

VERENA BARTKOWIAK DE OLIVEIRA

**POTENCIAL DOS FRUTOS DE *Xylopi*
aromatica (Lam.) Mart. (ANNONACEAE) NO
TRATAMENTO DE ALTERAÇÕES
METABÓLICAS, INDUZIDAS POR DIETA EM
CAMUNDONGOS BALB/c**

Faculdade de Farmácia da UFMG

Belo Horizonte, MG

2012

VERENA BARTKOWIAK DE OLIVEIRA

**POTENCIAL DOS FRUTOS DE *Xylopi
aromatica* (Lam.) Mart. (ANNONACEAE) NO
TRATAMENTO DE ALTERAÇÕES
METABÓLICAS, INDUZIDAS POR DIETA EM
CAMUNDONGOS BALB/c**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciência de Alimentos

Orientadora: Maria das Graças Lins Brandão

Co-orientadora: Adaliene Versiani Matos Ferreira

Faculdade de Farmácia da UFMG

Belo Horizonte, MG

2012



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DE ALIMENTOS -PPGCA

VERENA BARTKOWIAK DE OLIVEIRA

**“POTENCIAL DOS FRUTOS DE *Xylopi*a *aromatica* (Lam.)
Mart. (ANNONACEAE) NO TRATAMENTO DE ALTERAÇÕES
METABÓLICAS, INDUZIDAS POR DIETA EM CAMUNDONGOS BALB/c”**

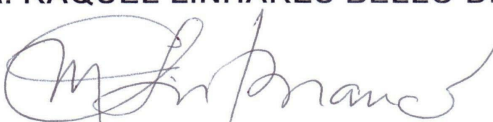
APROVADA EM 15 DE FEVEREIRO DE 2012

COMISSÃO EXAMINADORA


Profa. Dra. ADALIENE VERSIANI MATOS FERREIRA
Co-orientadora


Prof. Dr. GUSTAVO HENRIQUE BIANCO DE SOUZA


Profa. Dra. RAQUEL LINHARES BELLO DE ARAÚJO


Profa. Dra. MARIA DAS GRAÇAS LINS BRANDÃO
Orientadora

Nome da Mestranda: Verena Bartkowiak de Oliveira

Nome da Orientadora: Maria das Graças Lins Brandão

Nome da Co-orientadora: Adaliene Versiani Matos Ferreira

Linha de Pesquisa do PPGCA

Nutrição, Alimentação e Saúde

Áreas de conhecimento (CNPq/CAPES)

5.07.01.00-2 – Ciências de Alimentos

Instituições participantes:

Laboratório de Farmacognosia, Depto. Produtos Farmacêuticos. Faculdade de Farmácia – UFMG.

Laboratório de Imunologia e Bioquímica, Depto. Bioquímica, ICB – UFMG.

Banco de Dados e Amostras de Plantas Aromáticas, Medicinais e Tóxicas (DATAPLAMT), Museu de História Natural e Jardim Botânico (MHNJB) - UFMG

Apoio financeiro: CNPQ, FAPEMIG e CAPES

“No final, conservamos somente o que amamos, amaremos somente o que compreendemos, Compreendemos somente o que nos é ensinado.”

(Bada Dioum)

AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos (PPGCA) da Faculdade de Farmácia da UFMG (FAFAR – UFMG), na pessoa do Coordenador Professor Dr. Roberto Gonçalves Junqueira.

Ao Laboratório de Imunologia e Bioquímica (ICB – UFMG), por disponibilizar sua infraestrutura para realização dos ensaios biológicos.

Ao CNPq, FAPEMIG e a CAPES, pelo apoio financeiro fornecido para a elaboração e concretização deste trabalho.

AGRADECIMENTOS PESSOAIS

Aos meus pais, Felicita e Carlos, pelo apoio e pelo incentivo na busca de crescimento pessoal e científico.

À minha irmã, pelo incentivo, companheirismo e por todos os momentos de convívio e descontração.

À minha orientadora, Professora Maria das Graças Lins Brandão, pelo privilégio de sua orientação, incentivo nos estudos e exemplo de determinação e perseverança para alcançar objetivos na vida.

À minha co-orientadora, Professora Adaliene Versiani Matos Ferreira, pelo voto de confiança me integrando ao seu grupo de pesquisa e pelos conhecimentos compartilhados.

Às Julianas (Almeida e Quadros), Letícia, Daniela, Fernanda, Flávia, Ana Flávia, Darly, Núbia, Luciana, Gustavo e William pelo convívio alegre no laboratório de Farmacognosia, pelo companheirismo e auxílio durante a execução deste trabalho.

À Renata, Milene, Zélia e Marina pelos momentos compartilhados no Laboratório de Imunologia e Bioquímica, pelos ensinamentos e ajuda na execução de ensaios.

E a todos cujos nomes não foram citados, mas que contribuíram para que este trabalho fosse realizado.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	11
LISTA DE FIGURAS	12
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	14
RESUMO.....	16
ABSTRACT	17
1. INTRODUÇÃO	18
2. REVISÃO DE LITERATURA	22
2.1. Obesidade	22
2.2 Obesidade e inflamação.....	24
2.3 Obesidade e resistência à insulina.....	27
2.4. Substâncias bioativas presentes em vegetais.....	29
2.4.1. Substâncias fenólicas: flavonoides e ácidos fenólicos	33
2.4.2 Derivados terpênicos: óleos essenciais e saponinas	35
2.4.2.1 Óleos essenciais	35
2.4.2.2 Saponinas	37
2.4.3 Alcaloides.....	37
2.4.4 Ácidos graxos.....	38
2.5 <i>Xylopia aromatica</i> (Lam.) Mart. (pimenta-de-macaco)	41
3. MATERIAL E MÉTODOS	46
3.1 Materiais.....	46
3.1.1 Equipamentos	46
3.1.2 Reagentes e solventes.....	47
3.1.3 Outros materiais	48
3.2 Métodos	49
3.2.1 Preparação dos frutos para estudo	50
3.2.1.1 Moagem e acondicionamento	50
3.2.1.2 Preparação dos extratos e frações	50
3.2.2 Extração e quantificação de óleos essenciais.....	52
3.2.3 Extração de alcaloides	53
3.2.4 Caracterização das substâncias químicas em EBXA e suas frações .	54

3.2.4.1 Cromatografia em camada delgada (CCD)	54
3.2.4.2 Cromatografia gasosa de alta resolução acoplada ao detector de massas (GC/ EM)	55
3.2.5 Ensaio biológicos	57
3.2.5.1 Animais	57
3.2.5.2 Preparo da dieta rica em carboidratos	57
3.2.5.3 Esquema de tratamento	58
3.2.5.4 Eutanásia	60
3.2.5.5 Desenho experimental	60
3.2.5.6 Obtenção do soro	61
3.2.6 Protocolos experimentais	61
3.2.6.1 Teste de tolerância oral à glicose (TTOG)	61
3.2.6.2 Teste de sensibilidade à insulina (TSI)	61
3.2.6.3 Cálculo do Índice de HOMA-IR e HOMA- β	62
3.2.6.4. Análise morfológica dos adipócitos do tecido adiposo epididimal	62
3.2.6.4.1. Processamento do tecido adiposo epididimal para a microscopia de luz	62
3.2.6.4.2. Aquisição de imagem no microscópio e mensuração da área e diâmetro dos adipócitos	62
3.2.6.5. Dosagens sorológicas	63
3.2.6.6. Contagem total de leucócitos, células mononucleares e neutrófilos	63
3.2.6.7. Extração de citocinas dos tecidos	63
3.2.6.8. Determinação da concentração de citocinas por ELISA	64
3.2.7. Análise estatística	64
4. RESULTADOS	65
4.1 Análises químicas do EBXA e suas frações	65
4.1.1 Rendimento das extrações	65
4.1.2. Quantificação e caracterização do óleo essencial de <i>X. aromatica</i> (OEXA)	66

4.1.3. Caracterização química dos frutos de <i>X. aromatica</i> por CCD	66
4.1.4 Caracterização do HEXA dos frutos de <i>X. aromatica</i> por CG/ EM.....	71
4.1.5 Perfil de ácidos graxos dos frutos de <i>X. aromatica</i> por CG/ EM	76
4.2 Efeitos do EBXA no tratamento de alterações metabólicas induzidas por dieta em camundongos BALB/c	79
4.2.1 Teste de tolerância oral à glicose (TTOG)	79
4.2.2 Teste de sensibilidade à insulina (TSI)	80
4.2.3 Ingestão alimentar, peso ponderal e índice de adiposidade	80
4.2.4. Análise morfológica dos adipócitos do tecido adiposo epididimal	81
4.2.5 Teste de tolerância oral à glicose após quatro semanas de tratamento com EBXA.....	83
4.2.6 Teste de sensibilidade à insulina após quatro semanas de tratamento com EBXA.....	84
4.2.7 Parâmetros sorológicos.....	85
4.2.7.1 Triacilglicerol, colesterol total, glicose de jejum, insulina e índices HOMA	85
4.2.8 Avaliação da inflamação sistêmica e local	86
4.2.8.1 Contagem de leucócitos totais, células mononucleadas e neutrófilos	86
4.2.8.2 Concentração de citocinas no tecido adiposo epididimal e hepático	87
5. DISCUSSÃO	89
6. CONCLUSÃO.....	106
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	107
ANEXO A	128
ANEXO B	129
ANEXO C	134

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Distribuição de macro e micronutrientes e densidade calórica (Kcal/g) da dieta controle e HC.....	57
Tabela 2 - Rendimento do EBXA e HEXA.....	64
Tabela 3 - Rendimento do fracionamento a partir do EBXA utilizando diferentes solventes de polaridade crescente.....	64
Tabela 4 - Composição do HEXA determinado por CG/ EM.....	73
Tabela 5 - Ácidos graxos detectados no HEXA (lote 2) por CG/ EM.....	76
Tabela 6 - Parâmetros sorológicos e índices de HOMA.....	83

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Amplificação do estado inflamatório no tecido adiposo, mediado por macrófagos.....	25
Figura 2 - Esquema da biossíntese das substâncias bioativas.....	29
Figura 3 - Estrutura química dos flavonoides.....	32
Figura 4 - Estrutura química dos ácidos hidroxicinâmicos.....	34
Figura 5 - Estrutura química da isoquinolina.....	37
Figura 6 - <i>X. aromatica</i> (Lam.) Mart.....	41
Figura 7 - Frutos de <i>X. aromatica</i> (Lam.) Mart.....	49
Figura 8 - Obtenção do extrato bruto e frações dos frutos moídos de <i>X. aromatica</i>	51
Figura 9 - Aparelho utilizado para obtenção dos óleos essenciais presentes no fruto de <i>X. aromatica</i>	52
Figura 10 - Escala temporal do desenho experimental.....	59
Figura 11 - Obtenção de óleo essencial por hidrodestilação.....	65
Figura 12 - CCD para identificação de flavonoides.....	66
Figura 13 - Estrutura química das substâncias fenólicas identificadas por CCD nos frutos de <i>X. aromatica</i>	67
Figura 14 - CCD para identificação de saponinas.....	68
Figura 15 - CCD para identificação alcaloides.....	69
Figura 16 - CCD identificação de óleos essenciais.....	70
Figura 17 - Cromatograma (CG/ EM) dos constituintes químicos presentes no HEXA (lote 1).....	72
Figura 18 - Estruturas químicas das principais substâncias identificadas no HEXA (lote 1) por CG/ EM.....	74
Figura 19 - Cromatograma (CG/ EM) dos ácidos graxos presentes no HEXA (lote 2).....	75
Figura 20 - Estruturas químicas dos ácidos graxos identificados no HEXA (lote 2) por CG/ EM.....	76
Figura 21 - TTOG na oitava semana de experimento.....	77
Figura 22 - TSI na oitava semana de experimento.....	78

Figura 23 - Peso corporal e índice de adiposidade.....	79
Figura 24 - Análise histológica de secções do tecido adiposo epididimal.....	80
Figura 25 - TTOG realizada na 12 ^a semana de experimento, após quatro semanas de suplementação com três diferentes doses do EBXA.....	81
Figura 26 - TSI realizada na 12 ^a semana de experimento, após quatro semanas de suplementação com três diferentes doses do EBXA.....	82
Figura 27 - Contagem total de leucócitos e diferencial - mononucleadas e neutrófilos.....	84
Figura 28 - Concentração de IL-6, TNF- α e IL-10 no tecido adiposo epididimal de camundongos.....	85
Figura 29 - Concentração de IL-6 e TNF- α no tecido hepático de camundongos.....	86
Figura 30 - Espectro de massa referente ao pico 1 (CG/ EM do HEXA, lote 1).....	128
Figura 31 - Espectro de massa referente ao pico 2.....	128
Figura 32 - Espectro de massa referente ao pico 3.....	129
Figura 33 - Espectro de massa referente ao pico 4.....	129
Figura 34 - Espectro de massa referente ao pico 5.....	130
Figura 35 - Espectro de massa referente ao pico 6.....	130
Figura 36 - Espectro de massa referente ao pico 7.....	131
Figura 37 - Espectro de massa referente ao pico 8.....	131
Figura 38 - Espectro de massa referente ao pico 9.....	132
Figura 39 - Espectro de massa referente ao pico 10.....	132
Figura 40 - Espectro de massa referente ao pico 1 (CG/ EM do HEXA, lote 2).....	133
Figura 41 - Espectro de massa referente ao pico 2.....	133
Figura 42 - Espectro de massa referente ao pico 3.....	133
Figura 43 - Espectro de massa referente ao pico 4.....	133
Figura 44 - Espectro de massa referente ao pico 5.....	134
Figura 45 - Espectro de massa referente ao pico 6.....	134

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	Ácido araquidônico
AGLs	Ácidos graxos livres
ALA	Ácido alfa-linolênico
ALT	Alanina aminotransferase
ANOVA	Análise de variância
AST	Aspartato aminotransferase
AUC	<i>Area under the curve</i>
BHT	Hidróxitolueno butilado
C	Grupo controle
CCD	Cromatografia de camada delgada
CCL2	Quimiocina ligante da subfamília CC, número 2
CG	Cromatografia gasosa
CG / EM	Comatografia gasosa acoplada a espectrofotômetro de massa
DAD	<i>Diode array detector</i>
DHA	Ácido decosaheptaenóico
DANT'S	Doenças e agravos não transmissíveis
DATAPLAMT	Banco de dados de amostras de plantas aromáticas, medicinais e tóxicas
EBXA	Extrato bruto de <i>X. aromatica</i>
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra acético
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EPA	Ácido graxo eicosapentaenóico
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FABUT	Fração butanólica
FACET	Fração acetato de etila
FAEXA	Fração de alcalóides extraídos diretamente do fruto
FAHEX	Fração hexano
GLUT4	Proteína transportadora de glicose
HEXA	Extrato hexânico
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico
HC	Dieta rica em carboidratos
HC50	Dieta rica em carboidratos suplementada na dose de 50 mg/Kg
HC100	Dieta rica em carboidratos suplementada na dose de 100 mg/Kg
HC200	Dieta rica em carboidratos suplementada na dose de 200 mg/Kg
HOMA - IR	<i>Homeostasis model of assessment for insulin resistance</i>
HOMA - β	<i>Homeostasis model of assessment for β-cell function</i>
IKK	Quinase do inibidor do fator de transcrição NF-κB
IA	Índice de adiposidade
IL-6	Interleucina 6
IL-10	Interleucina 10
IRS-1	Substrato-1 do receptor de insulina
IS	Índice de similaridade
JNK	Jun N-terminal quinase
M1	Macrófagos clássicos

M2	Macrófagos alternativos
MAPK	Proteína quinase regulada pelo extracelular
NF-κB	Factor nuclear kappa B
NP	Difenilborilhexiletanolamina
OEXA	Óleo essencial do fruto de <i>X. aromatica</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
OPD	<i>O-phenylendiamine dihydrochloride</i>
PEG	Poliétilenoglicol
PBS	Salina tamponada com fosfato
PC	Peso corporal
PCR	Proteína C reativa
PI3K	Fosfatidil-inositol-3-quinase
PKC	Proteína quinase C
POF	Programa de Orçamentos Familiares
PPAR γ	Receptor ativado por proliferadores de peroxissomos
Rf	Fator de retenção
SI	Sensibilidade à insulina
SC	Saponina comercial
TAE	Tecido adiposo epididimal
TAM	Tecido adiposo mesentérico
TAR	Tecido adiposo retroperitoneal
TAG	Triacilglicerídeos
TLR4	<i>Toll-like receptor 4</i>
TNF- α	Fator de necrose tumoral
T _R	Tempo de retenção
TSI	Teste de sensibilidade à insulina
TTOG	Teste de tolerância oral à glicose
TZD's	Tiazolidinedionas
UI	Unidades de insulina
UV	Ultravioleta
W-3	Ácido linolênico
W-6	Ácido linoléico

RESUMO

A obesidade é uma condição inflamatória crônica, de baixa intensidade, envolvida no desenvolvimento de diversas comorbidades. Estudos têm demonstrado que substâncias bioativas presentes em plantas são capazes de modular a inflamação observada na obesidade e melhorar as comorbidades associadas ao excesso de adiposidade. Assim, nosso grupo vem estudando várias espécies nativas do Brasil visando verificar suas potencialidades no tratamento da obesidade e alterações metabólicas associadas. O objetivo desse estudo foi avaliar se os frutos de *Xylopia aromatica* eram capazes de tratar a obesidade e modular a disfunção metabólica e inflamatória observada nos animais alimentados com dieta HC. Os frutos foram secos, moídos e as substâncias químicas extraídas a frio até a exaustão, com solução hidroalcoólica a 95%. O extrato bruto foi obtido após a evaporação do solvente. Após oito semanas de consumo de dieta HC, ou controle foi realizado TTOG e TSI. Depois de confirmada as alterações, os testes foram repetidos após quatro semanas de consumo de dieta HC, acrescentando o extrato bruto nas concentrações de 50, 100 e 200 mg/kg de PC. Os animais alimentados com dieta HC apresentaram maior adiposidade e adipócitos hipertrofiados, menor tolerância oral à glicose e sensibilidade à insulina, maior índice HOMA-IR e menor índice HOMA- β , maiores concentrações de TNF- α , IL-6 no fígado e de TNF- α , IL-6 e IL-10 tecido adiposo, em relação aos animais alimentados com dieta controle. Após a adição do extrato na dieta, foi observada melhora na tolerância oral à glicose em todos os grupos que receberam o extrato. O grupo que recebeu o extrato na maior dose também apresentou melhora na sensibilidade à insulina. Os valores de leucócitos totais e os valores de células mononucleadas estavam menores nos animais que receberam o extrato, assim como a concentração de citocinas de perfil inflamatório (TNF- α , IL-6) no fígado. O tratamento com *X. aromatica* melhorou a tolerância oral à glicose e a sensibilidade à insulina, assim como a inflamação sistêmica e no fígado dos animais alimentados com dieta HC.

Palavras chaves: Obesidade; resistência à insulina; *Xylopia aromatica*

ABSTRACT

Obesity is associated with a chronic low-grade inflammation involved in the development of various comorbidities. Studies have shown that bioactive substances in plants could modulate inflammation and improve health problems associated with the excess of adiposity. Thus, our group has studied native species from Brazil to check their potential in treating obesity and related metabolic disorders. The objective of this study was to evaluate whether the fruits of *X. aromatica* were able to treat obesity and modulate inflammatory and metabolic dysfunction observed in animals fed diet HC. The fruits were cold-extracted until exhaustion with 95% water-alcohol solution. The extract tested was obtained after solvent evaporation. A test was performed to evaluate OGT and IS in mice after eight weeks of consumption of HC diet, or control. After confirmed the changes, the tests were repeated after four weeks of consumption of HC diet, adding the extract of the fruit at concentrations of 50, 100 and 200 mg/BW. Animals fed diet HC had higher values of adiposity and adipocyte hypertrophy, lower oral glucose tolerance and insulin sensitivity, higher HOMA-IR and lower HOMA- β , higher concentrations of TNF- α and IL-6 in the liver and also higher values of TNF- α , IL-6 and IL-10 in the adipose tissue, compared to the animals fed with control diet. After the addition of the extract in the diet was observed improvement in oral glucose tolerance in all groups that received the extract. The group that received the extract at the highest dose also showed improvement in insulin sensitivity. The values of total leukocytes and mononuclear cell values were lower in animals supplemented with the extract, as well as the concentration of inflammatory cytokine profile (TNF- α , IL-6) in the liver. Treatment with *X. aromatica* improved oral glucose tolerance and insulin sensitivity, as well as systemic inflammation in the liver compared to the animals animals fed with HC diet.

Keywords: Obesity, insulin resistance, *Xylopia aromatica*

1. INTRODUÇÃO

A obesidade aumentou de forma alarmante nos últimos anos, principalmente nos países do ocidente (WHO, 2010). Essa situação é preocupante visto que a obesidade está relacionada ao desenvolvimento de diversas alterações metabólicas, incluindo dislipidemia, resistência à insulina, diabetes tipo II e hipertensão (WELLEN & HOTAMISLIGIL, 2003; HOTAMISLIGIL, 2006). Tais enfermidades atualmente são um problema de saúde pública que assumiu proporções epidêmicas nos países do ocidente (ADA, 2004). Além disso, representam as maiores causas de morbidade e mortalidade nas sociedades atuais (POWELL, 2007; WELLEN & HOTAMISLIGIL, 2003).

As principais causas da obesidade são o sedentarismo e o consumo excessivo de alimentos com alta densidade calórica e de baixa qualidade nutricional. O balanço energético positivo, assim como o tipo de dieta ingerida, rica em carboidratos simples ou lipídios saturados favorece a hipertrofia e hiperplasia dos adipócitos, com conseqüente aumento da secreção de adipocinas, citocinas e quimiocinas, incluindo o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), e a interleucina 6 (IL-6) (GREENBERG & OBIN, 2006; MOKDAD et al., 2003; WELLEN & HOTAMISLIGIL, 2003; HOTAMISLIGIL et al., 1993). O aumento da secreção dessas proteínas de perfil pró-inflamatório caracteriza a obesidade como um estado inflamatório crônico, de baixa intensidade, relacionado com o desenvolvimento de várias comorbidades, incluindo a resistência à insulina, diabetes tipo II e alterações cardiovasculares (LUMENG & SALTIEL, 2011; LUCA & OLEFSKY, 2008; LAHOZA & MOSTAZAA, 2007; WANG et al., 2004).

Estudos observacionais e ensaios clínicos indicam que a dieta desempenha importante papel na redução do risco dessas doenças. Sugere-se que a adoção de hábitos saudáveis, com aumento do consumo de alimentos de origem vegetal, ricos em nutrientes e substâncias bioativas, e a redução da ingestão de alimentos ricos em gordura saturada e de elevado índice glicêmico,

promove a melhoria do estado inflamatório (BRESSAN et al., 2009; GERALDO & ALFENAS, 2008).

Várias pesquisas já identificaram nutrientes e substâncias bioativas, presentes principalmente em alimentos vegetais, que atuam em alvos fisiológicos específicos, interferindo nos processos patogênicos de inúmeras doenças (BASTOS et al., 2009). Os efeitos benéficos das substâncias bioativas nas alterações metabólicas associadas à obesidade, inclusive das especiarias, também vem sendo avaliados. A atividade terapêutica observada tem sido atribuída principalmente às substâncias fenólicas e alcaloides presentes nestes alimentos (WOO et al., 2007; LAMPE, 2003).

Existe hoje um grande interesse na utilização de alimentos funcionais, nutracêuticos ou fitoterápicos como auxiliares no tratamento da obesidade e doenças metabólicas associadas. Porém, muitas plantas medicinais popularmente utilizadas para tratamento da obesidade e diabetes ainda não possuem estudos em laboratório, que comprovem os seus benefícios (SHARPE et al., 2006; WESTERTERP-PLATENGA et al., 2006). Além disto, embora o Brasil seja detentor de uma vasta biodiversidade, grande parte das plantas validadas hoje e recomendadas para uso como fitoterápico, não são espécies nativas do Brasil. A raridade de espécies brasileiras que possuem estudos conclusivos reforça a necessidade da recuperação e avaliação das plantas nativas que são muito pouco conhecidas e estudadas (BRANDÃO et al., 2009). Nosso grupo vem se empenhando em recuperar informações sobre o uso tradicional dessas espécies, visando promover seu melhor aproveitamento. Entre as espécies levantadas está a *Xylopia aromatica* (Lam.) Mart., da família Annonaceae.

A *Xylopia aromatica* (Lam.) Mart. (pimenta-de-macaco) é um fruto nativo do cerrado mineiro e utilizado como condimento (SILVA & ROCHA, 1981). Vários constituintes químicos, incluindo óleos essenciais, alcaloides, flavonoides e ácidos graxos insaturados (BOUBA et al., 2010; SILVA et al., 2009; ANDRADE et al., 2004; STASCHENKO et al., 2004; MOREIRA et al., 2003; MARTINS et al., 1995; SILVA & ROCHA, 1981) de espécies de *Xylopia* são relatadas na

literatura, assim como atividade antioxidante, diurética, hopolipidêmica e hipoglicêmica (NWOSO et al., 2011; EZEKWESILI et al., 2010; OGBONNIA et al., 2010; OGBONNIA et al., 2008; SUFFREDINI et al., 2007; SOMOVA et al., 2001). No entanto, poucos são os estudos feitos até o momento com a *X. aromatica*.

O presente estudo teve como objetivo geral, avaliar o potencial da espécie *X. aromatica* (Lam.) Mart. no tratamento da obesidade e de suas alterações metabólicas em modelo animal. Os objetivos específicos foram:

- ✓ Traçar o perfil fitoquímico do extrato bruto e suas frações hexânica (FAHEX), acetato de etila (FACET) e butanólica (FABUT), além dos óleos essenciais do fruto (OEXA) por meio de cromatografia de camada delgada (CCD);
- ✓ Caracterizar o perfil de ácidos graxos e de óleos voláteis presentes no extrato hexânico do fruto (HEXA) por meio da cromatografia gasosa acoplada a espectômetro de massa (CG/ EM);
- ✓ Submeter o extrato bruto nas doses de 50, 100 e 200 mg/Kg de peso corporal (PC) a ensaios *in vivo* para verificar a eficácia do mesmo no tratamento da obesidade induzida por dieta.
- ✓ Avaliar se o tratamento com o extrato bruto da planta interfere na (i) ingestão alimentar, (ii) no ganho de PC, (iii) no índice de adiposidade, (iv) na morfologia dos adipócitos (área), (v) na tolerância oral à glicose (vi) e na sensibilidade à insulina;
- ✓ Avaliar se a adição do extrato bruto na dieta HC altera parâmetros sorológicos relacionados ao metabolismo dos lipídios (triacilglicerol e colesterol total) e da glicose (glicemia e insulina de jejum);

- ✓ Verificar se a adição do extrato bruto na dieta HC promove alterações de marcadores inflamatórios sistêmicos (contagem total de leucócitos, mononucleadas e neutrófilos) e local, através da análise nas concentrações de citocinas pró-inflamatórias, nos tecidos hepáticos (TNF- α , IL-6) e adiposo epididimal (TNF- α , IL-6 e IL-10).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Obesidade

A obesidade é um dos maiores problemas enfrentados na área de saúde pública na atualidade, atingindo países desenvolvidos e em desenvolvimento (HOSSAIN et al., 2007). Segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) o excesso de gordura corporal tem aumentado de forma alarmante nos últimos anos, principalmente nos países do ocidente. A estimativa para a obesidade no futuro é preocupante: em 2015, aproximadamente 2,3 bilhões de adultos no mundo estarão com excesso de peso e 700 milhões serão obesas (WHO, 2010).

Dados da OMS também mostram valores preocupantes em relação à obesidade no Brasil. No ano de 2002, a prevalência de obesidade em homens e mulheres acima de 15 anos era de 6,9% e 15%, respectivamente. Em 2010, ou seja, em apenas 8 anos, a prevalência de obesidade praticamente dobrou para 12,4% no sexo masculino e aumentou para 24,5% no sexo feminino (WHO, 2010).

Outra questão importante é o rápido aumento da obesidade infantil, observado nas últimas décadas. Nos Estados Unidos, a prevalência de obesidade infantil triplicou nos últimos 30 anos e, no Brasil, estudos mostram situação semelhante. Na infância, o excesso de peso corporal se torna ainda mais preocupante, uma vez que favorece o surgimento das morbidades associadas à obesidade, como hipertensão arterial e diabetes, as quais antes acometiam somente adultos e raramente atingiam a faixa etária mais jovem (OGDEN et al., 2010; OLIVEIRA & FISBERG, 2003).

Essa situação tem relação principalmente com o sedentarismo, favorecido por mudanças na estrutura de trabalho, assim como avanços tecnológicos (POPKIN, 1999). O aumento do consumo de alimentos de elevada densidade

energética, ricos em gordura saturada, açúcar e sódio também são causas do aumento da obesidade. Junto a isso, observa-se diminuição do consumo de cereais integrais, leguminosas, frutas e vegetais, alimentos fonte de micronutrientes, fibras e substâncias bioativas (WHO, 2006).

Estudo realizado pela Pesquisa de Orçamento Familiar (POF, 2008-2009) avaliou a disponibilidade domiciliar de alimentos e sua evolução nas áreas metropolitanas do Brasil, no período de 2003 a 2009. A pesquisa revelou que em todo o país e em todas as faixas de renda, houve consumo excessivo de açúcar e alimentos industrializados ricos em gordura saturada e sódio na alimentação do brasileiro, além de consumo insuficiente de frutas e hortaliças. Essas mudanças de hábitos favorecem um balanço energético positivo e consequente ganho de peso corporal (IBGE, 2010).

Atualmente, o aumento da adiposidade tem sido considerado um problema de saúde pública, pois está normalmente associado às alterações metabólicas e funcionais prejudiciais à saúde, incluindo o desenvolvimento de resistência à insulina, hiperglicemia, diabetes tipo 2, esteatose hepática, dislipidemias, aterosclerose, hipertensão, além de várias outras complicações cardiovasculares (HOTAMISLIGIL, 2006; MOKDAD, 2003). Tais comorbidades estão relacionadas à menor expectativa de vida e maior risco de morte prematura (WHO, 2010).

A relação entre a obesidade e o desenvolvimento de doenças e agravos não transmissíveis (DANT's) é conhecida desde a década de 40 (BRAM, 1947; KELLEY, 1946). Porém, somente nos anos 90, o papel do tecido adiposo no desenvolvimento da obesidade deixou de ser apenas passivo, com função quase que exclusiva de estoque e fornecimento de energia. Descobriu-se que o tecido adiposo secreta várias proteínas denominadas adipocinas e citocinas e que durante a sua expansão há uma maior liberação de proteínas de perfil pró-inflamatório. Assim, um novo conceito sobre a função biológica deste tecido vem surgindo, consolidando a idéia do tecido adiposo ser um órgão central no controle do metabolismo (POWELL, 2007; HOTAMISLIGIL et al., 1993).

2.2 Obesidade e inflamação

A associação entre obesidade e inflamação crônica de baixa intensidade foi estabelecida pela primeira vez com o estudo de HOTAMISLIGIL et al. (1993), quando se demonstrou que a expressão do TNF- α , citocina pró-inflamatória, estava aumentada em animais obesos. Desde então, a obesidade tem sido associada com o aumento da liberação de diversas citocinas, adipocinas e proteínas de perfil pro e antiinflamatório, incluindo as interleucinas 6 e 10 (IL-6 e IL-10), a quimiocina ligante da subfamília CC, número 2 (CCL2), a proteína C-reativa (PCR) e a resistina (INADERA, 2008; HOTAMISLIGIL, 2006; JUGE-AUBRY et al., 2005; WEISBERG et al., 2003; XU et al., 2003).

A resposta inflamatória desencadeada pela obesidade tem sido denominada, mais recentemente, de metainflamação. Esta terminologia foi concebida para diferenciar a inflamação relacionada a alterações metabólicas da resposta inflamatória clássica, induzida por patógenos, trauma ou doenças auto-imune. A metainflamação envolve alguns componentes similares a resposta inflamatória clássica como aumento na circulação sistêmica de citocinas inflamatória, proteínas de fase aguda, o recrutamento de leucócitos para tecidos inflamados, ativação de leucócitos no tecido e geração de respostas no tecido reparador, como por exemplo, a fibrose. No entanto, a metainflamação tem como fator desencadeante a ingestão excessiva de macronutrientes, e não inclui manifestações de sinais e sintomas como vermelhidão, dor e inchaço e aumento da taxa metabólica basal, características marcantes da resposta inflamatória clássica. Na inflamação associada à obesidade, a expressão de citocinas ocorre geralmente de forma mais branda, local e crônica, com menor ativação do sistema imune (GREGOR & HOTAMISLIGIL, 2011; LUMENG & SALTIEL, 2011).

Os adipócitos são células encontradas no tecido adiposo. Este tecido é heterogêneo e composto, não apenas por adipócitos, mas também por células da fração do estroma-vascular, composta de pré-adipócitos, fibroblastos, células endoteliais e macrófagos (WEISBERG et al., 2003; XU et al., 2003). Na

fração estroma-vascular do tecido adiposo, os macrófagos, células fagocitárias mononucleares envolvidas nos processos imunológicos e inflamatórios, representam cerca de três a 10% das células em indivíduos magros. Porém, na obesidade, podem representar mais de 40% de todas as células do tecido e são considerados um dos principais responsáveis pela amplificação da resposta inflamatória (CHAWLA et al., 2011; CURAT et al., 2004; WEISBERG et al., 2003).

Os macrófagos podem ser estimulados para expressar padrões distintos de quimiocinas e citocinas. Nos macrófagos do tecido adiposo de animais magros predomina a expressão de genes de característica antiinflamatória, característico de macrófagos alternativos do tipo M2. Em contrapartida, animais obesos apresentam em maior quantidade macrófagos clássicos do tipo M1, os quais possuem aumento na expressão de TNF- α , citocina de perfil pró-inflamatório (LUMENG et al., 2007).

Existem várias teorias para explicar as causas do recrutamento de macrófagos no tecido adiposo e o aumento da resposta inflamatória na obesidade (CHAWLA et al., 2011; GREGOR & HOTAMISLIGIL, 2011; HIRAI et al., 2010; SCHENK et al., 2008). Entre elas pode-se citar: (i) lipotoxicidade, caracterizada por maiores concentrações de ácidos graxos livres (AGLs) circulantes, (ii) hipóxia do tecido adiposo, induzida pelo aumento do tamanho dos adipócitos com consequente ativação do sistema imune, (iii) estresse oxidativo, relacionado com a elevação AGLs e glicose circulantes e (iv) estresse do retículo endoplasmático. Essas alterações metabólicas contribuem para o aumento da produção e secreção de TNF- α e outras citocinas pro-inflamatórias com consequente recrutamento de macrófagos para o tecido adiposo (Figura 1). Os macrófagos recrutados e ativados promoverão recrutamento e ativação de novos macrófagos, amplificando o estado inflamatório, relacionado ao desenvolvimento de diversas patologias.

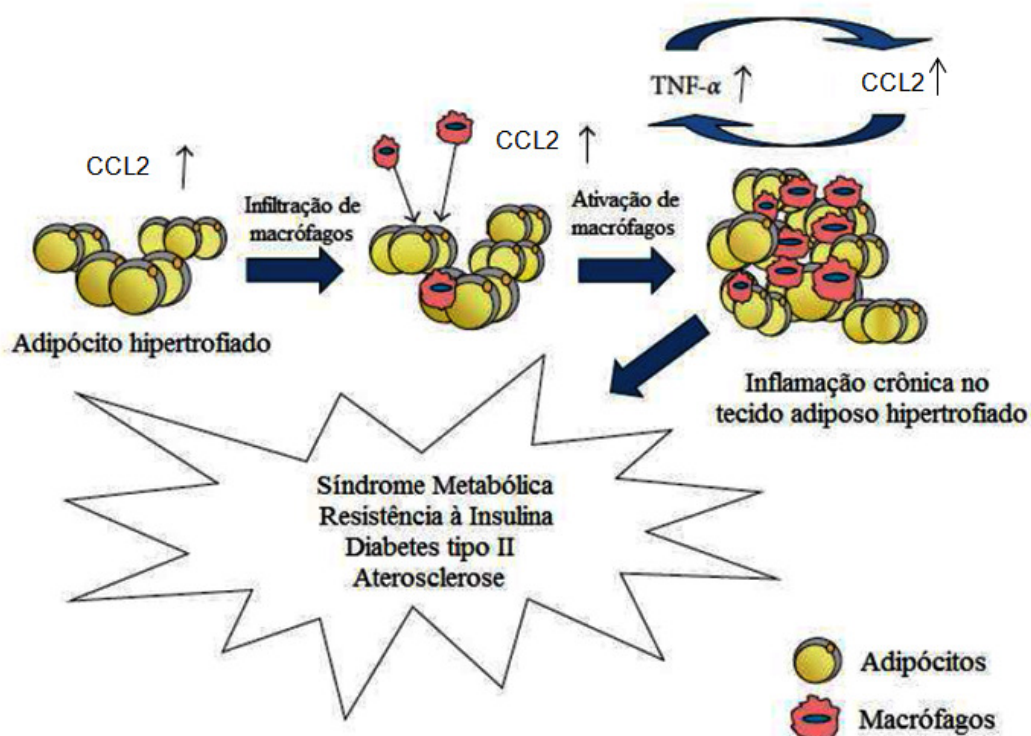


Figura 1 - Amplificação do estado inflamatório no tecido adiposo, mediado por macrófagos (adaptado de HIRAI et al., 2010).

