

FERNANDA DE OLIVEIRA ARAUJO

**EFEITO DO EXTRATO DA CASCA DO BACUPARI (*Garcinia brasiliensis*) NA
ESTEATOSE HEPÁTICA, NO ESTRESSE OXIDATIVO, NA INFLAMAÇÃO E
NA MICROBIOTA INTESTINAL EM RATOS WISTAR OBESOS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal
de Viçosa, como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em Agroecologia,
para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2017

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

A663e
2017

Araujo, Fernanda de Oliveira, 1986-
Efeito do extrato da casca de bacupari (*Garcinia
brasiliensis*) na esteatose hepática, no estresse oxidativo, na
inflamação e na microbiota intestinal em ratos wistar obesos : . /
Fernanda de Oliveira Araujo. – Viçosa, MG, 2017.
ix, 76f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexo.

Orientador: Hércia Stampini Duarte Martino.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Bacupari. 2. *Garcinia brasiliensis*. 3. Obesidade. 4. S
tresse oxidativo. 5. Inflamação. 6. Microbiota. I. Universidade
Federal de Viçosa. Departamento de Nutrição e Saúde. Mestrado
em Agroecologia. II. Título.

CDD 22. ed. 634

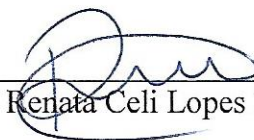
FERNANDA DE OLIVEIRA ARAUJO

**EFEITO DO EXTRATO DA CASCA DO BACUPARI (*Garcinia brasiliensis*) NA
ESTEATOSE HEPÁTICA, NO ESTRESSE OXIDATIVO, NA INFLAMAÇÃO E
NA MICROBIOTA INTESTINAL EM RATOS WISTAR OBESOS**

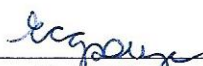
APROVADA: 23 de fevereiro de 2017.



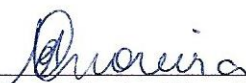
Laércio dos Anjos Benjamin



Renata Celi Lopes Toledo



Eliana Carla Gomes de Souza
(Coorientadora)



Maria Eliza de Castro Moreira
(Coorientadora)



Hércia Stampini Duarte Martino
(Orientadora)

SUMÁRIO

RESUMO	vi
ABSTRACT.....	viii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	3
2.1. Objetivo geral	3
3.2. Objetivos específicos:.....	3
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
3.1. Obesidade: Estresse oxidativo e inflamação	4
2.1.1 Peroxidação de lipídios.....	6
2.2. Doença hepática gordurosa não alcóolica (DHGNA)	7
2.3. Microbiota intestinal e ácidos graxos de cadeia curta	9
2.4. Compostos bioativos	11
2.5. Caracterização do bacupari.....	12
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	14
4.1. Local de execução	14
4.2. Coleta do material vegetal	15
4.3. Preparo dos extratos	15
4.4. Preparo das dietas Experimentais	15
4.5. Ensaio biológico	16
4.6. Eutanásia dos animais.....	18
4.7. Medidas de ingestão alimentar	18
4.8. Medidas biométricas.....	18
4.9. Extração do RNA no tecido hepático	18
4.9.1. Síntese de cDNA e qPCR em tempo real	19

4.10. Extração da proteína da fração nuclear e citoplasmática no tecido hepático	20
4.11. Análise de Western blotting	21
4.12. Quantificação da proteína no tecido hepático.....	22
4.13. Quantificação de citocinas plasmáticas	22
4.14. Preparação do homogeneizado para análise da peroxidação lipídica e da defesa antioxidante em tecido hepático.	23
4.15. Peroxidação lipídica no tecido hepático	23
4.15.1 Concentração de malondialdeído (MDA).....	23
4.15.2. Concentração de Óxido Nítrico (ON).....	23
4.16. Atividade da superóxido dismutase (SOD)	24
4.17. Atividade da catalase (CAT)	24
4.18. Glutathione Transferase (GST)	25
4.19. Microbiota intestinal.....	25
4.19.1. Extração do DNA fecal.....	25
4.19.2. Análise da microbiota intestinal a partir do DNA fecal	26
4.20. Determinação dos Ácidos orgânicos	27
4.21. Análise histomorfométrica do tecido hepático	27
4.22. Aspectos éticos	28
4.23. Análises estatísticas	28
5. REFERÊNCIAS.....	29
6. ARTIGO 1	38
7. INTRODUÇÃO.....	39
8. MATERIAIS E MÉTODOS.....	40
8.1. Coleta do material vegetal	40
8.2. Preparo dos extratos	40
8.3. Ensaio biológico	41

8.4. Medidas de ingestão alimentar e biométricas.....	42
8.5. Extração de mRNA, Síntese de cDNA e PCR em tempo real.....	42
8.6. Quantificação da proteína no tecido hepático.....	43
8.7. Quantificação de citocinas plasmática.....	43
8.8. Análise histomorfométrica do tecido hepático	44
8.9. Análises estatísticas	44
9. RESULTADOS	44
9.1. Efeito do extrato de bacupari no consumo alimentar e nas medidas biométricas ...	44
9.2. Efeito do extrato de bacupari na expressão de genes envolvidos na lipogênese e oxidação de ácidos graxos e na concentração de citocinas	46
9.3. Efeito do extrato de bacupari no tecido hepático dos ratos após o tratamento com EEB.....	48
10. DISCUSSÃO.....	49
11. CONCLUSÃO.....	51
12. REFERÊNCIAS:	52
13. ARTIGO 2.....	55
14. INTRODUÇÃO.....	56
15. MATERIAS E MÉTODOS	58
15.1. Coleta do material vegetal	58
15.2. Preparo dos extratos	58
15.3. Ensaio biológico	58
15.4. Análise da microbiota intestinal a partir do DNA fecal	59
15.5. Determinação dos Ácidos orgânicos	60
15.6. Análises do estresse oxidativo e das defesas antioxidantes no tecido hepático	61
15.7. Extração de RNA, Síntese de cDNA e PCR em tempo real.....	61
15.8. Análise de western blotting	62

15.9. Quantificação de resistina plasmática.....	62
15.10. Análises estatísticas	63
16. RESULTADOS	63
16.1. Efeito do extrato de bacupari na microbiota intestinal e nos ácidos orgânicos.....	63
16.2. Efeito do extrato etanólico de bacupari no estresse oxidativo.....	64
17. DISCUSSÃO	66
18. CONCLUSÃO.....	69
19. REFERÊNCIAS	70
20. CONCLUSÃO GERAL	75
ANEXO 1	76

RESUMO

ARAUJO, Fernanda Oliveira, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2017. **Efeito do extrato da casca do bacupari (*Garcinia brasiliensis*) na esteatose hepática, no estresse oxidativo, na inflamação e na microbiota intestinal em ratos Wistar obesos.** Orientadora: Hércia Stampini Duarte Martino. Coorientadoras: Maria Eliza de Castro Moreira e Eliana Carla Gomes de Souza.

A obesidade é uma doença crônica caracterizada pelo acúmulo excessivo de gordura corporal. Os distúrbios metabólicos relacionados com a obesidade têm demonstrado promover inflamação sistêmica subclínica de baixo grau, que leva a alteração na composição da microbiota intestinal e na produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), que pode aumentar o estresse oxidativo, a inflamação e a homeostase energética dos indivíduos. A espécie *Garcinia brasiliensis*, conhecida popularmente como bacupari, produz frutos comestíveis, ricos em compostos bioativos, principalmente benzofenonas, flavonoides e xantonas, que possuem propriedades antifúngicas, anti-inflamatórias, antitumorais, antioxidantes e antiobesogênicas. O objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito do extrato etanoico da casca de bacupari (EEB) na esteatose hepática, no estresse oxidativo, na inflamação e na microbiota intestinal de ratos wistar obesos alimentados com dieta hiperlipídica. Ratos da linhagem Wistar, machos, adultos e obesos (n=24) foram randomizados em três grupos experimentais (n=8/grupo) e alocados em gaiolas individuais por oito semanas, divididos nos seguintes grupos: grupo controle normal (AIN-93M), grupo controle obeso (HFD) e o grupo teste obeso recebendo 300 mg por dia/animal de EEB adicionado à dieta hiperlipídica (BHFD). Avaliou-se a ingestão alimentar, medidas biométricas e, os índices de massa corporal e hepatossomático dos animais. O perfil de adipocinas (resistina e adiponectina) foi determinado no soro dos animais. No tecido hepático foram avaliadas as expressões dos genes, tais como: o fator nuclear kappa B (NF-κB), o receptor ativado por peroxissoma alfa (PPAR-α), a carnitina palmitoil transferase alfa (CPT-1α), a proteína de ligação ao elemento regulador de esteroides 1c (SREBP-1c) e receptor de adiponectina 2 (ADIPOR2), a proteína do choque térmico (HSP72) e a superóxido dismutase (SOD). Avaliou-se também os fatores de transcrição NF-κB por western blot e PPAR-α por imunoensaio, a peroxidação de lipídios, a defesa antioxidante e a histomorfometria no fígado. A microbiota intestinal e a presença de ácidos graxos de cadeia curta foram avaliados nas fezes. O Coeficiente de eficiência

alimentar (CEA), o peso final e o índice de massa corporal (IMC) do grupo controle obeso foram maiores ($p<0,05$) em relação ao tratado com bacupari. O peso do fígado e o índice hepatossomático foram menores ($p<0,05$) no BHFD em relação ao grupo HFD. Em relação aos níveis séricos das citocinas pró-inflamatórias resistina reduziu ($p<0,05$) e adiponectina aumentou ($p<0,05$) no grupo BHFD em relação ao grupo HFD. A expressão dos genes NF- κ B, PPAR- α e ADIPOR2 foram menores ($p<0,05$) e CPT-1 α , HSP72 e SREBP-1c foram semelhantes ($p>0,05$) no grupo tratado com bacupari em relação ao controle normal. A banda formada pela identificação de NF- κ B foi menor no grupo BHFD em relação ao grupo HFD. As concentrações de malondialdeído, óxido nítrico e superóxido dismutase foram menores ($p<0,05$), a catalase foi maior ($p<0,05$) e a glutathione tranferase semelhante ($p>0,05$) no grupo BHFD em relação ao grupo HFD. A histologia dos tecidos hepáticos confirmou o efeito antioxidante do EEB ao reduzir o percentual de gordura hepática e o diâmetro dos núcleos no grupo BHFD em relação ao HFD ($p<0,05$). Para microbiota intestinal houve redução ($p<0,05$) da abundância do Filo *Firmicutes*, aumento do Filo *Proteobacterias* e do ácido propiônico no grupo BHFD em relação ao HFD. O presente estudo demonstrou que o extrato etanoico da casca de bacupari tem efeito protetor no estresse oxidativo, na inflamação e na esteatose hepática, além de modular positivamente a microbiota intestinal, em ratos obesos alimentados com dieta hiperlipídica.

ABSTRACT

ARAUJO, Fernanda Oliveira, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2017. **Effect of bacupari extract (*Garcinia brasiliensis*) on hepatic steatosis, oxidative stress, inflammation and intestinal microbiota in obese wistar rats.** Advisor: Hércia Stampini Duarte Martino. Co-advisors: Maria Eliza de Castro Moreira and Eliana Carla Gomes de Souza.

Obesity is a chronic disease characterized by excessive accumulation of body fat. Obesity-related metabolic disorders have been shown to promote low-grade subclinical systemic inflammation leading to alterations in the composition of the intestinal microbiota and in the production of short chain fatty acids (ACFA), which may increase oxidative stress, inflammation, and inflammation. Homeostasis of individuals. The species *Garcinia brasiliensis*, popularly known as bacupari, produces edible fruits rich in bioactive compounds, mainly benzophenones, flavonoids and xanthenes, which have antifungal, anti-inflammatory, antitumor, antioxidant and antiobesogenic properties. The objective of this study was to evaluate the effect of the bacupari extract (BSE) on hepatic steatosis, oxidative stress, inflammation and intestinal microbiota of obese wistar rats fed a hyperlipidic diet. Wistar rats, male, adult and obese (n = 24) were randomized into three experimental groups (n = 8 / group) and allocated to individual cages for eight weeks divided into the following groups: normal control group (AIN-93M) , Obese control group (HFD) and the obese test group receiving 300 mg per day / animal of BSE added to the hyperlipid diet (BHFD). Feed intake, biometric measurements, and body mass and hepatosomatic indexes of animals were evaluated. The adipokine profile (resistin and adiponectin) was determined in the sera of the animals. In hepatic tissue, the expression of the kappa B nuclear factor (NF-kB), the peroxisome alpha-activated receptor (PPAR- α), the carnitine palmitoyl transferase alpha (CPT-1 α), the Binding to steroid regulatory element 1c (SREBP-1c) and adiponectin 2 receptor (ADIPOR2), heat shock protein (HSP72) and superoxide dismutase (SOD). NF-kB transcription factors were also evaluated by western blot and PPAR- α by immunoassay, lipid peroxidation, antioxidant defense and histomorphometry in the liver. The intestinal microbiota and the presence of short chain fatty acids were evaluated in the faeces. The coefficient of food efficiency (CEA), the final weight and the body mass index (BMI) of the obese control group were higher (p <0.05) than the

bacupari treated group. Liver weight and hepatosomatic index were lower ($p < 0.05$) in BHFD than in the HFD group. In relation to serum levels of proinflammatory cytokines resistin reduced ($p < 0.05$) and adiponectin increased ($p < 0.05$) in the BHFD group compared to the HFD group. Expression of the NF- κ B, PPAR- α and ADIPOR2 genes were lower ($p < 0.05$) and CPT-1 α , HSP72 and SREBP-1c were similar ($p > 0.05$) in the bacupari group compared to control normal. The band formed by the identification of NF- κ B was lower in the BHFD group than in the HFD group. The concentrations of malondialdehyde, nitric oxide and superoxide dismutase were lower ($p < 0.05$), catalase was higher ($p < 0.05$) and similar glutathione transferase ($p > 0.05$) in the BHFD group in relation to the group HFD. Liver tissue histology confirmed the antioxidant effect of BSE by reducing the percentage of hepatic fat and the diameter of the nuclei in the BHFD group compared to HFD ($p < 0.05$). For intestinal microbiota there was a reduction ($P < 0.05$) in the abundance of the Filmo Firmicutes, increase of Filo Proteobacterias and propionic acid in the BHFD group in relation to HFD. The present study demonstrated that the ethanolic extract of bacupari peel has a protective effect on oxidative stress, inflammation and hepatic steatosis, besides positively modulating the intestinal microbiota in obese rats fed a hyperlipidic diet.

1. INTRODUÇÃO

A obesidade é uma doença crônica não transmissível (DCNT) que vem sendo considerada uma das principais causas de mortalidade de adultos e crianças em todo o mundo, totalizando mais de 4 milhões de mortes a cada ano (WHO, 2014). O acúmulo excessivo de tecido adiposo em indivíduos está associado com o estresse oxidativo e com inflamação subclínica crônica de baixo grau. Estes aumentam a expressão de marcadores inflamatórios e ativam a sinalização de vias inflamatórias como o fator nuclear κ B (NF- κ B), que podem desencadear a dislipidemia, as doenças cardiovasculares, o diabetes melitus, a esteatose hepática, entre outras, que são características da síndrome metabólica (PARK et al., 2012; NAIR et al., 2014; WITASP et al., 2014).

Em nossas células existem fatores de transcrição (FT) gênica sensíveis a sinais extracelulares e, ou modificações no meio interno capazes de regular a expressão dos genes, gerando respostas aos estímulos. Dentre estes, estão o NF- κ B e a AP-1 (proteína ativadora 1). Os FT podem ser modulados pelo estresse oxidativo e agentes inflamatórios e antiinflamatórios. O estresse oxidativo, via sinalização dos FT e lesão celular, gera modificações gênicas no núcleo das células, agindo como um potente indutor da resposta inflamatória, por alterar a síntese de citocinas, prostaglandinas, tromboxano, leucotrienos, moléculas de adesão e quimiocinas (HADDAD, 2002; RAUHMANN & MACNEE, 2000; JASSEN-HEINIGER; POYNTER & BAEURLE, 2000).

Os mecanismos de indução da inflamação sistêmica, gerados por um estresse oxidativo advindo de uma dieta hiperlipídica, possuem capacidade de modular a microbiota intestinal, influenciando assim na obesidade mediada por lipopolissacarídeos (LPS). Os LPS são derivados da parede celular de bactérias gram-negativas presentes no lúmen intestinal e, normalmente, estão presentes em baixas concentrações no sangue de indivíduos saudáveis. Quando em níveis aumentados, elas são responsáveis pela inflamação de baixo grau, resistência insulínica, hiperplasia adipocitária e diminuição da função das células beta-pancreáticas (PRANGTHIP et al., 2013; KRAJMALNIK-BROWN et al., 2012). De acordo com Brun e colaboradores (2007), a microbiota intestinal presente em obesos pode favorecer o aumento da permeabilidade intestinal e, com isso, contribuir para o aumento dos níveis sistêmicos de endotoxinas.

Sabe-se que o excesso de peso corporal pode provocar resistência à insulina no tecido adiposo, no músculo e fígado. A resistência à insulina faz com que aumente a lipólise e, conseqüentemente, os níveis de lipídeos circulantes, induzindo assim a retenção de gordura no fígado, que pode aumentar o estresse oxidativo em hepatócitos de animais e seres humanos (ROLO; TEODORO; PALMEIRA, 2012; CHOI; ABDELMEGEED; SONG, 2016). O acúmulo de gordura é considerado a fase inicial, para formas mais graves da doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA), especialmente na presença de aumento do estresse oxidativo. A DHGNA é considerada nos países ocidentais um problema de saúde pública, sendo associada diretamente aos hábitos dos indivíduos, como o aumento do consumo de dietas hiperlipídicas e a falta de exercícios físicos.

O controle e regulação da homeostase de lipídios hepáticos são realizados por reguladores de transcrição chave, tais como esteróis elemento regulamentar de ligação proteína-1c (SREBP-1c) e receptores ativados por proliferador de peroxissomas alfa (PPAR- α). O SREBP-1c é um fator de transcrição que regula a biossíntese de ácidos graxos aumentando a transcrição de enzimas-chave, incluindo ácido graxo sintase (FAS) e acetil-CoA carboxilase (ACC). A expressão deste fator de transcrição é elevada em indivíduos resistentes à insulina, que aumenta a lipogênese, conduz ao acúmulo de triacilglicerol (TG) no fígado e ao desenvolvimento de esteatose hepática (SHIMOMURA, BASHMAKOV & HORTON, 1999).

As adipocinas produzidas a partir do tecido adiposo branco têm sido relacionadas a modulação da sensibilidade à insulina. A adiponectina é uma citocina que diminui a resistência a insulina, estimula a oxidação de ácidos graxos no fígado e no músculo (GUERRA et al., 2015). Segundo Xu e colaboradores (2013), a adiponectina foi eficaz na redução da hepatomegalia, da esteatose e da enzima aspartato alanina aminotransferase, anormalidades associadas com DHGNA em ratos.

