTESTE®, Labtest, Lagoa Santa, Minas Gerais, Brasil), que tem como princípio a catalização oxidativa da glicose pela glicose oxidase (oxigênio-1-oxidoreductase), através da reação.



O peróxido de hidrogênio formado reage com 4-aminoantipirina e fenol, sob ação catalisadora da peroxidase (POD-Doador: hidrogênio-peróxido oxidoreductase), através de uma reação oxidativa de acoplamento, formando uma antipirilquinonimina vermelha cuja

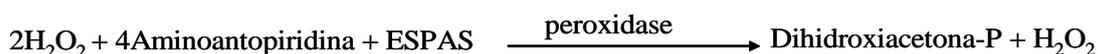
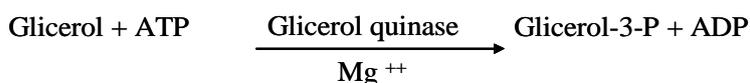
intensidade de cor é proporcional à concentração da glicose na amostra representada na equação abaixo.



Dentre os reagentes envolvidos: fosfatos 70 mmol/L, fenol 5 mmol/L, glicose oxidase > 10 U/mL, peroxidase > 1 U/mL, 4-aminoantipirina 0,4 mmol/L, pH 7,5 e o padrão de glicose (Glicose 100 mg/dL). Após obtenção das amostras, as mesmas foram imersas em banho-maria a 37 °C por um período de 15 minutos sendo depois retiradas e resfriadas em água corrente por 5 minutos. As quantificações séricas da glicose foram obtidas através da densidade ótica aferida pelo espectrofotômetro e uma tabela de correlação entre a densidade ótica e a concentração de glicose (TIESTZ, 1970). Somente animais com glicemia igual ou superior a 200 mg/dL foram incluídos no estudo.

3.4.3.2. Triglicerídeos

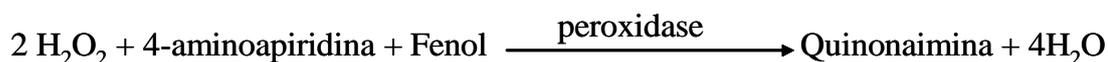
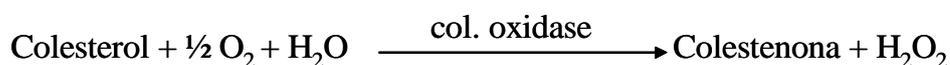
O método utilizado para a determinação dos triglicerídeos foi o enzimático de Trinder (Triglicérides GPO-ANA LABTESTE[®], Labtest, Lagoa Santa, Minas Gerais, Brasil), que tem como princípio a reação de hidrólise dos triglicerídeos pela lipase lipoproteica, onde o glicerol liberado é fosforilado pelo glicerol quinase, formando glicerol fosfato, que é oxidado a dihidroxiacetona e água oxigenada por ação da glicerol-3-fosfato oxidase. Através da reação oxidativa catalisada pela peroxidase, a água oxigenada reage com a 4-aminoantipirina e ESPAS (N-etil-N (3-sulfopropil)-m-anisidina/surfatante), produzindo a antipirilquinonimina que é um complexo colorido cuja absorbância é quantificada em 540 nm por espectrofotometria, com valores diretamente proporcionais à concentração de triglicerídeos (TONKS, 1970). As equações destas reações são descritas a seguir.



Os reagentes utilizados para a análise foram: pipes 45 mmol/l, 4-clorofenol 6 mmol/l, cloreto de magnésio 5 mmol/l, lipase > 100 u/ml, glicerol quinase > 1,5 u/ml, glicerol - 3 - fosfato oxidase > 4 u/ml, peroxidase > 0,8 u/ml, 4-aminoantipirina 0,75 mmol/l, atp 0,9 mmol/l com ph 7,5. O padrão foi o glicerol quantitativamente equivalente a 200 mg/dl de trioleína (TONKS, 1970).

3.4.3.3. Colesterol Total

Para a determinação do colesterol total foi utilizado o método enzimático de Trinder (Triglicérides GPO-ANA LABTESTE[®], Labtest, Lagoa Santa, Minas Gerais, Brasil), onde os ésteres de colesterol são hidrolisados pelo colesterol-esterase formando o colesterol livre que, após oxidação pela colesterol oxidase, forma o peróxido de hidrogênio. Este, reagindo com o fenol e 4-aminoantipirina, através de copulação oxidativa catalisada pela peroxidases, produz uma quinonimina de cor vermelha, cuja absorbância, medida em 500nm, é diretamente proporcional à concentração de colesterol da amostra (TONKS, 1970). As equações destas reações são descritas abaixo.



3.4.3.4. Colesterol HDL

O método utilizado para a determinação do colesterol HDL foi o enzimático de Trinder (Triglicérides GPO-ANA LABTESTE[®], Labtest, Lagoa Santa, Minas Gerais, Brasil), onde os quilomícrons e as lipoproteínas de baixíssima densidade (VLDL) e de baixa densidade (LDL) presentes na amostra, precipitam em presença de fosfotungstato e íons magnésio. O sobrenadante da centrifugação contém as lipoproteínas de elevada densidade (HDL), cujo colesterol quantifica-se espectrofotometricamente; as reações são semelhantes às descritas para o colesterol total (TONKS, 1970).

Os reagentes envolvidos nesta análise foram; fosfatos 35 mmol/L, colesterol esterase > 0,2 U/mL, colesterol oxidase > 0,1 U/mL, peroxidase > 1 U/mL, 4-aminoantipirina 0,5 mmol/L, colato sódico 0,5 mmol/L, diclorofenol-sulfonado 4mmol/l, Fosfotungstato 0,4 mmol/L, acetato de magnésio 20 mmol/L, com pH 7,0 (TONKS, 1970).

3.4.3.5 Colesterol LDL

O teor de colesterol LDL foi calculado através da fórmula da Friedwald, descrita abaixo; para níveis de triglicérides menores ou iguais a 400 mg/dl (FRIEDWALD *et al.*, 1972).

$$\text{LDL-colesterol} = \text{CT} - (\text{HDL-colesterol} + \text{TG}/5)$$

Onde:

LDL-colesterol = *low density lipoprotein*, lipoproteína de baixa densidade

CT = colesterol total sérico

HDL-colesterol = *high density lipoprotein*, lipoproteína de alta densidade

TG/5 = triglicérides/5 = VLDL = lipoproteína de muito baixa densidade

3.4.3.6 Aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT)

O sistema para medida da atividade da aspartato aminotransferase (AST) em amostra de sangue foi realizado por método cinético de tempo fixo e medição de ponto final. Aplicação manual e semi-automática. A metodologia utilizada foi a Labtest®. Temperatura de armazenamento: entre 2-8°C. Linearidade: 190 U/mL Comprimento de onda: 505 nm (490 - 540 nm).

3.4.3.7 Coleta de Sangue e Análise Histopatológica

Após tratamento com OFCC e salina, os animais foram submetidos a jejum de 12h e anestesiados com éter etílico e através de um tubo micro hematócrito foi feita a punção do sangue no plexo venoso orbital. Este procedimento fez-se no fim do tratamento para análise de parâmetros bioquímicos (concentração de glicose, aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), colesterol total, HDL-c e triglicérides). Os animais foram pesados semanalmente.

Ao final do período experimental os animais foram sacrificados por deslocamento cervical seguido de sangria por secção dos vasos cervicais. O coração, fígado e aorta foram coletados de todos os grupos (tratados com OFCC e tratados com salina) e fixados em formaldeído a 10%. Os fragmentos foram desidratados, diafanizados e cortados em micrótomo numa espessura de 5 µm. O material foi corado com Hematoxilina-Eosina e as lâminas avaliadas por microscopia ótica (CORMACK, 1991).

3.4.4 Avaliação dos Efeitos do OFCC sobre os Parâmetros Bioquímicos Nos Soros de Ratos e no Ganho de Peso Corporal, após Tratamento por via oral (v.o.) durante 7, 15 e 30 dias.

Neste experimento, foi avaliado o efeito da administração do OFCC, durante 7, 15 e 30 dias de tratamento, no perfil glicêmico e lipídico e ganho de peso corporal (Tabela 7).

Os animais foram divididos em grupo A: tratamento por 7 dias (n=40) ; grupo B: tratamento por 15 dias (n=40); grupo C: tratamento por 30 dias (n=40). Durante cada período, os animais foram tratados com doses de OFCC 2000, 1000 e 500 mg/Kg e com salina a 0,9% (v.o.). Amostras de sangue (2 mL) foram coletadas através do plexo infra orbital em tubos de coleta de soro de 2 mL com gel separador (Vacuette, São Paulo, S.P., Brasil), após 7, 15 e 30 dias de tratamento diário finalizando o protocolo. Foram avaliados os seguintes parâmetros bioquímicos: glicemia, colesterol total, HDL-c, LDL-c, TG, AST (aspartato aminotransferase) e ALT (alanina aminotransferase). As amostras de sangue foram centrifugadas e enviadas para análise.

TABELA 7 - Grupos Experimentais Selecionados para Avaliação dos Efeitos nos Parâmetros Bioquímicos, após Tratamento Oral com OFCC, durante 7 (Grupo A), 15 (Grupo B) e 30 (Grupo C) dias.

	Grupo	Dose	via	N
I	Salina	1mL/Kg	v.o	10
II	OFCC	2000 mg/Kg	v.o	10
III	OFCC	1000mg/Kg	v.o	10
IV	OFCC	500 mg/Kg	v.o	10

n = 10 animais / grupo.

3.4.5. Avaliação do Potencial Hipolipemiante do OFCC em Modelos de Hipertrigliceridemia Induzida por Triton WR-1339 em ratos.

No ensaio biológico, os ratos machos receberam a dieta marca Purina® e água à vontade durante o experimento. Os animais foram separados em seis grupos aleatórios (n=10/cada grupo), e tratados por 15 dias com: I- salina (1 mL/Kg; v.o.); II- salina (1 mL/Kg; v.o.); III- gemfibrozila (100 mg/Kg; v.o.); IV- OFCC (2000 mg/Kg; v.o.); V- OFCC (1000 mg/Kg; v.o.); VI- OFCC (500 mg/Kg; v.o.).

Seguindo a mesma metodologia utilizada por Silva (2000), após 15 dias de tratamento foi induzida a hiperlipidemia, sendo administrado por via intraperitoneal, na dose de 400 mg/kg de peso corporal, dissolvido em NaCl a 0,9%, Triton WR-1339, também conhecido como Tyloxapol (*Sigma Aldrich*), um detergente não aniônico de estrutura polimérica,

seguindo o modelo experimental desenvolvido por Mathur *et al.* (1964). Os grupos foram organizados no dia da indução conforme se observa na tabela 8 e tratados de acordo com o protocolo apresentado na figura 8.

TABELA 8 - Grupos Experimentais Selecionados para a Verificação do Óleo Fixo do *Caryocar Coriaceum* (OFCC) na Dislipidemia Induzida por Tiloxapol (n=10/cada grupo)

Grupo	Tratamento
I	salina (1 mL/Kg; i.p.) + salina (1 mL/Kg; v.o.)
II	tiloxapol (400 mg/Kg; i.p.) + salina (1 mL/Kg; v.o.)
III	tiloxapol (400 mg/Kg; i.p.) + gemfibrozila 100 mg/Kg; v.o.)
IV	tiloxapol (400 mg/Kg; i.p.) + OFCC (2000 mg/Kg; v.o.)
V	tiloxapol (400 mg/Kg; i.p.) + OFCC (1000 mg/Kg; v.o.)
VI	tiloxapol (400 mg/Kg; i.p.) + OFCC (500 mg/Kg; v.o.)

n = 10 animais / grupo.

FIGURA 8 - Protocolo de Avaliação do Efeito do Óleo Fixo do *Caryocar Coriaceum* (OFCC) na Dislipidemia Induzida por Tiloxapol

-1h	0h	2h	24h	26h	48h
Drogas teste (OFCC) e controles (gemfibrozila, salina) (v.o.)	Tiloxapol ou Salina (i.p.)	Drogas teste (OFCC) e controles (gemfibrozila, salina) (v.o.)	Coleta de sangue (Infra orbital)	Drogas teste (OFCC) e controles (gemfibrozila, salina) (v.o.)	Coleta de sangue (Infra orbital)

Decorridas 24 e 48 horas destas administrações, os animais foram anestesiados com éter etílico, por via inalatória, e, por punção infra-orbital, foram colhidas as amostras de sangue. A seguir, estas amostras foram centrifugadas a 7100G, durante 15 minutos, para obtenção do soro. Foram avaliados os seguintes parâmetros bioquímicos: glicemia, colesterol total, HDL-c, TG, AST e ALT. Para as quantificações, utilizou-se espectrofotômetro da marca Hitachi.

3.4.6. Avaliação do Efeito Anti-Inflamatório do OFCC com Tratamento por via oral: Edema de Pata Induzido por Carragenina em Ratos *Wistar*

Os animais foram divididos em grupo A: tratamento por 7 dias (n=40) ; grupo B: tratamento por 15 dias (n=40); grupo C: tratamento por 30 dias (n=40). Durante cada período, os animais foram tratados com de OFCC 2000, 1000 e 500 mg/Kg e com salina a 0,9% (v.o.). Após cada tratamento, o volume inicial (V_i) da pata posterior direita dos animais foi registrado através de um pletismógrafo (Ugo Basile®). Em seguida, os animais foram pré-tratados, por via oral, com veículo salina 0,9%, indometacina 10 mg/kg ou OFCC nas doses de 2000 mg/kg, 1000 mg/kg e 500 mg/kg. Após 1 hora, receberam uma injeção intraplantar de carragenina 2%, uma substância que induz a liberação de vários mediadores da inflamação,

(p/v) na pata posterior direita (0,2 mL/pata). O volume da pata traseira direita de cada animal foi avaliado novamente através do pletismógrafo após 1, 2, 3 e 4 h da injeção do agente flogístico (carragenina). Os resultados foram expressos como a diferença entre o volume final da pata a cada tempo (V_f) e o volume inicial (V_i), representados pela fórmula: $V_e = V_f - V_i$, onde V_e representa o volume do edema (em mL). (WINTER *et al.*, 1962).

3.4.7. Análise do Potencial Antioxidante *in vitro* - Redução do Radical DPPH (2,2-Difenil-1-Picril Hidrazila)

3.4.7.1. Determinação Quantitativa

A atividade antioxidante do OFCC foi determinada através da capacidade dos antioxidantes presentes nas amostras em sequestrar o radical estável DPPH (2,2-difenil-1-picril hidrazila), produzindo um decréscimo da absorbância a 515 nm. (BRAND-WILLIAMS *et al.*, 1995, modificado por SÁNCHEZ-MORENO *et al.*, 1998)

A quantificação da descoloração foi obtida mediante leitura em ultravioleta em 517 nm, sempre fazendo uma comparação com padrões (controle positivo). Inicialmente, foi preparada uma solução dissolvendo 2,4 mg de DPPH em álcool metílico e completando o volume para 100 mL em um balão volumétrico com álcool metílico. Foi feita homogeneização e transferência para um frasco de vidro âmbar, devidamente etiquetado, mantida sob refrigeração e protegida da luz. A partir da solução inicial de DPPH (60 μ M), foram feitas diluições em balões volumétricos de 10 mL, soluções variando a concentração de 10 μ M a 50 μ M (RUFINO *et al.*, 2007).

Em ambiente escuro, foi transferida uma alíquota de, aproximadamente, 4 mL de cada solução de DPPH (10 μ M, 20 μ M, 30 μ M, 40 μ M, 50 μ M e 60 μ M) para cubetas de vidro e foi realizada a leitura em espectrofotômetro a 515 nm. Tendo como “branco” o álcool etílico, para calibração do espectrofotômetro (SÁNCHEZ-MORENO *et al.*, 1998).

3.4.7.2. Leitura das Medidas de Absorbância nas Amostras

A partir de alíquotas do OFCC, foram feitas em tubos de ensaio três diluições diferentes em triplicata, nas concentrações de 1mg/mL. Em ambiente escuro, foi transferida uma alíquota de 0,1 mL de cada diluição do OFCC para tubos de ensaio com 3,9 mL do radical DPPH (item solução de DPPH 0,06 mM) e homogeneizado em agitador de tubos. Foi utilizada 0,1 mL da solução controle (solução controle de álcool metílico, acetona e água) com 3,9 mL do radical DPPH e homogeneizada. As leituras (515 nm) foram monitoradas a cada minuto, sendo observada a redução da absorbância até sua estabilização. A leitura da absorbância final para o cálculo do IC50 foi feita após a estabilização da absorbância (tempo IC50) (RUFINO *et al.*, 2007).

Após a leitura, foi substituído (Equação 1) pelo valor correspondente a metade da absorbância inicial do controle pelo y da equação da curva do DPPH (Equação 2) para encontrar o consumo em μM DPPH e, em seguida, transformado para g DPPH (RUFINO *et al.*, 2007).

Equivalência de Controle e DPPH

$$y = ax + b \text{ (Equação 1)}$$

(Equação da curva do DPPH),

Cálculo do IC50

IC50 é definido com a menor concentração em $\mu\text{g.mL}^{-1}$ presente na cubeta, requerido para decrescer a concentração inicial de DPPH em 50%.

$$y = - az + b \text{ (Equação 2)}$$

onde:

x = resultado em μM DPPH

y = Absorbância inicial do controle / 2 (item determinação da atividade antioxidante total)

$z = IC_{50}$ ($\mu\text{g/mL}$).

IC₅₀ expresso em g OFCC / g DPPH

$\text{g OFCC} / \text{g DPPH} = (\text{EC}_{50} (\text{mg/L}) / 1.000 * 1) / \text{g DPPH}$ (Equação 3)

Obs.: conversão para g DPPH, através da transformação:

$\text{g DPPH} = (\mu\text{M DPPH} / 1.000.000) * 394,3$ (peso molecular do DPPH).

3.4.8. Análise do Potencial Anti-Inflamatório *in vitro* – Medida da Liberação da Mieloperoxidase (MPO)

3.4.8.1. Obtenção de Neutrófilo

Os polimorfonucleares, predominantemente neutrófilos (80-90%) foram obtidos a partir de sangue humano cedido pelo Centro de Hemoterapia e Hematologia do Ceará. As células foram isoladas de acordo com método descrito por Henson (1971) e modificado por Lucisano & Mantovani (1984).

3.4.8.2. Desgranulação dos Neutrófilos.

A suspensão de neutrófilos (5×10^6 células/mL) foi incubada com óleo fixo do *Caryocar coriaceum* (OFCC; 1, 10, 50, 100 e 200 $\mu\text{g/mL}$), indometacina (35,7 $\mu\text{g/mL}$, fármaco padrão), Veículo (DMSO (Dimetilsulfóxido) – 1% em água) ou solução de Hanks (células não-tratadas). A seguir foi adicionado) (0,1 μM) e após 15 minutos, o material foi centrifugado. O sobrenadante obtido, rico em enzimas liberadas pela desgranulação leucocitária, foi utilizado para mensuração da enzima mieloperoxidase segundo metodologia descrita por Úbeda *et al.* (2002).

3.4.8.3. Ensaio de Mieloperoxidase

Ao sobrenadante foi adicionado PBS (solução tampão fosfato salino), tampão fosfato e H₂O₂. Decorrido 15 minutos, a 37°C foi adicionado 3,3',3,5'- tetrametilbenzidina (TMB) e a reação foi interrompida pela adição de acetato de sódio. A absorvância foi determinada a 620 nm. A construção de uma curva padrão pela adição de quantidades crescentes de MPO (0,125 – 3 U/mL) permitiu relacionar as absorvâncias obtidas com as unidades enzimáticas/mL (De Young et al., 1989).

As leituras foram feitas em replicatas (de três a seis), repetidas por três dias consecutivos.

3.5. Análise Estatística

Para facilitar a análise e visualização dos dados, estes foram organizados e agrupados de acordo com o objetivo do estudo e dispostos em tabelas e gráficos, elaborados nos programas Microsoft Excel e Microsoft Word, versão 2007 (Microsoft Co, USA).

Em seguida foram submetidas à análise estatística, onde foi utilizado para esse fim, o programa Graphpad Prism, versão 5.0 (Graphpad Software Inc, CA, USA). Os dados apresentados são expressos em média ± erro-padrão da média (E.P.M.). Para os ensaios que possuem três ou mais grupos e uma única avaliação das amostras, as diferenças obtidas entre os grupos foram submetidas à análise de variância (ANOVA) de uma via, seguindo-se do teste de Student-Newmann-Keuls. As diferenças entre os grupos foram submetidas à ANOVA de duas vias, seguindo-se do teste de Bonferroni. Foram consideradas diferenças significativas valores de $P < 0,05$.

Capítulo

4

Resultados

4. RESULTADOS

4.1. Identificação dos Ácidos Graxos do Óleo Fixo do *Caryocar Coriaceum* (OFCC)

Neste trabalho foi efetuada a análise química específica para identificação e quantificação de ácidos graxos no OFCC. Foi obtido em média 4,5 g de óleo da polpa com rendimento médio de 45%. Através da análise de CG/EM foi possível identificar a presença majoritária de ácidos graxos insaturados (64,2 %) quando comparados com os saturados (35,8 %), conforme mostrado na Tabela 9.

TABELA 9 - Constituintes Químicos Identificados no Óleo Fixo de *C. coriaceum* (OFCC).

Ácidos Graxos	Tempo de retenção (min)	(%)
Palmítico (C16:0)	25,5	34,1
Esteárico (C18:0)	29,1	1,7
Palmitoléico (C16:1)	26,7	0,3
Oléico (C18:1)	29,5	55,8
Linoléico (C18:2)	29,9	1,8
Heptadecenóico (C17:1)	30,6	5,9
Licosenóico(C20:1)	33,5	0,4
Total		100.0

4.2. Avaliação da Toxicidade Sub-Crônica

Durante o tratamento diário, por via oral, nas doses de 2000 mg/Kg, 1000 mg/Kg e 500 mg/Kg de OFCC, não foram observadas alterações do comportamento, nem nas condições físicas dos animais e nenhum óbito nos grupos experimentados. Nos grupos tratados com OFCC, houve um aumento progressivo de peso semanalmente que não foi diferente do grupo controle tratado com salina (Tabela 10, 11 e 12).

TABELA 10 - Ganho de Peso Corporal de Ratos, ao Fim de 7 dias de Tratamento com Óleo Fixo de *C. Coriaceum* (OFCC)

Grupo 7 dias	Peso inicial (g)	Peso final (g)	Ganho de peso (%)
OFCC 2000	194,2 ± 6,7	198,7 ± 6,1	2,3
OFCC 1000	196,6 ± 6,7	201,4 ± 5,9	2,4
OFCC 500	199,1 ± 6,0	202,9 ± 6,2	1,9
Controle Salina 0,9%	192,8 ± 6,7	196,9 ± 6,6	2,1

Os valores representam média erro ± padrão da média (E.P.M.), (n=10). Análise estatística: teste de Student-Newmann-Keuls.

