Gisele Aparecida de Souza

EFEITOS DA *ANNONA MURICATA* (GRAVIOLA) E DE SEU COMPONENTE ß-SITOSTEROL, SOBRE A ADIPOSIDADE ABDOMINAL, RESPOSTA GLICÊMICA, METABOLISMO BASAL, ESTRESSE OXIDATIVO E METABOLISMO ENERGÉTICO NO MIOCÁRDIO DE RATOS SUBMETIDOS À OBESIDADE EXPERIMENTAL

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia em Clínica Médica, da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP para obtenção do título de mestre.

Orientadora: Professora Titular Dr[a]**.** Ethel Lourenzi Barbosa Novelli

Botucatu – SP

2010

Livros Grátis

http://www.livrosgratis.com.br

Milhares de livros grátis para download.

Estudo realizado no Departamento de Química e Bioquímica do Instituto de Biociências e no Laboratório Experimental do Departamento de Clínica Médica, da Faculdade de Medicina, da Universidade Estadual Paulista, UNESP, Botucatu.

DEDICATÓRIA

Ao meu marido, *Anderson*, ***por tanto amor, companheirismo, incentivo e por tornar a minha vida tão feliz.***

Aos meus pais, *Sebastião e Maria do Carmo*, ***por tanta dedicação, carinho e amor, por terem apoiado meus sonhos e confiarem em mim.***

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À minha orientadora, *Dra Ethel Lourenzi Barbosa Novelli,* ***pelo longo e bom tempo de convivência, pelos ensinamentos e pela paciência em horas difíceis, pelo carinho e amizade. Meus sinceros agradecimentos.***

À minha querida irmã, *Aline,* ***por existir em minha vida e ser tão amiga.***

À minha madrinha, *Márcia,* ***por torcer pela realização dos meus sonhos e vibrar com minhas conquistas.***

AGRADECIMENTOS

Às minhas amigas, *Camila, Renata, Priscila, Juliana, Danielle e Maria Fernanda* ***que me ajudaram e me incentivaram nas horas alegres e nas horas difíceis.***

Aos meus amigos do laboratório de Bioquímica – UNESP – Botucatu, *Fábio, Katiucha e Geovana,* ***por toda ajuda na realização deste trabalho e também pela amizade.***

À *Ana Maria Mengue,* ***secretária da pós-graduação da clínica médica, pela dedicação, eficiência e pelo trabalho profissional.***

Ao Prof. *Dr. Carlos Roberto Padovani* ***do Departamento de Bioestatística, UNESP, Botucatu, pelos cuidados estatísticos.***

Ao *Fabio Henrique Fava* ***do Departamento de Química e Bioquímica – IB, pela simpatia e colaboração para a realização deste trabalho.***

Aos amigos, funcionários da Seção de Pós-Graduação da UNESP/Botucatu, pelo carinho e disponibilidade que sempre demonstraram.

A UNESP de Botucatu pela oportunidade, apoio e o incentivo ao meu crescimento pessoal e captação científica.

Agradeço também a FAPESP pelo apoio financeiro dado a este trabalho.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 1
Efeitos do chá de folhas de graviola e do seu componente β-sitosterol, em condições normais e de ingestão de dieta rica em colesterol e sacarose sobre os parâmetros nutricionais, morfométricos, calorimétricos e glicemia..... 1
Resumo 2
Introdução 3
Materiais e métodos..... 6
Resultados..... 11
Discussão..... 25
Referências bibliográficas..... 32
CAPÍTULO 2 37
Perfil lipídico sérico, metabolismo energético e estresse oxidativo miocárdico: ação do chá de graviola e de seu componente β-sitosterol em animais submetidos à ingestão de dieta padrão e de dieta rica em sacarose e colesterol..... 37
Resumo..... 38
Introdução..... 39
Material e métodos 42
Resultados 45
Discussão 51
Referências bibliográficas..... 60
CAPÍTULO 3 66
Considerações finais..... 66

ABREVIATURAS

ADH – hormônio antidiurético

ADP – adenosina difosfato

ATP – trifosfato de adenosina

ATPASE – ATP sintetase

CAT - catalase

Cit C – citocromo C

CO_2/O_2 – coeficiente respiratório

DCV – doenças cardiovasculares

DH – dieta hipercalórica

DP – dieta padrão

EA – eficiência alimentar

EI – energia ingerida

ERO – espécies reativas do oxigênio

$FADH_2$- flavina adenina dinucleotídeo reduzido

GSH – glutationa reduzida

GSH-Px – glutationa peroxidase

GSSG – glutationa oxidada

H^+ - prótons

H_2O_2 – peróxido de hidrogênio

HDL – lipoproteína de elevada densidade

HP – hidroperóxido de lipídio

IDL – lipoproteína de densidade intermediária

IMC – índice de massa corporal

LDL – lipoproteína de baixa densidade

NADH – nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida

NADH ox – complexo respiratório I

NBT – nitroblue-tetrazólico

$O_2^{\cdot}$ - radical superóxido

$OH^{\bullet}$ - radical hidroxil

QR – quociente respiratório

SAT – substâncias antioxidantes totais

SOD – superóxido dismutase

SRAA – sistema renina-angiotensina-aldosterona

TG – triacilglicerol

TMB – taxa metabólica basal

TMR – taxa metabólica de repouso

TOTG – teste oral de tolerância à glicose

VCO_2- produção de gás carbônico

VE – ventrículo esquerdo

VLDL – lipoproteína de densidade muito baixa

VO_2 - consumo de oxigênio

CAPÍTULO 1

EFEITOS DO CHÁ DE FOLHAS DE GRAVIOLA E DO SEU COMPONENTE β-SITOSTEROL, EM CONDIÇÕES NORMAIS E DE INGESTÃO DE DIETA RICA EM COLESTEROL E SACAROSE SOBRE OS PARÂMETROS NUTRICIONAIS, MORFOMÉTRICOS, CALORIMÉTRICOS E GLICEMIA

I. RESUMO

Dietas inadequadas, enriquecidas com carboidratos e lipídios, têm sido responsáveis pelo desenvolvimento de diversas patologias relacionadas ao estresse oxidativo. Portanto, atualmente vem crescendo o interesse na descoberta de substâncias naturais que possam atuar como agentes antioxidantes, capazes de conter, ou até mesmo reverter os danos provocados pelo estresse oxidativo.

O objetivo deste capítulo foi determinar os efeitos do chá de folhas de graviola e do seu componente β-sitosterol, em condições normais e de ingestão de dieta rica em colesterol e sacarose sobre os parâmetros nutricionais, morfométricos e calorimétricos, bem como sobre as concentrações séricas de glicose.

Foram utilizados 48 ratos machos, adultos, Wistar, divididos em 6 grupos: PC (controle) que recebeu ração padrão (DP) e água para beber; PA, que recebeu DP e chá de folhas de *Annona muricata* (30g/L); PB, DP e beta-sitosterol na água de beber (0,02g/L); HC, dieta hipercalórica (DH) e água para beber; HA, DH e chá de folhas de *Annona muricata* (30g/L); HB, DH e beta-sitosterol na água de beber. Após 42 dias de tratamento, foi realizada calorimetria indireta, em condições alimentado e jejum. Após 49 dias foi realizada a glicemia de jejum, o teste oral de tolerância a glicose (TOTG) e o sacrifício dos animais, sendo coletado o sangue, que foi utilizado para determinação da concentração de hidroperóxido de lipídio e substâncias antioxidantes totais.

A obesidade foi evidenciada nos animais que receberam DH pela elevação no peso final, ganho de peso e índice de Lee, quando comparados aos animais que receberam dieta padrão. Animais do grupo HA apresentaram menor circunferência abdominal em relação aos grupos HB e HC. Houve correlação linear positiva entre o peso final e IMC e entre o peso final e índice de Lee.

Não houve diferença na ingestão alimentar. A ingestão de líquidos foi maior no grupo PA em relação ao grupo PC e a eficiência alimentar foi menor nos grupos que ingeriram chá de folhas de graviola e β-sitosterol, tanto nos grupos com DP, quanto nos grupos com DH, em relação aos seus respectivos controles. A resposta glicêmica foi menor em animais dos grupos PB e HB em relação aos grupos PC e HC, respectivamente. Houve correlação linear positiva entre energia ingerida e peso final.

Animais do grupo HA apresentaram redução na glicemia de jejum em relação ao grupo HC. HB apresentou glicemia de jejum reduzida quando comparado ao PB. HA e HB apresentaram redução na glicemia após 60, 90 e 120 minutos no TOTG quando comparados ao HC, bem como elevação na glicemia nos 60 e 90 minutos quando

comparados ao PA e PB. Aos 120 minutos a glicemia dos grupos HA e HB ficou semelhante a dos grupos PA e PB, respectivamente. Os grupos mantidos com DH apresentaram maior concentração de hidroperóxido de lipídio (HP) e maior porcentagem de substâncias antioxidantes totais (SAT) do que os que receberam DP. β-sitosterol elevou a procentagem de SAT, tanto no grupo mantido com DP quanto no grupo mantido com DH.

Após 42 dias de tratamento, a análise calorimétrica demonstrou maior oxidação lipídica, tanto por animais que receberam chá de folhas de graviola, quanto por animais que receberam β-sitosterol, bem como redução na oxidação de carboidratos e do quociente respiratório (QR). Além de aumento na taxa metabólica basal (TMB).

Em conclusão, a ingestão de β-sitosterol bem como a de chá de folhas de graviola atuou como hipoglicemiante em animais que receberam dieta hipercalórica. β-sitosterol e ingestão de chá de folhas de graviola elevaram a oxidação lipídica e a TMB, além de reduzir o QR. Houve, portanto efeitos análogos entre β-sitosterol e chá de folhas de graviola. Os resultados obtidos permitiram evidenciar que ingestão de chá de folhas de graviola e de seu componente β-sitosterol apresentaram efeitos benéficos nos parâmetros analisados.

Palavras chave: chá de graviola, β-sitosterol, dieta hipercalórica, parâmetros nutricionais e morfométricos, glicemia, calorimetria.

II. INTRODUÇÃO

Não há dúvidas que a alimentação exerce papel fundamental no desenvolvimento de diversas patologias, e que uma dieta balanceada pode atenuar o surgimento de grande número de doenças degenerativas (Bray, 2000).

Estudos em humanos têm demonstrado que dietas com elevada concentração de sacarose e frutose podem levar a hipertrigliceridemia pela elevação na síntese hepática de ácidos graxos (Kok et al., 1996; Putman et al., 1999). Elevada ingestão de sacarose induziu aumento na síntese hepática de triacilglicerol, pela ativação das enzimas acetil coenzima A carboxilase, ácido graxo sintetase e da enzima málica (Sebokova et al., 1996). Estudos recentes demonstraram que elevada ingestão de sacarose, em ratos induziu elevação no peso corporal final, e hipertrigliceridemia (Diniz et al., 2005; Ebaid et al., 2006; Novelli et al., 2007).

Dietas suplementadas com frutose e sacarose induzem alterações metabólicas em animais, semelhantes às observadas em indivíduos diabéticos, incluindo anormalidades vasculares na retina e esclerose glomerular renal (Poulson, 1986). Elevada ingestão de frutose induziu hipertrigliceridemia, hipertensão arterial e elevada resistência à insulina em ratos (Bezerra et al., 2001). A hipertrigliceridemia está freqüentemente associada ao aumento na resistência à insulina (Sebokova et al., 1996) e repetidos episódios de hiperglicemia pós-prandial, decorrente da elevação na resistência à insulina, podem induzir alterações vasculares resultando disfunção pancreática (Svensson et al., 1996).

É fato conhecido que dietas ricas em lipídios e colesterol induzem obesidade (Hill et al., 2000), desde que o elevado consumo de lipídios aumenta o apetite e induz hiperfagia (Friedman, 1998). Por outro lado, a restrição na ingestão lipídica e a elevação no consumo de carboidratos podem ser contraproducentes para o controle das alterações metabólicas que acompanham a obesidade.

O conhecimento da importância biológica das espécies reativas de oxigênio (ERO) e antioxidantes parece estar iniciando uma nova era no estudo da indução de patologias e manutenção da saúde (Bray, 2000).

Espécies reativas de oxigênio, ou radicais livres, são essenciais para a sinalização química, detoxificação e função imune e, como conseqüência, são continuamente produzidas no organismo (Droge, 2002). Na maior parte das reações fisiológicas, a produção de radicais livres é controlada, entretanto, a produção excessiva desses compostos, sua exposição a oxidantes externos ou diminuição dos mecanismos de defesa antioxidantes pode resultar em dano no DNA, lipídios e proteínas, caracterizando o chamado "estresse oxidativo" (Nishyiama et al., 1998). Durante o estresse oxidativo, espécies reativas de oxigênio, tais como radical superóxido (O_2^-), radical hidroxil ($OH^\bullet$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) podem produzir danos nos tecidos, como a peroxidação de lipídios das membranas celulares, chamada lipoperoxidação.

Segundo a Hipótese Antioxidante, todas as alterações associadas com atividade de ERO eram indesejáveis e a ação de antioxidantes benéfica. O interesse em ERO como moléculas sinalizadoras na função, proliferação e diferenciação celular alterou essa visão demasiadamente simples (Astley, 2003).

Os organismos possuem mecanismos de defesa endógenos contra a ação tóxica dos radicais livres, divididos basicamente em dois grupos: as enzimas de atividade antioxidante e os antioxidantes não-enzimáticos. Os primeiros correspondem principalmente às enzimas catalase, superóxido dismutase e glutationa peroxidase. Os agentes antioxidantes não-

enzimáticos compreendem as substâncias antioxidantes totais (SAT), incluindo as vitaminas C e E (α-tocoferol), beta-caroteno e peptídeos ativos representados por glutationa reduzida (GSH) (Ferrari et al., 1998).

Entretanto, as defesas endógenas podem não ser suficientes para impedir a ação deletéria de uma liberação elevada de radicais livres (Masalkar et al., 2004). Nessas condições, compostos da dieta, que podem atuar como antioxidantes, podem exercer efeitos benéficos, aumentando as defesas celulares contra o dano oxidativo (Benzie et al., 2003).

Alimentos naturais e antioxidantes, derivados de alimentos como vitaminas e fitoquímicos tem recebido, recentemente, crescente atenção devido sua função quimiopreventiva contra danos oxidativos (Lee et al., 1994; Pearson et al., 1997; Root & Anderson, 2004). Evidências epidemiológicas associam o consumo de dietas ricas em antioxidantes, direta e indiretamente, com riscos reduzidos para doenças degenerativas (Weisburguer, 1999; Horváthová et al., 2001; Fredstrom, 2002).

O uso de plantas no tratamento e na cura de enfermidades é tão antigo quanto à espécie humana (Maciel et al., 2002). Há relatos do uso de plantas antidiabéticas na Índia desde o sexto século antes de Cristo (Grover, 2002), geralmente na forma de chás, obtendo-se um efeito que vêm sendo confirmado com o desenvolvimento da pesquisa científica (Carvalho et al., 2005).

Dados etnobotânicos relatam que cerca de 800 plantas com potencial antidiabético, apresentaram resultados positivos em ensaios experimentais (Grover et al., 2002).

Quanto às substâncias isoladas, mais de 200 compostos obtidos de plantas já mostraram efeito hipoglicemiante em ensaios farmacológicos, alguns destes compostos podem ter potencial terapêutico, enquanto outros podem produzir hipoglicemia devido a seus efeitos colaterais ou toxicidade, principalmente hepatotoxidade (Carvalho et al., 2005).

Entre as inúmeras espécies vegetais de interesse medicinal, vários estudos indicam a *Annona muricata* Linn. (família Annonaceae), conhecida popularmente como graviola, a qual tem raízes, fruto e folhas utilizados na medicina popular em várias regiões do mundo (Pereira et al., 2004; Cetto et al., 2005).

Muitos compostos bioativos e fitoquímicos são encontrados na graviola, e vários estudos têm mostrado ação hipoglicemiante, hipotensiva, sedativa, antiespasmódica, vasodilatadora, relaxante do músculo estomacal e atividade citotóxica contra células

cancerígenas a partir dos extratos e chás das folhas, troncos e raízes (Alali et al., 1999; Adewole et al., 2006).

Análises fitoquímicas revelaram que as folhas do gênero Annona são constituídas principalmente de alcalóides, triterpenos, flavonóides, polifenóis e taninos (Weniger et al., 1988; Ospina, et al, 1995) e dentre os componentes isolados, há um importante componente, o β-sitosterol (Wu et al., 1995; Chang et al., 1998).

Os fitosteróis, em geral, e particularmente o β-sitosterol vêm sendo considerados potentes agentes antiinflamatórios e com atividades antioxidantes e analgésicas (Bouic, 2001; De Jong et al., 2003; Lippiello et al., 2007)

Seria então, de grande interesse, trabalhos que associassem o β-sitosterol, componente ativo no gênero *Annona*, com as propriedades fitoterápicas atribuídas ao chá de folhas de graviola, tendo em vista a diversidade de usos medicinais atribuídos a esta planta.

Os objetivos deste trabalho foram determinar os efeitos do chá de folhas de graviola e do seu componente β-sitosterol, sobre parâmetros morfométricos, metabolismo basal, glicemia, adiposidade abdominal, calorimetria indireta e marcadores do estresse oxidativo sérico de ratos tratados com dieta controle e hipercalórica.

III. MATERIAIS E MÉTODOS

1. ANIMAIS

O protocolo experimental número 639 foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, SP, adotado pelo Colégio Brasileiro de experimentação Animal (COBEA). Foram utilizados 48 ratos machos *Wistar* de 85 dias de idade, peso inicial médio de 396 ± 37,27 g. Os animais foram provenientes do Biotério Central da UNESP "Campus de Botucatu" e transferidos para o "Laboratório de Bioquímica na Experimentação Animal", do Departamento de Química e Bioquímica, IB, UNESP, Botucatu, onde permaneceram durante todo o período experimental.

2. GRUPOS EXPERIMENTAIS

Os animais foram divididos em 6 grupos. Os grupos com inicial P (PC, PA e PB) receberam dieta padrão (DP) (Purina Labina, São Paulo, Brasil). Animais dos grupos com inicial H (HC, HA e HB) receberam ração rica em sacarose e colesterol (DH).

Dessa forma os grupos com n=8, foram divididos da seguinte maneira:

- **PC -** considerado controle, recebendo dieta padrão e água *ad libitum*;
- **PA** - receberam dieta padrão e solução de *Annona muricata ad libitum,* na forma de chá. A solução foi preparada utilizando-se 30g de folhas por litro de água, fervida, infundida por 15 minutos e posteriormente filtrada (Cetto et al., 2005);
- **PB** - mantidos com dieta padrão e para beber receberam solução aquosa com 0,02 g de β-sitosterol/L (Fluka - Sigma - St. Louis, MO, USA) *ad libitum*, dissolvido previamente em 1 mL de álcool etílico 99,8%. A quantidade de β-sitosterol ofertada em solução aquosa foi selecionada por corresponder a mesma dose encontrada em 30g de folhas de plantas ricas em fitoesteróis (Pegel, 1997);
- **HC** - recebendo dieta rica em colesterol e sacarose e água *ad libitum*;
- **HA** - receberam dieta rica em sacarose e colesterol e solução de *Annona muricata ad libitum*, como no grupo PA;
- **HB** – recebendo dieta rica em sacarose e colesterol e solução aquosa de β-sitosterol *ad libitum*, como no grupo PB

O período experimental foi de 49 dias (Diniz et al., 2008; Souza, et al., 2008). A ração ofertada para os animais dos grupos HC, HA e HB foi preparada a partir do farelo da ração padrão, ou controle (Purina Labina, São Paulo, Brasil), obtida pela trituração desta ração até formação de farelo homogêneo. Para cada 1000 g de farelo de ração foram adicionados 10,86g de colesterol, 1,08g de ácido cólico, 203,69g de sacarose e 88,26g de óleo de soja (Reeves, 1997; Quiles et al., 2003). A mistura foi homogeneizada com 2300 mL de água quente (inferior a 60º C), e colocada em máquina específica para formação de "pellets". Estes foram secos em estufa com ar circulante por um período de 24 h, em temperatura inferior a 70ºC. Após a secagem a ração foi conservada em câmara fria a 6ºC. A validade da ração preparada era de 3 meses.

A dieta rica em colesterol e sacarose utilizada apresentou 3,71 Kcal/g de energia metabolizável, ou conteúdo energético, sendo 0,73 Kcal/g proveniente de proteínas, 1,04 Kcal/g de lipídios e 1,93 Kcal/g de carboidratos. A ração padrão utilizada apresentou 3,00 Kcal/g de energia metabolizável, ou conteúdo energético, sendo 1,06 Kcal/g proveniente de proteínas, 0,34 Kcal/g de lipídios e 1,60 Kcal/g de carboidratos. As concentrações de fibras, umidade, vitaminas e sais minerais foram suficientes para a manutenção dos animais experimentais (Bieri et al., 1977). A análise da composição das dietas utilizadas foi realizada no Departamento de Tecnologia de Produtos Agropecuários da Faculdade de

Ciências Agronômicas e no Departamento de Bromatologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP, Botucatu.

A diferença calórica entre a ração padrão e a ração com colesterol e sacarose foi de 71,12 kcal/100g, ou 0,71kcal/g. O conteúdo de lipídios totais na ração padrão era de 3,8g/100g e na ração com colesterol e sacarose era de 11,61g/100g (11,86%). A ração para ratos, contendo colesterol e sacarose foi considerada hipercalórica. Segundo Quiles e colaboradores (2004), dietas hipercalóricas apresentam mais de 8% de lipídios. Para Gutman e colaboradores (1987), dietas hipercalóricas apresentam elevação no conteúdo calórico de 0,45kcal/g em relação à dieta padrão. Segundo Matsuo e colaboradores (1995), dieta hipercalórica apresenta elevação calórica superior a 0,32kcal/g em relação à dieta padrão.

3. OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS E DETERMINAÇÃO DE MARCADORES DO ESTRESSE OXIDATIVO

Após 49 dias de tratamento, os animais foram anestesiados. Foi determinado o comprimento corporal e a circunferência abdominal. A seguir, os animais foram submetidos à eutanásia através da decapitação. O sangue foi coletado em tubos de ensaio, com auxílio de funil. O soro foi separado por centrifugação a 3000 rpm e utilizado para determinações do hidroperóxido de lipídio (HP) e das substâncias antioxidantes totais (SAT).