Os compostos bioativos não nutrientes presentes nos alimentos, podem exercer os seus efeitos benéficos, influenciando na expressão gênica de genes envolvidos na sinalização intracelular do metabolismo de lipídios e no combate do processo inflamatório sistêmico (DRAGANO et al., 2013). A espécie *G. brasiliensis* Mart tem demonstrado em extratos possuir uma diversidade de compostos fenólicos, como benzofenonas, xantonas e flavonoides, com efeitos antioxidante, antifúngico e anti-inflamatório *in vitro* (MARTINS et al., 2008; SANTA CECILIA et al., 2011; GONTIJO et al., 2012). O extrato etanoico de *Garcinia brasiliensis* apresentou atividade

antiinflamatória e atividade antinociceptiva em ratos machos suíços com edema induzido na pata (SANTA CECILIA et al., 2012).

O nosso grupo de trabalho constatou que o EEB apresentou efeito antiobesogênico em ratos wistar obesos tratados com dieta hiperlipídica (MOREIRA et al., 2017). Assim, dando continuidade a investigação a hipótese da presente pesquisa baseia-se no princípio que o EEB irá modular as vias regulatórias no fígado relacionadas a lipólise e lipogênese, o estresse oxidativo e a inflamação, além de modular a microbiota intestinal, em ratos obesos alimentados com dieta hiperlipídica.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar o efeito do extrato da casca de bacupari (*Garcinia brasilienses*) na esteatose hepática, no estresse oxidativo, na inflamação e na microbiota intestinal de ratos obesos alimentados com dieta hiperlipídica.

3.2. Objetivos específicos:

- ✓ Avaliar o efeito do consumo do extrato da casca de bacupari sobre o peso corporal e as medidas biométricas, a retenção de gordura e o dano ao tecido hepático;
- ✓ Avaliar o efeito do consumo do extrato da casca de bacupari sobre transcrição de genes envolvidos na lipogênese e oxidação de gorduras do tecido hepático;
- ✓ Medir a peroxidação de lipídios e a defesa antioxidante no tecido hepático de ratos obesos alimentados com dieta hiperlipídica e extrato da casca de bacupari;
- ✓ Avaliar o efeito do consumo do extrato da casca de bacupari sobre os marcadores do processo inflamatório;
- ✓ Avaliar o efeito do consumo do extrato da casca de bacupari sobre a modulação da composição da microbiota intestinal e a produção de ácidos graxos de cadeia curta.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Obesidade: Estresse oxidativo e inflamação

As espécies reativas de oxigênio (ERO) e de nitrogênio (ERN) são continuamente produzidas no organismo humano, sobretudo nas mitocôndrias, membranas celulares e no citoplasma. Em concentrações fisiológicas, não causam danos às células, pois o sistema de defesa antioxidante tem o objetivo primordial de manter o processo oxidativo dentro dos limites fisiológicos e passíveis de regulação, impedindo que os danos oxidativos se amplifiquem e causem danos sistêmicos irreparáveis. Porém, quando em concentrações suprafisiológicas ocorre a instalação do estresse oxidativo em função do desequilíbrio entre os fatores pró-oxidantes e antioxidantes, que podem levar danos às lipoproteínas, lipídios, proteínas e DNA e desencadear doenças crônicas (STROBEL, 2011; BARBOSA et al., 2010; VASCONCELOS et al., 2007).

A existência, no nosso organismo, de uma produção contínua de compostos oxidantes durante os processos metabólicos levou ao desenvolvimento de um mecanismo de defesa antioxidante para diminuir os níveis intracelulares e impedir a indução de danos nas células. Quando a produção de radicais livres e, ou espécies reativas supera a capacidade de ação dos antioxidantes, a oxidação de biomoléculas é favorecida, gerando metabólitos específicos, os marcadores do estresse oxidativo, que podem ser identificados e quantificados.

Na obesidade é comum a baixa ingestão dietética de antioxidantes, concentrações plasmáticas baixas de antioxidantes e biomarcadores elevados do estresse oxidativo. O aumento do estresse oxidativo está relacionado com fatores de risco para alterações metabólicas e podem contribuir para o desenvolvimento de várias comorbidades relacionadas à obesidade, incluindo resistência à insulina, diabetes do tipo II, doença hepática gordurosa não alcoólica e aterosclerose (MURER et al, 2014).

Sabe-se que a dieta é sem dúvida, um fator de grande importância na modulação do estresse oxidativo (BARBOSA et al, 2010). O consumo excessivo de uma dieta rica em gordura é relacionado com o aparecimento da obesidade em ratos e em seres humanos. A obesidade leva a uma maior incidência de diabetes melitus, dislipidemia e doenças cardiovasculares, bem sendo o acúmulo de gordura maior no tecido adiposo e a partir daí ocorre o acúmulo em outros órgãos como o fígado (LIN et al., 2013 ;WANG, BIN et al., 2013).

O desenvolvimento da obesidade está diretamente relacionado com o aumento da massa gorda, que conduz à infiltração de macrófagos no tecido adiposo e à produção de citocinas pró-inflamatórias, juntamente com a diminuição de citocinas anti-inflamatórias. A desregulação das adipocinas e o aumento de infiltrados inflamatórios no tecido adiposo resulta na inflamação crônica e no estresse oxidativo (LIN et.al., 2013).

Com o objetivo de combater o estresse oxidativo e preservar a homeostase é necessário a produção endógena de antioxidantes, como as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e da glutathione peroxidase (GPX). A defesa também ocorre pelo consumo de antioxidantes dietéticos, os exógenos, que incluem vitamina E (tocoferóis e tocotrienóis), ácido ascórbico (vitamina C), ubiquinona (coenzima Q10), tióis (ácido alfa-lipóico), carotenoides e flavonoides (STROBEL et al., 2011).

A primeira linha de defesa contra os radicais livres no organismo ocorre pela ação das superóxido dismutases, que por dismutação do ânion superóxido que produz o peróxido de hidrogênio, que é convertido em água pela ação da catalase e, ou glutathione peroxidase. Além dessas enzimas, o organismo dispõe de outros sistemas antioxidantes, como a indução de síntese de proteína de choque térmico, HSP70, as quais têm sua expressão aumentada em condições variadas de estresse metabólico e atuam principalmente como chaperonas moleculares, ou seja, no auxílio durante o dobramento de proteínas e no transporte citosólico das mesmas (WILDNER et al, 2016; VELLOSA et al., 2007). A HSP72 é a primeira a ser induzida durante o estresse e tem funções citoprotetora e anti-inflamatória (DRUMMOND, 2013).

Chung e colaboradores (2008) demonstraram que seres humanos obesos, resistentes à insulina, têm expressão reduzida da proteína HSP 70 e aumento da fosforilação da proteína de sinalização c-Jun N-terminal quinase (JNK). Estes fatores são responsáveis pelo ciclo vicioso da inflamação e da resistência à insulina na obesidade. Portanto, com o aumento da expressão da proteína HSP 70, obtém-se um efeito anti-inflamatório devido ao bloqueio dos fatores de transcrição pró-inflamatório, como o fator nuclear kappa B (NF-kB) (SINGLETON et al., 2005).

As proteínas HSPs atuam em diferentes processos anti-apoptóticos (BURG et al., 2007), na inibição de vias de sinalização intracelular, tais como a da proteína quinase ativada por mitógenos (MAPK) e do NF-kB e, conseqüentemente, na inibição da expressão de marcadores inflamatórios como interleucina 1 β (IL-1 β), interleucina 6

(IL-6), fator de necrose tumoral (TNF- α) e óxido nítrico sintase (iNOS) (TAWFIK et al., 2012; SINGLETON et al., 2005).

Os receptores ativados por proliferador de peroxissoma (PPARs) representam uma família de receptores nucleares intimamente ligados à lipólise no fígado e no músculo esquelético (PPAR- α) e à adipogênese (PPAR- γ) (ALMEIDA FILHO & MENDES).

Segundo Nunn, Bell & Barter (2007) os PPARs podem ser uma solução evolutiva no enigma 'hipoxia-lipídico', onde a capacidade de armazenar e gastar gordura são essenciais para a sobrevivência. Porém, como as gorduras são potencialmente tóxicas, a hipoxia resulta no aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) mitocondrial, o que pode resultar na peroxidação de lipídios que leva ao processo inflamatório, que ativa o fator nuclear kappa B (NF- κ B) .

Além disso, a expressão aumentada de fatores de transcrição, como PPARs e NF κ B, e a intensa infiltração de macrófagos, caracterizam um quadro de inflamação crônica. Esta condição metabólica predispõe também à elevada formação de radicais livres, redução das enzimas antioxidantes e aumento do dano celular, promovendo resistência insulínica, esteatose hepática, doenças cardiovasculares, diabetes melitus, entre outras (NATAL et al., 2015).

A sobrecarga de lipídios no fígado contribui para a disfunção das células hepáticas, reduzindo a capacidade de oxidação de ácidos graxos, o que permite que compostos intermediários como ceramidas e diacilgliceróis se acumulem e ativem a da sintetase de óxido nítrico induzida (iNOS), com consequente formação de óxido nítrico e indução de processo de apoptose por meio da ativação do fator nuclear κ B (NF- κ B) (FERREIRA, 2014; ADIELS, TASKINEN & BORÉN, 2008).

2.1.1 Peroxidação de lipídios

Os ácidos graxos poliinsaturados são mais propensos ao dano oxidativo, em função do maior número duplas ligações de hidrogênio, que são mais susceptíveis à oxidação. O processo de peroxidação lipídica afeta a fluidez da membrana, o funcionamento, a permeabilidade, o potencial de elétrons e o transporte de metabólitos (STROBEL, 2011). O aumento da produção de ERO mitocondrial, pode resultar na peroxidação lipídica que não só é potencialmente prejudicial, mas também um sinal

inflamatório que ativa o fator nuclear kappa B (NF- κ B) (NUNN; BELL & BARTER, 2007).

A peroxidação de lipídios é um processo complexo que envolve a interação de radicais livres derivados de oxigênio com ácidos graxos poliinsaturados, que resulta em uma variedade de aldeídos altamente reativos e eletrofílicos. Este fenômeno acontece devido a reações em cadeia de radicais livres. Estes atacam um alílico de carbono para formar um radical central no carbono. O radical reage com O₂ para produzir radicais peroxil. O peroxil pode reagir com lipídios adjacentes, formando um hidroperóxido de lipídio, o qual pode decompor-se para produzir vários produtos de peroxidação lipídica, como a acroleína e seu derivado, o malondialdeído (REED, 2011).

O malondialdeído (MDA) é um aldeído de cadeia curta, sendo um dos compostos medidos pela reação com o ácido tiobarbitúrico (TBARS). A formação de malondialdeído ocorre pela decomposição dos hidroperóxidos lipídicos e sua concentração tem sido utilizada para estimar a intensidade da peroxidação lipídica em sistemas biológicos (células e tecidos). Nos sistemas biológicos é uma medida importante para avaliação do índice de peroxidação lipídica, servindo como um marcador de estresse oxidativo celular (MAFRA, ABDALLA & COZZOLINO, 1999; ANTUNES et al., 2008).

2.2. Doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA)

O fígado é um dos maiores e principais órgãos do corpo. Ele recebe grande parte das substâncias absorvidas no intestino. Neste órgão ocorre a maioria das reações metabólicas; como a gliconeogênese, desaminação e oxidação. É um órgão muito vascularizado, formado pelas células hepáticas, sinusóides, canais biliares e alguns macrófagos, denominados células de Kupffer. Tem como sua principal reserva energética o glicogênio. Entretanto verifica-se glóbulos de gordura que armazenam pequena quantidade de lipídio e vitaminas lipossolúveis, principalmente a vitamina A. Nos obesos, os hepatócitos tornam-se hipertróficos, sendo possível observar o acúmulo de gordura no citoplasma. Outra importante função é a eliminação de toxinas pela bile e a produção de ácidos biliares, responsáveis pela emulsificação das gorduras (ANDRADE et al., 2013; JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2013).

O estudo do funcionamento do fígado é de grande importância para entender a patogênese das doenças crônicas não transmissíveis. As análises microscópicas das

células são essenciais para observar as alterações que levam a modificações das suas funções do organismo. Algumas modificações em um determinado tratamento não são confirmadas pelas análises histométricas ou bioquímicas, em função das condições metabólicas inerentes aos animais testados e do tempo de experimentação (MORAES et al; 2012; NAIR et al., 2014).

A desorganização celular é iniciada a nível molecular e os sintomas não são descritos pela observação macroscópica (YANG et al., 2011; TEKELESELASSIE et al., 2013). É necessário para a confirmação das alterações promovidas pelas dietas e demais substâncias administradas aos animais laboratoriais, o emprego de análises histológica e de biologia molecular.

O fígado desempenha papel crítico na manutenção da homeostase energética. A DHGNA é um dos principais contribuintes para as doenças cardiovasculares e está relacionado a uma maior ocorrência de morbidades e mortalidades relacionadas com a obesidade (ROLO, TEODORO & PALMEIRA, 2012).

A doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) é, atualmente, a causa mais comum de doença hepática em adultos nos Estados Unidos, sendo a principal responsável pelo encaminhamento para os serviços de hepatologia. Estima-se que a prevalência na população em geral dos Estados Unidos, Japão e Itália esteja em torno de 25%, 29% e 20%, respectivamente. Em Bangladesh, na Ásia, a incidência tem sido maior. No Brasil, estima-se que a prevalência da DHGNA esteja entre 10 a 24% da população (DE SOUZA, 2014).

O primeiro estágio da DHGNA é a esteatose hepática, que é definida pela concentração hepática de triacilglicerídeos superior a 55 mg/g de fígado (5,5 %). A doença pode evoluir para esteato hepatite não alcoólica (NASH), caracterizada por sinais de lesão e inflamação hepática com deposição de colágeno, que conduz a um agravamento significativo da função hepática, caracterizada pela infiltração de lipídeos no fígado, inflamação, danos celulares e fibrose. Estima-se que de 10 a 29 % dos pacientes com NASH desenvolverá cirrose no período de 10 anos (ROLO, 2011; BASARANOGLU, BASARANOGLU & BUGIANESI, 2015).

A DHGNA é causada pela disponibilidade e mobilização de ácidos graxos livres (AGL), com aumento da sua síntese hepática, da esterificação em triacilglicerídeos e diminuição de transporte de triacilglicerídeos no fígado. De acordo com a teoria dominante, haveria um desvio de lipólise em favor da lipogênese (LIRA et al., 2010), assim resultando no acúmulo de gordura no fígado, principalmente por meio de um

aumento exagerado no transporte de AGL do tecido adiposo visceral para o fígado, gerando um desequilíbrio na síntese “de novo” de lipídio e do catabolismo nos hepatócitos (NOH et al., 2010).

Estudos clínicos, experimentais e epidemiológicos demonstram que a DHGNA está associada intensamente com a síndrome metabólica, que consiste na associação de fatores como, a obesidade, o diabetes, as hiperlipidemias e a resistência à insulina (GARCÍA-RUIZ et al., 2013; BEDOGNI et al., 2005) Apesar da DHGNA ser causa comum na doença hepática crônica, em muitos países nenhum tratamento adequado foi estabelecido. Noh e colaboradores (2010) afirmam que hipolipemiantes têm sido utilizados para inibir a doença; entretanto, estes possuem efeitos colaterais como, ganho de peso e alteração da função hepática.

2.3. Microbiota intestinal e ácidos graxos de cadeia curta

Indivíduos apresentam composições bacterianas distintas, sendo em parte definidas geneticamente, e em outra, determinadas por características individuais e ambientais, como modo de nascimento (parto normal ou cesariana), idade e hábitos alimentares, o que resulta numa grande variabilidade intra e interindividual. Uma das formas de avaliar as comunidades que habitam o trato digestório (TD) é pela classificação taxonômica que distribui as bactérias em filos, classes, ordem, família, gênero e espécie. Calcula-se que na microbiota intestinal existam cerca de mil espécies, distribuídas em mais de 50 diferentes filos. Estudos de metagenômica indicam que na microbiota humana haja cerca de 3,3 milhões de diferentes genes, 150 vezes a mais que o genoma humano (BÄCKHED et al., 2004).

A microbiota intestinal desempenha papel de captação, armazenamento e gasto de energia. O predomínio da evidência demonstra que os ratos *germe free* são protegidos contra a obesidade, e que a transferência de microorganismos intestinais de animais obesos resultou em aumento no teor de gordura corporal e na resistência à insulina. A modificação da microbiota intestinal pode ser uma estratégia terapêutica importante no controle da obesidade e de outras desordens metabólicas (DIBAISE; FRANK & MATHUR, 2012).

A microbiota intestinal, adquirida no período pós-natal, é composta por grande diversidade de bactérias que desempenham diferentes funções no hospedeiro humano, entre elas a absorção de nutrientes, proteção contra patógenos e modulação do sistema

imune. O conteúdo bacteriano intestinal ainda não é totalmente conhecido, mas sabe-se que é influenciado por fatores internos e, principalmente, externos, que modulam sua composição e função. Estudos indicam que a microbiota intestinal difere em indivíduos magros e obesos e ainda naqueles que mantêm hábitos alimentares diferentes. Há evidências de que as relações entre dieta, inflamação, resistência à insulina e risco cardiometabólico são, em parte, mediados pela composição de bactérias intestinais (MORAES et al., 2014; TAGLIABUE & ELLI, 2013). Os conhecimentos sobre a microbiota intestinal poderão reverter em diferentes estratégias para manipular as populações bacterianas e promover a saúde. Na maioria dos indivíduos, cerca de 90% dos Filos são *Firmicutes* e *Bacteroidetes*, sendo o restante composto por *Actinobacterias* (família Bifidobacteriaceae) e *Proteobacterias* (família Enterobacteriaceae) (MORAES et al., 2014).

De acordo com Tagliabue & Elli (2013) há uma mudança na microbiota intestinal distal para uma relação *Firmicutes/Bacteroidetes* aumentada em indivíduos obesos, com uma diminuição na abundância relativa de *Firmicutes*, uma vez que os obesos perdem peso diante de uma dieta hipocalórica.

Está bem estabelecido que no intestino humano habite um grande número de microorganismos, conhecidos como a microbiota intestinal, cujos produtos metabólicos finais, como os ácidos graxos de cadeia curta (AGCC, interferem na absorção e digestão dos nutrientes e de compostos bioativos, bem como na homeostase do hospedeiro (PARK et al., 2013).

Dentre os AGCC, o acetato e o propionato são os principais produtos do filo *Bacteroidetes* e o butirato é produzido principalmente pelo filo *Firmicutes*. A maior parte da atividade bacteriana é encontrada no cólon, com interferência na biodisponibilidade de nutrientes e compostos bioativos. O butirato é considerado como um marcador de antiobesidade e sua produção é dependente da alimentação, da composição da microbiota intestinal e do pH do intestino grosso (SHOAIE et al., 2013).

O acetato e o propionato bacterianos são produtos caracterizados principalmente como obesogênicos. O acetato é prontamente absorvido, atinge o fígado via circulação portal e, posteriormente, é distribuído por todo o corpo, onde é utilizado como um substrato para a síntese de colesterol e metabolismo energético (CHAKRABORTI, 2015).