As alterações metabólicas relacionadas à obesidade são mais comuns em animais e indivíduos com aumento de tecido adiposo visceral (SHENK et al., 2008; SONG et al., 2006.) A gordura visceral está relacionada com o depósito de gordura ao redor das vísceras da cavidade abdominal. Isso ocorre devido à maior atividade lipolítica e resistência à insulina deste tecido. AGL's ativam o fator de transcrição nuclear NF-κB, responsável pelo aumento da transcrição de citocinas pró-inflamatórias que irão interferir negativamente na cascata de sinalização da insulina (ROSENBAUM et al., 2001; WAJCHENBERG, 2000).

As adipocinas e as citocinas, produzidas de maneira desregulada pelo tecido adiposo hipertrofiado, irão atuar negativamente em diferentes processos metabólicos em diferentes órgãos e sistemas, influenciando diversos fenômenos locais e sistêmicos, incluindo a resistência à insulina (LUCA & OLEFSKY, 2008; OLEFSKY, 2008; XU et al., 2003).

2.3 Obesidade e resistência à insulina

As elevadas concentrações de AGLs, IL-6 e TNF- α , em resposta a atividade lipolítica aumentada e hipertrofia dos adipócitos, interferem negativamente na sinalização da insulina. Tais alterações metabólicas ativam cascatas de sinalização envolvendo enzimas com ação serina quinase, como a Jun N-terminal quinase (JNK), a proteína quinase C (PKC) e quinase do inibidor do fator nuclear de transcrição NF- κ B (IKK). Estes fatores de transcrição interferem negativamente na cascata de sinalização da insulina por reduzirem a fosforilação do substrato de insulina-1 (IRS-1) no resíduo tirosina, com consequente redução da síntese e da translocação do transportador de glicose (GLUT-4) para a membrana celular e menor captação de glicose pela insulina no músculo e tecido adiposo (SCHENK et al., 2008; BAILEY, 2007; HIROSUMI et al., 2002).

A resposta metabólica ao excesso de adiposidade causa alterações também no fígado, com diminuição da capacidade da insulina em reduzir a produção de glicose hepática via supressão da gliconeogênese e glicogenólise. A não inibição da produção hepática de glicose contribuirá para o estado hiperglicêmico presente no indivíduo obeso, com metainflamação (SHENK et al., 2008; SALTIEL & KAHN, 2001).

A resistência à insulina também está relacionada à concentração plasmáticas das adipocinas adiponectina e resistina. Embora a adiponectina seja sintetizada em grande quantidade pelo tecido adiposo, as concentrações plasmáticas são reduzidas com o aumento da adiposidade (LU et al., 2006; HOTTA et al., 2000). Esta adipocina possui perfil antiinflamatório que atua aumentando a sensibilidade à insulina no músculo e no fígado (MANIGRASSO, et al., 2006; BLÜHER et al., 2005). A resistina é também um hormônio produzido pelo tecido adiposo, mas possui ação antagônica a adiponectina. Há forte correlação entre a redução da concentração plasmática de adiponectina, aumento da concentração de resistina e o desenvolvimento da resistência periférica à ação da insulina (SHAH et al., 2008; LU et al., 2006; BLÜHER et al., 2005; FANTUZZI et al., 2005).

O desequilíbrio entre a liberação de citocinas, quimiocinas e adipocinas pelos adipócitos e macrófagos no tecido adiposo é responsável pela inflamação induzida pela obesidade e o desenvolvimento de patologias. Assim, alimentos vegetais, fontes de nutrientes e substâncias bioativas, capazes de modular a resposta inflamatória sistêmica ou localizada em órgãos metabólicos específicos como o fígado e tecido adiposo, são potenciais recursos terapêuticos para prevenção e reversão das alterações metabólicas associadas à obesidade (PANCHAL et al.; 2011; CHUANG et al., 2010; CHUNG et al., 2010; HIRAI et al., 2010; WOO et al., 2007).

Sugere-se que algumas substâncias bioativas contidas em alimentos vegetais podem inibir a ativação de fatores de transcrição relacionados com a resposta inflamatória e prevenir a resistência à insulina. Substâncias ligantes de fatores nucleares induzem alterações conformacionais, ativando ou reprimindo a transcrição gênica (GOTO et al., 2010). NF- κ B e JNK são importantes moduladores da expressão gênica inflamatória via TLR4 (*tool-like receptor*) que podem ser modulados por constituintes químicos presentes em vegetais e prevenir a resistência à insulina (HIRAI et al., 2010; SEYMOUR et al., 2009).

O receptor ativado por proliferadores de peroxissomos (PPAR γ) representa também um importante fator de transcrição, expresso em vários tecidos e células, incluindo pâncreas, fígado e rins, sendo encontrado em maior abundância nos adipócitos e macrófagos (DUBUQUOY et al., 2006). O PPAR γ possui papel chave na diferenciação e maturação das células adiposas e na inibição da expressão citocinas como TNF- α e IL-6. As tiazolidinedionas (TZDs), medicamento utilizado no tratamento do diabetes tipo II, atuam como um ligante sintético de PPAR γ e apresentam ação positiva no aumento da sensibilidade a insulina no fígado, músculos e adipócitos. Entretanto, ao promoverem a diferenciação de adipócitos e o maior estoque de lipídios, contribuem para o ganho de peso corporal (CASTRILLO & TONTONAZ, 2004; ARAUJO et al., 2000). Em contraste, moduladores seletivos de PPAR γ apresentam atividade antidiabética, sem promover o aumento de peso corporal (ZHANG et al., 2007). Algumas substâncias naturais presentes em alimentos

como os ácidos graxos mono e poliinsaturados presente no óleo de peixe, alguns flavonoides, incluindo a quercetina e naringerina, alcaloides, incluindo a capsaicina, e terpenoides, como o farnesol, geraniol e bixina, têm sido descritos como agonistas seletivos de PPAR γ (CHUANG et al., 2010; CHUNG et al., 2010; GOTO et al., 2010; HIRAI et al., 2010; DEMBINSKA-KIEC et al., 2008; JUNG et al., 2006).

2.4 Substâncias bioativas presentes em vegetais

Alimentos vegetais são fontes de macro e micronutrientes e a principal fonte de substâncias químicas bioativas, das quais o metabolismo humano também é dependente. Algumas substâncias presentes na grande maioria em alimentos de origem vegetal exercem potente atividade biológica, já comprovada por vários estudos. Tais substâncias são chamadas de bioativas ou fitoquímicos e podem desempenhar diversas ações em benefício da saúde humana (BADIMOM et al., 2010; XIA & WENG, 2010; BASTOS et al., 2009).

As substâncias bioativas são provenientes do metabolismo secundário de plantas as quais, entre outras ações, utilizam estas substâncias para se defender de microorganismos patogênicos, insetos e para atrair agentes polinizadores (GARCIA & CARRIL, 2009). As substâncias químicas presentes nas plantas podem ser divididas em classes químicas: os terpenos (carotenoides, esteroides, triterpenos livres e óleos essenciais), as substâncias fenólicas (flavonoides, lignina, ácidos orgânicos e taninos), as substâncias glicosídicas (saponinas, glicosídeos cardiotônicos, glicosídeos cianogênicos e glicosinolatos) e os alcaloides (GARCIA & CARRIL, 2009; SIMÕES, 1999). A associação entre estrutura química e efeitos biológicos pode ser muitas vezes estabelecida. A maioria das plantas contém apenas alguns destes constituintes e, muitas vezes, plantas taxonomicamente relacionadas contém substâncias semelhantes (LAMPE, 2003). O esquema da biossíntese das substâncias bioativas está apresentado a seguir (Figura 2).

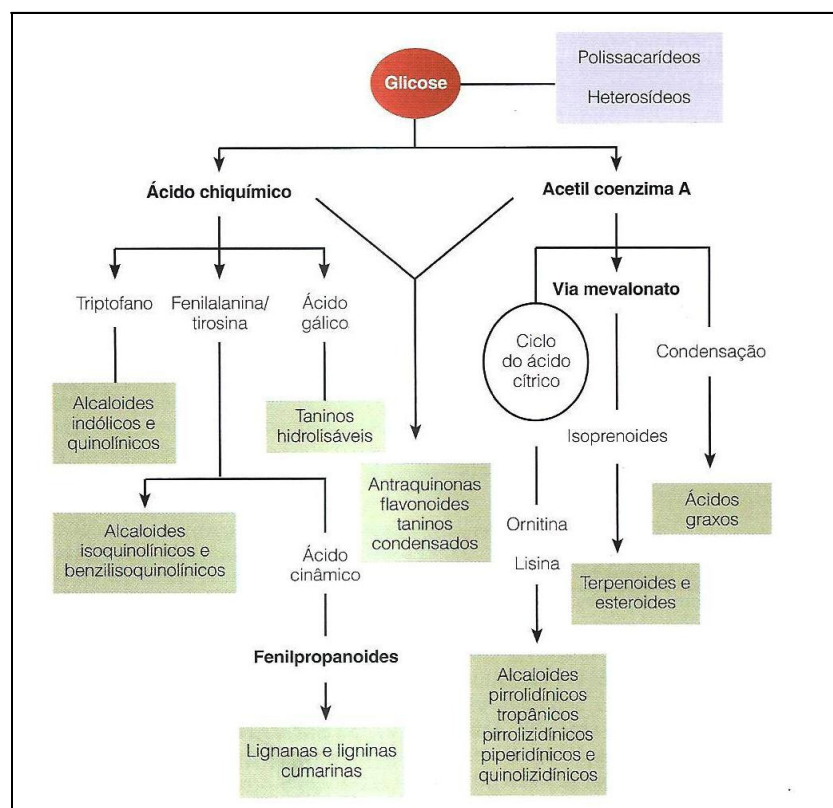


Figura 2 - Esquema da biossíntese das substâncias bioativas. Fonte: SAAD et al., 2009.

A importância das plantas medicinais que contêm estes constituintes na terapêutica humana é conhecida pelo homem há milhares de anos. Na antiga Grécia, as plantas e seu valor terapêutico e tóxico já eram muito conhecidos. Hipócrates (460-377 a.c) reuniu os conhecimentos médicos de seu tempo em um conjunto de tratados, no qual para cada enfermidade descreve um remédio proveniente de um vegetal e o tratamento correspondente. Naquela época, já se acreditava que o tratamento para várias doenças poderia ser feito por meio da alimentação adequada (NOGUEIRA et al., 2009). Atualmente, a importância da alimentação rica em vegetais está comprovada por meio de inúmeros estudos em laboratório. A partir dos resultados destes estudos, a OMS passou a recomendar o consumo diário de pelo menos 400g de vegetais, incluindo frutas e verduras, para prevenção de várias doenças crônicas (WHO, 2003).

Estudos têm mostrado, por exemplo, que a ingestão de alimentos ricos em substâncias bioativas é capaz de reduzir o risco do desenvolvimento de doenças cardiovasculares, cânceres, distúrbios metabólicos, doenças neurodegenerativas e enfermidades inflamatórias (CARRATU & SANZINI, 2005; CÂNDIDO & CAMPOS, 2005). Esses alimentos, capazes de produzir benefícios à saúde, além das funções básicas nutricionais, são denominados alimentos funcionais (SOUZA et al., 2003).

As terminologias alimentos funcionais, nutracêuticos e fitoterápicos não são muito claras. Deve-se considerar que os alimentos funcionais devem estar na forma de alimento comum na dieta, sendo que seus benefícios à saúde estão relacionados à redução do risco de doenças e manutenção do bem estar físico e mental. Por outro lado, os nutracêuticos são definidos como “aquele ingrediente alimentar, aditivo ou produto elaborado a partir de um alimento que se comercializa na forma de cápsula, pó ou outra apresentação não associada ao alimento, e que apresentem benefícios médicos e de saúde, incluindo a prevenção e/ou tratamento da doença” (ALONSO, 2009; HUNGENHOLTZ & SMID, 2002). Desta forma, os nutracêuticos podem abranger nutrientes isolados, suplementos dietéticos e fitoterápicos (MORAES & COLLA, 2006; TAIPINA et al., 2002).

Enquanto os alimentos funcionais e nutracêuticos podem ser também de origem não vegetal, os fitoterápicos são exclusivamente de fonte vegetais e feitos a partir de uma planta medicinal. São preparados e utilizados na forma de extrato, frações enriquecidas, tintura, óleos e outros, sem adição de substâncias ativas isoladas. Quando as plantas são consumidas na forma de extratos vegetais, ocorre a concentração dos princípios ativos que podem atuar de modo sinérgico (ERNST, 2005; SPINELLA, 2002; RATES, 2001). Independente dos conceitos deve-se considerar que os efeitos benéficos para a saúde relacionados ao consumo de plantas, na forma de alimentos funcionais, nutracêutico ou fitoterápico, estão associados ao conteúdo das substâncias químicas presentes.

Várias são as ações biológicas exercidas pelas diferentes classes de substâncias bioativas, incluindo atividade quimiopreventiva, antioxidante, hipolipidêmica, antiinflamatória e antibacteriana (TALHOUK et al., 2007; PADILHA & PINHEIRO, 2004; LIU et al., 2010). Para o tratamento de diversas doenças da atualidade relacionadas ao estresse metabólico, incluindo a obesidade, merecem atenção as substâncias bioativas com ação antioxidante e antiinflamatória (KUMAR et al., 2011; HIRAI et al., 2010).

A capacidade de algumas substâncias naturais em regular a produção de citocinas e sequestrar radicais livres podem explicar, pelo menos em parte, a correlação entre sua ingestão com a redução do risco de doenças (BADIMON et al., 2010; CHUANG et al., 2010; CEFALU et al., 2008). Outro possível mecanismo para esta correlação refere-se à modulação gênica, que interfere em diferentes processos intracelulares envolvidos na resposta inflamatória e na defesa contra o estresse oxidativo (GOTO et al., 2010; SEYMOUR et al., 2009; JOYAL, 2004).

As atividades antioxidante e antiinflamatória de substâncias bioativas, incluindo os flavonoides e os ácidos fenólicos, já foram confirmadas em vários estudos (CHUANG et al., 2010; LIU et al., 2010; TALHOUK et al., 2007; DEMBINSKA-KIEC et al., 2008; SOARES et al., 2002). O potencial efeito antiinflamatório de alguns óleos essenciais e alcaloides, incluindo a capsaicina e piperina, na obesidade e suas complicações metabólicas também vêm sendo evidenciado por alguns autores (CHUEH & LIN, 2012; SOUTO et al., 2011; CHUNG et al., 2010).

Ácidos graxos saturados, monoinsaturados e poliinsaturados, presentes em quantidades significativas em alguns frutos e sementes, são também importantes moduladores do processo inflamatório em animais. Sugere-se que os ácidos graxos oléico, linoléico e linolênico apresentam potencial efeito benéfico nas alterações metabólicas associadas à obesidade, quando ingeridos na proporção adequada (BRESSAN et al., 2009; GERALDO & ALFENAS, 2008).

2.4.1 Substâncias fenólicas: flavonoides e ácidos fenólicos

As substâncias fenólicas são originadas do metabolismo secundário das plantas, sendo essenciais para o seu crescimento e reprodução. Nas plantas, os flavonoides desempenham funções importantes, incluindo proteção contra raios ultravioleta, inibição da ação de certas enzimas, propriedade antioxidante e pigmentação (GARCIA & CARRIL, 2009; MANACH et al., 2004).

As estruturas dos fenóis presentes nos vegetais variam desde estruturas simples, contendo um anel benzeno, até outras mais complexas como os taninos, cumarinas e flavonoides. Quimicamente, os fenólicos são definidos como substâncias que possuem anel aromático com um ou mais substituintes hidroxílicos (NACZK & SHAHIDI, 2004; SOARES, 2002).

Os maiores grupos de fenólicos encontrados nos vegetais são representados pelos flavonoides e ácidos fenólicos. A estrutura química dos flavonoides possui um núcleo característico formado por 15 carbonos (C6-C3-C6) e dois anéis aromáticos (A e B) unidos por três carbonos que formam um anel heterocíclico C (Figura 3) (ANGELO & JORGE, 2007).

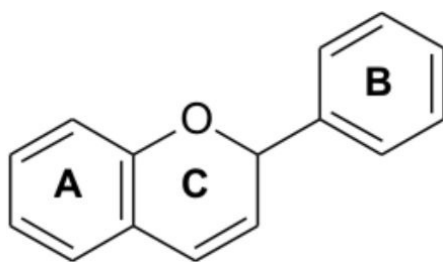


Figura 3. Estrutura química dos flavonoides. A e B, anéis aromáticos; C, anel heterocíclico (Adaptado de ANGELO & JORGE, 2007).

Variações em substituição do anel C resultam em importantes classes de flavonoides, como flavonóis, flavonas, flavanonas, flavanóis (ou catequinas), isoflavonas e antocianidinas (ANGELO & JORGE, 2007). No grupo das flavonas encontra-se a quercetina, um dos flavonoides mais encontrados na dieta rica em vegetais (MINK et al., 2007).

No organismo, os efeitos biológicos dos flavonoides são principalmente atribuídos à sua capacidade antioxidante, conferida pela sua estrutura química. Dentre os mecanismos antioxidantes, destaca-se a sua capacidade de remoção de espécies reativas de oxigênio (ERO's), inibição da peroxidação lipídica de ácidos graxos insaturados ou de fosfolipídios de membrana, capacidade de quelar metais de transição e de aumentar a ação de enzimas antioxidantes, entre outros (ERDEN & KAHRAMAN, 2000; PIETTA, 2000).

É também atribuída aos flavonoides atividade antiinflamatória, devido à capacidade destes constituintes em inibirem a ativação do fator de transcrição NF- κ B (GÀRCIA-LAFUENTE et al., 2009). Os efeitos benéficos dos flavonoides têm sido também estudados em relação ao diabetes, através da capacidade destas substâncias em reduzir a absorção ou melhorar a tolerância à glicose. Além disso, os flavonóides podem estimular a absorção de glicose nos tecidos periféricos e agir como secretagogos ou miméticos da ação da insulina. Porém, o mecanismo de ação destas substâncias ainda não foi completamente estabelecido (GÀRCIA-LAFUENTE et al., 2009; CAZAROLLI et al., 2008).

Os ácidos fenólicos caracterizam-se por terem um anel benzênico, um grupamento carboxílico e um ou mais grupamentos de hidroxila e/ou metoxila na molécula. Eles conferem propriedades antioxidantes para os vegetais (SOARES, 2002). Os ácidos fenólicos mais comuns são os derivados do ácido hidroxicinâmico que são compostos aromáticos com três carbonos que formam uma cadeia lateral (C6–C3), sendo o ácido caféico (Figura 4) um dos mais comuns (BRAVO, 1998; GARAMBONE & ROSA, 2007).

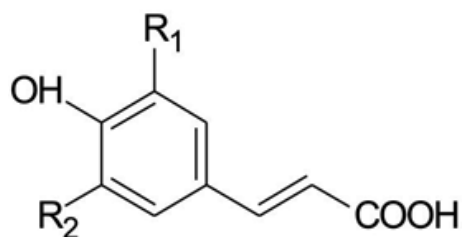


Figura 4 - Estrutura química dos ácidos hidroxicinâmicos. Àcido caféico: R1 = OH, R2 = H (Adaptado de ANGELO & JORGE, 2006).

O ácido caféico está presente nos alimentos, principalmente na forma de ácido clorogênico, que é um éster do ácido quínico com o ácido caféico. Na alimentação, o café, frutas cítricas, berinjela e alcachofra são as principais fontes de ácido clorogênico e estudos epidemiológicos têm sugerido a associação entre o consumo destes alimentos e a prevenção de doenças (GARAMBONE & ROSA, 2007; OLTHOF et al., 2001).

Como é característico de substâncias fenólicas, o ácido clorogênico apresenta atividade antioxidante e alguns estudos têm demonstrado potencial efeito anticarcinogênico, hipolipidêmico e no aumento da sensibilidade à insulina (SOTILLO & HADLEY, 2002; OLTHOF et al., 2001; KASAI et al., 2000).

2.4.2 Derivados terpênicos: óleos essenciais e saponinas

2.4.2.1 Óleos essenciais

Óleos essenciais ou óleos voláteis são definidos como produtos lipossolúveis obtidos de partes de plantas. Eles são os componentes responsáveis pelo aroma e fragrância dos vegetais, uma vez que a volatilidade e odor são suas características fundamentais (SIMÕES et al., 1999).

Estas substâncias constituem, na maioria das vezes, de misturas complexas que podem ser originados, pela biossíntese, a partir do ácido mevalônico por

duas vias biossintéticas distintas: a série terpênica e menos frequentemente, dos fenilpropanóides (SAAD et al., 2009).

Os terpenos são substâncias que possuem como unidade básica a molécula de isopreno $\text{CH}_2=\text{C}(\text{CH}_3)-\text{CH}=\text{CH}_2$ e podem ser subdivididos segundo o número de unidades isoprênicas que possuem: monoterpenos (2 unidades), sesquiterpenos (3 unidades), diterpenos (4 unidades), sesterpenos (5 unidades), triterpenos e esteróides (6 unidades) e tetraterpenos ou carotenóides (8 unidades). Os óleos essenciais são compostos principalmente de monoterpenos e sesquiterpenos (SAAD et al., 2009; BRUNETON, 1991).

A composição dos óleos essenciais nas plantas é determinada geneticamente e pode variar com os seguintes fatores: origem botânica, ciclo vegetativo, fatores climáticos, tipo de solo e procedimentos de obtenção do óleo. Nas plantas, atuam principalmente como atrativos para agentes polinizadores, inseticidas e fungicidas (CHEN et al., 2011; IBRAHIM et al., 2001).

Os óleos essenciais encontram sua maior aplicação biológica como agentes antimicrobianos, representando, de certa maneira, uma extensão do próprio papel que exercem nas plantas. Em função da grande diversidade química de seus componentes, outras importantes funções biológicas e fisiológicas são atribuídas a estas substâncias, sendo também muito pronunciadas as ações antiinflamatória e antiespasmódica (MERFROT, 2011; IBRAHIM et al., 2001).

Outros resultados mais recentes atribuem também aos óleos essenciais potenciais atividades anticancerígena e antialérgica (TALPUR et al., 2005; CHUNG et al., 2010; CUNHA et al., 2001). Estudo recente mostrou a capacidade de vários terpenoides em se ligar ao PPAR γ , sugerindo o potencial efeito benéfico de vários terpenos no tratamento de doenças associadas à obesidade e resistência à insulina (GOTO et al., 2010).

2.4.2.2 Saponinas

Os terpenos podem ser encontrados na sua forma glicosilada, como por exemplo, as saponinas, que são glicosídeos de triterpenos. As saponinas consistem em uma ou mais cadeias de açúcar unidas por uma ligação glicosídica a uma aglicona hidrofóbica, a sapogenina, que pode ser triterpenóide ou esteróide (FRANCIS et al., 2002). As saponinas são heterosídeos, com uma porção aglicona lipofílica e uma ou mais cadeias osídicas representando a porção hidrofílica da molécula, sendo assim, além de serem agentes afrognicos, são agentes emulsionantes quando em presença de dois líquidos imiscíveis. O nome saponina provém da sua capacidade de formar espuma quando agitadas em água, assim como o sabão (GARCIA & CARRIL, 2009).

Esse grupo de substâncias apresenta ainda as propriedades hemolítica, citóxica e antifúngica, em maior ou menor grau, dependendo da estrutura da molécula. Tais propriedades se explicam pela capacidade que essas moléculas têm de se complexar com esteroides das membranas biológicas, desestruturando-as e, portanto, alterando sua permeabilidade e conseqüentemente destruindo-as. A complexação com esteroides favorece a ação hipocolesterolemiantes das saponinas (ZHAO et al., 2006) Nos últimos anos, pesquisas revelaram inúmeras atividades biológicas e farmacológicas para as saponinas, entre elas antidiabética, anticancerígena, analgésica e antiinflamatória (DINDA et. al., 2010; BHAVSAR et al., 2009; BORGI et al., 2008).

2.4.3 Alcaloides

Os alcaloides são, geralmente, substâncias nitrogenadas de reação básica. Eles são classificados de acordo com o núcleo químico principalmente em indólicos, quinolínicos, quinolizidínicos, isoquinolínicos, imidazólicos, tropânicos e pirrolizidínicos. Os alcaloides de núcleo isoquinolínico (Figura 5) são os mais comumente presentes nos vegetais (FERRO, 2008; SIMÕES et al., 1999).

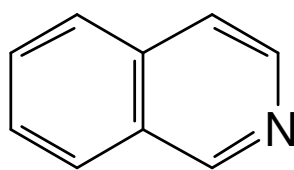


Figura 5. Estrutura química da isoquinolina (Adaptado de SIMÕES et al., 1999).

Nas plantas, acredita-se que os alcaloides sejam importantes produtos de detoxificação de substâncias nocivas do vegetal, ou que exerçam funções de reserva de nitrogênio, defesa contra microorganismos patogênicos e herbívoros, entre outros (SIMÕES et al., 1999; SAAD et al., 2009).

Os alcaloides presentes nas plantas constituem um grupo de metabólitos secundários com grande diversidade estrutural, comparável aos terpenos. Eles apresentam atividades farmacológicas importantes, sendo utilizados desde os primórdios da civilização, como medicamentos, poções mágicas e até venenos (SIMÕES et al., 1999; SAAD et al., 2009)

Os efeitos dos alcaloides no organismo são inúmeros, incluindo ação no sistema nervoso central e periférico, atividade antioxidante, anticancer, analgésica e antiinflamatória (CHUEH et al., 2012; KANG et al., 2010; SOUTO et al., 2011; SILVA et al., 2009; PUVANENDRAN et al., 2008; WOO et al., 2006). Revisão realizada por SOUTO et al., (2011) verificaram o efeito antiinflamatório de vários tipos de alcaloides, sendo o grupo dos isoquinolínicos os mais estudados.

2.4.4 Ácidos graxos

Ácidos graxos são ácidos carboxílicos de cadeia curta (dois a quatro átomos de carbono), média (seis a 10 átomos de carbono) ou longa (acima de 12 átomos de carbono). Podem conter insaturações na cadeia, sendo classificados como saturados quando não apresentam insaturações e insaturados quando

possuem uma insaturação (monoinsaturado) ou mais (poliinsaturados). Quando não são sintetizados pelo homem e indispensáveis para a saúde humana, são denominados ácidos graxos essenciais (FENNEMA, 1996).

O metabolismo humano pode biossintetizar ácidos graxos saturados e insaturados da família W-9 (ácido oléico). Porém, é incapaz de produzir os ácidos graxos insaturados das famílias W-6 (ácido linoléico) e W-3 (ácido linolênico). Como não são sintetizados pelo homem e indispensáveis para a saúde humana, são denominados de ácidos graxos essenciais. Neste caso, são considerados ácidos graxos de cadeia curta e longa, quando possuem 18 e 20 ou mais carbonos, respectivamente (CURI et al., 2002; FENNEMA, 1996).

A composição dos ácidos graxos nos óleos vegetais varia de forma considerável. Os ácidos graxos mais comuns são os que apresentam 12, 14, 16 ou 18 átomos de carbono na cadeia, com predominância de ácidos graxos insaturados, sendo os ácidos graxos saturados encontrados em maiores quantidades em alimentos de origem animal (BRESSAN et al., 2009; GERALDO & ALFENAS, 2008).

Alimentação rica em gorduras saturadas está associada ao aumento de vários marcadores inflamatórios. Estudos mostram que a gordura saturada ativa o NF- κ B, com conseqüente aumento da expressão de marcadores inflamatórios como o TNF- α e a IL-6 e diminuição da expressão do PPAR γ e adiponectina. Todos estes mecanismos pró-inflamatórios indicam o efeito potencial desses ácidos graxos no desenvolvimento da resistência à insulina (BRESSAN et al., 2009; KENNEDY et al., 2009; GERALDO & ALFENAS, 2008). Para tanto, recomenda-se em uma alimentação saudável que o menor percentual de gordura da dieta seja proveniente de lipídios saturados. As gorduras monoinsaturadas, seguidas das poliinsaturadas, devem estar presentes em maiores proporções na alimentação (LIMA et al., 2000).

Diferentemente dos ácidos graxos saturados, a ingestão de ácido oléico não está relacionado ao aumento de marcadores pró-inflamatórios e tem sido considerado em estudos epidemiológicos como fator protetor para o

desenvolvimento de doenças inflamatórias e cardiovasculares. Estudos têm encontrado uma associação inversa entre uma dieta rica em ácido oléico e a expressão de TNF- α e IL-6 e desenvolvimento da resistência à insulina (SALA-VILA et al., 2011; BAER & CLEVIDENCE et al., 2007; MARTÍNEZ-GONZÁLEZ & BES-RASTROLLO, 2006).

Os ácidos graxos poliinsaturados linoléico (W-6) e alfa linolênico (W-3) e seus derivados, particularmente o ácido araquidônico (AA; 20:4n-6), ácido eicosapentanoico (EPA; 20:5n-3) e ácido docosahexaenóico (DHA; 22:5n-3), tem importante papel na fluidez da membrana e na síntese de prostaglandinas de perfil inflamatório (BRESSAN et al., 2009). O AA é o principal precursor de prostaglandinas e leucotrienos da série par (2 e 4, respectivamente), de ação primariamente pro-inflamatória. O EPA e DHA, são os principais precursores de prostaglandinas e leucotrienos da série ímpar (3 e 5, respectivamente), de menor potencial inflamatório (CALDER, 2003).

Os derivados AA, EPA e DHA podem ser obtidos a partir de alimentos de origem animal e são também sintetizados no organismo a partir do ácido linoléico e através da ação das enzimas desaturases e elongases (ZHENG et al., 2004; PAWLOSKY et al., 2001). Em alimentos vegetais, o ácido linoléico está presente principalmente no óleo de soja, milho e girassol, principais óleos utilizados no preparo de alimentos pela população brasileira (NEPA, 2011). As fontes ricas em ácido linolênico são o óleo da semente da Chia (*Salvia hispanica* L.) e da linhaça (*Linum usitatissimum* L.). Em menores quantidades, são encontrados no óleo de canola, de soja e nas nozes (NEPA, 2011; PEIRETTI et al., 2009).

Alimentação rica em ácidos graxos poliinsaturados está associada à redução de marcadores de inflamação, quando consumida na proporção adequada de W-6: W-3 (LOPEZ-GARCIA et al., 2004). Autores sugerem que, diferentemente da proporção atualmente vista na dieta ocidental (10 a 20:1), a qual potencializa o estado inflamatório, dietas ricas em gorduras poliinsaturadas na relação máxima de 4 a 10:1, favorecem um perfil inflamatório mais adequado, e esta é a razão sugerida para ser preconizada na alimentação (SIMOPOULOS,

2002). Entretanto, outros autores sugerem uma proporção ainda menor, de 2 a 3:1, para que se evite aumento de marcadores inflamatórios e o desenvolvimento de doenças associadas à inflamação (ZHAO et al., 2004; RALLIDIS et al., 2003).

A maioria dos estudos mostra que o efeito positivo do consumo de poliinsaturados na saúde cardiovascular, perfil lipídico, doenças autoimunes e neurológicas se refere a ingestão dos ácidos graxos essenciais de cadeia longa EPA e DHA, os quais são encontrados principalmente nos peixes e em seus óleos (MOZAFFARIAN & WU, 2011; CALDER, 2003; SIMOPOULOS, 2002). Alguns estudos clínicos e observacionais sugerem que o ALA também apresenta efeito benéfico nas doenças cardiovasculares, entretanto os estudos são contraditórios (KROMHOUT et al., 2010; WANG et al., 2006; MOZAFFARIAN, 2005). Deve-se considerar que para obter esses benefícios com o consumo de ALA, é preciso o consumo de uma quantidade bem maior, pelo fato de apenas uma porcentagem pequena de ALA ser convertida em EPA e DHA no organismo (MOZAFFARIAN & WU, 2011; ARTERBURN et al., 2006).

2.5 *Xylopiá aromática* (Lam.) Mart. (pimenta-de-macaco)

A *Xylopiá aromática* (Figura 6) tem como sinônimos relevantes *Uvaria aromática* Lam. e *Xylopiá grandiflora* A.St.-Hil. (MAAS et al., 2010). A planta é conhecida popularmente em Minas Gerais como pimenta-de-macaco, pindaíba, e pindaíba-do-campo (DIAS, 1988). Outros nomes populares atribuídos à espécie são eira, pimenteira-da-terra e pimenteira-do-sertão (SPIX & MARTIUS, 1823), bananinha, begerecum, cedro-do-campo, envireira, imbiriba e pindaíba-de-macaco (MAAS et al., 2010).



Figura 6 - *X. aromatica* (Lam.) Mart (DATAPLAMT, 2010).

A *X. aromatica* é uma árvore nativa do cerrado e de fácil reconhecimento, com altura que varia de 2 a 8 metros. Apresenta ramos e folhas pendentes e flores com pétalas brancas e cálice vermelho-pardo. As flores, quando abertas, lembram estrelas, com pedicelos muito curtos e voltados para cima. Os frutos são comestíveis e apresentam-se vermelhos por ocasião da deiscência e amarronzados ou pretos quando secos. As sementes são ovóides, ariladas apicalmente e azuladas por ocasião da deiscência. Em média, são encontradas duas a oito sementes por carpídio. Os frutos podem ser coletados em todos os meses do ano (DIAS, 1988).

As plantas do gênero *Xylopia* constituem uma das mais numerosas espécies da família Annonaceae. Esta família botânica compreende 2.300 espécies, distribuídas em aproximadamente 130 gêneros (MAAS et al., 2001). Existem cerca de 150 espécies do gênero *Xylopia* distribuídas nas regiões tropicais do mundo, principalmente na África. Entre elas destacam-se a *X. aethiopica*, *X. brasiliensis* e *X. frutencens*, plantas mais estudadas sob o ponto de vista químico e biológico que a *X. aromatica* (EKUNDAYO, 1989).

No Brasil, existem 32 espécies de *Xylopia* descritas, distribuídas nas cinco regiões do país. A *X. aromatica* ocorre em vários Estados e a sua ocorrência natural é registrada na região Norte (Roraima, Amapá, Pará, Amazonas, Tocantins, Rondônia), Nordeste (Maranhão, Piauí, Bahia), Centro-Oeste (Mato

Grosso, Goiás, Distrito Federal, Mato Grosso do Sul), Sudeste (Minas Gerais, São Paulo) e Sul (Paraná) (MAAS et al., 2010).

Apesar do fruto ser comestível e saboroso e da madeira de alguns gêneros da espécie ter emprego na fabricação de embarcações e na cordoaria, espécies de *Xylopia* não são muito exploradas sob o ponto de vista econômico (SILVA & ROCHA, 1981). Naturalistas que descreveram sobre os costumes e usos das plantas da população no século 19 relatam o agradável sabor do fruto da *X. aromatica*. (SAINT-HILAIRE, 1824; SPIX & MARTIUS, 1823). Em uma de suas obras, Auguste the Saint-Hilaire cita que:

“...seus frutos, muito aromáticos, têm o odor da pimenta do reino; e se o sabor não é tão forte, eles são, no entanto, mais agradáveis. Se fossem mais conhecidos, esses frutos seriam certamente procurados como especiaria, e poderiam dar lugar a um novo ramo do comércio”.

(SAINT-HILAIRE, 1824)

Os frutos da *X. aromatica* são usados na medicina popular pelas suas propriedades carminativas, estimulantes e afrodisíacas (CORRÊA, 1984). Alguns frutos de espécies de *Xylopia*, inclusive a *X. aromatica*, são usados popularmente também como condimento, principalmente no tempero de carnes, e como substituto da pimenta do reino (*Piper nigrum* L.) por apresentarem odor semelhante, porém mais suave (MAIA et al., 2005; SILVA & ROCHA, 1981).

Estudos de caracterização química já identificaram a presença de alcaloides, esteroides, flavonoides, óleos essenciais, diterpenos e saponinas em frutos de *Xylopia* e, por isso, pode-se dizer que plantas deste gênero representam uma fonte promissora de substâncias bioativas (ELHASSAN et al., 2010; SILVA et al., 2009; SHANMUGAM et al., 2008; MOREIRA et al., 2007; NISHIYAMA et al., 2004; STACHENKO et al., 2004; MOREIRA et al., 2003; SILVA & ROCHA, 1981). A espécie de *Xylopia* mais estudada e melhor caracterizada química e

biologicamente é a *X. aethiopica*. Na medicina tradicional e popular africana é atribuído aos seus frutos e sementes efeito estimulante e também para o tratamento de infecções de pele, tosse, febre e diabetes (OGBONNIA et al., 2008; BALDÉ et al., 2006; SHUKLA et al., 2000). Estudos químicos com os frutos de *X. aromatica* somente avaliaram a presença de terpenos, incluindo monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos e esteróis (MORAES & ROQUE, 1988; SILVA & ROCHA, 1981).