O HP foi determinado através da oxidação do Fe^{2+} (sulfato ferroso amoniacal). O Fe^{3+} formado reage com alaranjado de xilenol formando composto colorido (Jiang et al., 1991). As substâncias antioxidantes totais (SAT) foram calculadas através da porcentagem de inibição na formação de HP (Mehmetcik et al., 1997).

As leituras espectrofotométricas foram realizadas no espectrofotômetro Pharmacia Biotech com temperatura controlada (U/V visible Ultrospec 5000, software Swift II, 974213, Cambridge, England, UK). Todos os reagentes eram de procedência Sigma (St. Louis, MO, USA).

4. PARÂMETROS NUTRICIONAIS

A ingestão alimentar e de líquidos foi controlada diariamente, no mesmo horário (9:00 as 11:00 horas). Foi ofertada 50g de ração e 60 mL líquido por animal, diariamente. O consumo alimentar e de liquidos diário foi calculado pela subtração da ração e do líquido restante, após o consumo *ad libitum* em 24 horas.

Os animais foram pesados antes do início do experimento e semanalmente durante todo o período experimental. Tendo como base o consumo alimentar diário médio, a energia da ração e o ganho de peso, foram calculados os parâmetros nutricionais (Ebaid et al., 2006; Novelli et al., 2007):

- Energia Ingerida (Kcal/dia) = consumo diário médio de ração x energia metabolizável da ração
- Eficiência Alimentar (EA) (%) = (ganho de peso/energia ingerida)/100

5. DETERMINAÇÃO DO METABOLISMO BASAL E UTILIZAÇÃO DE SUBSTRATO ENERGÉTICO

Após 42 dias do período experimental, foram determinados o metabolismo basal, o consumo de O_2 (VO_2) e a produção de CO_2 (VCO_2). A utilização de lipídios e carboidratos como fonte de energia foi obtida através do quociente respiratório (QR). As determinações foram realizadas com uso de câmara metabólica para sistema respiratório animal (CWE, Inc, St. Paul, USA), com medidas obtidas em computador através de programa específico (software MMX, CWE, Inc., USA), Figura 1. Após adaptação dos animais à câmara metabólica, Figura 2, a calorimetria indireta foi realizada nos animais após alimentação e após jejum de 12h, para que no momento da determinação o glicogênio muscular e hepático tenha sido depletado (COMMERFORD et al., 2000). Após a calibração do equipamento (temperatura e pressão) cada animal foi colocado na câmara metabólica permanecendo durante 10 minutos em repouso com fluxo de ar constante. Foram registrados o consumo de O_2 (VO_2) e a produção de CO_2 (VCO_2), permitindo evidenciar as alterações no QR nos grupos experimentais.

Tendo como base os dados da calorimetria indireta (VO_2, VCO_2 e TMB), energia total ingerida e peso corporal final, foram calculados:

- Consumo de oxigênio pela superfície corporal ($mL/h/g^{0,7}$) = VO_2 (mL/h)/superfície corporal ($g^{0,7}$) (Bray, 1969)
- Quociente respiratório (QR) = Produção de CO_2 (mL/h)/ consumo de O_2 (mL/h) (Labayen et al., 1999)
- Oxidação de lipídios (mg/min) = VO_2 x (1 – QR)/0,293 x 0,746 (Labayen et al., 1999)

- Oxidação de carboidrato = VO_2 x (QR – 0,707)/0,293 x 0,746 (Labayen et al., 1999)

- Balanço energético diário (kcal/dia) = energia ingerida (kcal/dia) – TMB (kcal/dia) (Labayen et al., 1999)

OBS: Para a determinação da oxidação de carboidratos e de lipídios, o VO_2 é medido em l/min, 1,00 é o QR para a oxidação total de carboidrato, 0,707 é o QR para a oxidação total de lipídios, 0,293 é a diferença entre 1,000 e 0,707; 0,746 é o numero de litros de oxigênio consumido por g de glicose oxidada.

Figura 1. Aparelho de calorimetria indireta com câmara metabólica para sistema respiratório animal e computador com programa específico para a obtenção de medidas (software MMX, CWE, Inc., USA).

Figura 2. Animais durante a determinação da calorimetria indireta na câmara metabólica para sistema respiratório animal (CWE, Inc, St. Paul, USA).

6. DETERMINAÇÃO DO TESTE ORAL DE TOLERÂNCIA À GLICOSE (TOTG), DA RESPOSTA GLICÊMICA E PARÂMETROS MORFOMÉTRICOS.

Após 49 dias do período experimental foi realizado o TOTG. Após determinação da glicemia de jejum (12-14 horas), foi administrada solução aquosa de glicose 20% (2g/Kg) pela via oral (intra-gástrica). A glicemia foi determinada com uso de glicosímetro (Boehringer Mannheim, Eli Lilly, SP,Brasil) no sangue coletado pela cauda, 30, 60, 90 e 120 minutos após a administração de glicose. Tendo como base a concentração de glicose pós prandial foi calculada a resposta glicêmica dos animais (Wolever et al., 1986; 1991).

Após o TOTG as animais foram anestesiados (pentobarbital sódico 3%, 0,1mL, i.p.). Foi determinada a circunferência abdominal, bem como o comprimento corporal total (exceto cauda). Estas determinações foram usadas para o cálculo dos parâmetros morfométricos, como o índice de massa corporal (IMC) (g/cm^2) = peso corporal/comprimento corporal^2 (Novelli et al., 2007), o índice de Lee (g/cm) = raiz cúbica do peso corporal/ comprimento corporal (Bernardis, 1970) e a superfície corporal (peso corporal^{0,7}) (Novelli et al., 2007).

7. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos foram expressos em média ± desvio padrão. A metodologia estatística na comparação entre os grupos foi a análise de variância (ANOVA) para o modelo com dois fatores (dieta e suplementação), complementada com o teste de comparações múltiplas de Tukey (Zar, 1999). O nível de significância foi de 5% para a discussão dos resultados (Norman & Streiner, 1994)

As letras utilizadas nas Tabelas são referentes as seguintes comparações:

-Letras maiúsculas: comparação entre os grupos com a mesma dieta;

-Letras minúsculas: comparação entre os grupos com diferentes dietas;

-Letras distintas: diferença significante entre as variáveis.

IV. RESULTADOS

Na Tabela 1 está apresentada a composição das rações padrão e hipercalórica utilizadas no experimento. Como pode ser observado, houve elevação no conteúdo de lipídios e carboidratos totais na ração rica em colesterol e sacarose (hipercalórica), uma vez que no preparo desta ração foram adicionados óleo de soja e sacarose. Desde que houve

acréscimo de ácidos graxos insaturados e sacarose, a dieta hipercalórica apresentou conteúdo calórico de 371,12 Kcal/100g, comparada à dieta padrão com 300,28 Kcal/100g.

Os animais utilizados iniciaram o estudo com peso inicial médio de 396 ± 37,27 g. Após sete semanas de tratamento não houve diferença estatística no peso corporal final bem como no ganho de peso e no índice de massa corporal (IMC) entre os grupos que receberam a mesma dieta. Animais que receberam dieta hipercalórica (DH) apresentaram maior peso corporal final e ganho de peso, quando comparados aos animais que receberam dieta padrão (DP). Animais do grupo HA apresentaram menor circunferência abdominal do que os animais dos grupos HB e HC (Tabela 2). Podemos observar que os grupos que receberam dieta hipercalórica apresentaram maior índice de Lee e maior superfície corporal do que os animais que receberam dieta padrão. O índice de massa corpórea (IMC) foi maior nos animais do grupo HA quando comparado ao grupo PA e não diferiu nos demais grupos.

Na Figura 3 pode-se observar que houve correlação positiva extremamente significante entre o IMC (g/cm^2) e o peso final (g) ($r=0,7700$ e $p<0,01$) e também entre o Índice de Lee e o peso final ($r=0,9582$ e $p<0,01$) (Figura 4).

Chá de graviola e β-sitosterol não modificaram a ingestão alimentar dos diferentes grupos. Os grupos que receberam DH tiveram menor ingestão de proteínas comparados aos grupos que receberam DP. Chá de graviola e β-sitosterol não induziram alteração na ingestão de lipídios e de carboidratos nos animais dos grupos DP e DH. Dieta hipercalórica aumentou a ingestão de lipídios e de carboidratos nos animais dos grupos DH, quando comparados aos seus controles mantidos com DP. Animais dos grupos HC, HA e HB tiveram a energia ingerida aumentada em relação aos grupos PC, PA e PB, respectivamente (Tabela 3).

A ingestão de β-sitosterol diminuiu significativamente a resposta glicêmica nos animais dos grupos PB e HB. Animais mantidos com DH apresentaram maior resposta glicêmica do que animais mantidos com DP, em relação aos seus respectivos controles. A eficiência alimentar esteve diminuída nos animais que receberam DP em relação aos mantidos com DH, sendo que animais dos grupos PA e PB apresentaram menor eficiência alimentar quando comparados ao grupo PC, o que também pode ser observado nos grupos HA e HB em relação ao grupo HC (Tabela 3).

A ingestão de líquidos foi maior nos animais do grupo PA em relação aos animais do grupo PC e não foi diferente do grupo HA (Tabela 3).

Foi observada correlação positiva extremamente significante entre a energia ingerida (Kcal/dia) e o peso final ($r=0,7607$ e $p<0,01$) (Figura 5).

Na Tabela 4 estão apresentados os valores da glicemia de jejum, teste oral de tolerância à glicose (TOTG), após 30, 60, 90 e 120 minutos da administração de glicose, além da concentração de hidroperóxido de lipídio (HP) e da porcentagem de substâncias antioxidantes totais (SAT) no soro dos animais. A glicemia de jejum mostrou-se reduzida no grupo HA em relação ao grupo HC. HA e HB apresentaram menor glicemia após 60, 90 e 120 minutos em relação ao grupo HC. Os grupos que receberam DH apresentaram maior glicemia que os animais que receberam DP após 30, 60 e 90 minutos. Após 120 minutos a glicemia não diferiu significativamente entre os grupos PA e HA, bem como entre os grupos PB e HB. Podemos verificar que animais que ingeriram dieta hipercalórica apresentaram maior concentração de HP e maior porcentagem de SAT do que animais que ingeriram dieta padrão. A porcentagem de SAT também esteve elevada nos animais dos grupos PB em relação ao grupo PC e HB em relação ao grupo HC.

Na Figura 6 está apresentada a curva glicêmica, representada pela média dos diferentes grupos.

Na Tabela 5 estão apresentados os valores da calorimetria indireta, durante o período alimentado, na qual podemos notar que animais que ingeriram dieta hipercalórica, quando comparados aos seus respectivos controles, os quais ingeriram dieta padrão, apresentaram elevação no consumo de oxigênio, na produção de gás carbônico, no VO_2 específico (VO_2 mL/h/g), no VO_2 ajustado pela superfície corporal, na oxidação de lipídios, na taxa metabólica de repouso e diminuição no quociente respiratório. A ingestão de chá de folhas de graviola, em animais que ingeriram DH, grupo HA, aumentou o consumo de oxigênio, o VO_2 específico, e o VO_2 ajustado pela superfície corporal. Este mesmo grupo apresentou redução significante no quociente respiratório, indicando maior oxidação de lipídios nestes animais, quando comparados ao seu controle, grupo, HC. Grupo HA também apresentou aumento na taxa metabólica de repouso em relação ao grupo HC.

Animais que ingeriram β-sitosterol apresentaram elevação no consumo de oxigênio, no VO_2 específico e no VO_2 ajustado pela superfície corporal. Essa diferença foi significante em animais que ingeriram dieta padrão, em relação ao grupo PC e embora tenha sido aumentada, não foi significante em animais que ingeriram dieta hipercalórica, quando comparados ao grupo HC (Tabela 5).

Beta-sitosterol diminuiu a produção de gás carbônico e o VCO_2 específico tanto em animais mantidos com DP quanto em animais mantidos com DH, em relação aos seus

respectivos controles. A oxidação de lipídios, bem como a taxa metabólica de repouso estiveram elevadas em animais dos grupos PB e HB, em relação aos animais dos grupos PC e HC, respectivamente. A oxidação de carboidratos não foi detectada nos grupos PB e HB em relação aos grupos PC e HC, no período alimentado.

Ainda na Tabela 5, podemos observar que o quociente respiratório foi menor em animais que ingeriram β-sitosterol e dieta padrão, em relação ao grupo PC e também foi menor em animais que receberam β-sitosterol e dieta hipercalórica, quando comparados ao grupo HC.

Na Tabela 6, estão apresentados os valores referentes à calorimetria indireta, realizada após o período de jejum dos animais. Pode-se notar que tanto em animais que ingeriram dieta padrão, quanto em animais que ingeriram dieta hipercalórica, chá de folhas de graviola aumentou o consumo de oxigênio, o VO_2 específico e o VO_2 ajustado pela superfície corporal. Grupos PA e HA também apresentaram menor quociente respiratório, indicando maior utilização de lipídios como substratos energéticos em relação aos grupos PC e HC, respectivamente. Houve elevação na taxa metabólica basal nos animais dos grupos PA e HA em relação aos grupos PC e HC respectivamente. Animais que receberam DH apresentaram maior balanço energético do que animais mantidos com DP. O balanço energético foi menor no grupo HA em relação ao grupo HC. A liberação de CO_2 esteve menor em animais do grupo PA, em relação ao grupo PC. Tanto animais que ingeriram chá de folhas de graviola e DP, quanto animais que ingeriram chá de folhas de graviola e DH apresentaram menor VCO_2 específico em relação aos seus respectivos controles.

β-sitosterol, no período de jejum, elevou o consumo de O_2 em animais dos grupos PB e HB em relação aos seus controles.

Ainda na Tabela 6, podemos observar que durante o jejum, a liberação de gás carbônico foi menor no grupo PB em relação ao grupo PC. Animais dos grupos PB e HB tiveram o VO_2 específico elevado em relação aos grupos PC e HC, respectivamente. O VCO_2 específico foi menor no grupo HB em relação ao grupo HC. Grupos PB e HB apresentaram elevação no VO_2 ajustado pela superfície corporal, na oxidação de lipídios e na taxa metabólica basal em relação aos grupos PC e HC, respectivamente.

Durante o jejum, a oxidação de carboidratos não foi detectada em animais que ingeriram β-sitosterol, assim como nos demais grupos. O quociente repiratório foi menor nos animais que ingeriram β-sitosterol, tanto nos mantidos com dieta padrão, quanto nos grupos que ingeriram dieta hipercalórica.

Tabela 1. Composição das rações padrão e hipercalórica

Componentes	Padrão		Hipercalórica	
	g/100g	**Kcal/100g**	**g/100g**	**Kcal/100g**
Proteína	26,52	106,08	18,32	73,28
Lipídio total	3,80	34,20	11,61	104,49
Óleo de soja	-	-	8,98	80,82
Lipídios saturados	3,80	34,20	2,63	23,67
Carboidrato total	40	160	48,37	193,48
Sacarose	-	-	20,73	82,92
Fibra	4,42	-	3,05	-
Colesterol	-	-	1,10	-
Ácido cólico	-	-	0,11	-
Outros (*)	25,20	-	17,41	-
Total	***100***	***300,28***	***100***	***371,12***

(*) *Umidade*, *Vitaminas*: (mg/Kg de ração) (A) 25,000 UI; (B_1) 8,0 mg; (B_2) 30,00 mg; (B_6) 14,0 mg; (B_{12}) 40,0 mcg; (D_3) 5,000 UI; (E) 60,0 mg; (K) 6,0 mg; Biotina 80,0 mg; Niacina 80,0 mg; Ácido fólico 3,0 mg; Ácido pantotênico 50,0 mg, Colina 1200 mg, *Sais Minerais*: Zinco 70,0 mg; Cobre 10,0 mg; Iodo 2,0 mg; Manganês 70,0 mg; Cobalto 1,5 mg; Ferro 50,0 mg; Selênio 0,1 mg e L-Lisina 1,2% e Metionina 0,45%. Composição básica do produto: milho moído, farelo de soja, farelo de trigo, calcário calcítico, fosfato bicálcico, cloreto de sódio (sal comum). Composição das dietas determinada no Departamento de Tecnologia de Produtos Agropecuários da Faculdade de Ciências Agronômicas e Departamento de Bromatologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Unesp, Botucatu.

Tabela 2. Peso inicial, peso final, ganho de peso total, circunferência abdominal, comprimento, índice de Lee, índice de massa corporal (IMC) e superfície corporal dos animais do grupo controle, mantidos com ração padrão (P) ou hipercalórica (H), sem suplementação (C), com suplementação nutricional de chá de folhas de *Annona muricata* L. (A) e β-sitosterol (B).

Variável	Dieta	Grupos		
		C	A	B
Peso inicial (g)	**P**	384,55 ± 33,20	383,46±38,27	383,36±38,73
	H	396,82±21,41	411,49±41,16	419,13±43,71
Peso final (g)	**P**	436,29±27,99^{a}	425,56±38,42^{a}	427,24±36,54^{a}
	H	475,14±26,92^{b}	474,38±38,71^{b}	482,79±34,25^{b}
Ganho de peso (g)	**P**	53,86±18,92^{a}	42,10±15,56^{a}	43,88±10,96^{a}
	H	85,35±14,46^{b}	71,52±11,36^{b}	73,96±12,56^{b}
Circunferência abdominal (cm)	**P**	18,25±0,65^{a}	17,75±0,53^{a}	17,88±0,52^{a}
	H	18,50±0,46^{Ba}	17,88±0,23^{Aa}	19,20±0,66^{Cb}
Comprimento (cm)	**P**	24,94±0,68^{a}	25,19±0,70^{a}	25,06±0,62^{a}
	H	25,63±0,44^{b}	25,69±0,70^{a}	26,05±0,68^{b}
Índice de Lee	**P**	5,83±0,27^{a}	5,63±0,42^{a}	5,68±0,37^{a}
	H	6,18±0,36^{b}	6,15±0,40^{b}	6,18±0,47^{b}
IMC (g/cm^{2})	**P**	0,70±0,03^{a}	0,67±0,05^{a}	0,68±0,03^{a}
	H	0,72±0,05^{a}	0,72±0,04^{b}	0,71±0,06^{a}
Superfície corporal (g^{0,7})	**P**	70,42±3,18^{a}	69,17±4,37^{a}	69,37±4,16^{a}
	H	74,76±2,99^{b}	74,54±2,53^{b}	74,78±3,29^{b}

Valores expressos como média ± desvio padrão ($p<0,05$).
Letras maiúsculas: comparação entre os grupos com a mesma dieta
Letras minúsculas: comparação entre os grupos com diferentes dietas
Letras distintas: diferença significante entre as variáveis

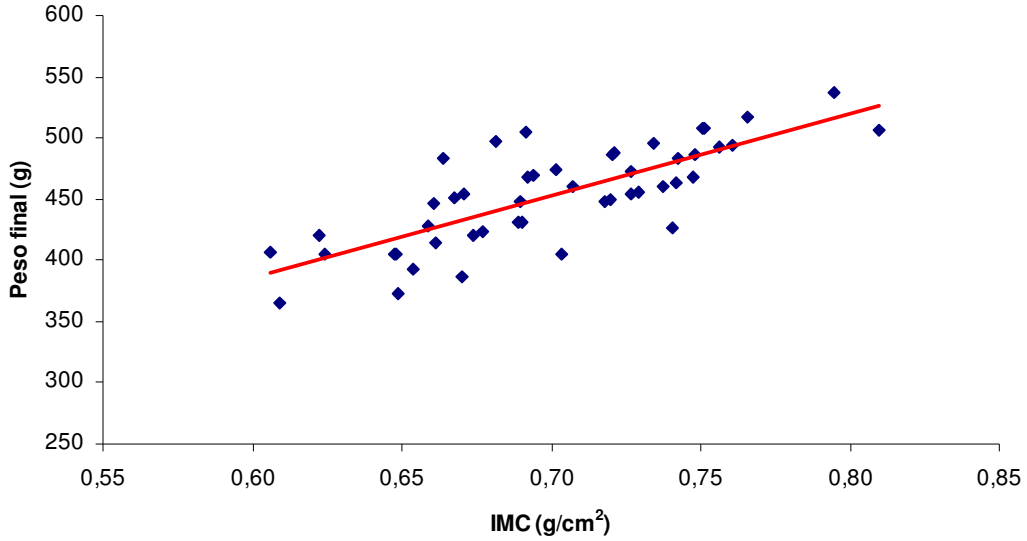

Figura 3. Relação linear entre o peso final (g) e o índice de massa corpórea (IMC) (g/cm^2) nos animais alimentados com dieta padrão, que receberam chá de graviola e β-sitosterol e animais alimentados com dieta hipercalórica, que receberam chá de graviola e β-sitosterol. Valores de r=0,7700 e p<0,01.

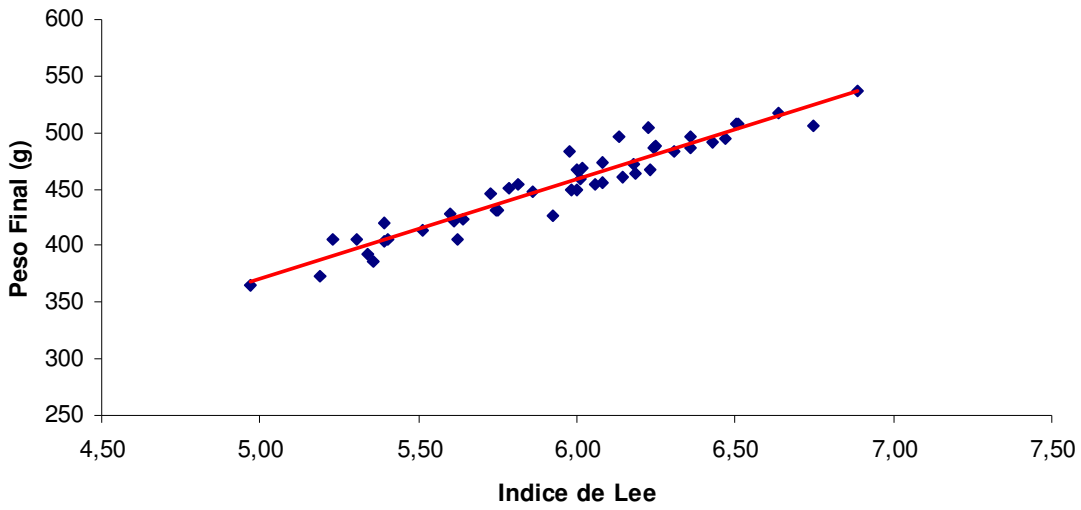

Figura 4. Relação linear entre o peso final (g) e o índice de Lee nos animais alimentados com dieta padrão, que receberam chá de graviola e β-sitosterol e animais alimentados com dieta hipercalórica, que receberam chá de graviola e β-sitosterol. Valores de r=0,9582 e p<0,01.