Em relação à constituição dos AGCC totais presentes no cólon a proporção do conjunto de acetato, propionato e butirato varia de 90 a 95%. E as constituições individuais são: acetato 60%, propionato 25% e butirato 15% (CHAKRABORTI, 2015).

O desequilíbrio da microbiota intestinal, juntamente com os ácidos graxos saturados dietéticos aumenta a produção de lipopolissacarídeos (LPS) que ativa o receptor Toll-like 4 (TLR-4), induzindo uma regulação positiva de vias intracelulares inflamatórias comuns, tais como JNK e NF- κ B em adipócitos e macrófagos relacionados à indução da resistência a insulina e aumento da adiposidade (ISMAIL et al, 2011). O *Fasting Induced Adipose Factor* (FIAF) é um inibidor da lipase de lipoproteína (LPL), produzido pelo intestino, fígado e tecido adiposo. Quando este é reduzido em função da disbiose intestinal, há aumento da atividade da LPL que determina a maior absorção de ácidos graxos e o acúmulo de triacilglicerídeos nos adipócitos (BÄCKHED et al., 2004).

Estudos revelam que os compostos bioativos, como os flavonóides, são transformados em metabólitos pela microbiota intestinal contribuindo para a manutenção da homeostase intestinal estimulando o crescimento de bactérias benéficas e inibindo as bactérias patogênicas, exercendo então efeito prebiótico (DUEÑAS et al., 2015; GUGLIELMETTI et al., 2013; PARKAR, TROWER & STEVENSON, 2013).

2.4. Compostos bioativos

Na atualidade, tem-se a busca constante de alimentos que, além de fornecer energia, tenha propriedades funcionais. Os antioxidantes encontrados são encontrados em maior quantidade em vegetais, em especial nas frutas, são os ácidos fenólicos e os flavonóides, que englobam antocianinas e taninos. A concentração destes compostos varia entre as diversas partes da planta, com menores concentrações na polpa dos frutos e maiores em folhas, cascas e revestimentos de troncos e caules (RIBEIRO et al., 2007; JING et al., 2012; SANTHIRASEGARAM; RAZALI & SOMASUNDRAM, 2013). Estas substâncias são indicadas para controlar o estresse oxidativo e reduzir risco de doenças crônicas não transmissíveis nas populações.

Estudos para qualificar e determinar as fontes de antioxidantes naturais, mostram que a ingestão de alimentos ou extratos naturais ricos em antioxidantes reduziram a expressão de hormônios e marcadores pró-inflamatórios, como leptina e TNF- α , diminuíram a oxidação no plasma sanguíneo, com aumento de adiponectina e

IL-10 e aumentaram a concentração das enzimas antioxidantes 10 (IL-10) (MORAES et al., 2012; MORAES et al., 2014; NAIR et al., 2014).

Moreira e colaboradores (2017) constaram que os compostos presentes em maior quantidade no extrato etanólico de bacupari são a morelloflavona e a 7-epiclusianona. A morelloflavone é uma biflavonoíde, da família dos flavonóides e a 7-epiclusianona é uma benzofenona poliisoprenilada (HANEMANN et al., 2015; PEREAÑEZ et al., 2014).

Os flavonóides representam um dos grupos fenólicos mais importantes e diversificados entre os produtos de origem natural. É conhecido que compostos derivados de flavonóides possuem atividades anti-inflamatórias e de efeito vasodilatador, ação antialérgica, atividade anti-neoplásica, hepatoprotetora, anti-ulcerogênica, inibição da agregação plaquetária, bem como ações antimicrobianas e antivirais (DE SOUZA, 2014).

As Benzofenonas poliisopreniladas são descritas na rota biossintética como precursores imediatos das xantonas e raramente são encontradas fora da família Clusiaceae. O estudo farmacológico das benzofenonas poliisopreniladas é de grande interesse devido ao seu amplo espectro de atividades biológicas, como efeito antioxidante, citotóxico, antimicrobiano, antiviral e anti-inflamatório (ACUÑA, JANCOVSKI & KENNELLY, 2009).

2.5. Caracterização do bacupari

A família Clusiaceae, também conhecida como Guttiferae, é formada por plantas tropicais e abrange cerca de 30 gêneros e 1150 espécies. São plantas de características lenhosas, arbóreas ou arbustivas, com folhas inteiras de disposição alternadas, oposta ou verticiladas e sem estípulas. Possuem flores geralmente vistosas, isoladas ou reunidas em inflorescência. Com ampla distribuição no Brasil, ocorrem 21 gêneros e 183 espécies (BARROSO et al., 2002). Englobam árvores, arbustos, lianas e ervas de interesse econômico pela produção de frutos comestíveis, madeiras, derivados químicos de interesse farmacêutico e tintas (ARQUIMEDES JUNIOR et al., 2005).

O gênero *Garcinia* ou *Rheedia* é o mais encontrado na família das Guttiferae, e está difundido nas regiões tropicais, com cerca de 400 espécies que são amplamente distribuídas na Ásia tropical, África, Nova Caledônia, Polinésia e Brasil (MARTINS et al., 2008).

O bacuparizeiro é uma árvore de porte médio, copa piramidal, folhas opostas, pecioladas, que floresce entre os meses de agosto a setembro (Figura 1) (GUIMARÃES et al., 2004; CORRÊA & PENNA, 1984). As folhas têm formato de lança e as flores abundantes e polígamas. As características dos frutos são: ovais, com polpa mucilaginosa, branca e comestível (CORRÊA; PENNA, 1984; GUIMARÃES et al., 2004). Apresentam pericarpo elásticos e amarelos, que são facilmente removidos. Normalmente possuem de 2 a 3 sementes. As sementes apresentam forma elipsoidal, com coloração externa castanha, ao passo que, internamente são branco-amarelada e exsudam látex amarelo (Figura 2) (NASCIMENTO; CARVALHO; MÜLLER, 2002).

Os frutos são cultivados em pomares domésticos, comumente vendidos nas feiras regionais e muitos frutos ainda estragam nos quintais, pois não são comercializados ou utilizados como alimento, sendo um grande potencial na indústria de alimentos subutilizados (KINUPP; LORENZI, 2014).



Figura 1 - Folhas e frutos de *Garcinia brasiliensis*



Figura 2 - Semente e polpa de *Garcinia brasiliensis* em fruto seccionado transversalmente.

As várias espécies da *Garcinia* têm sido utilizadas na medicina popular brasileira, pois é rica em inúmeros derivados do fenol, incluindo as benzofenonas. Muitas espécies deste gênero possuem propriedades anti-inflamatória e atividade analgésica em muitos modelos animais. Extratos etanólico e extrato diclorometano da casca da fruta *Garcinia mangostana* têm mostrado ação anti-inflamatória e potentes efeitos antinociceptivos centrais e periféricas em camundongos (CASTARDO et.al., 2008).

Verdi e colaboradores (2004) observaram que os flavonóides isolados a partir das folhas de bacupari, como marelloflavone e volkensiflavone, entre outros, possuem atividade bactericida contra bactérias Gram-positivas. Além disso, O 7-epiclusianona,

um bezonfenona poliisopreniladas, demonstrou atividade contra as formas tripomastigota de *Trypanosoma cruzi in vitro*, no entanto não foi eficaz quando testado em camundongos infetados com o parasita (DE ALMEIDA ALVES et al., 1999).

A *Garcinia brasiliensis* possui compostos com atividade biológica, como benzofenonas, flavonoides e xantonas. Estes vem demonstrando efeitos biológicos, como antifúngicos, anti-inflamatório, anti-tumoral e atividade antioxidante (MARTINS et al, 2008; SANTA-CECÍLIA, 2011). Moreira e colaboradores (2017) constataram que uma dieta rica em gordura adicionada do extrato etanólico de bacupari (EEB) da espécie *Garcinia brasiliensis* foi eficaz em reduzir o ganho de peso, a gordura visceral e o índice de adiposidade, constatando um efeito antioxidante, antiinflamatórios e anti-obesidade.

O Bacupari é uma planta que é amplamente distribuída na Mata Atlântica e fácil de cultivar. Em função da abundância dos compostos bioativos da espécie *Garcinia brasiliensis* e dos efeitos biológicos observados até o momento, torna-se importante investigar a ação destes nas DCNT. No presente estudo espera-se que o extrato etanólico de bacupari (EEB) reduza o risco da esteatose hepática, o estresse oxidativo e a inflamação, além de promover o equilíbrio da microbiota intestinal de ratos obesos alimentados com dieta hiperlipídica.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Local de execução

O preparo das dietas testes e desenvolvimento do ensaio biológico foram realizados no Laboratório de Nutrição Experimental e demais análises foram realizadas; no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular de Agentes Infecciosos e Parasitários (DBB), Laboratório de Metabolismo e Fermentação (DBB), Laboratório de Nutrição Experimental (DNS), Laboratório de genética molecular de bactérias (BIOAGRO), Laboratório de Genética Molecular de Bactérias, Laboratório de microbiologia de anaeróbios (DVT), Laboratório de biologia de peixes (DVT), Laboratório de histopatologia (DBA) e Laboratório de sistemática molecular (DBA), da Universidade Federal de Viçosa.

4.2. Coleta do material vegetal

Os frutos de *G. brasiliensis* foram coletados em fevereiro de 2011 na região de Viçosa, Minas Gerais, Brasil (latitude 20° 45' 14'' sul e longitude 42° 52' 55'' oeste). A identificação botânica foi realizada no horto botânico da Universidade Federal de Viçosa pelo Dr. João Augusto Alves Meira Neto. A espécie encontra-se catalogada pela exsicata sob o número VIC2604, depositada no herbário da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, Brasil.

4.3. Preparo dos extratos

Os frutos de *G. brasiliensis* foram coletados em fevereiro de 2011 na região de Viçosa, Minas Gerais, Brasil (latitude 20° 45' 14'' sul e longitude 42° 52' 55'' oeste). A identificação botânica foi realizada no horto botânico da Universidade Federal de Viçosa pelo Dr. João Augusto Alves Meira Neto. A espécie encontra-se catalogada pela exsicata sob o número VIC2604, depositada no herbário da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, Brasil.

4.4. Preparo das dietas Experimentais

A dieta padrão foi preparada de acordo com AIN-93M (REEVES; NIELSEN; FAHEY, 1939), para animais adultos, enquanto a hiperlipídica foi baseada na dieta padrão para manutenção (AIN-93M), acrescida de 40% de lipídios. A quantidade de dieta teste ofertada aos animais foi ajustada semanalmente de acordo com a média de peso dos animais, de modo que todos os animais recebessem 300 mg de extrato etanólico de bacupari por dia.

Para o preparo das dietas os ingredientes foram pesados individualmente, em balança semianalítica (GEHACA, modelo BG200) misturados manualmente em vasilhames plásticos higienizados e em seguida peneirados. A seguir, os ingredientes foram misturados em batedeira semi-industrial (Leme) por um período de aproximadamente 15 minutos em baixa rotação. Após o pré-preparo, as dietas foram acondicionadas em sacos de polietileno, devidamente rotulados e armazenados em freezer (-18°C). A composição das dietas se encontra na tabela 1.

Tabela 1. Composição das dietas experimentais (g/100 g)

Ingredientes	AIN 93M	HFD	BHFD
Caseína	14	19,5	19,5
Maltodextrina	15,5	10	10
Amido de Milho	46,57	5,32	5,32
Sacarose	10	34,1	34,1
Óleo de soja (ml)	4	1	1
Banha Suína	0	20	20
Celulose	5	5	5
Mix Mineral sem ferro	3,5	3,5	3,5
Mix Vitamínico	1	1	1
L-cistina	0,25	0,25	0,25
Colesterol	0,18	0,18	0,18
Bitartarato de colina	0	0,15	0,15
BHT	0,0008	0,004	0,004
EEB* mg/animal/dia	-	-	300
Calorias	308,3	464,7	464,7
DC (kcal·g-1)	3,8	4,7	4,7

Grupo controle normal (AIN-93M); grupo controle obeso alimentado com dieta hiperlipídica (HFD); grupo HFD adicionado de extrato de bacupari (BHFD).

*Dose: 300 mg/Animal/dia; EEB: extrato etanólico de bacupari; DC: Densidade calórica

4.5. Ensaio biológico

Animais / Dietas

Foram utilizados 24 ratos machos recém-desmamados com 21 dias de idade (*Rattus norvegicus*, variedade albinus, classe Rodentia), linhagem Wistar, provenientes do Biotério Central do Centro de Ciências Biológicas e de Saúde da UFV. Até o 60º dia de idade, fase adulta, os animais foram mantidos em caixas de polietileno, consumindo ração comercial (Presence/InVivo® Nutrição Animal) e água destilada *ad libitum*. A temperatura da sala de experimentação foi controlada em 22°C ± 3°C, com ciclo claro/escuro de 12 horas. No 61º dia os animais foram alocados em gaiolas individuais, de aço inoxidável e divididos em dois grupos de forma sistemática, de modo que não houvesse diferença maior que 5,0 g entre as médias dos pesos dos grupos, atendendo à recomendação da AOAC (1997). Os animais do grupo controle normal (n=8) receberam dieta AIN-93M (REEVES; NIELSEN; FAHEY JR., 1993) e os outros animais (n=16) receberam dieta hiperlipídica (HFD), segundo a formulação da RESEARCH DIETS® (2006), para indução de obesidade (SAMPEY et al., 2011), por

49 dias (Figura 1). Todos os animais receberam água destilada *ad libitum*. Os animais do grupo controle normal receberam a dieta AIN-93M durante todo o período experimental (105 dias). Após a indução da obesidade os animais HFD (n=16), foram divididos em dois grupos, de forma que apresentassem as medidas biométricas semelhantes: o grupo controle obeso (HFD) e o grupo obeso adicionado de extrato de bacupari (BHFD) na dose de 300 mg por animal/dia (Figura 3). A dose foi calculada para oferecer aos animais 42 mg/animal/ dia de 7-epiclusianona e 10,76 mg/animal/dia de morelloflavona de acordo com Moreira e colaboradores (2016) onde a concentração encontrada em análise de HPLC foi de 140 mg de 7-epiclusianona e 35,86 mg de morelloflavona por gramas do extrato. Estas doses foram baseadas em estudos prévios, onde estes compostos demonstraram atividade antioxidante e anti-inflamatória (CASTRO et al., 2015; SANTA-CEILIAa et al, 2012; SANTA-CECÍLIA et al, 2011; LIM; SON; CHANG; KANG; KIM, 2006).

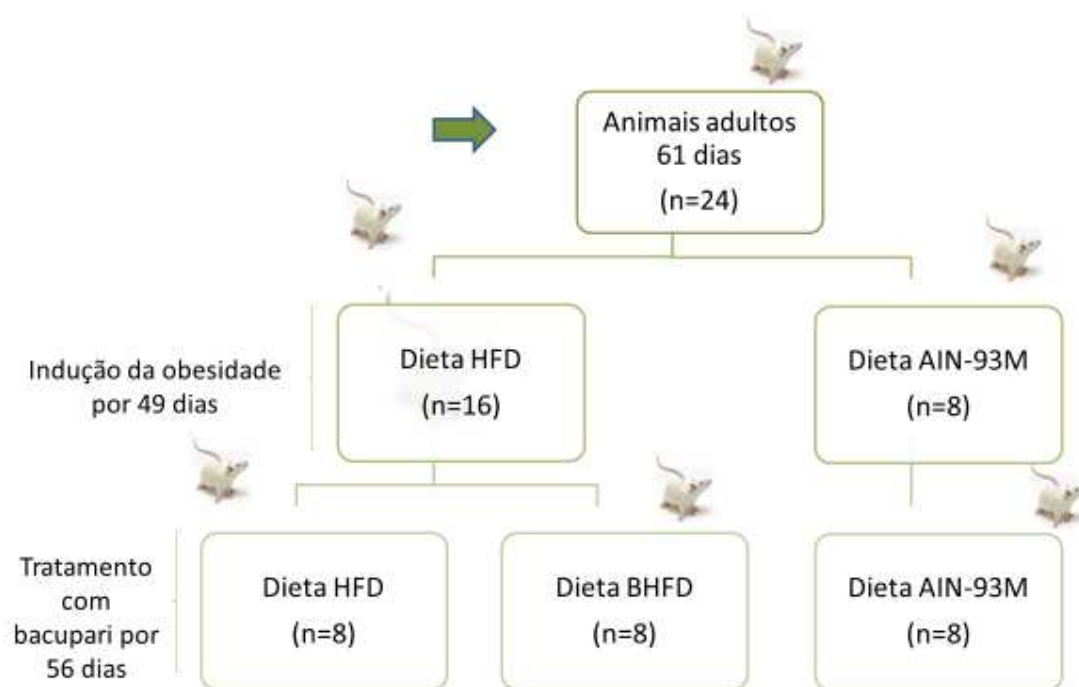


Figura 3 - Desenho Experimental – AIN-93M: Dieta de manutenção; HFD: Dieta hiperlipídica; BHFD: Dieta hiperlipídica acrescida de extrato da casca de bacupari.

4.6. Eutanásia dos animais

Ao final do experimento, os ratos ficaram em jejum por 12 horas, foram anestesiados (com a utilização de Isoflurano 100%, Isoforine, Cristália®, em aparelho de anestesia inalatória conforme resolução 714, de 20 de julho de 2002) e submetidos à eutanásia por punção cardíaca. O sangue foi coletado em tubos com ou sem anticoagulante (heparina) para obtenção do plasma ou do soro, respectivamente após centrifugação sob refrigeração (4°C) durante 10 minutos a 1009 × g. O fígado, o coração, o ceco e o cérebro dos animais foram retirados e pesados para posteriores cálculos das medidas biométricas. Amostras dos fígados foram fixadas em formaldeído tamponado 10% e o restante imediatamente congelados em nitrogênio líquido e armazenados em ultrafreezer à temperatura de -80°C até o início das análises.

4.7. Medidas de ingestão alimentar

O ganho de peso corporal e o consumo alimentar foram monitorados semanalmente, durante o período experimental. Foram calculados o coeficiente de eficiência alimentar - CEA ($CEA = \frac{\text{ganho de peso do animal (g)}}{\text{total de dieta consumida (g)}}$) e a ingestão energética ($\text{consumo alimentar} \times \text{densidade calórica da dieta} / \text{consumo total (g)}$).

4.8. Medidas biométricas

Os órgãos coração, cérebro, ceco e fígado foram pesados e seus índices somáticos foram calculados dividindo o peso do animal pelo peso do órgão. O índice de massa corporal (IMC) foi obtido pela relação entre o peso e o quadrado do comprimento naso-anal. Os animais foram considerados obesos quando o IMC foi maior que 0,68 (NOVELLI et al., 2007; REYNÉS et al., 2014).

4.9. Extração do RNA no tecido hepático

Foram pesados 100 mg de tecido e macerado juntamente com 1 mL de trizol, sob nitrogênio líquido. Acrescentou 200 µL de clorofórmio e agitou-se por 30 segundos. Em seguida os microtubos foram centrifugados a 12.000 g por 15 minutos a 4°C, sendo

o sobrenadante coletado. Acrescentou-se 500 µL de isopropanol seguido de nova centrifugação a 12.000 g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e adicionado ao tubo 1 mL de etanol a 75% e em seguida centrifugou a 9.500 g por 5 minutos a 4°C. O pellet foi seco a temperatura ambiente.