Em plantas de *Xylopi*a, já foram identificados também alcaloides do tipo isoquinolinícos em folhas, cascas e frutos (EZEKWESELI et al., 2010; SILVA et al., 2009; SHANMUGAM et al., 2008; NISHIYAMA et al., 2004). Esteroides também foram identificados em plantas desta espécie, incluindo o estigmasterol em frutos de *X. aromatica* (MORAES & ROQUE, 1988) e β -sitosterol em frutos de *X. aethiopica* (NWOSO et al., 2011; EZEKWESILI et al., 2010).

Nos frutos e folhas deste gênero também já foram identificadas substâncias fenólicas, incluindo flavonoides do tipo quercetina, responsáveis pela ação antioxidante evidenciada em alguns estudos (BOUBA et al., 2010; EZEKWESILI et al., 2010; MOREIRA et al., 2003). Apesar da grande variedade de substâncias bioativas descritas, os constituintes químicos predominantes e mais investigados nos frutos desta espécie são os óleos essenciais, responsáveis pelo aroma suave que apresentam (SILVA & ROCHA, 1981).

Estudos que avaliaram quimicamente o óleo essencial de *X. aromatica* originária do Brasil identificaram a presença de α -pineno, β -pineno, mirceno, ocimeno, limoneno, citronelol e carvona, sendo o limoneno, o citronelol, e alfa e beta pineno os componentes majoritários (SILVA & ROCHA, 1981; ANDRADE et al., 2004). A composição química dos frutos de *X. aromatica* originária da Colômbia foi diferente. Os óleos essenciais majoritários encontrados foram o β -felandreno, seguido de mirceno, α -pineno, α -felandreno e p-cimeno, respectivamente (STASHENKO et al., 2004).

O perfil lipídico dos frutos de *X. aethiopica* já foi avaliado por alguns autores. A fração lipídica dos frutos de *Xylopia* também é composta de ácidos graxos, com predominância de ácidos graxos monoinsaturados e W-6, seguidos dos ácidos graxos saturados, palmítico e esteárico e do poliinsaturado W-3 (ELHASSAN et al., 2009; EZEKWESILI et al., 2010). Entretanto, DOSOMU & OCHU (1995) avaliaram o perfil lipídico da *X. aromatica* obtida na Nigéria e encontraram maiores proporções do ácido mirístico e palmítico, seguido do monoinsaturado oléico e dos poliinsaturados da série W-6 e W-3.

Em relação aos estudos farmacológicos com espécie de *Xylopia*, tem sido atribuído às acetogeninas e alcaloides das folhas e cascas da planta, efeito citotóxico, larvicida e antitumoral *in vitro* (SUFFREDINI et al., 2007; MESQUITA et al., 2009; RODRIGUES et al., 2006; NISHIYAMA et al., 2004; COLMAN-SAZARBITORIA et al., 1994).

Aos frutos de *X. aethiopia* têm sido atribuído potencial efeito hipolipidêmico e antioxidante (OLUKEMI et al., 2005; EZEKWESILI, et al., 2010; NWOSO et al., 2011). A associação do fruto desta espécie, com outros extratos de plantas, evidenciou atividade hipoglicêmica e hipolipidêmica em roedores que receberam diferentes dosagens (50, 100, 250 e 500 mg/Kg de PC). Os autores atribuíram esses resultados principalmente às substâncias fenólicas e aos esteróis presentes nos frutos (OGBONNIA et al., 2008).

Na literatura, não foram encontrados estudos farmacológicos e biológicos que avaliassem o potencial terapêutico dos frutos da *X. aromatica*. Assim, a ausência de estudos sobre o efeito dos seus frutos no organismo, associada a sua grande abundância no cerrado mineiro e potencial fonte de substâncias bioativas despertaram o interesse em avaliar o potencial do fruto em um modelo experimental de animais que apresentam aumento de adiposidade e alterações metabólicas. Foi também um dos objetivos caracterizar o perfil lipídico dos frutos de *X. aromatica*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Materiais

3.1.1 Equipamentos

- Agitador magnético
- Aparelho de Clevenger
- Aparelho de GPS (Etrex)
- Balança analítica (Shimadzu, AY220)
- Banho Maria (Fisatom, 550)
- Bomba de vácuo (Tecnal, TE0581)
- Câmera digital (Motican 2500)
- Centrífuga refrigerada (Hermle, Z323K)
- Coluna BPX5 (30m x 0,25mm x 0,25 μ m)
- Coluna HP-5MS (30m x 0,25mm x 0,25 μ m)
- Cromatógrafo líquido Acquity – Waters, com injetor automático e detector de UV-DAD (Agilent, 1100)
- Cromatógrafo a gás acoplado a espectrômetro de massas (Shimadzu, GCMS-QP5050A)
- Cromatógrafo a gás acoplado a espectrômetro de massas (Shimadzu, GCMS-QP-5000)- Destilador (Quimis)
- Estufa para secagem de plantas (Sociedade Fabbe)
- Freezer (Electrolux, FE26)
- Funil de separação
- Geladeira
- Homogeneizador (Omni Internacional, TH)
- Lavador de placa
- Leitor de ELISA (Bio-tek Instruments, EL800)
- Microcâmera (JVC, TK-1270/RGB)
- Microscópio ótico (Olympus, B201)
- Micrótomo

- Moinho de facas (Tecnal, TE-625) - Phmetro
- Rotavapor (Fisatom, 802)
- Sílica gel 60 F254 Merck ®
- Sistema de purificação de água (MILLI-Q, Plus)
- Vórtex (Phoenix, AP56)

3.1.2 Reagentes e solventes

- Acetato de etila
- Acetona
- Acetonitrila (Merck)
- Àcido acético glacial
- Àcido clorídrico
- Àcido sulfúrico (Synth)
- Água oxigenada (Synth)
- Albumina de soro bovino
- Àlcool etílico (Synth)
- Anisaldeído sulfúrico
- Cloreto de sódio
- Cloreto benzetônico
- Cloridato de Xilasina (Syntec)
- Clorofórmio
- Diclorometano
- Dietilamina
- Diefenilboratoetilamina
- EDTA (Ethylenediamine tetraacetic acid)
- Estreptavidina
- Fluoreto de fenilmettilsulfonila
- Formaldeído
- Hexano
- Hidróxido de alumínio (Teuto ®)
- Hidróxido de amônio

- Hidróxido de potássio
- Metanol
- N-butanol (Synth®)
- PBS (salina tamponada com fosfato)
- OPD (o-phenylendiamine dihydrochloride) (Sigma®)
- Polietilenoglicol
- Reagente de Dragendorff- Tolueno
- Tween 20 (Sigma®)
- Xilazina
- Xilol

3.1.3 Outros materiais

- Agulha de gavagem para camundongo
- Amostras de referência de ácido clorogênico e rutina (Laboratório de Farmacognosia)
- Amostras de referência dos óleos essenciais cariofileno, citronelol, mirceno e ocimeno (doados pela empresa Givaudan Roure)
- Alcoômetro (Alla France)
- Aprotinina
- Açúcar refinado (união®)
- Câmara de Neubauer
- Coluna para CLAE Lichrospher C18 (250 x 4.6 mm) 5µm (Merck ®)
- Coluna para CG
- Corantes hematoxilina e eosina
- Glicosímetro Accue-Check (Roche Diagnostics Corp., Indianapolis, Indiana, USA)
- Fragmentos de porcelana porosa
- Ivermectina (Bayer)- Ketamina (Vetaset)
- Kits enzimáticos (Katal®)
- Kit ELISA (Millipore®)
- Kits ELISA (R&D systems®)
- Kit Panótipo

- Leite condensado (Moça®)
- Membrana filtrante (Millipore®)
- Parafina histológica (Synth)
- Pipeta automática multicanal e de volume variável (HTL, Multimate)
- Placas de poliestireno (Nunc)
- Ração labina
- Solução de Türk
- Tampão fosfato

3.2 Métodos

Frutos secos de *X. aromatica* (Figura 7) foram fornecidos por produtores rurais e um comerciante de plantas medicinais da cidade de Curvelo (Minas Gerais). Os frutos utilizados nos testes biológicos e parte das análises químicas foram coletados no mês de abril e maio de 2010 (lote 1). A parte química referente à análise do perfil de ácidos graxos foi realizada com frutos coletados no mês de julho e agosto de 2010 (lote 2). Após a coleta, os frutos foram secos no sol. O lote 1 foi transportado para o laboratório em saco de papel e o lote 2 em um saco plástico.

Para referência futura, amostras da droga vegetal foram armazenadas do Banco de Dados e Amostras de Plantas Aromáticas, Medicinais e Tóxicas (DATAPLAMT), localizado no Museu de História Natural e Jardim Botânico da Universidade Federal de Minas Gerais (MHNJB – UFMG). Uma amostra da planta, para confecção de exsicata e identificação taxonômica, foi coletada também na região de Curvelo, MG, na coordenada geográfica S 18°52'43,3"HO 44°35'31,2". A identificação taxonômica da espécie foi confirmada pela botânica Dra. Juliana de Paula-Souza.



Figura 7. Frutos de *X. aromatica* (Lam.) Mart

3.2.1 Preparação dos frutos para estudo

3.2.1.1 Moagem e acondicionamento

Aproximadamente 500g dos frutos secos foram pulverizados até pó fino. As amostras secas e moídas foram armazenadas em frascos de vidro, em temperatura a 1 °C, para posterior extração.

3.2.1.2 Preparação dos extratos e frações

O processo utilizado para obtenção do extrato bruto foi a percolação a frio. Os frutos moídos (lote 1) foram percolados até exaustão com solução hidroalcoólica a 95%. Após o processo de percolação, o líquido foi concentrado a vácuo até obtenção de resíduo, o qual constitui o extrato bruto nomeado EBXA.

Parte do EBXA foi armazenado em frascos de vidro, em temperatura de 1 °C, para posterior utilização nos testes farmacológicos. A outra porção foi submetida a fracionamento, que teve por objetivo separar constituintes químicos de diferentes polaridades.

Para a obtenção das frações, o EBXA foi resuspenso em solução hidroalcoólica a 80%. A suspensão obtida foi transferida para um funil de separação e, em seguida, foram adicionados vários solventes de polaridade crescente. Primeiramente, o hexano foi adicionado para extrair componentes de baixa polaridade, tais como óleos e gorduras, óleos essenciais e triterpenos (FAHEX). A fração aquosa resultante do procedimento anterior foi submetida à partição com acetato de etila, com o objetivo de obter componentes de polaridade intermediária, principalmente os flavonoides (FACET). A fração aquosa resultante desta partição foi então, extraída com n-butanol saturado com água, solvente de alta polaridade. Obteve-se assim a fração n-butanol (FABUT) que teve como objetivo extrair os alcaloides, saponinas e outros glicosídeos.

Os frutos secos e moídos (lote 2) também foram percolados a frio até exaustão com hexano, para caracterização química dos óleos voláteis e ácidos graxos. O percolato obtido foi concentrado a vácuo até obtenção de um óleo (HEXA).

As soluções obtidas das partições foram evaporadas completamente a temperatura máxima de 55°C em rotavapor. O extrato e as frações obtidas foram mantidos refrigerados a -1°C. A Figura 8 representa o protocolo seguido para a preparação do extrato bruto e frações.

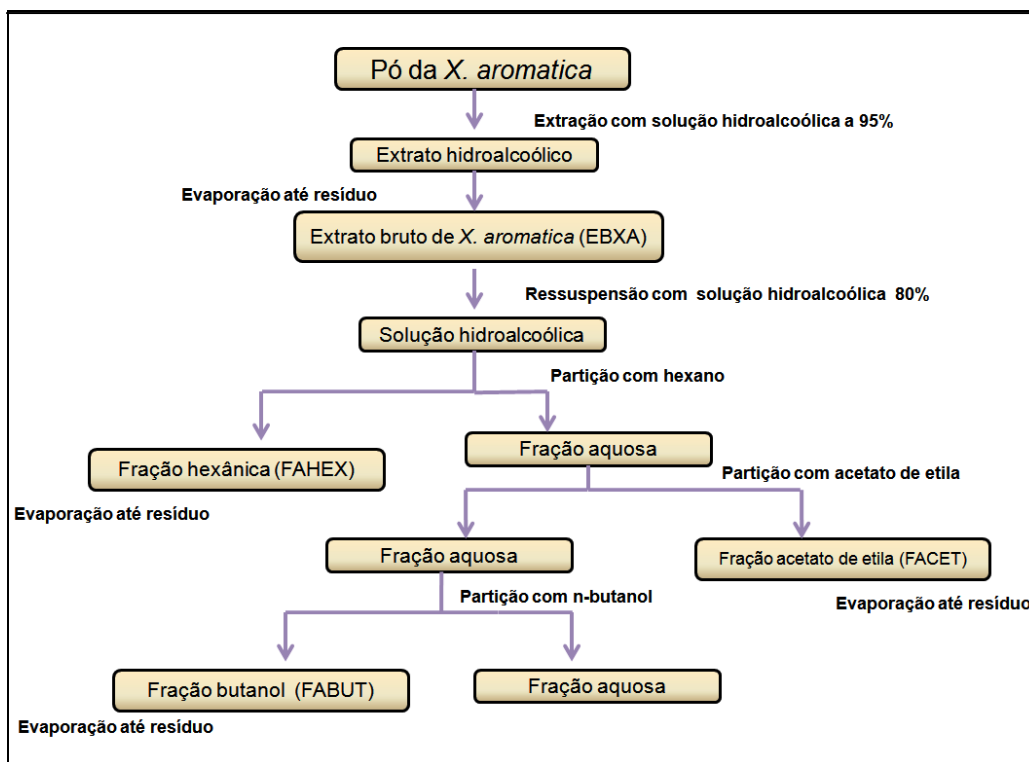


Figura 8 – Obtenção do extrato bruto e frações dos frutos moídos de *X. aromatica*.

3.2.2 Extração e quantificação de óleos essenciais

O teor de óleos essenciais foi determinado por processo de hidrodestilação, com o auxílio do aparelho de Clevenger, conforme preconizado pela Farmacopéia Brasileira 5ª edição (FARMACOPÉIA, 2011).

Em um balão de 1000 ml foram adicionados 500 ml de água destilada como líquido de destilação e 100 gramas do fruto seco previamente rasurado. Aproximadamente 300 ml da água destilada foram introduzidas na abertura K até seu escoamento em B (Figura 9). Foi adicionado 1 ml de xilol, apoiando-se a ponta da pipeta no fundo da saída lateral K (Figura 9). A amostra imersa no interior do balão foi aquecida até o início da ebulição e destilada na razão de aproximadamente 2 a 3 ml por minuto. Ao final de quatro horas de destilação, desligou-se o aquecimento. Após 10 minutos, tempo necessário para resfriamento do sistema, foi feita leitura do volume de óleo essencial recolhido

no tubo graduado. A este valor foi subtraído o valor de 1 ml de xilol, acrescentado anteriormente.

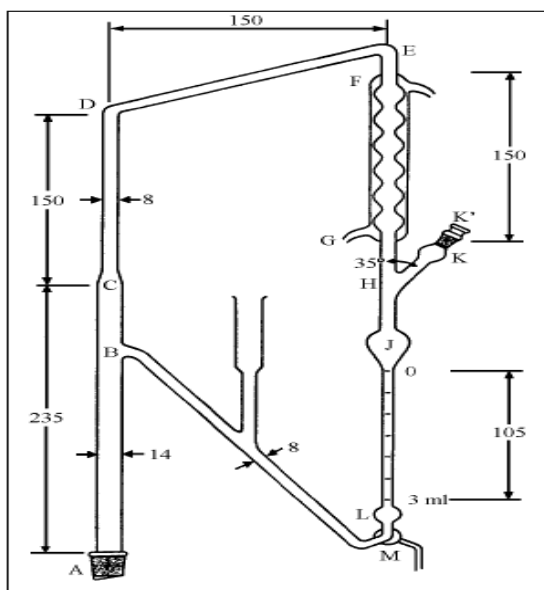


Figura 9. Aparelho utilizado para obtenção dos óleos essenciais presentes no fruto de *X. aromatica*.

3.2.3 Extração de alcaloides

Realizou-se extração específica de alcaloides para facilitar sua identificação através da técnica de cromatografia em camada delgada (CCD). O procedimento foi realizado conforme o preconizado na Monografia para o boldo-do-chile (*Peumus boldus* Molina) da Farmacopéia Brasileira 5ª edição (FARMACOPÉIA, 2011).

Foram transferidos 0,5 g do fruto seco rasurado para um balão de 50 ml. Adicionou-se uma mistura de 1 ml de ácido clorídrico 2 M e 20 ml de água. Após homogeneização, a mistura foi aquecida em banho-maria, sob refluxo, durante 10 minutos. A mistura foi resfriada, filtrada e adicionou-se 2 ml de hidróxido de amônio 6 M ao filtrado.

Em um funil de separação, o filtrado foi extraído duas vezes com 20 ml de éter etílico em cada vez, com agitação moderada, para evitar a formação de emulsão. Em seguida, a solução etérea, contendo os alcaloides, foi evaporada sob pressão reduzida.

3.2.4 Caracterização das substâncias químicas em EBXA e suas frações

3.2.4.1 Cromatografia em camada delgada (CCD)

Para evidenciar e caracterizar os óleos essenciais, flavonoides, saponinas e alcaloides, as amostras EBXA, FAHEX, FACET e FABUT foram analisadas por CCD. Aproximadamente, 10 mg de cada amostra foram dissolvidos em 1 ml de metanol. Uma pequena alíquota (10 – 20 µl) foi aplicada em uma placa de alumínio coberta com sílica gel. Essa placa foi colocada em uma cuba cromatográfica, contendo o eluente específico para cada classe de substância. Após a eluição, cada placa foi borrifada com o revelador específico para a identificação (WAGNER & BLADT, 1996).

Foram utilizadas amostras referências dos componentes de óleos essenciais (cariofileno, citronelol, mirceno e ocimeno), doados pela empresa Givaudan Roure e de substâncias fenólicas (ácido clorogênico e rutina), disponíveis no Laboratório de Farmacognosia da UFMG.

a) *Flavonoides*: Para a identificação de flavonoides, o eluente utilizado foi uma mistura de acetato de etila: ácido acético: ácido fórmico: água (100: 11: 11: 26). A placa foi revelada com difenilborilhexiletanolamina 1% em metanol (NP) seguido de polietilenoglicol 4000 1% em etanol (PEG). A placa foi aquecida por 5 min, a 105 °C e, em seguida, visualizada em luz ultravioleta (UV) a 365 nm. Foram utilizadas as amostras de referências rutina, quercetina e ácido clorogênico.

b) *Saponinas*: A identificação de saponinas foi realizada utilizando uma mistura dos eluentes clorofórmio: ácido acético glacial: metanol: água (60: 32: 10: 02) e

o revelador anisaldeído sulfúrico. A placa foi aquecida por 5 min, a 105 °C e, em seguida, visualizada no visível.

c) *Alcaloides*: Para avaliar a presença de alcaloides, a mistura de eluente utilizada foi diclorometano: acetona: dietilamina (60: 40: 02). A placa foi revelada com Dragendorff e seca ao ar frio.

d) *Óleos essenciais*: Para a caracterização dos óleos essenciais, o eluente utilizado foi uma mistura de tolueno: acetato de etila (93: 07). A placa foi revelada com anisaldeído sulfúrico. A placa foi aquecida por 10 min, a 105 °C e visualizada no visível. Foram utilizadas as amostras de referências cariofileno, citronelol, mirceno e ocimeno.

3.2.4.2 Cromatografia gasosa de alta resolução acoplada ao detector de massas (GC/ EM)

a) *Perfil de óleos voláteis do HEXA*: A identificação de óleos voláteis foi feita por cromatógrafo a gás acoplado a espectrometria de massa de marca Shimadzu modelo QP5050A. A temperatura do injetor split foi de 280°C. Foi utilizado hélio ultrapuro como gás de arraste a fluxo contínuo de 1mL/min e coluna BPX5 (30m x 0,25mm x 0,25µm) operando a 60-320 °C a 2,5 °C/min. O tempo de corrida foi de 57 minutos. A temperatura da fonte de íons (a 70 eV) foi de 200°C e a análise foi feita por impacto de elétrons. No cromatógrafo a gás, foi injetado 1 microlitro da amostra em metanol.

A identificação dos óleos voláteis foi realizada através da comparação dos espectros de massa obtidos com os de substâncias padrão existentes nas bibliotecas NIST21, NIST107, WILEY229 e SIMI607. Para cada pico evidenciado no cromatograma, foi apresentado o seu tempo de retenção (T_R), a área percentual, a substância identificada, massa e o índice de similaridade (IS). O índice de similaridade reflete a similaridade do espectro de massas obtido com os registrados nas bibliotecas utilizadas.

Esta análise foi realizada pela Central Analítica do Instituto de Química da USP.

b) *Perfil de ácidos graxos da HEXA*: A identificação dos ácidos graxos presentes na amostra foi realizada por meio de cromatógrafo a gás acoplado a espectrometria de massa da marca Shimadzu modelo QP-5000. A temperatura do injetor split foi de 280°C. Foi utilizado hélio ultrapuro com gás de arraste a fluxo contínuo de 1mL/min e coluna HP-5MS (30m x 0,25mm x 0,25µm) operando a 180-210°C a 5°C/min. O tempo de corrida foi de 25 minutos. A temperatura da fonte de íons (a 70eV) foi de 200°C e a análise foi feita por impacto de elétrons.

O HEXA foi submetido à hidrólise e metilação, para conversão dos ácidos graxos em compostos mais voláteis, como os ésteres metílicos de ácidos graxos, conforme método descrito por JHAM et al. (1982). Foram transferidos 1 ml de óleo para um tubo, adicionados de 2,0 mL de uma solução de KOH 0,50 mol/L em metanol e aquecidos em banho maria a 100 °C, por 5 minutos. Em seguida foram adicionados 1 ml de HCl em metanol aquoso (4:1 v/v). A mistura foi aquecida em um banho a 100°C por 15 minutos. Resfriou-se o tubo e, em seguida, foram adicionados 2,0 mL de água destilada e 3,0 mL de éter. Após agitação, o sobrenadante foi coletado. O extrato foi injetado em cromatógrafo à gás com espectrômetro de massas. No cromatógrafo a gás, foi injetado 1 microlitro da amostra em metanol.

A identificação dos ésteres de ácidos graxos foi realizada através da comparação dos espectros de massa obtidos com os de substâncias padrão existentes nas bibliotecas NIST21, NIST105 e WILEY229 e com dados da literatura. Para cada pico evidenciado no cromatograma, foi apresentado o seu T_R , a área percentual, a substância identificada, a massa e o índice de similaridade (IS).

Esta análise foi realizada pela Central Analítica do Instituto de Química da UNICAMP.

3.2.5 Ensaios biológicos

3.2.5.1 Animais

Os procedimentos experimentais realizados foram executados de acordo com os princípios éticos da experimentação animal, adotados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFMG (CETEA), e foram aprovados conforme CERTIFICADO Nº 2011/2010 (Anexo A).

Para a realização do ensaio biológico, foram utilizados camundongos com seis a sete semanas de vida, da linhagem Balb/c, provenientes do Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (CEBIO –ICB/UFMG). Os animais foram mantidos em gaiolas de plástico, contendo, no máximo, 8 animais por gaiola no Biotério da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais (FAFAR/UFMG).

3.2.5.2 Preparo da dieta rica em carboidratos

Para indução do aumento da adiposidade e alterações metabólicas associadas, os camundongos foram alimentados com dieta rica em carboidrato (HC). Esta dieta foi preparada conforme preconizado pelo nosso grupo de pesquisa: para o preparo de aproximadamente 1kg de ração palatável são usados 395g de leite condensado, 395g de ração Labina® em pó, 80 g de açúcar e 120 ml de água. O modo de preparo da ração consiste em peneirar o pó da ração comercial e acrescentar a este a mistura de água, açúcar e leite condensado até a obtenção de uma massa. Em seguida, *pelets* foram confeccionados manualmente. Durante todo o experimento os animais tiveram livre acesso a água e dieta.

A Tabela 1 apresenta a distribuição de macro e micronutrientes, assim como a porcentagem de quilocalorias provenientes da dieta controle (C) e da dieta HC. A análise bromatológica da dieta foi realizada no Laboratório de Qualidade do Leite da Escola de Veterinária da UFMG.

Tabela 1. Distribuição de macro e micronutrientes e densidade calórica (Kcal/g) da dieta controle e HC

	Dieta Controle (C)	Dieta HC
Proteínas (%)	23,3	17,5
Lipídios (%)	2,6	5,0
Carboidratos (%)	55,6	64,8
Fibra bruta (%)	6,2	4,1
Minerais (%)	9,3	8,5
Energia (Kcal/g)	4,0	4,4

3.2.5.3 Esquema de tratamento

A indução da obesidade e alterações metabólicas por dieta ocorreu durante as oito primeiras semanas do experimento. Até a oitava semana os camundongos foram divididos em 2 grupos: oito animais receberam dieta C e os 32 restantes foram alimentados com a dieta HC. Da 9^a a 12^a semana de estudo, os animais que recebiam dieta HC foram realocados em outros três novos grupos que passaram a se alimentar de dieta HC adicionada de três diferentes concentrações (50, 100 e 200 mg/Kg) de EBXA.

Para garantir a homogeneidade do extrato na dieta, o EBXA, diluído em quantidade mínima de álcool etílico, foi acrescentado ao pó da ração Labina® e peneirado três vezes. Em seguida, adicionou-se água, açúcar e leite condensado até formação de uma massa. Para finalizar, realizou-se confecção manual de *pelets*.

As doses escolhidas basearam-se nos resultados de estudos com os frutos de *X. aethiopica* (Dunal) A. Rich. Foram escolhidas as menores doses que apresentaram efeitos positivos em modelos animais (EZEKWESILI et al., 2010; OGBONNIA et al., 2010; OGBONNIA et al., 2008). A relação de todos os tratamentos realizados e os respectivos grupos de animais é descrita a seguir:

- ✓ Dieta controle: animais alimentados com a ração comercial Labina ® durante 12 semanas;
- ✓ Dieta HC: animais alimentados com a dieta HC durante 12 semanas;
- ✓ Dieta HC50: animais alimentados com a dieta HC durante 8 semanas. Da 9ª a 12ª semana foi adicionada na dieta HC 50/mg/Kg/dia de PC de EBXA;
- ✓ Dieta HC100: animais alimentados com a dieta HC durante 8 semanas. Da 9ª a 12ª semana foi adicionada na dieta HC 100/mg/Kg/dia de PC de EBXA;
- ✓ Dieta HC200: animais alimentados com a dieta HC durante 8 semanas. Da 9ª a 12ª semana foi adicionada na dieta HC 200/mg/Kg/dia de PC de EBXA.

A ingestão alimentar média foi determinada diariamente por meio da diferença entre a quantidade de ração ofertada e a quantidade restante na gaiola dos animais durante as semanas de experimento. O valor obtido foi dividido pelo número de animais que estavam na caixa. O mesmo foi realizado para avaliar o consumo e verificar as doses de tratamento, quando os animais passaram a receber dieta HC adicionada de EBXA.

A mensuração do peso corporal foi realizada uma vez por semana em balança semi-analítica com capacidade para 500 gramas e variação de 0,01 gramas. O ganho de peso foi calculado a partir da fórmula: (peso do dia – peso registrado na última pesagem) – delta de ganho de peso semanal.

O índice de adiposidade (IA) foi calculado pela relação entre a somatória dos pesos de tecido adiposo visceral, compostos pelo tecido adiposo epididimal (TAE), mesentérico (TAM) e retroperitoneal (TAR) (g) e o peso de cada animal

(g), seguido de multiplicação por 100. O IA foi calculado a partir da fórmula: $[(TAE + TAM + TAR)/PC] \times 100$.

3.2.5.4 Eutanásia

Após 90 dias de estudo, os camundongos foram deixados em jejum, no período noturno, por aproximadamente 12 horas. Os animais foram submetidos à eutanásia por exsanguinação, após terem sido anestesiados com 100 µL de ketamina: xilazina: PBS (3: 1: 4). Os tecidos adiposos epididimal, mesentérico e retroperitoneal e o fígado foram removidos e conservados em freezer - 20°C.

3.2.5.5 Desenho experimental

A representação gráfica do desenho experimental, com a escala temporal do estudo (90 dias), pode ser visualizada na Figura 10. Ao final da oitava e 12ª semana de experimento foi realizado o teste de tolerância oral à glicose (TTOG) e o teste de sensibilidade à insulina (TSI) para confirmar as alterações metabólicas causadas pela dieta HC. O TTOG e o TSI foram novamente realizados, após quatro semanas de consumo de dieta HC adicionadas de três diferentes concentrações de EBXA.

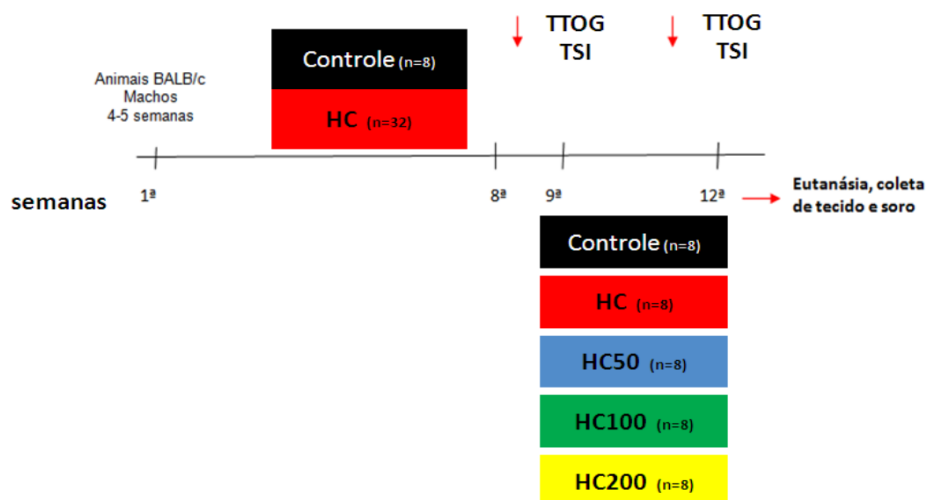


Figura 10. Escala temporal do desenho experimental

3.2.5.6 Obtenção do soro

O sangue foi coletado em tubos, centrifugado (3000 r.p.m) durante 10 minutos à 4°C para obtenção do soro. Em seguida, o material foi aliquotado em tubos individuais e congelado (-20°C) para posterior dosagem sérica de glicose, triglicérides, colesterol e insulina.

3.2.6 Protocolos experimentais

3.2.6.1 Teste de tolerância oral à glicose (TTOG)

Para o teste de tolerância oral à glicose (TTOG) foram utilizados camundongos no estado de jejum de aproximadamente 12 horas. Os animais receberam, via oral, por gavagem, D-glicose na dose de 0,2g/100g de PC, e a concentração sanguínea de glicose foi monitorada nos tempos 0 (estado de jejum), 15, 30, 60 e 90 minutos após a gavagem. Utilizou-se glicosímetro Accue-Check (Roche Diagnostics Corp., Indianapolis, Indiana, USA). As amostras de sangue foram obtidas da cauda dos animais após um pequeno corte. Este teste foi realizado na oitava e na 12^a semana do experimento.

3.2.6.2 Teste de sensibilidade à insulina (TSI)

Para o teste de sensibilidade à insulina, foram utilizados camundongos no estado alimentado. Os animais receberam, por injeção intrapeitoneal, insulina na concentração de 0,75UI/100g de PC, e a concentração sanguínea de glicose foi monitorada nos tempos 0 (estado alimentado), 15, 30, 60 e 90 minutos após a injeção. Utilizou-se glicosímetro Accue-Check (Roche Diagnostics Corp., Indianapolis, Indiana, USA). As amostras de sangue também foram obtidas da cauda dos animais após um pequeno corte. Este teste foi realizado na oitava e na 12^a semana do experimento.

3.2.6.3 Cálculo do Índice de HOMA-IR e HOMA-β

A resistência à insulina foi avaliada pela aplicação dos índices HOMA-IR (*homeostasis model of assessment for insulin resistance*) e HOMA-β (*homeostasis model of assessment for β-cell function*). O primeiro índice avalia a sensibilidade à insulina e o outro a função das células- β pancreáticas. O HOMA-IR foi calculado usando a fórmula (glicemia de jejum (mmol/L) x insulina de jejum (μUI/mL) / 22,5) e o HOMA-β a fórmula [(insulina de jejum (μUI/mL) x 20) / glicemia de jejum (mmol/L) – 3,5] descrita por MATTHEWS et al. (1985) e atualizado por BONORA et al. (2000).

3.2.6.4. Análise morfológica dos adipócitos do tecido adiposo epididimal

3.2.6.4.1. Processamento do tecido adiposo epididimal para a microscopia de luz

Fragmento do tecido adiposo epididimal, com cerca de 50-100mg, foram removidos e imersos em solução fixadora de formaldeído à 10% em tampão fosfato 0,1 mol/L, pH 7,4, por um período de 24 horas. Em seguida, procedeu-se a etapa de desidratação com o álcool 70^o, seguida de diafanização com xilol e a inclusão em parafina. Foram obtidas, no micrótomo, secções histológicas de 5 μm de espessura. As secções foram colocadas em lâminas e coradas com hematoxilina, contrastada com eosina e, em seguida avaliadas por microscopia.

3.2.6.4.2. Aquisição de imagem no microscópio e mensuração da área e diâmetro dos adipócitos

Para a determinação do tamanho dos adipócitos, as lâminas foram analisadas em microscópio, equipado com uma câmera digital (Motican 2500). O perímetro

e a área seccional foram obtidos através da medida aleatória de 50 adipócitos por lâmina (n=5), e posterior análise com o programa ImageJ para o processamento de imagens digitais.

3.2.6.5. Dosagens sorológicas

O triacilglicerol, colesterol total e glicose presentes no soro foram quantificados por Kit enzimático (KATAL, Belo Horizonte, MG), segundo as instruções do fabricante. A insulina foi quantificada por meio da técnica de ELISA (kit comercial – Millipore).

3.2.6.6. Contagem total de leucócitos, células mononucleares e neutrófilos

Para contagem total de leucócitos, amostra de sangue foi diluída na proporção 1:10 em solução de Türk. O sangue foi obtido da cauda dos animais após um pequeno corte na ponta da mesma. A contagem total foi realizada em microscópio ótico (Olympus), usando câmara de Neubauer. A contagem diferencial foi realizada após aplicação da técnica de coloração com kit panóptico das lâminas com esfregaço sanguíneo.

3.2.6.7. Extração de citocinas dos tecidos

Fragmentos do tecido adiposo epididimal e do fígado (100mg) foram homogeneizados em 1mL de solução de extração de citocinas e quimiocina (NaCl 0,4 mol/L; tween 20 0,05%; albumina de soro bovino 0,5%; fluoreto de fenilmetilsufonila 0,1 mmol/L; cloreto de benzetônio 0,1mmol/L; EDTA 10 mmol/L; 20 UI de aprotinina), preparada a partir de uma solução de tampão fosfato (8g NaCl, 0,2g KCl e 2,89g Na₂HPO₄.12H₂O diluídos em 1 litro). O homogeneizado resultante foi centrifugado por 10min a 10000 r.p.m. a 4°C, sendo o infranadante recolhido para a dosagem pela técnica de ELISA.

3.2.6.8. Determinação da concentração de citocinas por ELISA

O infranadante recolhido das amostras dos tecidos adiposo epididimal e fígado, obtidos no procedimento supracitado e o soro dos animais, foram diluídos na proporção de 1:4 para o tecido adiposo e 1:10 para o fígado, em PBS contendo 0,1% de albumina bovina. As concentrações de TNF- α , IL-6 e IL-10 nos tecidos foram determinados utilizando-se anticorpos obtidos da R&D Systems (DuoSet). As instruções do fabricante para a realização dos ensaios foram seguidas, e estão resumidamente descritas abaixo.

Todos os ensaios foram realizados em placas com 96 poços (Nunc, USA). Os anticorpos de captura foram diluídos em PBS pH 7,4, sendo que a sensibilização ocorreu durante aproximadamente 18 horas à 4°C. Os anticorpos de detecção foram diluídos em PBS pH 7,4, com 0,1% de albumina bovina, sendo que a sensibilização ocorreu durante aproximadamente 2 horas à temperatura ambiente. A reação foi detectada pela incubação com estreptavidina conjugada com peroxidase e revelada com OPD (*o-phenylenediamine dihydrochloride* - Sigma). A reação foi interrompida com H₂SO₄ a 1 mol/L. A leitura foi realizada no leitor de ELISA com filtro para comprimento de onda de 492 nm.

3.2.7 Análise estatística

Depois de realizado o teste de normalidade e verificado que as amostras apresentavam distribuição Gaussiana, as comparações estatísticas entre os vários grupos foram feitas por ANOVA “one way” seguida de pós-teste Newman-Keuls. Para comparação entre dois grupos, quando necessário, foi utilizado o teste “t de student”. Os resultados foram apresentados como média \pm erro padrão. O nível de significância adotado foi de $P < 0,05$. Para a realização de todas as análises, foi utilizado o software GraphPad PRISM, GraphPad software Inc. (San Diego, CA, USA).