Tabela 3. Ingestão alimentar, ingestão de proteínas, ingestão de lipídios, ingestão de carboidratos, energia ingerida, resposta glicêmica, eficiência alimentar, ingestão de líquidos dos animais do grupo controle, mantidos com ração padrão (P) ou hipercalórica (H), sem suplementação (C), com suplementação nutricional de chá de folhas de *Annona muricata* L. (A) e β-sitosterol (B).

Variável	Dieta	Grupos		
		C	A	B
Ingestão alimentar (g/dia)	**P**	22,24±2,06	23,54±1,32	23,71±1,76
	H	23,28±1,05	23,43±1,51	24,87±1,92
Ingestão de proteínas (g/dia)	**P**	5,78±0,41^{b}	6,09±0,34^{b}	6,13±0,45^{b}
	H	4,19±0,19^{a}	4,22±0,27^{a}	4,48±0,35^{a}
Ingestão de lipídios (g/dia)	**P**	0,82±0,08^{a}	0,87±0,05^{a}	0,88±0,07^{a}
	H	2,66±0,12^{b}	2,67±0,13^{b}	2,79±0,15^{b}
Ingestão de carboidratos (g/dia)	**P**	8,68±0,81^{a}	9,18±0,51^{a}	9,25±0,69^{a}
	H	11,06±0,50^{b}	11,13±0,52^{b}	11,58±0,59^{b}
Energia ingerida (Kcal/dia)	**P**	66,71±6,19^{a}	70,61±3,95^{a}	71,13±5,27^{a}
	H	84,74±3,82^{b}	85,30±5,51^{b}	88,74±4,68^{b}
Resposta glicêmica (mg/dLh)	**P**	21,5±2,70^{Ba}	22,1±2,70^{Ba}	15,00±3,10^{Aa}
	H	32,8±3,70^{Bb}	34,40±3,00^{Bb}	24,20±3,20^{Ab}
Eficiência alimentar (%)	**P**	77,74±6,92^{Ba}	58,78±7,70^{Aa}	60,08±8,89^{Aa}
	H	100,31±10,03^{Bb}	83,62±8,53^{Ab}	83,62±10,19^{Ab}
Ingestão de líquidos (mL/dia)	**P**	34,80±3,44^{Aa}	39,48±1,78^{Ba}	36,72±3,13^{ABa}
	H	40,36±4,47^{b}	40,28±3,65^{a}	41,14±4,23^{b}

Valores expressos como média ± desvio padrão ($p<0,05$).
Letras maiúsculas: comparação entre os grupos com a mesma dieta
Letras minúsculas: comparação entre os grupos com diferentes dietas
Letras distintas: diferença significante entre as variáveis

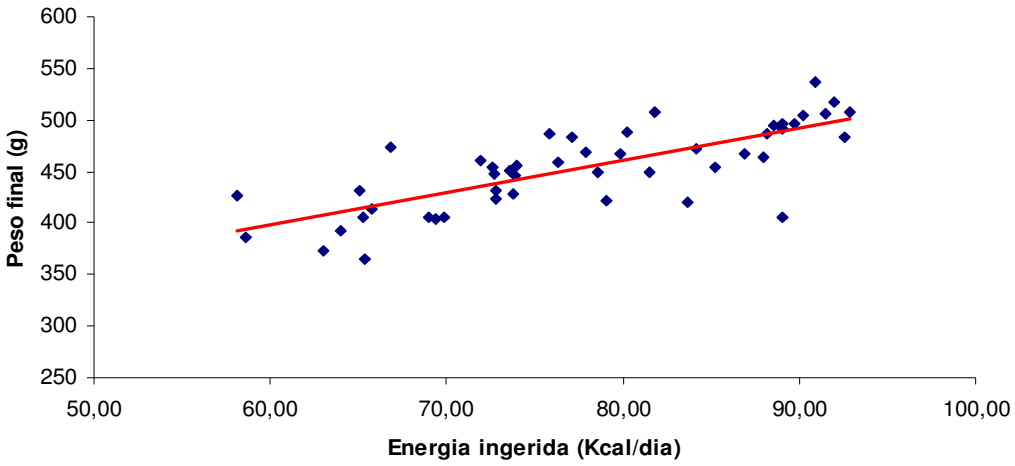

Figura 5. Relação linear entre o peso final (g) e a energia ingerida (Kcal/dia) nos animais alimentados com dieta padrão, que receberam chá de graviola e β-sitosterol e animais alimentados com dieta hipercalórica, que receberam chá de graviola e β-sitosterol. Valores de r=0,7607 e p<0,01.

Tabela 4. Glicemia de jejum, teste oral de tolerância a glicose, concentração de hidroperóxido de lipídio (HP) e substâncias antioxidantes totais (SAT) dos animais do grupo controle, mantidos com ração padrão (P) ou hipercalórica (H), sem suplementação (C), com suplementação nutricional de chá de folhas de *Annona muricata* L. (A) e β-sitosterol (B).

Variável	Dieta	Grupos		
		C	A	B
Jejum	**P**	73,25 ±5,20^{a}	70,00±11,56^{a}	73,63±3,58^{b}
	H	74,50 ±9,94^{Ba}	63,25±7,36^{Aa}	66,00±6,00^{ABa}
30 minutos	**P**	78,25±11,63^{a}	85,38±12,89^{a}	84,75±8,78^{a}
	H	109,00±11,55^{b}	102,53±12,39^{b}	98,50±6,12^{b}
60 minutos	**P**	81,88±12,28^{a}	88,38±12,02^{a}	86,63±8,00^{a}
	H	118,50±11,30^{Bb}	101,13±9,52^{Ab}	101,75±10,25^{Ab}
90 minutos	**P**	78,61±9,78^{a}	82,63±9,58^{a}	83,13±5,84^{a}
	H	106,88±5,38^{Bb}	92,63±4,96^{Ab}	91,75±3,06^{Ab}
120 minutos	**P**	77,97±6,11^{Aa}	75,31±8,86^{Aa}	79,06±5,36^{Aa}
	H	99,00±3,70^{Bb}	87,50±6,41^{Aa}	89,88±2,90^{Aa}
HP (nmol/mL)	**P**	8,40±0,60^{a}	8,17±0,24^{a}	8,67±0,26^{a}
	H	9,12±0,63^{b}	9,11±0,53^{b}	9,52±0,58^{b}
SAT (%)	**P**	10,31±3,25^{Aa}	9,59±2,70^{Aa}	15,51±3,27^{Ba}
	H	17,35±2,57^{Ab}	19,58±3,11^{Ab}	23,26±3,71^{Bb}

Valores expressos como média ± desvio padrão ($p<0,05$).
Letras maiúsculas: comparação entre os grupos com a mesma dieta
Letras minúsculas: comparação entre os grupos com diferentes dietas
Letras distintas: diferença significante entre as variáveis

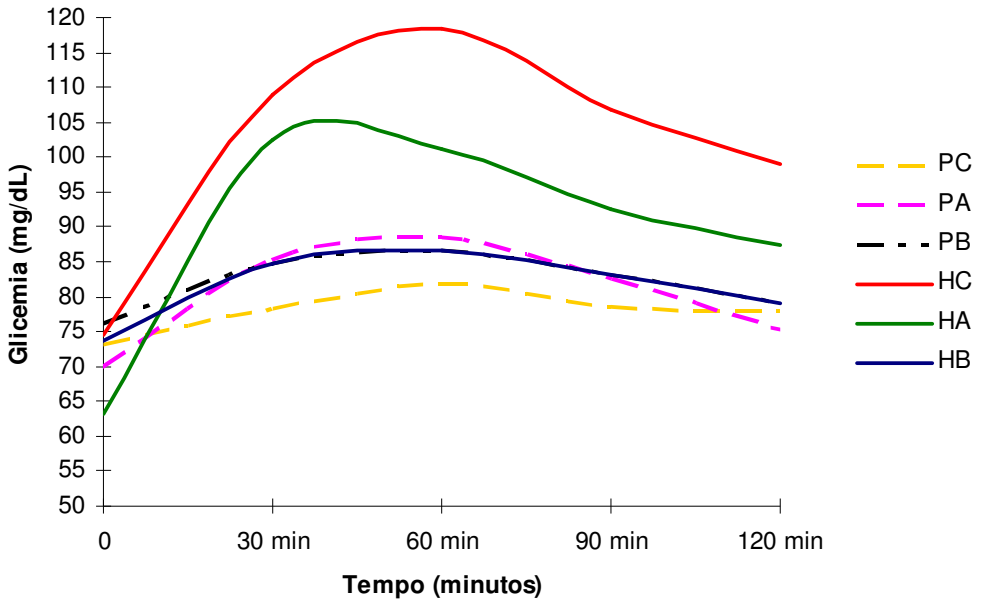

Figura 6. Curva glicêmica dos animais do grupo controle, mantidos com ração padrão (P) ou hipercalórica (H), sem suplementação (C), com suplementação nutricional de chá de folhas de *Annona muricata* L. (A) e β-sitosterol (B).

Tabela 5. Oxigênio inspirado (VO_2), gás carbônico expirado (VCO_2), VO_2/g de peso corporal, VCO_2/g de peso corporal, VO_2/superfície corporal, oxidação de lipídios, oxidação de carboidratos, quociente respiratório (QR, VCO_2/VO_2), taxa metabólica de repouso (TMR) e relação TMR/peso corporal, no estado alimentado dos animais do grupo controle, mantidos com ração padrão (P) ou hipercalórica (H), sem suplementação (C), com suplementação nutricional de chá de folhas de *Annona muricata* L. (A) e β-sitosterol (B).

Variável	Dieta	Grupos		
		C	A	B
VO_2 (mL/min)	**P**	$2,42\pm0,55^{Aa}$	$2,84\pm0,50^{Aa}$	$3,77\pm0,47^{Ba}$
	H	$3,86\pm0,31^{Ab}$	$4,77\pm0,79^{Bb}$	$4,53\pm0,54^{Ab}$
VCO_2 (mL/min)	**P**	$2,42\pm0,05^{Ba}$	$2,41\pm0,04^{Ba}$	$2,33\pm0,02^{Aa}$
	H	$2,48\pm0,004^{Bb}$	$2,48\pm0,005^{Bb}$	$2,47\pm0,012^{Ab}$
VO_2/peso corporal (mL/h/g)	**P**	$0,31\pm0,07^{Aa}$	$0,36\pm0,07^{Aa}$	$0,47\pm0,06^{Ba}$
	H	$0,48\pm0,03^{Ab}$	$0,59\pm0,09^{Bb}$	$0,56\pm0,07^{ABb}$
VCO_2/peso corporal (mL/h/g)	**P**	$0,31\pm0,01^{Ba}$	$0,31\pm0,01^{Ba}$	$0,29\pm0,003^{Aa}$
	H	$0,31\pm0,002^{Ba}$	$0,31\pm0,003^{Ba}$	$0,30\pm0,003^{ABb}$
VO_2/superfície corporal	**P**	$1,95\pm0,45^{Aa}$	$2,26\pm0,42^{Aa}$	$2,98\pm0,37^{Ba}$
	H	$3,08\pm0,24^{Ab}$	$3,77\pm0,63^{Bb}$	$3,58\pm0,45^{ABb}$
Oxidação de lipídios (mg/min)	**P**	$1,12\pm0,74^{Aa}$	$1,68\pm0,90^{Aa}$	$4,01\pm0,84^{Ba}$
	H	$3,50\pm0,78^{Ab}$	$5,35\pm1,63^{Bb}$	$5,23\pm1,37^{Bb}$
Oxidação de carboidratos (mg/min)	**P**	1,91±0,97	1,19±0,77	-
	H	-	-	-
QR	**P**	$0,88\pm0,10^{Bb}$	$0,79\pm0,11^{Bb}$	$0,66\pm0,07^{Ab}$
	H	$0,65\pm0,05^{Ba}$	$0,54\pm0,09^{Aa}$	$0,55\pm0,06^{Aa}$
TMR (Kcal/hora)	**P**	$0,72\pm0,13^{Aa}$	$0,82\pm0,12^{Aa}$	$1,04\pm0,11^{Ba}$
	H	$1,07\pm0,07^{Ab}$	$1,27\pm0,14^{Bb}$	$1,22\pm0,13^{Bb}$
TMR/peso corporal	**P**	$0,04\pm0,006^{Aa}$	$0,04\pm0,006^{Aa}$	$0,05\pm0,005^{Ba}$
	H	$0,05\pm0,003^{Ab}$	$0,05\pm0,03^{Bb}$	$0,06\pm0,01^{Bb}$

Valores expressos como média ± desvio padrão ($p<0,05$).
Letras maiúsculas: comparação entre os grupos com a mesma dieta
Letras minúsculas: comparação entre os grupos com diferentes dietas
Letras distintas: diferença significante entre as variáveis; (-) Valor não detectado

Tabela 6. Volume de oxigênio inspirado (VO_2), volume de gás carbônico expirado (VCO_2), VO_2/g de peso corporal, VCO_2/g de peso corporal, VO_2 na superfície corporal, oxidação de Lipídios, oxidação de Carboidratos, quociente respiratório (QR, VCO_2/VO_2), taxa metabólica basal, relação TMB/peso corporal e balanço energético, após jejum dos animais do grupo controle, mantidos com ração padrão (P) ou hipercalórica (H), sem suplementação (C), com suplementação nutricional de chá de folhas de *Annona muricata* L. (A) e β-sitosterol (B).

Variável	Dieta	Grupos		
		C	A	B
VO_2 (mL/min)	**P**	$3,35\pm0,63^{A}$	$3,83\pm0,65^{B}$	$3,94\pm0,35^{B}$
	H	$3,29\pm0,74^{A}$	$4,50\pm1,09^{B}$	$4,52\pm0,74^{B}$
VCO_2 (mL/min)	**P**	$2,44\pm0,018^{Ba}$	$2,34\pm0,063^{Aa}$	$2,33\pm0,04^{Aa}$
	H	$2,43\pm0,017^{Aa}$	$2,48\pm0,009^{Bb}$	$2,48\pm0,005^{Bb}$
VO_2(mL/h/g)	**P**	$0,40\pm0,07^{A}$	$0,49\pm0,07^{B}$	$0,49\pm0,04^{B}$
	H	$0,41\pm0,09^{A}$	$0,55\pm0,14^{B}$	$0,56\pm0,09^{B}$
VCO_2 (mL/h/g)	**P**	$0,31\pm0,003^{Ba}$	$0,30\pm0,003^{Ab}$	$0,31\pm0,003^{Bb}$
	H	$0,31\pm0,003^{Ba}$	$0,29\pm0,006^{Aa}$	$0,29\pm0,002^{Aa}$
VO_2/superfície corporal	**P**	$2,84\pm0,3^{A}$	$3,32\pm0,19^{B}$	$3,15\pm0,23^{B}$
	H	$2,63\pm0,59^{A}$	$3,64\pm0,89^{B}$	$3,57\pm0,6^{B}$
Oxidação de lipídios (mg/min)	**P**	$2,32\pm1,58^{A}$	$4,17\pm1,33^{B}$	$4,05\pm1,06^{B}$
	H	$2,36\pm1,46^{A}$	$4,91\pm2,01^{B}$	$4,85\pm2,03^{B}$
Oxidação de carboidratos (mg/min)	**P**	-	-	-
	H	-	-	-
QR	**P**	$0,71\pm0,09^{B}$	$0,59\pm0,07^{A}$	$0,61\pm0,07^{A}$
	H	$0,71\pm0,09^{B}$	$0,55\pm0,11^{A}$	$0,58\pm0,10^{A}$
TMB (Kcal/hora)	**P**	$1,00\pm0,09^{A}$	$1,12\pm0,06^{B}$	$1,10\pm0,06^{B}$
	H	$0,92\pm0,19^{A}$	$1,25\pm0,23^{B}$	$1,19\pm0,19^{B}$
TMB/peso corporal	**P**	$0,05\pm0,008^{A}$	$0,06\pm0,003^{B}$	$0,06\pm0,005^{B}$
	H	$0,05\pm0,01$	$0,06\pm0,01$	$0,06\pm0,01$
Balanço Energético (Kcal/dia)	**P**	$44,71\pm4,48^{a}$	$43,64\pm3,95^{a}$	$46,01\pm4,14^{a}$
	H	$62,58\pm3,82^{Bb}$	$55,09\pm3,96^{Ab}$	$60,18\pm4,68^{Bb}$

Valores expressos como média ± desvio padrão ($p<0,05$).
Letras maiúsculas: comparação entre os grupos com a mesma dieta
Letras minúsculas: comparação entre os grupos com diferentes dietas
Letras distintas: diferença significante entre as variáveis; (-) Valor não detectado

V. DISCUSSÃO

Este trabalho avaliou, pela primeira vez, os efeitos da ingestão do chá de folhas de graviola (*Annona muricata* Linn) e do seu componente β-sitosterol, sobre parâmetros morfométricos, metabolismo basal, glicemia, adiposidade abdominal, calorimetria indireta e marcadores de estresse oxidativo sérico em ratos tratados com dieta controle e hipercalórica. As condições gerais dos animais apresentaram-se normais durante o período experimental.

A ingestão de dieta hipercalórica proporcionou um aporte de energia que excedeu os gastos energéticos do organismo, fato que resultou a elevação do ganho de peso o que foi associado à elevada caloria da dieta hipercalórica (3,71 Kcal/g), comparada à dieta padrão (3,00 Kcal/g) (Tabela 1).

Animais que ingeriram dieta hipercalórica apresentaram maior ganho de peso e peso final do que animais que ingeriram dieta padrão (Tabela 2).

Embora os carboidratos representem importantes constituintes energéticos, a observação de que dieta com baixa concentração de carboidratos poderia ser usada na prevenção de danos cardiovasculares (Kenchaiah et al., 2002; Pereira et al., 2003; Carmona et al., 2009; Novelli et al., 2009), levou muitos indivíduos a utilizarem alimentação com baixo teor de carboidratos e elevada concentração de proteínas.

A procura de nutrição ideal levou ainda à chamada dieta vegetariana (Bergan et al., 1980; Tricopoulou et al., 2000). No entanto, a ingestão de sacarose e, conseqüentemente, frutose tem crescido, principalmente pelo aumento no consumo de refrigerantes, cereais matinais, condimentos e sobremesas adoçadas com sacarose e xarope de milho (Elliot et al., 2002).

De maneira geral, quando a energia ingerida excede o gasto energético, o excesso de energia é depositado como gordura, caracterizando a obesidade (Iossa et al., 2003). Considerando desta maneira simplista, desde que obesidade é observada quando a energia ingerida excede o gasto energético, intuitivamente a perda de peso seria obtida quando a ingestão calórica fosse menor que o gasto energético, independentemente dos componentes da dieta. Entretanto, a variação nos componentes da dieta, além do conteúdo calórico, bem como o número de refeições diárias influenciam consideravelmente o ganho de peso (Acheson, 2004) e os parâmetros metabólicos a ela associados (Faine et al., 2002; Diniz et al., 2002).

Estudos recentes reportaram que dieta rica em lipídios produziu aumento no peso corporal depois de oito semanas de tratamento, comparado com o grupo que recebeu dieta padrão, demonstrando que maior energia ingerida, quando comparado ao grupo controle contribui para o surgimento de obesidade (Hill et al., 2000; Kim et al., 2005).

Animais que ingeriram dieta hipercalórica apresentaram maior consumo de lipídios e de carboidratos e menor consumo de proteínas, do que animais que ingeriram dieta padrão. Estes fatos foram associados a modificações nos componentes da dieta hipercalórica. A dieta hipercalórica utilizada quando comparada a padrão, continha quantidades elevadas de lipídios e de carboidratos, bem como redução no conteúdo de proteínas (Tabela 1). Segundo Reeves (1997) ratos adultos necessitam de 14% de proteína para a manutenção do peso e desenvolvimentos normais. A dieta hipercalórica apresentava 18,32% de proteína, não sendo, portanto, hipoproteíca. Além do acréscimo de colesterol (1,10g/100g), foram também acrescentados 20,73g/100g de sacarose e 8,98g/100g de óleo de soja. É evidente que além da elevação na caloria, a dieta hipercalórica utilizada apresentou alteração nos macronutrientes (Tabela 1).

Dietas ricas em energia podem antecipar os efeitos da idade no ganho de peso, na forma de gordura, tanto em humanos quanto em roedores jovens (Iossa et al., 2003). Estudos prévios em nosso laboratório demonstraram que dieta rica em carboidratos leva a alterações metabólicas como aumento do ganho de peso corporal, do índice de massa corporal (IMC), índice de Lee e da superfície corporal de animais (Faine et al., 2002; Ebaid et al., 2006; Diniz et al., 2008). De fato, houve correlação positiva entre energia ingerida e peso final (Figura 5).

As análises do ganho de peso corporal, peso final, índice de Lee e superfície corporal demonstraram que o chá de folhas de graviola e o seu componente, β-sitosterol, não induziram alterações nestes parâmetros, tanto nos animais com dieta padrão como na hipercalórica (Tabela 2). O que demonstra que tanto o chá quanto o β-sitosterol não agiram sobre a prevenção do ganho de peso, discordando de algumas publicações anteriores, as quais reportaram que o chá é utilizado por algumas populações como agente emagrecedor (Dickel et al., 2007; Agra et al., 2008).

HA apresentou menor circunferência abdominal do que animais dos grupos HC e HB. A menor circunferência abdominal pode ser um indicativo de melhora no perfil lipídico. Indivíduos com elevada circunferência abdominal apresentaram maiores riscos para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares (Solati et al., 2004).

Embora não tenha sido observada elevação no IMC em animais que ingeriram dieta hipercalórica, estes animais apresentaram aumento no índice de Lee e na superfície corporal, independente da ingestão de chá de graviola e o seu componente, β-sitosterol. Desde que a elevação do índice de Lee (Bernardis, 1970) é um dos parâmetros utilizados para caracterizar obesidade, pode-se afirmar que a dieta hipercalórica induziu obesidade.