Os RNAs foram ressuspensos em 50 µL de água DEPC (água miliq tratada com 0,01% de dietilpirocarbonato (Invitrogen Brasil LTDA) autoclavada a 121°C por 30 minutos) e foi armazenado a -80°C.

A integridade do RNA foi avaliada, submetendo à eletroforese em gel de agarose a 1%. A quantificação foi feita em espectrofotômetro (Multiskan GO Thermo Cientific).

4.9.1. Síntese de cDNA e qPCR em tempo real

O mRNA isolado foi usado para sintetizar o cDNA utilizando kit de transcrição Reversa (M-MLV Invitrogen Corp, Grand Island, NY) de acordo com o protocolo do fabricante. O cDNA foi quantificado utilizando espectrofotômetro (Multiskan GO Thermo Cientific). A expressão dos níveis de mRNA foi realizada pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real (RT-qPCR) com SYBR green fast PCR master mix da Applied Biosystems (Foster City, CA). O volume de reação foi de 10 µL e todos os oligonucleotídeos utilizados na concentração final de 100 nmol/L. Para a quantificação no equipamento AB StepOne Real Time PCR System, utilizou-se o sistema de quantificação por fluorescência SYBR-Green e o Primer Express software (Applied Biosystems, Foster City, CA). O ciclo da PCR envolveu a desnaturação a 95°C (20seg), 40 ciclos de 95°C por 3 segundos e 60 °C por 30 segundos, seguidos da curva padrão de dissociação. Os dados de PCR real time foram analisados pelo método de $2^{-\Delta\Delta CT}$ (LIVAC, 2001). Foram utilizadas sequências de oligonucleotídeos (Sigma-Aldrich®) senso e anti-senso desenhados pelo Primer Express® software v2.0 da Applied Biosystems. Todas as etapas foram realizadas em condições livre de RNase.

Foram utilizados as seguintes sequências de oligonucleotídeos senso e anti-senso: fator nuclear kappa B (NFκB) (senso: 5'-CTG CGC GCT GAC GGC -3'; anti-senso: 5'-TCG TCG TCT GCC ATG TTG AA- 3'), proteína do choque térmico (HSP72) (senso: 5'- AGG CCA ACA AGA TCA CCA TC- 3'; anti-senso: 5'- TAG GAC TCG AGC GCA ATT CTT - 3') e superóxido dismutase (Zn-SOD) (senso: 5'- GAG CAG AAG GCA AGC GGT GAA - 3'; anti-senso: 5'- CCA CAT TGC CCA

GGT CTG – 3'), a lipogênese hepática: proteína de ligação ao elemento regulador de esteróis (SREBP-1c) (senso: 5'-CGC TAC CGT TCC TCT ATC AAT GAC- 3'; anti-senso: 5'- AGT TTC TGG TTG CTG TGC TGT AAG- 3') e envolvidos no processo de oxidação de ácidos graxos: carnitina palmitoil transferase (CPT-1) (senso: 5'- GTA AGG CCA CTG ATG AAG GAA GA- 3'; anti- senso: 5'-ATT TGG GTC CGA GGT TGA CA- 3'), receptor ativado por proliferador de peroxissoma alfa (PPAR- α) (senso: 5'CCT GGC TTC CCT GTG AAC T-3'; anti senso: 5'-ATC TGC TTC AAG TGG GGA GA- 3') e receptor de adiponectina 2 (ADIPOR2) (senso: 5'- CAT GTT TGC CAC CCC TCA GTA- 3'; anti-senso: 5'-ATG CAA GGT AGG GAT GAT TCC A- 3'). A expressão relativa dos níveis de mRNA foi normalizada pelo controle endógeno gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) (senso: 5'-AGG TTG TCT CCT GTC ACT TC- 3'; anti-senso: 5'- CTG TTG CTG TAG CCA TAT TC- 3'). Utilizou-se o grupo controle normal como padrão.

4.10. Extração da proteína da fração nuclear e citoplasmática no tecido hepático

Para a extração foi utilizado o Kit NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents (Thermo Scientific) de acordo com as instruções do fabricante. Foram pesados 20 mg de fígado e lavados com 1 mL de tampão fosfato salino 0,1M (pH 7,2). O tecido foi centrifugado por um minuto a 500 xg e o sobrenadante descartado. Em seguida adicionou-se Reagente de Reação Citoplasmática I (CER I) e os tubos foram agitados em vortex na rotação máxima, por 15 segundos e incubados em gelo por 10 minutos. Foi adicionado o Reagente de Reação Citoplasmática II (CER II) ao microtubo e agitado em vortex por 5 segundos e incubado no gelo por 1 minuto seguido de nova agitação. O tubo foi centrifugado a 16.000 xg por 5 minutos e o sobrenadante coletado (extrato citoplasmático) e armazenado a -80°C. O pellet (extrato nuclear) foi ressuspensão em Reagente de Extração Nuclear (NER), e agitado em vortex em velocidade máxima por 15 segundos. As amostras foram colocadas em gelo e agitadas por 15 segundos a cada 10 minutos, no total de 40 minutos. O tubo foi centrifugado a 16.000 xg por 5 minutos e o sobrenadante coletado e armazenado a -80°C.

4.11. Análise de Western blotting

As proteínas do homogeneizado de fígado (extrato nuclear e citoplasmático) foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida (10%) SDS-PAGE, (Laemmli, 1970) em voltagem constante de 100 Volts por 2 horas e 40 minutos utilizando o sistema de eletroforese vertical (Loccus do Brasil- Ltda). Foram aplicadas ao gel 15µg de proteína total da amostra e 5µL do padrão de referência (Broad Range Markers – Santa Cruz Biotechnology). As amostras foram preparadas utilizando-se uma alíquota de 30 µL do homogeneizado (extrato nuclear e citoplasmático) e 10 µL de tampão amostra 4X (125 mM tris-HCl; pH 6,8; 20% glicerol; 4% SDS; 0,002% azul de bromofenol e 4µL de β- mercaptoetanol). Antes de serem aplicadas no gel, as amostras foram aquecidas por 4 minutos, e posteriormente imersas em gelo. Após a separação em gel -SDS PAGE, as proteínas foram eletrotransferidas para membrana de Fluoreto Polivinidileno (PVDF) (BioRad®). A transferência ocorreu por 1 hora e 30 minutos a 4°C em amperagem constante (0,35 A) e 90V, usando o módulo interno para *western blot* da Loccus Brasil Ltda.

Após várias lavagens da membrana com tampão TBS 10 mM (pH 7,5), os sítios de interação não-específicos foram bloqueados utilizando uma solução de bloqueio a 5% (Blotting-grade blocker, BioRad) por 1 hora sob agitação. Em seguida a membrana foi lavada três vezes consecutivas com 15 mL de TBS-T (TBS 1X acrescido de 0,1% e tween 20) sob agitação por 15 minutos.

Após o bloqueio a membrana foi incubada sob agitação *overnight* a 4°C com o anticorpo primário monoclonal anti-NFκB-p65 (65 kDa) (ab13594; Abcam, Cambridge, Reino Unido) na diluição de 3:1000 em 15 mL de TBS-T com 3% albumina sérica bovina (BSA). Após a incubação a solução de anticorpo primário foi retirada, sendo realizado o processo de três lavagens sob agitação com 15µL de TBS-T por 10 minutos. A membrana foi incubada com o anticorpo secundário conjugado a *horseradish peroxidase* (HRP) (A-9044, Sigma-Aldrich Brasil Ltda), na diluição de 1:8000 em 15 mL de TBS-T com 3% BSA, por 2 horas a temperatura ambiente e agitação constante. Após uma nova sequência de lavagens, a membrana foi colocada em solução com o tetracloridrato de 3,3-diaminobenzidina (DAB) diluído em 15 mL de tris-HCl 50mM (pH 7,6) e 15 µL de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (30%), permanecendo incubadas

com agitação constante. Após o aparecimento das bandas, a membrana foi lavada com água destilada.

4.12. Quantificação da proteína no tecido hepático

Para a quantificação da PPAR α foi utilizado a 100 μ g fração proteica nuclear, contendo 60 μ g de proteína extraída anteriormente e realizada a análise com o Kit PPAR- α Elisa (E-EL-R0725; Elabsience; EUA) de acordo com as instruções do fabricante. Foram adicionados as amostras e os padrões a microplaca, revestida com o anticorpo PPAR- α e em seguida acrescentado o anticorpo de detecção biotilado específico para PPAR- α conjugado com Avidina-Horseradish Peroxidase (HRP), e então incubada. Após sucessivas lavagens, a solução de substrato foi adicionada a cada poço obtendo coloração azulada. A reação foi parada com uma solução de ácido sulfúrico, que provocou mudança para a cor amarela. A densidade óptica (DO) foi medida espectrofotometricamente a um comprimento de onda de 450 nm (Multiskan Go, Thermo Cientific). Foi calculada as concentrações de PPAR- α nas amostras comparando a DO das amostras com a curva padrão.

4.13. Quantificação de citocinas plasmáticas

As análises de adiponectina e resistina foram realizadas utilizando Kits comerciais: Adiponectin, (EZR ADP-62 K, Millipore Corporation) e Resistin (SE A847RA, USCV, USA). As amostras e padrões foram adicionados aos poços da placa de microtitulação, contendo um anticorpo conjugado com biotina específico para resistina ou adiponectina. Em seguida, avidina conjugada com peroxidase de rábano (HRP) foi adicionada a cada poço da microplaca e esta foi incubada. A reação enzima-substrato foi finalizada pela adição de solução de ácido sulfúrico e a alteração da cor foi medida espectrofotometricamente a um comprimento de onda de 450 nm (Multiskan Go, Thermo Cientific). A concentração de resistina e adiponectina nas amostras foram então determinadas por comparação da densidade óptica das amostras em relação à curva padrão.

4.14. Preparação do homogeneizado para análise da peroxidação lipídica e da defesa antioxidante em tecido hepático.

Amostras de fígado (100 mg) foram maceradas em microtubos e em seguida adicionadas de 1000 µL de tampão fosfato 1M (pH 7,4). Os tubos foram centrifugados a 10.000 xg por 10 min a 4°C e o sobrenadante coletado e armazenado a -80°C.

4.15. Peroxidação lipídica no tecido hepático

4.15.1 Concentração de malondialdeído (MDA)

A determinação de MDA foi feita pelo teste de TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico) (KOHN; LIVERSEDGE, 1944). Em um microtubo foram adicionados 200 µL de homogeneizado e 400 µL de TBARS. Em seguida, as amostras foram agitadas em vortex por 5 segundos e incubadas em banho-maria por 40 minutos, a 90°C. As amostras foram resfriadas em gelo e adicionadas de 600 µL de n-butanol e agitadas por 2 minutos, seguida por centrifugação a 900 xg por 10 minutos. Foram retiradas 200 µL do sobrenadante e a leitura foi realizada na absorvância de 532nm.

Os valores finais foram calculados por meio de curva-padrão sendo utilizado o reagente N-oxil-2,2,2,6,6-tetrametilpiperidima (TMPO), com a concentração variando de 20 µM a 1,25 µM. Os resultados foram em nmol de MDA por miligramas de proteínas (nMol de MDA/mgPTN). A proteína total do homogeneizado do fígado foi quantificada, segundo o método de Bradford (1976).

4.15.2. Concentração de Óxido Nítrico (ON)

A análise foi realizada em triplicata em placa de 96 poços. Foi utilizado 50 µL de homogeneizado e misturados as soluções A (Sulfanilamida 1% em H₃PO₄ 2,5%) e B (Naftil etileno amida dihydrochloride 0,1% em H₃PO₄ 2,5%) na proporção (1:1) e foi deixada a placa reagir por 10 min no escuro para posterior leitura no espectrofotometro (Multiskan Go, Thermo Cientific) em comprimento de onda 570 nm.

Para a montagem da curva padrão foram feitas 8 diluições 1:2 para o padrão (1-Nitrito de Sódio 6,9 mg/400 mL). Foi colocado 50 µL de tris HCl nos poços destinados ao

padrão. Acrescentou 50 µL do próprio padrão à primeira duplicata, e continuou a diluição homogeneizando e retirando 50µL da primeira diluição e passando para a segunda diluição e assim sucessivamente.

4.16. Atividade da superóxido dismutase (SOD)

A quantificação desta enzima é dada em unidades relativas, sendo uma unidade de SOD definida como a quantidade de enzima que inibe em 50% a velocidade de oxidação do pirogalol. Para preparo das amostras foram utilizados 30 µL de homogeneizado do fígado, 228µL de tampão fosfato (1M; pH 7,0), 15 µL de pirogalol (100µM; PM=126,11) e 6 µL de MTT (brometo de (3-[4,5- dimetiltiazol-2H]-2,5-difeniltetrazolium) a 1,25mM ;PM=414,3). O padrão foi preparado com 258 µL de tampão fosfato, 6 µL de MTT e 15 µL de pirogal. O branco foi preparado com 294 µL de tampão fosfato e 6µL de MTT. A leitura foi feita no espectofotometro (Multiskan Go, Thermo Cientific) a uma absorvância de 570 nm , sendo os resultados expressos em U de SOD / mg de proteína (MARKLUND, 1985), sendo uma unidade (U) de SOD responsável pela redução de 50% da oxidação do pirogalol.

4.17. Atividade da catalase (CAT)

A determinação da atividade da enzima catalase é baseada na sua capacidade de clivar o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em água e oxigênio molecular, conforme descrito por AEBI (1984).

Na cubeta de quartzo para a leitura do padrão no espectofotometro (Thermo Cientific) foram adicionados 10 µL de homogeneizado e 1000 µL de tampão fosfato (100 mM; pH 7,0) e para a leitura das amostras foram adicionadas 10 µL da amostra mais 1000µL de tampão fosfato com H₂O₂. A reação foi iniciada pela adição de 900 µL de H₂O₂ (5 mM). As absorbâncias foram determinadas no espectofotometro (Multiskan Go, Thermo Cientific) nos tempos 0, 30 e 60 segundos, a 240 nm. Água destilada foi utilizada como branco.

Uma unidade (U) de catalase é equivalente a hidrólise de 1mol de H₂O₂ ($\epsilon=39,4$ L.mol⁻¹.cm⁻¹) por minuto (AEBI, 1984). Usualmente a atividade dessa enzima é representada U catalase/mg de PTN. A absorbância utilizada para o cálculo é o delta obtido das absorbâncias lidas (absorbância no tempo 0 – absorbância a 60 segundos).

4.18. Glutationa Tranferase (GST)

O CNDB (1-cloro2,4-dinitrobenzeno; MW 202,6) é metabolizado pela GST conjugado à GSH, com o aumento de absorbâncias (340nm). (HABIG; PABST & JAKOBY, 1976). Para a leitura de 340nm no espectrofotometro (Thermo Cientific) foi adicionado na cubeta: 970µL de tampão fosfato (0,1M pH 7,0) + 10 µL homogenato + 10 µL de CNDB(0,1M diluído em etanol 80%) e 10µL GSH (0,1 M diluído em tampão fosfato a 100 mM; pH=7,0). E para a leitura do branco: 970µL de tampão fosfato (0,1M pH 7,0) + 10µL de CNDB e 10 µL GSH. A solução foi pipetada em cubeta semi-micro de quartzo (1,5 ml) e a leitura das amostras foram realizadas em triplicata nos tempos 0, 30, 60 e 90 segundos. Resultados expressos em µmol/min/g, foi utilizada a seguinte equação:

$$\Delta A_{340} \times \text{diluições}/\epsilon = A_{340} \times 1000 (100 \text{ cubetas} \times 10f / 9.6 = A_{340} \times 104,17; \text{ onde } \epsilon = 9.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1} (\text{coeficiente de extinção molar}).$$

4.19. Microbiota intestinal

4.19.1. Extração do DNA fecal

A extração do DNA fecal foi realizado de acordo com as instruções do fabricante do kit da Qiagen (QIAamp Fast DNA Stool Mini kit). As fezes (200 mg) foram colocadas em microtubos e em seguida adicionou 1 mL de Tampão InhibitEX agitando em vortex continuamente por um minuto. Os tubos foram incubados a 70°C por cinco minutos e novamente agitados por 15 segundos, sendo então centrifugados a 20000 xg por 1min para sedimentar as partículas de fezes (pellets).

Adicionou-se ao sobrenadante (200 µL) 15 µL de Proteinase K e 200 µL do Tampão AL e agitou por 15 segundos incubando a 70°C por 10 min. Em seguida, foi adicionado 200 µL de etanol (100%) e agitado. O lisado (600 µL) foi aplicado à coluna e centrifugado a 20000 xg por 1 minuto e esta transferida para um novo tubo adicionando 500 µL de tampão AW1, seguida de nova centrifugação.

A coluna foi colocada em um novo tubo coletor acrescentando 500 µL do Tampão AW2 e foi centrifugada a 20000 xg por seis minutos, descartando o tubo coletor. A coluna foi transferida para um novo tubo e adicionado 200 µL de Tampão

Tris –Acetato-EDTA (TAE) diretamente sobre a membrana e incubado por um minuto a temperatura ambiente. O DNA foi eluído após nova centrifugação.

4.19.2. Análise da microbiota intestinal a partir do DNA fecal

As análises de RT-qPCR foram realizadas em um sistema de detecção de sequência CFX96 Touch (BioRad, Califórnia, EUA), utilizando o kit de detecção de DNA Power SYBR Green PCR (Promega, Madison, EUA). Todas as análises foram realizadas em duplicata com um volume final de 25 µL contendo 2 µL de amostra de DNA fecal a 10 ng/µL e 12,5 µM de cada um dos iniciadores senso e anti-senso. As condições térmicas do ciclo de PCR utilizadas foram as seguintes: uma desnaturação inicial do DNA a 95° C durante 10 minutos, seguido por 40 ciclos de desnaturação a 95° C durante 10 segundos, anelamento do iniciador à temperatura ótima de 60°C durante 20 segundos e extensão a 72° C durante 15 segundos. Uma análise da curva de melting após amplificação foi realizada para garantir a qualidade e especificidade da PCR.

As concentrações das bactérias por amostra fecal foram feitas por comparação dos valores de *Ct* obtidos pelas curvas - padrão a partir do software Primer Express. Foram construídas as curvas padrão para cada experimento utilizando cinco diluições seriadas de DNA genômico bacteriano (concentrações conhecidas) de culturas puras variando de 20 ng a 0,032 ng do gene 16S rRNA. As diferentes cepas utilizadas foram obtidas da *American Type Culture Collection* e da Coleção de Culturas Tropical (UFV H2b20 CCT 3744). Para a caracterização das bactérias totais (16S) e do filo proteobactérias, foi utilizada a bactéria *Escherichia Coli*, para o filo Firmicutes, a bactéria *Lactobacillus delbrueckii*, para o filo dos Bacteroidetes a bactéria *Bacteroides Ovatus*. Foram utilizadas as sequências de oligonucleotídeos (Alpha DNA e diagnósticos moleculares LTDA) para avaliar as bactérias totais: senso 5'-GCA GGC CTA ACA CAT GCA AGT C -3' e anti-senso 5'- CTG CTG CCT CCC GTA GGA GT - 3'); *Bacteroidetes* : senso 5'- CAT GTG GTT TAA TTC GAT GAT- 3' anti-senso 5'- AGC TGA CGA CAA CCA TGC AG - 3'); *Firmicutes* 5'-ATG TGG TTT AAT TCG AAG CA 3' e anti-senso 5'- AGC TGA CGA CAA CCA TGC AC-3'); *Proteobactéria* : senso (5'-CAT GAC GTT ACC CCG CAG AAG AAG- 3' e anti-senso 5'CTC TAC GAG ACT CAA GCT TGC 3').