TABELA 11 - Ganho de Peso Corporal de Ratos, ao Fim de 15 dias de Tratamento com Óleo Fixo de *C. Coriaceum* (OFCC)

Grupo 15 dias	Peso inicial (g)	Peso 7 dias (g)	Peso final (g)	Ganho de peso (%)
OFCC 2000	191,5 ± 7,5	196,3 ± 6,9	204,7 ± 7,4	6,3
OFCC 1000	194,3 ± 8,0	198,8 ± 8,1	209,4 ± 8,4	7,2
OFCC 500	193,2 ± 7,3	199,2 ± 7,0	208,9 ± 5,9	8,1
Controle Salina 0,9%	199,1 ± 6,9	202,9 ± 6,9	210,3 ± 6,2	5,6

Os valores representam média ± erro padrão da média (E.P.M.), (n=10). Análise estatística: teste de Student-Newmann-Keuls.

TABELA 12 - Ganho de Peso Corporal de Ratos, ao Fim de 30 dias de Tratamento com Óleo Fixo de *C. Coriaceum* (OFCC)

Grupo 30 dias	Peso inicial (g)	Peso 7 dias (g)	Peso 15 dias (g)	Peso final (g)	Ganho (%)
OFCC 2000	195,7 ± 6,4	200,7 ± 6,1	209,8 ± 6,5	234,8 ± 6,5	19,9
OFCC 1000	194,8 ± 7,4	200,4 ± 9,2	210,7 ± 10,0	236,9 ± 6,8	21
OFCC 500	194 ± 6,6	199,7 ± 6,7	209,8 ± 6,4	237,2 ± 5,0	22
Controle Salina 0,9%	201,8 ± 9,2	207,8 ± 6,3	215,3 ± 6,6	241,2 ± 8,2	16,3

Os valores representam média ± erro padrão da média (E.P.M.), (n=10). Análise estatística: teste de Student-Newmann-Keuls.

Em relação aos parâmetros bioquímicos séricos avaliados, o tratamento com OFCC (2000, 1000 e 500 mg/Kg v.o), durante 7, 15 e 30 dias não revelou alterações nas concentração de transaminase glutâmica oxalacética (AST) e alanina aminotransferase (ALT) (Figuras 9 e 10).

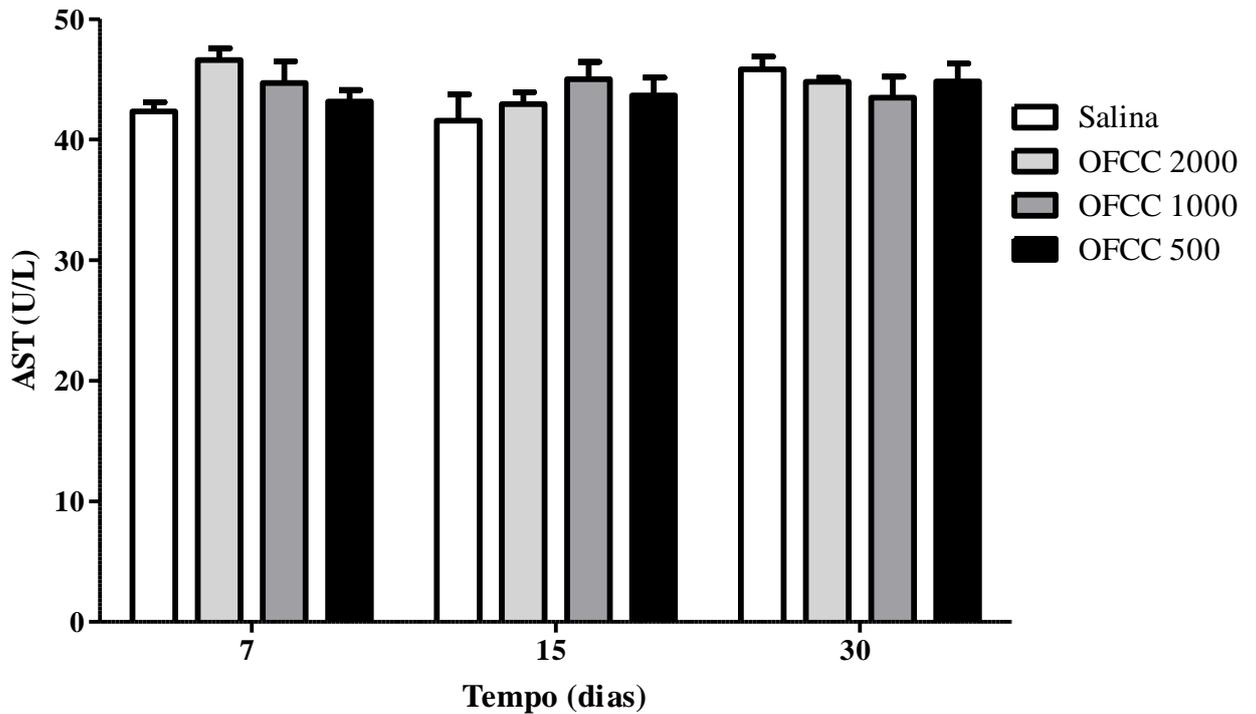


FIGURA 9 - Níveis de AST de Ratos *Wistar* depois do Tratamento Oral por 7, 15 e 30 dias nas Doses 2000 mg/Kg/dia, 1000 mg/Kg/dia e 500 mg/Kg/dia do OFCC ou Salina 0,9%. Cada grupo representa a média de 10 animais e as barras verticais o E. P. M. As médias foram comparadas com o grupo controle salina. Análise estatística: ANOVA de uma via seguido do teste de Student-Newmann-Keuls.

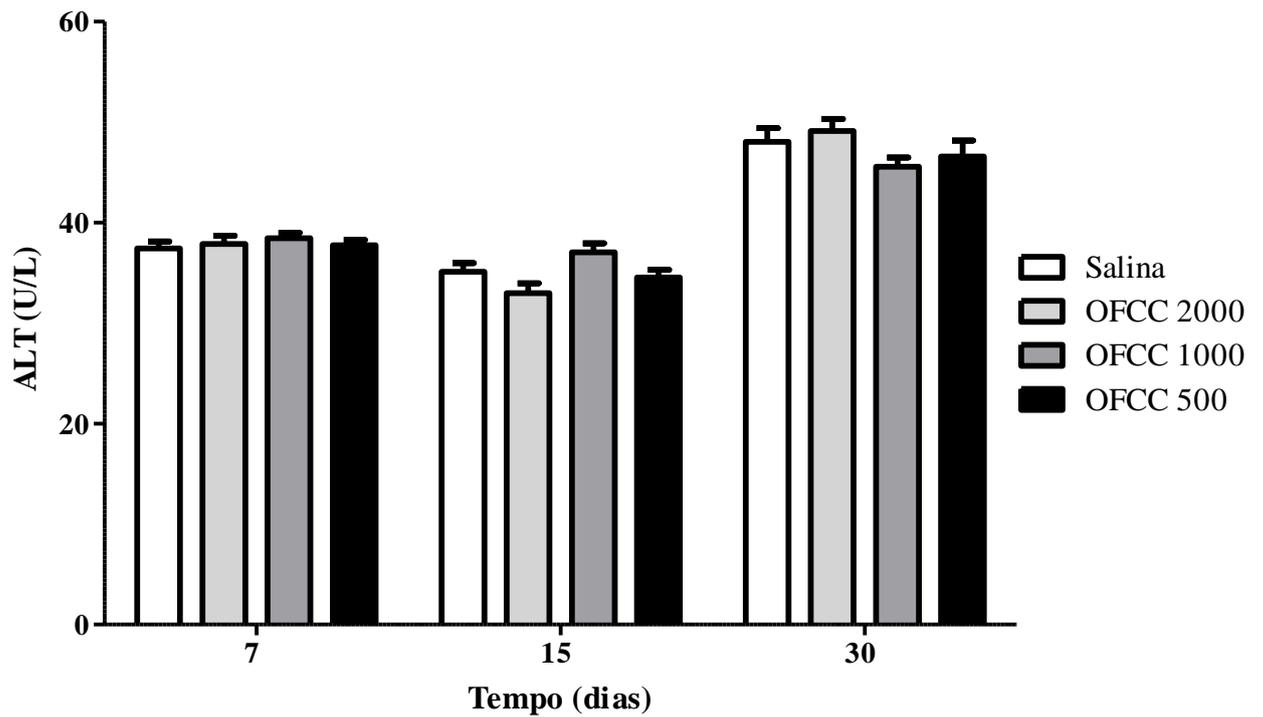


FIGURA 10 - Níveis de ALT de Ratos *Wistar* depois do Tratamento Oral por 7, 15 e 30 dias nas Doses 2000 mg/Kg/dia, 1000 mg/Kg/dia e 500 mg/Kg/dia do OFCC ou Salina 0,9%. Cada grupo representa a média de 10 animais e as barras verticais o E. P. M. As médias foram comparadas com o grupo controle salina. Análise estatística: ANOVA de uma via seguido do teste de Student-Newmann-Keuls.

Porém com o tratamento de 30 dias, observou-se aumento de 36% e 24% na glicose nas doses de 2000 mg/Kg ($115,3 \pm 6,15$ mg/dL) e 1000 mg/Kg (109 ± 5 mg/dL), respectivamente, quando comparadas ao controle salina 30 dias ($84,6 \pm 4,0$ mg/dL). Não se observando alterações na glicose nos demais tratamentos (Figura 11).

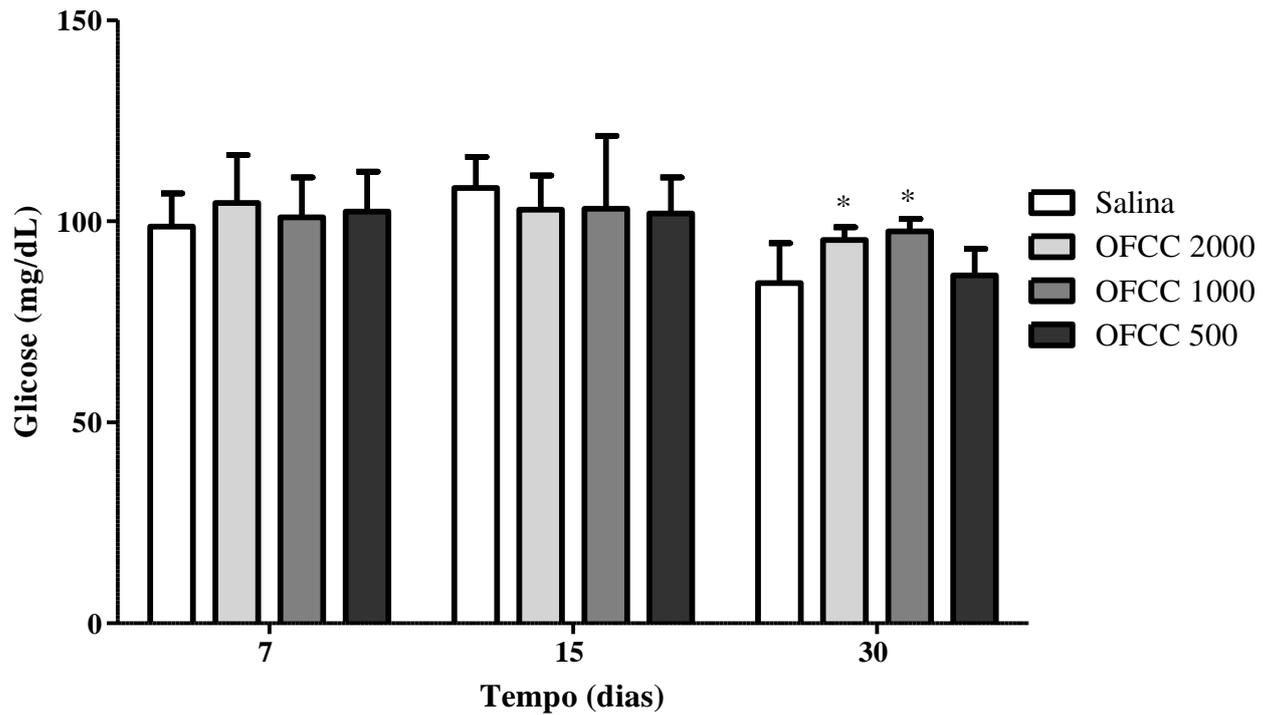


FIGURA 11 - Perfil Glicêmico de Ratos *Wistar* depois do Tratamento Oral por 7, 15 e 30 dias nas Doses 2000 mg/Kg/dia, 1000 mg/Kg/dia e 500 mg/Kg/dia do OFCC ou Salina 0,9%. As médias foram comparadas com o grupo controle salina. Análise estatística: ANOVA de uma via seguido do teste de Student-Newmann-Keuls.

Ao longo do tratamento diário de 30 dias, os níveis séricos de colesterol total ($111,6 \pm 6,8$ mg/dL vs. $133,8 \pm 5,3$ mg/dL) diminuíram em 16% na dose de 2000 mg/Kg, comparado ao controle salina (Figura 12). A administração oral do OFCC diariamente, na dose de 2000 mg/Kg, durante 30 dias reduziu em 31% os níveis de triglicerídeos, quando comparado ao grupo controle ($106,7 \pm 4,2$ mg/dL v.s. $139,1$ mg/dL $\pm 6,8$) (Figura 13).

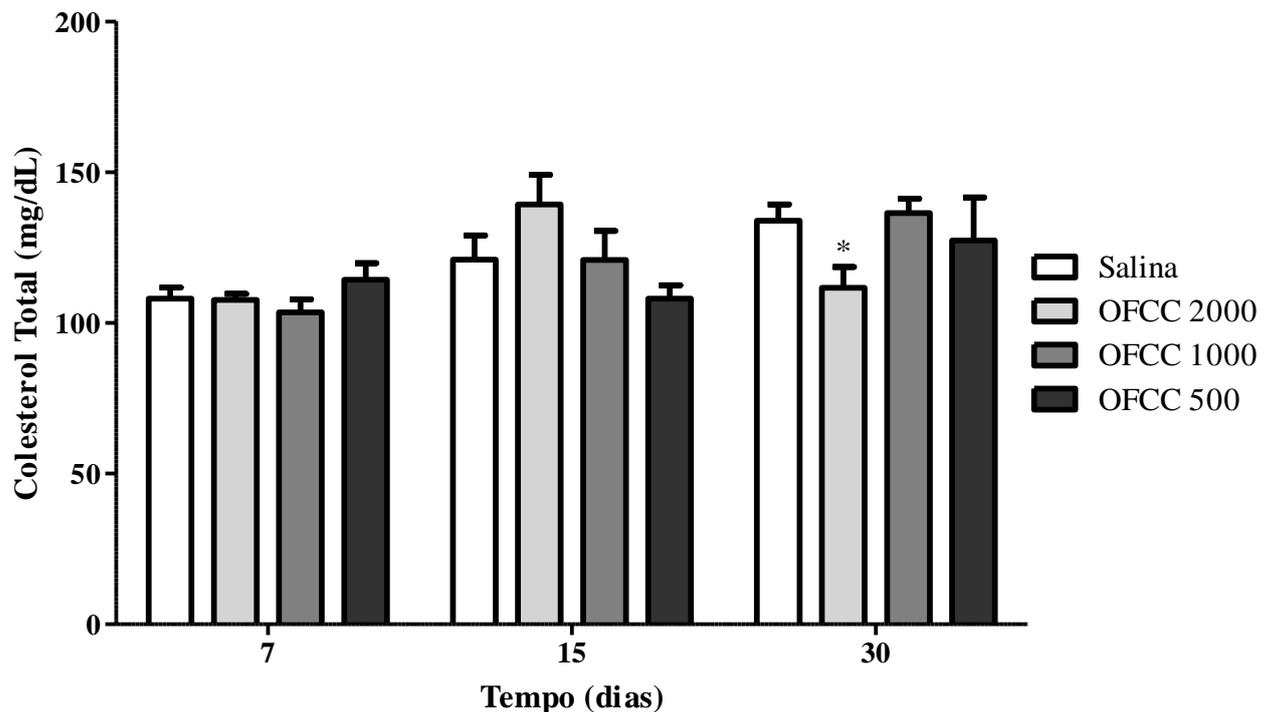


FIGURA 12 - Níveis de CT de Ratos Wistar depois do Tratamento Oral por 7, 15 e 30 dias nas Doses 2000 mg/Kg/dia, 1000 mg/Kg/dia e 500 mg/Kg/dia do OFCC ou Salina 0,9%. As médias foram comparadas com o grupo controle salina. Análise estatística: ANOVA de uma via seguido do teste de Student-Newmann-Keuls.

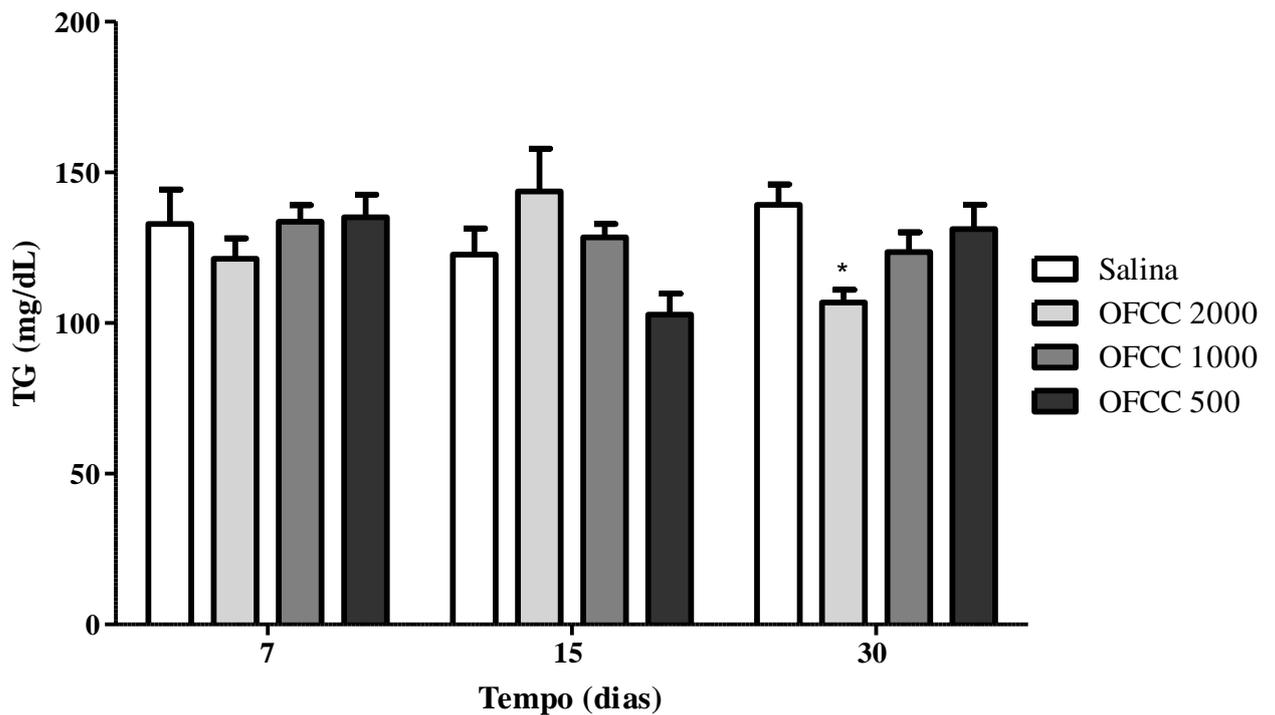


FIGURA 13- Níveis de TG de Ratos *Wistar* depois do Tratamento Oral por 7, 15 e 30 dias nas Doses 2000 mg/Kg/dia, 1000 mg/Kg/dia e 500 mg/Kg/dia do OFCC ou Salina. As médias foram comparadas com o grupo controle salina. Análise estatística: ANOVA de uma via seguido do teste de Student-Newmann-Keuls.

O tratamento com o OFCC durante 15 dias aumentou significativamente os níveis HDL-c dos animais nas três doses usadas 2000 mg/Kg/dia (39%), 1000 mg/Kg/dia (41%) e 500 mg/Kg/dia (35%). Também foi observado o aumento dos níveis de HDL-c com 30 dias de tratamento com OFCC nas doses 2000 mg/Kg/dia (70%), 1000 mg/Kg/dia (62%) e 500 mg/Kg/dia (43%) (Figura 14).

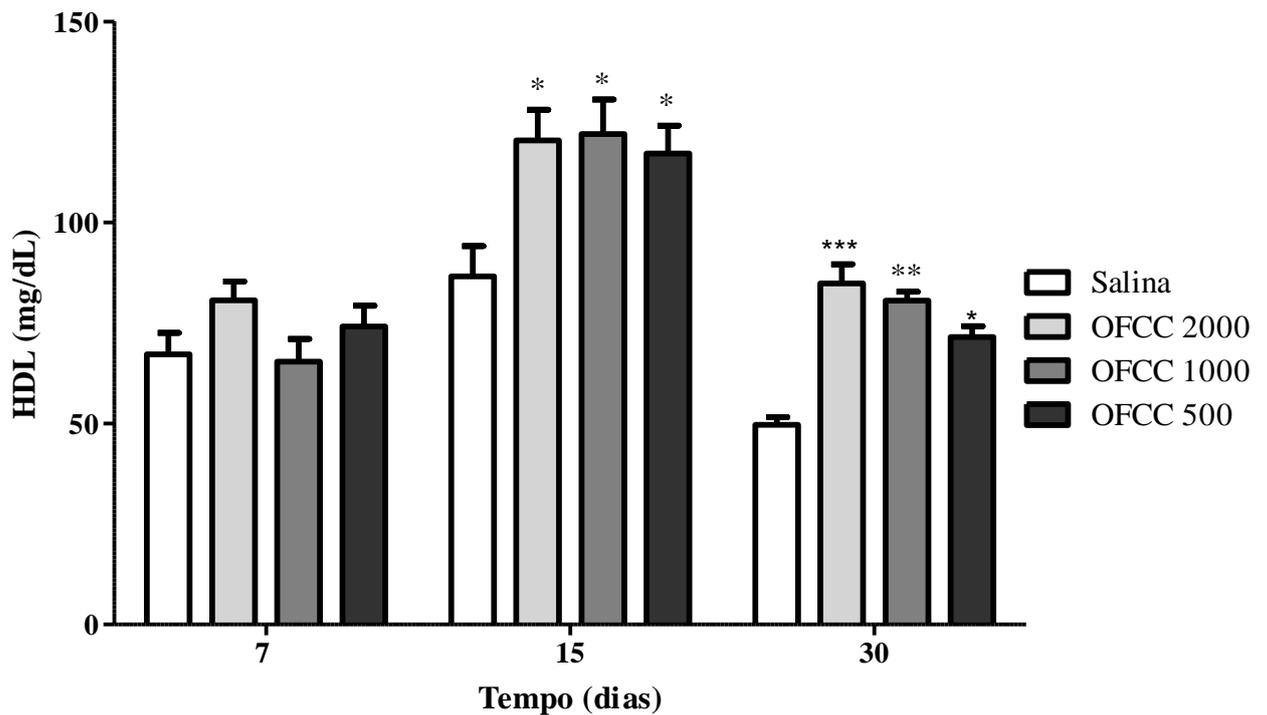


FIGURA 14 - Níveis HDL-c de Ratos *Wistar* depois do Tratamento Oral por 7, 15 e 30 dias nas doses 2000 mg/Kg/dia, 1000 mg/Kg/dia e 500 mg/Kg/dia do OFCC ou Salina 0,9%. As médias foram comparadas com o grupo controle salina. Análise estatística: ANOVA de uma via seguido do teste de Student-Newmann-Keuls.