Embora a ingestão alimentar não tenha diferido significantemente entre os grupos, animais que ingeriram dieta hipercalórica apresentaram maior ingestão energética. A eficiência alimentar foi maior nos animais dos grupos HC, HB e HA em relação aos grupos PC, PA e PB, respectivamente, demonstrando que animais alimentados com dieta hipercalórica tiveram melhor aproveitamento de componentes calóricos da dieta. Fato interessante pode ser observado na Tabela 3, onde pode-se observar que animais que ingeriram chá de folhas de graviola e β-sitosterol apresentaram menor eficiência alimentar, tanto nos grupos que ingeriram dieta padrão, quanto nos grupos que ingeriram dieta hipercalórica, quando comparados aos seus respectivos controles e mesmo assim não apresentaram redução no peso corporal. Nota-se que houve correlação positiva entre o IMC e o peso final (Figura 3) e entre Índice de Lee e peso final (Figura 4).

Alguns estudos indicam que o chá de folhas de graviola possui ação diurética (Heide, 1992; Bipat et al., 2008). Este fato pode ser associado, à elevação na ingestão de líquidos pelos animais do grupo PA em relação aos animais do grupo PC (Tabela 3). Sabe-se que o controle do balanço hídrico se dá através de um sistema integrado complexo, que envolve a entrada e o débito de água no organismo. O Hormônio Antidiurético (ADH), o sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) e o mecanismo da sede permitem a manutenção do equilíbrio hidroeletrolítico e da constância da osmolalidade plasmática. Elevações mínimas da osmolalidade são percebidas imediatamente pelos osmorreceptores, e mais tardiamente pelos barorreceptores, desencadeando um processo que resulta no estímulo da secreção do ADH e na ativação do mecanismo da sede (Naves et al., 2003).

Interessante efeito da ingestão de dieta hipercalórica foi associado à alteração na resposta glicêmica, que foi significantemente elevada nos animais mantidos com esta dieta, quando comparados aos que receberam dieta padrão.

A elevação na glicemia pode ela própria induzir o estresse oxidativo. Glicose pode reagir não enzimaticamente com grupos amino terminais de proteínas, ou de lisina através de uma reação denominada glicosilação. Tal reação, gerando inicialmente cetoamia e posteriormente hemiacetal, pode alterar as estruturas físicas e propriedades fisiológicas das proteínas. A glicosilação não enzimática e auto-oxidação da glicose induzem a formação

de peróxido de hidrogênio. Deste modo, auto-oxidação da glicose pode constituir importante fator para o estresse oxidativo (Galhardi et al., 2004; Di Muzio et al., 2006). Na Tabela 4, podemos observar que animais mantidos com dieta hipercalórica apresentaram maiores concentrações de hidroperóxido de lipídio (HP), independentemente da elevação na concentração das substâncias antioxidantes totais (SAT), o que indica elevação do estresse oxidativo nesses animais.

A análise da glicemia de jejum e do TOTG (Tabela 4) demonstrou que a houve redução na glicemia jejum nos animais que ingeriram chá de folhas de graviola e dieta hipercalórica, quando comparado ao seu controle, grupo HC. Estes resultados são concordantes com estudos que apontam o efeito hipoglicemiante do chá de folhas de graviola. Em estudo realizado em 1974, no Ceará, com 15 espécies de plantas utilizadas para o diabetes, graviola mostrou efeito antidiabético mais potente que a cloropropamida (Bragança, 1996). Outro estudo observou efeito benéfico em ratos submetidos ao diabetes experimental, induzido pela estreptozotocina (Adewole et al., 2006).

No presente trabalho, podemos observar, que animais que ingeriram dieta hipercalórica e receberam chá de folhas de graviola e animais que receberam dieta hipercalórica e β-sitosterol, grupos HA e HB respectivamente, apresentaram redução na glicemia após 60, 90 e 120 minutos em relação ao grupo HC. Demonstrando que tanto o chá quanto o β-sitosterol foram eficazes na redução da glicemia em animais submetidos à dieta hipercalórica, pois diminuíram a utilização da glicose. A glicemia esteve aumentada em animais que ingeriram dieta hipercalórica quando comparados aos animais que ingeriram dieta padrão, após 30, 60 e 90 minutos, no entanto, após 120 minutos, chá de folhas de graviola e β-sitosterol normalizaram a glicemia de animais que ingeriram dieta hipercalórica, não havendo diferenças significantes entre estes animais e os dos grupos PA e PB, respectivamente.

É notório o fato que dieta rica em carboidratos induz aumento na lipogênese hepática, culminado na elevação na trigliceridemia tendo papel crítico no desenvolvimento de resistência celular à insulina e hiperinsulinemia compensatória (Voet et al., 2000; Novelli, 2005). A partir de estudos experimentais com animais transgênicos, foi demonstrado que o aumento de ácidos graxos circulantes contribui fundamentalmente para o desenvolvimento de resistência à insulina e hiperinsulinemia compensatória (Poornima et al., 2006).

O consumo de β-sitosterol diminuiu a resposta glicêmica nos animais dos grupos PB e HB quando comparados aos seus respectivos controles, PC e HC (Tabela 3). O que demonstra que o β-sitosterol agiu de forma benéfica na resposta insulínica, deste modo

reduzindo a resposta glicêmica tanto em animais com dieta padrão, quanto em animais com dieta hipercalórica.

Animais que receberam β-sitosterol apresentaram elevação na concentração das substâncias antioxidantes totais (Tabela 4). Os efeitos benéficos do beta-sitosterol podem ser associados a propriedades antioxidantes. Estudos recentes apontam a associação entre hiperglicemia e estresse oxidativo (Ebaid et al., 2006; Poornima et al., 2006).

Sabe-se que a absorção e a liberação de componentes da dieta na corrente sanguínea, realizada pelos enterócitos intestinais, envolve um processo complexo que é influenciado pelo estado fisiológico destas células. Situações de persistente desequilíbrio redox, devido ao excesso de oxidantes, ou redução nas defesas antioxidantes têm sido associadas a inúmeras alterações gastrointestinais (Rivabene et al., 2001). Em condições de estresse oxidativo ocorre comprometimento entre a absorção e a liberação sanguínea de compostos dietéticos pelos enterócitos, havendo um desequilíbrio no ajuste metabólico na utilização da glicose, incorporada pelo sistema de co-transporte Na^+-glicose (Shimizu et al., 1997). Deste modo, na presença de agentes redutores seria esperada uma regulação precisa entre a absorção e liberação dos componentes dietéticos pelas células intestinais. Parece provável que chá de folhas de graviola e seu componente β-sitosterol, prevenindo o estresse oxidativo em animais que ingeriram dieta hipercalórica, permitiram a manutenção do equilíbrio entre energia ingerida e utilização de glicose, reduzindo, assim, a glicemia.

Como podemos observar na Tabela 4, dieta rica em sacarose e colesterol induziu aumento nas concentrações séricas de hidroperóxido de lipídio (HP), se compararmos aos animais que ingeriram dieta padrão. Animais que ingeriram DH apresentaram maiores concentrações de substâncias antioxidantes totais (SAT) em relação aos seus respectivos controles, os quais ingeriram dieta padrão. Apesar dos animais dos grupos PB e HB não terem apresentado modificações significantes no HP, β-sitosterol elevou as SAT nestes grupos, em relação aos grupos PC e HC respectivamente.

Estudos em nosso laboratório têm demonstrado que alguns antioxidantes isolados de plantas reduziram significativamente os níveis de glicose sanguínea em animais com elevada ingestão de carboidratos (Souza et al., 2008; Ebaid et al., 2006).

Os efeitos benéficos do chá de folhas de graviola e do seu componente β-sitosterol, na glicemia e no TOTG (Figura 6), também podem ser evidenciados através da análise calorimétrica. Calorimetria indireta é uma forma não invasiva e bastante precisa de se determinar o metabolismo energético, através deste método é possível determinar a taxa de utilização de substratos energéticos na presença de O_2 e liberação de CO_2 pela análise do ar

inspirado e expirado pelos pulmões (Diener, 1997; Mourão et al., 2005). No presente trabalho, para que fosse evidenciado o efeito da dieta padrão e da dieta hipercalórica, foi realizada a calorimetria com os animais alimentados (Tabela 5) e também em jejum (Tabela 6). Esta última análise é feita para se evitar a influência de possíveis reservas energéticas, como o glicogênio hepático.

O VO_2 corresponde à quantidade de oxigênio consumido, o VCO_2 a quantidade de gás carbônico produzido por grama de substrato metabólico oxidado no organismo. O VO_2 específico e o VCO_2 específico permitem comparar o consumo de oxigênio e produção de gás carbônico em diferentes espécies e tecidos animais, desde que refletem especificamente as trocas gasosas associadas à oxidação de nutrientes em relação ao seu peso corporal (Brito, 2004). O quociente respiratório ($QR=VCO_2/VO_2$) é empregado para determinar o tipo de substrato que está sendo oxidado pelo organismo em estudo. A redução no QR indica maior utilização de lipídios como substrato energético (Wahrlich & Anjos, 2001; Schneider & Meyer, 2005).

A redução no quociente respiratório no grupo HA, comparado ao HC, no período alimentado, indicou que houve elevação na oxidação de lipídios nestes animais, em detrimento da oxidação de carboidratos (Tabela 5). Desde que a oxidação de lipídios requer maior consumo de oxigênio, houve elevação no VO_2 ajustado pela superfície corporal nestes mesmos animais (Tabela 5).

Animais que receberam chá de folhas de graviola e dieta hipercalórica apresentaram elevação do VO_2 específico, da taxa metabólica basal, da relação taxa metabólica basal/peso corporal, da oxidação de lipídios e menor oxidação de carboidratos, comparado ao grupo HC.

Animais do grupo PB apresentaram aumento no VO_2 e diminuição no VCO_2 quando comparados ao grupo PC e animais do grupo HB apresentaram menor produção de CO_2 em relação ao grupo HC. A maior utilização de oxigênio na oxidação de lipídios relaciona-se a maior quantidade de ATP produzida pela oxidação de ácidos graxos em relação a carboidratos, bem como o fato que ácidos graxos (CH_3-(CH_2)n-COOH), apresentam baixa concentração de oxigênio por molécula, em comparação com carboidratos ($C_6H_{12}O_6$) (Voet et al., 2000). Deste modo, a oxidação de lipídios requer proporcionalmente maior consumo de oxigênio, e menor liberação de gás carbônico, o que pode ser observado na Tabela 5.

Desde que carboidratos são polihidroxi-aldeídos ou polihidroxi-cetonas, apresentam estruturalmente um oxigênio por carbono. Portanto, o consumo de apenas um oxigênio externo, é necessário para formação de uma molécula de CO_2 no processo de oxidação de

carboidratos. Animais que receberam β-sitosterol apresentaram menor QR tanto no grupo que ingeriu dieta padrão quanto no grupo que ingeriu dieta hipercalórica, comparados aos seus respectivos controles.

β-sitosterol elevou o VO_2 específico, a taxa metabólica de repouso e a oxidação de lipídios, reduzindo a oxidação de carboidratos, tanto em animais que ingeriram dieta padrão quanto em animais que ingeriram dieta hipercalórica, comparados aos seus respectivos controles. Estudos prospectivos mostraram que uma taxa metabólica basal relativamente baixa e uma baixa oxidação de lipídios em relação aos carboidratos induziu ganho de peso (Weyer et al., 2000).

Uma característica da indução de obesidade em animais por dieta rica em lipídios é a diminuição da atividade simpática, que resulta em diminuição da taxa metabólica basal. Porém, não está claro como a redução da atividade simpática atua no sistema nervoso central durante o desenvolvimento da obesidade (Kim et al., 2005). O balanço energético, na calorimetria, reflete a relação entre energia absorvida da dieta e energia utilizada pelo organismo (Labayen, et al., 1999). O elevado balanço energético nos animais com dieta hipercalórica (Tabela 6) indicou que a energia ingerida excedeu o gasto energético para as funções vitais, disponibilizando maior quantidade de energia que os animais mantidos com dieta padrão, para ser convertida em estoque de lipídios. Deste modo, o aumento de peso em animais mantidos com DH ocorreu devido elevação no balanço energético, ou seja, o organismo disponibilizou maior quantidade de energia para o estoque no tecido adiposo.

Independente do tipo de dieta é evidente que a suplementação com β-sitosterol induziu modificação no substrato utilizado para obtenção de energia, elevando consideravelmente a oxidação de lipídios. O chá de folhas de graviola também apresentou tal efeito em animais que ingeriram dieta hipercalórica.

A análise da calorimetria após jejum (Tabela 6) demonstrou resultados semelhantes aos observados no estado alimentado, embora a oxidação de carboidratos não tenha sido detectada em nenhum dos grupos experimentais, demonstrando que após o jejum, os animais não possuíam reservas de carboidrato a serem oxidadas.

A análise da resposta calorimétrica, durante o período alimentado, demonstrou efeitos análogos entre chá de folhas de graviola e β-sitosterol em condições de ingestão de dieta hipercalórica. Já no período de jejum, a resposta calorimétrica ao chá de folhas de graviola e de seu componente β-sitosterol, tanto em animais que ingeriram dieta padrão quanto animais que ingeriram dieta hipercalórica foram semelhantes. Nestas condições,

houve redução na oxidação de carboidratos e aumento no aproveitamento de lipídios como fonte energética.

Em conclusão, animais que receberam DH apresentaram estresse oxidativo, visto que apresentaram maior concentração de HP. β-sitosterol e chá de graviola atuaram como hipoglicemiantes em animais que receberam dieta hipercalórica, aumentaram a oxidação lipídica e TMB, além de reduzir o QR. Estes resultados indicam efeitos análogos entre o β-sitosterol e o chá de folhas de graviola.

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS

*International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted journal. N. Engl J Med 1997; 336:309-15.

Acheson KJ. Carbohydrate and weight control: where do we stand? Curr Opin Clin Nutr Metab Care 2004; 7: 485-492.

Adewole SO, Caxton-Martins EA. Morphological changes and hypoglycemic effects of *Annona muricata* Linn. (Annonaceae). African J Biomed Res 2006; 9: 173-187.

Agra MF, Silva KN, Basílio IJLD, Freitas PF, Barbosa-Filho JM. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. Braz J Pharmac 2008; 18(3): 472-508.

Alali FQ, Liu XX, Mclaughlini JL. Annonaceous acetogenins: recent progress. J Nat Prod 1999; 62(3):504-540.

Astley SB. Dietary antioxidants – past, present and future? Trends Food Scienc Technol 2003; 14: 93-98.

Benzie IFF. Evolution of dietary antioxidants. Comp Biochem Phsiol 2003; 136(Pt A): 113-26.

Bergan JG, Brown P. Nutritional status of "new" vegetarians. J Am Diet Assoc 1980: 76: 151-155.

Bernardis LL. Prediction of carcass fat, water and lean body mass from Lee's Nutritive ratio in rats with hypothalamic obesity. Experimen 1970; 26: 789-790.

Bezerra RMN, Ueno M, Silva MS, et al. A high-fructose diet induces insulin resistance but not blood pressure changes in normotensive rats. Braz J Med Biol Res 2001; 34: 1155-1160.

Bieri AC. Report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Committee on Standards for Nuttritional Studies. J Nutr 1977; 107: 1340-1348.

Bipat R, Toelsie JR, Joemmanbaks RF, Gummels JM, Klaverweide J, Jhanjan N, et al. Effects of plants popularly used against hypertension on norepinephrine-stimulated guinea pig atria. Phcog Mag 2008; 4(13): 12-19.

Bouic PJ. The role of phytosterols and phytosterolins in immune modulation: a review of the past 10 years. Curr Opin Clin Nutr Metab Care 2001; 4: 471-475.

Bragança LA. Plantas medicinais antidiabéticas: Uma abordagem multidisciplinar. Rio de Janeiro: Editora EDUFF, 1996; 5:105-122.

Bray GA. Oxygen consumption of genetically obese rats. Experientia 1969; 23: 1100-1.

Bray TM. Dietary antioxidants and assessment of oxidative stress. Nutrition 2000; 16 (7/8): 578-581.

Brito HFV. Determinação da taxa metabólica basal em *Dazyprocta azarae* por calorimetria indireta. 46f. 2004. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal do Paraná; Curitiba, Paraná, 2004.

Carmona MC, Lefebvre P, Lefebvre B, Galinier A, Benani A, Jeanson Y, et al. Coadministration of coenzyme Q prevents rosiglitazone-induced adipogenesis in ob/ob mice. Int J Obesity 2009; 33: 204-211.

Carvalho ACB, Diniz MFFM, Mukherjee R. Estudos da atividade antidiabética de algumas plantas de uso popular contra o diabetes no Brasil. Rev Bras Farm 2005; 86 (1):11-16.

Cetto AA, Heinrich M. Mexican plants with hypoglycaemic effect used in the treatment of diabetes. J Ethnopharm 2005; 99: 325-348.

Chang FR, Wei JL, Teng CM, Wu YC. Antiplatelet aggregation constituents from *Annona pupurea*. J Nat Prod 1998; 61 (12): 1457-1461.

Commerford SR, Pagliassotti MJ, Melby CL, Wei Y, Gayles EC, Hill JO. Fat oxidation, lipolysis, and free fatty acid cycling in obesity-prone and obesity-resistant rats. Am J Physiol Endocrinol Metab 2000; 279: 875-885.

Cooling J, Blundell J. Differences in energy expenditure and substrate oxidation between habitual high fat and low fat consumers (phenotypes). Intern J of Obesity 1998; 22 (7): 612-618.

De Jong A, Plat J, Mensink RP. Metabolic effects of plant sterols and stanols (review). J Nutr Biochem 2003; 14 :362-9.

Di Muzio BP, Okoshi K, Cicogna AC, Novelli ELB, Dal Pai SM, Okoshi MP, et al. Avaliação funcional (*in vivo* e *in vitro*) e histológica do ventrículo esquerdo e bioquímica de ratos com diabetes mellitus induzido por estreptozotocina. Rev Soc Cardiol Estado de São Paulo 2006; 16: 144 -149.

Dickel ML, Rates SMK, Ritter MR. Plants popularly used for loosing weight purposes in Porto Alegre, South Brazil. J Ethnopharm 2007; 109: 60–71.

Diener JRC. Calorimetria indireta. Rev Ass Med Bras 1997; 43(3): 245-53.

Diniz YS, Burneiko RM, Seiva FRF, Almeida FQA, Galhardi CM, Novelli Filho JLVB et al. Diet compounds, glycemic index and obesity-related cardiac effects. Intern J Cardiol 2008; 124: 98-99.

Diniz YS, Faine LA, Almeida JA, Silva P, Ribas BO, Novelli ELB. Toxicity of dietary restriction of fat enriched diets on cardiac tissue. Food Chem Toxicol 2002; 40: 1893-1899.

Droge W. Free radicals on the physiological control of cell function. Phys Rev 2002; 82: 47-95.

Ebaid GMX, Faine LA, Diniz YS, Rodrigues HG, Galhardi CM, Ribas BO, Fernandes AAH, Novelli ELB. Effects of digitonin on hyperglycaemia and dislipidemia induced by high-sucrose intake. Food Chem Toxicol 2006; 44: 293-299.

Elliot SS, Kein NL, Stern SS, Teff K, et al. Fructose, weight gain, and the insulin resistance syndrome. Am J Clin Nutr 2002; 76: 911-922.

Faine LA, Diniz YS, Almeida JA, Novelli ELB, Ribas BO. Toxicity of ad lib. overfeeding: effects on cardiac tissue. Food and Chem Toxicol 2002; 40: 663-668.

Ferrari R, Ceconi C, Curello C. Intracellular effect of myocardial ischaemic and reperfusion: Role of calciunm and oxygen. Eur Heart J 1998; 7: 3-12.

Fredstrom S. Nitric oxide, oxidative stress, and dietary antioxidants. Nutrition 2002; 18: 537-9.

Galhardi CM, Diniz YS, Faine LA, Rodrigues HG, Burneiko RCM, Ribas BO, et al. Toxicity of copper intake: lipid profile, oxidative stress and susceptibility to renal dysfunction. Food Chem Toxicol 2004; 42: 2053-60.

Grover JK, Yadav S, Vats V. Medicinal plants of India with antidiabetic potential. J Ethnopharm 2002; 81: 81-100.

Gutman RA, Basilico MZ, Bernal CA, Chicco A, Lombardo YB. Long-term hypertriglyceridemia and glucose intolerance in rats fed chronically na isocaloric sucrose-rich diet. Metabolism 1987; 36: 1013-1020.

Heyde, H. Geneesplanten van Suriname, Paramaribo (Suriname): Westfort, 1992.

Horváthová K, Vachálková A, Novotny L. Flavonoids as chemoprotective agents in civilization diseases. Neoplasma 2001; 48 (6): 435-441.

Iossa S, Lionetti L, Mollica MP, Crescenzo R, Botta M, Barletta A, Liverini G. Effect of high-fat feeding on metabolic efficiency and mitochondrial oxidative capacity in adult rats. Brit J Nutr 2003; 90: 953-960.

Jiang ZY, Woollard ACS, Wolf S. Lipid hydroperoxide measurement by oxidation of Fe2+ in the presence of xylenol orange. Comparison with TBA assay and on iodometric method. Lipids 1991; 26: 853-856.

Kenchaiah S, Evans JC, Levy D, Wilson PWF, Benjamin EJ, Laron MG. Obesity and the risk of heart failure. N Engl J Med 2002; 347: 305-13.

Kim JH, Hahm DH, Yang DC, Kim JH, Lee HJ, Shim I. Effect of crude saponin of Korean red ginseng on high-fat diet-induced obesity in the rat. J Pharmacol Sci 2005; 97: 124-131.

Kok N, Robertfroid M, Delzenne N. Dietary oligofructose modifies the impact of fructose on hepatic triacylglycerol metabolism. Metabolism 1996; 45: 1547-1550.

Labayen I, Forga L, Martinez JA. Nutrient oxidation and metabolic rate as affected by meals containing different proportions of carbohydrate and fat in healthy young women. Eur J Nutr 1999; 38: 158-66.

Lee KN, Kritchevsky D, Pariza MW. Conjugated linoleic acid and atherosclerosis in rabbits. Atherosclerosis 1994; 108:19–25.

Lippiello L, Joseph VN, Harlan R, Chiou T. Metabolic effects of Avocado/Soy unsaponifiables on articular chondrocytes. Evid Based Complement Altern Med 2007; 5(2): 191-197.