4.20. Determinação dos Ácidos orgânicos

Os ácidos orgânicos foram determinados por HPLC em um Dionex Ultimate 3000 Detector duplo HPLC (Dionex Corporation, Sunnyvale, CA, EUA) acoplado a um índice de refração (RI) Shodex RI-101. As condições da coluna do HPLC foram: coluna: Bio-Rad HPX-87H, 300 mm x 4,6 mm; coluna de guarda: Bio-Rad Cation H; taxa de fluxo: 0,7 mL/min; temperatura da coluna: 45 °C; volume de injeção: 20 µL e detector: índice de refração.

Para o preparo da fase móvel foram dissolvido 1,66 mL de H₂SO₄ concentrado em 3,5L de água ultrapura, aquecido e completado o volume para 4 litros para posterior filtração em membrana de 0,2 µm sob vácuo.

Os seguintes ácidos orgânicos foram utilizados para a calibração da curva padrão: acético, succínico, fórmico, propiônico, valérico, isovalérico, isobutírico e butírico. Todos os ácidos foram preparados com uma concentração final de 10 mmol, exceto os ácidos isovalérico (5 mmol/l) e acético (20 mmol/l).

Amostras de fezes diluídas (300 mg de fezes em 2,5 mL de água) foram centrifugadas (12000 xg, 10 min) e os sobrenadantes tratados como descrito por Siegfried et al. (1984). Transferiu-se 600 µL do sobrenadante em duplicata para novos tubos, adicionando 600 µL de CHS (Solução de Hidróxido de Cálcio) e 300 µL de CSR (solução de sulfato cúprico) e agitou por 10 segundos. As amostras foram congeladas e descongeladas em temperatura ambiente, sendo em seguida centrifugadas a 12000 xg por 10 minutos. Transferiu-se um mL do sobrenadante para novos tubos e adicionou 28 µL de H₂SO₄ concentrado. As amostras foram submetidas a um novo congelamento, descongelamento e centrifugação e o sobrenadante (600 µL) transferido para *vials* de HPLC e armazenados a 4 °C.

4.21. Análise histomorfométrica do tecido hepático

Foi realizada a contagem das gotas de gordura, núcleo e citoplasma de hepatócitos de oito animais por grupo. Os fragmentos de tecidos fixados foram lavados com álcool a 70% por 4 dias. Em seguida, foram transferidos para o etanol 95% por quatro horas, imersos em solução de álcool-resina na proporção de 1:1 durante 24h e, posteriormente, colocados em resina de infiltração glicolmetacrilato (Leica, Historesin[®]) por mais 24h. Os tecidos foram incluídos em resina contendo endurecedor

(Leica, Historesin[®]). Foram obtidos cortes histológicos semi-seriados com 3 µm de espessura em micrótomo automático Leica[®] utilizando-se navalha de vidro, e corados pela técnica Hematoxilina/Eosina. As lâminas (BioGlass[®]) foram montadas com Entellan (Merck[®]) e analisadas em microscópio de luz (Nikon Phase Contrast 0,90 Dry, Japão). As imagens foram obtidas em câmera digital ful-DIGI-PRO 5.0M com auxílio do software Micrometrics SE Premium (Accu-Scope[®]). As imagens das secções histológicas foram capturadas com objetiva de 40X e as medidas dos diâmetros dos hepatócitos e dos núcleos foram obtidas com auxílio do Software ImagePro-Plus[®] versão 4.5 (Media Cybernetics). Foram realizadas duas medições do diâmetro por núcleo e obtidas as médias de cada núcleo, em dez campos por animal. Para visualização e quantificação das áreas de esteatose e inflamação hepáticas, foram contabilizados os percentuais das gotas de gordura, infiltrado inflamatório e demais estruturas hepáticas por meio da contagem manual de pontos sobre os tecidos de dez campos por animal (SABARENSE et al., 2012).

4.22. Aspectos éticos

Todos os procedimentos experimentais com os animais foram realizados em consonância com os princípios éticos da experimentação animal, sendo a pesquisa submetida e aprovada pelo Comitê de Ética no uso de animais da UFV sob protocolo número: 98/2015.

4.23. Análises estatísticas

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) seguidos pelo teste de médias de Newman Keuls. Foi adotado o nível de significância igual a 5%. Todas as análises estatísticas foram realizadas pelo programa GraphPad Prism versão 6.01.

5. REFERÊNCIAS

- ACUÑA, U.M.; JANCovski, N.; KENNELLY, E.J. Polyisoprenylated benzophenones from Clusiaceae: Potential drugs and lead compounds. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v.9, p.1560-1580, 2009.
- ADIELS, Martin; TASKINEN, Marja-Riitta; BORÉN, Jan. Fatty liver, insulin resistance, and dyslipidemia. **Current diabetes reports**, v.8, n.1, p.60-64, 2008.
- AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods Enzymology**, v.105, p.121-106, 1984.
- ANDRADE, G. et al. The addition of whole soy flour to cafeteria diet reduces metabolic risk markers in wistar rats. **Lipids in Health and Disease**, v.12, n.1, p.145, 2013.
- ANTUNES, V. M. et al. Estudo pré-analítico e de validação para determinação de malondialdeído em plasma humano por cromatografia líquida de alta eficiência, após derivatização com 2,4 dinitrofenilhidrazina. **Rev. Bras. Cienc. Farm**, v.44, n. 2, p.279-287 2008.
- AOAC. **Official Methods of Analysis**. Washington (D.C.): Association of Official Analytical Chemists, 1997.
- ARQUIMEDES JUNIOR, G. et al. Estudo morfo-anatômico das folhas e caule da *Calophyllum brasiliense* (Clusiaceae), uma contribuição ao estudo farmacognóstico da droga vegetal. **Acta Farmacêutica Bonaerense**, v. 24, p. 371-376, 2005.
- BÄCKHED, F. et al. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.101, n.44, p.15718-15723, 2004.
- BARBOSA, K. et al. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Rev. nutr**, v.23, n.4, p.629-643, 2010.
- BARBOSA, T. N. R. M.; FERNANDES, D. C. Compostos Bioativos e Doenças Cardiovasculares: revisando as evidências científicas. **Estudos**, v.41, n.2, p.181-192, 2014.
- BARROSO, G. M. et al. **Sistemática de angiospermas do Brasil**. 2 ed. Viçosa: UFV, 2002.
- BASARANOGU, M.; BASARANOGU, G.; BUGIANESI, E. Carbohydrate intake and nonalcoholic fatty liver disease: fructose as a weapon of mass destruction. **Hepatobiliary surgery and nutrition**, v.4, n.2, p.109-116, 2015.
- BLACKWELL, Timothy; CHRISTMAN, John. The role of nuclear factor- κ B in cytokine gene regulation. **American journal of respiratory cell and molecular biology**, v.17, n.1, p.3-9, 1997.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248-254, 1976.

BRITO, L. F. et al. Produtos naturais ativadores de PPAR e marcadores associados ao processo inflamatório na Síndrome Metabólica. **Rev. Bras. Pl. Med**, v. 15, n.3, p. 449-466, 2013.

BURG, T. P. et al. Weighing of biomolecules, single cells and single nanoparticles in fluid. **Nature**, v. 446, n.7139, p.1066-1069, 2007.

CASTARDO, J. C. et al. Anti-inflammatory effects of hydroalcoholic extract and two biflavonoids from *Garcinia gardneriana* leaves in mouse paw oedema. **Journal of ethnopharmacology**, v.118, n.3, p.405-411, 2008.

CASTRO, A. P. et al. Potent Schistosomicidal Constituents from *Garcinia brasiliensis*. **Planta medica**, v. 81, n. 09, p. 733-741, 2015.

CHAKRABORTI, Chandra Kanti. New-found link between microbiota and obesity. **World journal of gastrointestinal pathophysiology**, v. 6, n. 4, p. 110-119 2015.

CHOI, Youngshim; ABDELMEGEED, Mohamed A.; SONG, Byoung-Joon. Preventive effects of dietary walnuts on high fat-induced hepatic fat accumulation, oxidative stress and apoptosis in mice. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v.38, p.70-80, 2016.

CHUNG, J. et al. HSP72 protects against obesity-induced insulin resistance. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.105, p.1739-1744, 2008.

CORRÊA, M. P.; PENNA, L. A. **Dicionário das Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas**. Ministério da Agricultura, Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal, 1984.

DE ALMEIDA ALVES, Tânia Maria et al. Biological activities of 7-epiclusianone. **Journal of natural products**, v. 62, n. 2, p. 369-371, 1999.

DE ALMEIDA FILHO, Celio Mendes. Em busca da homeostase bioenergética: obesidade ou longevidade? **Cadernos Brasileiros de Medicina**, v.26, n.1-4, p.55-77, 2013.

DE SOUZA, A.V. et al. Doença hepática gordurosa não alcoólica: Revisão de literatura/Nonalcoholic fatty liver disease: literature review. **Revista ciências em saúde**, v.4, n.1, p.47-56, 2014.

DEN BESTEN, G. et al. The role of short-chain fatty acids in the interplay between diet, gut microbiota, and host energy metabolism. **J Lipid Res**, v.54, p.2325-2340, 2013.

DIBAISE, John K.; FRANK, Daniel N.; MATHUR, Ruchi. Impact of the gut microbiota on the development of obesity: current concepts. **The American Journal of Gastroenterology Supplements**, v.1, n.1, p.22-27, 2012.

DRUMMOND, L. et al. Expression of heat shock proteins (HSPs) in heart in response to exercise training: a systematic review. **Revista da Educação Física/UEM**, v.24, n.4, p.637-647, 2013.

FERREIRA, Paula Souza. **Atividade anti-inflamatória e antioxidante de flavonoides cítricos em camundongos submetidos a dieta indutora do estado pró-inflamatório**. 2014. 61 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, 2014.

GARCIA-AMOEDO, L. H.; DE SOUZA, G. P. **Determinação do mecanismo de ação dos inibidores derivados de benzofenonas e biflavonóides sobre as convertases kex2, furina e pc1**. 2013. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) - Universidade de Mogi das Cruzes. 2014.

GHOSH, Sankar; KARIN, Michael. Missing pieces in the NF- κ B puzzle. **Cell**, v.109, n.2, p.S81-S96, 2002.

GUERRA, C. et al. Dietary açai attenuates hepatic steatosis via adiponectin-mediated effects on lipid metabolism in high-fat diet mice. **Journal of Functional Foods**, v.14, p.192-202, 2015.

GUIMARÃES, C. L. et al. Uma revisão sobre o potencial terapêutico da *Garcinia gardneriana*-NA. **Dynamis Revista Tecno-Científica**, v.12, n.48, p.6-12, 2004.

HABIG, William H.; PABST, Michael J.; JAKOBY, William B. Glutathione S-transferase AA from rat liver. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 175, n. 2, p. 710-716, 1976.

HADDAD, J. J. Antioxidant and prooxidant mechanism in the regulation of redox(y)-sensitive transcription factors. **Cell Signal**, v.14, p.879-97, 2002.

HANEMANN, Simone da Silva Lamartine. **Estudo *in vitro* da Atividade antiproliferativa de 7-epiclusianona sobre linhagens celulares de carcinoma de mama humana**. 2015. 93 f. Dissertação (Mestrado em Biociências Aplicadas à Saúde) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, 2015.

HARAZAKI, T. et al. Resistant starch improves insulin resistance and reduces adipose tissue weight and CD11c expression in rat OLETF adipose tissue. **Nutrition**, v.30, n.5, p.590-595, 2014.

HWANG, Y. P. et al. Purple sweet potato anthocyanins attenuate hepatic lipid accumulation through activating adenosine monophosphate-activated protein kinase in human HepG2 cells and obese mice. **Nutrition Research**, v.31, p. 896-906, 2011.

INFANTE JANTAN, I.; SAPUTRI, F. C. Benzophenones and xanthenes from *Garcinia cantleyana* var. *cantleyana* and their inhibitory activities on human low-density lipoprotein oxidation and platelet aggregation. **Phytochemistry**, v.80, p.58-63, 2012.

ISMAIL, N. et al. Frequency of Firmicutes and Bacteroidetes in gut microbiota in obese and normal weight Egyptian children and adults. **Arch Med Sci**, v.7, n.3, p.501-507, 2011.

JASSEN-HEINIGER, Y. M.; POYNTER, M. E.; BAEURLE, P. A. Recent advances towards understanding redox mechanism in the activation of nuclear factor kB. **Free Rad Biol Med.**, v.28(9), p.1317-327, 2000.

JIA, Y. et al. Cyanidin is an agonistic ligand for peroxisome proliferator-activated receptor- α reducing hepatic lipid. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1831(4), p.698–708, 2013.

JING, P. et al. Quantitative Studies on Structure-DPPH - Scavenging Activity Relationships of Food Phenolic Acids. **Molecules**, v.17, n.11, p.12910-12924, 2012.

JUNQUEIRA, L. C. U.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 12^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013. 556p.

KINUPP, V. F.; LORENZI, H. **Plantas Alimentícias Não Convencionais (PANC) no Brasil: Guia de identificação, aspectos nutricionais e receitas ilustradas**. São Paulo: Nova Odessa, 2014, 768p.

LI, S. et al. Therapeutic Role of Ursolic Acid on Ameliorating Hepatic Steatosis and Improving Metabolic Disorders in High-Fat Diet-Induced Non-Alcoholic Fatty Liver Disease Rats. **PLoS ONE**, v.9, n.1, p.1-13, 2014.

LIM, H. et al. Effects of anti-inflammatory biflavonoid, ginkgetin, on chronic skin inflammation. **Biol. Pharm. Bull.** v. 29, p.1046-1049, 2006.

LIN, H. Z. et al. Metformin reverses fatty liver disease in obese, leptin-deficient mice. **Nature Medicine**, v. 6, p.998–1003, 2000.

LIRA, A. R. et al. Esteatose hepática em uma população escolar de adolescentes com sobrepeso e obesidade. **J Pediatr (Rio J)**, v.86, p.45-52, 2010.

LOCKE, M.; NOBLE, E. G.; ATKINSON, B. G. Exercising mammals synthesize stress proteins. **Am. J. Physiol.**, v.258, p.C723-C729, 1990.

LU, C. et al. Ligustrazine prevents alcohol-induced liver injury by attenuating hepatic steatosis and oxidative stress. **International immunopharmacology**, v. 29, n. 2, p. 613-621, 2015.

MAFRA, Denise; ABDALLA, Dulcinéia Saes Parra; COZZOLINO, Sílvia Maria Franciscato. Peroxidação lipídica em pacientes com insuficiência renal crônica. **Revta Nutr**, v.12, p.205-212, 1999.

MARKLUND, S. "Pyrogallol autooxidation". In: **Handbook of Methods for Oxygen Radical Research**. Boca Raton: CRC PRESS, 1985. p.243-247.

MARTINS, F. et al. Composition, and Anti-Inflammatory and Antioxidant Activities of the Volatile Oil from the Fruit Peel of *Garcinia brasiliensis*. **Chemistry & biodiversity**, v.5, n.2, p.251-258, 2008.

MAYER, M. P.; BUKAU, B. Hsp70 chaperones: Cellular functions and molecular mechanism. *Cell. Mol. Life Sci.*, v.62, p.670-684, 2005.

MORAES, A. C. F. et al. Microbiota intestinal e risco cardiometabólico: mecanismos e modulação dietética. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v.58, p. 317-327, 2014.

MORAES, É. A. et al. Sorghum genotype may reduce low-grade inflammatory response and oxidative stress and maintains jejunum morphology of rats fed a hyperlipidic diet. **Food Research International**, v.49, n.1, p.553-559, 2012.

MORI, S. et al. Characteristic Expression of Extracellular Matrix in Subcutaneous Adipose Tissue Development and Adipogenesis; Comparison with Visceral Adipose Tissue. **International Journal of Biological Sciences**, v.10, n.8, p.825-833, 2014.

MURER, S. B. et al. Antioxidant supplements reduced oxidative stress and stabilized liver function tests but did not reduce inflammation in a randomized controlled trial in obese children and adolescents. **The Journal of nutrition**, v.144, n.2, p.193-201, 2014.

MYUNG, S. et al. Efficacy of vitamin and antioxidant supplements in prevention of cardiovascular disease: systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. **Bmj**, v.346, p.F10, 2013.

NAIR, A. R. *et al.* Blueberry-Enriched Diet Improves Renal Function and Reduces Oxidative Stress in Metabolic Syndrome Animals: Potential Mechanism of TLR4-MAPK Signaling Pathway. **PLoS ONE**, v.9, n.11, p.1-12, 2014.

NASCIMENTO, W. M. O.; CARVALHO, J. E. U.; MÜLLER, C. H. Caracterização morfológica da semente e da plântula de bacurizinho (*Rheedia acuminata* (Ruiz et Pav.) Plachon et Triana - CLUSIACEAE). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 24, n. 2, p. 555-558, 2002.

NATAL, D. et al. Ubá mango juices intake decreases adiposity and inflammation in high-fat diet-induced obese Wistar rats. **Nutrition**, v.32, p.1011-1018, 2016.

NOH, J. R. et al. Chestnut (*Castanea crenata*) inner shell extract inhibits development of hepatic steatosis in C57BL/6 mice fed a high-fat diet. **Food chemistry**, v.121, n.2, p.437-442, 2010.

NOVELLI, E. L. B. et al. Anthropometrical parameters and markers of obesity in rats. **Laboratory Animals**, v.41, n.1, p.111-119, 2007.

NUNN, Alistair; BELL, Jimmy; BARTER, Philip. The integration of lipid-sensing and anti-inflammatory effects: how the PPARs play a role in metabolic balance. **Nuclear receptor**, v.5, n.1, 2007.

OLIVEIRA, A. et al. Potencial alelopático de folhas frescas de bacupari (*Rheedia brasiliensis* (Mart.) Planch. & Triana) na germinação de alface. **Revista Brasileira de Biociências**, v.9, n.4, p.550-553 2011.

PADILLA, J. et al. Divergent phenotype of rat thoracic and abdominal perivascular adipose tissues. **American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v.304, n.7, p.R543-R552, 2013.

PARK, S. et al. Calorie restriction with a high-fat diet effectively attenuated inflammatory response and oxidative stress-related markers in obese tissues of the high diet fed rats. **Mediators of inflammation**, v. 2012, 11p., 2012.