4.3. Estudo Histopatológico Hepático, Aórtico e Cardíaco de Ratos *Wistar* depois de 7, 15 e 30 dias do Tratamento Oral com Óleo Fixo do *Caryocar Coriaceum* (OFCC)

A análise histopatológica da aorta e coração não revelou alterações na estrutura padrão dos tecidos estudados, após administração de 2000 mg/kg, 1000 mg/kg e 500 mg/kg do óleo fixo do *Caryocar coriaceum* (OFCC) em ratos durante 7, 15 e 30 dias. No estudo histológico do fígado, foi evidenciada esteatose macrogoticular focal em dois animais (n=10) no tratamento por 30 dias na dose de 2000 mg/Kg, efeito que não foi repetido nas doses de 500 e 1000 mg/Kg e nos tratamentos de 7 e 15 dias, ver nas figuras 15 a 18, fotos das lâminas representativas,



FIGURA 15.- HE 40X - Coração histologicamente normal (Ventrículo esquerdo- a esquerda (*VE)/Ventrículo direito (*VD) - a direita). Tratamento com OFCC por 30 dias na dose de 2000 mg/Kg. Mi= miocárdio; En= endocárdio; Ep= epicárdio

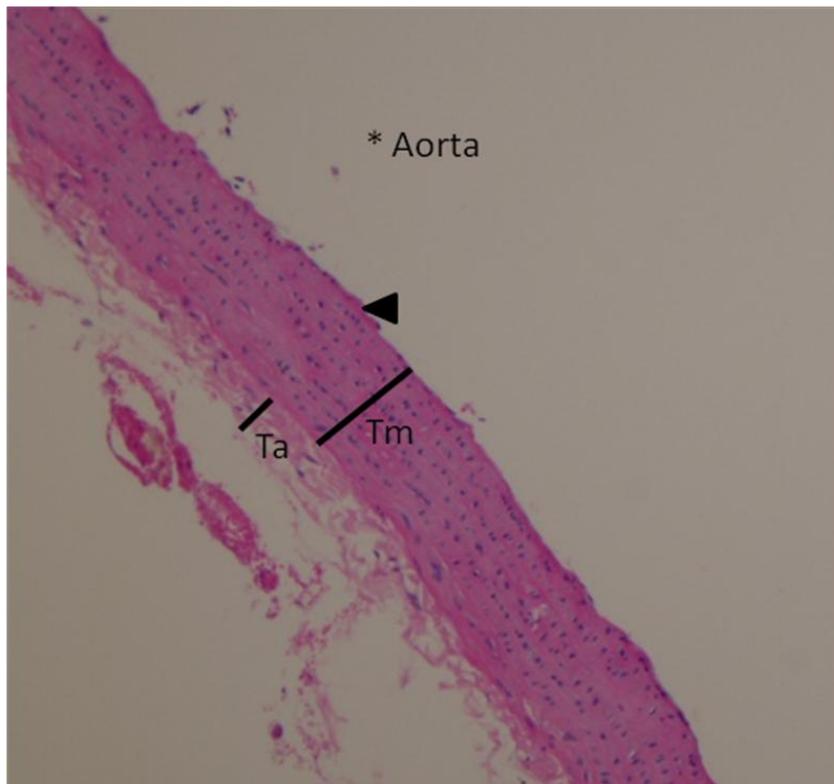


FIGURA 16- HE 40X - Artéria histologicamente normal em corte longitudinal. Tratamento com OFCC por 30 dias na dose de 2000 mg/Kg. Ti= túnica íntima; Tm= túnica média; Ta= túnica adventícia

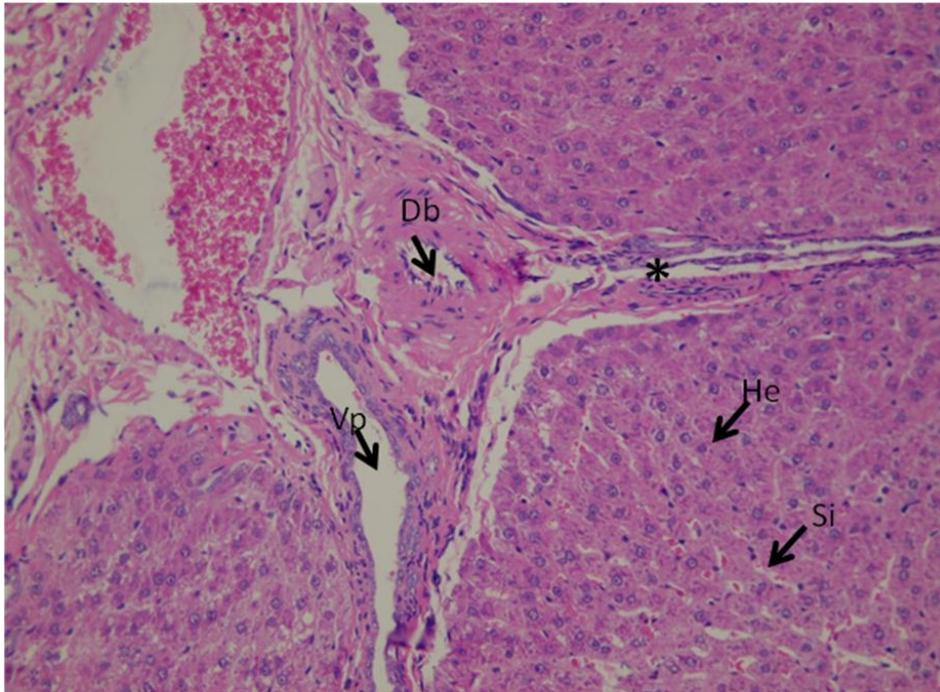


FIGURA 17 - HE 400x - Fígado histologicamente normal. *Representação de espaço-porta no centro da figura. Tratamento com OFCC por 30 dias na dose de 2000 mg/Kg. Ah= ramo da artéria hepática; Vp= veia porta; Db= ducto bilífero; He= hepatócito; Si: sinusóide.

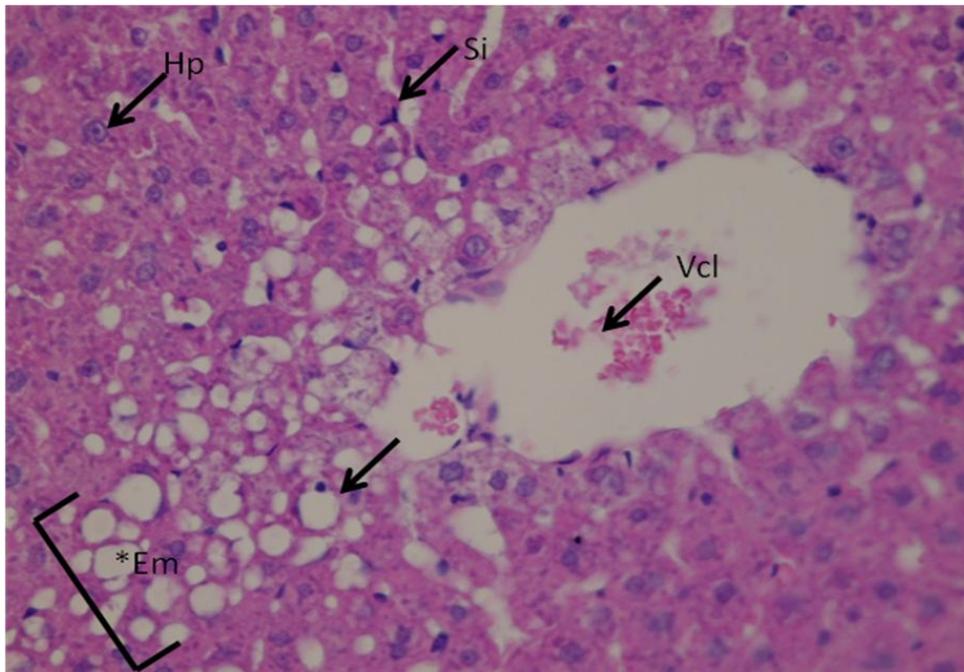


FIGURA 18 - HE 400X - Esteatose macrogoticular focal (*Em), a esquerda da veia centro-lobular hepática Tratamento com OFCC por 30 dias na dose de 2000 mg/Kg. Vcl= veia centro-lobular; Si= sinusóide; Hp= hepatócito

4.4. Atividade Hipolipemiante do Óleo Fixo do *Caryocar Coriaceum* (OFCC) em Ratos Submetidos à Dislipidemia Induzida por Tiloxapol

A administração oral do óleo fixo do *Caryocar coriaceum* (OFCC) diariamente durante 15 dias em ratos corrigiu tanto a dislipidemia induzida pelo tiloxapol, quando comparados a animais controle. Amostras de sangue foram coletadas do plexo retroorbital 24 e 48 horas e processados para dosagem de triglicérides (TG) e colesterol total (CT) e HDL colesterol (HDL-c) utilizando-se *Kits* labtest com método de leitura espectrofotométrica.

Os animais tratados apenas com salina apresentaram concentrações séricas de triglicérides (TG) de $118,3 \pm 15,42$ mg/dL, e os naqueles tratados com tiloxapol apresentaram níveis TG de $2387,6 \pm 45,1$ mg/dL, nas 24 horas após indução (Figura 19 a).

A hipertrigliceridemia induzida pelo tiloxapol foi reduzida pelo OFCC nas três doses utilizadas no experimento: 2000 mg/Kg/d (93%), 1000 mg/Kg/dia (96%) e 500 mg/Kg/dia (84%), e nas duas primeiras doses com níveis comparados aqueles dos animais tratados com salina ($118,3 \pm 15,42$ mg/dL) e com gemfibrozila ($101,3 \pm 14,3$ mg/dL). (Figura 19 a).

Os níveis de triglicérides (TG) das 48 h no grupo tiloxapol eram de $1204,6 \pm 104,7$ mg/dL, nos tratados com OFCC nas doses de 2000 mg/Kg/dia ($219,1 \pm 8,5$ mg/dL), 1000 mg/Kg/dia ($51,6 \pm 4,9$ mg/dL) e 500 mg/Kg/dia ($747,5 \pm 144,4$ mg/dL), com níveis semelhantes aos animais tratados com salina ($79,5 \pm 6,8$ mg/dL) e gemfibrozila ($62,6 \pm 6,8$ mg/dL) nas doses de 2000 e 1000 mg/Kg (Figura 19 b).

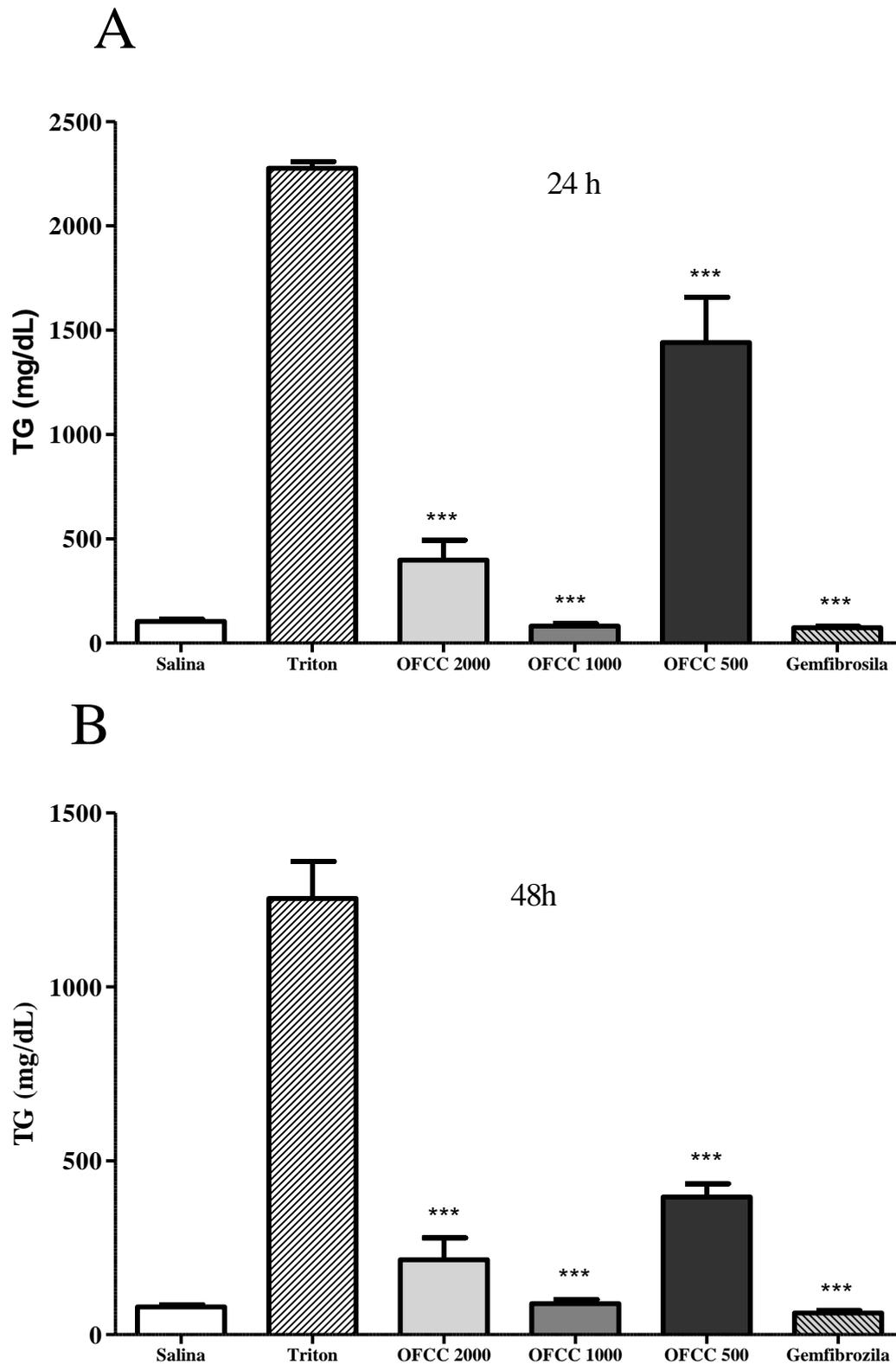


FIGURA 19 - Em (A), observa-se o efeito do Óleo Fixo do *Caryocar coriaceum* (OFCC) na hipertrigliceridemia induzida por tiloxapol (400 mg/Kg) após 24 horas da indução. No painel (B), verifica-se o efeito do Óleo Fixo do *Caryocar coriaceum* (OFCC) na hipertrigliceridemia induzida por tiloxapol (Triton; 400 mg/Kg) após 48 horas da indução, (n=10/grupo). Análise estatística: ANOVA de uma via seguido do teste de Student-Newmann-Keuls.

A administração oral do OFCC durante 15 dias reduziu a hipercolesterolemia nas três doses utilizadas no experimento: 2000 mg/Kg/dia (75%), 1000 mg/Kg/dia (79 %) e 500 mg/Kg/dia (25%), e nas duas primeiras doses a níveis semelhantes ao controle salina ($82,0 \pm 2,1$ mg/dL) e ao controle gemfibrozila ($73,7 \pm 6,3$ mg/dL) (Figura 20 a).

Após 48 h da indução com tiloxapol, os valores séricos do colesterol total (CT) no grupo tiloxapol eram de $392,0 \pm 28,3$ mg/dL, nos tratados com OFCC houve redução dos níveis de triglicerídeos nas doses de 2000 mg/Kg/dia (70%), 1000 mg/Kg/dia (81%) e 500 mg/Kg/dia (52%), com níveis semelhantes animais tratados com salina ($81,5 \pm 4,2$ mg/dL) e gemfibrozila ($74,5 \pm 5,8$ mg/dL) nas doses de 2000 e 1000 mg/Kg (Figura 20 b).

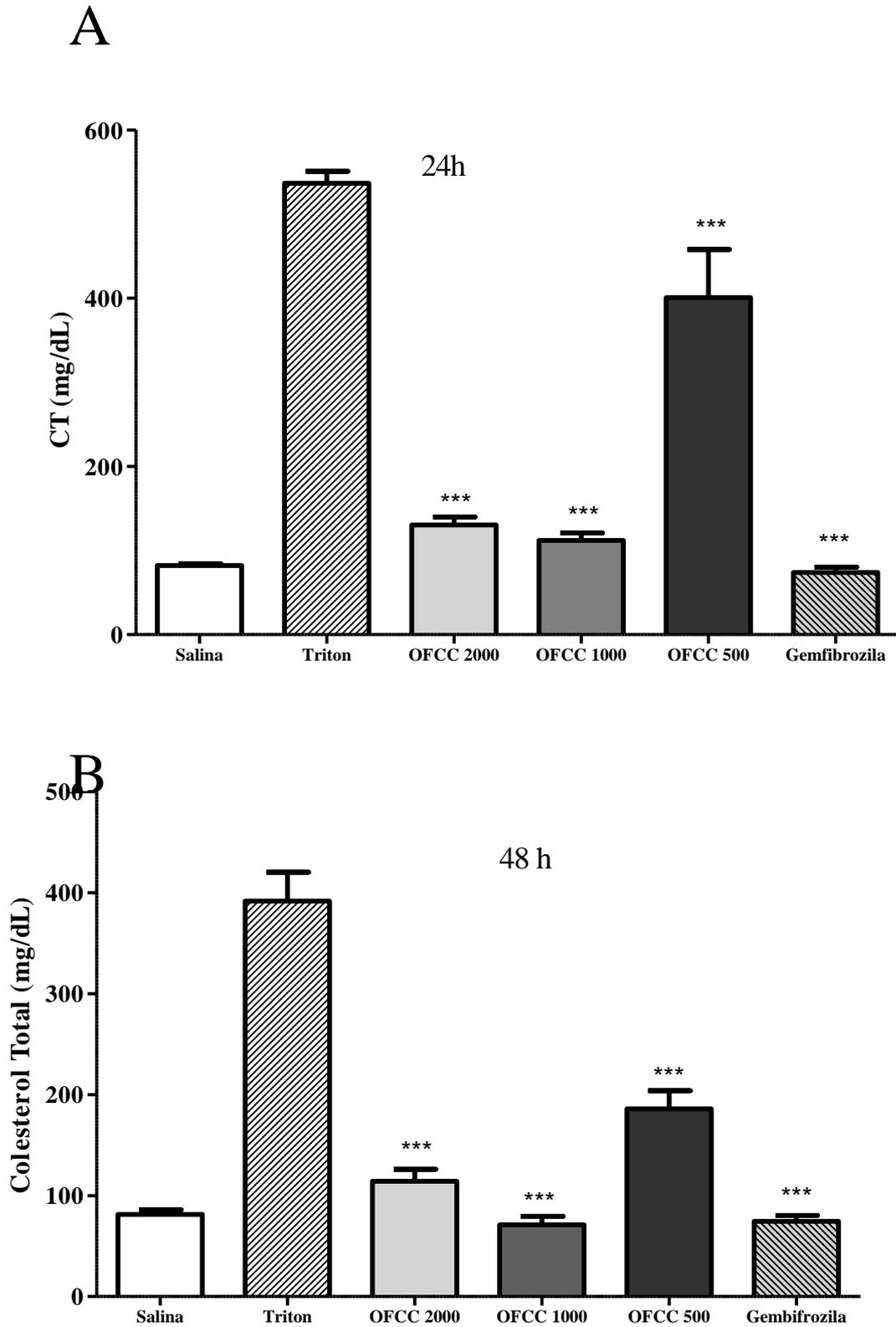


FIGURA 20 - Em (A), observa-se o efeito do OFCC na hipercolesterolemia induzida por tiloxapol (400 mg/Kg) após 24 horas da indução. No painel (B), verifica-se o efeito do OFCC na hipercolesterolemia induzida por tiloxapol (Triton; 400 mg/Kg) após 48 horas da indução, (n=10/grupo). Análise estatística: ANOVA de uma via seguido do teste de Student-Newmann-Keuls.

Houve elevação dos níveis séricos de HDL-c após 24 h da indução da hipertrigliceridemia com Triton®, nos grupos tratados com OFCC, nas doses de 2000 mg/Kg (23%) e 500 mg/Kg (41%), comparados ao controle salina, porém a redução foi semelhante ao grupo controle gemfibrozila (32%). Enquanto que, na dose de 1000 mg/Kg, os níveis de HDL-c foram semelhantes ao controle salina ($22,0 \pm 2,5$ mg/dL vs. $28,9 \pm 2,4$ mg/dL) (Figura 21 a).

Após 48 h da indução com Tiloxapol, os níveis séricos de HDL-c reduziram nos grupos OFCC 2000 (40%), OFCC 500 (50%), Tiloxapol (54%), Gemfibrozila (61%), comparados ao controle salina. Porém na dose de 1000 mg/Kg ($23,6 \pm 1,5$ mg/dL), os níveis permaneceram semelhantes ao controle salina e houve aumento significativo em relação ao tratamento com gemfibrozila por 15 dias (Figura 21 b).