Maciel MAM, Pinto AC, Júnior VFV. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidiciplinares. Quím. Nova 2002; 25 (3): 429-438.

Masalkar PD, Abhang SA. Oxidative stress and antioxidant status in patients with alcoholic liver disease. Clin Chim Acta 2004; 355: 61-65.

Matsuo T, Shimomura Y, Saitoh S, Tokuyama K, Takeucgi H, Suzuki M. Sympathetic activity is lower in rats fed a beef tallow diet than in rats fed a safflower oil diet. Metabolism 1995; 44: 934-939.

Mehmetcik G, Toker G, Uysal M. Endogenous and copper-induced lipid hydroperoxidation and antioxidant activity of serum in hypercholesterolemic subjects. Horm Metab Res 1997; 29: 63-65.

Mourão DM, Moteiro JBR, Costa NMB, Stringheta PC, Minim VPR, Dias CMG. Conjugated linoleic acid and weight loss. Rev de Nutr 2005; 18(3): 391-399.

Naves LA, Vilar L, Costa ACF, Domingues L, Casulari LA. Distúrbios na Secreção e Ação do Hormônio Antidiurético. Arq Bras Endocrinol Metab 2003; 47(4): 467-81.

Nishiyama Y, Ikeda H, Haramaki N, Yoshida N, Imaizumi T. Oxidative stress is related to exercise intolerance in patients with heart failure. Am Heart J 1998; 135: 115-120.

Norman GR, Streiner DL. Biostatistic – the base essentials. St. Louis: Mosby Book, 1994. 260p.

Novelli ELB. Nutrição e vida saudável - Estresse oxidativo e metabolismo energético. Ribeirão Preto: Tecmed Editora, 2005. 288p.

Novelli ELB, Diniz YS, Galhardi CM, Ebaid GMX, Rodrigues HG, Mani F, et al. Anthropometrical parameters and markers of obesity in rats. Lab Animals 2007; 41: 111–19.

Novelli ELB, Santos P, Assalin H, Souza G, Rocha K, Ebaid G, et al. N-acetylcysteine in high sucrose induced obesity: energy expenditure, metabolic shifting for cardiac health. Pharmacol Res 2009; 59: 74-79.

Ospina LFG, Serrano RP. Plantas usadas como antidiabéticas em la medicina popular colombiana. Rev Colom Ciên Quím Farm 1995; 23: 81-94.

Pearson DA, Frankel EN, Aeschbach R, German JB. Inhibition of endothelial cell-mediated oxidation of low-density lipoprotein by Rosemary and plant phenolics. J Agric Food Chem 1997; 45: 578-82.

Pegel KH. The importance of sitosterol and sitosterolin in human health and animal nutrition. S African J SC 1997; 93:263-268.

Pereira LO, Francischi RP, Júnior AHL. Obesidade: hábitos nutricionais, sedentarismo e resistência à insulina. Arq Bras Endocrinol Metab 2003; 47: 111-27.

Pereira RC, Oliveira MTR, Lemos GCS. Plantas utilizadas como medicinais no município de Campos de Goytacazes - RJ. Rev Bras Farmacogn 2004**;** 14(1): 37-40.

Poornima IG, Parikh P, Shannon RP. Diabetic cardiomyopathy: the search for a unifying hypothesis. Circ Res 2006**;** 98: 596-605.

Poulson R. Morphological changes of organs after sucrose or fructose feeding. Prog Biochem Pharmacol 1986; 21:104-134.

Putman JJ, Allshouse JE. Food consumption, prices and expenditures 1970-1997. Washington, DC. Economic Research Service, US Departament of Agriculture, 1999.

Quiles JL, Ochoa JJ, Huertas JR, Mataix J. Coenzyme Q supplementation protects from age-related DNA doublé-strand breaks and increases lifespan in rats fedo n a PUFA-rich diet. Experimental Gerontology 2004; 39: 189-194.

Quiles JR, Huertas JR, Ochoa JJ, Battino M, Mataix J, Mañas M. Dietary fat (virgin olive oil or sunflower oil) and physical training interactions on blood lipids in the rat. Nutrition 2003; 19: 363-68.

Reeves PG. Components of the AIN-93 diets as improvements in the AIN-76A diet. J Nutr 1997;127: 838S-841S.

Rivabene R, Napolitano M, Cantafora A, Bravo E. Redox-dependent modulation of lipid synthesis induced by oleic acid in the human intestinal epithelial cell line caco-2. Exp Biol Med 2001; 226: 191–198.

Root M, Anderson JJB. Dietary effects on nontraditional risk factors for heart disease. Nutrition Research 2004; 24: 827-38.

Schneider P, Meyer F. As equações de predição da taxa metabólica basal são apropriadas para adolescentes com sobrepeso e obesidade? Rev Bras Med Esp 2005; 11(3): 193-6.

Sebokova E, Klimes I, Gaperikova D, Bohow P, Langer P, Lavau M. Regulation of gene expression for lipogenic enzymes in the liver and adipose tissue of hereditary hypertriglyceridemic, insulin-resistent rats: effect of dietary sucrose and marine fish oil. Biochim et Biophsy Acta 1996; 1303: 56-62.

Shimizu K, Ozeki M, Tanaka K, Nakajyo S, Urakawa N, Atsuchi M. Spression of glucose absortion by extracts from leaves of *Gymmena inodorum.* J Veterin Science 1997; 59: 753-57.

Solati M, Ghanbarian A, Rahmani M, Sarbazi N, Allahverdian S, Azizi F. Cardiovascular risk factor in males with hypertriglycemic waist (Tehan lipid and glucose study). Intern J of Obs 2004; 28: 706-709.

Souza GA, Ebaid GMX, Seiva FRF, Rocha KKHR, Galhardi CM, Mani F, Novelli ELB. N-Acetylcysteine an Allium plant compound improves high-sucrose diet-induced obesity and related effects. Evid Based Complem Altern 2008; 1-7.

Svensson AM, Hellerstrom C, Jansson L. Diet-induced obesity and pancreatic islet blood flow in the rat. J Endovrinol 1996; 151: 507-511.

Tricopoulou A, Vasipoulou E. Mediterran diet and longevity. Br J Nutr 2000; 84: 205-9.
Voet D, Voet JG, Pratt CW. Fundamentos de Bioquímica. Porto Alegre. Editora Artmed, 2000. 931p.
Warhlich V, Dos Anjos LA. Aspectos históricos e metodológicos da medição e estimativa da taxa metabólica basal: uma revisão de literatura. Cad Saúde Pública 2001; 17(4): 801-17.
Weisburguer JH. Mechanisms of action of antioxidants as exemplified in vegetables, tomatoes and tea. Food Chem Toxicol 1999; 37: 943-8.
Weniger B, Robineau L. Elements pour une Pharmacopee Caraibe. Seminaire Tramil 3, La Habana, 1988.
Weyer C, Pratley RE, Salbe AD, Bogardua C, Ravussin E, Tataranni PA. Energy expenditure, fat oxidation, and body weight regulation: A stumetabolic adaptation to long-term weigh change. J Clin Endocrinol Metab 2000; 85:1087-94.
Wolever T, Jenkins D. The use of the glycemic index in predicting the blood glucose response to mixed meals. Am J Clin Nutr 1986; 43: 167-72.
Wolever TMS, Jenkins DJA, Jenkins AL, Josse RG. The glycemic index: methodology and clinical, implications. Am J Clin Nutr 1991; 54: 846-54.
Wu YC, Chang GY, Ko FN, Teng CM. Bioactive constitutents from the stems of *Annona Montana.* Planta Med 1995; 61: 146-149.
Zar JH. Biostatistical analysis. 4.ed. New Jersey: Practice-Hall, 1994. 663p.

CAPÍTULO 2

PERFIL LIPÍDICO SÉRICO, METABOLISMO ENERGÉTICO E ESTRESSE OXIDATIVO MIOCÁRDICO: AÇÃO DO CHÁ DE GRAVIOLA E DE SEU COMPONENTE β-SITOSTEROL EM ANIMAIS SUBMETIDOS À INGESTÃO DE DIETA PADRÃO E DE DIETA RICA EM SACAROSE E COLESTEROL

I.RESUMO

Inúmeras condições patológicas estão associadas ao estresse oxidativo e dislipidemias. Essas alterações desenvolvem-se lentamente tornando-se manifestas quando clinicamente instaladas. As doenças cardiovasculares são freqüentemente associadas com déficit energético e, em muitos casos são acompanhadas por desordens lipídicas.

O objetivo do presente capítulo foi determinar os efeitos do chá de folhas de graviola e do seu componente β-sitosterol em condições normais e de ingestão de dieta rica em colesterol e sacarose sobre as alterações no perfil lipídico sérico e no metabolismo energético e estresse oxidativo do tecido cardíaco

Foram utilizados 48 ratos machos, adultos, *Wistar*, divididos em 6 grupos: PC (controle) que recebeu ração padrão (DP) e água para beber; PA, que recebeu DP e chá de folhas de *Annona muricata* (30g/L); PB, DP e beta-sitosterol na água de beber (0,02g/L); HC, dieta hipercalórica (DH) e água para beer; HA, DH e chá de folhas de *Annona muricata* (30g/L); HB, DH e beta-sitosterol na água de beber. Após 49 dias foi realizado o sacrifício dos animais onde o sangue e o coração dos animais foram coletados para as determinações bioquímicas.

Os resultados demonstraram que a dieta rica em sacarose e colesterol (DH) induziu dislipidemia. O consumo de chá ou β-sitosterol foram eficazes na normalização da lipidemia de animais mantidos com DH, visto que a concentração sérica de colesterol total foi menor nos grupos HA e HB em relação ao grupo HC. Tanto o chá quanto o β-sitosterol elevaram HDL-colesterol e diminuíram LDL-colesterol, nos animais estudados.

Não foram observadas diferenças significantes no peso do coração e na relação peso do coração/peso final. A concentração miocárdica de proteína total não foi diferente entre os animais com a mesma dieta. Também não foram observadas diferenças na concentração de glicose livre e no glicogênio cardíaco, entre os grupos. Animais do grupo HA apresentaram menores concentrações de triacilglicerol do que o grupo HC. Não houve diferença significante nas atividades das enzimas catalase e superóxido dismutase. Grupo HA apresentou maior atividade da enzima glutationa peroxidase em relação ao grupo HC.

A atividade da NADH oxidorredutase foi maior no grupo HA se comparado ao grupo HB. Não foram observadas diferenças significantes na atividade da ATP sintetase (ATPase) entre os grupos.

Concluiu-se que a elevada ingestão de dieta hipercalórica foi capaz de promover alterações na lipidemia e tanto o chá quanto o β-sitosterol foram eficazes na melhora do

perfil lipídico, demosntrando seu potencial na prevenção de doenças cardiovasculares. Chá de folhas de graviola foi capaz de reduzir as concentrações de triacilglicerol no miocárdio, indicando efeitos benéficos no tecido cardíaco em condições de ingestão de dieta hipercalórica.

Palavras chave: chá de graviola, β-sitosterol, dieta hipercalórica, dislipidemia, coração.

II. INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas as doenças cardiovasculares (DCV) passaram a ser a principal causa de morbimortalidade nos países desenvolvidos e também em segmentos cada vez mais crescentes dos países em desenvolvimento (Djoussé et al., 2003; Kerner et al., 2003; Novelli, 2005). A doença aterosclerótica é responsável por aproximadamente cinqüenta por cento das mortes em países ocidentais (Araújo et al., 2005) e, no Brasil, cerca de 300.000 pessoas por ano são vítimas dessa doença (Costa & Silva, 2005).

Dentre os fatores determinantes para as DCV, destacam-se as dislipidemias, já que elevadas concentrações de triglicérides plasmáticos, colesterol total e da lipoproteína de baixa densidade (LDL), associados à diminuição nos valores de lipoproteína de elevada densidade (HDL), aumentam a probabilidade do desenvolvimento dessas enfermidades (Abuja & Albertini, 2001; Costa & Silva, 2005; Magalhães et al., 2005; Novelli, 2005).

Deste modo, estudos dos fatores de risco da doença cardiovascular têm grande importância na prevenção e tratamento desta enfermidade.

Nos últimos anos tem sido observada elevação na incidência de danos cardiovasculares em vários países, resultante da inadequada ingestão alimentar e obesidade (Colombo et al., 2003). Várias observações realizadas desde a década de 70 demonstraram claramente a relação entre hábitos alimentares e a incidência de doenças crônico-degenerativas e mortalidade por DCV (Krummel, 2005; Martinez et al., 2005; Novelli, 2005; Root & Anderson, 2004).

Foi observado que ratos suplementados com dietas ricas em sacarose mostraram elevação dos níveis plasmáticos de colesterol total e elevação nos níveis das LDL, com conseqüente elevação na relação LDL/HDL, demonstrando assim, o efeito deletério da suplementação dietética com sacarose sobre o sistema cardiovascular (Roberts et al., 2001).

Depres (2001) sugeriu que elevação na relação LDL/HDL quando associada a elevação no triacilglicerol sérico resultava no agravamento e elevação dos riscos para

doença cardiovascular. Este estado dislipidêmico, onde há elevação na relação LDL/HDL em conjunto com hipertrigliceridemia tem sido caracterizado como dislipidemia aterogênica. Entretanto, como em indivíduos com hipertrigliceridemia a concentração de VLDL é encontrada em níveis mais elevados, a dislipidemia aterogênica pode, de maneira simples e eficiente ser calculada através da relação entre os níveis de triacilgliceróis e as concentrações de HDL (Depress, 2001). Níveis elevados de triacilgliceróis são correlacionados de forma linear com a incidência de infarto do miocárdio (Fung et al., 2002).

O coração participa do processo de manutenção das atividades dos diferentes tecidos, bombeando quantidade de sangue capaz de suprir as necessidades do organismo. Para desempenhar este papel, é necessário que suas propriedades básicas, ejeção e enchimento, reguladas pela freqüência de batimentos cardíacos, e processos metabólicos estejam funcionando adequadamente (Cicogna et al., 1999). Deste modo, alterações metabólicas podem contribuir consideravelmente para a disfunção cardíaca (Opie, 1992; Voet et al, 2000). O estresse oxidativo tem sido associado à disfunção cardíaca observada em processos de isquemia e reperfusão (Taylor et al., 2003), insuficiência cardíaca congestiva (Keith et al., 1998; Choudhary & Dudley, 2002) e no envelhecimento (Kakatta & Sollott, 2002).

A associação do estresse oxidativo com doenças cardiovasculares tem elevado a procura de agentes antioxidantes naturais (Serra-Majem et al., 2003). Antioxidantes são substâncias capazes de prevenir os efeitos deletérios da oxidação, inibindo o início da lipoperoxidação, seqüestrando radicais livres e/ou quelando íon metálicos (Abuja & Albertini, 2001).

Em sistemas aeróbicos, é essencial o equilíbrio entre agentes oxidantes e o sistema de defesa antioxidante. Os principais componentes do sistema de defesa antioxidante no organismo são as enzimas antioxidantes (catalase, superóxido dismutase e glutationa peroxidase) e a glutationa, as quais estão envolvidas na redução das espécies reativas de oxigênio e peróxidos produzidos em organismos vivos assim como na detoxificação de certos compostos de origem exógena, tendo então, ação primária na manutenção da homeostase. Além das enzimas antioxidantes, os antioxidantes dietéticos favorecem o equilíbrio entre a produção e eliminação dos radicais livres (Alía et al., 2003) (Figura 1).

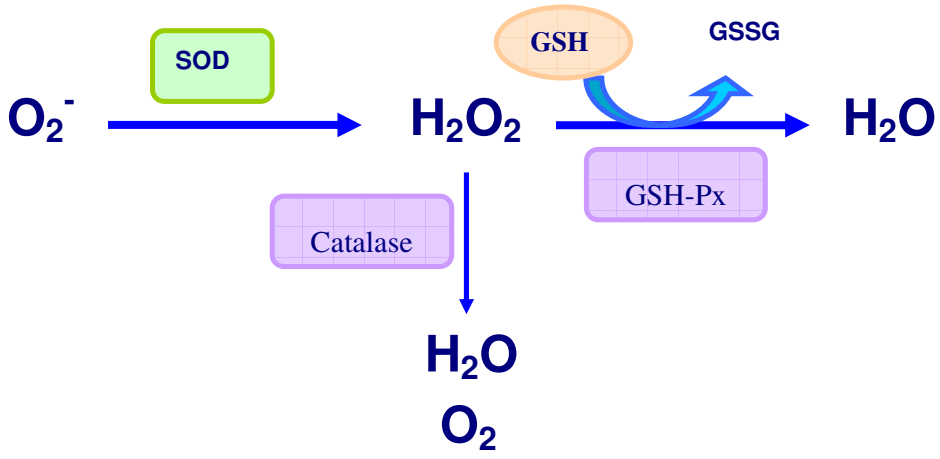

Figura 1. Ação do sistema antioxidante endógeno no combate às espécies reativas de oxigênio. SOD (superóxido dismutase); GSH (glutationa reduzida); GSSG (glutationa oxidada); GSH-Px (glutationa peroxidase).

Na tentativa de reduzir os efeitos da ingestão de dietas desbalanceadas, tem sido observado aumento no consumo de plantas, especialmente na forma de chás (Carvalho et al., 2005; Lans et al., 2006; Taufner et al., 2006). As plantas medicinais e seus derivados consistiram durante muito tempo a base da terapêutica e, atualmente, cerca de 25% dos fármacos utilizados são de origem vegetal, enquanto 50% são de origem sintética, mas relacionados aos princípios ativos isolados de plantas medicinais (Da Silva e Filho, 2002). O uso de extratos de plantas, com efeito terapêutico em inúmeras doenças tem aumentado nos últimos anos, principalmente nos países em desenvolvimento, por tratar-se de método acessível e de baixo custo (Rodrigues et al., 2003; Doyama et al., 2005).

Os fitosteróis desempenham nos vegetais funções análogas ao colesterol nos tecidos animais. Acredita-se que competem com o colesterol no momento da absorção intestinal, reduzindo, portanto, a concentração plasmática deste (Rique et al., 2002; Rasmussen et al., 2006; Guderian et al, 2007). Este efeito na redução do colesterol indica uma melhora na proteção do sistema cardiovascular (Kojima et al., 2003; Castelli et al., 2006). Dessa forma, o consumo de β-sitosterol, bem como de chá de folhas de graviola poderiam inibir as alterações cardiovasculares causadas pelo consumo de dietas ricas em colesterol e sacarose.

Os objetivos deste capítulo foram determinar os efeitos do chá de folhas de graviola e do seu componente β-sitosterol, em condições de ingestão de dieta padrão e de ingestão de dieta rica em colesterol e sacarose, sobre as alterações no perfil lipídico sérico, no metabolismo energético e estresse oxidativo do tecido cardíaco.

III. MATERIAIS E MÉTODOS

1. ANIMAIS

O protocolo experimental número 639 foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, SP, adotado pelo Colégio Brasileiro de experimentação Animal (COBEA). Foram utilizados 48 ratos machos *Wistar* de 85 dias de idade, peso inicial médio de 396 ± 37,27g. Os animais foram provenientes do Biotério Central da UNESP "Campus de Botucatu" e transferidos para o "Laboratório de Bioquímica na Experimentação Animal", do Departamento de Química e Bioquímica, IB, UNESP, Botucatu, onde permaneceram durante todo o período experimental.

2. GRUPOS EXPERIMENTAIS

Os animais foram divididos em 6 grupos. O grupo PC (n=8) foi considerado controle e recebeu dieta basal (Purina Labina, São Paulo, Brasil) e água *ad libitum*. Animais do grupo PA (n=8) receberam dieta basal e solução de *Annona muricata ad libitum,* na forma de chá. A solução foi preparada utilizando-se 30g de folhas por litro de água, fervida, infundida por 15 minutos e posteriormente filtrada (Cetto et al., 2005). Animais do grupo PB (n=8) foram mantidos com dieta basal e para beber receberam solução aquosa com 0,02 g de β-sitosterol/L de água, dissolvido previamente em 1mL de álcool etílico 99,8%. A quantidade de β-sitosterol ofertada em solução aquosa foi selecionada por corresponder a mesma dose encontrada em 30g de folhas de plantas esteróides e foi determinada segundo Pegel (1997).

Os animais do grupo (HC, n=8) foram mantidos com ração rica em sacarose e colesterol e água *ad libitum*. Animais do grupo (HA, n=8) e (HB, n=8) receberam ração rica em colesterol e sacarose e para beber, receberam chá de *Annona muricata* e solução de β-sitosterol, respectivamente. O período experimental foi de 49 dias (Diniz et al., 2008; Souza, et al., 2008).

A ração ofertada para os animais dos grupos HC, HA e HB foi preparada como descrito no capítulo 1 (página 7).

3. OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS

Após 49 dias de tratamento, os animais foram anestesiados (pentobarbital sódico 3%, 0,1 mL, i.p.) e submetidos à eutanásia através da decapitação. Os animais estavam em jejum no momento do sacrifício. O sangue foi coletado em tubos de ensaio, com auxílio de funil. O soro foi separado por centrifugação a 3000 rpm e utilizado para determinações das concentrações das proteínas totais (Lowry et al., 1951), triacilglicerol, colesterol total, lipoproteína de elevada densidade (HDL-colesterol) (CELM diagnóstico, Companhia de Equipamentos de Laboratório Moderno, São Paulo, Brasil).

As concentrações de lipoproteína de densidade muito baixa (VLDL-colesterol) foram determinadas através do cálculo de Friedewald et al (1972). A lipoproteína de densidade baixa (LDL-colesterol) foi isolada através da precipitação (CELM diagnóstico, Companhia de Equipamentos de Laboratório Moderno, São Paulo, Brasil) e suspensão do precipitado em hidróxido de sódio (Scoccia et al., 2001). A LDL-colesterol foi determinada através da quantificação do colesterol no precipitado ressuspenso (Jiang et al., 1991).

As leituras espectrofotométricas foram realizadas no espectrofotômetro Pharmacia Biotech com temperatura controlada (U/V visible Ultrospec 5000, software Swift II, 974213, Cambridge, England, UK). Todos os reagentes eram de procedência Sigma (St. Louis, MO, USA).

4. OBTENÇÃO DE AMOSTRAS E DETERMINAÇOES BIOQUÍMICAS NO TECIDO CARDÍACO

Imediatamente após o sacrifício, o coração foi removido, lavado em solução salina gelada (NaCl 0,9%) e amostras de 200mg do ventrículo esquerdo (VE) foram armazendas em freezer a -86°C.