PARK, J.; SEO, J.; YOUN, H.. Gut microbiota and clinical disease: obesity and nonalcoholic Fatty liver disease. **Pediatr Gastroenterol Hepatol Nutr**, v.16, p.22-27, 2013.

PEREAÑEZ, J. et al. The biflavonoid morelloflavone inhibits the enzymatic and biological activities of a snake venom phospholipase A 2. **Chemico-biological interactions**, v. 220, p.94-101, 2014.

PRANGTHIP, P. et al. Amelioration of hyperglycemia, hyperlipidemia, oxidative stress and inflammation in streptozotocin-induced diabetic rats fed a high fat diet by riceberry supplement. **Journal of Functional Foods**, v.5, n.1, p.195-203, 2013.

RAUHMANN, I.; MACNEE, W. Regulation of redox glutathione levels and gene transcription in lung inflammation: therapeutic approaches. **Free Rad Biol Med.**, v.18(9), p1405-420, 200

REED, Tanea. Lipid peroxidation and neurodegenerative disease. **Free Radical Biology and Medicine**, v.51, n.7, p.1302-1319, 2011.

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

REIS, S. et al. Attenuation of colitis injury in rats using Garcinia cambogia extract. **Phytotherapy research**, v.23, n.3, p.324-329, 2009.

RESEARCH DIETS®. Open formula purified diets for lab animals - D12079B. **OPEN SOURCE DIETS**, 2006.

REYNÉS, B. et al. Reversion to a control balanced diet is able to restore body weight and to recover altered metabolic parameters in adult rats long-term fed on a cafeteria diet. **Food Research International**, v.64, p.839-848, 2014.

RIBEIRO, S. M. R.; QUEIROZ, J. H.; QUEIROZ, M. E. L. R. D.; CAMPOS, F. M.; SANT'ANA, H. M. P. Antioxidant in Mango (*Mangifera indica* L.) Pulp. **PlantFoods for Human Nutrition**, v.62, n.1, p.13-17, 2007.

ROLO, A. P.; TEODORO, J.S.; PALMEIRA, C.M. Role of oxidative stress in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. **Free Radical Biology and Medicine**, v.52, n.1, p.59-69, 2012.

SABARENSE, Alessandra P. et al. Characterization of mortality in children with sickle cell disease diagnosed through the Newborn Screening Program. **Jornal de Pediatria**, v. 91, n. 3, p. 242-247, 2015.

SAMPEY et al. Cafeteria diet is a robust model of human metabolic syndrome with liver and adipose inflammation: comparison to high-fat diet. **Obesity** (Silver Spring), v.19, p.1109–1117, 2011.

SANTA-CECÍLIA, F. V. **Efeito antinociceptivo e antiinflamatório do extrato etanólico e da benzofenona 7-epiclusianona isolada de folhas de *Garcinia brasiliensis* Mart.(Clusiaceae)**. 2011. 121 f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2011.

_____. et al. Anti-inflammatory and antinociceptive effects of *Garcinia brasiliensis*. **Journal of ethnopharmacology**, v.133, n.2, p.467-473, 2011.

_____ et al. 7-Epiclusianone, the Natural Prenylated Benzophenone, Inhibits Superoxide Anions in the Neutrophil Respiratory Burst. **Jounal of Medicinal Food**, v.15, p.200-205, 2012.

SANTHIRASEGARAM, V.; RAZALI, Z.; SOMASUNDRAM, C. Effects of thermal treatment and sonication on quality attributes of Chokanan mango (*Mangifera indica* L.) juice. **Ultrasonics Sonochemistry**, v.20, n.5, p.1276-1282, 2013.

SCHNEIDER, A.C. R. **Alterações hepáticas causadas pelo etanol e efeito do tratamento com *Lactobacillus rhamnosus* GG em zebrafish (*Danio rerio*)**. 2015. 103 f. Tese (Doutorado em Gastroenterologia e Hepatologia) - Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2015.

SINGLETON, K. D.; BECKEY, V. E.; WISCHMEYER, P. E. Glutamine prevents activation of NF- κ B and stress kinase pathways, attenuates inflammatory cytokine release, and prevents acute respiratory distress syndrome (ARDS) following sepsis. **Schock**, v. 24, p.583-589, 2005.

SHIMOMURA, I.; BASHMAKOV, Y.; HORTON, J. D. Increased levels of nuclear SREBP-1c associated with fatty livers in two mouse models of diabetes mellitus. **The Journal of Biological Chemistry**, v.274 (42), p.30028–30032, 1999.

SHIN, J. H. et al. Hepatoprotective Effect of Aged Black Garlic Extract in Rodents. **Toxicological Research**, v.30, n.1, p.49-54, 2014.

SHOAIE S, Karlsson F, Mardinoglu A, Nookaew I, Bordel S, Nielsen J. Understanding the interactions between bacteria in the human gut through metabolic modeling. **Sci Rep**, v.3, p.252, 2013.

SONG, S. et al. Peroxisome proliferator activated receptor α (PPAR α) and PPAR gamma coactivator (PGC-1 α) induce carnitine palmitoyltransferase IA (CPT-1A) via independent gene elements. **Molecular and cellular endocrinology**, v.325, n.1, p.54-63, 2010.

STIENSTRA, R. et al. Peroxisome proliferator-activated receptor α protects against obesity-induced hepatic inflammation. **Endocrinology**, v.148, n.6, p.2753-2763, 2007.

STROBEL, N. et al. Oxidative stress biomarkers as predictors of cardiovascular disease. **International journal of cardiology**, v.147, n.2, p.191-201, 2011.

TAGLIABUE, A.; ELLI, M. The role of gut microbiota in human obesity: Recent findings and future perspectives. **Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases**, v.23, p.160-168, 2013.

TAWFIK, Vivianne L.; WHITE, Robin E.; GIFFARD, Rona. "Glial Cells, Inflammation and Heat Shock Proteins in Cerebral Ischemia". **Advances in the Preclinical Study of Ischemic Stroke**. INTECH, Open Access Publisher, 2012. p.177-192.

TEKELESELASSIE, A. W. et al. High-Fat Diet Enriched with Low Omega-6 to Omega-3 Fatty Acid Ratio Reduced Fat Cellularity and Plasma Leptin Concentration in Sprague-Dawley Rats. **The Scientific World Journal**, v. 2013, p.1-7, 2013.

TINKOV, A. et al. Adipose tissue chromium and vanadium disbalance in high-fat fed Wistar rats. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 29, p. 176-181, 2015.

VASCONCELOS, S. M. L. et al. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Quim Nova**, v.30, n.5, p.1323-1338, 2007.

VELLOSA, J. C. R.; BARBOSA, V. F.; OLIVEIRA, O. M. M. de F. Pesquisa de produtos naturais: plantas e radicais livres. **Rev. Eletr. de Farm**, UNESP, v.IV, n.2, p.119-130, 2007.

VERDI, L.G. et al. Antibacterial and brine shrimp lethality tests of biflavonoids and derivatives of *Rheedia gardneriana*. **Fitoterapia**, v.75, p.360-363, 2004.

WANG, B. et al. Resveratrol prevents suppression of regulatory T-cell production, oxidative stress, and inflammation of mice prone or resistant to high-fat diet-induced obesity. **Nutrition research**, v.33, n.11, p.971-981, 2013.

WANG, J. et al. Anti-inflammatory effects of apigenin in lipopolysaccharide-induced inflammatory in acute lung injury by suppressing COX-2 and NF-kB pathway. **Inflammation**, v.37, n.6, p. 2085-2090, 2014.

WHO. **Obesidade e excesso de peso.** World Health Organization. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>>. Acesso em 22 de out. de 2016.

WILDNER, G. et al. Efeito da terapia de choque térmico sobre a concentração de hsp70 e parâmetros de estresse oxidativo em fígado de ratas ovariectomizadas. **Salão do Conhecimento**, v.2, n. 2, 2016.

WITASP, A. et al. Inflammatory biomarker pentraxin 3 (PTX3) in relation to obesity, body fat depots and weight loss. **Obesity**, v.22, n.5, p.1373-1379, 2014.

XU, A. et al. The fat-derived hormone adiponectin alleviates alcoholic and nonalcoholic fatty liver diseases in mice. **The Journal of Clinical Investigation**, v.112(1), p.91–100, 2003.

YANG, Y. et al. Anthocyanin Extract from Black Rice Significantly Ameliorates Platelet Hyperactivity and Hypertriglyceridemia in Dyslipidemic Rats Induced by High Fat Diets. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.59, n.12, p.6759-6764, 2011.

ZHANG, A.; SUN, H.; WANG, Xijun. Recent advances in natural products from plants for treatment of liver diseases. **European journal of medicinal chemistry**, v.63, p.570-577.2013.

6. ARTIGO 1

Extrato de bacupari (*Garcinia brasiliensis*) reduz a biometria, a lipogênese e a esteatose hepática de ratos obesos.

Resumo

O objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito do extrato etanólico da casca de bacupari (EEB) nas medidas biométricas, na lipogênese hepática e na progressão da doença hepáticas gordurosa não alcoólica (DHGNA) em ratos Wistar obesos. Ratos machos adultos após oito semanas de indução de obesidade com dieta hiperlipídica, foram divididos em dois grupos: grupo com dieta hiperlipídica (HFD), controle obeso, e grupo com dieta HFD acrescida de EEB (BHFD) na concentração de 300 mg por animal/dia (42mg/dia de 7-epiclusianona e 10,76mg/dia de morelloflavona). O grupo controle normal foi mantido durante todo experimento alimentado com dieta AIN-93M por 15 semanas. O EEB reduziu o índice de massa corporal (IMC), o peso do fígado e o índice hepatossomático do grupo BHFD em relação ao grupo HFD. No grupo BHFD a expressão gênica do receptor de adiponectina 2 (AdipoR2) no fígado e os níveis séricos de adiponectina aumentaram ($p<0,05$) e reduziram ($p<0,05$) a expressão gênica do fator de transcrição de genes lipogênicos, proteína palmitoil transferase (SREBP-1c), o percentual de gordura hepática e o grau de esteatose reduziram. Além disto, foi observado que o EEB promoveu o aumento ($p<0,05$) da expressão de mRNA do receptor ativado por proliferador de peroxissoma α (PPAR- α) e o aumento da expressão gênica de carnitina palmitoil transferase (CPT-1 α). Conclui-se que, o EEB demonstrou efeito protetor à DHGNA, pois promoveu redução do IMC, induziu da β -oxidação de lipídios, reduziu a lipogênese e a esteatose hepática.

Palavras chaves: expressão gênica; bacupari; adiponectina; fígado.

7. INTRODUÇÃO

A doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) é considerada, nos países ocidentais, um problema de saúde pública, sendo associada diretamente aos hábitos dos indivíduos, como o aumento do consumo de dietas hiperlipídicas e a falta de exercícios físicos, e o aumento da incidência de obesidade e resistência à insulina (BEDOGNI et al., 2005). Sabe-se que o excesso de peso corporal pode provocar a resistência à insulina no tecido adiposo, no músculo e no fígado. O aumento da glicose e da insulina, causada pela resistência à insulina, faz com que aumente a lipólise e consequentemente os níveis de lipídeos circulantes, induzindo assim a retenção de gordura pelo fígado (ROLO; TEODORO & PALMEIRA, 2012).

O desenvolvimento da esteatose hepática está relacionada com as vias metabólicas, incluindo o aumento da liberação de ácidos graxos não esterificados a partir de tecido adiposo branco, aumentando a síntese “de novo” de ácido graxo e diminuindo a β -oxidação. O controle e a regulação da homeostase hepática de lipídios são realizados por reguladores de transcrição chave, tais como proteínas de ligação ao elemento regulador de esterol-1c (SREBP-1c) e o receptor ativado por proliferadores de peroxissoma (PPAR- α), receptor de adiponectina 2 (ADIPOR2) e carnitina palmitoil transferase (CPT-1 α) (GUERRA et al, 2014).

O PPAR- α regula o metabolismo de lipídios, carboidratos e aminoácidos e pode ser ativado por ligantes como ácidos graxos poliinsaturados e drogas usadas para tratar dislipidemias (CONTRERAS; TORRES & TOVAR, 2013). O SREBP-1c é um fator de transcrição que regula a biossíntese de ácidos graxos aumentando a transcrição de enzimas-chave, incluindo a ácido graxo sintase (FAS) e acetil-CoA carboxilase (ACC). A expressão deste fator de transcrição é elevada em indivíduos resistentes à insulina, pois aumenta a lipogênese, que conduz ao acúmulo de triacilglicerol (TG) no fígado e o desenvolvimento de esteatose hepática (SHIMOMURA; BASHMAKOV & HORTON, 1999).

A adiponectina é uma citocina que sensibiliza a insulina, estimulando a oxidação de ácido graxos no fígado e nos músculos (GUERRA et al., 2015). Segundo Xu e colaboradores (2013), o aumento dos níveis de adiponectina reduziu a hepatomegalia, esteatose hepática e aspartato aminotransferase, que estão associadas com DHGNA em ratos. A melhoria do estado inflamatório, como aumento de adiponectina pode estimular

a síntese de ADIPOR2, fator de transcrição, que regula positivamente a ativação de PPAR- α e CPT-1 α , estimulando a β -oxidação e reduzindo a biossíntese de lipídio (YAMAUCHI; KADOWAK, 2008).

A regulação de genes e a redução dos riscos de doenças crônicas não transmissíveis, pode ser feito pelos flavonóides, compostos bioativos não nutrientes presentes nos alimentos, devido à sua capacidade antioxidante. Estes podem exercer os seus efeitos benéficos por meio da interação com os genes envolvidos na sinalização intracelular, interferindo no metabolismo de lipídios (DRAGANO et al., 2013).

O gênero *Garcinia* (ou *Rheedia*) pertencente à família Clusiaceae tem demonstrado pelos estudos fitoquímicos, ser possuidor de uma grande diversidade de compostos fenólicos como benzofenonas, xantonas e flavonoides. Muitos desses constituintes são princípios ativos com propriedades farmacológicas contra várias doenças (INFANTE, 2013). O EEB apresentou atividade antiinflamatória e antioxidante (SANTA CECILIA et al., 2012) e nosso grupo de trabalho constatou que ele apresenta efeito antiobesogênico em ratos Wistar obesos tratados com dieta hiperlipídica (MOREIRA et al., 2017). Assim, dando continuidade aos nossos estudos o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do EEB na modulação das vias regulatórias relacionadas a lipólise e lipogênese hepática em ratos obesos alimentados com dieta hiperlipídica.

8. MATERIAIS E MÉTODOS

8.1. Coleta do material vegetal

Os frutos de *G. brasiliensis* foram coletados em fevereiro de 2011 na região de Viçosa, Minas Gerais, Brasil (latitude 20° 45' 14'' sul e longitude 42° 52' 55'' oeste). A identificação botânica foi realizada no horto botânico da Universidade Federal de Viçosa pelo Dr. João Augusto Alves Meira Neto. A espécie encontra-se catalogada pela exsicata sob o número VIC2604, depositada no herbário da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, Brasil.

8.2. Preparo dos extratos

Os epicarpes de *G. brasiliensis* foram secos em estufa com circulação de ar a uma temperatura de 40°C durante 8 dias com monitoramento de umidade. Após a

secagem completa, o material foi pulverizado em moinho de facas e posteriormente foi submetido à extração exaustiva em extrator Soxhlet utilizando o etanol como solvente. A seguir o extrato foi filtrado à pressão reduzida, obtendo-se o extrato etanólico (CASTRO et al., 2015).

8.3. Ensaio biológico

Animais / Dietas

Foram utilizados 24 ratos machos recém-desmamados com 21 dias de idade (*Rattus norvegicus*, variedade albinus, classe Rodentia), linhagem Wistar, provenientes do Biotério Central do Centro de Ciências Biológicas e de Saúde da UFV. Até o 60º dia de idade, fase adulta, os animais ficaram mantidos em caixas de polietileno, consumindo ração comercial (Presence/InVivo® Nutrição Animal) e água destilada *ad libitum*. A temperatura da sala de experimentação foi controlada em $22 \pm 3^\circ\text{C}$, com ciclo claro/escuro de 12 horas. No 61º dia os animais foram alocados em gaiolas individuais, de aço inoxidável e divididos em dois grupos de forma sistemática, de modo que não houvesse diferença maior que 5,0 g entre as médias dos pesos dos grupos, atendendo à recomendação da AOAC (1997). Os animais do grupo controle normal (n=8) receberam dieta AIN-93M (REEVES; NIELSEN; FAHEY JR., 1993), e os outros animais (n=16) receberam dieta hiperlipídica (HFD) e água destilada *ad libitum*, segundo a formulação da RESEARCH DIETS® (2006), para indução de obesidade (SAMPEY et al., 2011), por 49 dias. Após a indução da obesidade o grupo controle AIN-93M foi mantido e os animais obesos (n=16) foram realocados, de forma que apresentassem as medidas biométricas semelhantes em dois grupos: o grupo controle obeso (HFD) e o grupo obeso que recebeu HFD adicionada de extrato de bacupari (BHFD) na dose de 300 mg por animal/dia. A dose foi calculada para oferecer aos animais 42 mg/animal/dia de 7-epiclusianona e 10,76 mg/animal/dia de morelloflavone de acordo com Moreira e colaboradores (2017). Cada g de extrato contribuiu com 140 mg de 7-epiclusianona e 35,86 mg de morelloflavona por gramas de extrato (Moreira et al., 2017). Estas doses foram baseadas em estudos prévios, onde estes compostos demonstraram atividade antioxidante e anti-inflamatória (CASTRO et al., 2015; SANTA-CECILIA et al., 2012; SANTA-CECÍLIA et al., 2011; LIM; SON; CHANG; KANG; KIM, 2006). Ao final do experimento, os ratos ficaram em jejum por 12 horas e foram anestesiados por anestesia com isoflurano 100% (Isoforine, Cristália®) após jejum por 12 horas e o sangue foi

coletado por punção cardíaca. O sangue foi estocado em tubos sem anticoagulante, 16×100 mm (BD Vacutainer®) e centrifugados sob refrigeração por 10 minutos a 900 × g, para obtenção de soro. Os órgãos coração, cérebro, ceco e fígado foram retirados e em seguida, posteriormente armazenados a -80° C. Amostras do tecido hepático foram lavadas em solução salina, fixadas em formaldeído a 10% e mantidas à temperatura ambiente para posterior análise histológica.

A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética no Uso de animais da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais. Protocolo número: 98/2015

8.4. Medidas de ingestão alimentar e biométricas

O ganho de peso corporal e o consumo alimentar foram monitorados semanalmente, durante o período experimental. Foram calculados a ingestão energética (multiplicando a densidade calórica da dieta pelo consumo em gramas total) e o coeficiente de eficiência alimentar - CEA (CEA= ganho de peso do animal (g)/ total de dieta consumida (g)). Os índices somáticos do coração, cérebro, ceco e fígado foram calculados dividindo o peso do animal pelo peso do órgão. O índice de massa corporal (IMC) foi obtido pela relação entre o peso e o quadrado do comprimento naso-anal. Os animais foram considerados obesos animais cujo IMC for maior que 0,68 (NOVELLI et al., 2007; REYNÉS et al., 2014).