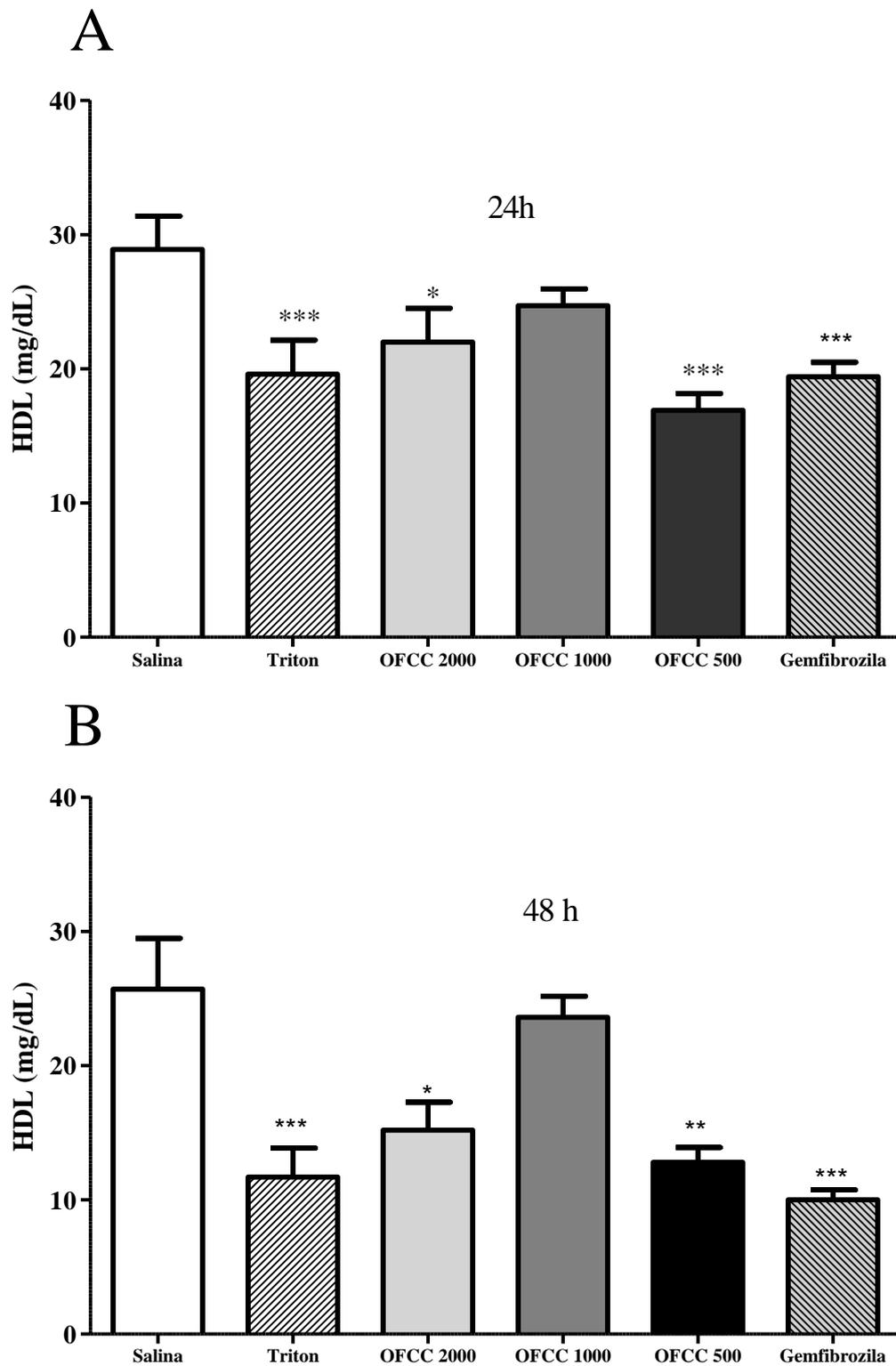


FIGURA 21 - Em (A), observa-se o efeito do Óleo Fixo do *Caryocar coriaceum* (OFCC) nos níveis de HDL-c após 24 horas da indução por tilioxapol (400 mg/Kg). No painel (B), verifica-se do OFCC nos níveis de HDL-c após 48 horas da indução por tilioxapol (Triton; 400 mg/Kg), (n=10/grupo). Análise estatística: ANOVA de uma via seguido do teste de Student-Newmann-Keuls.

4.5. Efeito do Óleo Fixo do *Caryocar coriaceum* (OFCC) no Edema de Pata Induzido por Carragenina – Tratamento Sub-Crônico por via oral durante 7, 15 e 30 dias.

O tratamento por via oral com OFCC por 7 dias reduziu significativamente o edema de pata induzido por carragenina nas doses 2000 mg/kg nos tempos 2 (41%) e 3 (46%), 1000 mg/kg no tempo 3 (50%) e 500 mg/kg no tempo 3 (38%) comparado ao controle com salina. O controle positivo (indometacina 10 mg/kg, v.o.) demonstrou redução significativa no volume do edema comparado ao controle negativo no tempos 3 (30%) após indução do edema pelo agente flogístico e não houve diferença com relação a redução observada com os animais tratados com OFCC (Figura 22).

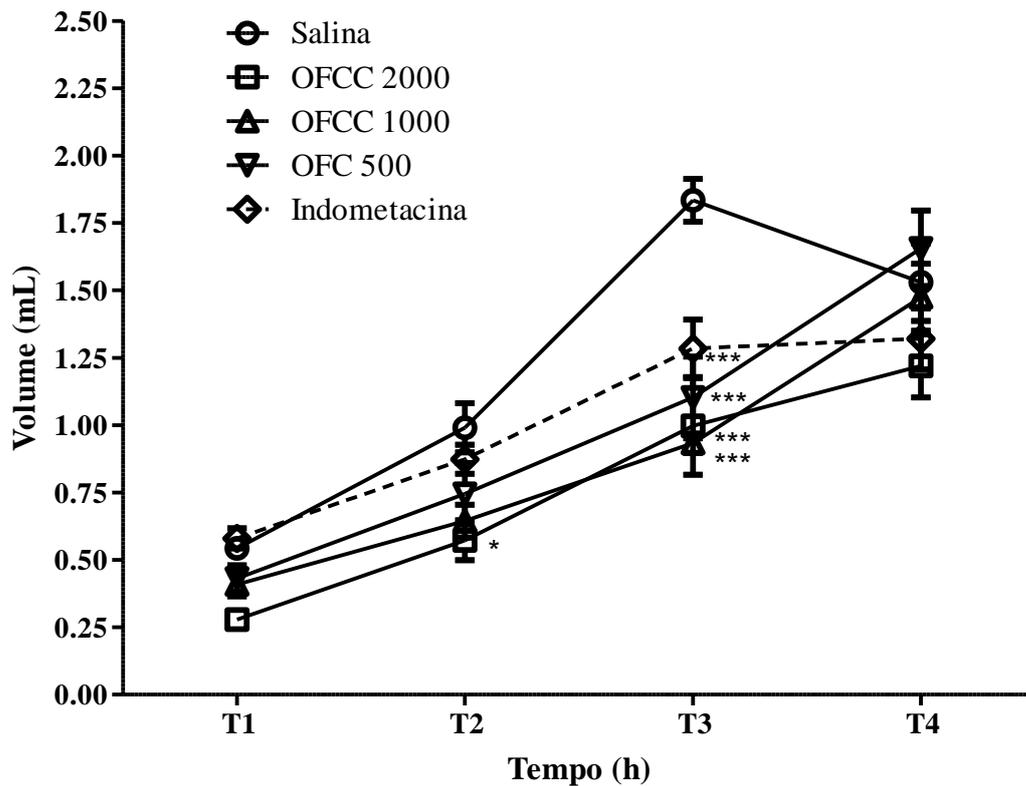


FIGURA 22 - Curva tempo-resposta do efeito do OFCC por 7 dias sobre o edema de pata induzido por carragenina em ratos *Wistar*. Durante período de 7 dias, os animais foram tratados com doses de OFCC 2000, 1000 e 500 mg/Kg e com salina a 0,9%. Após tratamento, foi administrada salina, indometacina ou OFCC nas doses 2000, 1000, 500 mg/kg e após 1 hora, receberam a administração intraplantar de carragenina. O efeito antiedematogênico das substâncias foi analisado através da variação do volume da pata medido através do hidropletismógrafo nos tempos 0, 1, 2, 3 e 4 horas após a administração da carragenina. Os pontos representam a média de 10 animais e as barras verticais o E. P. M. As médias foram comparadas com o grupo controle negativo e foram consideradas significativamente diferentes para (* $p < 0,05$ ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$) comparadas ao controle negativo, ANOVA de duas vias seguido do teste de Bonferroni).

O tratamento a por via oral com OFCC por 15 dias reduziu significativamente o edema de pata induzido por carragenina nas doses 2000 mg/kg nos tempos 3 (36%) e 4 (34%), 1000 mg/kg no tempo 4 (23%) e 500 mg/kg nos tempos 3 (37%) e 4 (38%), comparado ao controle com salina. O controle positivo (indometacina 10 mg/kg, v.o.) demonstrou redução significativa do edema comparado a salina nos tempos 2 (40%), 3 (46%) e 4 h (41%) e não houve diferença com relação aos animais tratados com OFCC (Figura 23).

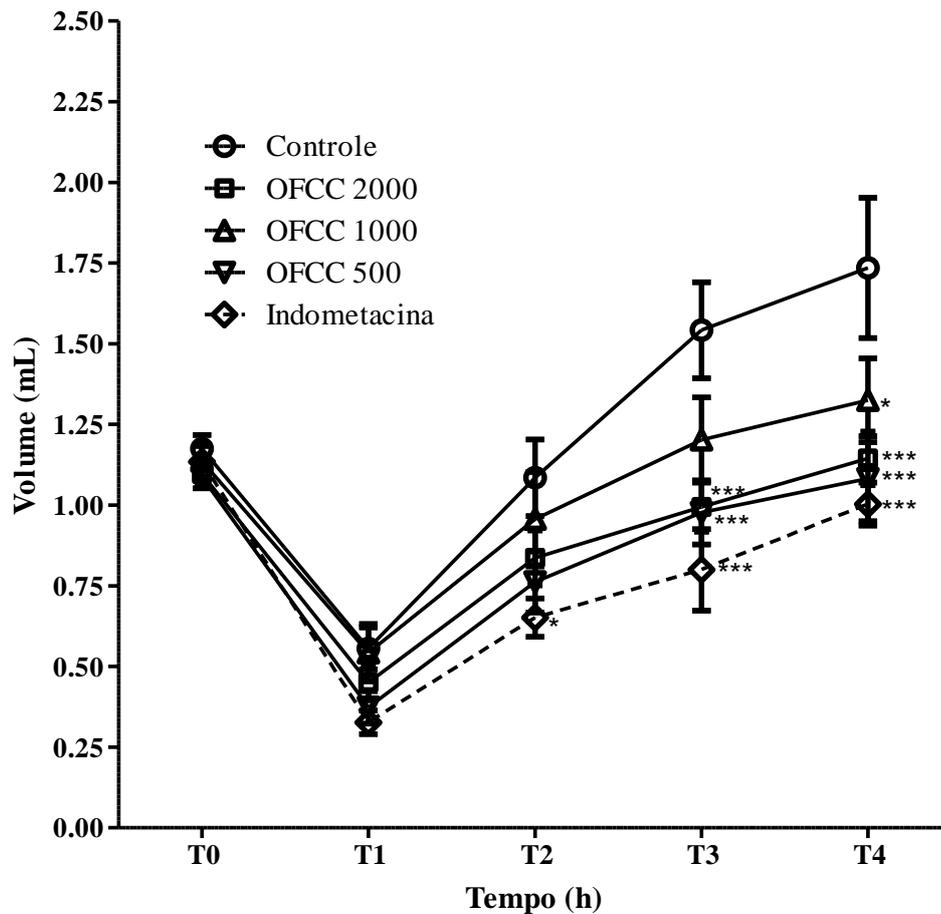


FIGURA 23 - Curva tempo-resposta do efeito do OFCC por 15 dias sobre o edema de pata induzido por carragenina em ratos *Wistar*. Durante período de 15 dias, os animais foram tratados com doses de OFCC 2000, 1000 e 500 mg/Kg e com salina a 0,9%. Após tratamento, foi administrada salina, indometacina ou OFCC nas doses 2000, 1000, 500 mg/kg e após 1 hora, receberam a administração intraplantar de carragenina. O efeito antiedematogênico das substâncias foi analisado através da variação do volume da pata medido através do hidropletismógrafo nos tempos 0, 1, 2, 3 e 4 horas após a administração da carragenina. Os pontos representam a média de 10 animais e as barras verticais o E. P. M. As médias foram comparadas com o grupo controle negativo e foram consideradas significativamente diferentes para (* $p < 0,05$ ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$) comparadas ao controle negativo, ANOVA de duas vias seguido do teste de Bonferroni).

O tratamento por via oral com OFCC por 30 dias reduziu significativamente o edema de pata induzido por carragenina nas doses 2000 mg/kg nos tempos 2 (41%), 3 (30%) e 4 (40%), 1000 mg/kg nos tempos 2 (34%), 3 (36%) e 4 (27%) e 500 mg/kg nos tempos 2 (48%), 3 (47%) e 4 (27%) comparado ao controle com salina. O controle positivo (indometacina 10 mg/kg, v.o.) demonstrou redução significativa no volume do edema comparado ao controle negativo no tempos 2 (43%), 3 (39%) e 4 h (44%) após indução do edema pelo agente flogístico e não houve diferença com relação a redução observada com os animais tratados com OFCC (Figura 24).

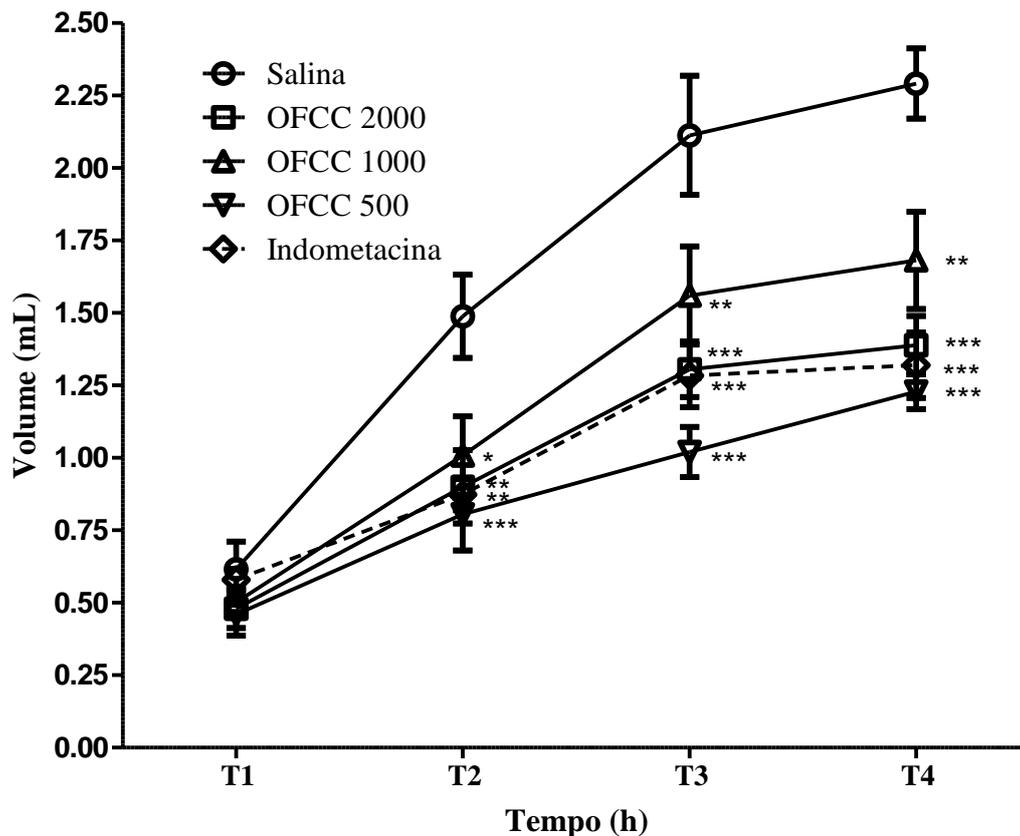


FIGURA 24 - Curva tempo-resposta do efeito do OFCC por 30 dias sobre o edema de pata induzido por carragenina em ratos *Wistar*. Durante período de 30 dias, os animais foram tratados com doses de OFCC 2000, 1000 e 500 mg/Kg e com salina a 0,9%. Após tratamento, foi administrada salina, indometacina ou OFCC nas doses 2000, 1000, 500 mg/kg e após 1 hora, receberam a administração intraplantar de carragenina. O efeito antiedematogênico das substâncias foi analisado através da variação do volume da pata medido através do hidropletismógrafo nos tempos 0, 1, 2, 3 e 4 horas após a administração da carragenina. Os pontos representam a média de 10 animais e as barras verticais o E. P. M. As médias foram comparadas com o grupo controle negativo e foram consideradas significativamente diferentes para (* $p < 0,05$ ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$) comparadas ao controle negativo, ANOVA de duas vias seguido do teste de Bonferroni).

4.6. Efeito do Óleo Fixo do *Caryocar Coriaceum* (OFCC) na Redução do Radical DPPH (2,2-Difenil-1-Picril Hidrazila)

A atividade antioxidante de *C. coriaceum* avaliada pelo método de DPPH, apresentou IC50 para o DPPH foi de 20,1 µ/mL, indicando atividade antioxidante do óleo fixo.

4.7. Efeito do Óleo Fixo do *Caryocar Coriaceum* (OFCC) na Atividade da Enzima Mieloperoxidase (MPO)

A indometacina reduziu a atividade da mieloperoxidase em $72 \pm 4,8$ %. O óleo fixo do *Caryocar coriaceum* (OFCC) inibiu a atividade da mieloperoxidase, nas doses de 1 µg/mL ($59,8 \pm 3,4$ %) e 0,1 µg/mL ($61,9 \pm 2,2$ %), semelhante a indometacina, porém em doses maiores de 200 µg/mL ($17,5 \pm 2,2$ %, $p < 0,001$), 100 µg/mL ($25,7 \pm 1,7$ %, $p < 0,001$), 50 ($23,9 \pm 2,2$ %, $p < 0,001$), 10 µg/mL ($50,3 \pm 2,5$ %, $p < 0,001$) e na menor dose de 0,05 µg/mL ($47,02 \pm 2,05$ %, $p < 0,001$), a inibição da atividade da MPO foi inferior ao controle indometacina.

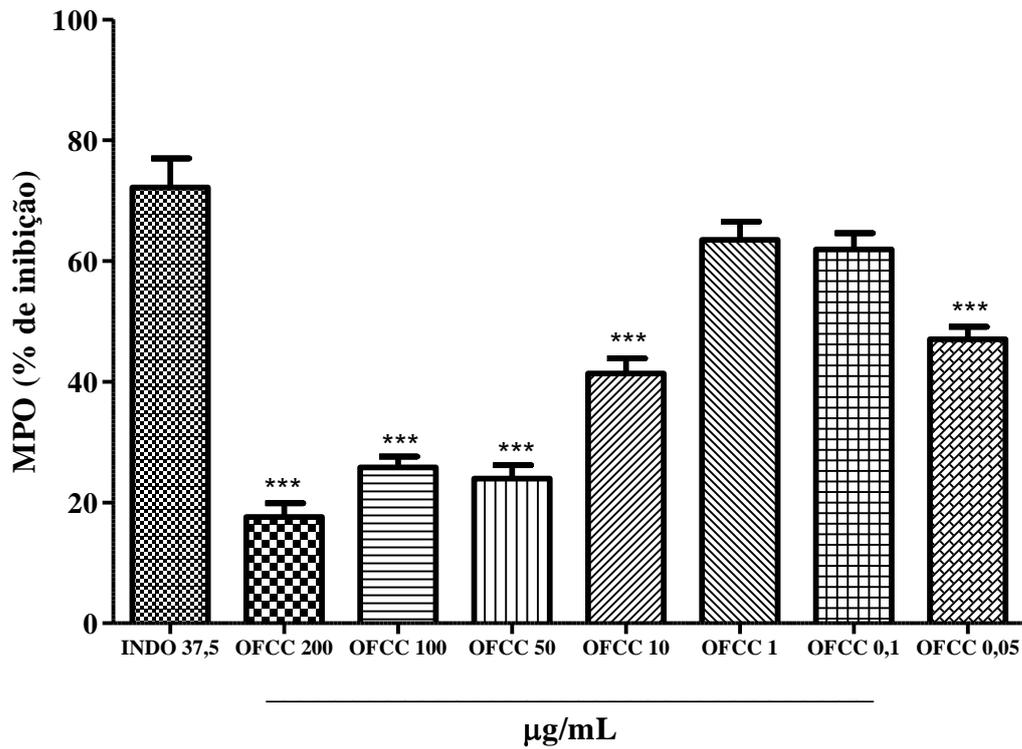


FIGURA 25 - Efeito do Óleo Fixo do *Caryocar coriaceum* (OFCC; 1, 10, 50, 100 e 200 µg/mL), sobre a Atividade da Enzima Mieloperoxidase (MPO). Animais tratados com o veículo (DMSO – 1% em água) e indometacina (35,7 µg/mL, fármaco padrão). Os valores estão expressos percentagem (%) ± padrão da média (E.P.M.). ** p<0,01; ***p<0,001 representam o nível de significância em relação ao controle. Análise estatística: ANOVA de uma via seguido do teste de Student-Newmann-Keuls.

Capítulo

5

Discussão

5. DISCUSSÃO

O método de extração artesanal foi adotado nesse estudo foi feito da mesma forma como o óleo é obtido e utilizado nas comunidades tradicionais, visto que não há diferenças significativas, na obtenção do óleo fixo da polpa de *C. coriaceum* por extração artesanal e com extrator de *Soxhlet*, entre constantes físicas, químicas e o percentual de ácidos graxos presentes em ambos os óleos (FIGUEIREDO *et al.*, 1989).

Azevedo-Meleiro & Rodriguez-Amaya (2004) descobriram que a polpa de pequi é rico em compostos nutricionais, tais como os ácidos graxos, hidratos de carbono, proteínas, carotenos, vitamina E, e retinol. Segundo Almeida (1998), a polpa da fruta também tem níveis elevados de pectina e taninos, além de óleos poli-insaturados.

O óleo fixo do *Caryocar coriaceum* (OFCC) foi caracterizado, sendo identificados ácidos graxos saturados (64,2 %) e insaturados (35,8 %), tendo como componente majoritário o ácido graxo insaturado oléico (55,8%), apresentando ainda na composição o ácido graxo poli-insaturado linoléico (1,8%). Resultados semelhantes aos encontrados na literatura estudada (SARAIVA, 2009).

Nas últimas décadas, muitos esforços foram canalizados para o desenvolvimento de abordagens não farmacológicas para diminuir o risco de doença coronariana. (JAYE & KRAWIEC, 2004; BALLIGAND, 2002; LIBBY, 2003; SHAHAR *et al.*, 2003). Os efeitos benéficos do consumo de gordura monoinsaturada de origem vegetal encontrada nos óleos de oliva, canola, nozes e abacate, são significantes na redução do risco de desenvolver doenças cardiovasculares. A substituição isocalórica da dieta dos ácidos graxos saturados por ácidos graxos poli-insaturados reduz o CT e o LDL-c plasmáticos (JACKSON *et al.*, 2006). Isto é explicado devido à redução do mRNA de receptores hepáticos de LDL, ou da sua atividade, talvez por alteração no conteúdo de ácidos graxos das membranas, diminuindo, assim, o

catabolismo das lipoproteínas de baixa densidade, além do aumento da atividade da LCAT hepática, aumentando a quantidade de colesterol éster em lipoproteínas ricas em apo B, havendo também o aumento do estímulo da secreção hepática de lipoproteínas contendo Apo B-100, levando ao aumento nos níveis de triglicerídeos. E finalmente, as moléculas de ácidos graxos saturados empilham-se de maneira coesa por possuírem cadeia retilínea de carbono, facilitando a capacidade de transporte de colesterol das partículas de LDL (LEE *et al.*, 2004).