Para determinação dos conteúdos de glicogênio (Roehrig & Allred, 1974) e glicose livre, as porções de 200 mg do tecido cardíaco de cada animal foram pesadas e homogeneizadas na proporção 200mg/5mL. O homogeneizado foi centrifugado a 3000rpm e o sobrenadante utilizado para a determinação da glicose livre. Após tratamento com 3.5 U de amiloglicosidase (Sigma) foi determinada a concentração de glicose liberada. A concentração de glicogênio foi obtida subtraindo-se as concentrações de glicose livre das respectivas concentrações de glicose liberadas. O triacilglicerol miocárdico foi quantificado segundo método de Bligh & Dier (1959).

Amostras de 200mg do VE foram homogeneizadas em Potter Elvehjem, com pistilo de teflon, com 5 mL de tampão fosfato de sódio 0,1M. pH 7.0. Os homogeneizados foram centrifugados a 10.000 rpm por 15 minutos, em centrífuga refrigerada a -4°C. Os sobrenadantes foram utilizados para determinações de proteínas e marcadores do estresse oxidativo. Os precipitados contendo os fragmentos de membrana mitocondrial, foram ressuspensos em tampão fosfato de sódio contendo sacarose e EDTA (Cassina & Radi, 1996), sendo utilizados para determinação das atividades do complexo respiratório I (NADH oxidoredutase) (Desai et al., 1996). A produção de ATP foi quantificada através da ATP sintetase (ATPase) (Pullman et al., 1960; Cassina & Radi, 1996).

5. ANÁLISE DO ESTRESSE OXIDATIVO

A análise do estresse oxidativo foi realizada através das atividades das enzimas superóxido dismutase, catalase e glutationa peroxidase, bem como das concentrações de hidroperóxido de lipídio (HP) e substâncias antioxidantes totais (SAT) no músculo cardíaco.

O hidroperóxido de lipídio foi determinado através da oxidação do Fe^{2+} (sulfato ferroso amoniacal). O Fe^{3+} formado reage com alaranjado de xilenol formando composto colorido (Jiang et al., 1991). As substâncias antioxidantes totais foram calculadas através da porcentagem de inibição da formação de HP (Mehmetcik et al., 1997).

As atividades da catalase (CAT, E.C.1.11.1.6.) foram determinadas em tampão fosfato pH 7,0, utilizando-se 0,5mL de amostra e peróxido de hidrogênio (30%). As leituras espectrofotométricas foram realizadas a 240nm (Aebi, 1974).

As atividades da superóxido dismutase (SOD, E.C.1.15.1.1.) foram determinadas através da alteração na redução do nitroblue-tetrazólico (NBT) pelos radicais superóxido, gerados pela mistura NADH e fenazina metassulfatos em pH fisiológicos (Ewing & Janero, 1995).

A atividade da glutationa peroxidase (GSH-Px, E.C.1.11.1.9.) foi determinada através da oxidação em presença de peróxido (Nakamura et al.,1974). A mistura de reação foi formada por tampão fosfato de sódio pH 7,0, NADPH, NaN_3, EDTA e glutationa reduzida.

6. ANÁLISE DO METABOLISMO ENERGÉTICO NO MÚSCULO CARDÍACO

O metabolismo energético foi analisado através das concentrações de glicogênio, glicose livre e do triacilglicerol, importantes substratos energéticos, bem como do

transporte de elétrons através da cadeia respiratória e formação de ATP (trifosfato de adenosina). No músculo cardíaco foi determinada a atividade do complexo respiratório I (NADH oxidoredutase). Para análise da produção de ATP foi quantificada a ATP sintetase (ATPase).

A atividade do complexo respiratório I foi analisada pela oxidação do NADH pela ubiquinona-1, em tampão fosfato contendo EDTA (Desai et al., 1996).

A atividade da ATPase foi avaliada através do sistema regenerador de ATP. A formação de piruvato à partir de fosfoenolpiruvato foi determinada a 340nm, pela oxidação do NADH na presença de piruvato quinase e lactato desidrogenase (Pullman et al., 1960; Cassina & Radi, 1996).

7. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos foram expressos em média ± desvio padrão. A metodologia estatística na comparação entre os grupos foi a análise de variância (ANOVA) para o modelo com dois fatores (dieta e suplementação), complementada com o teste de comparações múltiplas de Tukey (Zar, 1994). O nível de significância foi de 5% para a discussão dos resultados (Norman & Streiner, 1994)

As letras utilizadas nas Tabelas são referentes as seguintes comparações:

-Letras maiúsculas: comparação entre os grupos com a mesma dieta;

-Letras minúsculas: comparação entre os grupos com diferentes dietas;

-Letras distintas: diferença significante entre as variáveis.

IV. RESULTADOS

Na Tabela 1, podemos observar que não houve diferença significante na concentração de proteína total sérica entre os grupos PC, PA e PB, bem como entre os grupos HC, HA e HB. O grupo HB apresentou elevação na proteína total, em relação ao grupo PB.

Não houve diferença significante nas concentrações de colesterol total entre os grupos PC, PA e PB. Animais mantidos com DH (dieta hipercalórica) e chá de folhas de graviola, grupo HA e animais mantidos com DH e β-sitosterol, grupo HB, apresentaram menores níveis de colesterol total do que o grupo HC. Os grupos que receberam DH apresentaram maior concentração de colesterol total, quando comparados aos grupos que receberam DP (dieta padrão).

Animais que receberam β-sitosterol, tanto os mantidos com DP, quanto os mantidos com DH apresentaram elevação na concentração de HDL-colesterol, quando comparados aos seus respectivos controles. Animais que receberam chá de folhas de graviola e dieta hipercalórica, grupo HA, apresentaram elevação na concentração de HDL-colesterol, quando comparados ao grupo HC.

Não foi observada diferença estatística nas concentrações de VLDL-colesterol e triacilglicerol (TG) entre os grupos com a mesma dieta. No entanto, animais que ingeriram DH apresentaram maior concentração de VLDL-colesterol e de TG do que animais que ingeriram DP.

Foi observada elevação na LDL entre os animais que ingeriram dieta hipercalórica quando comparados aos animais mantidos com dieta padrão. No entanto, animais que receberam β-sitosterol apresentaram redução na LDL, tanto o grupo PB quanto o grupo HB, quando comparados aos grupos PC e HC, respectivamente. Animais que ingeriram chá de folhas de graviola e dieta hipercalórica apresentaram redução na concentração de LDL em relação ao grupo HC.

Ainda na Tabela 1 podemos observar que a relação HDL/TG foi maior nos grupos PB e HB em relação aos grupos PC e HC, respectivamente.

Nas Tabelas 2 e 3 estão apresentados os resultados das determinações realizadas no tecido cardíaco. Pode-se observar que não houve diferença significante no peso do coração e na relação peso do coração/peso final entre os animais. A concentração de proteína total não foi diferente entre os animais com a mesma dieta. Também não foram observadas diferenças nos estoques de glicose livre e no glicogênio cardíaco, entre os grupos. Animais que ingeriram dieta hipercalórica e chá de folhas de graviola, grupo HA, apresentaram menor triacilglicerol no coração, do que o grupo HC. Embora a concentração de hidroperóxido de lipídio (HP) tenha sido elevada nos animais do grupo PA, este grupo apresentou maior porcentagem de substâncias antioxidantes totais (SAT) em relação ao grupo PC. A relação HP/SAT não foi diferente entre os grupos.

Não houve diferença significante nas atividades das enzimas catalase e superóxido dismutase (SOD) (Tabela 3). Administração de chá de folhas de graviola em animais mantidos com dieta hipercalórica, grupo HA, elevou a atividade da enzima glutationa peroxidase (GSH-Px), em relação ao grupo HC. Animais mantidos com dieta hipercalórica apresentaram menor atividade da enzima GSH-Px do que animais mantidos com dieta padrão.

Ainda na Tabela 3, podemos observar que a atividade da NADH oxidorredutase foi maior no grupo HA se comparado ao grupo HB. Não foram observadas diferenças significantes na atividade da ATP sintetase (ATPase) entre os grupos.

Não houveram diferenças significantes nas realções HP/SOD e HP/Catalase. Grupo HA apresentou menor relação HP/GSH-Px do que os grupos HC e HB. A relação NADH oxidase/ATPase foi menor nos animais que ingeriram β-sitosterol e dieta padrão, grupo PB em relação ao seu controle, grupo PC e não foi diferente nos grupos que ingeriram dieta hipercalórica.

Tabela 1. Proteína total, colesterol total (CT), HDL-colesterol (HDL-C), VLDL-colesterol (VLDL-C), LDL-colesterol (LDL-C), triacilglicerol (TG) e relação HDL-colesterol/triacilglicerol (HDL/TG) no soro dos animais do grupo controle, mantidos com ração padrão (P) ou hipercalórica (H), sem suplementação (C), com suplementação nutricional de chá de folhas de *Annona muricata* L. (A) e β-sitosterol (B).

Variável	Dieta	Grupos		
		C	A	B
Proteína total (g/dL)	**P**	6,77±0,61^{a}	6,69±0,71^{a}	6,97±0,22^{a}
	H	7,92±0,69^{b}	7,22±0,82^{a}	7,84±1,07^{b}
CT (mg/dL)	**P**	66,27±8,42^{a}	59,68±6,28^{a}	66,43±8,53^{a}
	H	144,12±13,72^{Bb}	125,56±16,08^{Ab}	116,53±9,69^{Ab}
HDL-C (mg/dL)	**P**	37,35±6,09^{Aa}	45,36±9,89^{ABa}	52,80±9,60^{Bb}
	H	35,77±6,46^{Aa}	41,39±5,66^{Ba}	43,74±4,82^{Ba}
VLDL-C(mg/dL)	**P**	7,14±1,32^{a}	7,09±1,49^{a}	6,58±1,36^{a}
	H	14,71±2,23^{b}	14,29±2,73^{b}	13,13±2,49^{b}
LDL-C (mg/dL)	**P**	21,78±6,98^{Ba}	13,17±7,05^{ABa}	11,51±7,50^{Aa}
	H	93,18±12,09^{Bb}	68,87±11,24^{Ab}	60,80±9,61^{Ab}
TG (mg/dL)	**P**	35,70±6,59^{a}	35,45±7,43^{a}	32,91±6,81^{a}
	H	73,56±11,14^{b}	71,43±13,66^{b}	65,65±12,47^{b}
HDL/TG	**P**	1,08±0,29^{Ab}	1,31±0,34^{ABb}	1,51±0,25^{Bb}
	H	0,45±0,06^{Aa}	0,56±0,11^{ABa}	0,63±0,11^{Ba}

Valores expressos como média ± desvio padrão ($p<0,05$).
Letras maiúsculas: comparação entre os grupos com a mesma dieta
Letras minúsculas: comparação entre os grupos com diferentes dietas
Letras distintas: diferença significante entre as variáveis

Tabela 2. Peso do coração (PC), peso do coração/peso final (PC/PF), proteína total, glicogênio, glicose livre, triacilglicerol (TG), hidroperóxido de lipídio (HP), substâncias antioxidantes totais (SAT), relação HP/SAT, no coração dos animais do grupo controle, mantidos com ração padrão (P) ou hipercalórica (H), sem suplementação (C), com suplementação nutricional de chá de folhas de *Annona muricata* L. (A) e β-sitosterol (B).

Variável	Dieta	Grupos		
		C	A	B
PC (g)	**P**	1,15±0,09	1,15±0,10	1,15±0,10
	H	1,24±0,10	1,20±0,15	1,28±0,15
PC/PF	**P**	2,64±0,14	2,71±0,15	2,71±0,22
	H	2,61±0,18	2,52±0,23	2,65±0,27
Proteína total %	**P**	19,40±2,09^{a}	19,76±0,91^{a}	19,78±0,43^{a}
	H	20,24±0,47^{a}	20,46±0,76^{a}	20,95±0,39^{b}
Glicogênio %	**P**	3,83±0,36	3,67±0,67	3,40±0,57
	H	3,41±0,45	3,68±0,28	3,43±0,31
Glicose livre %	**P**	1,81±0,39	1,98±0,22	1,99±0,30
	H	1,96±0,32	1,96±0,20	1,88±0,33
TG (mg/g de tecido)	**P**	0,42±0,03^{a}	0,43±0,02^{b}	0,42±0,05^{a}
	H	0,42±0,02^{Ba}	0,38±0,03^{Aa}	0,39±0,02^{ABa}
HP (nmol/g de tecido)	**P**	330,61±21,70^{Aa}	366,41±27,34^{Bb}	352,98±9,07^{Aba}
	H	342,81±14,85^{a}	332,10±14,25^{a}	344,30±11,96^{a}
SAT %	**P**	45,31±3,88^{Aa}	50,09±3,51^{Bb}	49,29±1,93^{ABb}
	H	47,05±3,66^{a}	45,48±1,71^{a}	48,08±3,63^{a}
HP/SAT	**P**	7,31±0,25	7,31±0,22	7,16±0,17
	H	7,31±0,36	7,30±0,19	7,18±0,38

Valores expressos como média ± desvio padrão ($p<0,05$).
Letras maiúsculas: comparação entre os grupos com a mesma dieta
Letras minúsculas: comparação entre os grupos com diferentes dietas
Letras distintas: diferença significante entre as variáveis

Tabela 3. Atividade das enzimas catalase, superóxido dismutase (SOD), glutationa peroxidase (GSH-Px), NADH oxidase (NADH-ox) e ATPase, relações HP/SOD, HP/GSH-Px, HP/catalase, NADH-oxidase/ATPase no coração dos animais do grupo controle, mantidos com ração padrão (P) ou hipercalórica (H), sem suplementação (C), com suplementação nutricional de chá de folhas de *Annona muricata* L. (A) e β-sitosterol (B).

Variável	Dieta	Grupos		
		C	A	B
Catalase (µmol/g de proteína)	**P**	339,52±48,91	331,48±58,74	310,58±53,76
	H	325,87±42,16	342,64±53,29	355,69±73,13
SOD (nmol/mg de proteína)	**P**	9,27±2,06	10,07±1,78	9,15±1,17
	H	9,50±0,44	9,87±0,63	9,41±0,74
GSH-Px (nmol/mg de proteína)	**P**	$159,67±14,15^{b}$	$178,45±11,13^{a}$	$155,85±29,53^{b}$
	H	$142,85±13,41^{Aa}$	$188,04±22,36^{Ba}$	$123,97±26,99^{Aa}$
NADH-ox (nmol/mg de proteína)	**P**	8,52±2,19	7,85±1,07	7,53±1,19
	H	$7,31±0,93^{AB}$	$7,94±0,94^{B}$	$6,67±0,93^{A}$
ATPase (nmol/mg de proteína)	**P**	$11,15±1,37^{b}$	$10,38±1,15^{a}$	$11,50±3,30^{a}$
	H	$9,47±1,17^{a}$	$10,77±2,03^{a}$	$8,62±2,57^{a}$
HP/SOD	**P**	37,14±8,36	37,16±6,08	39,17±5,28
	H	36,13±1,86	33,79±3,17	36,81±3,36
HP/GSH-Px	**P**	$2,07±0,14^{a}$	$2,05±0,14^{b}$	$2,34±0,49^{a}$
	H	$2,41±0,26^{Bb}$	$1,78±0,23^{Aa}$	$2,89±0,62^{Bb}$
HP/Catalase	**P**	0,98±0,13	1,14±0,24	1,16±0,17
	H	1,06±0,14	0,98±0,12	1,00±0,18
NADH oxidase/ATPase	**P**	$0,82±0,08^{B}$	$0,75±0,08^{AB}$	$0,67±0,11^{A}$
	H	0,75±0,08	0,75±0,07	0,87±0,39

Valores expressos como média ± desvio padrão ($p<0,05$).
Letras maiúsculas: comparação entre os grupos com a mesma dieta
Letras minúsculas: comparação entre os grupos com diferentes dietas
Letras distintas: diferença significante entre as variáveis

V. DISCUSSÃO

Este estudo avaliou, pela primeira vez, os efeitos da ingestão do chá de folhas de graviola (*Annona muricata* Linn) e do seu componente β-sitosterol, sobre o perfil lipídico sérico, metabolismo energético e estresse oxidativo miocárdico em animais mantidos com dieta padrão (DP) e animais mantidos com dieta hipercalórica (DH).

Embora o grupo HB tenha apresentado maior concentração de proteínas do miocárdio em relação ao grupo PB, não foram observadas alterações no peso do coração e na relação PC/PF dos animais estudados, indicando além do adequado suprimento de proteínas nas duas rações utilizadas, a ausência de hipertrofia cardíaca (Burneiko et al., 2004). Estes fatos estariam associados à manutenção do metabolismo energético.

É notória a importância da dieta no perfil lipídico sérico (Diniz et al., 2004), bem como o fato que a ingestão de dietas hipercalóricas pode induzir dislipidemia (Diniz et al., 2002). Koteish & Diehl, 2001 observaram que a lipogênese hepática é aumentada pela elevada concentração de sacarose, frutose ou gorduras dietéticas.

Tem sido demonstrado que ingestão de dietas ricas em colesterol é responsável pela ocorrência de elevação na concentração do colesterol e da LDL em humanos (Gaw et al., 2001), embora existam diferenças entre as espécies animais nas respostas metabólicas à elevada ingestão de colesterol nas dietas (Balkan et al., 2004).

Hiperlipidemias são tradicionalmente definidas como condições nas quais a concentração de lipoproteínas excede o limite normal (Chopra & Thurnham, 1999). Lipoproteínas são formadas por lipídios e proteínas, sintetizadas para solubilizar e transportar lipídios e compostos lipossolúveis como os triacilgliceróis e colesterol. Estas lipoproteínas entram na corrente sangüínea via sistema linfático e suprem os tecidos com os lipídios dietéticos na forma de triacilglicerol (Chopra & Thurnham, 1999).

O transporte de lipídios na circulação sangüínea está associado a três principais componentes. A entrada exógena de lipídios, a síntese endógena de lipídios e o metabolismo dos remanescentes. A via endógena produz VLDL a partir de precursores endógenos, enquanto a exógena utiliza produtos da digestão e absorção de lipídios da dieta para produzir quilomicrons. O metabolismo de remanescentes envolve o catabolismo de lipoproteínas de densidade intermediária (IDL) e remanescentes de quilomicrons (Voet et al., 2000).

Na dieta, a maior parte dos lipídios está na forma de triacilgliceróis, fosfoglicérides, colesterol esterificado e livre. Estes são emulsificados no lúmen intestinal, digeridos por enzimas hidrolíticas e absorvidos pelas células da mucosa intestinal.

A emulsificação ocorre no duodeno, onde os lipídios interagem com a bile, composta por ácidos biliares, fosfatidilcolina e colesterol. Estes compostos agem como detergentes biológicos, convertendo gorduras da dieta em micelas mistas de sais biliares e triacilgliceróis. Em uma primeira etapa, a formação da micela aumenta a fração de moléculas lipídicas acessíveis à ação de lipases no intestino. A lipase converte os triacilgliceróis em ácidos graxos livres e glicerol. Na segunda etapa, estes produtos da ação da lipase difundem-se para a mucosa intestinal. Como uma terceira fase, os lipídios absorvidos no interior das células são reconvertidos em triacilglicerol e, junto com o colesterol da dieta são acrescidos de proteínas sintetizadas nas células da parede intestinal, para então formar a lipoproteína quilomícron em uma quarta etapa (Martinez et al., 2005).

Uma porção considerável do colesterol dietético se apresenta na forma de éster de colesterol, não sendo absorvida diretamente neste estado. O suco pancreático contém uma enzima, a colesterol esterase, que, na presença de certos ácidos biliares, catalisa a hidrólise do éster de colesterol no intestino, liberando ácido graxo e colesterol livre. O colesterol não-esterificado presente na luz intestinal é englobado nas micelas mistas e, tornando-se um componente destas, difunde-se para as células epiteliais da mucosa, onde é reconvertido em éster de colesterol, e o seu destino é a incorporação na lipoproteína quilomícron (Martinez et al., 2005).

Quando a dieta contém elevada concentração de triacilgliceróis, estes chegam ao fígado através dos remanescentes de quilomícrons. Do mesmo modo, o excesso de sacarose da dieta, pode ser convertido em glicose e frutose e posteriormente em triacilglicerol no fígado. O triacilglicerol hepático é exportado para a corrente sangüínea através de VLDL pela via endógena.

Vários trabalhos têm demonstrado o papel aterogênico dos triacilgliceróis (Bernal et al.,1995; Brizzi et al., 2003), além de comprovarem que o consumo de dietas ricas em sacarose altera o metabolismo do triacilglicerol ocasionando a hipertrigliceridemia (Gutman et al., 1987; Lombardo et al., 1996).

É notória a associação entre elevação na colesterolemia, aterosclerose e a doença arterial coronariana (Naderali et al., 2003). A dislipidemia induz anormalidades na função arterial e acúmulo de LDL-colesterol no endotélio vascular (Naderali & Williams, 2001). Fatores metabólicos de risco para a doença cardiovascular incluem elevações nas

concentrações de triacilglicerol, colesterol, ácidos graxos livres, LDL-colesterol e diminuição na lipoproteína de elevada densidade (HDL-colesterol) (Abuja & Albertini, 2001). Como esperado, a dieta rica em sacarose e colesterol elevou significantemente a colesterolemia, trigliceridemia e as concentrações de LDL e VLDL e reduziu a relação HDL/TG (Tabela 1). Resultados semelhantes foram obtidos por Balkan et al. (2004) e Ginsberg et al. (1994), os quais observaram que as concentrações séricas de colesterol aumentavam em 1,47mg/dL para cada 100mg de colesterol adicionado à dieta, em humanos.

Há evidências que a dislipidemia causada tanto por dietas ricas em carboidratos, como em lipídios, podem induzir estresse oxidativo (Roberts et al. 2000). Como observado no capítulo 1, Tabela 4, houve estresse oxidativo sérico, visto que animais mantidos com dieta rica em sacarose e colesterol apresentaram maiores concentrações de hidroperóxido de lipídio (HP). A inadequada ingestão alimentar pode estar relacionada a dislipidemia e ao estresse oxidativo (Hart et al., 1994), e a oxidação de nutrientes através da cadeia respiratória constitui fonte endógena para a produção de radicais livres (Esposito et al., 1999; Novelli et al., 2002; Van Heerebeek et al., 2002).