4. RESULTADOS

4.1 Análises químicas do EBXA e suas frações

4.1.1 Rendimento das extrações

O processo utilizado para obtenção do EBXA e HEXA dos frutos de *X. aromatica* foi a percolação a frio. Obteve-se rendimento de 39,1% e 14,8% a partir da percolação de 400g e 100g de fruto seco e moído, respectivamente, seguida de completa evaporação do solvente (Tabela 2).

Tabela 2 - Rendimento do EBXA e HEXA

Partição	Pó da planta (g)	Peso(g)	Rendimento (%)
EBXA	400,0	156,2	39,1
HEXA	100,0	14,8	14,8

Com objetivo de conhecer os principais constituintes químicos da planta, o EBXA foi fracionado utilizando diferentes solventes de polaridade crescente. O fracionamento foi feito a partir de 38,0g do extrato. O rendimento obtido com os solventes hexano (FAHEX), acetato de etila (FACET) e n-butanol (FABUT) encontram-se na tabela (Tabela 3). Os maiores rendimentos foram observados para as frações hexano e acetato de etila, indicando uma elevada concentração de substâncias apolares e de polaridade intermediária no fruto.

Tabela 3 - Rendimento do fracionamento a partir do EBXA utilizando diferentes solventes de polaridade crescente.

Fração	Peso (g)	Rendimento (%)
EBXA	38g	-
FAHEX	18,36	48,3
FACET	17,66	46,5
FABUT	1,4	3,7

4.1.2. Quantificação e caracterização do óleo essencial de *X. aromatica* (OEXA)

A extração dos óleos essenciais presentes nos frutos de *X. aromatica* foi realizada com objetivo de quantificá-lo e facilitar sua caracterização pela CCD. O teor de óleo essencial obtido por hidrodestilação foi de 2,2%. O óleo essencial recém-extraído era de coloração amarelo-clara (Figura 11) e observou-se que esta tonalidade foi perdida gradativamente, com o armazenamento.



Figura 11 - Obtenção de óleo essencial por hidrodestilação (OEXA)

4.1.3. Caracterização química dos frutos de *X. aromatica* por CCD

A Figura 12 mostra o perfil cromatográfico, em CCD, do EBXA, FACET e FABUT para flavonoides e ácidos fenólicos. As bandas amarelas fluorescentes, no Rf 0,43 e entre os Rfs 0,7 e 0,97, encontradas em EBXA e nas frações FACET e FABUT, indicam a presença de flavonoides. A amostra referência de rutina apresentou fluorescência amarela no Rf 0,43. Esta substância foi observada em todas as amostras. Outras duas bandas fluorescentes, entre os

Rfs 0,7 e 0,97, encontradas na amostra referência e em EBXA, FACET e FABUT, são decorrentes da perda espontânea de unidades de açúcar na estrutura da rutina.

As bandas de fluorescência azul no EBXA e suas frações são devido à presença de ácidos fenólicos. O padrão de referência de ácido clorogênico, no Rf 0,7, de coloração azul, foi também observado no EBXA, FACET e FABUT. A banda azul nos Rfs 0,97 a 0,99, presente em EBXA e FACET sugere a presença de ácido caféico (WAGNER & BLADT, 1996). As estruturas das substâncias fenólicas, rutina e ácido clorogênico, identificadas por CCD, no EBXA, FACET e FABUT estão representadas na Figura 13.

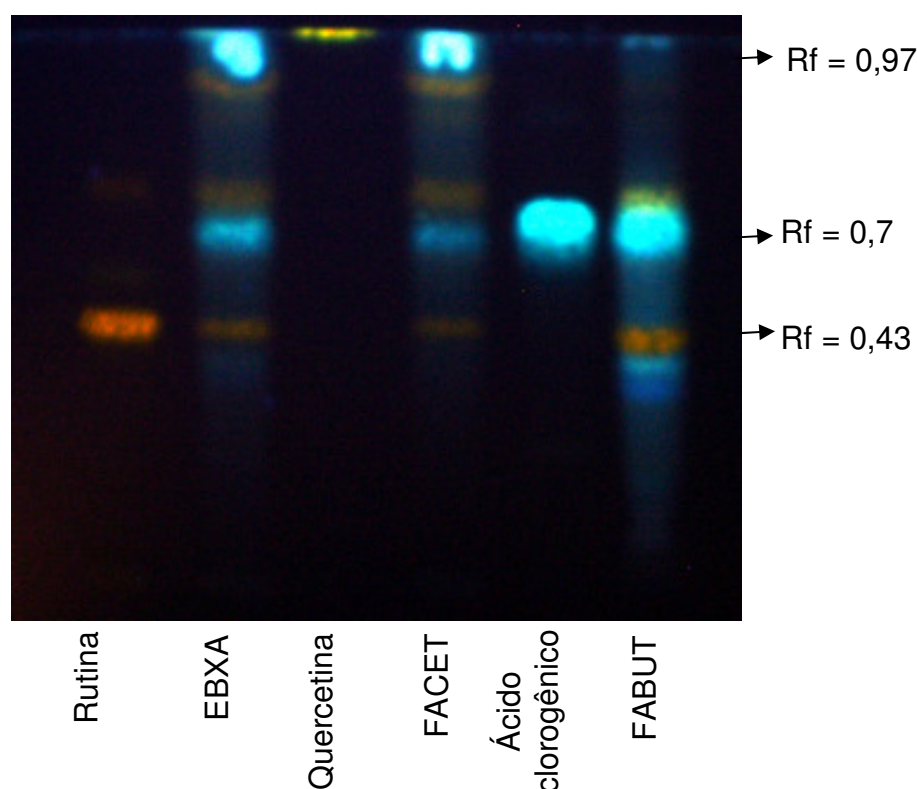


Figura 12. CCD para identificação de flavonoides. *Padrões*, rutina, quercetina e ácido clorogênico. EBXA, extrato bruto dos frutos de *X. aromatica*; FACET, fração acetato de etila; FABUT, fração n-butanol FABUT. *Eluente*, acetato de etila, ácido acético, ácido fórmico e água (100:11:11:26); *revelador*, difenilborilhexiletanolamina a 1% em metanol seguido de polietilenoglicol 4000 a 1% em etanol (PEG); *visualização*, luz ultravioleta a 365 nm.

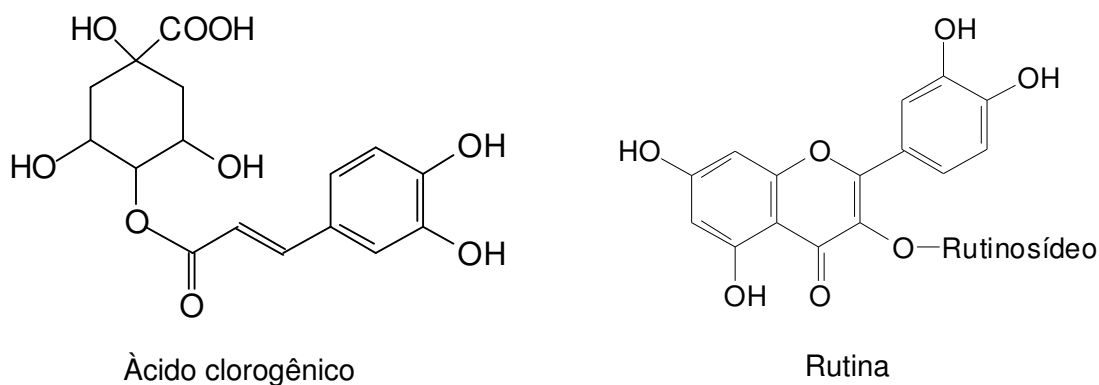


Figura 13. Estrutura química das substâncias fenólicas identificadas por CCD nos frutos de *X. aromatica*.

A Figura 14 mostra o perfil cromatográfico em CCD para saponinas, do EBXA e suas frações. O padrão de referência de saponina comercial (SC) apresentou duas bandas marrons escuras, nos Rfs 0,7 e 0,78. Manchas de coloração marrom claro, nos Rfs 0,42 e 0,6, foram observadas em EBXA e FABUT e em menor evidencia em FACET. Bandas de coloração azul-violeta, nos Rfs entre 0,64 e 0,82, também foram visualizadas na FABUT e em menor intensidade no EBXA e FACET. Estas colorações sugerem a presença de terpenos e ou saponinas.

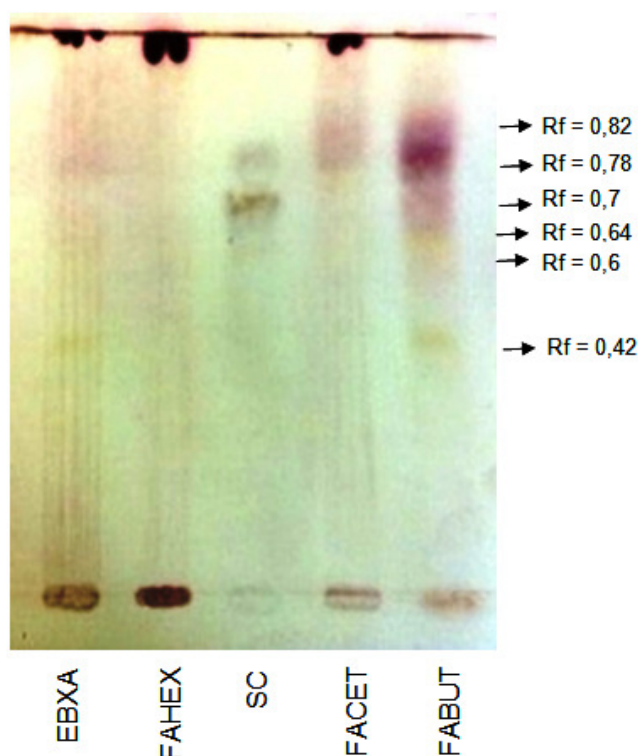


Figura 14. CCD para identificação de saponinas. SC, padrão de saponina comercial; EBXA, extrato bruto dos frutos de *X. aromatica*; FAHEX, fração hexânica; FACET, fração acetato de etila; FABUT, fração n-butanol. *Eluente*, clorofórmio: ácido acético glacial: metanol: água (60:32:10:02); *revelador*, anisaldeído sulfúrico; *visualização*, luz visível, após aquecimento.

A Figura 15 mostra o perfil comatográfico em CCD para alcaloides do EBXA, FABUT e de uma fração de alcaloides extraídos diretamente do fruto (FAEXA). Foram observadas bandas de coloração marrom e marrom-alaranjada nos Rfs 0,01 a 0,12, 0,3 e 0,95, após revelação com reagente Dragendorff. Essas substâncias encontram-se em maior proporção na fração de maior polaridade, FABUT.

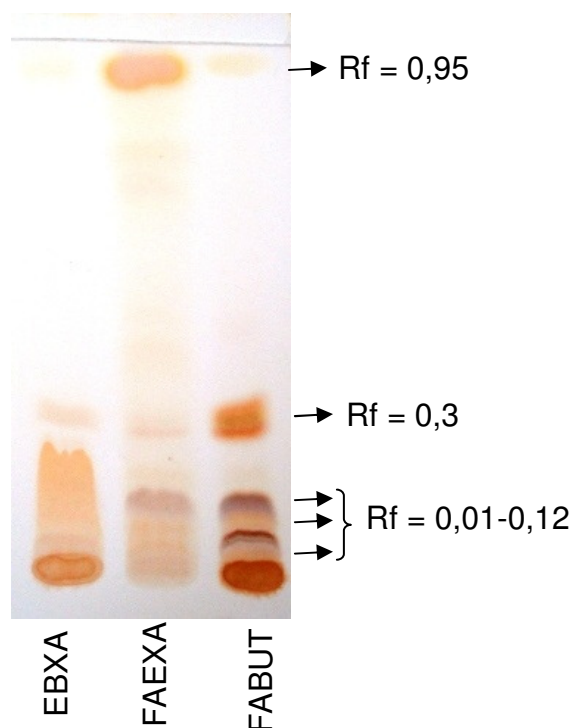


Figura 15. Cromatografia em camada delgada para identificação de alcaloides. FAEXA, fração de alcaloides extraídos diretamente dos frutos de *X. aromatica*; EBXA, extrato bruto dos frutos de *X. aromatica*; FABUT, fração n-butanol. *Eluente*, diclorometano: acetona: dietilamina (60:40:02); *revelador*, dragendorff; *visualização*, luz visível, após secagem ao ar seco.

A Figura 16 mostra o cromatograma obtido para óleos essenciais do fruto (OEXA). A amostra apresentou 11 bandas de coloração variada, que vão dos tons rosa a violeta, nos Rfs 0,98, 0,8, 0,76, 0,67, 0,6, 0,5, 0,46, 0,4, 0,36, 0,28 e 0,2. O mirceno, cariofileno, ocimeno e citronelol apresentaram bandas nos Rfs 0,98, 0,96, 0,44 e 0,28. A presença de duas ou mais bandas nas amostras referência de óleos essenciais são decorrentes da degradação dos mesmos. A comparação dos Rfs obtidos para OEXA com as amostras referências sugere a presença de mirceno (Rf = 0,98), citronelol (Rf = 0,28) e cariofileno (Rf = 0,96).

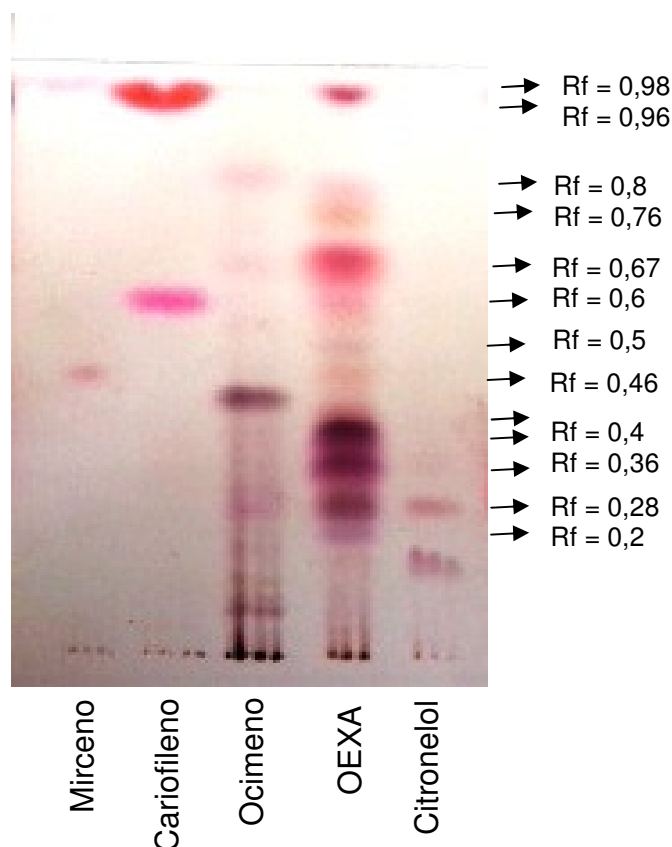


Figura 16. CCD para identificação de óleos essenciais. Mirceño, Cariofileno, Ocimeno, OEXA, citronelol. *Eluente*, tolueno: acetato de etila (93:07); *revelador*, anisaldeído sulfúrico; *vizualização*, luz visível, após aquecimento.

4.1.4 Caracterização do HEXA dos frutos de *X. aromatica* por CG/ EM

O cromatograma em CG/ EM para as substâncias voláteis obtidos do HEXA (lote 1) apresentou 14 picos (Figura 17), nos T_{RS} 5,3 (pico número 1), 19,8 (pico 2), 27,5 (pico 3), 28,7 (pico 4), 30,2 (pico 5), 31,8 (pico 6), 32,0 (pico 7), 32,1 (pico 8), 32,5 (pico 9), 35,1 (pico 10), 35,3 (pico 11), 35,4 (pico 12), 35,4 (pico 13) e 50,6min (pico 14), respectivamente. Foram identificados por meio de seus espectros de massas os 10 primeiros picos, conforme demonstrado na Tabela 4. Somente um dos picos (10 a 13) presente no T_R 35,4min, pode ser identificado.

Os compostos majoritários identificados foram o ácido oléico, ácidos graxos poliinsaturados (ácido linoléico, 3,6-ácido octadecadiinóico e ciclopentano

ácido undecanóico) e saturados (ácido palmítico e caprótico), seguidos de sesquiterpenos (trans-cariofileno) e de monoterpenos (mirceno e 4,5-dimetil-1-hexano) (Tabela 4).

Mirceno e β -pineno apresentaram espectros de massas com IS semelhantes, no T_R 27,5min (pico 3). Este resultado, associado à identificação na CCD de bandas de coloração e Rfs semelhantes à amostra referência de mirceno, sugere que este componente integre o pico 3 (Figura 17). Ambos monoterpenos, mirceno e β -pineno, já foram identificados em frutos de *X. aromatica* e possuem massa molecular semelhante (SILVA & ROCHA 1981). Deste modo, há a possibilidade de não ter ocorrido a separação completa das duas substâncias e de ambos monoterpenos estarem presentes na amostra.

Na CCD foram identificados os óleos essenciais mirceno e cariofileno, também detectados pela CG, e o citronelol. O citronelol também já foi identificado em frutos de *X. aromatica* (SILVA & ROCHA 1981). Possivelmente, este monoterpeno corresponde a um dos picos (11 a 13) evidenciados pela CG, não identificados pelo espectrofotômetro de massa.

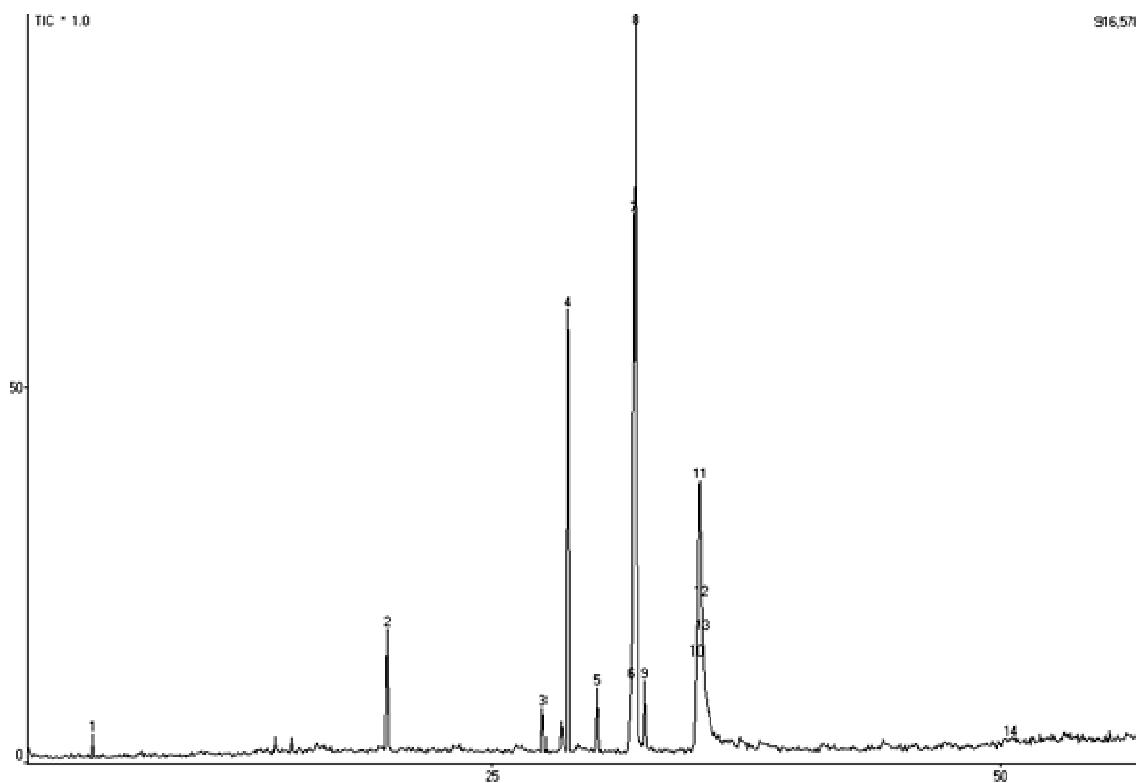


Figura 17. Cromatograma (CG/ EM) dos constituintes químicos presentes no HEXA (lote 1). Cada pico representa um componente da amostra.

Tabela 4. Composição do HEXA (lote 1) determinado por CG/ EM. As substâncias a seguir citadas foram aquelas que apresentaram maior similaridade com os espectros de massa presentes na biblioteca do sistema.

Pico	IS	Substâncias	Massa (g)	Tempo de retenção (min)	Área (%)
01	70	1,4 pentadieno	68	5,32	0,65
02	72	3,6-ácido octadecadiinóico	276	19,79	3,9
03	70	Mirceno	136	27,55	1,1
03	70	β-pineno	136		
04	84	Ácido palmítico	256	28,73	15,5
05	73	4,5-dimetil-1-hexeno	112	30,17	2,2
06	77	Ciclopentano ácido undecanóico	254	31,85	1,9
07	88	Ácido linoléico	280	31,98	20,4
08	84	Ácido oléico	282	32,09	27,5
09	79	Ácido caprótico	144	32,53	2,2
10	78	Trans cariofileno	204	35,14	19,6
11	-	-	-	35,27	1,56
12	-	-	-	35,36	0,33
13	-	-	-	35,39	0,51

IS: índice de similaridade na base de dados que reflete a similaridade do espectro de massas obtido com os registrados nas bibliotecas utilizadas.

Os espectros de massa das substâncias identificadas no HEXA (lote 1) se encontram no Anexo A. As estruturas dos óleos voláteis identificadas por CG/ EM nesta amostra estão representadas na Figura 18.

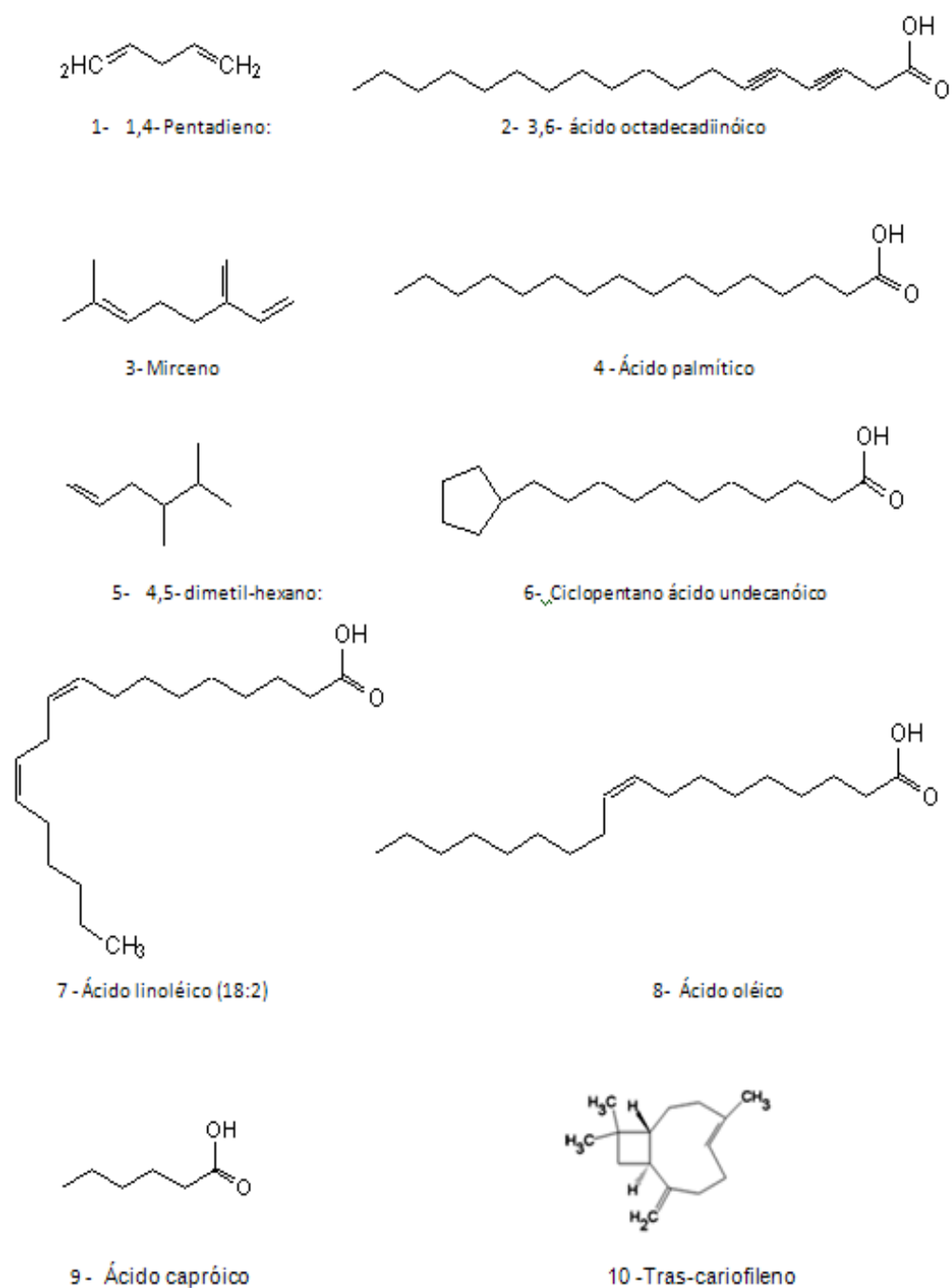


Figura 18. Estruturas químicas das principais substâncias identificadas no HEXA (lote 1) por CG/ EM.

4.1.5 Perfil de ácidos graxos dos frutos de *X. aromatica* por CG/ EM

Para esta análise, os ácidos graxos foram convertidos em compostos voláteis, de forma a permitir a sua separação e caracterização por CG/ EM.

O cromatograma obtido por CG/ EM mostrou seis picos nos T_{Rs} 2,88 (pico 1), 4,83 (pico 2), 6,69 (pico 3), 6,97 (pico 4), 7,58 (pico 5) e 8,54mn (pico 6) (Figura 19). Os ácidos graxos majoritários identificados foram os ácidos oléico e linoléico, seguido de menores proporções de ácido palmítico, esteárico e linolênico (Tabela 5).

O pico 1 foi identificado como hidróxitolueno butilado (BHT) e a sua presença pode ser devida a forma com que os frutos foram armazenados e transportados, em uma embalagem plástica. O BHT é um antioxidante usado na produção de materiais plásticos e, possivelmente, pode ter ocorrido contaminação da amostra. É importante considerar que esta substância não foi identificada na amostra do lote 1, a qual foi armazenada e transportada em um saco de papel.

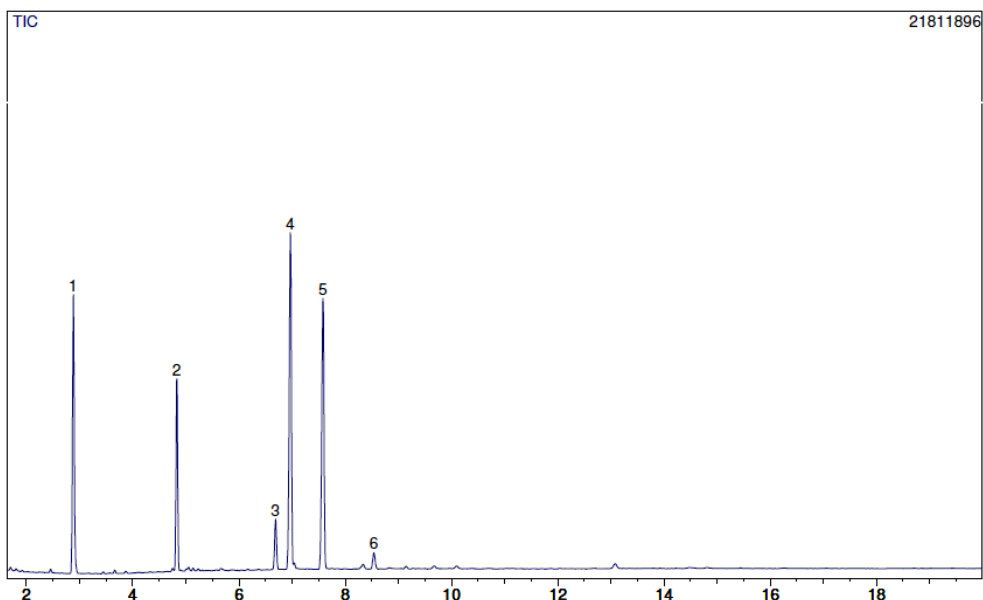


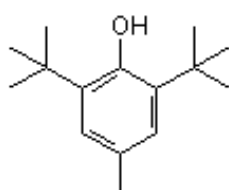
Figura 19. Cromatograma (CG) dos ácidos graxos presentes HEXA (lote 2). Cada pico representa um componente da amostra.

Tabela 5. Ácidos graxos detectados no HEXA (lote 2) por CG/ EM. Substâncias identificadas por análise comparativa de espectros de massas de substâncias presentes na biblioteca do sistema e com dados da literatura.

Pico	IQ	Substâncias	Massa (g)	Tempo de retenção (min)	Área (%)
01	93	Hidróxitolueno butilado	220	2,88	22,06
02	94	Ácido palmítico	256	4,83	13,79
03	95	Ácido esteárico	284	6,69	4,29
04	95	Ácido oléico	282	6,97	31,4
05	95	Ácido linoléico	280	7,58	27,40
06	86	Ácido linolênico	306	8,54	1,43

IQ: índice de pesquisa na base de dados que reflete a similaridade do espectro de massas obtido com os registrados nas bibliotecas utilizadas.

Os espectros de massa dos ácidos graxos identificados no HEXA (lote 2) se encontram no Anexo B. As estruturas dos óleos voláteis identificadas por CG/ EM estão representadas a seguir (Figura 20).



1- Hidroxitolueno burilado



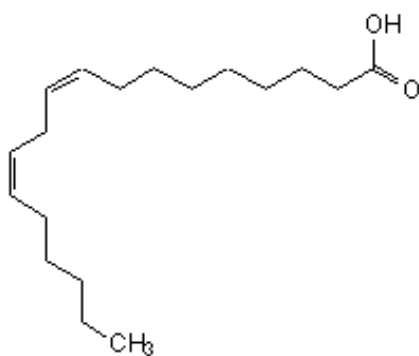
2 - Ácido palmítico



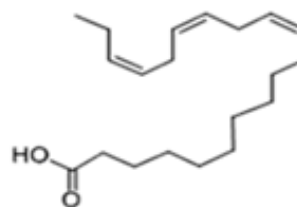
3 - Ácido esteárico



4- Ácido oléico



5- Ácido linoléico (18:2)



6 - Ácido linolénico (18:3)

Figura 20. Estruturas químicas dos ácidos graxos identificados no HEXA (lote 2) por CG/ EM.

4.2 Efeitos do EBXA no tratamento de alterações metabólicas induzidas por dieta em camundongos BALB/c

4.2.1 Teste de tolerância oral à glicose (TTOG)

Os animais foram submetidos ao TTOG na oitava semana de experimento com o objetivo de confirmar as alterações no metabolismo da glicose causada pela dieta HC. Conforme mostrado na Figura 21 A, nos tempos 15, 30 e 60 minutos após a sobrecarga oral de glicose, os animais alimentados com dieta HC apresentaram maior percentual de aumento de glicemia quando comparado aos animais controle (C). A Figura 21 B apresenta a área sob a curva do TTOG e evidencia menor tolerância oral à glicose dos animais do grupo HC quando comparados aos animais controle.

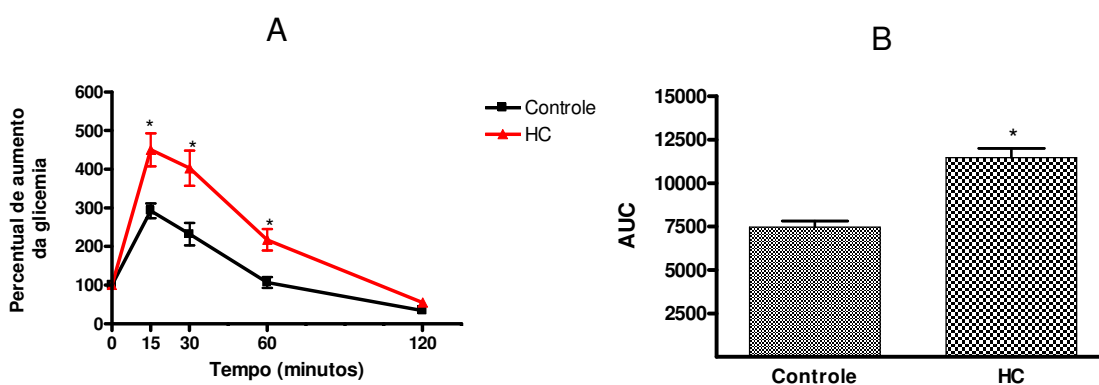


Figura 21 - TGO na oitava semana de experimento. (A) Percentual de aumento da glicemia em relação ao basal (tempo 0 - jejum) aos 15, 30, 60 e 120 minutos após a gavagem de 2g/Kg de PC de glicose. (B) Representação da área sob a curva (AUC) do TTOG. As barras representam a média \pm erro padrão, n=8. *P<0,05 vs C.

4.2.2 Teste de sensibilidade à insulina (TSI)

Os animais foram submetidos ao TSI na oitava semana de experimento com o objetivo de confirmar alteração na sensibilidade à insulina causada pela dieta HC. Conforme mostrado na Figura 22 A, nos tempos 30 e 60 minutos após injeção intraperitoneal de insulina, os animais alimentados com dieta HC apresentaram menor percentual de redução da glicemia quando comparado aos animais alimentados com dieta C. A Figura 22 B apresenta a área sob a curva do TSI evidenciando que os animais do grupo HC apresentavam menor sensibilidade à insulina.

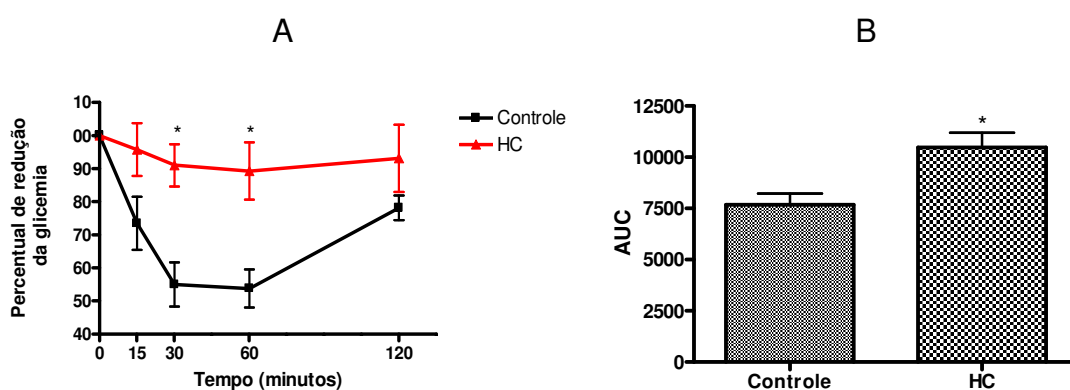


Figura 22 - TSI na oitava semana de experimento. (A) Percentual de redução da glicemia em relação ao basal (tempo 0 - posprandial) aos 15, 30, 60 e 120 minutos após injeção intraperitoneal de 0,75UI/Kg de PC de insulina. (B) Representação da área sob a curva (AUC) do TSI. As barras representam a média \pm erro padrão, n=8. *P<0,05 vs C.

4.2.3 Ingestão alimentar, peso ponderal e índice de adiposidade

Após verificar que os animais alimentados com dieta HC apresentavam menor tolerância à glicose e sensibilidade à insulina, foi iniciado tratamento com três diferentes doses do extrato bruto dos frutos de *X. aromatica* (EBXA) durante quatro semanas.

Animais alimentados com dieta HC e tratados com extrato nas diferentes doses não apresentaram alteração na ingestão alimentar (dado não apresentado) e de PC (Figura 23 A) em relação aos animais alimentados com dieta controle. Entretanto, conforme pode ser observado na Figura 23 B, os animais alimentados com dieta HC apresentaram maior índice de adiposidade quando comparados aos animais alimentados com dieta controle. Os grupos que receberam dieta HC acrescida das diferentes doses do EBXA não apresentaram alteração desse índice em relação ao seu respectivo controle (HC).