Enquanto, os ácidos graxos poli-insaturados têm efeitos benéficos na colesterolemia, foram descritas diversas ações, tais com redução da síntese hepática de VLDL, precursora da LDL, levando a um maior catabolismo hepático desse ácido graxo nos peroxissomos, quanto por interferência com receptores nucleares. Aumento da fluidez das membranas do hepatócito, alterando a atividade dos receptores de LDL (TRIPODI *et al.*, 1991), e da quantidade de receptores hepáticos B/E, devido à alta afinidade desses ácidos graxos com a LCAT, aumentando o conteúdo celular de colesterol éster e induzindo a síntese do receptor B/E (YU-POTH *et al.*, 2005). Além de mudança na estrutura espacial das LDL, o fato de apresentarem configuração *cis* ocupam mais espaço na lipoproteína e, portanto, restringe o volume disponível do LDL para transportar colesterol. A gordura poli-insaturada também reduz a trigliceridemia, pelo fato de estimularem a hidrólise de apo B-100 que ocorre após o retículo endoplasmático (PAN *et al.*, 2004).

Os ácidos graxos poli-insaturados possuem o inconveniente de induzir maior oxidação lipídica de LDL e diminuir o HDL-c quando utilizados em grande quantidade. Em razão desses achados, alguns autores mostraram um potencial efeito aterogênico dos ácidos graxos, chegando a sugerir redução do seu consumo, porém o Comitê de Nutrição da *American Heart Association* reforçou que seu consumo deve ser estimulado (HARRIS *et al.*, 2009).

Os ácidos graxos monoinsaturados exercem o mesmo efeito sobre a colesterolemia, sem, no entanto, diminuir o HDL-c e provocar oxidação lipídica (SPOSITO *et al.*, 2007). O ácido oleico é um melhor substrato para a LCAT no fígado, uma das possíveis razões pelas quais não eleva o LDL-c. Portanto, o excesso de colesterol na forma livre é esterificado rapidamente, não induzindo a supressão de receptores de LDL. Além disso, o ácido graxo oleico induz menor síntese endógena de colesterol, quando comparado a ácidos graxos poli-insaturados (LOTTENBERG *et al.*, 2007).

A composição química do OFCC assemelha-se muito com o óleo de oliva e outros óleos vegetais, por ser extraído da polpa dos frutos e pela similaridade de suas propriedades físico-químicas, e principalmente pela composição de seus ácidos graxos, predominando o ácido oléico, uma gordura insaturada utilizada como coadjuvante no tratamento de hiperlipidemias, com potencial efeito cardioprotetor. (COVAS, 2007).

Após seis semanas de dieta com óleo de pequi, não houve diferenças no ganho de peso ou níveis de glicose plasmática entre os grupos (AGUILAR *et al.*, 2012). A administração oral de OFCC em ratos nas doses de 2000 mg/ Kg, 1000 mg/Kg e 500 mg/Kg não provocou nenhuma sintomatologia digna de nota, tão pouco afetou o ganho de peso dos animais.

Porém apenas no tratamento por 30 dias, observou-se aumento dos níveis plasmáticos de glicose nas doses de 2000 mg/Kg e 1000 mg/Kg/, quando comparadas ao controle salina. Em contraste, com estudo de Aguilar *et al.* (2012), que não encontrou diferenças na glicemia de animais com dieta suplementada com óleo de pequi, em comparação com óleo de soja contendo dieta. Porém, neste estudo foi utilizada doses elevadas (2000, 1000 e 500 mg/Kg) diariamente, sem substituição isocalórica da dieta, sendo o grupo controle apenas salina 0,9%.

Estudos epidemiológicos e experimentais mostram que o consumo elevado de alimentos ricos em antioxidantes previne ROS e que esses alimentos podem atuar como

agentes de prevenção contra o câncer e outras doenças crônico-degenerativas (SANTOS & CRUZ, 2001). No estudo de Miranda-Vilela (2009) houve diminuição nos níveis séricos de AST e ALT, bem como danos ao DNA após suplementação do óleo pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.), diminuindo o *stress* oxidativo induzido pelo exercício. Em contrapartida, neste experimento não houve diferença significativa entre os valores de transaminases nos grupos tratados com óleo de Pequi em doses elevadas quando comparado ao controle.

A análise histopatológica também não revelou alterações significativas ou toxicidade no fígado, coração e aorta dos animais tratados com OFCC por 7 e 15 dias nas doses de 2000, 1000 e 500 mg/Kg. No fígado, foi evidenciada esteatose microgoticular em dois animais no tratamento por 30 dias na dose de 2000 mg/Kg, efeito não evidenciado nos demais experimentos. Assim como, no coração, e aorta não se evidenciou depósito de gordura ou sinais de doença aterosclerótica. Almeida *et al.* (2012) investigaram a genotoxicidade in vivo do *Caryocar villosum* e seu potencial de antigenotoxicidade em dados no DNA induzido por doxorubicina (DXR). A análise fitoquímica revelou a presença de carotenóides, compostos fenólicos, incluindo flavonóides; taninos e α -tocoferol em polpa pequi. Não houve diferenças estatisticamente significativas nos parâmetros avaliados, demonstrando a ausência de efeitos citotóxicos e genotóxicos do Pequi em todas as doses testadas. No rim, fígado, células de medula óssea e cardíacas houve redução significativa o dano do DNA induzido por DXR dose-resposta (ALMEIDA *et al.*, 2012).

Foi demonstrada atividade hipolipemiante após administração do óleo de Pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.), com redução nos níveis séricos de colesterol total e uma redução significativa da lipoproteína de baixa densidade (LDL) em pacientes atletas. Indivíduos portadores do genótipo Hp 1F-1F apresentaram um aumento significativo da lipoproteína de alta densidade (HDL) e elevação dos níveis triglicérides. Assim, as diferenças significativas apresentadas neste estudo são mais prováveis de estar relacionada

com a composição do óleo do pequi afetando genes / alelos (MIRANDA-VILELA *et al.*, 2011). Ao final do tratamento diário de 30 dias com OFCC, os níveis séricos de colesterol T e triglicerídeos diminuíram na dose de 2000 mg/Kg, comparado ao controle salina. O tratamento com o OFCC durante 15 e 30 dias aumentou significativamente os níveis HDL-c dos animais nas três doses usadas.

Como não se observou toxicidade subcrônica significativa com doses elevadas do OFCC, exceto no tempo de 30 dias, onde foi vista elevação da glicemia e esteatose macrofocular ($p > 0,05$). O estudo foi repetido com animais hiperlipêmicos, por um período de 15 dias, devido ao fato de que neste grupo foram observados efeitos benéficos na lipemia, como a elevação do HDL-c. A atividade do OFCC na dislipidemia, com 15 dias de tratamento diário, reduziu o CT e TG, a níveis semelhantes ao controle gemfibrozila, tanto nas primeiras 24 horas, como depois de 48 horas da indução da dislipidemia. Esta atividade não foi devido a uma regressão espontânea, uma vez que os valores de colesterol e triglicérides permaneceram aumentados nos animais tratados apenas com tiloxapol até as 48 horas experimentais. Entretanto, foi observada redução nos níveis de HDL-c nas primeiras 24 h da indução, porém na dose de 1000 mg/Kg, houve aumento significativo do HDL-c em relação ao tratamento com gemfibrozila por 15 dias.

A administração de Triton® WR-1339, um detergente não-iônico, induz a hipertrigliceridemia marcante em ratos normolipêmicos, quando administrados por via parenteral. O pico máximo de elevação do colesterol, triglicerídeos e fosfolipídios ocorre em torno de 20 h, com decréscimo em seguida. Este agente bloqueia tanto o clareamento das lipoproteínas quanto a degradação intravascular, estimulando a síntese hepática de lipoproteínas. Alguns estudos demonstraram aumento da síntese hepática do colesterol a partir de acetato e aumento da atividade da 3-hidroxi- 3-metilglutaril coenzima após a injeção de

Triton® (SILVA, 2000). Em nosso estudo foi observada elevação dos níveis séricos de colesterol e triglicerídeos após administração do detergente tiloxapol comparado ao grupo controle (*** $p < 0,001$), dados compatíveis com a literatura estudada.

A doença arterial coronariana (DAC) é a principal causa isolada de morbi e mortalidade em países industrializados, observando taxas mais baixas em países do Mediterrâneo, comparados ao restante da Europa e os Estados Unidos. Fatores de proteção, como a dieta mediterrânea, podem contribuir para explicar este paradoxo. O azeite de oliva é a principal fonte de gordura desta dieta (PARIKH *et al.*, 2005). Os efeitos benéficos do azeite de oliva sobre fatores de risco de DCV são reconhecidos e muitas vezes atribuídos apenas a seus altos níveis de ácidos graxos monoinsaturados (AGM). O azeite é, no entanto, mais do que uma gordura monoinsaturada, constitui um alimento funcional que, além de ter um nível elevado de gordura monoinsaturada, contém outros componentes secundários, com propriedades biológicas (COVAS, 2007).

Vários estudos foram realizados comparando os efeitos benéficos de dietas ricas em ácidos graxos monoinsaturados no perfil lipídico (GARG, 1998; FRANZ *et al.*, 2004). Abia *et al.*, (2001) relataram que a ingestão de azeite de oliva resultou em níveis de triglicerídeos pós-prandiais menores do que a alta ingestão do óleo de girassol. Em comparação com as dietas ricas em carboidratos, a gordura monoinsaturada teve um melhor efeito de em reduzir a susceptibilidade do LDL-c à oxidação (COVAS, 2007, JACKSON *et al.*, 2009).

EUROLIVE (2006) estudou o efeito do consumo de azeite de oliva no dano oxidativo em populações europeias. Houve aumento do HDL-c e diminuição dos triglicédeos, com redução da relação LDL -c/ HDL-c e dos níveis de LDL oxidada circulantes no plasma. Os maiores efeitos em aumentar os níveis de HDL-c e diminuir *stress* oxidativo lipídico foram observadas após o consumo do óleo de oliva com alto teor fenólico (COVAS *et al.*, 2006 a).

Estudos recentes sugerem que uma reação de oxidação está envolvido na formação de LDL pequena e densa (HIDAKA *et al.*, 2005). Estas partículas de LDL são mais propensas à oxidação e ao entrar na parede arterial mais facilmente do que partículas de LDL maiores, assim, aceleram o desenvolvimento da aterosclerose (CHAIT *et al.*, 1993). O tamanho de partícula do LDL lipoproteína é influenciada pela gordura da dieta. Dietas com alto teor de gordura insaturada aumentam o tamanho das partículas de LDL mais do que as dietas ricas em hidratos de carbono (COVAS *et al.*, 2006 a).

O abacate é rico em ácido oléico e β -sitosterol, uma gordura insaturada utilizada como coadjuvante no tratamento das dislipidemias. A ingestão de 3 a 4 g/dia de fitoesteróis promove a redução do LDL colesterol em 10 a 15% (SPOSITO *et al.*, 2007). Segundo Salgado *et al.* (2008) a suplementação da dieta com farinha de abacate reduziu os níveis de colesterol sanguíneo, hepático e LDL, aumentou o colesterol excretado e manteve os níveis de HDL e triglicérides em ratos hipercolesterolêmicos.

No entanto, os fitoesteróis apesar de reduzirem o colesterol total, não mostraram ter qualquer efeito benéfico sobre os triglicerídeos. O óleo de peixe é rico em Omega-3, com efeito hipotriglicedêmico, estudos em modelos animais sugerem que a suplementação de fitoesteróis com o óleo de peixe pode reduzir simultaneamente o colesterol plasmático e triglicerídeos (DEMONTY, 2006). O óleo de bambu também é considerado como uma fonte alimentar de antioxidantes fenólicos e gordura poli-insaturada. Park e Jhon (2009) confirmaram os efeitos benéficos do consumo de brotos de bambu na redução do colesterol e nas funções intestinais.

O óleo de coco é gordura saturada, porém rica em ácidos graxos de cadeia média (AGCM), que parece ter menos efeitos deletérios no perfil lipídico do que o ácido palmítico, desde que consumido em doses moderadas. Entretanto, ainda são necessários mais estudos

para indicação efetiva com nutracêutico (LIAU *et al.*, 2011). Um estudo duplo cego mostrou que a dieta com AGCM elevou o colesterol total, o LDL e a razão LDL e HDL. Portanto, o uso do suplemento teve um efeito desfavorável no perfil lipídico (THOLSTRUP *et al.*, 2004).

Entretanto, um estudo recente realizado por Aguilar *et al.* (2012) mostrou que após 6 semanas de ingestão de dieta suplementada com óleo de pequi (*Caryocar brasiliense*), as lesões ateroscleróticas na raiz aórtica tiveram aumento, mas foram reduzidas quando comparadas com os dos animais que ingeriram uma dieta com óleo de soja. Em contraste, os lípidos apresentaram um perfil mais aterogênico no grupo Pequi, mas a atividade antioxidante foi melhorada, com uma peroxidação lipídica inferior ao grupo óleo de soja. O grupo Pequi apresentou um perfil lipídico mais aterogênico e mais lesões ateroscleróticas avançadas na raiz da aorta em comparação com o grupo da soja. Estes dados sugerem que uma dieta com pequi diminui aterogênese nos estágios iniciais, possivelmente devido a sua atividade antioxidante. No entanto, o aumento do colesterol induz a migração de LDL para a camada íntima das artérias, aumentando a placa aterosclerótica (ROESLER *et al.*, 2008).

Caryocar brasiliense Cambess (Caryocaraceae) é uma árvore amplamente distribuída que é encontrado principalmente no Cerrado. O óleo do fruto tem um alto teor de vitaminas lipossolúveis e ácidos graxos saturados e monoinsaturados. Assim como no óleo do *Caryocar coriaceum*, estão presentes as altas quantidades de carotenóides e ácidos fenólicos, responsáveis por suas propriedades antioxidantes (FDA, 1995). Embora o ácido oléico, uma gordura monoinsaturada, também esteja presente no *Caryocar brasiliense e coriaceum* em concentrações semelhantes (54,28 % vs 55,79%), porém o ácido palmítico, uma gordura saturada, está presente no *Caryocar brasiliense* em maiores concentrações quando comparadas ao *Caryocar coriaceum* (41,78% vs. 34,1%) (AGUILAR *et al.*, 2012). O ácido palmítico, predominante no *C. brasiliense*, é um dos ácidos graxos mais aterogênicos e é

amplamente ligada tanto à hipertrigliceridemia e hipercolesterolemia (KHROURI *et al.*, 2007). Isto explica, o perfil lipídico mais aterogênico, talvez porque a proporção de ácidos graxos monoinsaturados no óleo do pequi (*Caryocar brasiliense*) não pareceu ser suficiente para neutralizar os efeitos deletérios da gordura saturada nos lipídios séricos (AGUILAR *et al.* 2012). Ao contrário, do nosso óleo do pequi, que apresentou melhora no perfil lipídico, com elevação do HDL-c, efeitos semelhantes aos vistos com azeite de oliva, podendo assim, ser denominado como o “azeite do Cariri”.

Os efeitos benéficos do azeite de oliva sobre fatores de risco cardiovasculares eram reconhecidos e atribuídos apenas aos seus altos níveis de ácidos graxos monoinsaturados (AGM) (FDA, 2004). Na verdade, o ácido oleico é o ácido graxo predominante, mas não é o único agente primário responsável pelas propriedades saudáveis do azeite de oliva (COVAS *et al.*, 2006 b). Estudos comprovam que a fração saponificável do azeite, que inclui os fitoesteróis, tem um importante papel na diminuição dos níveis de colesterol sanguíneo e consequentemente contribuem para a diminuição do risco de doenças cardiovasculares. O mecanismo de ação para tal benefício é devido à sua estrutura química semelhante à do colesterol, dessa forma, interferem na absorção do colesterol, deslocando-os das micelas (COVAS, 2007). Portanto, avaliar a presença dos fitoesteróis no “azeite do Cariri” deve ser um objetivo para futuros estudos pré-clínicos.

O tratamento sub-crônico contínuo por via oral do OFCC durante 7, 15 e 30 dias reduziu significativamente o edema de pata induzido por carragenina nas doses 2000 mg/kg, 1000 mg/kg e 500 mg/kg, quando comparado ao controle com salina, com resultado semelhante a indometacina.

A carragenina, utilizada no modelo de edema de pata como agente flogístico, tem como ação o aumento da vasodilatação, permeabilidade sanguínea e da dor. Após 1 h da

administração da carragenina, observa-se o aumento do volume da pata, devido à liberação de histamina e serotonina, e outros mediadores inflamatórios iniciais. O pico máximo do edema ocorre entre 3 e 4 horas, coincidindo com o aumento de eicosanoides pró-inflamatórios (mediadores tardios). (DI-ROSA *et al.*, 1971). Após aplicação intraplantar de carragenina, observou redução significativa o edema dos animais tratados com indometacina ($p < 0,001$) nos tempos 2, 3 e 4 horas, resultado semelhante ao encontrado por Saraiva (2009) no tratamento agudo do OFCC por via oral nas concentrações 200 e 400 mg/kg. Tal observação é justificada, pois a indometacina, um anti-inflamatório não-esteroidal, age via da COX-1 e COX-2, inibindo a síntese de prostaglandinas e tromboxanos e, conseqüentemente, contribuindo para a redução do edema.

Na literatura, alguns trabalhos têm demonstrado que a presença dos ácidos graxos no OFCC pode estar relacionada à atividade anti-inflamatória. O mecanismo de proteção de ácido oleico sobre a inflamação tem sido atribuída a uma diminuição do ácido linoleico do conteúdo do LDL (COVAS *et al.*, 2006 a). Os ácidos graxos, oleico e palmítico, inibiram moderadamente a agregação plaquetária induzida por ácido araquidônico ($75 \pm 7\%$ e $43 \pm 18\%$ do controle, respectivamente, com $P < 0,05$), com pequena inibição da formação de tromboxanos (HÖHLFELD *et al.*, 2008). Henry *et al.* (2002) observaram que o ácido oleico apresentou atividade inibitória moderada para a COX-1 em (25%). Na composição química do OFCC, foram encontrados os ácidos oleico e palmítico, componentes majoritários do OFCC, podendo explicar, em parte, a diminuição da atividade inflamatória com administração oral do OFCC por 15 dias.

O ácido linoleico, uma gordura poli-insaturada também encontrada no OFCC, tem sido apontado na literatura como anti-inflamatório. O ácido 13-hidroxi-octadecaenoico (13-HODE) via 15-LOX, substância que inibe a produção de superóxidos, tem com precursor o

ácido linoleico. O 13-HODE age reduzindo a migração de leucócitos através do endotélio ativado por citocinas, promovendo vasodilatação na artéria aorta e modulando as ações de leucotrienos e prostanoides (FRITSCHÉ, 2008). Henry *et al.*. (2002) evidenciaram que o ácido linoléico (AL) pode inibir a COX-1 e COX-2 *in vitro*; células humanas monocíticas THP-1 *in vitro* tratadas com AL tiveram redução significativa na secreção de IL-6, IL-1 β e TNF- α , comparadas com células THP-1 tratadas com ácido palmítico ($P < 0,05$), diminuindo também a expressão do TNF- α e do fator de transcrição NF- κ B (ZHAO *et al.*, 2005).

Há uma associação entre os ácidos graxos da dieta e a inflamação. Estudo com animais LDL R-/-, transgênicos para o gene *agouti*, submetidos a uma dieta hiperlipídica ou normal, revelou que ambos os grupos apresentaram grande infiltração de macrófagos no tecido adiposo. O aumento foi mais pronunciado no grupo que recebeu dieta rica em gordura (COEN *et al.*, 2007), aumentando, portanto, o processo inflamatório. Em outro estudo, Nappo e cols. verificaram que dieta rica em lipídios aumentou moléculas de adesão vascular (VCAM-1) e intercelular (ICAM), interleucina-6 e TNF- α e esse efeito foi exacerbado em indivíduos com *diabetes mellitus*. Houve também maior expressão de TNF- α em tecido adiposo retroperitoneal com dieta hiperlipídica. Com relação ao efeito específico dos ácidos graxos sobre inflamação, diversos estudos têm encontrado forte associação da ingestão de graxos poli-insaturados com a diminuição da síntese de marcadores inflamatórios em comparação a gordura *trans* e saturada (BAER, *et al.*, 2004). Em comparação ao ácido oleico, o consumo de ambos aumentou a concentração plasmática de interleucina-6, proteína C reativa selectina-e. Estudo epidemiológico, conduzido em indivíduos com sobrepeso, demonstrou aumento de interleucina-6 com gordura saturada (LOPES-GARCIA *et al.*, 2005). Realmente, o alto consumo de ácidos graxos saturados relaciona-se à lipotoxicidade de diversos órgãos e pode aumentar o risco para diabetes e doenças cardiovasculares em consequência de sua forte relação com inflamação e resistência à insulina.

No entanto, Saraiva (2009) não demonstrou redução significativa do edema de pata induzido após a aplicação de carragenina, com tratamento agudo do OFCC comparado ao grupo tratado com salina, resultados diferentes aos dados encontrados na literatura e no nosso estudo com o tratamento sub-crônico com OFCC. Comparando os dados da atividade anti-inflamatória crônica oral em relação à aguda oral, foi constatada uma melhor atividade anti-inflamatória no tratamento crônico. Este dado pode sugerir que há uma melhor biodisponibilidade sanguínea em tratamentos contínuos.

Vários estudos têm mostrado atividade antioxidante do óleo do pequi com a capacidade de sequestrar radicais livres, reduzir a peroxidação lipídica e prevenir o *stress* oxidativo ao DNA (MIRANDA-VILELA, 2008). O antioxidante é um composto que protege o sistema biológico contra o efeito nocivo de processos ou reações que podem causar oxidação excessiva (KRINSKY, 1994). Evidências epidemiológicas apontam o papel de alimentos antioxidantes na prevenção de certas doenças crônicas, dentre elas a aterosclerose. Vários compostos foram extraídos do pequi, identificados como carotenóides luteína, β -criptoxantina e β -caroteno, sugerindo um potencial antioxidante (PEREZ, 2004). Neste ensaio pré-clínico, foi observada também atividade antioxidante do óleo fixo do *Caryocar coriaceum* (OFCC) pela metodologia do DDPH, com IC50 de 20,1 μ mL.

Os estudos *in vivo* realizados em corredores humanos também detectaram uma redução no plasma da peroxidação lipídica após ingestão do óleo do pequi. Além disso, a liberação de radicais livres foi reduzida em macrófagos no grupo do óleo de pequi em relação ao controle. Todos esses dados confirmam o efeito benéfico do pequi na redução do *stress* oxidativo, que é um fator chave na gênese da aterosclerose. Embora LDL nativo possa desencadear a resposta imune e a formação de células espumosas, mas são as partículas de LDLox, que podem estar aumentados pelo *stress* oxidativo, o estímulo aterogênico mais

poderoso, ativando células endoteliais e induzindo a expressão do receptor sequestrante de macrófagos. Assim, uma dieta rica em colesterol, contendo óleo de pequi foi novamente associada a ações ateroprotetoras, como a redução do *stress* oxidativo resultando em uma redução da oxidação de LDL na corrente sanguínea (MIRANDA-VILELA *et al.*, 2009).