8.5. Extração de mRNA, Síntese de cDNA e PCR em tempo real

A extração total do mRNA foi realizada no fígado, utilizando trizol (Invitrogen, CA, EUA). O mRNA isolado foi usado para sintetizar o cDNA utilizando kit de transcrição Reversa (M-MLV Invitrogen Corp, Grand Island, NY) de acordo com o protocolo do fabricante. O cDNA foi quantificado utilizando espectrofotômetro (Multiskam GD Thermo Cientific).

A expressão dos níveis de mRNA foi realizada pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real (RT-PCR) com SYBR green fast PCR master mix da Applied Biosystems (Foster City, CA) com volume de reação de 10 µL e todos os oligonucleotídeos utilizados na concentração final de 100 nmol/L. Para a quantificação no equipamento AB StepOne Real Time PCR System, utilizou-se o sistema de quantificação por fluorescência SYBR-Green e o Primer Express software (Applied Biosystems, Foster City, CA). O ciclo da PCR envolveu a desnaturação a 95°C (20seg),

40 ciclos de 95°C por 3 segundos e 60 °C por 30 segundos, seguidos da curva padrão de dissociação. Os dados de PCR real time foram analisados pelo método de $2^{-\Delta\Delta CT}$ (LIVAC, 2001). Todas as etapas foram realizadas em condições livre de RNase.

Foram utilizadas as sequências de oligonucleotídeos (Sigma- Aldrich®) senso e anti-senso; relacionado à lipogênese hepática: proteína de ligação ao elemento regulador de esteróis (SREBP-1c) (senso: 5'- CGC TAC CGT TCC TCT ATC AAT GAC- 3'; anti-senso: 5'- AGT TTC TGG TTG CTG TGC TGT AAG- 3') e envolvidos no processo de oxidação de ácidos graxos: carnitina palmitoil transferase (CPT-1α) (senso: 5'- GTA AGG CCA CTG ATG AAG GAA GA- 3'; anti- senso: 5'- ATT TGG GTC CGA GGT TGA CA- 3'), receptor ativado por proliferador de peroxissoma (PPAR-α) (senso: 5' CCT GGC TTC CCT GTG AAC T-3'; anti senso: 5'- ATC TGC TTC AAG TGG GGA GA- 3') e receptor de adiponectina 2 (ADIPOR2) (senso: 5'- CAT GTT TGC CAC CCC TCA GTA- 3'; anti-senso: 5'- ATG CAA GGT AGG GAT GAT TCC A- 3'). A expressão relativa dos níveis de mRNA foi normalizada pelo controle endógeno GAPDH (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase) (senso: 5'- AGG TTG TCT CCT GTC ACT TC- 3'; anti-senso: 5'- CTG TTG CTG TAG CCA TAT TC- 3') para ratos. Utilizou-se os valores do grupo controle normal como padrão.

8.6. Quantificação da proteína no tecido hepático

Para a extração da proteína da fração nuclear e citoplasmática no tecido hepático foi utilizado o Kit NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents (Thermo Scientific). Para a quantificação da PPAR-α foi utilizado a 100 µg da fração proteica nuclear contendo 60 µg de proteína extraída anteriormente e realizada a análise com o Kit PPAR-α Elisa Kit (E-EL-R0725) de acordo com as instruções do fabricante.

8.7. Quantificação de citocinas plasmática

A análise de adiponectina foi realizada utilizando kit comercial ELISA específico Adiponectin, (EZR ADP-62 K, Millipore Corporation). A placa de microtitulação foi pré-revestida com um anticorpo específico para adiponectina. As amostras e padrões foram adicionados aos poços da placa de microtitulação apropriados contendo um anticorpo conjugado com biotina específico para adiponectina. Os

procedimentos foram realizados de acordo com o protocolo estabelecido pelo fabricante.

8.8. Análise histomorfométrica do tecido hepático

Os fragmentos de tecidos fixados foram incluídos em resina (Leica, Historesin®). Foram obtidos cortes histológicos semi-seriados com 3 µm para coloração de Hematoxilina/Eosina. As análises das lâminas foram realizadas em microscópio de luz (Nikon Phase Contrast 0,90 Dry, Japão) e as imagens foram obtidas em câmera digital ful-DIGI-PRO 5.0M com auxílio do software Micrometrics SE Premium (Accu-Scope®), com ampliação de 40X. Para a avaliação da inflamação foi realizada contagem manual de pontos sobre o tecido, utilizando-se uma gradícula micrométrica com 10000 µm² de área com 441 pontos de interseção, sendo dez campos por animal. Os diâmetros dos núcleos de 10 hepatócitos por animal foram mensurados com auxílio do aplicativo ImagePro-Plus® versão 4.5 (Media Cybernetics).

Foi usado o sistema de pontuação semi-quantitativo para quantificar a gravidade de esteatose hepática em 10 campos microscópicos por animal como descrito anteriormente por Turlin e colaboradores (2001), obedecendo-se uma escala de cincogaus: grau 0, se o percentual de gordura ausente ou <5%; grau 1, se ≥5% e <25%; grau 2, se ≥25% e <50%; grau 3, se ≥50% e <75% e grau 4, se ≥75%.

8.9. Análises estatísticas

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de médias de Newman Keuls. Foi adotado o nível de significância igual a 5%. Todas as análises estatísticas foram realizadas pelo programa GraphPad Prism versão 6.01.

9. RESULTADOS

9.1. Efeito do extrato de bacupari no consumo alimentar e nas medidas biométricas

O extrato de bacupari adicionado a dieta hiperlipídica (HFD) proporcionou um consumo do composto 7-epiclusianona, na proporção de $41,38 \pm 2,4$ por animal e de morelloflavone de $10,60 \pm 0,55$ por animal (MOREIRA et al., 2017).

O consumo alimentar foi semelhante entre os grupos HFD adicionados ou não de EEB. No entanto, o grupo controle normal (AIN-93M) apresentou maior consumo alimentar (Fig. 1A; $p < 0,05$) e menor peso final (Fig. 1C; $p < 0,05$) em relação ao grupo hiperlipídico (HFD). No entanto, o consumo calórico foi semelhante entre os grupos experimentais (Fig. 1B; $p > 0,05$). O coeficiente de eficiência alimentar (CEA) (Fig. 1D) do grupo controle obeso foi maior ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle normal e ao tratado com extrato de bacupari.

O EEB reduziu ($p < 0,05$) o IMC (Fig. 1E), o peso do fígado (Fig. 1F) e o índice hepatossomático (Fig. 1G) em relação ao controle obeso. Porém, o peso do ceco, do coração e do cérebro não diferiram entre os grupos experimentais (Fig. 1F; $p > 0,05$) e, no entanto, seus índices somáticos foram menores ($p < 0,05$) nos animais obesos com e sem EEB em relação ao grupo controle normal (Fig. 1G).

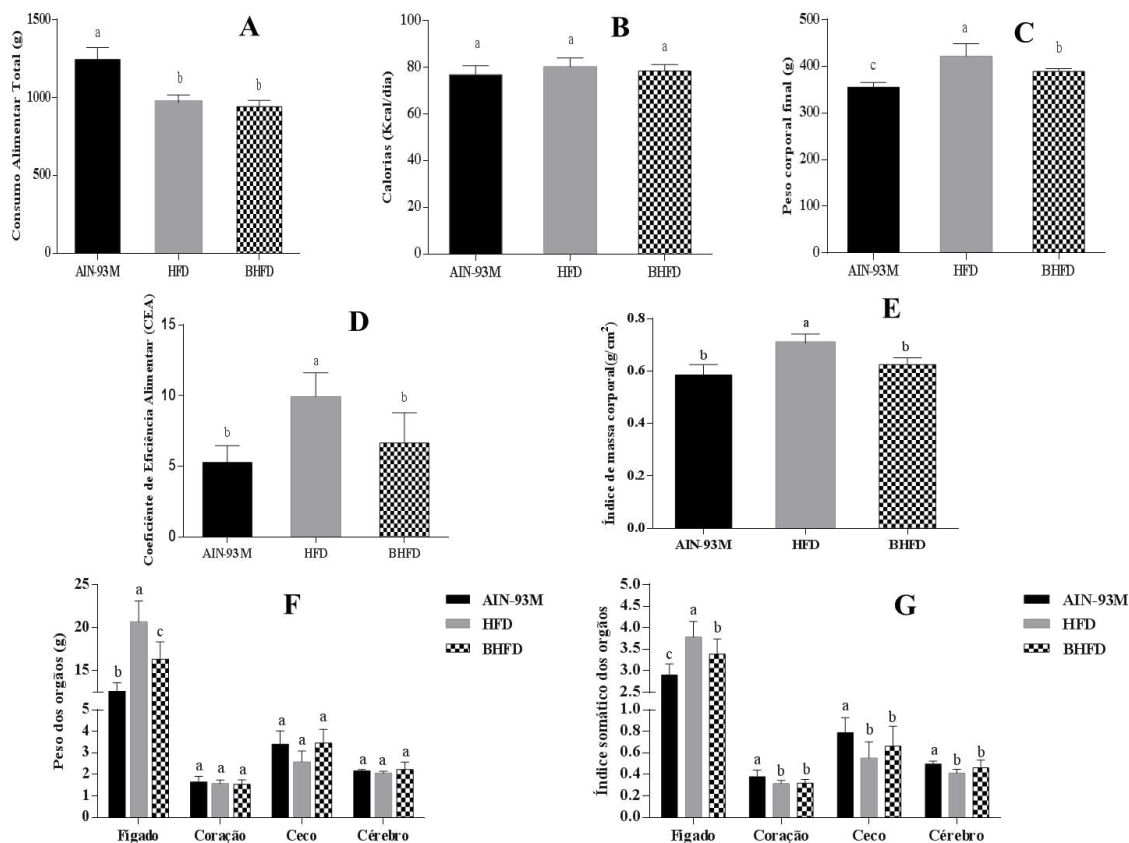


Figura 1: Consumo alimentar e calórico, peso final, coeficiente de eficiência alimentar (CEA), Índice de Massa Corporal (IMC), peso e índice somático do fígado, coração, ceco e cérebro de ratos obesos alimentados com dieta hiperlipídica adicionado de extrato de bacupari por oito semanas. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste post hoc Newman Keus a 5% de probabilidade. Grupo controle normal (AIN-93M); grupo controle obeso alimentado com dieta hiperlipídica (HFD); grupo HFD adicionado de extrato de bacupari (BHFD).

9.2. Efeito do extrato de bacupari na expressão de genes envolvidos na lipogênese e oxidação de ácidos graxos e na concentração de citocinas

Foi avaliado se o extrato etanólico da casca de bacupari modula a expressão de genes relacionados com a sinalização de adiponectina envolvido na lipogênese e oxidação de ácidos graxos hepáticos.

O PPAR- α e o seu gene alvo, o CPT-1 α , são responsáveis por aumentar a sensibilidade à insulina, oxidação de ácidos graxos livres e impedir a gliconeogênese (GOMES; 2006, LEE et al., 2010). Embora a expressão gênica do mRNA do PPAR- α tenha aumentado ($p < 0,05$) no grupo BHFD em relação ao controle obeso, seus níveis

proteicos não alteraram, permanecendo inferiores em relação ao controle normal (Fig. 2A-B). O EEB promoveu redução da expressão gênica de SREBP-1c e aumentou a expressão gênica de CPT-1 α , em relação ao controle obeso (Fig. 2E-F; $p<0,05$).

O receptor de adiponectina (ADIPOR2), que regula positivamente a ativação de PPAR- α e CPT-1 α , estimulando a β -oxidação e consequentemente biossíntese de lipídio (YAMAUCHI & KADOWAK, 2008), pode ter sido modulado pelo EEB, que promoveu aumento de sua expressão gênica e a concentração de adiponectina em relação ao grupo controle obeso (Fig. 2C-D; $p<0,05$).

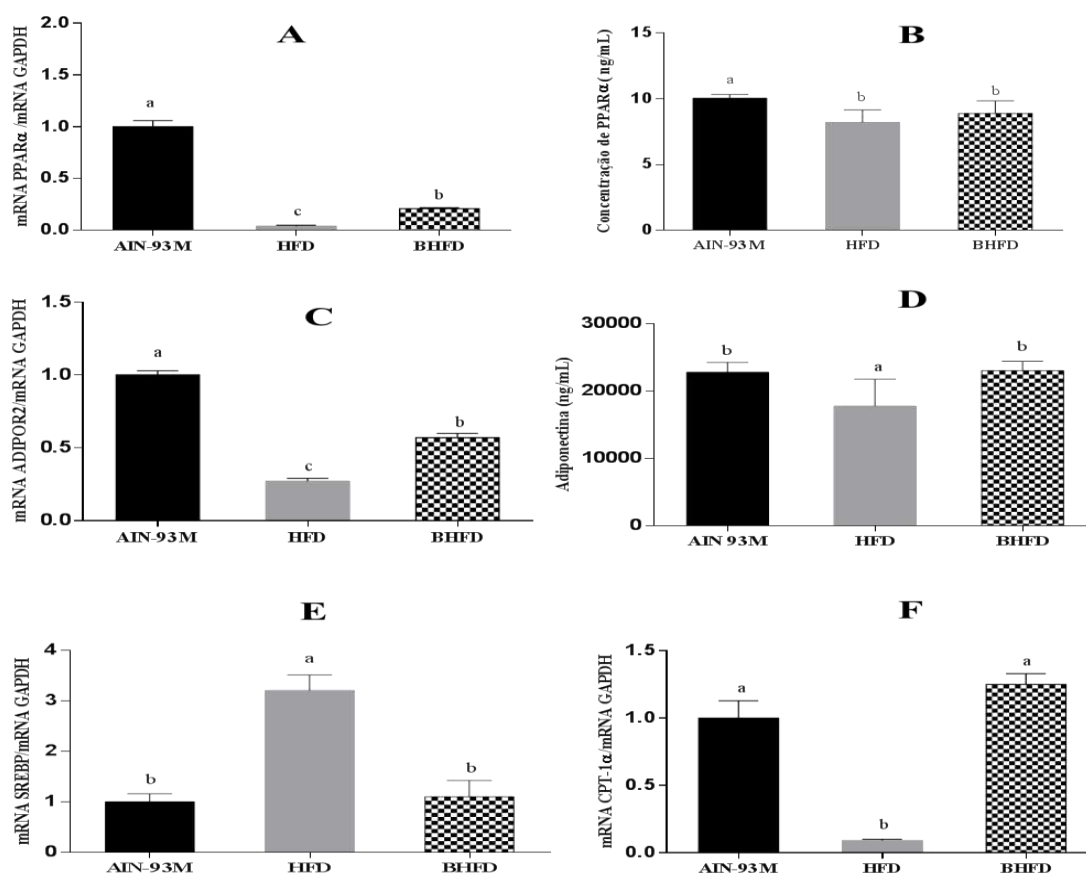


Figura 2: Expressão gênica relativa do Receptor Ativado por Proliferador de Peroxissoma (PPAR- α), Carnitina Palmitoil Transferase (CPT-1 α), Proteína de Ligação ao Elemento Regulador de Esteróis (SREBP-1C), Receptor de Adiponectina 2 (ADIPOR2), tradução gênica de PPAR- α e adiponectina de ratos obesos alimentados com dieta hiperlipídica adicionado de extrato de bacupari por oito semanas. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste post hoc Newman Keuls a 5% de probabilidade. Grupo controle normal (AIN-93M); grupo controle obeso alimentado com dieta hiperlipídica (HFD); grupo chFD adicionado de extrato de bacupari (BHFD).

9.3. Efeito do extrato de bacupari no tecido hepático dos ratos após o tratamento com EEB

Estudos têm demonstrado que a dieta rica em gordura saturada é ideal para a indução da obesidade em experimento com animais, podendo representar o ganho de peso excessivo (TINKOV et al., 2015; TEKELESELASSIE et al., 2013; YANG et al., 2011). A identificação e as medidas celulares são procedimentos de grande importância para identificação de atrofia, hipertrofia e outras alterações celulares para avaliação de patologias (SAMPEY et al., 2011; ANDRADE et al., 2013). As fotomicrografias histológicas identificaram um aumento notável da deposição de gordura nos hepatócitos do grupo controle obeso em relação aos grupos controle normal e BHFD (Fig. 3A-C). O percentual de gordura encontrado no tecido hepático do grupo BHFD foi menor ($p<0,05$) em relação ao grupo controle obeso (Fig. 3D). Em relação à classificação do grau de esteatose o grupo BHFD apresentou grau 2, o grupo HFD com grau 4 e o controle normal com grau 0 (ausência de esteatose). O percentual de citoplasma foi maior ($p<0,05$) no grupo BHFD em relação ao HFD e menor ($p<0,05$) em relação ao controle normal. Porém, o percentual do núcleo não diferiu entre os grupos BHFD e HFD, sendo estes menores ($p<0,05$) em relação ao controle normal (Fig. 3D). O diâmetro do núcleo foi menor ($p<0,05$) no grupo BHFD em relação aos controles obeso e normal (Fig. 3E).

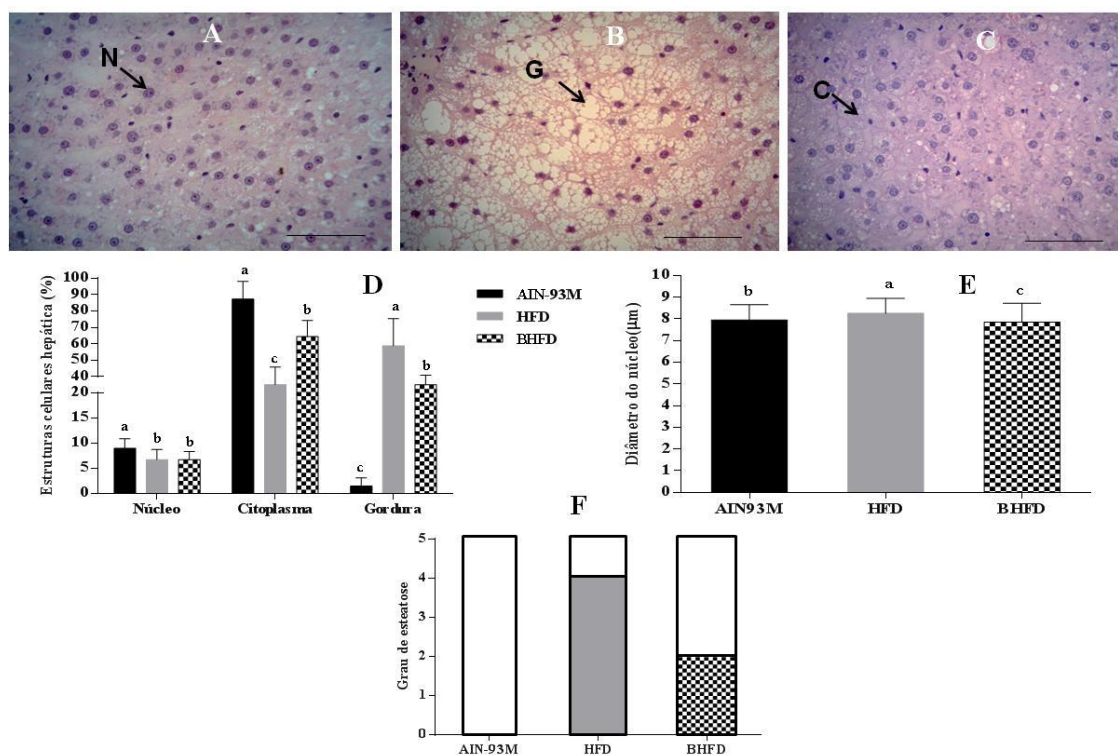


Figura 3: Fotomicrografias do tecido hepático (A, B, C), percentual dos componentes estruturais (D) (citoplasma, núcleo e gota de gordura), diâmetro do núcleo (E), grau de esteatose (F) de ratos obesos alimentados com dieta hiperlipídica adicionado de extrato de bacupari por oito semanas. (A) Grupo controle normal (AIN-93M); (B) grupo controle obeso alimentado com dieta hiperlipídica (HFD); (C) grupo HFD adicionado de extrato de bacupari (BHFD). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste post hoc Newman Keuls a 5% de probabilidade.