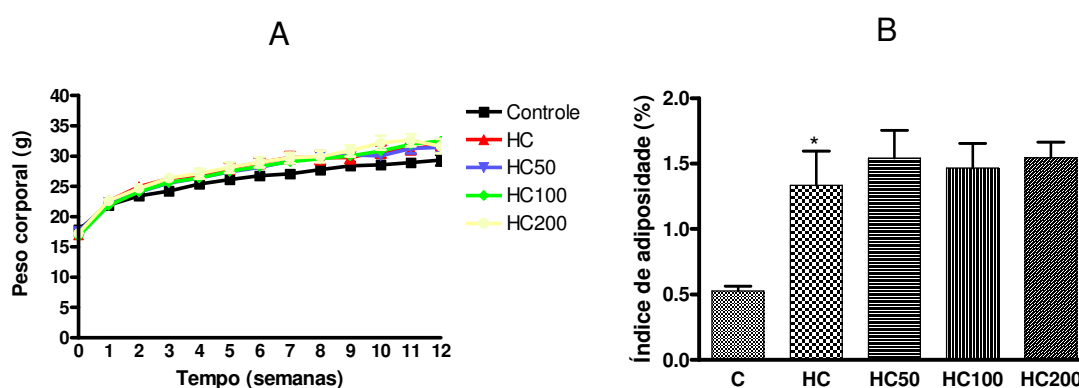


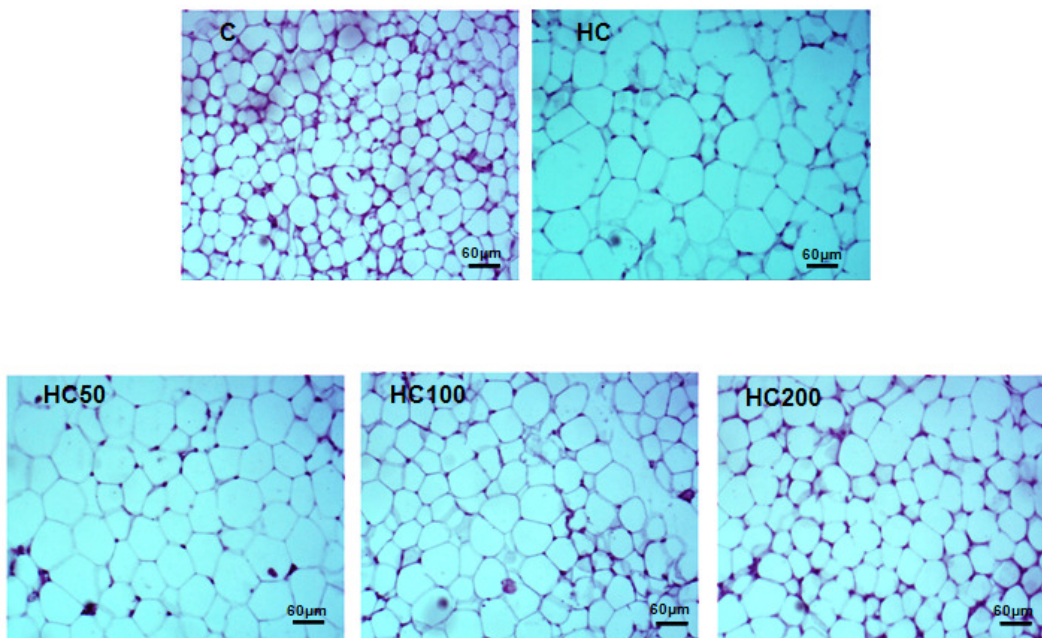
Figura 23 - Peso Corporal e índice de adiposidade de camundongos alimentados com dieta controle, HC e dieta HC acrescida de três diferentes doses de EBXA. (A) Peso corporal mensurado semanalmente. (B) Avaliação da biometria do tecido adiposo visceral pelo índice de adiposidade (TAE+TAM+TAR x 100/ PC). As barras representam a média \pm erro padrão, n= 8. *P<0,05 vs C.

4.2.4. Análise morfológica dos adipócitos do tecido adiposo epididimal

A análise histológica do tecido adiposo epididimal mostrou que os animais alimentados com dieta HC apresentaram área (Figura 24 A e B) dos adipócitos maiores quando comparados aos animais do grupo C. Os grupos que receberam dieta HC adicionada de 50, 100 e 200mg/kg de PC de EBXA apresentaram menores valores de área dos adipócitos quando comparado ao respectivo controle, HC. Os animais alimentados com dieta HC200

apresentaram adipócitos de área menores quando comparados aos grupos alimentados com dieta HC, HC50 e HC100.

A



B

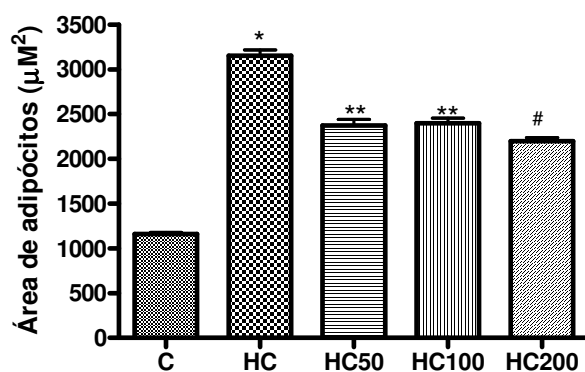


Figura 24 - Análise histológica de secções do tecido adiposo epididimal. (A) Representação da morfologia do tecido adiposo epididimal dos grupos alimentados com dieta C, dieta HC e dieta HC acrescentada de 50, 100 e 200mg/kg de PC de EBXA. (B) Determinação da área dos adipócitos de camundongos alimentados com dieta controle, HC, HC50, HC100 e HC200. As barras representam a média \pm erro padrão, n= 5. *P<0,05 vs C. **P<0,05 vs HC. #P<0,05 vs HC50 e HC100.

4.2.5 Teste de tolerância oral à glicose após quatro semanas de tratamento com EBXA

O TTOG foi realizado novamente na 12^a semana de experimento, com o objetivo de verificar se o consumo de dieta HC adicionada de diferentes doses do EBXA, durante quatro semanas, seria capaz de reverter a alteração do metabolismo da glicose dos animais alimentados com a dieta HC.

Após 12 semanas de experimento os animais alimentados com dieta HC apresentavam percentuais de aumento de glicose maiores nos tempos 30 e 60 minutos, quando comparado aos animais controle (C). Os animais alimentados com as três diferentes doses do EBXA apresentaram percentuais de aumento de glicemia menores nos tempos 30 e 60 minutos quando comparado ao grupo alimentado com dieta HC (Figura 25 A). A área sob a curva, conforme observado na Figura 25 B, indica menor tolerância oral a glicose nos animais do grupo HC. Após suplementação com 50, 100 e 200 mg de PC de EBXA observou-se uma atenuação desta intolerância.

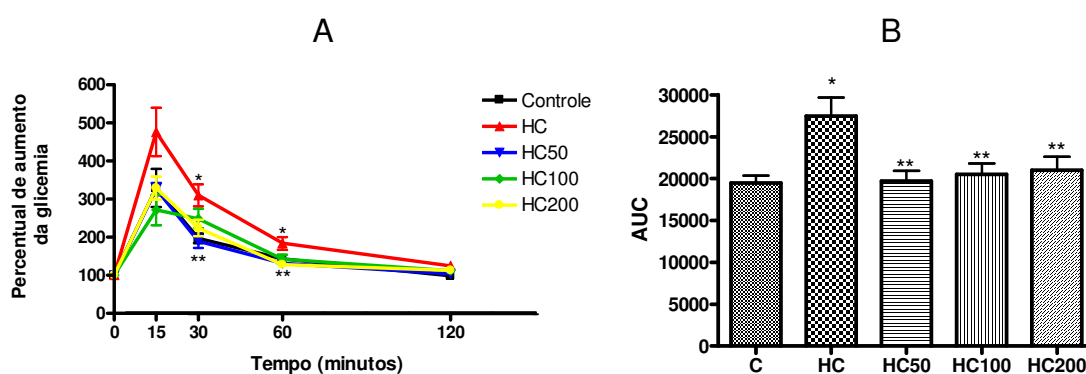


Figura 25 - TTOG realizada na 12^a semana de experimento, após quatro semanas de suplementação com três diferentes doses do EBXA. (A) Percentual de aumento da glicemia em relação ao basal (tempo 0 - jejum) aos 15, 30, 60 e 120 minutos após gavagem de 2g/Kg de PC de glicose (B) Representação da área sob a curva (AUC) do TTOG. As barras representam a média \pm erro padrão, n=8. *P<0,05 vs C. **P<0,05 vs HC.

4.2.6 Teste de sensibilidade à insulina após quatro semanas de tratamento com EBXA

O TSI foi realizado novamente na 12^a semana de experimento, com o objetivo de verificar se o consumo de dieta HC adicionada de diferentes doses do EBXA, durante quatro semanas, seria capaz de melhorar a sensibilidade à insulina dos animais alimentados com a dieta HC.

Na 12^a semana de tratamento, os animais alimentados com dieta HC apresentaram percentuais de redução de glicose menores nos tempos 30, 60 e 120 minutos, após injeção intraperitoneal de insulina, quando comparados aos animais controle. Somente os animais alimentados com dieta HC, adicionada de 200mg/kg de EBXA por PC, apresentaram atenuação da insensibilidade à insulina induzida por dieta HC (Figura 26 A e B). A área sob a curva, conforme observado na Figura 26 B, indica menor sensibilidade à glicose nos animais do grupo HC. Após suplementação com 200 mg de PC de EBXA observou-se uma atenuação desta insensibilidade.

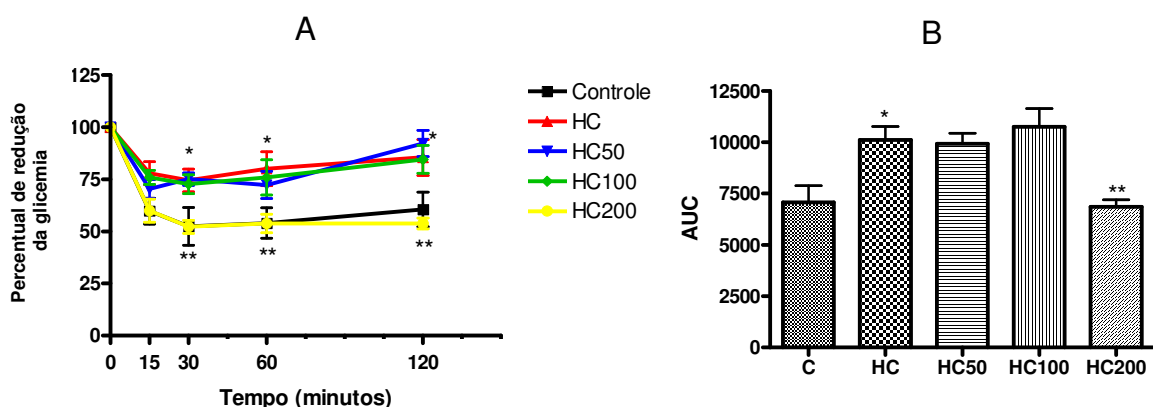


Figura 26 - TSI realizada na 12^a semana de experimento, após quatro semanas de suplementação com três diferentes doses do EBXA. (A) Percentual de redução da glicemia em relação ao basal (tempo 0 - posprandial) aos 15, 30, 60 e 120 após injeção intraperitoneal de 0,75UI de insulina/Kg de PC. (B) Representação da área sob a curva (AUC) do TSI. As barras representam a média \pm erro padrão, n=8. *P<0,05 vs C. **P<0,05 vs HC.

4.2.7 Parâmetros sorológicos

4.2.7.1 Triacilglicerol, colesterol total, glicose de jejum, insulina e índices HOMA

Para verificar as alterações no metabolismo de glicose e lipídios dos animais estudados, foram realizadas as dosagens de glicose de jejum, insulina, índices HOMA-IR e HOMA- β , colesterol total e triglicérides. Os resultados apresentados na Tabela 6 mostram que os animais alimentados com dieta HC apresentaram maiores valores de glicose de jejum, HOMA-IR, colesterol total e triglicérides assim como menores valores de HOMA- β e valores similares de insulina quando comparados aos animais alimentados com dieta C. Os animais suplementados com as três diferentes doses de EBXA não apresentaram alterações dos parâmetros avaliados quando comparados aos animais alimentados com dieta HC.

Tabela 6. Parâmetros sorológicos e índices de HOMA. Animais alimentados com dieta controle (C), dieta rica em carboidrato (HC) e dieta HC acrescentada de 50 (HC50), 100 (HC100) e 200mg/kg de PC de EBXA (HC200). n=8. *P<0,05 vs C. **P<0,05 vs HC

Perfil sérico	Grupos				
	Controle	HC	HC50	HC100	HC200
Glicose de jejum (mg/dl)	167,8 ± 30,7	259,6 ± 53,9*	220,8 ± 52,4	279,2 ± 41,0	264,0 ± 62,7
Insulina (ng/ml)	5,6 ± 0,8	5,9 ± 0,9	6,4 ± 0,6	5,7 ± 0,6	5,6 ± 0,4
HOMA-IR	2,3 ± 0,3	3,9 ± 0,8*	3,9 ± 1,7	3,8 ± 0,55	3,1 ± 0,5
HOMA- β	26,2 ± 9,9	14,1 ± 6,1*	17,1 ± 4,0	12,2 ± 1,9	12,1 ± 1,9
Colesterol total (mg/dl)	160,9 ± 23,3	326,6 ± 48,2*	297,3 ± 31,4	314,0 ± 51,3	327,8 ± 53,0
Triacilglicerol (mg/dl)	199,7 ± 43,1	335,6 ± 34,3*	327 ± 59,6	326,9 ± 61,1	323,5 ± 68,9

4.2.8 Avaliação da inflamação sistêmica e local

4.2.8.1 Contagem de leucócitos totais, células mononucleadas e neutrófilos

Animais alimentados com dieta HC apresentaram maior número de leucócitos e de células mononucleadas circulantes quando comparados aos controles (Figura 27 A e B). Os animais alimentados com dieta HC adicionada de diferentes doses do EBXA apresentaram menores valores para leucócitos totais e células mononucleadas, quando comparados ao seu controle HC. Os diferentes grupos não apresentaram alteração em relação ao número de neutrófilos (Figura 27 C).

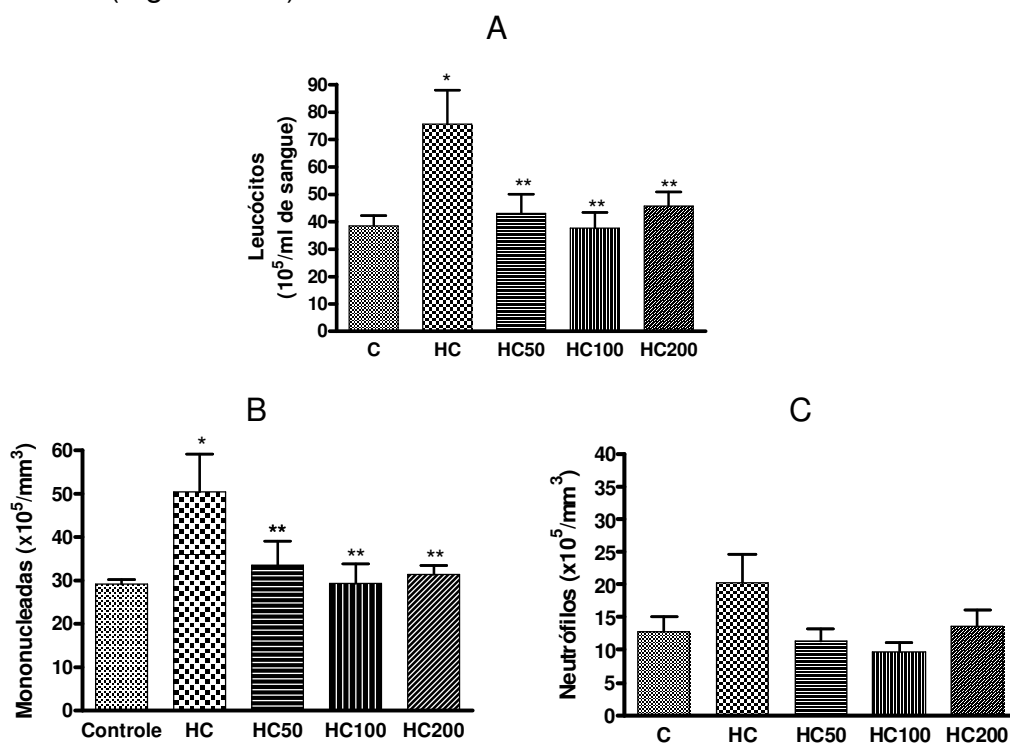


Figura 27 - Contagem total de leucócitos e diferencial: mononucleadas e neutrófilos. Animais alimentados com dieta controle (C), dieta rica em carboidrato (HC) e dieta HC acrescentada de 50 (HC50), 100 (HC100) e 200mg/kg de PC de EBXA (HC200). (A) Contagem de leucócitos totais do sangue retirado da cauda dos animais em câmara de Neubauer. (B-C) Contagem de células mononucleadas (B) e neutrófilos (C), realizado por meio da avaliação morfológica do esfregaço sanguíneo. As barras representam a média \pm erro padrão, n=8. *P<0,05 vs C, **P<0,05 vs HC.

4.2.8.2 Concentração de citocinas no tecido adiposo epididimal e hepático

As concentrações de citocinas foram determinadas no tecido adiposo epididimal e hepático. Os animais alimentados com a dieta HC apresentaram maiores valores de IL-10, IL-6 e TNF- α no tecido adiposo quando comparados aos animais controle (Figura 28 A, B e C). Os animais alimentados com dieta HC adicionados de diferentes concentrações de EBXA não apresentaram alterações nas concentrações das citocinas avaliadas no tecido adiposo, em relação aos animais HC.

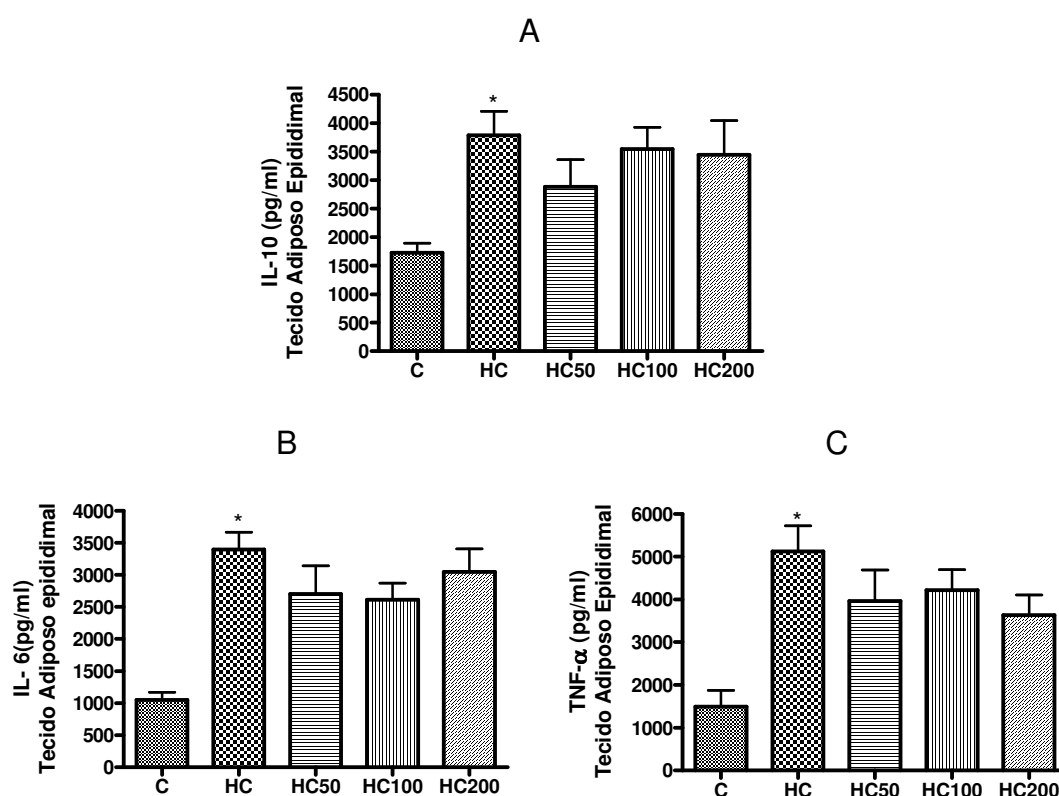


Figura 28 - Concentração de IL-6, TNF- α e IL-10 no tecido adiposo epididimal de camundongos. Animais alimentados com dieta controle (C), dieta rica em carboidrato (HC) e dieta HC acrescentada de 50 (HC50), 100 (HC100) e 200mg/kg de PC de EBXA (HC200). As barras representam a média \pm erro padrão, n=8. *P<0,05 vs C.

Os animais alimentados com a dieta HC também apresentaram maiores valores das citocinas inflamatórias TNF- α e IL-6 no fígado. Os animais suplementados com diferentes concentrações de EBXA apresentaram menores valores de IL-6 e TNF- α no fígado, quando comparados ao seu controle HC (Figura 29 A e B).

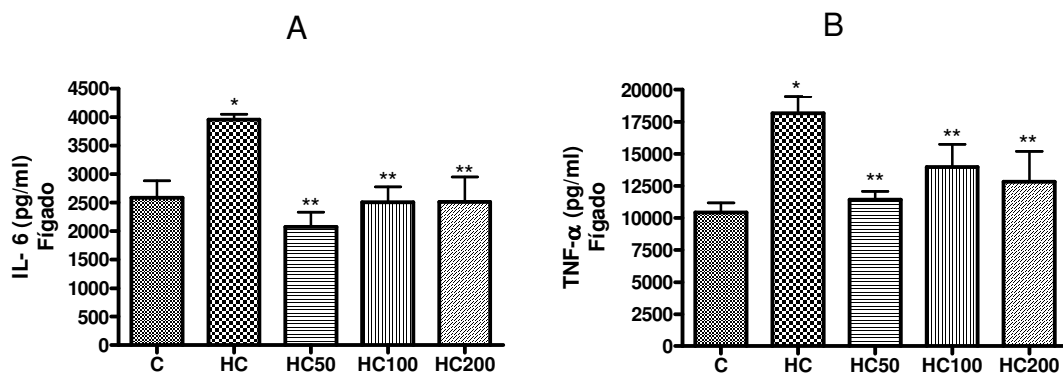


Figura 29 - Concentração de IL-6 e TNF- α no tecido hepático de camundongos. Animais alimentados com dieta controle (C), dieta rica em carboidrato (HC) e dieta HC acrescentada de 50 (HC50), 100 (HC100) e 200mg/kg de PC de EBXA (HC200). As barras representam a média \pm erro padrão, n=8. *P<0,05 vs C. **P<0,05 vs HC.

5. DISCUSSÃO

A alimentação em longo prazo com dieta HC, ou rica em lipídios (especialmente gordura saturada), está associada ao aumento de adiposidade e à excessiva produção de mediadores pró-inflamatórios, além de menor tolerância oral à glicose (FERREIRA et al., 2011; ESPOSITO et al., 2003; BRESSAN, 2009; LOTTENBERG, 2009). Corroborando com dados da literatura, no presente estudo, os animais alimentados com a dieta HC apresentaram alterações metabólicas, evidenciada pela menor tolerância oral à glicose, menor sensibilidade à insulina, maiores valores de leucócitos e células mononucleares circulantes, além de maior concentração de citocinas pró-inflamatórias no tecido adiposo e fígado assim como dislipidemia (FERREIRA et al., 2011; ESPOSITO et al., 2003).

Algumas evidências científicas atuais têm observado que não só a quantidade calórica ingerida, mas a natureza do macronutriente presente na dieta influencia na produção de citocinas pró-inflamatórias, na ação da insulina e no desenvolvimento das DANT's (FERREIRA et al., 2011; BRESSAN, 2009; LOTTENBERG, 2009). Quando se comparam os efeitos na saúde de diferentes dietas, é importante observar a natureza de todos os componentes presentes. Geralmente, a dieta padrão recebida pelos animais do grupo controle é fonte de fibras, contém carboidratos complexos e gorduras de fonte vegetal (THIGPEN et al., 2004). No presente estudo, a dieta HC foi composta pela ração padrão, acrescida de água, açúcar e leite condensado.

Maior adiposidade e hipertrofia dos adipócitos, evidenciado pelo aumento da área da célula adiposa, foram encontrados nos animais alimentados com a dieta HC em relação aos animais controle. Entretanto, não foi observado diferença no peso corporal e consumo alimentar entre os grupos. A maior adiposidade desses animais está relacionada, possivelmente, com a composição nutricional da dieta, rica em carboidratos refinados. O excesso de carbonos oriundos de carboidratos como glicose e frutose pode ser transformado em gordura, por meio do processo denominado lipogênese *de*

novo (PARKS, 2002). O aumento considerável da lipogênese (UYEDA et al., 2002) e da expressão de enzimas lipogênicas (DELZENE et al., 2001) acarreta no desenvolvimento de dislipidemias e no acúmulo de gordura corporal.

O tratamento da obesidade é complexo e multidisciplinar, e deve envolver mudança de hábitos alimentares. Não existe nenhum tratamento farmacológico em longo prazo que seja efetivo, sem envolver mudança de estilo de vida (ABESO, 2009). Contudo, sabe-se que a adesão a dietas é bastante variável. DIMATTEO (1994), por exemplo, relatou que 75% dos pacientes não seguem às recomendações médicas relacionadas às mudanças no estilo de vida. Assim, fornecer nutrientes e substâncias bioativas na forma de nutracêuticos ou fitoterápicos pode representar uma alternativa terapêutica interessante para auxiliar no tratamento e prevenção de doenças e alterações metabólicas relacionadas a maus hábitos alimentares.

A OMS, desde a década de 70, vem estimulando pesquisas de validação com as plantas medicinais e o desenvolvimento de extratos padronizados. A estratégia de utilizar várias substâncias de forma sinérgica, presentes nos extratos, se apresenta como uma nova abordagem terapêutica, visto que os processos patológicos são complexos e resultam da interação entre vários mediadores celulares. Além disso, extratos de plantas, ricos em substâncias bioativas, possuem o benefício de apresentarem menos efeitos colaterais que as substâncias sintéticas (ERNST, 2005). Muitos esforços passaram a ser empreendidos em todo o mundo, e também no Brasil, visando os estudos com as plantas medicinais e a promoção do seu uso adequado. A flora medicinal brasileira, devido à sua vasta biodiversidade, representa uma das mais promissoras fontes de substâncias bioativas, que podem ser utilizadas para o tratamento de diversas patologias (BRANDÃO et al., 2009; BROOKS et al., 2006).

As atividades emagrecedoras, hipolipidêmica, hipoglicêmica e antiinflamatória de diferentes extratos e substâncias bioativas, vêm sendo demonstradas em inúmeros estudos científicos de várias partes do mundo (KIM et al., 2011; BAHRAMIKIA & YAZDANPARAST, 2008; MURRAY et al., 2008; LEI et al.,

2007; WOO et al., 2007; HERRERA-ARELLANO et al., 2004; JORGE et al., 1998). Neste estudo, foi avaliado o potencial do extrato bruto dos frutos de *X. aromatica* (Lam.) Mart. (EBXA) no tratamento da obesidade e suas alterações metabólicas.

A pimenta-de-macaco (*Xylopia aromatica* (Lam.) Mart.), planta nativa do cerrado, é usada popularmente como condimento por apresentar odor semelhante à pimenta do reino (*Piper nigrum* L.) (SILVA & ROCHA, 1981). Aos seus frutos são atribuídas ainda propriedades afrodisíaca, estimulante e carminativa (CORRÊA, 1984). O potencial da planta é descrito desde o século XIX por naturalistas que percorreram o Estado de Minas Gerais (Saint-Hilaire, Spix & Martius). Apesar do uso tradicional por séculos, nenhum estudo havia sido feito, até o momento, visando avaliar as atividades biológicas dos frutos da planta.

As análises químicas dos frutos de *X. aromatica* por CCD, realizadas neste estudo, evidenciaram a presença de vários metabólicos secundários, incluindo ácidos fenólicos, flavonoides, saponinas, alcaloides e óleos essenciais. Esses resultados estão de acordo com o observado para plantas da família Annonaceae, incluindo espécies de *Xylopia*. Elas apresentam grande diversidade de constituintes químicos, principalmente, substâncias aromáticas, incluindo os terpenoides (monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos e triterpenos), além de flavonoides e alcaloides (EZEKWESILI et al., 2010; LEBOEUF et al., 1982).

Os resultados mostraram que o EBXA e as frações FACET e FABUT contém flavonoides (rutina) e ácidos fenólicos (ácidos clorogênico e caféico). A presença de substâncias fenólicas, inclusive flavonoides, já foi descrita em frutos de algumas espécies de *Xylopia* (BOUBA et al., 2010; EZEKWESILI et al., 2010; SILVA et al., 2009; SENA-FILHO et al., 2008; MOREIRA, 2003), e em folhas e cascas de *X. aromatica* (SILVA et al., 2010). Neste estudo, é descrita a presença destas substâncias nos frutos, pela primeira vez.

A CCD para saponinas em EBXA, FACET e FABUT, reveladas com reagente específico para substâncias terpênicas, apresentou manchas com Rfs de elevada polaridade, sugerindo a presença dessas substâncias. A presença de saponinas já foi observada em frutos de *X. aethiopica* (EZEKWESILI et al., 2010; MOREBISE et al., 1998). Nenhum estudo foi encontrado na literatura descrevendo a presença de saponinas nos frutos da espécie estudada.

A CCD também evidenciou a presença de alcaloides no EBXA e FABUT. A presença dessas substâncias foi confirmada também na fração preparada especificamente para obter os alcaloides, extraídos diretamente do fruto. Espécies de *Xylopi*a são conhecidas por possuírem alcaloides, principalmente do tipo isoquinolíquinos quaternários e bisbenzylisoquinolínicos, que estão presentes nas cascas, folhas e frutos destas plantas (EZEKWESILI et al., 2010; SILVA et al., 2009; MOREIRA et al., 2003; MARTINS, 1995). As principais atividades farmacológicas dessas substâncias são citotóxica e bactericida (CHEN et al., 1996). Alcaloides já foram identificados por CCD em frutos de *Xylopi*a *aromatica*, coletados no Maranhão (SILVA et al., 2010).

As substâncias aromáticas, incluindo terpenoides (monoterpenos, sesquiterpenos) são os constituintes químicos presentes nos frutos de *X. aromatica* mais bem estudados e caracterizados quimicamente. Neste estudo, o teor de óleo essencial extraído dos frutos (2,2%) foi semelhante ao valor encontrado por outros autores (SILVA & ROCHA, 1981). A análise por CCD do óleo essencial, através da comparação com Rfs de amostras referências, indicou a presença de mirceno, citronelol e cariofileno. Outras oito bandas foram detectadas na CCD, o que indica a possível presença de mais substâncias dessa classe. A análise química por CG/ EM confirmou a presença de mirceno e cariofileno, e evidenciou a presença do monoterpeno 4,5-dimetil-1-hexeno.

Mirceno e β -pineno apresentaram espectros de massas com IS semelhantes, no T_R 27,5min (pico 3). Este resultado, associado à identificação na CCD de bandas de coloração e Rfs semelhantes à amostra referência de mirceno, sugere que este componente integre o pico três (Figura 17). Ambos os

monoterpenos, mirceno e β -pineno, já foram identificados em frutos de *X. aromatica* e possuem massa molecular semelhante (ANDRADE et al., 2004; SILVA & ROCHA 1981), o que dificulta a separação completa das duas substâncias na amostra.

SILVA & ROCHA (1981) descreveram a presença de 17 componentes nos óleos essenciais dos frutos de *X. aromatica*, e identificaram sete substâncias predominantes: limoneno, citronelol, α -pineno, β -pineno, ocimeno, mirceno e carvona. Outros estudos com frutos de *Xylopia* spp. também encontraram uma grande variedade de óleos essenciais (ANDRADE et al., 2004; STASHENKO et al., 2004). No cromatograma para o HEXA (lote 1) os picos não se apresentaram tão bem definidos, o que pode indicar a não separação e identificação de algumas substâncias voláteis. Como exemplo, tem-se o citronelol, evidenciado na CCD, mas não identificado na CG/ EM. Sugere-se também que o limoneno, óleo essencial mais abundante presente nos frutos de *X. aromatica*, segundo outros autores (ANDRADE et al., 2004; SILVA & ROCHA, 1981), pode ser um dos componentes dos picos 10 a 13, não identificados pela CG/ EM.

A variação na composição de óleos essenciais e de outras substâncias bioativas em plantas da mesma espécie pode ser decorrente da época de coleta da planta, local e condições de cultivo, idade da planta, entre outros fatores que contribuem para a formação ou não de determinados metabólitos (SIMÕES et al., 1999). Deve-se considerar que a caracterização dos óleos essenciais da planta foi realizada a partir do extrato hexânico dos frutos de *X. aromatica*. A análise por CG/ EM dos óleos essenciais obtidos por hidrodestilação representa uma opção para melhor caracterização dos óleos essenciais.

É curioso observar que, na análise do HEXA (lote 1) por CG/ EM, além da identificação de óleos essenciais, foi também detectada a presença de ésteres metílicos de ácidos graxos, mesmo sem nenhum tratamento prévio da amostra. Para realizar a análise de ácidos graxos deve ser aplicado procedimento de esterificação, onde eles são convertidos em substâncias mais voláteis, como os

seus ésteres metílicos. Este procedimento é necessário também para reduzir a adsorção de solutos no suporte e superfície da coluna e melhorar a separação das substâncias (JHAM et al., 1982).

Para obtenção do perfil de ácidos graxos da amostra, o HEXA (lote 2) foi submetido a esterificação para posterior análise por CG. Os ácidos graxos majoritários encontrados foram o oléico (40,26%) e o linoléico (35,13). Outros componentes, presentes em menores proporções foram os ácidos graxos palmítico (17,68%), esteárico (5,5%) e linolênico (1,8%). Pode-se observar que o cromatograma obtido através da CG/ EM para o HEXA 2 apresentou picos bem definidos e as substâncias encontradas apresentaram maiores índices de similaridade, em comparação com os dados dos padrões de referência disponíveis na biblioteca do sistema.

Ao comparar os resultados de GC/ EM entre os HEXA (lote 1) e HEXA (lote 2), observa-se concordância na identificação do ácido oléico, linoléico e palmítico. Porém, no HEXA (lote 1) também foram observadas, em pequenas proporções, a presença do ácido caprótico, ácido ciclopentano undecanóico, 3,6-ácido octadecadiinóico, mas não foi identificado o ácido linolênico e esteárico. Sabe-se que o procedimento de esterificação pode afetar os resultados devido a vários fatores, incluindo perda de ésteres metílicos de cadeia curta e muito volátil e mudanças na composição dos ácidos graxos durante a esterificação (SHANTA & NAPOLITANO, 1992; BRONDZ, 2002). Possivelmente, por não estarem na forma de ester metílico, os ácidos graxos esteárico e linolênico não foram detectados no HEXA (lote 1). Outra hipótese é que estes ácidos integrem os picos 10 a 13, não identificados pela CG/ EM.

DOSOMU & OCHU (1995) verificaram que a fração oleosa dos frutos de *X. aromatica* que ocorre na África apresentava predominância de ácidos graxos saturados. EZEKWESILI et al. (2010) verificaram elevada porcentagem de ácidos graxos insaturados nos frutos de *X. aethiopica* originários da Nigéria, com predominância de ácido oléico (39,12%), e linoléico (25,98%) e menor proporção de linolênico (1,10%). Os ácidos graxos esteárico (4,54%) e palmítico (19,21%) apresentaram também proporção semelhante à encontrada

neste estudo. ELHASSAN et al. (2009), apesar de ter encontrado predominância do ácido oléico e quantidades também similares de ácidos graxos saturados nos frutos de *X. aethiopica* provenientes do Sudão, não observou quantidades consideráveis de ácido linoléico. De fato, conforme discutido anteriormente, as condições climáticas, idade da planta entre vários outros fatores podem interferir na composição química da planta (SIMÕES et al., 1999).

O ácido capróico e o ácido octadecadiinóico, além de ácidos graxos cíclicos, como o ciclopentano ácido undecanóico, foram detectados nos frutos de *X. aromatica*. Eles estão presentes também em óleos de algumas espécies vegetais (KUMAR, 2011; SUDHA et al., 2011; BAJPAI et al., 2008). Entretanto, na literatura, não foi encontrado nenhum estudo que descrevesse a presença desses três ácidos graxos nos frutos de *Xylopia*. Durante o aquecimento de óleos vegetais, sob condições semelhantes às utilizadas para a extração de solvente, pode ocorrer formação de ácidos graxos contendo anéis ciclopentano ou ciclohexano, formados a partir do ácido linoléico e linolênico, o que pode explicar a identificação do ciclopentano ácido undecanóico no extrato hexânico do fruto (SEBEDIO & GRANDGIRARD, 1989). É possível também que a presença de ésteres metílicos no HEXA (lote 1), discutida anteriormente, seja decorrente do processo de obtenção e manipulação da amostra.

Para avaliar o potencial dos frutos de *X. aromatica* sobre parâmetros metabólicos característicos da obesidade, o EBXA foi suplementado à dieta HC. A adição do extrato melhorou a tolerância oral à glicose e, na maior dose consumida, a sensibilidade à insulina dos animais. Além disso, os animais que se alimentaram do extrato apresentaram redução de células imunes circulantes e citocinas pró-inflamatórias no fígado.