Por outro lado, a mieloperoxidase (MPO) é uma proteína com peso molecular de 144 kD, constituída por dois dímeros, contendo uma subunidade de cadeia leve e pesada, com grupos heme idênticos funcionalmente, estando unidos entre si por uma ponte de bissulfeto. Esta enzima é a principal constituinte dos grânulos azurófilos dos neutrófilos, também é encontrada nos monócitos e alguns macrófagos teciduais. É derivada de leucócitos e catalisa a formação de numerosas espécies reativas oxidantes, contribuindo para resposta imune inata do organismo e o dano tecidual durante a inflamação (FU *et al.*, 2001). A MPO também participa de atividades biológicas pró-trombóticas relacionadas à evolução da doença cardiovascular, incluindo início, propagação e as fases de complicação aguda do processo aterosclerótico (HANSSON, 2005)

Estudos demonstram o papel da MPO como participante central do elo entre inflamação e doença cardiovascular. A mieloperoxidase forma radicais livres e substâncias oxidantes difusíveis, pela reação com peróxido de hidrogênio, com atividade antimicrobiana, além de promover dano oxidativo tecidual, exercendo efeitos pleiotrópicos nos vasos sanguíneos com potencial impacto no desenvolvimento de aterosclerose, disfunção endotelial, instabilidade de placa e resposta no remodelamento ventricular após injúria isquêmica (NICHOLLS & HAZEN, 2005; NICHOLLS & HAZEN, 2004; BRENNAN & HAZEN, 2003). A participação da MPO na composição da carga lipídica da placa de ateroma, na ativação de proteases e em mecanismos de vasoconstrição e trombose torna evidente o

envolvimento desta enzima no desenvolvimento da doença aterosclerótica e de suas complicações trombóticas (NICHOLLS & HAZEN, 2004).

A oxidação da LDL leva ao aumento de sua recaptação e degradação por macrófagos, resultando em depósito de colesterol e formação de células espumosas. Evidências atuais apontam os prováveis mecanismos pelos quais a MPO é capaz de promover oxidação de lipoproteínas *in vivo* (MOHIUDDIN *et al.*, 2006, MALLE *et al.*, 2006). Macrófagos produzem superóxido (O_2^-), via NADPH oxidase, que pode dismutar e formar peróxido de hidrogênio (H_2O_2). A MPO catalisa reações com H_2O_2 para gerar oxidantes citotóxicos mais potentes como HOCl (ácido hipocloroso) e radical tirosil, sendo a única enzima humana capaz de gerar HOCl. Por meio de ensaios de alta sensibilidade e especificidade, diversos produtos finais estáveis gerados por essas espécies têm sido detectados em placas ateroscleróticas (PODREZ *et al.*, 2000).

A MPO tem a habilidade de modificar o aminoácido tirosina da apolipoproteína B-100 (apo B-100), usando H_2O_2 e íon Cl^- para gerar 3-clorotirosina. Pode também nitratar a tirosina oxidando nitrito (NO_2^-), produto final do metabolismo do óxido nítrico (ON), gerando 3-nitrotirosina. Além de marcadores da atividade da MPO, a 3-clorotirosina e 3-nitrotirosina têm importância clínica por promover dano oxidativo, o que contribui para a aterosclerose. Foi evidenciado o sistema MPO- H_2O_2 - NO_2^- como rota preferencial, utilizada por monócitos, para converter LDL em formas aterogênicas com maior afinidade pelo receptor CD36, principal receptor de macrófagos para LDL oxidado envolvido diretamente na formação de células espumosas *in vivo* (PODREZ *et al.*, 2000).

Mais recentemente, Nicholls *et al.*, 2005 demonstraram que a partícula de HDL é também suscetível a modificações oxidativas mediadas pela mieloperoxidase através da nitratação ou halogenação de resíduos de tirosina na apolipoproteína AI (apo AI). Estas

prejudicam a habilidade da proteína de promover o transporte reverso de colesterol dependente de ABCA-1, contribuindo para a formação de lesões ateroscleróticas.

Pelo conhecimento atual, dados sugerem que a atividade da MPO pode servir como marcador de doença cardiovascular, como potencial causador da progressão e instabilidade de placas ateroscleróticas na fase da isquemia. Nossos estudos evidenciaram que óleo fixo do *Caryocar coriaceum* (OFCC) inibiu a atividade da mieloperoxidase, nas doses de 1 µg/mL ($59,8 \pm 3,4$ %) e 0,1 µg/mL ($61,9 \pm 2,2$ %), semelhante a indometacina, este resultado foi dose dependente, não se observando o mesmo efeito nas doses de doses 200 µg/mL, 100 µg/mL, 50 µg/mL, 10 µg/mL e 0,05 µg/mL ($47,02 \pm 2,05$ %, $p < 0,001$). Há perspectivas futuras para avaliação da utilidade do OFCC no desenvolvimento de tratamentos específicos que atuem removendo a MPO dos espaços endotelial e subendotelial para prevenir suas ações pro-inflamatórias na parede dos vasos sanguíneos ou reduzindo as fontes de H₂O₂ para evitar a depleção MPO-dependente dos níveis de ON vascular.

A validação da atividade antilipêmica, anti-oxidante e anti-inflamatória desta planta é altamente estimulante tendo em vista que esta associada a efeito cardioprotetor nas doenças ateroscleróticas. Dessa forma, configura-se de fundamental importância, mais estudos que avaliem as potencialidades farmacológicas do óleo do pequi, como adjuvantes na terapia contra aterosclerose e muitas outras doenças crônico-degenerativas.

Capítulo

6

Conclusão

6. CONCLUSÃO

O óleo fixo do *Caryocar coriaceum* (OFCC) é rico em ácido oleico (55,8%) e palmítico (34,1%), como componentes majoritários.

A toxicidade relativa do óleo fixo do *Caryocar coriaceum* (OFCC) é baixa após administração por via oral durante 7, 15 e 30 dias.

Neste mesmo protocolo, a administração oral do óleo fixo do *Caryocar coriaceum* aumentou HDL-c em animais não dislipidêmicos.

Os valores séricos de colesterol total e triglicerídeos reduziram a níveis semelhantes ao nas primeiras 24 horas e 48 horas após a indução da dislipidemia com Tiloxapol nas doses de 2000, 1000 e 500 mg/Kg.

Os efeitos obtidos por via oral são equivalentes aos obtidos com uso do fibrato oral gemfibrozila, porém com elevação do HDL-c.

A administração por via oral do OFCC nas doses de 2000, 1000 e 500 mg/Kg demonstrou atividade anti-inflamatória em ratos com 7, 15 e 30 dias de tratamento, demonstrando haver efeito sistêmico sub-crônico dos constituintes químicos do OFCC.

Foi demonstrada uma potente atividade antioxidante do *Caryocar coriaceum* avaliada pelo método de DPPH (2,2-difenil-1-picril hidrazila).

O óleo fixo do *Caryocar coriaceum* (OFCC) reduziu a atividade da enzima mieloperoxidase (MPO).

REFERÊNCIAS

ABIA, R.; PACHECO, Y. M.; PERONA, J. S.; MONTERO, E.; MURIANA, F. J.; RUIZ-GUTIERREZ, V. The metabolic availability of dietary triacylglycerols from two high oleic oils during the postprandial period does not depend on the amount of oleic acid ingested by healthy men. **Journal of Nutrition**, v. 131, p.59–65, 2001.

ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy**. Baylor University. Allured, 2001.

AI, M.; OTOKOZAWA, S.; ASZTALOS, B. F.; ITO, Y.; NAKAJIMA, K.; WHITE, C. C.; CUPPLES, L. A.; WILSON, P. W.; SCHAEFER, E. J. Small dense LDL cholesterol and coronary heart disease: results from the Framingham Offspring Study. **Clinical Chemistry**, v. 56, n. 6, p. 967-976, 2010.

AGUILAR, E.C.; JASCOLKA, T.L.; TEIXEIRA, L.G. ; LAGES, P.C.; RIBEIRO, A.C.C. ; VIEIRA, E. L. M.; PELUZIO, M. C.G.; ALVAREZ-LEITE, J.I. Paradoxical effect of a pequi oil-rich diet on the development of atherosclerosis: balance between antioxidant and hyperlipidemic properties. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 45, n. 7, p. 601-69, 2012.

ALENCAR, J. W.; CRAVEIRO, A. A.; MATOS, F. J. A. Kovats indices as a preselection routine in mass spectra library search of volatiles. **Journal of Natural Products**, v. 47, p. 890-892, 1984.

ALENCAR, J. W.; CRAVEIRO, A. A.; MATOS, F. J. A.; MACHADO, M. I. L. Kovats indices simulation in essential oils analysis. **Química Nova**, v. 13, p. 282-284, 1990.

ALMEIDA, M. R.; DARIN, J.D.; HERNANDES, L.C.; AISSA, A.F.; CHISTÉ, R. C.; MERCADANTE, A. Z.; ANTUNES, L.M.; BIANCHI, M. L. Antigenotoxic effects of piquiá (*Caryocar villosum*) in multiple rat organs. **Plant Foods for Human Nutrition.**, v. 67, n. 2, p. 171-177, 2012.

ALMEIDA, S. P. Frutas nativas do cerrado: caracterização físico-química e fonte de nutrientes. In: **Cerrado: Ambiente e Flora** (Sano SM and Almeida SP, eds.). EBRAPA-CPAC, Planaltina, p. 247-287, 1998.

ALVES, T. M. A.; SILVA, A. F.; BRANDÃO, M.; GRANDI, T. S. M.; SMÂNIA, E. F. A.; SMÂNIA-JÚNIOR, A.; ZANI, C. L. Biological screening of Brazilian medicinal plants. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 95, n. 3, p. 367-373, 2000.

ALONSO, J. R. **Tratado de fitomedicina, bases clínicas e farmacológicas**. Buenos Aires: Isis Ediciones SRL, p. 805 – 806, 2000.

ARICHI, H.; KIMURA, Y.; OKUDA, H.; BABA, K.; KOZAWA, M.; ARICHI, S. Effects of stilbene components of the roots of *Polygonum cuspidatum* Sieb. Et zucc. on lipid metabolism. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 30, p. 1766-1770, 1982.

ASAKURA, L.; LOTTENBERG, A.M.; NEVES, M.Q.; NUNES, V.S.; ROCHA, J.C.; PASSARELLI, M. *et al.*. Dietary medium-chain triacylglycerol prevents the postprandial rise of plasma triacylglycerols but induces hypercholesterolemia in primary hypertriglyceridemic subjects. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 71, n. 3, p. 701-705, 2000.

AUGUSTO, L.G.S.; GÓES, L. Integrated understanding for health surveillance in a forest environment: the case of the Araripe Plateau in Ceará State, Brazil. **Caderno de Saúde Pública**, v. 23, n. 4, p. 549-558, 2007.

AUSTIN, M. A. Plasma triglyceride and coronary heart disease. **Arteriosclerosis Thrombosis**, v. 11, p. 2–14, 1991.

AZEVEDO-MELEIRO, C. H.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Confirmation of the identity of the carotenoids of tropical fruits by HPLC-DAD and HPLC-MS. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 17, p. 385–396, 2004.

BAER, D. J.; JUDD, J.T.; CLEVIDENCE, B.A.; TRACY, R. P. Dietary fatty acids affect plasma markers of inflammation in healthy men fed controlled diets: a randomized cross over study. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 79, n. 6, p. 969-973, 2004.

BALLIGAND, J.L. New mechanisms of LDL-cholesterol induced endothelial dysfunction; correction by statins. **Bulletin et Mémoires de l'Académie Royale de Médecine de Belgique**, p. 157, n. 10-12, p 427-431, 2002.

BARBOSA, R. C. M. V.; AMANTE, E. R. **Farinha da casca de pequi (*Caryocar brasiliense*)**. Disponível: http://www.ufpel.tche.br/sbfruti/anais_xvii_cbf/tecnologia_de_alimentos/015.htm. Acesso: 03 de maio 2011. 2011

BARROSO, G. M.; PEIXOTO, A. L.; ICHASO, C. L. F.; GUIMARÃES, E. F.; COSTA, C. G. **Sistemática de angiospermas do Brasil**, 2.ed. Viçosa: UFV, v.1, 309p, 2002.

BATISTA, J. S.; SILVA, A. E.; RODRIGUES, C. M. F.; COSTA, K. M. F. M.; OLIVEIRA, A. F.; PAIVA, E. S.; NUNES, F. V. A.; OLINDA, R. G. Avaliação da atividade cicatrizante do óleo de pequi (*Caryocar Coriaceum* Wittm) em feridas cutâneas produzidas experimentalmente em ratos. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 77, n. 3, p. 441-447, 2010.

BEVER, B. O. Oral hypoglycaemic plants in West Africa. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 2, n. 2, p. 119 - 127, 1980.

BRAGA, R. **Plantas do Nordeste, especialmente do Ceará**. 2. ed. Fortaleza: Imprensa Oficial, 540 p, 1960.

BRAND-WILIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Food Science and Technology**, v. 28, p. 25-30. 1995.

BRENNAN, M.L.; HAZEN, S. Emerging role of myeloperoxidase and oxidant stress markers in cardiovascular risk assessment. **Current Opinion in Lipidology**, v. 14, p. 353-359, 2003.

CHAIT, A.; BRAZG, R. L.; TRIBBLE, D. L.; KRAUSS, R. M. Susceptibility of small, dense, low-density lipoproteins to oxidative modification in subjects with the atherogenic lipoprotein phenotype, pattern B. **American Journal of Medicine**, v. 94, p.350–356, 1993.

CHANDER, R.; KHANNA, A. K.; KAPOOR, N. K. Lipid lowering activity of guggulsterone from *Commiphora mukul* in hyperlipemic rat. **Phytotherapy Research**, v. 10, p. 508 - 511, 1996.

CIGNARELLA, A.; NASTASI, M.; CAVALLI. E.; PUGLISI, L. Novel lipid-lowering properties of *vaccinium myrtillus* l. leaves, a tradicional antidiabetic treatment, in several models of rat dyslipidaemia: a comparison with ciprofibrate, **Institute of Pharmacological Sciences**, University of Milano, 1996.

COENEN, K.R.; GRUEN, M.L.; CHAIT, A.; HASTY, A. H. Diet-induced increases in adiposity, but not plasma lipids, promote macrophage infiltration into white adipose tissue. **Diabetes**. v. 56, n. 3, p.564-573, 2007.

CORMACK, H. D. **Ham - Histologia**. 9ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 570 p., 1991.

COSTA, I. R.; ARAUJO, F. S.; LIMA-VERDE, L. W. Flora e aspectos auto-ecológicos de um encrave de cerrado na chapada do Araripe, Nordeste do Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 18, n. 4, .p. 759-770, 2004.

COVAS, M. I.; NYSSONEN, K.; POULSEN, H. E.; KAIKKONEN, J.; ZUNFT, H. J. F.; KIESEWETTER, H., *et al.*. The effect of polyphenols in olive oil on heart disease risk factors. **Annals of Internal Medicine**, v. 145, p. 333–341, 2006 a.

COVAS, M. I.; RUIZ-GUTIÉRREZ V.; DE LA TORRE, R.; KAFATOS, A.; LAMUELA-RAVENTÓS, R.M.; OSADA, J., *et al.*. Minor components of olive oil: evidence to date of health benefits in humans. **Nutrition Review**, v. 64, n. 1, p. 20–30, 2006 b.

COVAS, M. I. Olive oil and the cardiovascular system. **Pharmacological Research**, v. 55: p. 175–186, 2007.

COX, R. A. The Hyperlipidemias. **Boletín de la Asociación Médica de Puerto Rico**, v. 95, p.36-44, 2003.

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

DEMONTY, I.; CHAN, Y. M.; PELLED, D.; JONES, P. J. H. Fish-oil esters of plant sterols improve the lipid profile of dyslipidemic subjects more than do fish-oil or sunflower oil esters of plant sterols. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 84, p. 1534–1542, 2006.

DI ROSA, M.; GIROUD, J.P.; WILLOUGHBY, D. A. Studies of the mediators of the acute inflammatory response induced in rats in different sites by carrageenan and turpentine. **Journal of Pathology**, v. 104, p. 15-29, 1971.

DE YOUNG, L. M.; KHEIFETS, J. B.; BALLARON, S. J.; YOUNG, J. M. Edema and cell infiltration in the phorbol ester-treated mouse ear are temporally separated and can be differentially modulated by pharmacologic agents. **Agent Actions**, v.26, p. 335-341, 1989.

ECKEL H, GRUNDY SM, ZIMMET PZ. The metabolic syndrome. **Lancet**, v. 365, p.1415–1428. 2005.

ELIZABETZBY, E. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. In: Simões, C. M. O. (Organizador). 1ª ed. Florianópolis: Editora da Universidade/ UFSC, 1999.

FERNANDEZ, M.L.; MCNAMAR, D.J. Dietary fat-mediated changes in hepatic apoprotein B/E receptor in the guinea pig: effect of polyunsaturated, monounsaturated, and saturated fat. **Metabolism**, v. 38, n.11, p. 1094-102, 1989.

FDA. A review of *Caryocar brasiliense* (Caryocaraceae) - an economically valuable species of the Central Brazilian Cerrados. **Economic Botany**, v. 49, p. 40-48, 1995.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Press Release**, p 04-100. November 1, 2004.
<http://www.fda.gov/bbs/topics/news/2004/NEW01129.html>. Acesso 28 maio, 2011.

FIGUEIREDO, R. W.; MAIA, G. A.; FIGUEIREDO, E. A. T. Propriedades físico-químicas e composição dos ácidos graxos da fração lipídica da polpa e amêndoa do piqui (*Caryocar coriaceum* Wittm). **Revista de Ciências Agronômicas**, v. 20, n. ½, p. 135-139 , 1989.

FRIEDWALD, W. T.; LEVY, R. I.; FREDRICKSON, D. S. Estimation of concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of preparative ultracentrifugation. **Clinical Chemistry**, v. 18 , n. 6, p. 499 – 502, 1972.

FRITSCHÉ, K. L. Too much linoleic acid promotes inflammation – doesn't it? **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 79, p. 173–175, 2008.

FODOR, J. G.; FROHLICH, J. J.; GENEST, J. J. G.; MCPHERSON, P. R. Recommendations for the management and treatment of dyslipidemia: Report of the Working Group on Hypercholesterolemia and Other Dyslipidemias. **Canadian Medical Association Journal**, v. 162, p. 1441-47, 2000.

FRANZ, M. J.; BANTLE, J. P.; BEEBE, C.A.; BRUNZELL, J. D.; CHIASSON, J.L.; GARG, A., *et al.*. Nutrition principles and recommendations in diabetes. **Diabetes Care**, v. 27, n. 1, p.36-46, 2004.

FU, X.; KASSIM, S.Y.; PARKS, W. C.; HEINECKE, J.W. Hypochlorous acid oxygenates the cysteine switch domain of pro-matrilysin (MMP-7): a mechanism for matrix metalloproteinase activation and atherosclerotic plaque rupture by myeloperoxidase. **Journal of Biological Chemistry**. v.276, n. 41, p. 279-287, 2001

GARG, A. High-monounsaturated-fat diets for patients with diabetes mellitus: a meta-analysis. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 67, n.3, p. 577-582, 1998.

GOLDIM, J. R.; RAYMUNDO, M. M. **Pesquisa em Modelos Animais**. Disponível em: <<http://www.ufrgs.br/bioetica/animrt.htm>>. Acesso em: 05 de Junho de 2012. 2008.

HANSSON, G;K. Inflammation, atherosclerosis and coronary artery disease. **New England Journal of Medicine** . v.352, p. 1685-1695, 2005.

HARRIS, W.S.; MOZAFFARIAN, D.; RIMM, E.; KRIS-ETHERTON, P.; RUDEL, L.L.; APPEL, L. J., *et al.*. Omega-6 fatty acids and risk for cardiovascular disease: a science advisory from the American Heart Association Nutrition Subcommittee of the Council on Nutrition, Physical Activity, and Metabolism; Council on Cardiovascular Nursing; and Council on Epidemiology and Prevention. **Circulation**, v. 119, n. 6, p.902-907, 2009.

HARTMAN, L.; LAGO, R. Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids.

Laboratory Practice, v. 8, n. 22, p. 475-476, 1973.

HENRY, G. E.; MOMIN, R. A.; NAIR, M. G.; DEWITT, D. L. Antioxidant and cyclooxygenase activities of fatty acids found in food. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**

istry, v. 50, p. 2231-2234, 2002.

HERZOG-SOARES, J. D.; ALVES, R. K.; ISAC, E.; BEZERRA, J. C. B.; GOMES, M. H.;

SANTOS, S. C.; FERRI, P. H. Atividade tripanocida *in vivo* de *Stryphnodendron adstringens* (barbatimão verdadeiro) e *Caryocar brasiliensis* (pequi). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 12, p. 1-2, 2002.

HIDAKA, A.; INOUE, K.; KUTSUKAKE, S.; ADACHI, M.; KAKUTA, Y.; KOJO, S.

Decrease in the particle size of low-density lipoprotein (LDL) by oxidation. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v.15, p. 2781–2785, 2005.

HOHLFELD, T.; POTT, A.; SCHRÖR, K. Oleic and palmitic acid interfere with the

inhibition of platelet function and thromboxane formation by aspirin: a possible mechanism of aspirin resistance. **Circulation**, v. 118, p. 374-375, 2008.

HOKANSON, J. E.; AUSTIN, M. A. Plasma triglyceride level is a risk factor for cardiovascular disease independent of high-density lipoprotein cholesterol level: a meta-

analysis of population-based prospective studies. **Journal of Cardiovascular Risk**, v. 3, p. 213–219, 1996.

HOTAMISLIGIL, G. S. Role of endoplasmic reticulum stress and c- Jun NH2-terminal kinase pathways in inflammation and origin of obesity and diabetes. **Diabetes**. v. 54, n. 2, p. 73–78, 2005.

IVORRA, M. D.; PAYA, M.; VILLAR, A. A review of natural products and plants as potential antidiabetic drugs. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 27, p. 243 – 275, 1989.

JACKSON, K. G.; BATEMAN, P. A.; YAQOUB, P.; WILLIAMS, C. M. Impact of saturated, polyunsaturated and monounsaturated fatty acid-rich micelles on lipoprotein synthesis and secretion in Caco-2 cells. **Lipids**, v. 44, p. 1081-1089, 2009.

JACKSON, K.G.; MAITIN, V.; LEAKE, D.S.;YAQOUB, P.; WILLIAMS, C. M. Saturated fat-induced changes in Sf 60-400 particle composition reduces uptake of LDL by HepG2 cells. **Journal of Lipid Research** . v. 47, n. 2, p.393-403, 2006.

JAYE, M., KRAWIEC, J. Endothelial lipase and HDL metabolism. **Current Opinion in Lipidology**, v. 15, , n. 2, p.183-189, 2004.

JELLINGER, P. S.; SMITH D. A. ; MEHTA, A. E.; GANDA, O.; HANDELSMAN, Y.; RODBARD, H. W.; SHEPHERD, M. D.;MD, FACE; SEIBEL J. AACE Task Force for Management of Dyslipidemia and Prevention of Atherosclerosis American Association of Clinical Endocrinologists Medical Guidelines for Clinical Pract. **Endocrine Practice** , v. 18, n.1, 2012.