Estudos recentes têm indicado que mudanças nos hábitos alimentares podem representar medidas iniciais na prevenção e tratamento de várias patologias (Costa et al., 2000; Kaur & Kapoor, 2001; Battino et al., 2002). A atribuição de efeitos benéficos à ingestão de componentes naturais, e substâncias com propriedades antioxidantes, tem levado ao aumento da ingestão destes compostos, na maioria das populações. Embora, as reais conseqüências do elevado consumo destes compostos, ainda não estejam efetivamente estabelecidas.

Estudos têm demonstrado que o β-sitosterol, importante componente do chá de folhas de graviola, reduz as concentrações séricas de colesterol em muitas espécies animais, incluindo o homem (Drexel et al., 1981; Mattsson et al., 1982; Jones et al., 2000; Nieminem et al., 2007). No presente trabalho a ingestão de β-sitosterol, no grupo HB, diminuiu significativamente a concentração de colesterol total em relação ao grupo HC. Outros estudos demonstraram que o consumo diário de 1-3g de vegetais esteróides reduz os níveis de colesterol de 5-15% (Miettinen et al., 1999; Castelli et al., 2006). Animais que ingeriram chá de folhas de graviola e dieta hipercalórica também apresentaram redução na concentração de colesterol total (Tabela 1).

Um dos fatores mais importantes no processo de desenvolvimento da aterosclerose consiste na presença de altas concentrações plasmáticas de colesterol na forma de LDL,

portanto redução dos níveis plasmático desta lipoproteína diminui a incidência de doença arterial coronariana (Reaven et al., 2001). No presente trabalho, observamos que a ingestão de β-sitosterol tanto por animais mantidos com dieta padrão quanto por animais mantidos com dieta hipercalórica, aumentou os níveis da HDL e diminuiu os níveis de LDL. Este mesmo efeito foi observado em animais que ingeriram dieta hipercalórica e chá de folhas de graviola, grupo HA.

O efeito hipolipidêmico do β-sitosterol tem sido associado à sua estrutura, que é semelhante à estrutura do colesterol, o que gera um mecanismo de competição, dessa forma inibindo a absorção intestinal do colesterol e diminuição da síntese de colesterol hepático (Moghandasian & Frohlich, 1999; Kojima, et al., 2003; Miettinen, et al., 1999). Tal mecanismo se reflete sobre os valores de colesterol plasmático total e LDL (Valenzuela & Garrido, 2000).

No presente trabalho, ficou evidente o efeito protetor tanto do β-sitosterol quanto do chá de folhas de graviola, visto que a maior concentração de HDL foi associada a presença de LDL de maior tamanho, portanto menos suscetíveis a sofrerem oxidação, permitindo assim a interação adequada da lipoproteína HDL (Ayoaori et al., 1997). Considerando a importância da HDL para o transporte reverso do colesterol do sangue para o fígado e da LDL para a formação de aterosclerose, podemos afirmar que β-sitosterol e chá de folhas de graviola melhoraram o perfil lipídico.

Segundo Bloomgarden (2002), o tamanho da LDL é inversamente associado à concentração de triacilglicerol. Indivíduos com baixas concentrações de triacilgliceróis apresentam LDL grandes, enquanto aqueles que apresentam elevadas concentrações de triacilgliceróis séricos têm LDL pequenas e compactas. O tamanho da LDL e, assim, da concentração de LDL e HDL, constituem importantes fatores para a aterogênese. Desde que o tamanho da LDL dificilmente é determinado, as relações entre os lipídios séricos constituem parâmetros eficientes para determinar o potencial aterogênico (Brizzi et al., 2003).

A oxidação da LDL não depende somente da concentração de LDL, mas também da relação HDL/TG que esteve maior nos animais que ingeriram β-sitosterol, independente da dieta ingerida. Embora não tenha sido estatísticamente significante, animais dos grupos PA e PB também tiveram esta relação elevada em relação aos grupos PC e HC, respectivamente. LDL contendo elevadas concentrações de triacilgliceróis carregam mais hidroperóxido que LDL com baixo conteúdo de triacilglicerol. Desse modo, a diminuição

na concentração de triacilglicerol significa redução no potencial de oxidação da LDL (Brizzi et al., 2003).

Chá de folhas de graviola reduziu as concentrações de triacilglicerol no miocárdio de animais mantidos com dieta rica em sacarose e colesterol. Embora não tenha sido estatísticamente significante, também houve redução nas concentrações de triacilglicerol em animais do grupo HB em relação ao grupo HC (Tabela 2). Estes resultados demonstram que tanto o chá quanto o β-sitosterol foram eficazes na diminuição do acúmulo de lipídios no coração, visto que, como citado anteriormente, o acúmulo de triacilglicerol é potencial para a lipotoxicidade e excesso de triacilglicerol no tecido cardíaco está associado à disfunção miocárdica (Lewin et al., 2003).

Não foram observadas alterações nos estoques de glicose livre no miocárdio e glicogênio cardíaco (Tabela 2), o que indica que esta reserva energética não foi utilizada. Os carboidratos apresentam um papel de extrema importância no fornecimento de energia ao organismo por meio do catabolismo da glicose presente na corrente sangüínea e do glicogênio muscular e hepático (Newsholme, 1983). O glicogênio é o principal substrato da via das pentoses, importante via de fornecimento de NADPH/glutationa para o sistema glutationa redutase/peroxidase na manutenção do estado redox intracelular (Halliwell et al., 1989; Lawler et al., 1993) sugerindo que uma menor disponibilidade de glicogênio poderia comprometer a síntese de glutationa, reduzindo a capacidade de defesa antioxidante, além de induzir acidose através da elevação na produção de lactato.

A manutenção do conteúdo de glicogênio pode constituir um mecanismo do coração para a prevenção do dano cardíaco, visto que o glicogênio é fonte potencial de energia em condições de isquemia (Wolfe et al., 1993, Henning et al., 1996). Como observado no capítulo 1, Tabela 4, o TOTG mostrou efeitos benéficos sobre a glicemia de jejum. Sabe–se que em condições de dislipidemia, o metabolismo da glicose pode ser alterado, visto que pode aumentar a captação de ácidos graxos pelo músculo cardíaco, com subseqüente redução na captação e oxidação de glicose e lactato (Stanley & Rydén, 2003).

Embora as concentrações de hidroperóxido de lipídio (HP) no coração, tenham sido elevadas no grupo PA em relação ao PC e também no grupo PB em relação ao HB, houve também elevação nas SAT no tecido cardíaco destes animais. Este fato indicou que tanto o chá quanto o β-sitosterol atuaram como antioxidantes, permitindo a manuteção do equilíbrio oxidante/antioxidante miocárdico, evidenciado pela manutenção da relação HP/SAT. Os antioxidantes têm a capacidade de seqüestrarem os radicais livres (Pannala et

al., 1997; Pari & Velmurigan, 2009), atividade esta dependente do número de radicais hidroxila da molécula fenólica (Hu et al., 1995).

O sistema de defesa antioxidante compreende a superóxido dismutase, que constitui a primeira linha de defesa contra a ação de ERO, convertendo o radical superóxido (O_2^-) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Duas enzimas, a catalase e a glutationa peroxidase (GSH-Px), eliminam o H_2O_2 formado pela SOD (Abuja e Albertini, 2001). Desde que estas enzimas eliminam H_2O_2, existe uma relação compensatória entre ambas, para impedir os efeitos tóxicos do H_2O_2 (Wierik et al., 1996).

Chá de folhas de graviola induziu aumento da GSH-Px em animais do grupo HA e reduziu a relação HP/GSH-Px (Tabela 3), indicando maior contribuição da GSH-Px para impedir o aumento do HP e também para a redução da relação oxidante/antioxidante no tecido cardíaco no grupo HA.

A diminuição nas defesas antioxidantes miocárdicas nos animais que receberam dieta hipercalórica foi evidenciada pela redução na GSH-Px, a despeito da manutenção das relações HP/SOD e HP/Catalase.

A análise das enzimas antioxidantes permitiu evidenciar que chá de folhas de graviola e β-sitosterol não atuaram na modulação das atividades da SOD ou da catalase, enzimas que convertem o H_2O_2 em água. A ação da GSH-x é compensatória em relação a catalase, desde que as duas enzimas degradam o peróxido de hidrogênio (Novelli, 2005).

O músculo cardíaco contém grande número de mitocôndrias e possui elevada taxa de consumo de oxigênio, desde que utiliza ácidos graxos como principais substratos para a produção de energia (Henning et al., 1996). A maior utilização de oxigênio pelo músculo cardíaco relaciona-se a maior quantidade de ATP produzida pela oxidação de ácidos graxos em relação aos carboidratos, bem como o fato de que ácidos graxos (CH_3-$(CH_2)_n$-COOH) (Figura 2), apresentam baixa concentração de oxigênio por molécula, em comparação com carboidratos ($C_6H_{12}O_6$) (Novelli, 2005).

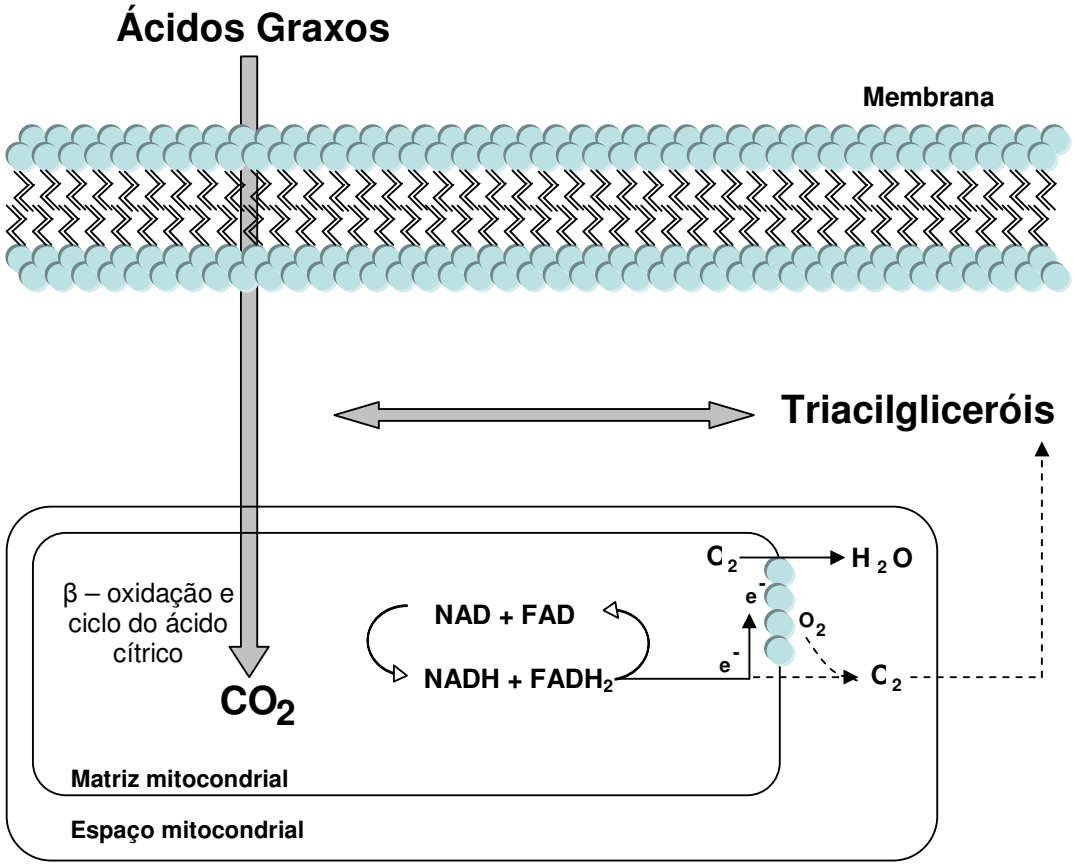

Figura 2. Elevação nos ácidos graxos e triacilgliceróis com o estresse oxidativo (Novelli, 2005)

A principal função da mitocôndria é energética, suprindo as células de ATP. Na matriz mitocondrial, através do ciclo do citrato (ciclo de *Krebs*), os equivalentes redutores NADH (nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida) são gerados nas reações catalisadas pela isocitrato desidrogenase, α-cetoglutarato desidrogenase e malato desidrogenase. O $FADH_2$ (flavina adenina dinucleotídeo reduzido) é produzido pela succinato desidrogenase. NADH e $FADH_2$ doam seus elétrons para os complexos respiratórios da cadeia respiratória na membrana mitocondrial interna (Wallace et al., 1994; Wallace et al., 1997; Souza et al., 2001). Esse transporte de elétrons está associado à respiração mitocondrial e ao consumo de oxigênio, acoplada à síntese de ATP, mediante ADP (adenosina difosfato). Em conseqüência, prótons (H^+) são liberados através da membrana mitocondrial interna, gerando gradiente eletroquímico, responsável pela síntese de ATP nos sítios catalíticos da F_1F_o-ATP sintetase, ou ATP-ase mitocondrial. Independente do substrato energético utilizado, o oxigênio é o aceptor terminal de elétrons durante os processos de produção de energia através da fosforilação oxidativa (Nelson & Cox, 2006).

Dessa forma a atividade do ciclo de Krebs é regulada pela razão NAD/NADH, que por sua vez está dependente da disponibilidade de ADP e este da utilização do ATP (Figura 3).

As determinações do substrato energético, da velocidade de atuação do complexo respiratório I, NADH-oxidase e da atividade da ATP-ase mitocondrial, permitem obter informações sobre o metabolismo energético cardíaco. No presente trabalho, pode-se observar que a atividade da enzima NADH-oxidase esteve elevada no grupo HA, em relação ao grupo HB, não sendo diferente do grupo controle, HC (Tabela 4), o que indica que o grupo HB apresentou menor utilização do complexo respiratório I, na cadeia respiratória.

Os efeitos da suplementação de chá de folhas de graviola e β-sitosterol, em animais mantidos com dieta rica em sacarose e colesterol foram refletidos no miocárdio, visto que a menor concentração de triacilglicerol cardíaco nos animais do grupo HA indica maior oxidação de ácidos graxos no coração (Tabela 2). Este fato corrobora com a análise calorimétrica, (capítulo 1, Tabelas 5 e 6), que demonstrou maior oxidadação lipídica, nos animais que receberam chá de folhas de graviola e β-sitosterol.

As células de tecidos não adiposos, têm capacidade limitada para o acúmulo de lipídios, e quando essa capacidade é excedida, pode gerar a disfunção celular (Leichtweis, et al., 1997)

A sobrecarga cardíaca de triacilglicerol ocorre quando a oxidação mitocondrial não está sendo realizada de maneira correta, o que está associado à disfunção cardíaca e morte súbita (Fink et al., 2003). O acúmulo de lipídios no miocárdio, ou lipotoxicidade cardíaca reflete desequilíbrio entre a absorção e oxidação de ácidos graxos (Lopaschuk, et al., 2007).

Em condições aeróbicas normais, as móleculas de acetil Coenzima A, provenientes da β-oxidação de ácidos graxos são metabolizadas no ciclo do ácido cítrico produzindo equivalentes redutores NADH ou $FADH_2$. A menor concentração de triacilglicerol cardíaco indica maior β-oxidação de ácidos graxos e gera maior produção de NADH ou $FADH_2$, através do ciclo do citrato. Estes são transferidos através da cadeia de transporte de elétrons, produzindo ATP pela fosforilação oxidativa (Figura 3).

Sabe-se que deficiências no funcionamento normal da cadeia respiratória mitocondrial levam a uma rápida queda na obtenção de energia, ou seja, comprometimento na síntese de ATP, o que induz aumento da produção de EROs e lesão e morte celular (Ankarcrona et al., 1995). A manutenção das atividades da ATPase nos grupos mantidos com a mesma dieta, indicou que a produção de ATP, não foi comprometida. A redução na

relação NADH oxidase/ATPase nos animais do grupo PB em relação ao grupo PC, sugeriu que β-sitosterol permitiu melhor utilização de equivalentes redutores através do complexo respiratório I, para formação de ATP pela ATPase. Desde que a atividade da ATPase não foi significantemente alterada entre os animais com dieta padrão, é de se esperar que a redução na relação NADH-ox/ATPase tenha sido compensada pela redução na atividade do complexo respiratório II (Figura 3).

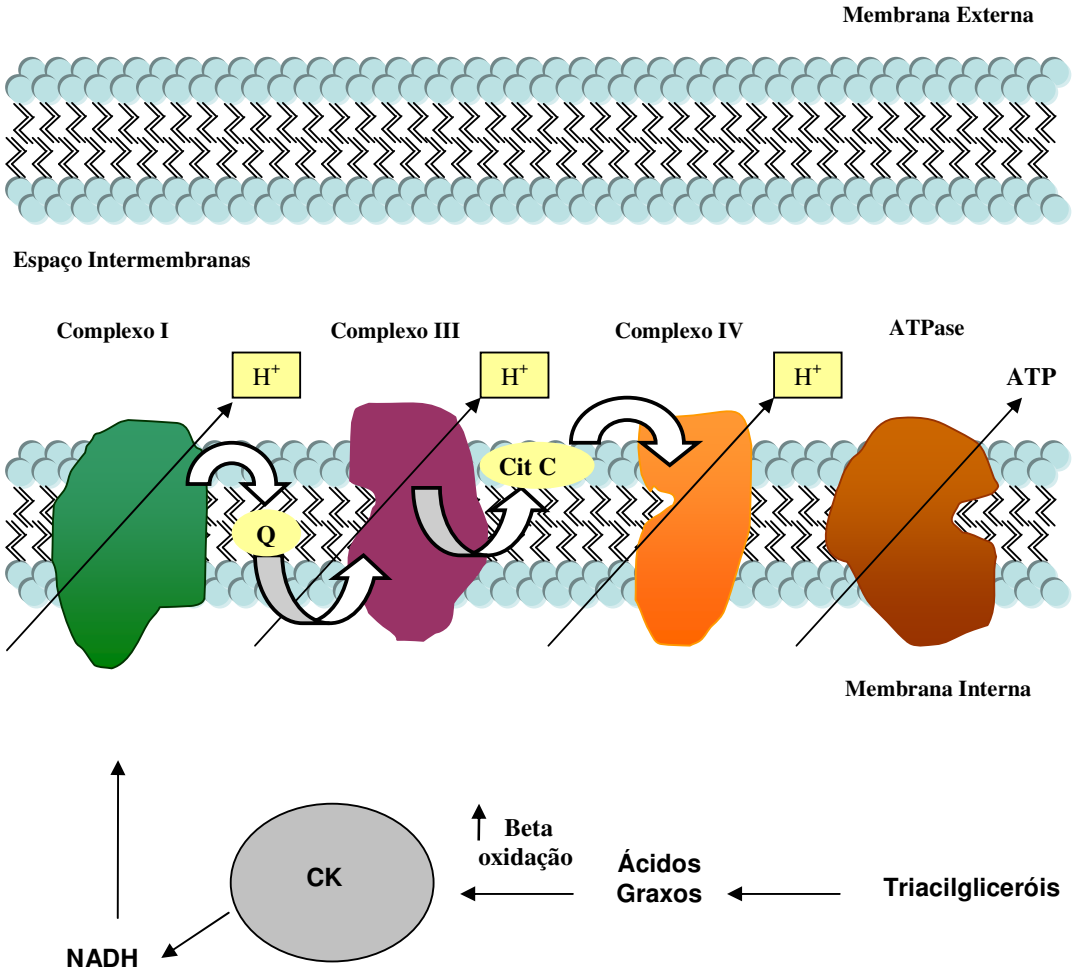

Figura 3. Oxidação de ácidos graxos, no miocárdio e transferência de NADH para a cadeia mitocondrial de transporte de elétrons. O diagrama indica as vias de transporte de elétrons entre os complexos respiratórios. Os elétrons são tranferidos entre os complexos I e III pela Coenzima Q (Q) e entre os complexos III e IV pela citocromo C (Cit C). O potencial eletroquímico gera ATP, através da ATPase.

O efeito adverso da dieta no tecido cardíaco, foi claramente evidenciado pela redução na atividade da ATPase nos animais do grupo HC comparado ao PC, indicando que a obesidade diminuiu o fornecimento de ATP para a contração do músculo cardíaco (Wilson et al., 2007). Este fato pode estar associado à dislipidemia induzida pela dieta (Tabela 1). Administração de chá e de β-sitosterol normalizou a atividade da ATPase miocárdica comparando-se animais dos grupos HA com PA e HB com PB, sugerindo que os efeitos benéficos dos suplementos nos lipídicos séricos foram refletidos no tecido cardíaco.

Em conclusão, a dieta rica em sacarose e colesterol induziu dislipidemia. Chá de folhas de graviola e seu componente β-sitosterol melhoraram o perfil lipídico sérico. Chá de graviola diminuíu as concentrações de triacilglicerol, indicando efeitos benéficos no tecido cardíaco, em condições de ingestão de dieta hipercalórica.

VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

*International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted journal. N. Engl J Med 1997; 336:309-15.

Abuja PM, Albertini, R. Methods for monitoring oxidative stress, lipid peroxidation and oxidation resistance of lipoproteins. Clinica Chim. Acta 2001; 306: 1-17.

Aebi H. Methods of enzymatic analysis. 2. ed. (New York): Bergmeyer H. V. Editor Verloy Chemia Weinheim, 1974. 1-4.

Alía M, Horcajo C, Bravo L, Goya L, Effect of grape antioxidant dietary fiber on the total antioxidant capacity and the activity of liver antioxidant enzymes in rats. Nutr Res 2003; 23:1251-2167.

Ankarcrona M, Dypbukt JM, Bonfoco E, Zhivotovsky B, Orrenius S, Lipton SA, Nicotera P. Glutamate-induced neuronal death: a sucession of necrosis or apoptosis depending on mitochondrial function. Neuron 1995**;** 15: 961-973.

Araújo RG. et al. Dislipidmia, inflamação e aterosclerose. Rev. Soc. Cardiol. Estado de São Paulo 2005; 6: 470-6.

Ayaori M, Ishikawa T, Yoshida H, Suzukawa M, Nishiwaki M, Shige, H. Beneficial effects of alcohol withdrawal on LDL particle size distribution and oxidative susceptibility in subjects with alcohol-induced hypertriglyceridemia. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 1997; 17: 2540–2547.

Balkan J, Dogru-Abbasoglu S, Aykaç-Toker G, Uysal M. The effect of a high cholesterol diet on lipids and oxidative stress in plasma, liver and aorta of rabbits and rats. Nutrition Research 2004; 24: 229-234.