Apesar de ser observado melhora metabólica e inflamatória nos animais que receberam o extrato, os mesmos não apresentaram alteração no peso corporal, ingestão alimentar e adiposidade quando comparados aos animais alimentados somente com a dieta HC. Entretanto, observou-se que os animais alimentados com todas as doses de extratos apresentaram adipócitos menores,

característicos da ocorrência de hiperplasia celular. A expansão da massa adiposa ocorrida na obesidade é determinada pelo tamanho do adipócito (hipertrofia) ou do seu número (hiperplasia) (QUEIROZ et al., 2009). O aumento do tamanho dos adipócitos não é um processo ilimitado. Quando a célula adiposa atinge a capacidade máxima de armazenamento de gordura, novas células são recrutadas, os pré-adipócitos. A substituição de células hipertróficas por adipócitos jovens pode criar um ambiente metabólico mais favorável, por apresentarem maior sensibilidade à insulina (OKUNO et al., 1998). Os adipócitos hipertrofiados desencadeiam aumento de AGLs e citocinas pró-inflamatórias no plasma, que irão atuar em outros órgãos e tecidos, como o músculo e fígado, aumentando a resistência à insulina também nestes sítios (CHAWLA et al., 2011; GREGOR & HOTAMISLIGIL, 2011). Na literatura tem sido demonstrado que alguns extratos de plantas diminuem o tamanho dos adipócitos em animais obesos e diabéticos o que conseqüentemente, promove melhora no metabolismo lipídico e da glicose (ALMEIDA, 2011; KIM et al., 2011; KRISANAPUN et al., 2011; CHUNG et al., 2010).

Os animais alimentados com a dieta HC apresentaram também menor tolerância oral à glicose e menor sensibilidade à insulina na oitava e 12^a semana de experimento. Esta alteração pode ser explicada pela inflamação sistêmica e local, evidenciada pelo maior número de células imunes circulantes (leucócitos e células mononucleadas) e das citocinas TNF- α e IL-6, observados no fígado e tecido adiposo dos animais alimentados com a dieta HC. A resistência à insulina está relacionada com o aumento de citocinas pró-inflamatórias, juntamente com o aumento na produção de radicais livres, em resposta aos excessos de ácidos graxos circulantes e de glicose no plasma. Os radicais livres, o TNF- α e IL-6 ativam o fator de transcrição nuclear NF- κ B que estimulará maior transcrição de citocinas pró-inflamatórias, prejudicando a ação intracelular da tirosina quinase e o adequado processo de sinalização celular da insulina (SCHENK et al., 2008; WELLEN & HOTAMISLIGIL, 2005; HIROSUMI et al., 2002). Além disso, o aumento destas citocinas prejudica a ação da insulina em inibir a neoglicogênese, contribuindo para o aumento da produção de glicose pelo fígado (SALTIEL & KAHN, 2001).

Diversos estudos têm demonstrado que o aumento da adiposidade, induzida por dieta, desencadeia alterações no metabolismo de lipídios e carboidratos (WAKI & TONTONOZ, 2007; COENEN & HASTY, 2007) associadas a um perfil pró-inflamatório sistêmico e em sítios metabólicos importantes como o fígado e tecido adiposo (HOTAMISLIGIL, 2003; FERREIRA et al., 2011; POWELL, 2007; SPEAKMAN et al., 2007). Entretanto, foram encontrados também maiores valores de IL-10, citocina de perfil antiinflamatório, no tecido adiposo dos animais alimentados com dieta HC. Apesar da obesidade ser classicamente considerada um estado pró-inflamatório, estudos demonstraram que citocinas antiinflamatórias, como a IL-10, apresenta concentrações sanguíneas aumentadas em humanos e animais obesos. Esses achados sugerem que o tecido adiposo, na tentativa de regular a resposta inflamatória global, também produz fatores antiinflamatórios (JUGE-AUBRY et al., 2005; ESPOSITO et al., 2003).

A metainflamação, característica da obesidade, pode também ser caracterizada por maior número de células imunes circulantes (PEARSON et al., 2003). A contagem total de leucócitos e de monócitos tem sido considerada marcadores inflamatórios independentes para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares (AFIUNE-NETO et al., 2006). Os monócitos recrutados para os tecidos, por meio da estimulação da CCL2, diferenciam-se em macrófagos. Os macrófagos são considerados os principais responsáveis pela produção de TNF- α no sítio inflamatório. Nos tecidos, o aumento da produção de TNF- α induz a produção de proteínas pró-inflamatórias, como o IL-6, CCL2, além de intensificar a produção TNF- α pelas células destes tecidos (WEISBERG et al., 2003; HIRAI et al., 2010; YU et al., 2006). No presente estudo, animais alimentados com dieta HC apresentaram maiores valores de leucócitos totais circulantes e células mononucleadas. Esses dados correlacionam-se com a hipertrofia dos adipócitos e com os maiores valores de TNF- α e IL-6 observados no tecido adiposo dos animais alimentados com dieta HC. De fato, adipócitos hipertrofiados estimulam o recrutamento de monócitos para o tecido adiposo que amplificam a resposta inflamatória (SCHENK et al., 2008; GREENBERG & OBIN, 2006; WELLEN & HOTAMISLIGIL, 2003).

Os animais alimentados com dieta HC suplementada com três doses de EBXA apresentaram menor número de leucócitos totais e células mononucleadas circulantes. Estudo *in vitro* que avaliou ação do extrato de *Melilotus officinalis*, mostrou efeito inibidor sobre a produção de leucócitos (LUMINIT et al., 2002). Nesse estudo, o efeito sobre a produção de leucócitos foi atribuído ao conteúdo de polifenóis do extrato. Os polifenóis presentes em *Eriobotrya japonica* (TAKUMA et al., 2008) e *Theobroma cacao* (SELMI et al., 2006) foram associados à redução da ativação de leucócitos para sítios de inflamação.

Apesar do tamanho dos adipócitos estarem reduzidos nos animais alimentados com o EBXA, não foi observada diferença nas concentrações das citocinas IL-6 e TNF- α no tecido adiposo, após adição de diferentes doses do extrato à dieta HC. Entretanto, os animais que receberam o EBXA apresentaram atenuação na secreção de citocinas pró-inflamatórias no fígado, quando comparados aos animais alimentados com dieta HC. Da mesma forma que os macrófagos no tecido adiposo aumentam a secreção de mediadores pró-inflamatórios, a ativação de vias inflamatórias nas células de kuppfer correlaciona-se à resistência à insulina vista na obesidade (SCHENK et al., 2008). Por outro lado, quando ocorre inibição de NF- κ B no hepatócito e, conseqüentemente, menor secreção de citocinas pró-inflamatórias, observa-se melhora na sensibilidade hepática à insulina (CAI et al., 2005).

A suplementação na dieta HC com todas as doses do extrato apresentou melhora na tolerância oral à glicose dos animais e a suplementação na maior dose também resultou em maior sensibilidade à insulina. Esse resultado pode estar associado à redução da inflamação sistêmica e hepática, evidenciada por menor número de células imunes circulantes (leucócitos e células mononucleadas) e menor concentração das citocinas inflamatórias, IL-6 e TNF- α , no fígado.

Plantas medicinais são muito utilizadas no tratamento do diabetes, principalmente em países em desenvolvimento, onde o tratamento convencional é de alto custo. Várias evidências científicas comprovaram o

efeito benéfico de extratos dessas plantas aumentando, inclusive a sensibilidade à insulina (CHUANG et al., 2010; LIU et al., 2010; SOLOMON & BLANNIN, 2009; BRYANS et al., 2007). Para elucidar os mecanismos de ação dos extratos das plantas é de fundamental importância identificar quais as substâncias químicas presentes nos mesmos e indicar quais seriam as possíveis responsáveis pelos efeitos benéficos observados.

A análise química dos frutos de *X. aromatica* indicou a presença de diferentes substâncias bioativas, além de ácidos graxos monoinsaturados e poliinsaturados. Sabe-se que esses componentes são deficientes na dieta ocidental, caracterizada por excesso de carboidratos refinados, gorduras saturada e pobre em alimentos de origem vegetal (GERALDO & ALFENAS, 2008). Dessa forma, o uso do fruto de *X. aromatica* na forma *in natura* ou sob a forma de extrato poderia enriquecer a dieta, atualmente pobre em fitoquímicos.

Os flavonoides têm sido considerados potenciais agentes antidiabéticos, com ação hipoglicêmica e antihiperlipidêmica, mimetizando e estimulando a secreção da insulina (CHUANG et al., 2009; MARTÍNEZ, 2009; WU et al., 2009; JUNG et al., 2006). Vários mecanismos de ação são propostos (CAZAROLLI et al., 2008). Sugere-se, por exemplo, que esses componentes têm o potencial de modificar a atividade de enzimas intracelulares, incluindo tirosina quinase, proteína quinase C, fosfatidil-inositol-3-quinase (PI3K) e proteína quinase regulada pelo extracelular (MAPK), resultando em aumento do transporte de glicose estimulada por insulina no músculo e tecido adiposo (NOMURA et al., 2008; BAZUINE et al., 2005). Outro mecanismo de ação proposto seria a capacidade de indução da expressão de PPAR γ por tais substâncias (GOTO et al., 2010; TAKAHASHI et al., 2003). Através da ativação da expressão de PPAR γ , os flavonoides inibiriam a inflamação associada à obesidade e, conseqüentemente, melhorariam a sensibilidade à insulina (KARSTEN, 2008; CASTRILLO & TONTONNOZ, 2004).

As substâncias fenólicas identificadas no EBXA por meio da CCD foram a rutina e o ácido clorogênico. A quercetina está presente em abundância em alimentos vegetais como maçã, cebola, chá e vinho, sendo encontrada nos

alimentos principalmente na forma glicosídica (rutina). A rutina tem efetiva ação antioxidante e na redução do estresse oxidativo no plasma e fígado, e atividade antiinflamatória também tem sido atribuída a este flavonoide (PANCHAL et al., 2011; WU et al., 2009). Em ratos com artrite, a rutina inibiu a produção de citocinas pró-inflamatórias (KAUSS et al., 2008, GUARDIA et al., 2001).

No presente estudo, apesar da melhora na tolerância oral dos animais suplementados com o EBXA e da sensibilidade à insulina nos animais alimentados com a maior dose do extrato, não houve alteração na concentração de insulina e glicose de jejum. Este resultado pode ser atribuído, em parte, aos flavonoides presentes no extrato (CAZAROLLI et al., 2008; NDONG et al., 2007). Outros estudos também mostraram que extratos vegetais podem apresentar resposta positiva relativa à tolerância oral à glicose, mas não na glicemia de jejum (AKASE et al., 2011; ZANG et al., 2011; MANG et al., 2006). Em concordância com os resultados encontrados, a administração oral de extrato de *Punica granatum* em ratos diabéticos não alterou os valores da glicemia de jejum, mas reduziu a glicose pós-prandial. Os autores sugerem que o extrato da planta pode ter potencial terapêutico na hiperglicemia pós-prandial em diabéticos tipo II, pelo menos em parte, pela inibição da atividade da enzima α -glicosidase (LI et al., 2005). Estudo realizado por SOTILLO & HADLEY (2002) com ratos obesos, verificou que a infusão intravenosa de ácido clorogênico não promoveu a manutenção da hipoglicemia, mas reduziu significativamente a resposta glicêmica à sobrecarga de glicose. Os autores sugeriram que o ácido clorogênico não estimulou a liberação da insulina, mas agiu como agente anti-hiperglicêmico, com ação similar a de drogas como a metformina, que aumentam a sensibilidade à insulina e não a sua liberação.

A maior quantidade de substâncias bioativas na dieta HC200 poderia explicar a melhora na sensibilidade à insulina, que foi observada somente neste grupo de animais. SOLOMON & BLANNIN (2009) verificaram que a suplementação oral com canela (*Cinnamomum* sp.), planta rica em substâncias fenólicas, melhorou a tolerância oral a glicose em homens saudáveis, já no primeiro dia de suplementação. Eles observaram também que a melhora na sensibilidade à insulina foi tardia, verificada apenas no 14^a dia de tratamento. Sugere-se que a

maior sensibilidade à insulina dos animais alimentados com dieta HC200 seja atribuída às substâncias fenólicas presentes no extrato. Conforme já citado, essas substâncias podem mimetizar a ação da insulina.

A presença de substâncias fenólicas no EBXA pode estar relacionada também com a redução de citocinas com perfil pró-inflamatório no fígado. Substâncias fenólicas são antioxidantes, e estudos relacionam o consumo de alimentos ricos nessas substâncias na redução do estresse oxidativo, inclusive no fígado. De fato, a menor produção de radicais livres está associada à menor estimulação nuclear de proteínas pró-inflamatórias, que induzem maior expressão de TNF- α e IL-6 (WELLEN & HOTAMISLIGIL, 2005). A suplementação com folhas de alcachofra (*Cynara scolymus* L.), rica em substâncias fenólicas, incluindo o ácido clorogênico e caféico, em ratos alimentados com dieta rica em colesterol, por exemplo, reduziu o estresse oxidativo no fígado dos animais (KÜÇÜKGERGIN et al., 2010). Outro estudo também verificou que a suplementação de rutina, em animais alimentados com dieta rica em carboidrato e lipídios, resultou em maior tolerância oral à glicose e melhora de outras alterações metabólicas induzidas pela dieta. Os autores consideraram que a melhora dos parâmetros metabólicos avaliados no estudo estava associado à redução de marcadores de estresse oxidativo e inflamação no fígado e tecido cardíaco (PANCHAL et al., 2011).

A melhora das alterações metabólicas observadas nos animais alimentados com o EBXA pode estar também relacionada com a presença de óleos essenciais. KARIOTI et al. (2004) verificou que óleos essenciais de frutos de gênero *Xylopi*a apresentam atividade antioxidante. Outros estudos também associaram a presença de óleos essenciais em extratos de plantas com melhora no metabolismo da glicose. TALPUR et al. (2005) verificou que a suplementação oral de uma combinação de óleos essenciais, obtidos de várias especiarias, melhorou a tolerância oral à glicose e reduziram a glicemia de animais diabéticos. A melhora no metabolismo lipídico e da glicose em ratos diabéticos suplementados com *Melissa officinalis* foi também atribuída aos óleos essenciais e flavonoides presentes na planta. Esse mesmo estudo mostrou que a suplementação com o extrato induziu a expressão de PPAR γ no

tecido adiposo destes animais (CHUNG et al., 2010). De fato, alguns flavonoides e terpenoides têm sido descritos como agonistas seletivos de PPAR γ (CHUANG et al., 2010; CHUNG et al., 2010; GOTO et al., 2010; DEMBINSKA-KIEC et al., 2008; JUNG et al., 2006).

Acredita-se que substâncias químicas provenientes de fontes vegetais que atuam como ligantes de PPAR γ podem exercer ações positivas na etiologia da obesidade e alterações metabólicas associadas, incluindo efeitos antidiabéticos e antiinflamatórios (HIRAI et al., 2010; SEYMOUR et al., 2009). O PPAR γ possui papel fundamental na diferenciação de adipócitos, além de atuar como repressor da expressão de genes inflamatórios (CASTRILLO & TONTONNOZ, 2004). Sugere-se a possibilidade de algumas substâncias químicas presentes no EBXA serem ligantes de PPAR γ , uma vez que foi evidenciada modulação da hipertrofia dos adipócitos dos animais suplementados com o extrato, melhora na sensibilidade à insulina e redução da inflamação sistêmica.

A resistência à insulina e a disfunção das células β -pancreáticas têm sido associadas à patogênese do diabetes tipo II (SONG et al., 2007). Os índices HOMA-IR e HOMA- β avaliam, respectivamente, a resistência à insulina e a função das células β -pancreáticas, por meio de fórmulas matemáticas que consideram os valores de glicose e insulina de jejum (MATTHEWS, 1985). Os animais HC apresentaram maior HOMA-IR e menor HOMA- β que os animais controle. A adição do EBXA nas diferentes dosagens não apresentou alteração nestes parâmetros. Diante disso, a partir dos índices HOMA, não é possível afirmar que os animais que receberam o extrato apresentaram melhor resistência à insulina e células β -pancreáticas mais funcionantes. Deve-se considerar que estes índices correlacionam glicose e insulina de jejum, parâmetros que não apresentaram alteração entre os grupos HC e HC adicionado de diferentes concentrações de EBXA. Assim, sugere-se que provavelmente as substâncias presentes no extrato potencializaram a ação da insulina o que resultou na melhora na tolerância oral à glicose dos animais que receberam o extrato.

Outras alterações comuns na obesidade são as relacionadas ao metabolismo de lipídios. Os animais alimentados com dieta HC apresentaram maiores valores séricos de colesterol total e triglicérides. A dislipidemia é um achado comum em indivíduos com sobrepeso e obesos e está intimamente relacionada ao desenvolvimento de complicações cardiovasculares, como aterosclerose (KLEEMANN et al., 2010; NGUYEN et al., 2008). A própria glicose, por ser convertida a acetil-CoA através da via glicolítica, estimula a lipogênese uma vez que a mesma pode ser um substrato para tal processo. Além disso, a glicose plasmática estimula a lipogênese por aumentar a liberação de insulina (POLACOW & LANCHÁ-JUNIOR, 2007; KERSTEN et al., 2001). Após adição de diferentes doses de EBXA não foi observada alteração no metabolismo lipídico dos animais.

Em discordância com os resultados encontrados NWOSO et al. (2011) verificaram que ratos com hipercolesterolemia tratados com extrato de *X. aethiopica*, na dosagem de 250mg/kg de PC, durante oito semanas, apresentaram redução no colesterol total e triglicérides. Os autores atribuíram os resultados ao β -sitosterol.

Estudos que avaliaram o efeito de diferentes dosagens (entre 50 e 500mg/kg de PC) de uma mistura de extratos, entre eles dos frutos de *X. aethiopica* em animais diabéticos, atribuíram os efeitos hipoglicemiantes e hipolipidêmicos observados aos polifenóis e esteróis presentes nas plantas (OGBONNIA et al., 2010; OGBONNIA et al., 2008). No entanto, o EBXA não apresentou ação no metabolismo lipídico e na glicemia de jejum.

A toxicidade dessa mistura de extratos também foi avaliada por OGBONNIA et al. A maior dosagem (500mg/kg de PC) foi associada a maiores valores de creatinina e das enzimas hepáticas aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT). Estes resultados sugerem que doses elevadas levam a um comprometimento da função renal e hepática. Já nas menores doses, estas alterações não foram observadas. O presente estudo utilizou dosagens inferiores, sendo observado efeito positivo na tolerância oral à glicose dos animais, na menor dose de extrato utilizada. De fato, somente após a

realização de testes farmacológicos, toxicológicos, pré-clínicos e clínicos com resultados positivos, o uso de plantas medicinais na prática médica deve ser preconizada (SAAD et al., 2009).

Alcaloides do tipo isoquinolínicos já foram identificados em folhas, cascas e frutos de espécies de *Xylopia* (EZEKWESELI et al., 2010; SILVA et al., 2009; NISHIYAMA et al., 2004; MOREIRA et al., 2003). Alcaloides isoquinolínicos obtidos de outras fontes apresentam atividade antiinflamatória em vários modelos experimentais, por exemplo, a berberina (YOUSAF et al., 2004; KUPALI et al., 2002; ZHOU & MINESHITA, 2000). Além disso, a piperina e capsaicina, alcalóides presentes na pimenta-do-reino e pimenta-vermelha, respectivamente, apresentaram resposta positiva na obesidade, via modulação da resposta inflamatória, diminuindo a secreção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias como IL-6, TNF- α e CCL-2 (KANG et al., 2010; WOO et al., 2007). Entretanto, estudos que avaliaram as atividades hipolipidêmica, hipoglicêmica e antioxidante dos frutos de *Xylopia*, não atribuíram os resultados encontrados a presença de alcaloides e sim, aos compostos fenólicos e esteróis presentes no extrato testado (NWOSO et al., 2011; BOUBA et al., 2010; OGBONNIA et al., 2008, 2010).

O resultado do perfil de ácidos graxos do HEXA indica que os frutos de *X. aromatica* podem ser uma importante fonte de gorduras monoinsaturadas e poliinsaturadas. O maior consumo de ácidos graxos insaturados, em substituição aos lipídios saturados, representa fator protetor para o desenvolvimento de doenças inflamatórias e cardiovasculares (SALA-VILA et al., 2011; KENNEDY et al., 2009; BAER et al., 2004). O maior consumo de ácido oléico, em detrimento da gordura saturada, está relacionado a menores marcadores de inflamação e resistência à insulina (SALA-VILA et al., 2011; MARTÍNEZ-GONZÁLEZ & BES-RASTROLLO, 2006; BAER et al., 2004). É possível, no entanto, que os efeitos biológicos observados no presente estudo, após suplementação com EBXA, não estejam relacionados aos ácidos graxos insaturados. Os lipídios são macronutrientes energéticos e estão presentes em quantidades elevadas na dieta quando comparado às substâncias bioativas, que não possuem valor nutricional (ROSADO & MONTEIRO, 2001). A

quantidade dessas substâncias presentes no EBXA, e adicionada à ração dos animais, foi extremamente baixa. Se considerarmos, por exemplo, que a maior dose de EBXA consumida foi de 6mg/ dia, e que desta quantidade menos de 50% é constituída de ácidos graxos (Tabela 2), pode-se inferir que a quantidade total destas substâncias consumida pelos animais é mínima, ou seja, menos de 0,06% do total da dieta. Desta forma, sugere-se que as substâncias bioativas presentes no extrato sejam as responsáveis pelo resultado obtido.

A análise química do EBXA evidenciou a presença de várias classes de substâncias bioativas, incluindo flavonoides, óleos essenciais, alcaloides e possivelmente saponinas. No presente estudo, EBXA promoveu maior tolerância oral à glicose observada nos animais que receberam as três doses do extrato, maior sensibilidade à insulina observada nos animais alimentados com HC200, e redução do número de células imunes circulantes e da produção de citocinas pró-inflamatórias no fígado. Estudos mostram que alguns extratos de plantas, ao reduzirem a produção de radicais livres, inibem o recrutamento de células inflamatórias para os tecidos (THAMBI et al., 2009; SELMI et al., 2006; RÓDENAS et al., 2000) e que a modulação da resposta inflamatória relaciona-se com a redução das alterações metabólicas induzidas por dieta (PANCHAL et al., 2011; SELMI et al., 2006). Os resultados evidenciam que as atividades biológicas observadas neste estudo são devidas ao conjunto de todas as substâncias presentes no EBXA. A identificação exata das substâncias bioativas responsáveis pelos efeitos observados exige a realização de novos estudos.

6. CONCLUSÃO

Os resultados revelam que os frutos de *X. aromatica* contém substâncias bioativas capazes de modular alterações metabólicas associadas à obesidade, em especial as relacionadas ao metabolismo da glicose. O efeito positivo na tolerância oral à glicose e na sensibilidade à insulina dos animais que receberam dieta HC sugere o potencial da planta na atenuação da resistência à insulina, comumente presente na obesidade. Esse efeito pode ser atribuído, pelo menos em parte, a redução de células imunes circulantes e a menor concentração de citocinas de perfil inflamatório no fígado. Os resultados sugerem que o extrato dos frutos de *X. aromatica* representam um potencial recurso terapêutico para o tratamento da intolerância à glicose, induzida por dieta.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABESO (Associação Brasileira para Estudo da Obesidade e da Síndrome Metabólica). Diretrizes brasileiras de obesidade 2009/2010. *Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade e Síndrome Metabólica*. 3. ed. São Paulo: AC Farmacêutica, 2009. 83p.

ADA (American Diabetes Association). The prevention or delay of type 2 diabetes (Position Statement). *Diabetes Care.*, v.27, p.47-54, 2004.

AFIUNE-NETO, A.; MANSUR, A.P.; AVAKIAN, S.D.; EVERLY, P.S.G.; GOMES, J.A.F.R. Monocitose é um marcador de risco independente para a doença arterial coronariana. *Arq. Bras. Cardiol.*, v.86, n.3, p.240-244, 2006.

AKASE, T.; SHIMADA, T.; TERABAYASHI, S.; IKEYA, Y.; HIROMI SANADA, H.; ABURADA, M. Antiobesity effects of *Kaempferia parviflora* in spontaneously obese type II diabetic mice. *J. Nat. Med.*, v.65, p.73–80, 2011.

ALMEIDA, J.M.A. Potencial das folhas de *Rudgea viburnoides* (Cham.) Benth (Rubiaceae) no tratamento da obesidade e suas alterações metabólicas induzidas por dieta em camundongos Balb/c. Belo Horizonte: Faculdade de Farmácia da UFMG, 2011. 119p. (Dissertação, Mestrado em Ciências).

ALONSO, J. *Curso anual de Alimentos Funcionales y Nutraceuticos*. Asoc. Argentina de Fitomedicina. Bs. Aires, Argentina, 2009.

ANDRADE, E.H.A.; SILVA, A.C.M.; MAIA, J.G.S.; CARREIRA, L.M.M.; OLIVEIRA, J. Essential oil composition from leaf, fruit and flower of *Xylopiá aromática* (Lam.) Mart. *J. Essent. Oil Bear. Plants.*, v.7, p.151-154, 2004.

ANGELO, P.M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos: uma breve revisão. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, v.66, p.232-240, 2007.

ARAÚJO, L.M.B.; BRITTO, M.M.S.; CRUZ, T.R.P. Tratamento do Diabetes Mellitus do Tipo 2: Novas Opções. *Arq. Bras. Endocrinol. Metab.*, v.44, n.6, 2000.

ARTERBURN, L.M.; HALL, E.B.; OKEN, H. Distribution, interconversion, and dose response of n-3 fatty acids in humans. *Am. J. Clin. Nutr.*, v.83, Suppl.6, p. S1467-S1476, 2006.

BADIMON, L.; VILAHUR, G.; PADRO, T. Nutraceuticals and atherosclerosis: human trials. *Cardiovascul. Therapeut.*, v.28, p.202-215, 2010.

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 crossover study. *Am. J. Clin. Nutr.*, v.79, n.6, p.969-973, 2004.

BAHRAMIKIA, S.; YAZDANPARAST, R. Effect of hydroalcoholic extracts of *Nasturtium officinale* leaves on lipid profile in high-fat diet rats. *J. Ethnopharmacol.*, v.115, p.116-121, 2008.

BAILEY, C.J. Treating insulin resistance: future prospects. *Diab. Vasc. Dis. Res.*, v.4, n.1, p.20-31, 2007.

BAJPAI, V.K.; DUNG, N.T.O.; JUN KWON, J.; KANG, S.C. Analysis and the potential applications of essential oil and leaf extracts of *Silene armeria* L. to control food spoilage and food-borne pathogens. *Eur. Food Res. Technol.*, v.227, p.1613–1620, 2008.

BALDÉ, N.M.; YOULA, A.; BALDÉ, M.D.; KAKÉ, A.; DIALLO, M.M.; BALDÉ, M.A.; MAUGENDRE, D. Herbal medicine and treatment of diabetes in Africa: an example from Guinea. *Diabetes Metab.*, v.32, n.2, p.171-175, 2006.

BASTOS, D.H.M.; ROGERO, M.M.; AREAS, J.A.G. Mecanismos de ação de compostos bioativos dos alimentos no contexto de processos inflamatórios relacionados à obesidade. *Arq. Bras. Endocrinol. Metab.*, v.53, n.5, p.646-656, 2009.

BAZUINE, M.; VAN DEN BROEK, P.J.A.; MAASSEN, J.A. Genistein directly inhibits GLUT4-mediated glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes. *Bioch. Biophys. Resear. Communicat.*, v.326, n.2, p.511-514, 2005.

BHAVSAR, S.K.; SINGH, S.; GIRI, S.; JAIN, M.R.; SANTANI, D.D. Effect of saponinas from *Helicteres isora* on lipid and glucose metabolism regulating genes expression. *J. Ethnopharmacol.*, v.124, p.426–433, 2009.

BLÜHER, M.; FASSHAUER, M.; TÖNJES, A.; KRATZSCH, J.; SCHÖN, M.R.; PASCHKE, R. Association of interleukin-6, C-reactive protein, interleukin-10 and adiponectin plasma concentrations with measures of obesity, insulin sensitivity and glucose metabolism. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes*, v.133, n.9, p.534-537, 2005.

BORGI, W.M.C.; RECIO, J.L.; RÍOS, N.C. Anti-inflammatory and analgesic activities of flavonoid and saponin fractions from *Zizyphus lotus* (L.) Lam. *S. Afr. J. Bot.*, v.74, n.2, p.320-324, 2008.

BOUBA, A.A.; NJINTANG, N.Y.; SCHER, J.; MBOFUNG, C.M.F. Phenolic compounds and radical scavenging potential of twenty camerronian species. *Agr. Biol. J. N. Am.*, v.1, n.3, p.213-224, 2010.

BRAM, I. Complications of obesity with special reference to high blood pressure; report on 125 cases. *Med. Rec.*, v.160, n.6, p.350-353, 1947.

BRANDÃO, M.G.L.; COSENZA, G.P.; GRAEL, C.F.F.; NETTO-JR, N.L.; MONTE-MÓR, R.L.M. Tradicional uses of American plant species from the 1st edition of Brazilian Official Pharmacopoeia. *Rev. Bras. Farmacogn.*, v.19, n.2A, p.478-487, 2009.

BRAVO L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutrition significance. *Rev. Nutr.*, v.56, n.11, p.317-333, 1998.

BRESSAN, J.; HELEN, H.M.; HERMSDORFF, H.H.M; ZULET, M.A.; MARTÍNEZ; J.A. Impacto hormonal e inflamatório de diferentes composições dietéticas: ênfase em padrões alimentares e fatores dietéticos específicos. *Endocrinol. Metab.*, v.53, n.5, p.572-581, 2009.

BRONDZ, I. Development of fatty acid analysis by high-performance liquid chromatography, gas chromatography, and related techniques. *Anal. Chim. Acta.*, v.465, p.1-37, 2002.

BROOKS, T.M.; MITTERMEIER, R.A.; FONSECA, G.A.B.; GERLACH, J.; HAFFMANN, M.; LAMOREUX, J.F.; MITTERMEIER, C.G.; PILGRIM, J.D.; RODRIGUES, A.S.L. Global Biodiversity Conservation Priorities. *Sci.*, v.313, n.5783, p.58-61, 2006.

BRUNETON, J. *Elementos de fitoquímica y de farmacognosia*. Zaragoza: Acribia, 1991. 594p.

BRUUN, J.M.; LIHN, A.S.; PEDERSEN, S.B.; RICHELSEN, B. Monocyte chemoattractant protein-1 release is higher in visceral than subcutaneous human adipose tissue (AT): implication of macrophages resident in the AT. *J. Clin. Endocr. Metab.*, v.90, n.4, p.2282–2289, 2005.

BRYANS, J.A.; JUDD, P.A.; ELLIS, P.R. The effect of consuming instant black tea on postprandial plasma glucose and insulin concentrations in healthy humans. *J. Am. Coll. Nutr.*, v.26, n.5, p.471-477, 2007.

CAI, D.; YUAN, M.; FRANTZ, D.F.; MELENDEZ, P.A.; HANSEN, L.; LEE, J.; SHOELSON, S.E. Local and systemic insulin resistance resulting from hepatic activation of IKK-beta and NF-kappaB. *Nat. Med.*, v.11, n.2, p.183-190, 2005.

CALDER, P.C. Long-chain n-3 fatty acids and inflammation: potential application in surgical and trauma patients. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, v.36, p.433-446, 2003.

CANDIDO, L.M.B.; CAMPOS, A.M. Alimentos funcionais. Uma revisão. *Boletim da SBCTA*. v.29, n.2, p.193- 203, 2005.

CARRATU, E.; SANZINI, E. Sostanze biologicamente attive presenti negli alimenti di origine vegetable. *Ann. Ist. Super Sanità*, v.41, n.1, p.7-16, 2005.

CASTRILLO, A.; TONTONOZ, P. Nuclear receptors in macrophage biology: at the crossroads of lipid metabolism and inflammation. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, v.20, p.455-480, 2004.

CAZAROLLI, L.H.; ZANATTA, L.; ALBERTON, E.H.; FIGUEIREDO, M.S.; FOLADOR, P.; DAMAZIO, R.G.; PIZZOLATTI, M.G.; SILVA, F.R. Flavonoids: cellular and molecular mechanism of action in glucose homeostasis. *Mini. Rev. Med. Chem.*, v.8, n.10, p.1032-1038, 2008.

CEFALU, W.T.; YE, J.; WANG, Z. Efficacy of Dietary Supplementation with Botanicals on Carbohydrate Metabolism in Humans. *Endoc. Metabol. & Imm. Disor. Drug Targets*, v.8, p.78-81, 2008.

CHAWLA, A.; NGUYEN, K.D.; GOH, Y.P.S. Macrophage-mediated inflammation in metabolic disease. *Nat. Rev. Immunol.*, v.11, p.738-749, 2011.

CHEN, F.; THOLL, D.; BOHLMANN, J.; PICHERSKY, E. The family of terpene synthases in plants: a mid-size family of genes for specialized metabolism that is highly diversified throughout the kingdom. *Plant J.*, v.66, p.212–229, 2011.

CHEN, K.S.; KO, F.N.; TENG, C.W.; WU, Y.C. Antiplatelet and vasorelaxing actions of some aporphinoids, *Planta Med.*, v.62, p.133-136, 1996.

CHUANG, C.C.; MARTINEZ, K.; XIE, G.; KENNEDY, A.; BUMRUNGPET, A.; OVERMAN, A.; JIA, W.; MCINTOSH, M.K. Quercetin is equally or more effective than resveratrol in attenuating tumor necrosis factor- α -mediated inflammation and insulin resistance in primary human adipocytes. *Am. J. Clin. Nutr.*, v.96, n.6, p.1511-1521, 2010.

CHUEH, W.H.; LIN, J.Y. Protective effect of isoquinoline alkaloid berberine on spontaneous inflammation in the spleen, liver and kidney of non-obese diabetic mice through downregulating gene expression ratios of pro-/anti-inflammatory and Th1/Th2 cytokines. *Food Chem.*, v.131, p.1263–1271, 2012.

CHUNG, M.J.; CHO, S.Y.; BHUIYAN, M.J.; KIM, K.H.; LEE, S.J. Anti-diabetic effects of lemon balm (*Melissa officinalis*) essential oil on glucose- and lipid-regulating enzymes in type 2 diabetic mice. *Br. J. Nutr.*, v.104, n.2, p.180-188, 2010.

COLMAN-SAIZARBITORIA, T.; ZAMBRANO, J.; FERRIGNI, N.R.; GU, Z.M.; NG, J.H.; SMITH, D.L.; MCLAUGHLIN, J.L. Bioactive Annonaceous acetogenins from the bark of *Xylopiia aromatica*. *J. Nat. Prod.*, v.57, n.4, p.486-493, 1994.

COENEN, K.R.; HASTY, A.H. Obesity potentiates development of fatty liver and insulin resistance, but not atherosclerosis, in high-fat diet-fed agouti LDLR-deficient mice. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, v.293, p.E492–E499, 2007.

CORRÊA, M.P. *Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas*. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, v.5, 1984. 478p.

CUNHA, F.M.; FRÖDE, T.S.; MENDES, G.L.; MALHEIROS, A.; CECHINEL – FILHO, V.; YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B. Additional evidence for the antiinflammatory and anti-allergic properties of the sesquiterpene polygodial. *Life Sci.*, v.70, n.2, p.159-169, 2001.

CURAT, A.C.; MIRANVILLE, A.; SENGENÈS, C.; DIEHL, M.; TONUS, C.; BUSSE, R.; BOULOUMIE, A. From Blood Monocytes to Adipose Tissue–Resident Macrophages: Induction of Diapedesis by Human Mature Adipocytes. *Diabetes.*, v.53, p.1285-1292, 2004.

DATAPLANT. Banco de dados de amostras de plantas aromáticas, medicinais e tóxicas da UFMG. Disponível em: <<http://www.dataplant.org.br/bd2.php?id=9>>. Acesso em: 20 jul. 2010.

DELZENNE, N.; FERRE, P.; BEYLOT, M.; DAUBIOUL, C.; DECLERQ, B.; DIRAISON, F. Study of the regulation by nutrients of the expression of genes involved in lipogenesis and obesity in humans and animals. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.*, v.11, p.118-121, 2001.

DEMBINSKA-KIEC, A.; MYKKÄNEN, O.; KIEC-WILK, B.; MYKKÄNEN, H. Antioxidant phytochemicals against type 2 diabetes. *Br. J. Nutr.*, v.99, p.109-117, 2008.

DIAS, M.C. *Estudos taxonômicos do gênero Xylopia L. (Annonaceae) do Brasil extra-amazônico*. Campinas: Instituto de Biologia da UNICAMP, 1988. 78p. (Dissertação, Mestrado em Ciências Biológicas).

DIMATTEO, M.R. The physician-patient relationship: effects on the quality of health care. *Clin. Obstet. Gynecol.*, v.37, p.149-161, 1994.

DINDA, B.; DEBNATH, S.; MOHANTA, B.C.; HARIGAYA, S. Naturally occurring triterpenoid saponins. *Chem. & Biodiv.*, v.7, p.2327-2580, 2010.

DOSOMU, M.I.; OCHU, C. Physicochemical properties and fatty acid composition of lipids extracted from some Nigerian fruits and seeds. *Global J. Pure Appl. Sci.*, v.1, n.1-2, p.45-50, 1995.