KABAKCI, G.; KOYLAN, N.; ILERIGELEN, B.; KOZAN, O.; BUYUKOZTURK, K. Impact of dyslipidemia on cardiovascular risk stratification of hypertensive patients and association of lipid profile with other cardiovascular risk factors: results from the ICEBERG study. **Integrated Blood Pressure Control**, v. 1, p.5 – 13, 2008.

KERNTOPF, M. R. **Atividade antidiabética da *Bauhinia Ungulata*.: papel dos inositóis componentes dos mediadores putativos da ação da insulina** [tese]. Fortaleza/CE: Universidade Federal do Ceará, 2004

KHANNA, P.; JAIN, S. C.; PANAGARIYA, A.; DIXIT, V. P. Hypoglycemic activity of polypeptide-p from a plant source. **Journal of Natural Products**, v. 44, n. 6, p.648 – 655, 1981.

KHOURI, J.; RESCK, I. S.; POÇAS-FONSECA, M.; SOUSA, T. M. M.; PEREIRA, L. O.; OLIVEIRA, A.B.B.; GRISOLIA, C. K. Anticlastogenic potential and antioxidant effects of an aqueous extract of pulp from the pequi tree (*Caryocar brasiliense* Camb). **Genetics and Molecular Biology**, v. 30, n. 2, p.442-448, 2007.

KIVIMÄKI, M.; NYBERG, S. T.; BATTY, G. D.; SHIPLEY, M. J.; FERRIE, J.E.; VIRTANEN, M., *et al.*. Does adding information on job strain improve risk prediction for coronary heart disease beyond the standard Framingham risk score? The Whitehall II study. **International Journal of Epidemiology** , 2011

KNOOPS, K.T.; DE GROOT, L. C.; KROMHOUT, D.; PERRIN, A. E.; MOREIRAS-VARELA, O.; MENOTTI, A., *et al.*. Mediterranean diet, lifestyle factors, and 10-year mortality in elderly European men and women. The HALE Project. **Journal of the American Medical Association**, v. 292, p. 1433–1439, 2004.

KREISBERG R.A; OBERMAN A. Medical management of hyperlipidemia/dyslipidemia. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 88, p. 2445-2461, 2003.

KRINSKY, N.I. The biological properties of carotenoids. **Pure and Applied Chemistry**, v. 66, p. 1003-1010, 1994.

KUPPURAJAN K, RAJAGOPALAN SS, RAO TK, SITARAMAN R. Effect of guggulu (Commiphora mukul--Engl.) on serum lipids in obese, hypercholesterolemic and hyperlipemic cases. **J Assoc Physicians India**, v. 26, n. 5, p.367-373, 1978.

LEE, J.Y.; CARR, T. P. Dietary fatty acids regulate acyl-CoA: cholesterol acyltransferase and cytosolic cholesteryl ester hydrolase in hamsters. **Journal of Nutrition**,v.134, n. 12, p. 3239-3244, 2004.

LIAU, K.M.; LEE, Y.Y.; CHEN, C.K.; RASOOL, A.H.G. ANOPEN-label pilot study to assess the efficacy and safety of virgin coconut oil in reducing visceral adiposity. **ISRN Pharmacology**, p.1-7, 2011.

LIBBY, P. Metformin and vascular protection: a cardiologist's view. **Diabetes & Metabolism**, v. 29, .n. 6, .p. 117-120, 2003.

LIBBY, P.; RIDKER, P. M.; MASERI, A. Inflammation and atherosclerosis. **Circulation**, v. 105, p. 1135-1143, 2002.

LONGO D. L. ; FAUCI A. S.; KASPE D. L.; HAUSE S. L.; JAMESON J. L.; LOSCALZO J. **Medicina Interna de Harrison**. Artmed 18 ed, 2012.

LOPEZ-GARCIA, E.; SCHULZE, M.B.; MEIGS, J.B.; MANSON, J. E.; RIFAI, N.; STAMPFER, M.J., *et al.*. Consumption of trans fatty acids is related to plasma biomarkers of inflammation and endothelial dysfunction. **Journal of Nutrition**, v.135, n. 3, 562-566, 2005.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2002.

LOTTENBERG, A. M. P. Importância da gordura alimentar na prevenção e no controle de distúrbios metabólicos e da doença cardiovascular. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 53, n. 5 595, 2009

LU, B.; XIA, D.; HUANG, W.; WU, X.; ZHANG, Y.; YAO, Y. Hypolipidemic Effect of Bamboo Shoot Oil (*P. pubescens*) in Sprague–Dawley Rats. **Journal of Food Science**, v. 75, n.6, 2010.

LUCISANO, Y.M., MANTOVANI, B. Lysosomal enzyme release from polymorphonuclear leukocytes induced by immune complexes of IgM and IgG. The **Journal of Immunology**, v.132, p. 2015-2020, 1984.

MACHOWETZ, A.; POULSEN, H. E.; GRUENDEL, S.; WEIMANN, A.; FITO, M.; MARRUGAT, J., et al.. Effect of olive oils on biomarkers of oxidative DNA stress in North and South Europeans. **FASEB Journal**, v. 137, p. 84–87. 2007.

MAHLEY, R.W.; WEISGRABER, K. H.; BERSON, T. P. Disorders of lipid metabolism. In: LARSEN, P.R. KRONENBERG, H.M. MELMED, S. POLONSKY, K. S. **Williams Textbook of Endocrinology**. 11th ed. Philadelphia: WB Saunders, p.1589-1654, 2008.

MALLE, E.; MARSCHE, G.; PANZENBOECK, U.; SATTLER, W. Myeloperoxidase mediated oxidation of high-density lipoproteins: fingerprints of newly recognized potential proatherogenic lipoproteins. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.445, p.245-255, 2006

MALLOY, M.J. KANE, J.P. Disorders of lipoprotein metabolism. In: GREENSPAN, F. S.; GARDNER, D.G. **Basic and Clinical Endocrinology**. 7th ed. New York: McGraw-Hill & Lange, p.766-793, 2004.

MATHUR, K.S., SINGHAL, S.S., SHARMA, R.D. Effect of Bengal Gram on experimentally induced high level of cholesterol in tissues and serum in Albino Rats. **Journal of Nutrition**, v. 84, n. 8, p. 201-204, 1964.

MATOS, F. J. A. **Plantas Mediciniais**: guia de seleção e emprego de plantas usadas em fitoterapia no Nordeste do Brasil. 2^a ed. Fortaleza: IU, 346 p, 2000.

MICCOLI, A. **Natureza**. Disponível em: <www.members.tripod.com/drmiccoli/fitcol.htm>. Acesso em: 07 fev. 2004

MIRANDA-VILELA, A. L.; RESCK, I.S.; GRISOLIA, C.K. Antigenotoxic activity and antioxidant properties of organic and aqueous extracts of pequi fruit (*Caryocar brasiliense* Camb.) pulp. **Genetics and Molecular Biology**, v. 31, n. 4, p. 956-963, 2008.

MIRANDA-VILELA, A. L.; AKIMOTO, A. K.; ALVES, P. C. Z.; PEREIRA, L.C.S.; GONÇALVES, C. A.; KLAUTAU-GUIMARAES, M. N.; GRISOLIA, C. K. Dietary carotenoid-rich pequi oil reduces plasma lipid peroxidation and DNA damage in runners and evidence for an association with MnSOD genetic variant—Val9Ala. **Genetics and Molecular Research**, v. 8, p.481–1495, 2009.

MIRANDA-VILELA, A. L.; LORDELO, G. S.; AKIMOTO, A. K.; ALVES P. C.Z.; PEREIRA, L.C.S.; KLAUTAU-GUIMARAES, M. N.; GRISOLIA, C. K. Genetic polymorphisms influence runners' response to the dietary ingestion of antioxidant supplementation based on pequi oil (*Caryocar brasiliense* Camb.): a before-after study. **Genes & Nutrition**, v. 6, p. 369–395, 2011.

MOHIUDDIN, I.; CHAI, H.; LIN, P.H.; LUMSDEN, A.B.; YAO, Q.; CHEN, C. Nitrotyrosine and chlorotyrosine: clinical significance and biological functions in the vascular system. **Journal of Surgical Research**, v. 133, p.143-9, 2006.

MOSSA, J. S.; TARIQ, M. Pharmacological studies on aerial parts of *Calotropis procera*. **American Journal of Chinese Medicine**, v. 19, n. 3 – 4, p. 223 – 231, 1991.

MUKHERJEE, B.; SARKAR, A.; KULKUARNI, S. Hypolipidemic activity of *Catharanthus roseus* leaf extract in mice. **Fitoterapia**, v. 66, n.6, p. 403 – 407, 1995.

NAPPO, F.; ESPOSITO, K.; CIOFFI, M.; GIUGLIANO, G.; MOLINARI, A.M.; PAOLISSO, G., *et al.* Postprandial endothelial activation in healthy subjects and in type 2 diabetic patients: role of fat and carbohydrate meals. **Journal of the American College of Cardiology**, v.39, n.7, p.1145-1150, 2002.

National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults. Executive summary of the third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). **Journal of the American Medical Association**, v. 285, p. 2486 –2497, 2001.

NICHOLLS, S.J.; HAZEN, SL. Myeloperoxidase and cardiovascular disease. **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**, v. 25, p.1102-1111, 2005.

NICHOLLS, S.J.; HAZEN, SL. The role of myeloperoxidase in the pathogenesis of coronary artery disease. **Japanese Journal of Infectious Diseases** , v.57, p. 21-22, 2004.

NICHOLLS, S.; ZHENG, L.; HAZEN, S.L. Formation of dysfunctional high-density lipoprotein by myeloperoxidase. **Trends in Cardiovascular Medicine**, v.15, p. 212-219, 2005

OLIVIERA, G. H. Novel serologic markers of cardiovascular risk. **Current Atherosclerosis Reports** , v. 7, p. 148-54, 2005.

OLIVEIRA, M.E.B.; GUERRA, N.B.; BARROS, L.M.; ALVES, R.E. Aspectos agronômicos e de qualidade do pequi. Fortaleza: **Embrapa Agroindústria Tropical**, n.113, 32p, 2008.

PAN, M.; CEDERBAUM, A.I.; ZHANG, Y.L.; GINSBERG, H.N.; WILLIAMS, K.J.; FISHER, E.A. Lipid peroxidation and oxidant stress regulate hepatic apolipoprotein B degradation and VLDL production. **Journal of Clinical Investigation**, v. 113, n. 9, p. 1277-1287, 2004.

PARIKH, P.; MCDANIEL, M.C.; ASHEN, M. D.; MILLER, J. I.; SORRENTINO, M.; CHAN, V. *et al.*. Diets and cardiovascular disease. An evidence-based assessment. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 45, p. 1379–1387, 2005.

PARK, E.J.; JHON, D.Y. Effects of bamboo shoot consumption on lipid profiles and bowel function in healthy young women. **Nutrition** v. 25, p. 723–728, 2009..

PASSOS, X. S.; SANTOS, S. C.; FERRI, P. H.; FERNANDES, O. F. L.; PAULA, T. F.; GARCIA, A. C. F.; SILVA, M. R. R. Atividade antifúngica de *Caryocar brasiliensis* (Caryocaraceae) sobre *Cryptococcus neoformans*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 35, n. 6, p. 623-627, 2002.

_____ ; ROCHA, F. H.; DONATTI, L.; FADEL-PICHETH, C. M. T.; WEFFORT-SANTOS, A. M. Leishmanicidal, antibacterial and antioxidant activities of *Caryocar brasiliense* Cambess leaves hydroethanolic extract. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 16 (supl.), p. 625-630, 2006.

PENHA, A. R. S. **Estudo de atividade antiulcerogênica de plantas da chapada do Araripe**. Monografia (Graduação em Ciências Biológicas), 2007. Universidade Regional do Cariri, Crato, 2007.

PEREZ, E. **Diagnose fitoquímica dos frutos de *Caryocar brasiliense* Camb., Caryocaraceae.** 2004. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2004.

PIANOVSKI, A.R.; VILELA, A. F. G.; SILVA, A. A. S.; LIMA, C. G.; SILVA, K. K.; CARVALHO, V. F. M., et al.. Uso do óleo de pequi (*Caryocar brasiliensis*) em emulsões cosméticas: desenvolvimento e avaliação da estabilidade física. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, n. 2, p. 249-259, 2008.

PODREZ, E.A.; FEBBRAIO, M.; SHEIBANI, N.; SCHMITT, D.; SILVERSTERIN, R.L.; HAJJAR DP, et al.. Macrophage scavenger receptor CD36 is the major receptor for LDL modified by monocyte-generated reactive nitrogen species. **Journal of Clinical Investigation**. v.105, p. 1095-1108, 2000

PRANCE, G. T.; SILVA, M. F. Flora da reserva Ducke, Amazonas, Brasil: Caryocaraceae. **Rodriguésia**, v. 57, p. 2,155-157, 2007.

QUIRINO, G. S. **Atividade cicatrizante e gastroprotetora de *Caryocar coriaceum* Wittm.** Dissertação (Mestrado em Bioprospecção Molecular), 2009. Universidade Regional do Cariri, Crato, 2009.

ROESLER, R.; CATHARINO, R.R.; MALTA, L.G.; EBERLIN, M. N.; PASTORE, G. Antioxidant activity of *Caryocar brasiliense* (pequi) and characterization of components by electrospray ionization mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 110, p.711-717, 2008.

RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; MORAIS, S. M.; SAMPAIO, C. G.; JIMÉNEZ, J. P.; SAURA-CALIXTO, F. D. **Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre DPPH** . Julho,

2007. Disponível em: < www.cnpat.embrapa.br/cnpat/cd/jss/acervo/Ct_127.pdf>. Acesso em: 07 out. 2012.

SALGADO, J.M.; BIN, C.; MANSI, D. N.; SOUZA, A. Efeito do abacate (*Persea americana* Mill) variedade hass na lipidemia de ratos hipercolesterolêmicos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 28, p. 4, 922-928, 2008.

SÁNCHEZ-MORENO, C.; LARRAURI, J.A.; SAURA-CALIXTO, F. A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.76, p.270-276. 1998.

SANTOS, H. S.; CRUZ, W. M. S. A terapia nutricional com vitaminas e o tratamento quimioterápico oncológico. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 47, n. 3, p. 303–308, 2001.

SANTOS, R. I. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, p. 403-434, 2007.

SARAIVA, R. A. **Efeito do óleo fixo do mesocarpo interno de *Caryocar Coriaceum* Wittm. em modelos animais de inflamação induzida por agentes flogísticos** [dissertação]. Crato-Ce: Universidade Regional do Cariri; 2009.

SARAIVA, R. A.; ARARUNA, M. K. A.; OLIVEIRA, R. C.; MENEZES, K. D. P.; LEITE, G. O.; KERNTOPF, M. R., *et al.*. Topical anti-inflammatory effect of *Caryocar coriaceum* Wittm. (*Caryocaraceae*) fruit pulp fixed oil on mice ear edema induced by different irritant agents. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 136, n. 3, 504- 510, 2011

SCARTEZINI, M. PICHETH G., SALGADO, W. *et al.*. Metabolismo dos lipídeos e lipoproteínas. In: MATINEZ, T.L.R. **Manual de Condutas Clínicas em Dislipidemias**. São Paulo; Medline, p. 21-33, 2003.

SHAHAR, E.; CHAMBLESS, L.E.; ROSAMOND, W. D.; BOLAND, L. L.; BALLANTYNE, C. M.; MCGOVERN, P. G.; SHARRETT, A. R. Plasma lipid profile and incident ischemic stroke: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study. **Stroke**, v.34, n.3, p.623-631, 2003.

SHEPHERD, J.; BETTERIDGE, J.; VAN, G. L on behalf of a European Consensus Panel. Nicotinic acid in the management of dyslipidemia associated with diabetes and metabolic syndrome: a position paper developed by a European Consensus Panel. **Current Medical Research and Opinion**, v. 21, p. 665– 82, 2005.

SILVA, M. A. P.; MEDEIROS-FILHO, S. Morfologia de fruto, semente e plântula de piqui (*Caryocar coriaceum* Wittm.). **Revista de Ciências Agrônômicas**, Fortaleza, v. 37, n. 3, p. 320-325, 2006a.

_____; _____. Emergência de plântulas de pequi (*Caryocar coriaceum* Wittm.). **Revista de Ciências Agrônômicas**, Fortaleza, v.37, n.3, p. 381-385, 2006b.

SILVA, R. M. **Estudo dos efeitos da *trans*-desidrocrotonina, um diterpeno 19-nor-clerodano do *Croton cajucara* Benth. em hiperlipidemia de hipertrigliceremia experimental**. Fortaleza. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Ceará. 92 p, 2000.

SMIT, J. W.; DIAMANT, M. Genetically defined hyperlipidemia. **Pharmacogenomics**, v.5, p. 295-304, 2004.

SPOSITO, A.C.; CARAMELLI, B.; FONSECA, F.A, *et al.*. IV Brazilian guidelines for dyslipidemia and atherosclerosis prevention: Department of Atherosclerosis of Brazilian Society Cardiology. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 88, suppl 1, 2-19, 2007.

STENHAGEN, E.; ABRAHAMSON, S.; MCLAFFERTY, F. W. **Registry of Mass Spectra Data Base**, Washington DC: Government Printing Office, 1974.

SZKUDELSKI, T, KANDULSKA K, OKULICZ M. Alloxan *in vivo* does not only exert deleterious effects on pancreatic beta cells. **Physiological Research**, v. 47, p. 343-346, 1998.

THOLSTRUP, T.; EHNHOLM, C.; JAUHAINEN, M., *et al.*. Effects of medium-chain fatty acids and oleic acid on blood lipids, lipoproteins, glucose, insulin, and lipid transfer protein activities. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 79, n. 4, p. 564-569, 2004.

TIESTZ, N. W. **Fundamentals of clinical chemistry**. Philadelphia: W. B. Sanders CO. 1970.

TONKS, D.B. **Quality control in clinical laboratories, diagnostic reagents**. Ontario: Division. 1970.

TRIPODI, A.; LORIA, P.; DILENGITE, M. A.; CARULLI, N. Effect of fish oil and coconut oil diet on the LDL receptor activity of rat liver plasma membranes. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1083, n. 3, p. 298-304, 1991.

TSENG, C. F.; LIN, C. C.; HUANG, H.Y.; LIU, H. C.; MAO, S. J. T. Antioxidant role of human haptoglobin. **Proteomics**, v. 4, p. 2221-2228, 2004.

TSI, D.; DAS, N. P.; TAN, B. K. Effects of aqueous celery (*Apium graveolens*) extract on lipid parameters of rats fed a high fat diet. **Planta Medica**, v. 61, p.18 – 21, 1995.

ÚBEDA, A.; FERRÁNDIZ, M. L.; HERENCIA, F. Activación celular: desgranulación leucocitária. In: ALCARAZ, M. J.; CALIXTO, J. B.; DELGADO, R. **Técnicas *in vitro* para el estudio de fármacos antiinflamatorios**. CYTED – Subprograma X Proyecto X.6. Espanha, 2002.

VIEIRA, R.F.; MARTINS, M. V. M. Recursos genéticos de plantas medicinais do cerrado. Uma compilação de dados. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, v. 3, n. 1, p. 13-36, 2000.

WANG, H. X. Natural products with hypoglycemic, hypotensive, hypocholesterolemic, antiatherosclerotic and antithrombotic activities. **Life Sciences**, v. 65, p. 2663 – 2677, 1999.

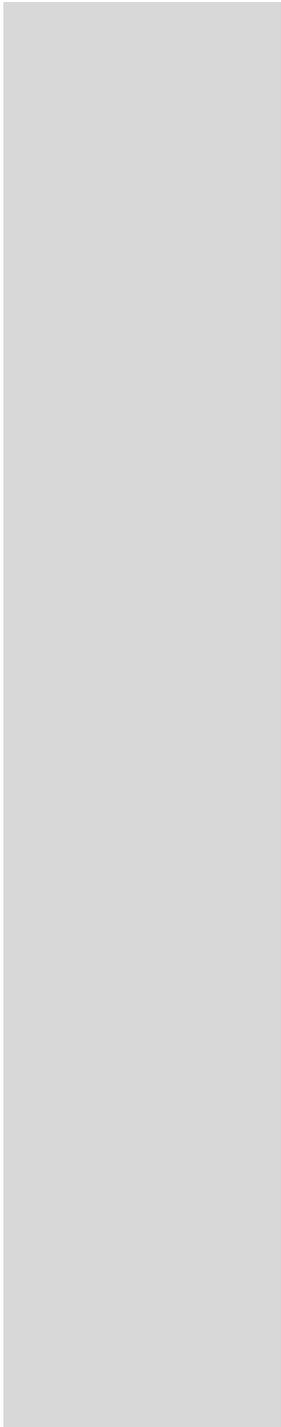
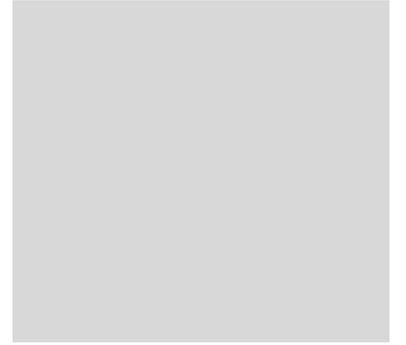
WINTER, C. A.; RISLEY, E. A.; NUSS, G. W. Carrageenan induced oedema in hind paw as an assay for anti-inflammatory drugs. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**., v. 111, p. 544-547, 1962.

WELLEN, K. E., HOTAMISLIGIL, G. S. Inflammation, stress, and diabetes. **Journal of Clinical Investigation**,v. 115, n. 5, p. 1111-1119, 2005.

YU-POTH, S.; YIN, D.,; KRIS-ETHERTON, P.M.; ZHAO, G.; ETHERTON, T.D. Long-chain polyunsaturated fatty acids upregulate LDL receptor protein expression in fibroblasts and HepG2 cells. **Journal of Nutrition**, v.135, n. 11, p. :2541-2545, 2005.

ZHAO, G.; ETHERTON, T. D.; MARTIN, K. R.; HEUVEL, J. P. V.; GILLIES, P. J.; WEST, S. G.; KRIS-ETHERTON, P. M. Anti-inflammatory effects of polyunsaturated fatty acids in THP-1 cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 336, p. 909-917, 2005.

ZIMMET, P.; ALBERTI, K. G.; SHAW, J. Global and societal implications of the diabetes epidemic. **Nature**, v. 414, p. 782 – 787, 2001.



Anexos



UNIVERSIDADE REGIONAL DO CARIRI
Comissão de Experimentação e Uso de Animais



PARECER DO RELATOR DA CEUA

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins de direito que no trabalho intitulado “**Influência do óleo fixo do mesocarpo de *Caryocar Coriaceum* WITTM. sobre o perfil lipídico em modelo animal**”, e que tem como pesquisadores Patrícia Rosane Leite de Figueiredo (Pesquisadora); Marta Regina Kerntopf (Orientadora) e Cicero Francisco Bezerra Felipe (Co-Orientador), foram realizadas as alterações no ítem eutasia do animal, de acordo com as orientações e normas do CEUA. Desta forma, o trabalho foi aprovado sob o número de processo 05/2012.