Battino M, Quiles JL, Huertas JR, Ramirez-Tortoza MC, Cassinello M, Mañas M, et al. Feeding fried oil changes antioxidant and fatty acid pattern of rat and affects rat liver mitochondrial respiratory chain components. J Bioen Biomem 2002; 34:127-134.

Bernal C, Gutman R, Lombardo YB. The duration od feeding on sucrose-rich diet determines variable in vitro effects of insulin and fructose on rat liver triglyceride metabolism. J Nutr Biochem. 1995; 6: 422-430.

Bligh E, Dyer W. A rapid method of total lipid extraction and purification. Can J Biochem Physiol 1959; 37: 911-19.

Blonnmgardem Z. Obesity hypertension and insulin resistance. Diabetes 2002; 25: 2088-2097.

Brizzi P, Tonolo G, Carsillo F, Malaguarnera M, Maioli M, Musumeci S. Plasma lipid composition and LDL oxidation. Clin Chem Lab Med 2003; 41: 56-60.

Burneiko RC, Diniz YS, Faine LA, Gaklhardi CM, Padovani CR, Novelli ELB, Cicogna AC. Impact of the Training Program on Lipid Profile and Cardiac Health. Biol Res 2004; 37: 53-59.

Carvalho ACB, Diniz MFFM, Mukherjee R. Estudos da atividade antidiabética de algumas plantas de uso popular contra o diabetes no Brasil. Rev Bras Farm 2005; 86(1): 11-16.

Cassina A, Radi R. Differential inhibitory action of nitric oxide and peroxynitrite on mitochondrial electron transport. Arch Biochem Biophys 1996; 328: 309-316.

Castelli F, Sarpietro MG, Micieli D, Trombetta D, Saija A. Differential Scanning Calorimetry Evidence of the Enhancement of β-Sitosterol Absorption across Biological Membranes Mediated by β-Cyclodextrins. J Agric Food Chem 2006; 54 (26): 10228-10233.

Champe PC, Harvey RA. Bioquímica ilustrada. 2ª ed. Porto Alegre: Editora Artes Médicas, 1997. 446 p.

Chopra M, Thurnham D. Antioxidants and lipoprotein metabolism. Procc Nutr Soc 1999; 58: 663-671.

Choudhary G, Dudley JR. Heart failure, oxidative stress and ion channel modulation. Congesty Heart Failure 2002; 8: 148-55.

Cicogna AC, Padovani CR, Georgette, JC, Aragon FF, Okoshi MP. Protein-calorie restricyion on mechanical function of hypertrophied cardiac muscle. Arquivos Brasileiros de Cardiologia 1999; 72: 436-40.

Colombo RCR, Aguilar OM, Gallani MCBJ, Gobato CA. Caracterização da obesidade em pacientes com infarto do miocárdio. Rev Latino-Am Enferm 2003; 11(4): 461-7.

Costa RP, Menendez G, Bricarello LP, Elias MC, Ito M. Óleo de peixe, fitosteróis, soja e antioxidantes: impacto nos lípides e na aterosclerose. Rev Soc Cardiol Est SP 2000; 10: 819-827.

Costa RP, Silva CC. Doenças cardiovasculares. Guia de nutrição: nutrição clínica no adulto. In: Cuppari, L. Barueri: Manole, cap. 15, 2005. 287-312 p.

Da Silva KL, Filho VC. Plantas do gênero *bauhinia*: composição química e potencial farmacológico. Quím Nova 2002, 25 (3):1-6.

Depres JP. Total cholesterol/ HDI ratio vs LDL cholesterol/ HDL ratio as indices of ischemic heart disease risk in men. Arch Intern Med 2001; 161:2685-2692.

Desai VG, Weindruch R, Hart RW, Feuers R J. Influences of age and dietary restriction on gastrocnemius electron transport system activities in mice. Archives of Biochemistry and Biophysics 1996; 333: 145–151.

Diniz YS, Cicogna AC, Padovani CR, Santana LS, Faine LA, Novelli ELB. Diets rich in saturated and polyunsaturated fatty acids: Metabolic shifting and cardiac health. Nutrition 2004; 20: 230-234.

Diniz YS, Faine LA, Almeida JA, Silva MDP, Bibas BO, Novelli ELB. Toxicity of dietary restriction of fat enriched diets on cardiac tissue. Food and Chemical Toxicology 2002; 40: 1893-1899.

Diniz YS, Burneiko RM, Seiva FRF, Almeida FQA, Galhardi CM, Novelli Filho, JLVB et al. Diet compounds, glycemic index and obesity-related cardiac effects. Intern J Cardiol 2008; 124: 98-99.

Diniz YS, Galhardi CM, Faine LA, Cataneo AC, Fernandes AAH, Rodrigues HG, et al. Dietary copper: cardioprotective, hypoglycaemic, hypolipidaemic and antioxidant effects on experimental diabetes. J of Nutr & Environm Med 2003; 13: 83-90.

Djoussé L, Hunt SC, Arnett DK, Province MA, Eckfeldt JH, Ellison, RC. Dietary linolenic acid is inversely associated with plasma triacylglycerol: the National Heart, Lung and Blood Institute Family Heart Study. Am J Clin Nutr 2003; 78: 1098-102.

Doyama JT, Rodrigues HG, Novelli ELB, Cereda E, Vilegas W. Chemical investigation and effects of the tea of Passiflora alata on biochemical parameters in rats. Journal Ethnopharmacol. 2005; 96: 371-374.

Drexel H, Breier C, Lisch HJ, Sailer S. Lowering plasma cholesterol with beta-sitosterol and diet. Lancet 1981; 1: 1157.

Droge W. Free radicals on the physiological control of cell function. Phys Rev 2002; 82: 47-95.

Esposito LA, Melov S, Cottrell B. A. Mitochondrial disease in mouse resulting increased oxidative stress. Proc Natl Acad Sci 1999; 96: 4820-5.

Ewing JF, Janero DR. Microplate superoxide dismutase assay employing a nonenzymatic superoxide generation. Anal Chem 1995. 232: 243-248.

Ferrari R, Ceconi C, Curello C. Intracellular effect of myocardial ischaemic and reperfusion: Role of calciunm and oxygen. Eur Heart J 1998; 7 : 3-12.

Finck BN, Han X; Vourtois M, Aimond F, Nerbonne JM, Kovacs A, et al. A critical role for PPAR-mediated lipotoxicity in the pathogenesis of diabetic cardiomyopathy: modulation by dietary fat content. Proc Natl Acad Sci 2003; 100: 1226–31.

Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. Clin Chem 1972; 18: 499-502.

Fung MA, Frohlich JJ. Common problens in the management of hypertriglyceridemia, CMAJ 2002; 177: 1261-1266.

Gaw G, Cowan RA, O' Reilly D, Stewart MJ, Shepherd, J. Bioquímica Clínica. 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. 165 p.

Ginsberg HN, Karmally W, Siddiqui M, Holleran S, Tall AR, Rumsey SC, et al. A dose-response study of the effects of dietary cholesterol on fasting and posprandial lipid and lipoprotein metabolism in health young men. Arterioscler. Thrombosis. 1994; 14: 576-586.

Guderian DMJ, Rasmussen HE, Wray CA, Dussault PH, Timothy PC. Cholesterol-lowering properties of plant sterols esterified with beff tallow fatty acids in hamsters. Nutr Res 2007; 27: 283-288.

Gutman R, Basílico MZ, Bernal C, Chicco A, Lombardo YB. Long-term hypertriglyceridemia and glucose intolerance inrats fed chronically na isocaloric sucrose-diet. Metabolism 1987; 36: 1013-1020.

Halliwell B, Gutteridge JM. Iron toxicity and oxygen radicals. In: Free radicals in Byology and Medicine.2nd Ed. Oxford: Clarendon Press, 1989, p. 86-123.

Hart RW, Dixit R, Seng J, Turturro JE, Leakey JEA, Feurs R. Adaptative role of caloric intake on degenerative disease processes. Toxicol Sci 1999; 52: 3-12.

Henning SL, Wambolt RB, Schönekess BO, Allard MF. Contribution of glycogen to aerobic myocardial glucose utilization. Circulation 1996; 93: 1549-1555.

Hu JP, Calome M, Lasure A, Bruyne T, Pieters L, Vlietinck A, Berghe DAV. Structure activity relationship of flavonoids with Superoxide scavenging activity. Biol Trace Elemn Res 1995; 47: 327-331.

Jiang ZY, Woollard ACS, Wolf S. Lipid hydroperoxide measurement by oxidation of Fe2+ in the presence of xylenol orange. Comparison with TBA assay and on iodometric method. Lipids 1991; 26: 853-856.

Jones PJ, Raeini-Sarjaz M, Ntanios FY, Vanstone CA, Feng JY, Parsons WE. Modulation of plasma lipid levels and cholesterol kinetcs by phytosterol versus phytostanol esters. J Lipid Res 2000; 41: 697-705.

Kakatta EG, Sollott SJ. Perspectives on mammalian cardiovascular aging: humans to molecules. Comp Ciochem Physiol 2002; 132: 699-721.

Kaur C, Kapoor HC. Antioxidants in fruits and vegetables – the millennium's health. Int J Food Sci Technol 2001; 36: 703-725.

Keith M, Geranamayegan A, Sole M. Increased oxidative stress in patients with congestive heart failure. J Am Coll Cardiol 1998; 31:1352-6.

Kerner JM, Yang EU, Song WO. Dietary patterns associated with risk factors for cardiovascular disease in healthy US adults. Am J Clin Nutr 2003; 78:1103-10.

Kojima K, Seki S, Hidaka I, Yoshino H, Nugushi O, Sato C, Aoyama T. Effects of phytosterol esters on serum lipids and fecal steroids excretion in hamsters. J Oleo Sci 2003; 52(5): 229-237.

Koteish A, Diehl AM. Animals models of steatosis. Seminars in Liver Diseases 2001; 21: 89-104.

Krummel DA. Terapia nutricional na doença cardiovascular. In: MAHAN LK & ESCOTT-STUMP S. Alimentos, nutrição e dietoterapia. 11 ed. São Paulo: Roca, 2005. 820-58 p.

Lans CA. Ethnomedicines used in Trinidad and Tobago for urinary problems and diabetes mellitus. J Ethnobiol Ethnomed 2006; 2: 1-11.

Lawler J, Powers S, Criswell D. Inducibility of NADPH-specific isocitrate dehydrogenase with endurance training in skeletal muscle. Acta Physiol Scand 1993; 149: 177-81.

Leichtweis SB, Parmelee DJ, Fiebig R, JI LL. Rigorous swim training impairs mitochondrial function in post-ischaemic rat heart. Acta Physiol Scand 1997; 160: 139–48.

Lewin TM, Coleman RA, Regulation of myocardial triacylglycerol synthesis and metabolism. Biochim Biophys Acta 2003;75:1634-63.

Lombardo YB, Drago S, Chicco A, Fainstein-Day P, Gutman R, Gagliardino JJ, et al. Long-term administration of a sucrose-rich diet to normal rats: relationship between metabolic and hormonal profiles and morphological changes in the endocrine pancreas. Metabolism 1996; 45: 1527-1532.

Lopaschuk GD, Folmes CDL, Stanley WC. Cardiac energy metabolism in obesity. Cir Res 2007; 101: 335–47.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL. Protein measurement with the Folin – phenol reagent. J Biol Chem 1951; 193: 265-275.

Magalhães CC, Chagas ACP, Luz PL. Hipertrigliceridemia: implicações clínicas e terapêuticas. Rev Soc Cardiol Estado de São Paulo 2005; 15: 483-8.

Martinez TLR, Nascimento HM, Moraes CAA. Tratamento não-farmacológico das dislipidemias: o que os estudos ensinaram? Rev Soc Cardiol Estado de São Paulo 2005; 15: 489-94.

Mattsson FH, Grundy SM, Crouse JR. Optimizing the effect of plant sterols on cholesterol absortion in man. Am J Clin Nutr 1982; 35: 697-700.

Mehmetcik G, Toker G, Uysal M. Endogenous and copper-induced lipid hydroperoxidation and antioxidant activity of serum in hypercholesterolemic subjects. Horm Metab Res 1997; 29: 63-65.

Miettinen TA, Gylling H. Regulation of cholesterol metabolism by dietary plant sterols. Curr Opin Lipidol 1999; 10: 9-14.

Moghandasian MH, Frohlich J J. Effects of dietary phitosterols on cholesterol metabolism and atherosclerosis: Clinical and Experimental Evidence. Am J of Med 1999; 28(4): 922-928.

Naderali EK, Brown MJ, Pickavance LC, Wilding JP, Doyle PJ, Williams G. Dietary obesity in the rat induces endothelial dysfunction without causing insulin resistance: a possible role for triglycerides. Clinical Science 2001; 101: 302-9.

Naderali EK, Fatani S, Williams G. Chronic withdrawals of a high-palatable obesity-induced diet completely reverses metabolic and vascular abnormalities associated with-dietary obesity in rat. Atherosclerosis 2003; 10: 1-7.

Nakamura W, Hojoda S, Hayashi K. Purification and properties of rat liver glutathione peroxidase. Biochim Biophys Acta 1974; 358: 251-261.

Nelson DL, Cox MM, Lehninger AL. Princípios de Bioquímica. 4ª ed. São Paulo: Sarvier, 2006. 1119p.

Newsholme EA, Leech AR. Biochemistry for the Medical Sciences. Toronto:Wiley, 1983.p.623-627.

Nieminen P, Polonen I, Ikonen K, Maattanen M, Mustonen AM. Evaluation of reproductive safety of β-sitosterol on the american mink (neovision vision). Cehmosphere 2007; 71: 493-499.

Norman GR, Streiner DL. Biostatistic – the base essentials. St. Louis: Mosby Book, 1994. 260p.

Novelli ELB. Nutrição e vida saudável - Metabolismo energético e estresse oxidativo. Ribeirão Preto: Tecmedd Editora, 2005. 288p.

Novelli ELB, Fernandes AAH, Campos KE, Diniz YS, Almeida JA, Faine LA, et al. The adverse effect of high energy dense diet on cardiac tissue. J Nutr Environ Med 2002; 12 (4): 287-294.

Opie LH. Cardiac metabolism emergence, decline and resurgence. Part I. Cardiovascular Research Arch 1992; 26: 721-33.

Pannala AS, Rice-Evans CA, Halliwell B, Singh S. Inhibition of peroxynitrite-mediated tyrosine nitration by cathechin polyphenols. Biochem Biophys Res Commun 1997; 232:164-168.

Pari L, Velmurugan K. Protective and antioxidant role of caffeic acid against chloramphenicol induced hepatotoxicity in rats. Ad Phytother Res 2009; 37: 79-89.

Pegel KH. The importance of sitosterol and sitosterolin in human health and animal nutrition. S African J Sc 1997; 93: 263-268.

Pullman ME, Penefsky HS, Datta A, Racker E. Partial resolution of the enzymes catalyzing oxidative phsophorylation. J Biol Chem 1960; 235: 3322-3329.

Rasmussen HE, Guderian JR, Wray CA, Dussault PH, Schlegel TP, Carr TP. Reduction in cholesterol absorption is enhanced by stearate-enriched plant sterol esters in hamsters. J Nutr 2006; 136:2722- 7.

Reaven G. Metabolic syndrome: pathophysiology and implications for management of cardiovascular and metabolic syndrome. Circulation 2002; 106: 286-288.

Rique AB, Soares EA, Meirelles CM. Nutrição e exercício na prevenção e controle das doenças cardíacas. Rev Bras Med Esporte 2002; 8: 244-54.

Roberts CK, Vaziri ND, Wang XQ, Barnard RJ. Enhanced NO inactivation and hypertension induced by high-fat, refined-carboyhydrate diet. Hipertension 2000; 36: 423-429.

Rodrigues HG, Diniz YS, Faine LA, Almeida JA, Fernandes AAH, Novelli ELB. Suplementação nutricional com antioxidantes naturais: efeito da rutina na concentração de colesterol-HDL. Revista de Nutrição 2003; 16: 315-20.

Roehrig KL, Allred JB. Direct enzymatic procedure for the determination of liver glycogen. Anal Biochem 1974; 59: 414-421.

Root M, Anderson JJB. Dietary effects on nontraditional risk factors for heart disease. Nutrition Research 2004; 24: 827-38.

Scoccia AE, Molinuevo MS, Mccarthy AD, Cortizo AM. A simple method to assess the oxidative susceptibility of low density lipoproteins. BMC Clinical Pathology 2001; 1: 1-12.

Serra-Majem L, Cruz N, Ribas L, Tur JA. Olive oil and the mediterranean diet: beyond the rhetoric. Eur J Clin Nutr 2003; 57: S2-S7.

Souza AFM, Giugliani R. Doenças Mitocondriais. In: Carakushanski E. Doenças Genéticas em Pediatria. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan, 2001. 195p.

Stanley WC, Rydén L. The diabetic coronary patient. 2.ed. London: Science Pres, 2003. 76p.

Taufner CF, Ferraço EB, Ribeiro LF. Uso de plantas medicinais como alternativa fitoterápica nas unidades de saúde pública de Santa Teresa e Marilândia, ES. Natureza on line 2006; 4(1): 30-39.

Taylor RP, Ciccolo JT, Starnes JW. Effect of exercise training on the ability of the rat heart to tolerate hydrogen peroxide. Cardiovascular Research 2003; 58: 575-81.

Valenzuela BA, Garrido GA. Os fitoesteróis: agentes hipocolesterolêmicos naturais de origem não farmacológica. Revista Chile Nutrition 2000; 27 (2): 220-225.

Voet D, Voet JG, Pratt C. Fundamentos de Bioquímica. São Paulo: Artes Médicas, 2000. p.931,.

Wallace DC. Mitochondrial DNA sequence variation in human evolution and disease. Proc Aatl Acad Sci USA 1994; 91: 8739-8746.

Wallace DC, Brown MD, Lott MT. Mitochondrial Genetics. In: Rimoin DL, Cormor JM, Pybriz RE. Emery and Rimoin's Practice of Medical Genetics. New York: Vol I. 3a ed. Churchill Livingstone, 1997. 299p.

Wierik EV, Berg H, Weststrate JA, Hof KV. Consumption of reduced fat products: effects on parameters of antioxidant capacity. Eur J Clin Nutr 1996; 50: 214-9.

Wilson CR, Tran MK, Salazar KL, Young ME, Taegtmeyer H. Western diet, but not high fat diet, causes derangements of fatty acid metabolism and contractile dysfunction in the heart of Wistar rats. Biochem. J. 2007; 406: 457–467.

Wolfe CL, Sievers RE, Visseren FLJ, Donelly TJ. Loss of myocardial protection after preconditioning correlates with the time course of glycogen recovery within the preconditioned segment. Circulation 1993; 87: 881-892.

Zar JH. Biostatistical analysis. 4.ed. New Jersey: Practice-Hall, 1994. 663p.

CAPÍTULO 3

Considerações Finais

Os resultados deste estudo permitiram concluir que as alterações nos componentes da dieta rica em sacarose e colesterol (DH) induziram modificações no consumo de macronutrientes.

- Animais alimentados com DH apresentaram maior ganho de peso e peso final do que animais alimentados com dieta padrão.
- β-sitosterol e chá de folhas de graviola não alteraram a ingestão alimentar, bem como o peso final nos animais.
- A resposta glicêmica foi menor em animais que ingeriram β-sitosterol tanto nos que receberam dieta padrão quanto nos que receberam dieta hipercalórica, quando comparados aos seus respectivos controles.
- O teste oral de tolerância à glicose (TOTG), demonstrou que a ingestão de β-sitosterol bem como a de chá de graviola atuaram como hipoglicemiantes em animais que receberam dieta hipercalórica..
- A análise calorimétrica demonstrou que a suplementação nutricional com β-sitosterol e chá de folhas de graviola induziu modificação no substrato usado para obtenção de energia, aumentando a oxidação lipídica, além de aumentar a taxa metabólica basal e reduzir o quociente respiratório.
- Chá de folhas de graviola e seu componente β-sitosterol, demonstraram melhora do perfil lipídico e do estresse oxidativo sérico.
- Dieta rica em sacarose e colesterol favoreceu o desenvolvimento da hipercolesterolemia isolada e do estresse oxidativo sérico. Admnistração de chá de graviola diminuiu as concentrações de triacilglicerol, indicando efeitos benéficos no tecido cardíaco, em condições de ingestão de dieta hipercalórica.
- Dieta hipercalórica diminuiu a atividade da ATPase, indicando que a obesidade diminuiu o fornecimento de ATP para a contração do músculo cardíaco. Chá de folhas de graviola e β-sitosterol normalizaram a atividade da ATPase miocárdica de animais mantidos com dieta hipercalórica.

Esses resultados demonstram que o β-sitosterol possui efeitos análogos ao chá de folhas de chá de graviola.

Livros Grátis

(http://www.livrosgratis.com.br)

Milhares de Livros para Download:

Baixar livros de Administração
Baixar livros de Agronomia
Baixar livros de Arquitetura
Baixar livros de Artes
Baixar livros de Astronomia
Baixar livros de Biologia Geral
Baixar livros de Ciência da Computação
Baixar livros de Ciência da Informação
Baixar livros de Ciência Política
Baixar livros de Ciências da Saúde
Baixar livros de Comunicação
Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE
Baixar livros de Defesa civil
Baixar livros de Direito
Baixar livros de Direitos humanos
Baixar livros de Economia
Baixar livros de Economia Doméstica
Baixar livros de Educação
Baixar livros de Educação - Trânsito
Baixar livros de Educação Física
Baixar livros de Engenharia Aeroespacial
Baixar livros de Farmácia
Baixar livros de Filosofia
Baixar livros de Física
Baixar livros de Geociências
Baixar livros de Geografia
Baixar livros de História
Baixar livros de Línguas

Baixar livros de Literatura
Baixar livros de Literatura de Cordel
Baixar livros de Literatura Infantil
Baixar livros de Matemática
Baixar livros de Medicina
Baixar livros de Medicina Veterinária
Baixar livros de Meio Ambiente
Baixar livros de Meteorologia
Baixar Monografias e TCC
Baixar livros Multidisciplinar
Baixar livros de Música
Baixar livros de Psicologia
Baixar livros de Química
Baixar livros de Saúde Coletiva
Baixar livros de Serviço Social
Baixar livros de Sociologia
Baixar livros de Teologia
Baixar livros de Trabalho
Baixar livros de Turismo