DUBUQUOY, L.; ROUSSEAU, C.; THURU, X.; PEYRIN-BIROULET, L.; ROMANO, O.; CHAVATTE, P.; CHAMAILLARD, M.; DESREUMAUX, P. PPAR γ as a new therapeutic target in inflammatory bowel diseases. *Gut.*, v.55, n.9, p.1341-1349, 2006.

EKUNDAYO, O. A Review of the volatiles of the Annonaceae. *J. Essent. Oil Res.*, v.1, n.5, p.223-245, 1989.

ELHASSAN, I.A.; ELAMIN, E.E.; AYOUB, S.M.H. Characterization of Lipid Compounds of the Dried Fruits of *Xylopi aethiopica* (Dunal) A. Rich Growing in Sudan. *Pakistan J. Nutr.*, v.8, n.10, p.1592-1595, 2009.

ERDEN, I.M.; KAHRAMAN, A. The protective effect of flavonol quercetin against ultraviolet a induced oxidative stress in rats. *Toxicology*, v.23, n.154, p.21-29, 2000.

ERNST, E. The efficacy of herbal medicine - an overview. *Fundam. Clin. Pharm*, v.19, p.405-409, 2005.

ESPOSITO, A.; PONTILLO, F.; GIUGLIANO, F.; GIUGLIANO, G.; MARFELLA, R.; NICOLETTI, G.; GIUGLIANO, D. Association of low interleukin-10 levels with the metabolic syndrome in obese women. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, v.88, p.1055-1058, 2003.

ESPOSITO, K.; NAPPO, F.; GIUGLIANO, F.; DI PALO, C.; CIOTOLA, M.; BARBIERI, M. Meal modulation of circulating interleukin 18 and adiponectin concentrations in healthy subjects and in patients with type 2 diabetes mellitus. *Am. J. Clin. Nutr.*, v.78, p.1135-1140, 2003.

EZEKWESILI, C.N.; NWODO, O.F.C.; ENEH, F.U.; OGBUNUGAFOR, H.A. Investigation of the chemical composition and biological activity of *Xylopi aethiopica* Dunal (Annonaceae). *Afr. J. Biotechnol.*, v.9, n.43, p.7352-7356, 2010.

FANTUZZI, G. Adipose tissue, adipokines, and inflammation. *J. allergy clin. immunol.*, v.115, n.5, p.911-919, 2005.

FARMACOPEIA BRASILEIRA, Brasil. 5 ed. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, v.2, 546p., 2010.

FERREIRA, A.V.M.; MARIO, E.G.; PORTO, L.C.J.; ANDRADE, S.P.; BOTION, L.M. High-carbohydrate diet selectively induces tumor necrosis factor- α production in mice-liver. *Inflammation.*, v.34, n.2, p.1139-1345, 2011.

FENNEMA, O. R. *Food Chemistry*. 3. ed. New York: Marcel Dekker, 1996.

FERRO, D. *Fitoterapia: conceitos clínicos*. São Paulo: Atheneu, 2008.

FRANCIS, G.; KEREM, Z.; MAKKAR, H.P.; BECKER, K. The biological action of saponins in animal systems: a review. *Br. J. Nutr.*, v.88, n.6, p.597-605, 2002.

GARAMBONE, E.; ROSA, G. Possíveis benefícios do ácido clorogênico à saúde. *Alim. Nutr.*, v.18, n.2, p.229-235, 2007.

GARCÍA, A. A.; CARRIL, E.P.U. Metabolismo secundário de plantas. *REDUCA*, v.2, n.3, p.119-145, 2009.

GARCÍA-LAFUENTE, A.; GUILLAMÓN, E.; VILLARES, A.; ROSTAGNO, M.A.; MARTÍNEZ, J.A. Flavonoids as anti-inflammatory agents: implications in cancer and cardiovascular disease. *Inflamm .Res.*, v.58, n.9, p.537-552, 2009.

GERALDO , J.M.; ALFENAS, R.C.G. Papel da dieta na prevenção e no controle da inflamação crônica - evidências atuais. *Arq. Bras. Endocrinol. Metab.*, v.52 n.6, p.951-967, 2008.

GOTO, T.; TAKAHASHI, N.; HIRAI, S.; KAWADA, T. Various terpenoids derived from herbal and dietary plants function as PPAR modulators and regulate carbohydrate and lipid metabolism. *PPAR Res.*, v.2010, p.1-9, 2010.

GREENBERG, A.S.; OBIN, M. Obesity and the role of adipose tissue in inflammation and metabolism. *Am. J. Clin. Nutr.*, v.83, p.S461-S465, 2006.

GREGOR, M.F.; HOTAMISLIGIL, G.S. Inflammatory Mechanisms in Obesity. *Annu. Rev. Immunol.*, v.29, p.415–445, 2011.

GUARDIA, T.; ROTELLI, A.E.; JUAREZ, A.O.; PELZER, L.E. Anti-inflammatory properties of plant flavonoids. Effects of rutin, quercetin and hesperidin on adjuvant arthritis in rat. *Farmacol.*, v.56, n.9, p.683–687, 2001.

HERRERA-ARELLANO, A.; AGUILAR-SANTAMARÍA, L.; GARCÍA-HERNÁNDEZ, B.; NICASIO-TORRES, P.; TORTORIELLO, J. Clinical trial of *Cecropia obtusifolia* and *Marrubium vulgare* leaf extracts on blood glucose and serum lipids in type 2 diabetics. *Phytomedicine.*, v.11, p.561-566, 2004.

HIRAI, S.; TAKAHASHI, N.; TSUYOSHI, G.; LIN, S.; UEMURA, T.; YU, R.; KAWADA, T. Functional food targeting the regulation of obesity-induced inflammatory responses and pathologies. *Mediators Inflamm.*, v.2010, p.1-8, 2010.

HIROSUMI, J.; TUNCMAN, G.; CHANG, L.; GÖRGÜN, C.Z; K. UYSAL, T.H; MAEDA, K.; KARIN, M; HOTAMISLIGIL, G.S. A central role for JNK in obesity and insulin resistance. *Nature.*, v.420, p.333-336, 2002.

HOSSAIN, P.M.D.; BISHAR KAWAR, B.M.D.; NAHAS, M. Obesity and diabetes in the developing world - a growing challenge. *N. Engl. J. Med.*, v.356, n.3, p.213-215, 2007.

HOTAMISLIGIL, G.S. Inflammation and metabolic disorders. *Nature.*, v.444, p. 860–867, 2006.

HOTAMISLIGIL, G.S.; SHARGILL, N.S.; SPIEGELMAN, B.M. Adipose expression of tumor-necrosis-factor-alpha – direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science.*, v.259, n.5091, p.87-91, 1993.

HOTTA, K.; FUNAHASHI, T.; ARITA, Y.; TAKAHASHI, M.; MATSUDA, M.; OKAMOTO, Y.; IWAHASHI, H.; KURIYAMA, H.; OUCHI, N.; MAEDA, K.; NISHIDAM, K.S.; SAKAI, N.; NAKAJIMA, T.; HASEGAWA, K.; MURAGUCHI, M.; OHMOTO, Y.; NAKAMURA, T.; YAMASHITA, S.; HANAFUSA, T.; MATSUZAWA, Y. Plasma Concentrations of a Novel, Adipose-Specific Protein, Adiponectin, in Type 2 Diabetic Patients. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, v.20, p.1595-1599, 2000.

HUNGENHOLTZ, J.; SMID, E. J. Nutraceutical production with food-grade microorganisms. *Curr. Opinion in Biotechnol.*, v.13, p.497-507, 2002.

IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). Pesquisa de orçamentos Familiares 2008-2009: desnutrição cai e peso das crianças brasileiras ultrapassa padrão internacional. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia_visualiza.php?id_noticia=1699&id_pagina=1>. Acesso em: 10 set. 2010.

IBRAHIM, M.A.; KAINULAINEN, P.; AFLATUNI, A.; TIILIKKALA, K.; HOLOPAINEN, J.K. Insecticidal, repellent, antimicrobial activity and phytotoxicity of essential oils: with special reference to limonene and its suitability for control of insect pests. *Agric. Food Sci. Finland.*, v.10, p.243-259, 2001.

INADERA, H. The usefulness of circulating adipokine levels for the assessment of obesity-related health problems. *Int. j. med. sci.*, v. 5, n. 5, p. 248-62, 2008.

JHAM, G.N.; TELES, F.F.F.; CAMPOS, L.G. Use of aqueous HCl/MeOH as esterification reagent for analysis of fatty acids derived from soybean. *J. Am. Oil. Chem. Soc.*, v.59, n.3, p.132-133, 1982.

JORGE, P.A.R.; NEYRA, L.C.; OSAKI, R.M.; ALMEIDA, E.; BRAGAGNOLO, N. Efeito da berinjela sobre os lípidos plasmáticos, a peroxidação lipídica e a reversão da disfunção endotelial na hipercolesterolemia experimental. *Arq. Bras. Cardiol.*, v.70, p.87-91, 1998.

JOYAL, S.V. A Perspective on the Current Strategies for the Treatment of Obesity. *Curr. Drug Targets CNS Neurol. Disord.*, v.3, p.341-356, 2004.

JUGE-AUBRY, C.E.; SOMM, E.; PERNIN, A.; ALIZADEH, N.; GIUSTI, V.; DAYER, J.M.; MEIER, C.A. Adipose tissue is a regulated source of interleukin-10. *Cytokine*, v.29, n.6, p.270-274, 2005.

JUNG, U.J.; LEE, M.K.; PARK, Y.B.; KANG, M.A.; CHOI, M.S. Effect of citrus flavonoids on lipid metabolism and glucose-regulating enzyme mRNA levels in type-2 diabetic mice. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, v.38, n.7, p.1134-1145, 2006.

KANG, J-H.; TSUYOSHI, G.; HAN, I-S.; KAWADA, T.; KIM, Y.M.; YU, R. Dietary capsaicin reduces obesity-induced insulin resistance and hepatic steatosis in obese mice fed a high-fat diet. *Obes.*, v.18, p.780-787, 2010.

KARIOTI, A.; HADJIPAVLOU-LITINA, D.; MENSAH, M.L.K.; FLEISCHER, T.C.; SKALTSA, H. Composition and antioxidant activity of the essential oils of *Xylopiya aethiopica* (Dun) A. Rich. (Annonaceae) leaves, stem bark, root bark, and fresh and dried fruits, growing in Ghana. *J. Agric. Food Chem.*, v.52, n.26, p.8094-8098, 2004.

KARSTEN, S. Peroxisome proliferator activated receptors and lipoprotein metabolism. *PPAR Res.*, v.2008, p.1-11, 2008.

KASAI, H.; FUKADA, S.; YAMAIZUMI, Z.; SUGIE, S.; MORI, H. Action of chlorogenic acid in vegetables and fruits as an inhibitor of 8-hydroxydeoxyguanosine formation *in vitro* and in rat carcinogenesis model. *Food Chem. Toxicol.*, v.38, n.5, p.467-471, 2000.

KAUSS, T.; MOYNET, D.; RAMBERT, J.; AL-KHARRAT, A.; BRAJOT, S.; THIOLAT, D.; ENNEMANY, R.; FAWAZ, F.; MOSSALAYI, M.D. Rutoside decreases human macrophage-derived inflammatory mediators and improves clinical signs in adjuvant-induced arthritis. *Arthritis Res. Ther.*, v.10, n.1, R.19, 2008.

KELLEY, W.H. Portal cirrhosis in the obese. *Southern Med. J.*, v.39, n.12, p.978-981, 1946.

KENNEDY, A.; MARTINEZ, K.; CHUANG, C.C.; LAPOINT, K.; MCINTOSH, M. Saturated fatty acid-mediated inflammation and insulin resistance in adipose tissue: mechanisms of action and implications. *J. Nutr.*, v.139, n.1, p.1-4, 2009.

KERSTEN, S. Mechanisms of nutritional and hormonal regulation of lipogenesis. *EMBO reports*, v.21, n.41, p.282-286, 2001.

KIM, H.J.; KANG, H.J.; SEO, J.Y.; LEE, C.H.; KIM, Y-S.; KIM, J-S. Antiobesity effect of oil extract of ginseng. *J. Med. Food*, v.14, n.6, p.573–583, 2011.

KLEEMANN, R.; VAN ERK, M.; VERSCHUREN, L.; VAN DEN HOEK, A.M.; KOEK, M.; WIELINGA, P.Y.; JIE, A.; PELLIS, L.; BOBELDIJK-PASTOROVA, I.; KELDER, T.; TOET, K.; WOPEREIS, S.; CNUBBEN, N.; EVELO, C.; VAN OMMEN, B.; KOOISTRA, T. Time-resolved and tissue-specific systems analysis of the pathogenesis of insulin resistance. *PLoS One.*, v.5, n.1, p.e8817, 2010.

KRISANAPUN, C.; LEE, S.H.; PEUNGVICHA, P.; TEMSIRIRIRKKUL, R.; BAEK, S.J. Antidiabetic activities of *Abutilon indicum* (L.) sweet are mediated by enhancement of Adipocyte differentiation and activation of the GLUT1 promoter. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.*, v.2011, Article ID 167684, p.1-9, 2011.

KROMHOUT, D.; GILTAY E.J.; GELEIJNSE, J.M. N-3 fatty acids and cardiovascular events after myocardial infarction. *N. Engl. J. Med.*, v.363, p.2015–2026, 2010.

KÜÇÜKGİRGİN, C.; AYDIN, A.F.; ÖZDEMİRLER-ERATA, G.; MEHMETÇİK, G.; KOÇAK-TOKER, N.; UYSAL, M. Effect of artichoke leaf extract on hepatic and cardiac oxidative stress in rats fed on high cholesterol diet. *Biol. Trace Elem. Res.*, v.135, n.1-3, p.264-274, 2010.

KUMAR, D.S.; BANJI, D.; HARANI, A. A medicinal plants survey for treatment of obesity. *J. Pharm. Res.*, v.4, n.3, p.597-600, 2011.

KUMAR, N.S. Variability in Coconut (*Cocos nucifera* L.) Germplasm and Hybrids for Fatty Acid Profile of Oil. *J. Agr. Food Chem.*, v.59, n.24, p.13050-13058, 2011.

KUPELİ, E.; KOSAR, M.; YESİLADA, E.; BASER, K.H.C; BASER, C. A comparative study on the anti-inflammatory, antinociceptive and antipyretic effects of isoquinoline alkaloids from the roots of turkish berberis species. *Life Sci.*, v.72, p.645-657, 2002.

LAHOZA, C.; MOSTAZAA, J.M. Atherosclerosis as a systemic disease. *Rev. Esp. Cardiol.*, v.60, p.184-195, 2007.

LAMPE, J.W. Spicing up a vegetarian diet: chemopreventive effects of phytochemicals. *Am. J. Clin. Nutr.*, v.78, p.579–583, 2003.

LEBOEUF, M.; CAVÉ, A.; BHAUMIK, P. K.; MUKHERJEE, B.; MUKHERJEE, R. The phytochemistry of the Annonaceae. *Phytochemistry.*, v.21, p.2783-2813, 1982.

LEI, F.; ZHANG, X.N.; WANG, W.; XING, D.M; XIE, W.D.; SU, H.; DU, L.J. 2007. Evidence of anti-obesity effects of the pomegranate leaf extract in high-fat diet induced obese mice. *Int. J. Obesity.*, v.31, p.1023-1029, 2007.

LIMA, F.E.L.; MENEZES, T.N.; TAVARES, M.P.; SZARFARC, S.C.; FISBERG, R.M. Ácidos graxos e doenças cardiovasculares: uma revisão. *Rev. Nutr.*, v.13, n.2, p.73-80, 2000.

LI, Y.; WEN, S.; KOTA, B.P.; PENG, G.; LI, G.Q.; YAMAHARA, J.; ROUFOGALIS, B.D. *Punica granatum* flower extract, a potent α -glucosidase inhibitor, improves postprandial hyperglycemia in Zucker diabetic fatty rats. *J. Ethnopharmacol.*, v.99, p.239-244, 2005.

LIU, I.M.; TZENG, T.F.; LIOU, S.S. *Abelmoschus moschatus* (MALVACEAE), an aromatic plant, suitable for medical or food uses to improve insulin sensitivity. *Phytother. Res.*, v.24, p.233-239, 2010.

LIU, Y.T.; LU, B.N.; LI-NA, X.U., YIN, L.H.; WANG, X.N.; PENG, J.Y.; LIU, K.X. The antioxidant activity and hypolipidemic activity of the total flavonoids from the fruit of *Rosa laevigata* Michx. *Natural Science*, v. 2, n.3, p.175-183, 2010.

LOPEZ-GARCIA, E.; SCHULZE, M.B.; MANSON, J.E.; MEIGS, J.B.; ALBERT, C.M.; RIFAI, N.; WILLETT, W.C., HU, F.B. Consumption of (n-3) fatty acids is related to plasma biomarkers of inflammation and endothelial activation in women. *J. Nutr.*, v.134, n.7, p.1806-1811, 2004.

LOTTENBERG, A.M.P. Importância da gordura alimentar na prevenção e no controle de distúrbios metabólicos e da doença cardiovascular. *Arq. Bras. Endocrin. Metab.*, v.53, n.5, p.595-607, 2009.

LU, H.L.; WANG, H.W.; WEN, Y.; ZHANG, M.X.; LIN, H.H. Roles of adipocyte derived hormone adiponectin and resistin in insulin resistance of type 2 diabetes. *World J. Gastroenterol*, v.21, n.12, p.1747-1751, 2006.

LUCA, C.; OLEFSKY, J.M. Inflammation and insulin resistance. *FEBS Lett.*, v.582, n.1, p.97-105., 2008.

LUMENG, C.N.; JENNIFER, L.B.; SALTIEL, A.R. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *J. Clin. Invest.*, v.117, n.1, p.175-184, 2007.

LUMENG, C.N.; SALTIEL, A.R. Inflammatory links between obesity and metabolic disease. *J. Clin. Invest.*, v.126, p. 2111–2117, 2011.

LUMINIT, P.; PÂRVU, A.E.; PÂRVU, M.; TAAMAS, M.; BUIA, R.; PUIA, M. Effects of *Melilotus officinalis* on Acute Inflammation. *Phytother. Res.*, v.16, p.316-319, 2002.

MAAS, P.J.M.; KAMER, H.M.V.; JUNIKKA, L.; MELLO-SILVA, R.; RAINER, H. Annonaceae from central-eastern Brazil. *Rodriguésia*, v.52, p.65-98, 2001.

MAAS, P.; RAINER, H.; LOBÃO, A. Annonaceae *in* Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2010. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2010/FB110557>>. Acesso em: 20 set. 2011.

MAIA, J.G.S.; ANDRADE, E.H.A.; SILVA, A.C.; OLIVEIRA, J.; CARREIRA, L.M.M. Araújo, J.S. Leaf volatile oils from four Brazilian *Xylopi*a species. *Flav. Frag. J.*, v.20, p.474-747, 2005.

MANACH, C.; SCALBERT, A.; MORAND, C.; RÉMÉSY, C.; JIMÉNEZ, L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.*, v.79, n.5, p.727-747, 2004.

MANG, B.; WOLTERS M.; SCHMITT, B.; KELB, K.; LICHTINGHAGEN, R.; STICHTENOTH, D.O.; HANH, A. Effects of a cinnamon extract on plasma

glucose, Hba, and serum lipids in diabetes mellitus type 2. *Eur. J. Clin. Invest.*, v.36, p.340-344, 2006.

MANIGRASSO, M.R.; FERRONI, P.; SANTILLI, F.; TARABORELLI, T.; GUAGNANO, M.T.; MICHETTI, N.; DAVI, G. Association between circulating adiponectin and interleukin-10 levels in android obesity: effects of weight loss. *JCEM*, v.90, n.10, p.5876–5879, 2006.

MARTÍNEZ-GONZÁLEZ, M.A., BES-RASTROLLO, M. The cardioprotective benefits of monounsaturated fatty acid. *Altern. Ther. Health. Med.*, v.12, n.1, p.24-30, 2006.

MARTINS, D.; ALVARENGA, M.A.; ROQUE, N.; FELICIO, J. Diterpenes and alkaloids from brasilian xylopia species. *Quim. Nova*, v.18, n.1, p.14-16, 1995.

MATTHEWS, D.R.; HOSKER, J.P.; RUDENSKI, A.S.; NAYLOR, B.A.; TREACHER, D.F.; TURNER, R.C. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetol.*, v.28, p.412-419, 1985.

MESQUITA, M.L.; PAULA, J.E.; PESSOA, C.; MORAES, M.O.; LOTUFO, L.V.C.; GROUGNET, R.; MICHELD, S.; TILLEQUIND, F.; LAILA SALMEN ESPINDOLA, L.S. Cytotoxic activity of Brazilian Cerrado plants used in traditional medicine against cancer cell lines. *J. Ethnopharmacol.*, v.123, p.439–445, 2009.

MINK, P.J.; SCRAFFORD, C.G.; BARRAJ, L.M.; HARNACK, L.; HONG, C.P.; JENNIFER, A.N.; JACOBS, D.R. Flavonoid intake and cardiovascular disease mortality: a prospective study in postmenopausal women. *Am. J. Clin. Nutr.*, v.85, p.895–909, 2007.

MOKDAD, A.H. My personal perspective on the obesity epidemic. *Soz. Praventivmed.*, v.48, n.3, p.143-144, 2003.

MORAES, F.P.; COLLA, L.M. Alimentos funcionais e nutracêuticos: definições, Legislação e benefícios à saúde. *Rev. Eletr. Farm.*, v.3, n.2, p.109-122, 2006.

MORAES, M.P.L.; ROQUE, N.F. Diterpenes from the fruits of *Xylopia aromatica*. *Phytochemistry.*, v.27, n.10, p.3025-3028, 1988.

MOREBISE, O.; FAFUNSO, M.A. Antimicrobial and phytotoxic activities of Saponin extracts from two Nigerian Edible medicinal plants. *Biokemistry.*, v.8, n.2, p.69-77, 1998.

MOREIRA, I.C.; LAGO, J.H.G.; ROQUE, N.F. Alkaloid, flavonoids and terpenoids from leaves and fruits of *Xylopia emarginata* (Annonaceae). *Biochem. system. ecol.*, v.31, p.535-537, 2003.

MOREIRA, I.C.; ROQUE, N.F.; CONTINI, K.; LAGO, J.H.G. Sesquiterpenos e hidrocarbonetos dos frutos de *Xylopiya emarginata* (Annonaceae). *Rev. bras. farmacogn.*, v.17, p.55-58, 2007.

MOZAFFARIAN, D. Does alpha-linolenic acid intake reduce the risk of coronary heart disease? A review of the evidence. *Altern. Ther. Health. Med.*, v.11, p.24 - 30, 2005.

MOZAFFARIAN, M.D.D.; WU, J.H.Y. Omega-3 Fatty Acids and Cardiovascular disease. Effects on risk factors, molecular pathways, and clinical events. *J. Am. Coll. Cardiol.*, v.58, n.20, p. 2047-2067, 2011.

MURRAY, C.D.R.; ROUX, C.W.L.; EMMANUEL, A.V.; HALKET, J.M.; PRZYBOROWSKA, A.M.; KAMM, M.A.; MURRAY-LYON, I.M. The effect of Khat (*Catha edulis*) as an appetite suppressant is independent of is independent of ghrelin and PYY secretion. *Appetite.*, v.51, n.3, p.747-750, 2008.

NACZK, M.; SHAHIDI F. Extraction and analysis of phenolics in food. *J. Chromatogr. A.*, v.1054, p.95-111, 2004.

NEPA (Núcleo de estudos e Pesquisa em alimentação). Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TACO). 4. ed. São Paulo: UNICAMP. Disponível em: <[http:// www.unicamp.br/nepa/taco](http://www.unicamp.br/nepa/taco)>. Acesso em: 20 dez. 2011.

NDONG, M.; UEHARA, M.; KATSUMATA, S.I.; SUZUKI, K. Effects of oral administration of *Moringa oleifera* Lam on glucose tolerance in Goto-Kakizaki and Wistar rats. *J. Clin. Biochem Nutr.*, v.40, n.3, p.229–233, 2007.

NGUYEN, N.T.; MAGNO, C.P.; LANE, K.T.; HINOJOSA, M.W.; LANE, J.S. Association of hypertension, diabetes, dyslipidemia, and metabolic syndrome with obesity: findings from the National Health and Nutrition Examination Survey, 1999 to 2004. *J. Am. Coll. Surgeons*, v.207, n.6, p.928-934, 2008.

NISHIYAMA, Y.; MORIYASU, M.; ICHIMARU, M.; IWASA, K.; KATO, A.; MATHENGE, S.G.; MUTISO, P.B.C.; JUMA, F.D. Quaternary isoquinoline alkaloids from *Xylopiya parviflora*. *Phytochemistry.*, v.65, n.7, p.939-944, 2004.

NOGUEIRA, L.J.; MONTANARI, C.A.; DONNICIA, C.L. Histórico da evolução da química medicinal e a importância da lipofilia: de Hipócrates e Galeno a Paracelsus e as contribuições de Overton e de Hansch. *Rev. Virtual Quim.*, v.1, n.3, p.227-240, 2009.

NOMURA, D.K.; BLANKMAN, J.L.; SIMON, G.M.; FUJIOKA, K.; ISSA, R.S.; WARD, A.M.; CRAVATT, B.F.; CASIDA, J.E. Activation of the endocannabinoid system by organophosphorus nerve agents. *Nat. Chem. Biol.*, v.4, p.373–378, 2008.

NWOZO, S.O.; OROJOBI, B.F.; ADARAMOYE, O.A. Hypolipidemic and antioxidant potentials of *Xylopiya aethiopyca* seed extract in hypercholesterolemic rats. *J. Med. Food.*, v.14, p.114-119, 2011.

OGBONNIA, S. O.; MBAKA, G.O.; ADEKUNLE, A.; ANYIKA, E.N.; NGBOLADE, O.E.; NWAKAKWA, N. Effect of a poly-herbal formulation, *Okudiabet*, on alloxan- induced diabetic rats. *Agric. Biol. J. N. Am.*, v.1, n.2, p.139-145, 2010.

OGBONNIA, S.; ADEKUNLE, A.A.; BOSA, M.K.; ENWURU, V.N. Evaluation of acute and subacute toxicity of *Alstonia congensis* Engler (Apocynaceae) bark and *Xylopiya aethiopyca* (Dunal) A. Rich (Annonaceae) fruits mixtures used in the treatment of diabetes. *Afr. J. Biotechnol.*, v.7, n.6, p.701-705, 2008.

OGDEN, C.C.; CARROLL, M.D.; CURTIN, L.R.; LAMB, M.M.; FLEGAL, K.M. Prevalence of High Body Mass Index in US Children and Adolescents, 2007-2008. *JAMA.*, v.303, n.3, p.242-249, 2010.

OKUNO, A.; TAMEMOTO, H.; TOBE, K. Troglitazone increases the number of small adipocytes without the change of white adipose tissue mass in obese Zucker rats. *J. Clin. Invest.*, v.101, p.1354–1361, 1998.

OLEFSKY, C.L.J.M. Inflammation and insulin resistance. *FEBS Lett.*, v.582, p.97–105, 2008.

OLIVEIRA, C.L.; FISBERG, M. Obesidade na Infância e Adolescência – Uma Verdadeira Epidemia. *Arq. Bras. Endocrinol. Metabol.*, v.47, n.2, p.107-108, 2003.

OLTHOF, M.R.; HOLLMAN, P.C.; KATAN, M.B. Chlorogenic acid and caffeic acid are absorbed in humans. *J. Nutr.*, v.131, n.1, p.66-71, 2001.

OLUKEMI, O.M.; OLUKEMI, I.O.; OLUWATOYIN, S.M.; AUSTIN, A.O.; MANSURAT, L.B. Antioxidant activity of Nigerian dietary spices. *E. j. Environ. Agric. Food Chem.*, v.4, n.6, p.1086-1093, 2005.

PADILHA, P.C.; PINHEIRO, R.L. O papel dos alimentos funcionais na prevenção e controle do câncer de mama. *Rev. bras. cancerol.*, v.50, n.3, p.251-260, 2004.

PAWLOSKEY, R.J.; HIBBELN, J.R.; NOVOTNY, J.A.; SALEM, N. Physiological compartmental analysis of alpha-linolenic acid metabolism in adult humans. *J. Lipid. Res.*, v.42, p.1257-1265, 2001.

PANCHAL, S.K.; POUDYAL, H.; ARUMUGAM, T.V.; BROWN, L. Rutin attenuates metabolic changes, nonalcoholic steatohepatitis, and cardiovascular remodeling in high-carbohydrate, high-fat diet-fed rats. *J. Nutr.*, v.141, n.6., p.1062-1069, 2011.

PARKS, E.J. Dietary carbohydrate's effects on lipogenesis and the relationship of lipogenesis to blood insulin and glucose concentrations. *Br. J. Nutr.*, v.87, p.247-253, 2002.

PEARSON, T.A.; MENSAH, G.A.; ALEXANDER, R.W.; ANDERSON, J.L.; CANNON, R.O.; CRIQUI, M. Markers of inflammation and cardiovascular disease: Application to clinical and public health practice. *Circulation.*, v.107, p.499-511, 2003.

PIETTA, P.G. Flavonoids as antioxidants. *J. Nat. Prod.*, v.63, n.7, p.1035-1042, 2000.

POLACOW, V.O.; LANCHÁ-JUNIOR, A.H.. Dietas hiperglicídicas: efeitos da substituição isoenergética de gordura por carboidratos sobre o metabolismo de lipídios, adiposidade corporal e sua associação com atividade física e com o risco de doença cardiovascular. *Arq. Bras. Endocrinol. Metab.*, v.51, n.3, p.389-400, 2007.

POPKIN, B.M. Urbanization, lifestyle changes and the nutrition transition. *World Development.*, v.27, p.1905-1916, 1999.

POWELL, K. Obesity: the two faces of fat. *Nature*, v.447, p.525-527, 2007.

PUVANENDRAN, S.; WICKRAMASINGHE, A.; KARUNARATNE, N.D.; CARR, G.; WIJESUNDARA, D. S. A.; ANDERSEN, R.; KARUNARATNE, V. Antioxidant Constituents from *Xylopiá championii*. *Pharmaceut Biol.*, v.46, n.5, p.352-355, 2008.

QUEIROZ, J.C.F.; ALONSO-VALE, M.I.C.; CURI, R.; LIMA, F.B. Controle da adipogênese por ácidos graxos. *Arq. Bras. Endocrinol. Metab.*, v.53, n.5, p.582-594, 2009.

RALLIDIS, L.S.; PASCHOS, G.; LIAKOS, G.K.; VELISSARIDOU, A.H.; ANASTASIADIS, G.; ZAMPELAS, A. Dietary alpha-linolenic acid decreases C reactive protein, serum amyloid A and interleukin-6 in dyslipidaemic patients. *Atherosclerosis.*, v.167, p.237-242, 2003.

RATES, S.M.K. Promoção do uso racional de fitoterápicos: uma abordagem no ensino de farmacognosia. *Rev. Bras. Farmacogn.*, v.11, n.2, p.57-69, 2001.

RÓDENAS, J.; CARBONELL, T.; MITJAVILA, M.T. Different roles for nitrogen monoxide and peroxyxynitrite in lipid peroxidation induced by activated neutrophils. *Free Radical Bio. Med.*, v.28, p.374-380, 2000.

RODRIGUES, A.M.S.; PAULA, J.E.; DEGALLIER, N.; MOLEZ, J.F.; ESPÍNDOLA, L.S. Larvicidal activity of some cerrado plant extracts against *Aedes aegypti*. *J. Am. Mosq. Control Ass.*, v.22, n.2, p.314-317, 2006.

ROSADO, E.L.; MONTEIRO, J.B.R. obesidade e a substituição de macronutrientes da dieta. *Rev. Nutr.*, v.14, n.2, p.145-152, 2001.

ROSENBAUM, M.; PIETROBELLI, A.; VASSELI, J.R.; HEYMSFIELD, S.B.; LEIBEL, R.L. Sexual dimorphism in circulating leptin concentration is not accounted for by differences in adipose tissue distribution. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.*, v.1, n.25, p.1365-1371, 2001.

SAAD, G.A.; LÉDA, P.H.O; SÁ, I.M.; SEIXLACK, A.C. *Fitoterapia Contemporânea: Tradição e Ciência na Prática Clínica*. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009, p.29-59.

SAINT-HILAIRE, A. *Plantes Usuelles des Brésiliens*. Grimbert Libraire, Paris, 1824.

SALA-VILA, A.; COFÁN, M.; MATEO-GALLEGRO, R.; CENARRO, A.; CIVEIRA, F.; ORTEGA, E.; ROS, E. Inverse association between serum phospholipid oleic acid and insulin resistance in subjects with primary dyslipidaemia. *Clin. Nutri.*, v.30, n.5, p.590-592, 2011.

SALTIEL, A.R.; KAHN, C.R. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature*, v.414, p.799-806, 2001.

SCHENK, S., SABERI, M.; OLEFSKY, J.M. Insulin sensitivity: modulation by nutrients and inflammation. *J. Clin. Investig.*, v.118, p.2992-3002, 2008.

SEBEDIO, J.L.; GRANDGIRARD, A. Cyclic fatty acids: natural sources, formation during heat treatment, synthesis and biological properties. *Progr. Lipid. Res.*, v.28, p.303-336, 1989.

SELMI, C.; MAO, T.K.; KEEN, K.L.; SCHMITZ, H.H.; GERSHWIN, M.E. The Antiinflammatory properties of Cocoa Flavanols. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, v.47, n.2, p.S163-S171, 2006.

SENA-FILHO, J.G.; DURINGER, J.M.; CRAIG, A.M.; SCHULER, A.R.P.; XAVIER, H.S. Preliminary phytochemical profile and characterization of the extract from the fruits of *Xylopia frutescens* Aubl. (Annonaceae). *J. Essent. Oil Res.*, v.20, n.6, p.536-538, 2008.

SEYMOUR, E.M.; LEWIS, S.K.; URCUYO-LLANES, D.E.; TANONE, I.I.; KIRAKOSYAN, A.; KAUFMAN, P.B.; BOLLING, S.F. Regular tart cherry intake alters abdominal adiposity, adipose gene transcription, and inflammation in obesity-prone rats fed a high fat diet. *J. Med. Food.*, v.12, n.5, p.935-942, 2009.

SHAH, A.; MEHTA, N.; REILLY, M. P. Adipose inflammation, insulin resistance, and cardiovascular disease. *JPEN J. Parenter. Enteral Nutr.*, v.32, n.6, p.638-644, 2008.

SHANTA, N.C.; NAPOLITANO, G.E. Gas chromatography of fatty acids. *J. Chromatogr. B*, v.624, p.37-51, 1992.

SHARPE, P.A.; GRANNER, M.L.; CONWAY, J.M.; AINSWORTH, B.E.; DOBRE, M. Availability of Weight-Loss Supplements: Results of an Audit of Retail Outlets in a Southeastern City. *J. Am. Diet. Assoc.*, v.2045, 2006.

SHUKLA, R.; SHARMA, S.B.; PURI, D.; PRABHU, K.M.; MURTHY, P.S. Medicinal plants for treatment of diabetes mellitus. *Indian J. Clin. Biochem.*, v.15, p.169-177, 2000.

SILVA, J.B.; ROCHA, A.B. Oleorresina do fruto de *Xylopiya aromatica* (Lamarck) Martius. *Rev. Ciênc. Farm.*, v.3, p.33-40, 1981.

SILVA, M.S.; TAVARES, J.F.; QUEIROGA, K.F.; AGRA, M.F.; FILHO-BRABOSA, J.M. Acalóides e outros constituintes de *Xylopiya langsdorffiana* (ANNONACEAE). *Quim. Nova.*, v.32, n.6, p.1566-1570, 2009.

SILVA, N.L.A.; MIRANDA, F.A.A.; CONCEIÇÃO, G.M. Triagem fitoquímica de plantas de cerrado, da área de proteção ambiental municipal do inhamum, Caxias, Maranhão. *Sci. Plena.*, v.6, n.2, p.1-17, 2010.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. Ed. da Universidade, 1999.

SIMOPOULOS, A.P. Omega-3 Fatty Acids in Inflammation and Autoimmune Diseases. *J. Am. Coll. Nutr.*, v.21, n.6, p.495–505, 2002.

SOARES, S.E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. *Rev. Nutr.*, v.15, n.1, p.71-81, 2002.

SOLOMON, T.P.; BLANNIN, A.K. Changes in glucose tolerance and insulin sensitivity following 2 weeks of daily cinnamon ingestion in healthy humans. *Eur. J. Appl. Physiol.*, v.105, p.969-976, 2009.

SOMOVA, L.I.; SHODE, F.O.; MOODLEY, K.; GOVENDER, Y. Cardiovascular and diuretic activity of kaurene derivatives of *Xylopiya aethiopica* and *Alepidea amatymbica*. *J. ethnopharmacol.*, v.77, p.165-174, 2001.

SONG, M.J.; KIM, K.H.; YOON, J.M.H.; KIM, J.B. Activation of Toll-like receptor 4 is associated with insulin resistance in adipocytes. *Biochem. Bioph. Res. Co.*, v.346, p.739–745, 2006.