RECOMENDAÇÃO FINAL:

- Aprovado
 Aprovado com recomendações
 Com Pendência
 Não aprovado

Crato, 08 de outubro de 2012.

Irwin Rose Alencar
Assinatura do Relator da CEUA



UNIVERSIDADE REGIONAL DO CARIRI
Comissão de Experimentação e Uso de Animais



PARECER DO RELATOR DA CEUA

Processo n ° 05/2012

Título do Projeto de Pesquisa: Influencia do óleo fíco do mesocarpo do pequi (Caryocar coriaceum) sobre o perfil lipídico em modelos animais

Pesquisadores: Marta regina Kerntopf (Pesquisadora Orientadora)

Patrícia Rosane Leite de Figueiredo (Pesquisadora Participante)

FINALIDADE DO PROJETO:

Ensino

Pesquisa

ITENS METODOLÓGICOS E ÉTICOS:

Título

Adequado

Comentários

Objetivos

Adequados

Comentários

Introdução e Justificativa

Adequadas

Comentários

Cronograma para execução da pesquisa

Adequado

Comentários

Orçamento e fonte financiadora

Adequados

Comentários

Referências Bibliográficas

Adequadas

Comentários

O PROJETO DESTA PESQUISA ESTA ADEQUADO À LEGISLAÇÃO VIGENTE:

Adequado

Comentários

INFORMAÇÕES RELATIVAS AOS ANIMAIS:

Grau de severidade:

Leve

Moderado

Severo

Justifique:

Este trabalho envolve procedimentos em que os animais experienciam dor, sofrimento ou desconforto moderados, ou dor, sofrimento ou desconforto leves, porém, prolongados.

Espécie: Rattus noevigius

Número Amostral: 180

Redução Amostral:

Sim

Não

Justifique:



UNIVERSIDADE REGIONAL DO CARIRI
Comissão de Experimentação e Uso de Animais



Substituição de Metodologia: Sim Não
Se achar necessário, justifique e sugira uma nova metodologia:

Aprimoramento da Metodologia: Sim Não
Se achar necessário, justifique e sugira aprimoramentos da metodologia:

Acomodação e manutenção dos animais: Adequado Inadequado
Se achar inadequado cite abaixo as melhorias necessárias:

Manipulação dos animais: Adequado Inadequado
Se achar inadequado cite abaixo as melhorias necessárias:

Analgesia dos animais (se aplicável): Adequado Inadequado
Se achar inadequado cite abaixo as melhorias necessárias com analgésico substituto:

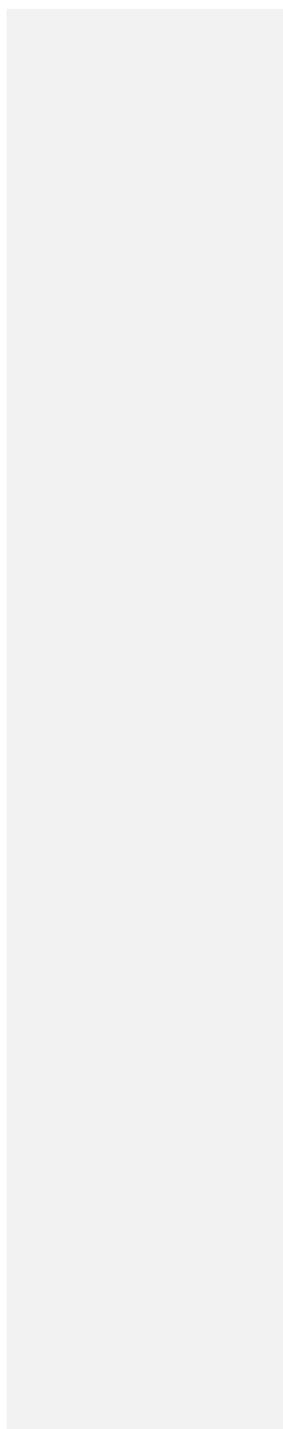
Anestesia dos animais (se aplicável): Adequado Inadequado
Se achar inadequado cite abaixo as melhorias necessárias com anestésico substituto:

Eutanásia dos animais (se aplicável): Adequado Inadequado
Se achar inadequado cite abaixo as melhorias necessárias com metodologia substituta:

A decaptação deve ser feita com anestesia geral prévia.

Análise e Parecer do relator:

O presente projeto tem como finalidade o estudo de avaliar o efeito do óleo fixo do mesocarpo do pequi (*Caryocar coriaceum*) sobre os parâmetros sorológicos lipêmicos em ratos. O estudo envolvendo produtos naturais em perfil sorológico lipídico é de grade importância, pois, não muitos dados na literatura. O estado da arte atual presente neste trabalho levantará possibilidades de conhecimento sobre a influência de óleos fixos vegetais sobre o metabolismo lipídico através dos níveis de colesterol Total e LDL, triglicerídeos e perfil de açúcar. A metodologia empregada é pertinente e, segundo o "Expert working group on severity classification of scientific procedures performed on animals" este procedimento é considerado de grau leve a moderado. O experimento será realizado usando 180 a espécie ratos wistar (*Rattus norvegicus*), com média de peso entre 200-250g e divididos em 6 grupos diferentes. Os animais serão obtidos do biotério da Faculdade de Medicina de Juazeiro do Norte – CE e mantidos em regime *ab libidum* de água e ração em ciclo



Apêndice

TABELA 13 - Avaliação dos efeitos sobre os parâmetros bioquímicos nos soros de ratos e no ganho de peso corporal, após tratamento por via oral (v.o.) com OFCC durante 7 dias

Parâmetros	OFCC 2000	OFCCC 1000	OFCC 500	Salina
Glicose (mg/dL)	104 ± 4,8	100,9 ± 4,02	102 ± 4,07	98 ± 3,3
AST (UI/L)	46,5 ± 0,9	44,6 ± 1,7	43,1 ± 0,9	42,44 ± 0,7
AST (UI/L)	37,8 ± 0,8	38,4 ± 0,5	37,7 ± 0,5	37,4 ± 0,7
CT (mg/dL)	107,6 ± 2,0	103,5 ± 4,	108 ± 3,73	114,2 ± 5,5
HDL-c (mg/dL)	74,1 ± 5,1	67,2 ± 5,3	80,6 ± 4,6	65,4 ± 5,5
TG (mg/dL)	135,1 ± 7,4	133,5 ± 5,4	135,1 ± 7,4x	132,7 ± 11,5

Os valores representam média erro ± padrão da média (E.P.M.), (n=10)

TABELA 14 - Avaliação dos efeitos sobre os parâmetros bioquímicos nos soros de ratos e no ganho de peso corporal, após tratamento por via oral (v.o.) com OFCC durante 15 dias

Parâmetros	OFCC 2000	OFCCC 1000	OFCC 500	Salina
Glicose (mg/dL)	102,9 ± 3,4	103,1 ± 7,3	101,8 ± 3,6	108,2 ± 3,12
AST (UI/L)	42,9 ± 0,9	45 ± 1,4	43,6 ± 1,4	41,5 ± 2,1
ALT (UI/L)	33 ± 0,9	37 ± 0,9	34,5 ± 0,7	35,1 ± 0,8
CT (mg/dL)	139,2 ± 9,7	120,8 ± 9,6	108 ± 4,4	121 ± 8,0
HDL-c (mg/dL)	120,3 ± 7,6	122 ± 8,5	117,3 ± 6,9	86,5 ± 7,
TG (mg/dL)	143,6 ± 14,1	128,3 ± 4,4	102,8 ± 6,9	122,6 ± 8,6

Os valores representam média erro ± padrão da média (E.P.M.), (n=10)

TABELA 15 - Avaliação dos efeitos sobre os parâmetros bioquímicos nos soros de ratos e no ganho de peso corporal, após tratamento por via oral (v.o.) com OFCC durante 30 dias

Parâmetros	OFCC 2000	OFCCC 1000	OFCC 500	Salina
Glicose (mg/dL)	95,3 ± 6,1	97,4,1 ± 1,2	86,5 ± 2,6	84,6 ± 4,0
AST (UI/L)	44,8 ± 0,3	43,4 ± 1,7	44,8 ± 1,4	45,8 ± 1,0
ALT (UI/L)	49,1 ± 1,2	45,5 ± ,9	46,5 ± 1,6	48 ± 1,3
CT (mg/dL)	111,6 ± 6,8	136,4 ± 4,7	127,2 ± 14,3	133,8 ± 5,3
HDL-c (mg/dL)	85,2 ± 4,6	78,5 ± 3,2	72,4 ± 3,1	54,5 ± 4,5
TG (mg/dL)	106,7 ± 4,2	123,4 ± 6,5	131,1 ± 7,9	139,1 ± 6,8

Os valores representam média erro ± padrão da média (E.P.M.), (n=10)

TABELA 16 - Avaliação do potencial hipolipemiante do Óleo Fixo do *Caryocar coriaceum* (OFCC) em modelos de hipertrigliceridemia induzida por Triton WR-1339 em camundongos

Tratamento	CT (mg/dL)		TG (mg/dL)		HDL-c (mg/dL)	
	24h	48 h	24h	48 h	24h	48 h
Salina	82,0 ± 2,1	81,5 ± 4,2	103,5 ± 15,42	79,5 ± 6,8	28,9 ± 2,4	25,7 ± 3,7
Tiloxapol	536,6	392,0 ± 28,3	2275,8 ± 45,1	1254,3 ± 104,7	19,6 ± 2,5	11,7 ± 2,15
	± 57					
OFCC 2000	130,3 ± 9,5	114,3 ± 11,7	397,5 ± 4,6	215,3 ± 8,5	22 ± 2,5	15,2 ± 2,0
OFCC 1000	112,1 ± 8,84	71,2 ± 8,3	73,8 ± 3,6	89,2 ± 4,9	24,7 ± 1,24	23,6 ± 1,55
OFCC 500	400,7 ± 17,9	186,0 ± 17,9	1441,2 ± 33,4	395,5 ± 144,4	16,9 ± 1,25	12,8 ± 1,09
Gemfibrozila	73,7 ± 6,3	74,5 ± 5,8	101,3 ± 14,3	62,6 ± 6,8	19,4 ± 1,07	10 ± 0,74

Os valores representam média erro ± padrão da média (E.P.M.), (n=10)

Estudo Histopatológico de Coração de Ratos *Wistar* depois de 7, 15 e 30 dias do Tratamento com OFCC

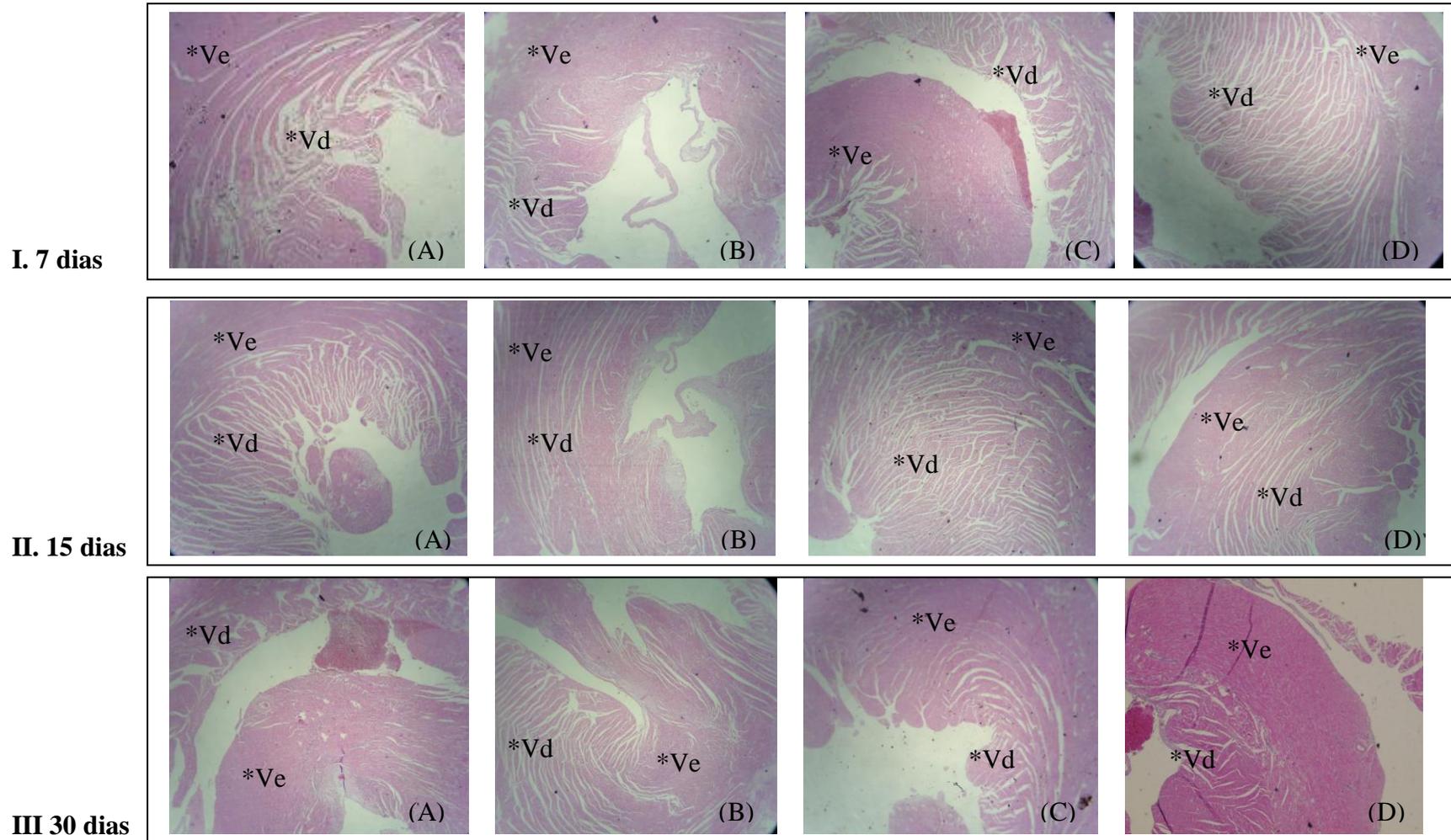


FIGURA 26 - HE 40X Coração histologicamente normal (ventrículo esquerdo (*Ve)/ventrículo direito (*Vd)). (A) Controle (B) 2000mg/dL (C) 1000 mg/dL (D) 500 mg/dL.

Estudo Histopatológico de Fígado de Ratos *Wistar* depois de 7, 15 e 30 dias do Tratamento com OFCC

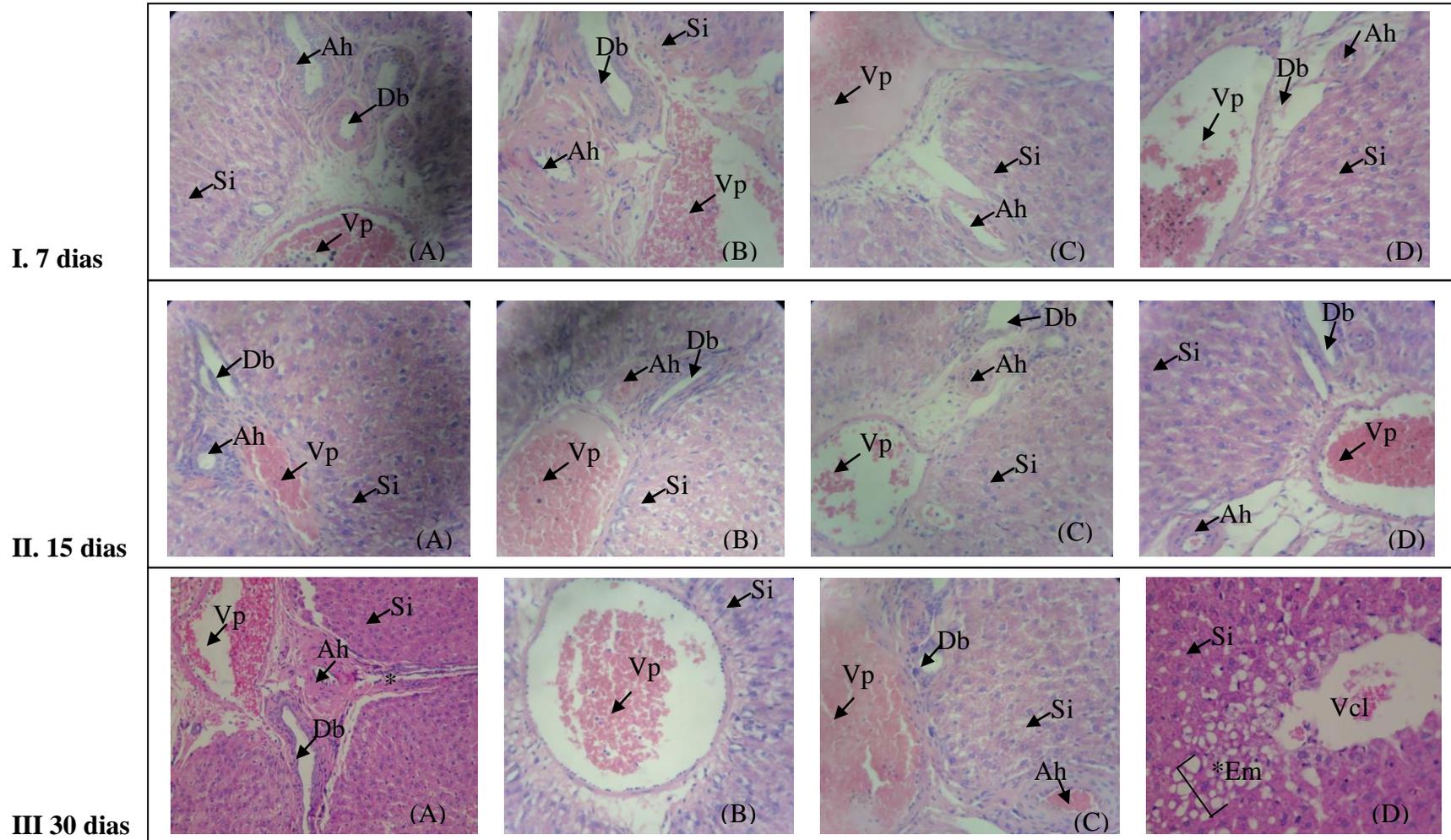


FIGURA 27 - HE 400x – *Representação de espaço-porta hepático. Ah= artéria hepática; Vp= veia porta; Db= ducto bilífero; He= hepatócito; Vcl= veia centro-lobular; Esteatose macrogótica focal (*Em). (A) Controle (B) 2000mg/dL (C) 1000 mg/dL (D) 500 mg/dL.

Estudo Histopatológico de Aorta de Ratos *Wistar* depois de 7, 15 e 30 dias do Tratamento com OFCC

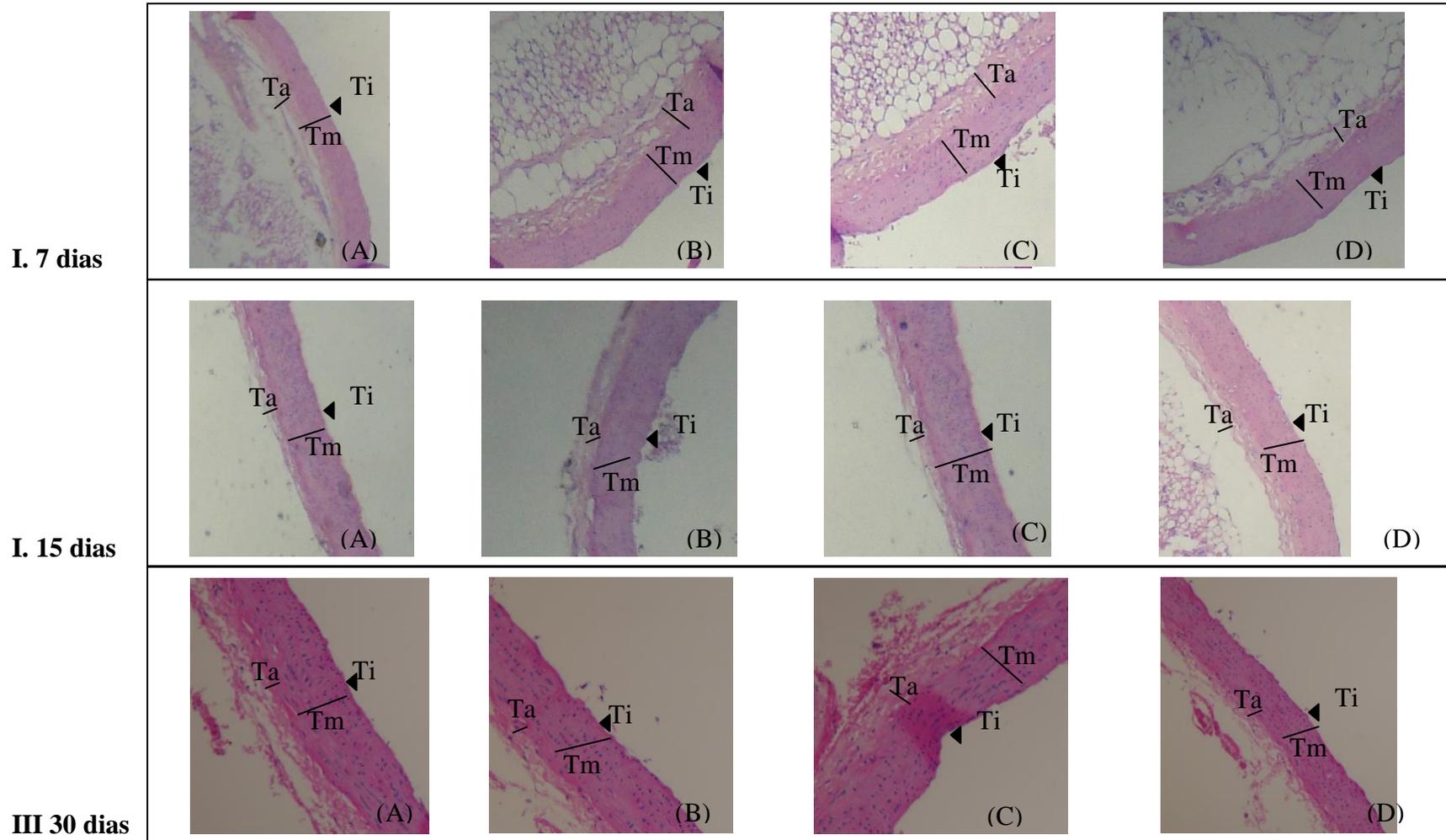


FIGURA 28 - HE 40x – Artéria histologicamente normal em corte longitudinal. Ti= túnica íntima; Tm= túnica média; Ta= túnica adventícia. (A) Controle (B) 2000mg/dL (C) 1000 mg/dL (D) 500 mg/dL.