SONG, Y.; MANSON, J.E.; TINKER, L.; HOWARD, B.V.; KULLER, L.H.; NATHAN, L.; RIFAI, N.; LIU, S. Insulin sensitivity and insulin secretion determined by homeostasis model assessment (HOMA) and risk of diabetes in a multiethnic cohort of women: the women's health initiative observational study. *Diabetes Care.*, v.30, n.7, p.1747-1752, 2007.

SOTILLO, R.D.V.; HADLEY, M. Chlorogenic acid modifies plasma and liver concentrations of: cholesterol, triacylglycerol, and minerals in (fa/fa) Zucker rats. *J. Nutr. Biochem.*, v.13, n.12, p.717-726, 2002.

SOUTO, A.L.; TAVARES, J.F.; SILVA, M.S.; DINIZ, M.F.F.M.D.; ATHAYDE-FILHO, P.F.; BARBOSA-FILHO, J.M. Anti-Inflammatory activity of alkaloids: an update from 2000 to 2010. *Molecules*, v.16, p.8515-8534, 2011.

SOUZA, P.H.M.; SOUZA NETO, M.H.; MAIA, G.A. Componentes funcionais nos alimentos. *Bol. SBCTA*, v.37, n.2, p.127-135, 2003.

SPINELLA, M. The importance of pharmacological synergy in psychoactive herbal medicines. *Alternat. Med. Rev.*, v.7, n.2, p.130-137, 2002.

SPEAKMAN, J.; HAMBLY, C.; MITCHELL, S.; KRÓL, E. Animal models of obesity. *Obes. Rev.*, v.8, suppl.1, p.55-61, 2007.

SPIX, J.B.; MARTIUS, C.F.P. *Viagem pelo Brasil (1817-1820)*. São Paulo: EDUSP, v.2, 1981 [1823], 200p.

STASCHEENKO, E.E.; JARAMILLO, B.E.; MARTÍNEZ, J.R. Analysis of volatile secondary metabolites from colombian *Xylopiá aromática* (Lamarck) by different extraction and headspace methods and gas chromatography. *J. chromatogr. A.*, v.1025, n.1, p.105-113, 2004.

SUDHA, P.; SMITA, S.Z.; SHOBHA, Y.B.; AMEETA, R.K. Potent α -amylase inhibitory activity of Indian Ayurvedic medicinal plants. *BMC Complement. Altern. Med.*, v.11, n.5, p.1-10, 2011.

SUFFREDINI, I.B.; PACIENCIA, M.L.B.; VARELLA, A.D.; YOUNES, R.N. In vitro cytotoxic activity of Brazilian plant extracts against human lung, colon and CNS solid cancers and leukemia. *Fitoterapia.*, v.78, n.3, p.223-226, 2007.

TAIPINA, M.S.; FONTS, M.A.S.; COHEN, V.H. Alimentos funcionais-nutracêuticos. *Higiene Alimentar.*, v.16, n.100, p.28-29, 2002.

TAKAHASHI, N.; KAWADA, T.; GOTO, T.; KIM, C.S.; TAIMATSU, A.; EGAWA, K. Abietic acid activates peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPAR γ) in RAW264.7 macrophages and 3T3-L1 adipocytes to regulate gene expression involved in inflammation and lipid metabolism. *FEBS Lett.*, v.550, p.190-194, 2003.

TAKUMA, D.; GUANGCHEN, S.; YOKOTA, J.; HAMADA, A.; ONOGAWA, M.; YOSHIOKA, S.; KUSUNOSE, M.; MIYAMURA, M.; KYOTANI, S.; NISHIOKA, Y. Effect of *Eriobotrya japonica* Seed Extract on 5-Fluorouracil-Induced Mucositis in Hamsters. *Biol. Pharm. Bull.*, v.31, n.2, p.250-254, 2008.

TALHOUK, R.S.; KARAM, C.; FOSTOK, S.; EL-JOUNI, W.; BARBOUR, E.K. Anti-Inflammatory Bioactivities in Plant Extracts. *J. Med. Food*, v.10, n.1, p.1-10, 2007.

TALPUR, N.; ECHARD, B.; INGRAM, C.; BAGCHI, D.; PREUSS, H. Effects of a novel formulation of essential oils on glucose – insulin metabolism in diabetic and hypertensive rats: a pilot study. *Diabetes obes. metab.*, v.7, p.193–199, 2005.

THAMBI, P.T.; KUZHIVELIL, B.; SABU, M.C.; JOLLY, C.I. Antioxidant and anti-inflammatory activities of the flowers of *Tabernaemontana coronaria* (L) R. Br. *Indian J. Pharm. Sci.*, v.68, p.352-355, 2009.

THIGPEN, J.E.; SETCHELL, K.D.; SAUNDERS, H.E.; HASEMAN, J.K.; GRANT, M.G.; FORSYTHE, D.B. Selecting the appropriate rodent diet for endocrine disruptor research and testing studies. *Ilar J.*, v. 45, p.401–416, 2004.

UYEDA, K.; YAMASHITA, H.; KAWAGUCHI, T. Carbohydrate responsive element-binding protein (ChREBP): a key regulator of glucose metabolism and fat storage. *Biochem. Pharmacol.*, v.63, p.2075-2080, 2002.

WAGNER, H.; BLADT, S. *Plant Drug Analysis*. Berlin: Springer, 1996.

WAJCHENBERG, B.L. Subcutaneous and Visceral Adipose Tissue: Their Relation to the Metabolic Syndrome. *Endocr. Rev.*, v.21, n.6, p.697–738, 2000.

WANG, C.; HARRIS, W.S.; CHUNG M, et al. N-3 Fatty acids from fish or fish-oil supplements, but not alpha-linolenic acid, benefit cardiovascular cardiovascular disease outcomes in primary- and secondary-prevention studies: a systematic review. *Am. J. Clin. Nutr.*, v.84, p.5-17, 2006.

WANG, C.C.L.; GOALSTONE, M.L.; DRAZNIN, B. Molecular mechanisms of insulin resistance that impact cardiovascular biology. *Diabetes*, v.53, p.2735-2740, 2004.

WAKI, H.; TONTONOZ, P. Endocrine functions of adipose tissue. *Annu. Rev. Pathol.*, v.2, p.31-56, 2007.

WEISBERG, S.P.; MCCANN, D.; DESAI, M.; ROSENBAUM, M.; LEIBEL, R. L.; FERRANTE, A.W.J. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J. Clin. Invest.*, v.112, p.1796–1808, 2003.

WELLEN, K.E.; HOTAMISLIGIL, G.S. Inflammation, stress, and diabetes. *J. Clin. Invest.*, v.115, n.5, p.1111-1119, 2005.

WELLEN, K.E.; HOTAMISLIGIL, G.S. Obesity-induced inflammatory changes in adipose tissue. *J. Clin. Invest.*, v.122, p.1785-1788, 2003.

WESTERTERP-PLATENGA, M.; DIEPVENS, K.; JOOSEN, A.M.C.P.; BERUBE-PARENT, B.; TREMBLAY, A. Metabolic effects of spices, teas, and caffeine. *Physiol. Behav.*, v.89, p.85-91, 2006.

WHO (World Health Organization). Fact sheet: obesity and overweight. 2006. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/index.html>> Acesso em: 25 mai. 2010.

WHO (World Health Organization). The world health report 2003: shaping the future. Neglected global epidemics: three growing threats. Geneva: WHO, 2003.

WHO. *WHO Fact Files: Ten facts on obesity*. Geneva: WHO. 2010. Disponível em: <http://www.who.int/features/factfiles/obesity/en/index.html>. Acesso em: 10 set. 2011.

WOO, H.M.; KANG, J.H.; KAWADA, T.; YOO, H.; SUNG, M.K.; YU, R. Active spice-derived components can inhibit inflammatory responses of adipose tissue in obesity by suppressing inflammatory actions of macrophages and release of monocyte chemoattractant protein-1 from adipocytes. *Life sci.*, v.80, n.10, p.926-931, 2007.

WU, C.H.; WU, C.F.; HUANG, H.W.; JAO, Y.C.; YEN, G.C. Naturally occurring flavonoids attenuate high glucose-induced expression of proinflammatory cytokines in human monocytic THP-1 cells. *Mol. Nutr. Food Res.*, v.53, n.8, p.984-995, 2009.

XIA, X.; WENG, J. Targeting metabolic syndrome: Candidate natural agents. *J. Diabetes*, v.2, n.4, p.243-249, 2010.

XU, H.; BARNES, G.T.; YANG, Q.; TAN, G.; YANG, D.; CHOU, C.J.; SOLE, J.; NICHOLS, A.; ROSS, J.S.; TARTAGLIA, L.A.; CHEN, H. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J. clin. invest.*, v. 112, p.1821-1830, 2003.

YOUSAF, M.; HAMMOND, N.L.; PENG, J.N.; WAHYUONO, S.; MCINTOSH, K.A.; CHARMAN, W.N.; MAYER, A.M.S.; HAMANN, M.T. New manzamine alkaloids from an indo-pacific sponge. pharmacokinetics, oral availability, and the significant activity of several manzamines against HIV-I, AIDS opportunistic infections, and inflammatory diseases. *J. Med. Chem.*, v.47, p.3512-3517, 2004.

YU, R.; KIM, C.S.; KWON, B.S.; KAWADA, T. Mesenteric adipose tissue-derived monocyte chemoattractant protein-1 plays a crucial role in adipose tissue macrophage migration and activation in obese mice. *Obesity (Silver Spring)*, v.14, n.8, p.1353-1362, 2006.

ZANG, Y.; SATO H.; IGARASHI, K. Anti-Diabetic Effects of a Kaempferol Glycoside-Rich Fraction from Unripe Soybean (Edamame, *Glycine max* L.

Merrill. 'Jindai') Leaves on KK-Ay Mice. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, v.75, n.9 p.1677-1684, 2011.

ZHANG, F.; LAVAN, B.E.; GREGOIRE, F.M. Selective modulators of PPAR-gamma activity: molecular aspects related to obesity and side-effects. *PPAR Res.*, art. nº 32696, 2007.

ZHAO, H.L.; CHO, K.H.; HA, Y.W.; JEONG, T.S.; LEE, W.S.; KIM, Y.S. Cholesterol-lowering effect of platycodin D in hypercholesterolemic ICR mice. *Eur. J. Pharmacol.*, v.10, n.1-3, p.166-173, 2006.

ZHAO, G.; ETHERTON, T.D.; MARTIN, K.R.; WEST, S.G.; GILLIES, P.J.; KRIS-ETHERTON, P.M. Dietary - alpha linolenic acid reduces inflammatory and lipid cardiovascular risk factors in hypercholesterolemic men and women. *J. Nutr.*, v.134, p.2991-2997, 2004.

ZHENG, X.I.; SEILIEZ, N.; HASTINGS, D.R.; TOCHER, S.; PANSERAT, C.A.; DICKSON, P. B.; TEALE, A.J. Characterization and comparison of fatty acyl D6 desaturase cDNAs from freshwater and marine teleost fish species. *Comp. Biochem. Physiol., A.*, v.139, p.269-279, 2004.

ZHOU, H.; MINESHITA, S. The effect of berberine chloride on experimental colitis in rats in vivo and in vitro. *J. Pharm. Exp. Ther.*, v. 294, p.822-829, 2000.

Total referências: 242

ANEXO A



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
- C E T E A -

CERTIFICADO

Certificamos que o **Protocolo nº 211/2010**, relativo ao projeto intitulado "**Avaliação do potencial dos frutos da *Xylopiá aromática (LAM.) MART. (Pimenta-de-macaco)* no tratamento de alterações metabólicas, induzidas por dieta em camundongos Balb/c**", que tem como responsável(is) **Maria das Graças Lins Brandão**, está(ão) de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo **Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG)**, tendo sido aprovado na reunião de **27/ 10/2010**.

Este certificado expira-se em **27/ 10/ 2015**.

CERTIFICATE

We hereby certify that the **Protocol nº 211/2010**, related to the project entitled "**Evaluation of the potential of fruits of *Xylopiá aromatic (LAM.) MART. in the treathment of metabolic changes, induced by diet in balb/c***", under the supervisors of **Maria das Graças Lins Brandão**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the **Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG)**, and was approved in **October 27, 2010**.

This certificate expires in **October 27, 2015**.

Belo Horizonte, 29 de Outubro de 2010.

Profª. Jacqueline Isaura Alvarez-Leite
Coordenadora do CETEA/UFMG

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 - Belo Horizonte, MG - Brasil
Telefone: (31) 3499-4516
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@proq.ufmg.br

(Mod.Cert. v1.0)

ANEXO B

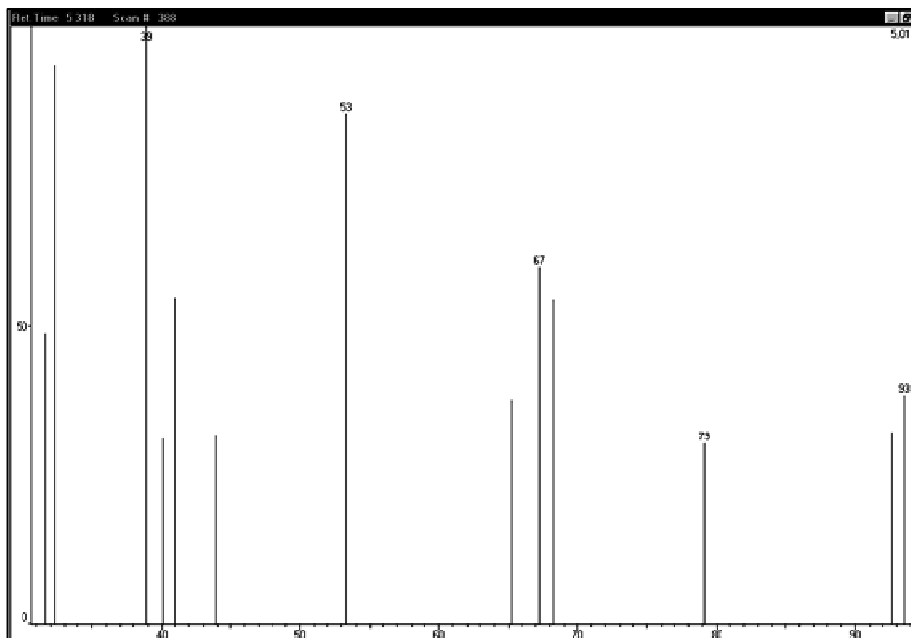


Figura 30 - Espectro de massa referente ao pico 1 (CG/ EM do HEXA, lote 1).

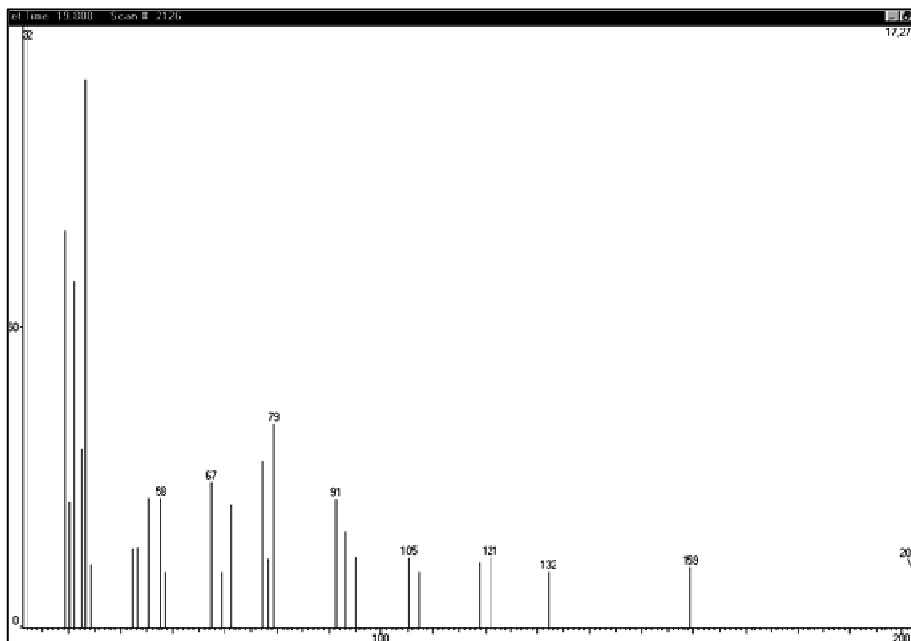


Figura 31 - Espectro de massa referente ao pico 2 (CG/ EM do HEXA, lote 1).

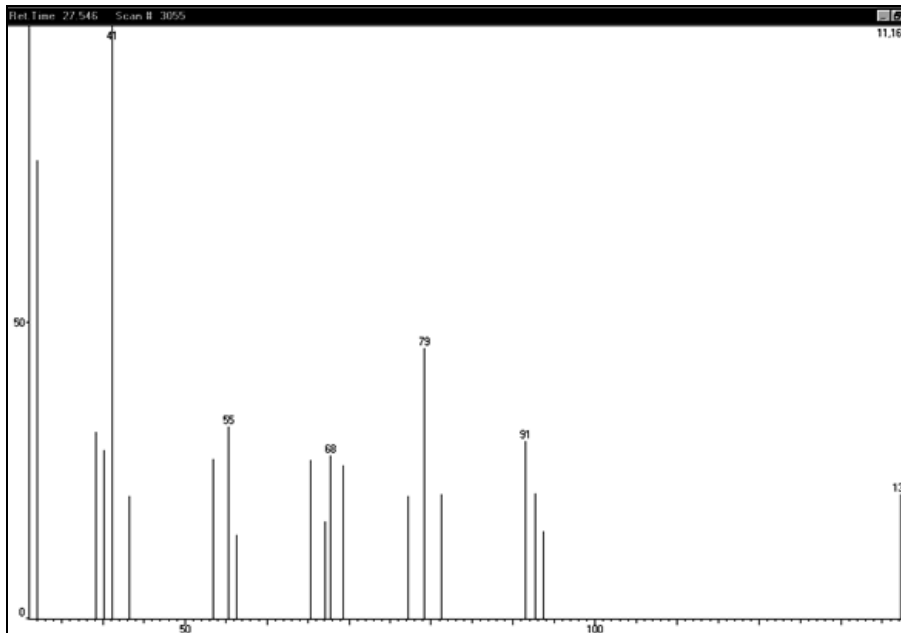


Figura 32 - Espectro de massa referente ao pico 3 (CG/ EM do HEXA, lote 1).

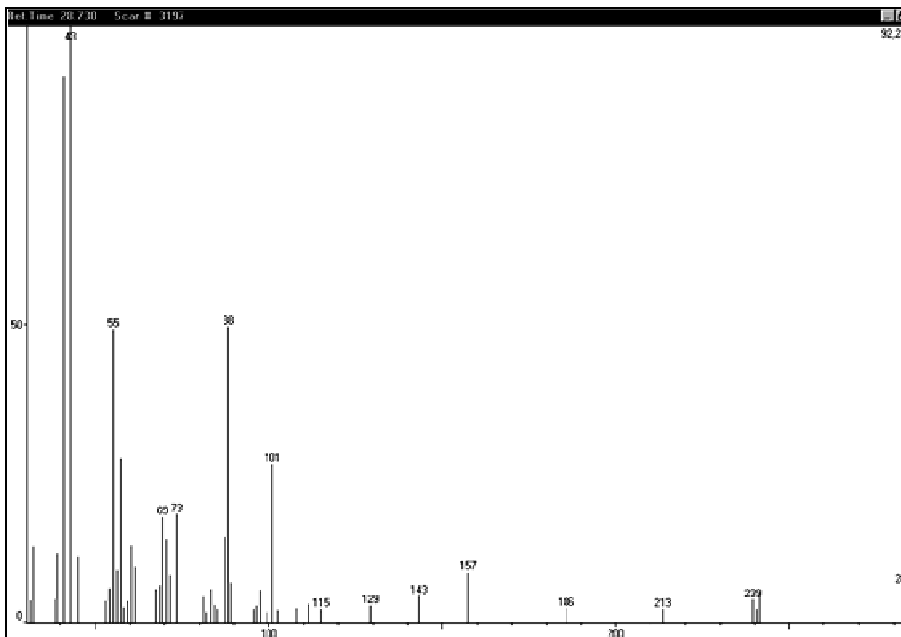


Figura 33 - Espectro de massa referente ao pico 4 (CG/ EM do HEXA, lote 1).

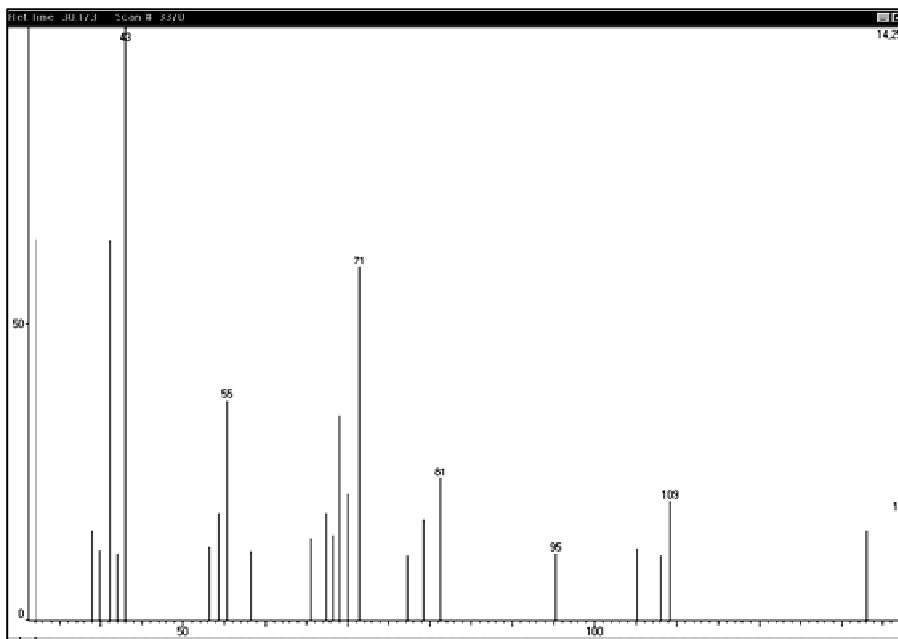


Figura 34 - Espectro de massa referente ao pico 5 (CG/ EM do HEXA, lote 1).

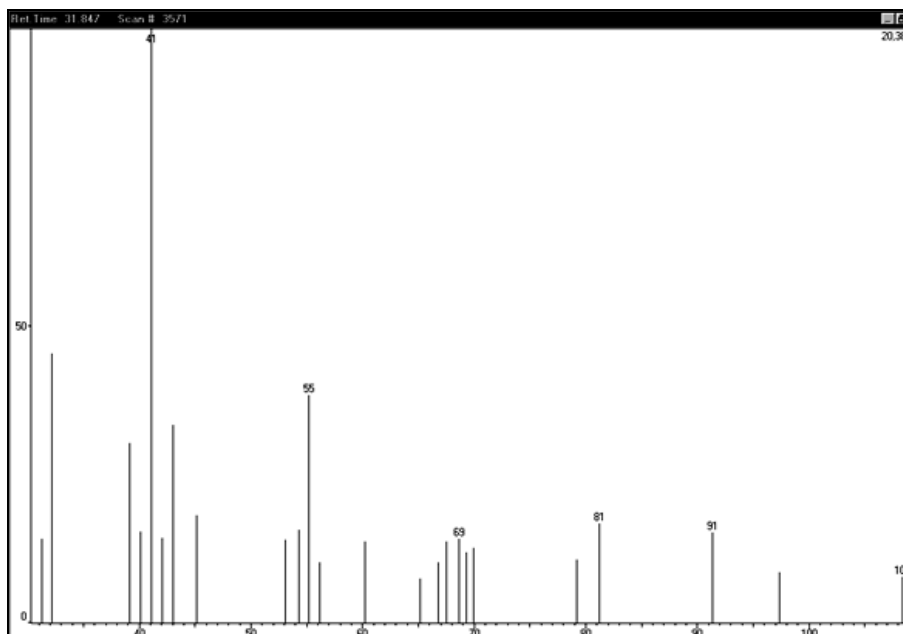


Figura 35 - Espectro de massa referente ao pico 6 (CG/ EM do HEXA, lote 1).

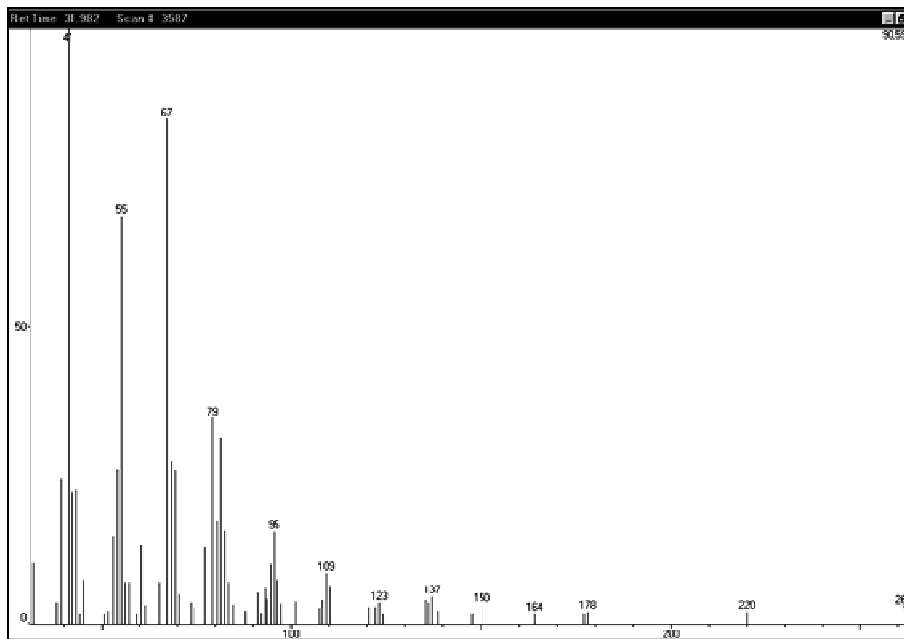


Figura 36 - Espectro de massa referente ao pico 7 (CG/ EM do HEXA, lote 1).

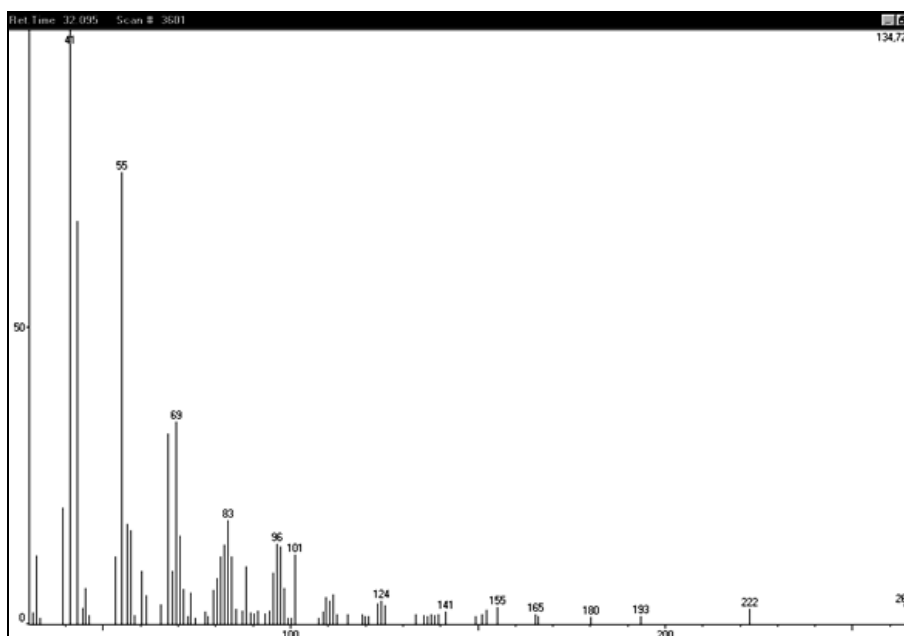


Figura 37 - Espectro de massa referente ao pico 8 (CG/ EM do HEXA, lote 1).

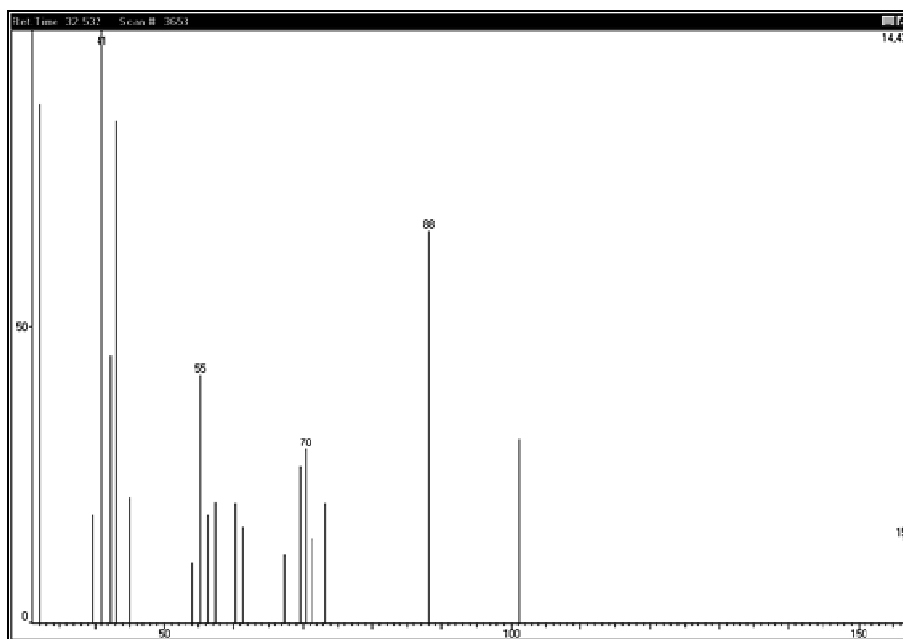


Figura 38 - Espectro de massa referente ao pico 9 (CG/ EM do HEXA, lote 1).

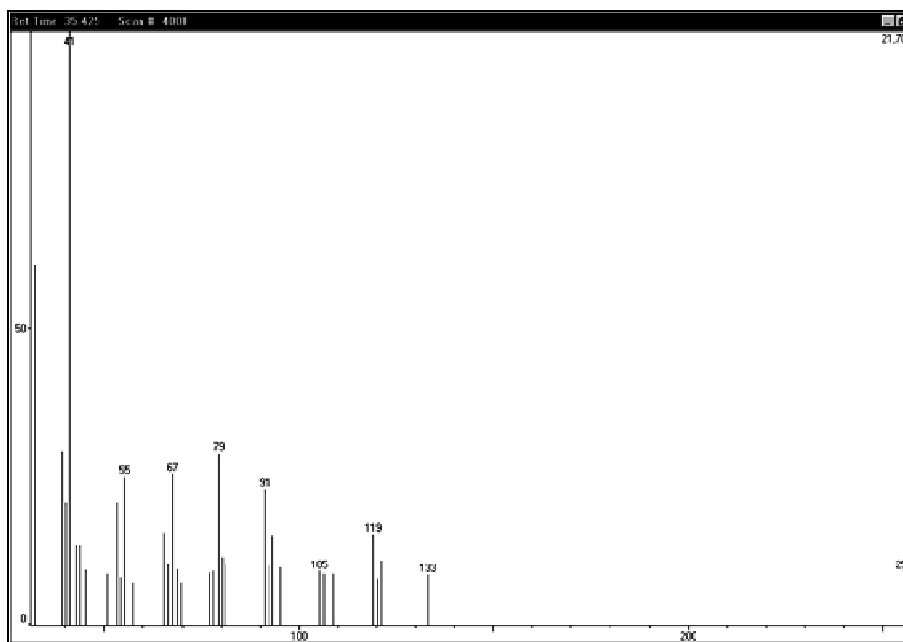


Figura 39 - Espectro de massa referente ao pico 10 (CG/ EM do HEXA, lote 1).

ANEXO C

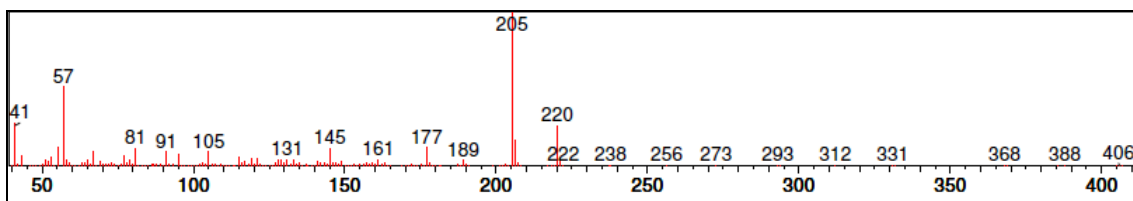


Figura 40 - Espectro de massa referente ao pico 1 (CG/ EM do HEXA, lote 2).

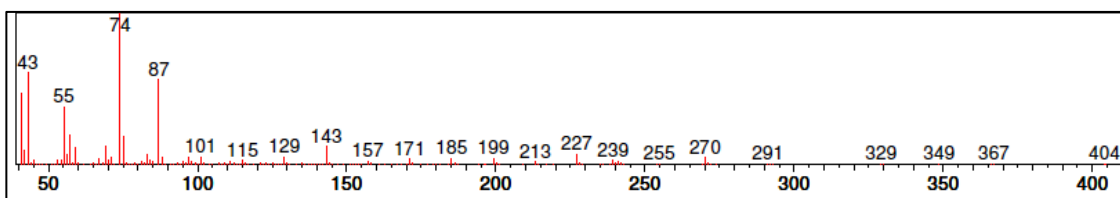


Figura 41 - Espectro de massa referente ao pico 2 (CG/ EM do HEXA, lote 2).

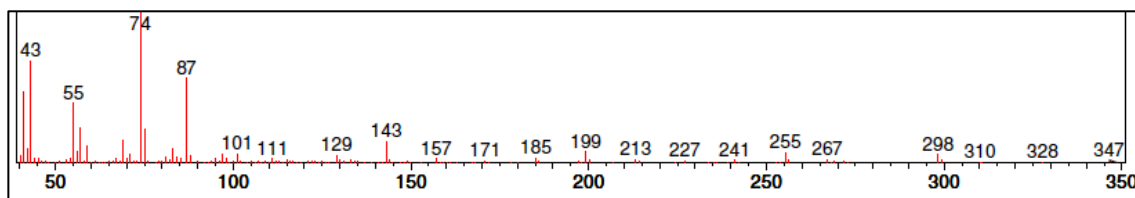


Figura 42 - Espectro de massa referente ao pico 3 (CG/ EM do HEXA, lote 2).

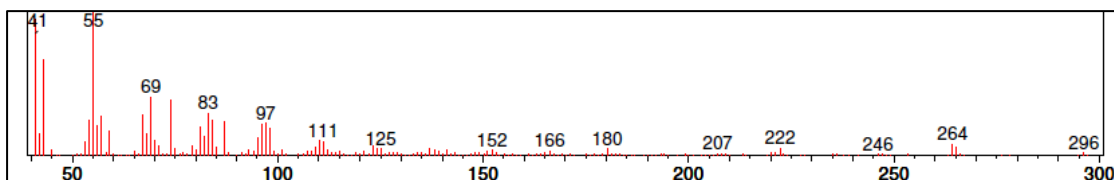


Figura 43 - Espectro de massa referente ao pico 4 (CG/ EM do HEXA, lote 2).

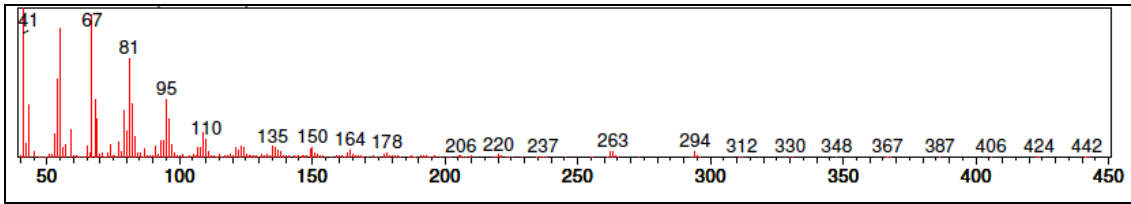


Figura 44 - Espectro de massa referente ao pico 5 (CG/ EM do HEXA, lote 2).

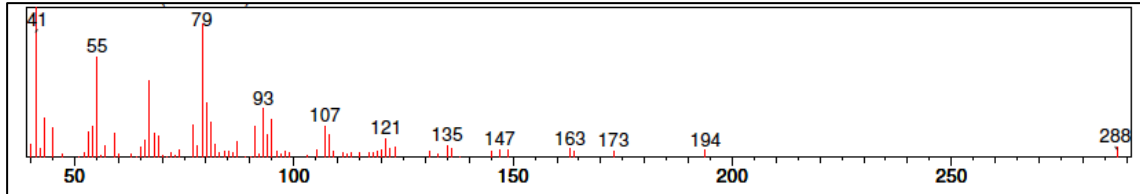


Figura 45 - Espectro de massa referente ao pico 6 (CG/ EM do HEXA, lote 2).