N: núcleo do hepatócito; C: citoplasma do hepatócito; G: gota de gordura. Coloração HE. Barra: 100 µm.

10. DISCUSSÃO

O presente estudo investigou o potencial benefício do extrato etanólico da casca de bacupari que contém concentração elevada de 7-epiclusianona e morelloflavona, com efeito anti-obesogênico em ratos Wistar (MOREIRA et al., 2017). Os índices biométricos, modulação da lipogênese e da β -oxidação hepática de ratos Wistar obesos alimentados com dieta hiperlipídica também mostraram o efeito positivo do bacupari.

Verificou-se, neste estudo, que o grupo obeso apresentou maior coeficiente de eficiência alimentar (CEA), confirmando densidade calórica superior e a eficácia em promover o ganho de peso dos animais, com menor consumo alimentar. Em relação ao IMC, de acordo com NOVELLI e colaboradores (2007) e REYNÉS e colaboradores (2014), os animais do grupo HFD podem ser classificados como obesos. No entanto, o

EEB reduziu a eficiência do ganho de peso da dieta hiperlipídica, sendo constatado pelo menor peso final dos animais em relação ao grupo HFD. Nosso grupo de pesquisa, Moreira e colaboradores (2017), também observaram que o EEB adicionado à dieta hiperlipídica de ratos obesos promoveu menor ganho de peso e menor percentual de adiposidade e menor índice glicêmico. O nosso estudo confirma a eficácia do EEB rico em 7-epiclusianona (%) e morelloflavona (%) no controle da obesidade, do IMC e do peso final.

Tem sido demonstrado que a expressão reduzida de ADIPOR2 na DHGNA pode desempenhar papel importante na patogênese da esteatose (SCHNEIDER, 2015). A adiponectina possui mecanismos pelos quais tem demonstrado a redução do acúmulo de lipídios hepático e a sensibilização do ADIPOR2, que ativa o receptor nuclear PPAR- α . A ativação da ligação desse fator de transcrição é considerada como sendo um dos principais reguladores da oxidação de ácidos graxos (GUERRA et al., 2015). O EEB aumentou a expressão gênica de ADIPOR2, PPAR- α , CPT-1 α e os níveis séricos de adiponectina promovendo aumento da oxidação de ácidos graxos e redução do processo inflamatório por meio da indução de adiponectina na regulação da via do PPAR- α , promovendo redução do percentual de gordura hepática e corporal. Assim, o EEB reduziu o peso do fígado, o índice hepatossomático e o percentual de gordura hepática, consequentemente aumentando o percentual de citoplasma. Os valores aumentados do diâmetro do núcleo no controle obeso indicaram hipertrofia da célula devido a ingestão de dieta rica em gordura saturada. Porém, o grupo que recebeu EEB teve como resultado menor diâmetro do núcleo em relação ao controle negativo, demonstrando que a adição do extrato de casca de bacupari foi eficiente em reverter o estado obesogênico, diminuindo o volume do núcleo celular. Assim, a atividade antioxidante dos compostos bioativos do EEB, como a benzofenona 7-epiclusianona (3,6%) e do biflavonóide morelloflavona (14%), foram eficientes na melhoria da morfologia e da função hepática. Estudo prévio do nosso grupo de pesquisa utilizando o mesmo extrato e modelo animal, realizado por Moreira e colaboradores (2017), verificou que o EEB reduziu os níveis séricos de aspartato alanina aminotransferase (ALT), suprimindo o processo inflamatório no fígado. O nosso estudo vem confirmar a redução da lesão hepática, uma vez que o EEB reduziu o grau de esteatose hepática, melhorando a condição fisiopatológica da doença que é caracterizada por inflamação, fibrose, morte celular e resistência à insulina (GARCÍA-RUIZ et al., 2013).

Outros estudos também mostraram efeito positivo de compostos fenólicos na inflamação e na esteatose hepática, utilizando a mesma via de investigação: EMAMAT e colaboradores (2016) em ratos com esteatose hepática tratados com cebola em pó, durante quatro semanas; GUERRA e colaboradores (2015) em camundongos obesos alimentados com dieta hiperlipídica com ingestão diária de 3g/kg de peso corpóreo de extrato aquoso de açaí por doze semanas; LU et al (2015) ao administrar doses de 50, 100 e 200 mg/kg de peso corpóreo de ligustrazine, composto com ação antiinflamatória, em ratos, por quatro semanas; PAN e colaboradores (2014), em ratos obesos tratados com resveratrol administrado via oral (100 mg/kg/dia) por oito semanas e NOH e colaboradores (2010) administrando 150 mg/kg de peso corporeo por dia de extrato de castanha em camundongos tratados com dieta hiperlipidica, no período de onze semanas.

A expressão do gene SREBP-1c também foi reduzida no grupo tratado com EEB, o que nos leva a inferir que pode ter ocorrido uma redução preferencialmente da transcrição de genes envolvidos na síntese de ácido graxo, entre eles a acetil CoA carboxilase (ACC), que converte a acetil CoA em malonil CoA e o ácido graxo sintetase (FAS) que converte a malonil CoA em palmitato (CARVALHEIRA; ZECCHIN & SAAD, 2002). Nosso grupo também observou redução de transcrição de gene envolvidos na síntese de lipídio como o FAS utilizando o EEB (Moreira et al., 2017). Assim, evidencia-se o potencial benefício do EEB na redução da síntese de ácidos graxos e consequente no acúmulo de gordura hepática em animais, com efeito protetor contra a DHGNA, prevenindo os processos inflamatórios e o acúmulo de gordura, ao aumentar as concentrações séricas de adiponectina.

11. CONCLUSÃO

O extrato etanólico da casca de bacupari teve efeito protetor contra a DHGNA, proporcionando aumento na expressão gênica de ADIPOR2 e nos níveis de adiponectina, que reduziu a expressão dos fatores de transcrição de genes adipogênicos e ativaram a β -oxidação, via PPAR- α e CPT-1c, confirmados histologicamente pela redução da gordura e do grau esteatose hepática.

12. REFERÊNCIAS:

ANDRADE, G. et al. The addition of whole soy flour to cafeteria diet reduces metabolic risk markers in wistar rats. **Lipids in Health and Disease**, v.12, n.1, p.145, 2013.

BEDOGNI, G. et al. Prevalence of and risk factors for nonalcoholic fatty liver disease: the Dionysos nutrition and liver study. **Hepatology**, v.42, n.1, p.44-52, 2005.

CARVALHEIRA, José; ZECCHIN, Henrique G.; SAAD, Mario. Vias de Sinalização da Insulina. **Arq Bras Endocrinol Metab**, São Paulo , v.46, n.4, p.419-425, 2002.

CASTRO, A. P. et al. Potent Schistosomicidal Constituents from *Garcinia brasiliensis*. **Planta medica**, v.81, n.09, p.733-741, 2015.

CONTRERAS, Alejandra V.; TORRES, Nimbe; TOVAR, Armando R. PPAR- α as a key nutritional and environmental sensor for metabolic adaptation. **Advances in Nutrition: An International Review Journal**, v.4, n.4, p.439-452, 2013.

DE LA SERRE, C. et al. Propensity to high-fat diet-induced obesity in rats is associated with changes in the gut microbiota and gut inflammation. **American Journal of Physiology**, Gastrointestinal Liver Physiology, v.299 (2), p.G440–G448, 2010.

DRAGANO MYUNG, S. et al. Efficacy of vitamin and antioxidant supplements in prevention of cardiovascular disease: systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. **Bmj**, v.346, p.F10, 2013.

GARCÍA-RUIZ, C. et al. Mitochondrial dysfunction in non-alcoholic fatty liver disease and insulin resistance: cause or consequence? **Free radical research**, v.47, n.11, p.854-868, 2013.

GOMES, M. B. et al. Prevalência de sobrepeso e obesidade em pacientes com diabetes mellitus do tipo 2 no Brasil: estudo multicêntrico nacional. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v.50, n.1, p.136-144, 2006.

GUERRA, C. et al. Dietary açai attenuates hepatic steatosis via adiponectin-mediated effects on lipid metabolism in high-fat diet mice. **Journal of Functional Foods**, v.14, p.192-202, 2015.

INFANTE JANTAN, I.; SAPUTRI, F. C. Benzophenones and xanthenes from *Garcinia cantleyana* var. *cantleyana* and their inhibitory activities on human low-density lipoprotein oxidation and platelet aggregation. **Phytochemistry**, v.80, p.58-63, 2012.

LIM, H. et al. Effects of anti-inflammatory biflavonoid, ginkgetin, on chronic skin inflammation. **Biol. Pharm. Bull.** v.29, p.1046-1049, 2006.

LU, C. et al. Ligustrazine prevents alcohol-induced liver injury by attenuating hepatic steatosis and oxidative stress. **International immunopharmacology**, v.29, n.2, p.613-621, 2015.

MOREIRA, Ana Paula Boroni. Influência da dieta na endotoxemia metabólica. **HU Revista**, v.40, n.3-4, 2015.

MOREIRA, M. E. C. et al. Bacupari peel extracts (*Garcinia brasiliensis*) reduce high-fat diet-induced obesity in rats. **Journal of Functional Foods**, v.29, p.143-153, 2017.

NOH, J. R. et al. Chestnut (*Castanea crenata*) inner shell extract inhibits development of hepatic steatosis in C57BL/6 mice fed a high-fat diet. **Food chemistry**, v.121, n.2, p.437-442, 2010.

NOVELLI, E. L. B. et al. Anthropometrical parameters and markers of obesity in rats. **Laboratory Animals**, v.41, n.1, p.111-119, 2007.

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

REYNÉS, B. et al. Reversion to a control balanced diet is able to restore body weight and to recover altered metabolic parameters in adult rats long-term fed on a cafeteria diet. **Food Research International**, v.64, p.839-848, 2014.

ROLO, A. P.; TEODORO, J.S.; PALMEIRA, C.M. Role of oxidative stress in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. **Free Radical Biology and Medicine**, v.52, n.1, p.59-69, 2012.

SAMPEY et al. Cafeteria diet is a robust model of human metabolic syndrome with liver and adipose inflammation: comparison to high-fat diet. **Obesity** (Silver Spring), v.19, p.1109 – 1117, 2011.

SANTA-CECÍLIA, F. V. **Efeito antinociceptivo e antiinflamatório do extrato etanólico e da benzofenona 7-epiclusianona isolada de folhas de *Garcinia brasiliensis* Mart.(Clusiaceae)**. 2011. 121 f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2011.

_____. et al. Anti-inflammatory and antinociceptive effects of *Garcinia brasiliensis*. **Journal of ethnopharmacology**, v.133, n.2, p.467-473, 2011.

_____ et al. 7-Epiclusianone, the Natural Prenylated Benzophenone, Inhibits Superoxide Anions in the Neutrophil Respiratory Burst. **Journal of Medicinal Food**, v.15, p.200-205, 2012.

SCHNEIDER, A.C. R. **Alterações hepáticas causadas pelo etanol e efeito do tratamento com *Lactobacillus rhamnosus* GG em zebrafish (*Danio rerio*)**. 2015. 103 f. Tese (Doutorado em Gastroenterologia e Hepatologia) - Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2015.

SHIMOMURA, I.; BASHMAKOV, Y.; HORTON, J. D. Increased levels of nuclear SREBP-1c associated with fatty livers in two mouse models of diabetes mellitus. **The Journal of Biological Chemistry**, v.274 (42), p.30028–30032, 1999.

TEKELESELASSIE, A. W. et al. High-Fat Diet Enriched with Low Omega-6 to Omega-3 Fatty Acid Ratio Reduced Fat Cellularity and Plasma Leptin Concentration in Sprague-Dawley Rats. **The Scientific World Journal**, v.2013, p.1-7, 2013.

TINKOV, A. et al. Adipose tissue chromium and vanadium disbalance in high-fat fed Wistar rats. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v.29, p.176-181, 2015.

XU, A. et al. The fat-derived hormone adiponectin alleviates alcoholic and nonalcoholic fatty liver diseases in mice. **The Journal of Clinical Investigation**, v.112(1), p.91–100, 2003.

WANG, B. et al. Resveratrol prevents suppression of regulatory T-cell production, oxidative stress, and inflammation of mice prone or resistant to high-fat diet–induced obesity. **Nutrition research**, v.33, n.11, p.971-981, 2013.

YAMAUCHI, T.; KADOWAKI, T. Physiological and pathophysiological roles of adiponectin and adiponectin receptors in the integrated regulation of metabolic and cardiovascular diseases. **International journal of obesity**, v.32, p.S13-S18, 2008.

YANG, Y. et al. Anthocyanin Extract from Black Rice Significantly Ameliorates Platelet Hyperactivity and Hypertriglyceridemia in Dyslipidemic Rats Induced by High Fat Diets. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.59, n.12, p.6759-6764, 2011.

13. ARTIGO 2

Extrato de bacupari (*Garcinia brasiliensis*) modula a microbiota intestinal, reduz o estresse oxidativo e a inflamação

Resumo

O objetivo desse estudo foi avaliar o efeito do extrato etanólico da casca de bacupari (EEB) no estresse oxidativo, na modulação da inflamação, na abundância da microbiota intestinal e na concentração de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) em ratos Wistar obesos. Ratos machos adultos após oito semanas de indução de obesidade com dieta hiperlipídica foram divididos em dois grupos: grupo com dieta hiperlipídica (HFD), controle obeso, e grupo com dieta HFD acrescida de EEB (BHFD) na concentração de 300 mg por animal/dia (42 mg de 7-epiclusianona e 10,76 mg de morelloflavona). Um grupo controle normal foi mantido durante todo experimento alimentado com dieta AIN-93M por quinze semanas. Os animais tratados com EEB apresentaram redução ($p<0,05$) na abundância do filo *Firmicutes* e *Proteobacterias* e aumento ($p<0,05$) da concentração do ácido propiônico. O EEB também reduziu ($p<0,05$) a concentração de resistina e o fator de transcrição nuclear kappa B (NFκB). A concentração de malondialdeído, óxido nítrico e superóxido dismutase foram menores e a expressão de HSP72 e catalase aumentadas e a glutathione transferase inalterada no grupo BHFD ($p<0,05$). O presente estudo demonstrou que o EEB exerceu efeito protetor na modulação positiva da microbiota intestinal, no estresse oxidativo e na inflamação em ratos obesos alimentados com dieta hiperlipídica.

Palavras chaves: estresse oxidativo; resistina; inflamação, antioxidante.

14. INTRODUÇÃO

A obesidade é uma doença crônica caracterizada pelo acúmulo excessivo de gordura corporal, podendo acarretar várias implicações à saúde a médio e longo prazo. Estudos têm relatado que as mudanças na composição da microbiota intestinal contribuem para o controle do ganho de peso, o desenvolvimento da obesidade e distúrbios metabólicos relacionados (MACHADO & CORTEZ, 2012, FRAZIER; DIBASE & MCCLAIN, 2011; LYRA et al., 2010). Os distúrbios metabólicos relacionados à disbiose intestinal têm demonstrado promover inflamação sistêmica subclínica de baixo grau, que leva a alterações na permeabilidade intestinal e na produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), aumentando o estresse oxidativo, inflamação e homeostase energética do indivíduos (PARK et al., 2013).

Um grande número de bactérias gram negativas e o aumento da permeabilidade intestinal em obesos, favorecem a ocorrência de endotoxemia metabólica, caracterizada por um aumento da concentração de lipopolissacarídeo (LPS) na corrente sanguínea. A endotoxemia leva à inflamação de baixo grau, resistência à insulina e hiperplasia de adipócitos (KRAJMALNIK-BROWN et al., 2012; BRUN et al., 2007).

O consumo de dieta rica em gordura promove o crescimento de bactérias patogênicas que são gram negativas, produtoras de endotoxinas e também são capazes de reduzir os sulfatos para H_2S , danificando a barreira intestinal e promovendo a inflamação (ZHANG et al., 2010; CANI et al., 2008). A maioria dos estudos sugere que a dieta rica em gordura pode prejudicar a microbiota intestinal, aumentando a proporção *Firmicutes* e redução de *Bacteroidetes* à obesidade geneticamente induzida (HILDEBRANDT et al., 2009; TURNBAUGH et al., 2008).

A obesidade está diretamente relacionada com o aumento da massa gorda, que conduz a infiltração de macrófagos no tecido adiposo e à produção de citocinas pró-inflamatórias, juntamente com a diminuição de citocinas anti-inflamatórias e ativação e sinalização de vias inflamatórias como o $NF\kappa B$. A desregulação de adipocina e o aumento de infiltrados inflamatórios no tecido adiposo resultam na inflamação crônica e no estresse oxidativo (LIN et al., 2013; PARK et al., 2012).

A situação estressante no organismo implica em uma rápida transcrição e posterior tradução de uma série de proteínas altamente conservadas, denominadas “proteínas do estresse” (HSP) (LOCKE et al., 1990, MAYER; BUKAU, 2005). A

HSP72 é a primeira proteína a ser induzida rapidamente durante o estresse e tem funções citoprotetora e anti-inflamatória (DRUMMOND, 2013).

Além da defesa das HSP, temos as enzimas Catalase (CAT) e Superóxido Dismutase (SOD) como primeira linha de defesa do organismo contra o estresse oxidativo, atuando no combate ao estresse oxidativo, a fim de manter o equilíbrio redox do organismo (BARBOSA et al., 2010). Portanto, como tentativa de manter o estado de homeostasia, o organismo tende a aumentar suas linhas de defesa, podendo potencializar a síntese de proteínas do estresse, acompanhadas por um aumento da atividade das enzimas antioxidantes.

As alterações metabólicas e funcionais encontradas em regiões de inflamações crônicas associadas à obesidade conduzem a ativação e fosforilação das quinases serina/treonina, que ativam o fator de inibição nuclear kappa B (IKK) e jun N-terminal quinase (JNK). O IKK ativa o NFκB, e este aumenta a produção de citocinas inflamatórias incluindo o TNF-α, a interleucina-6 (IL-6), a interleucina 1β (IL-1β), a interleucina 8 (IL-8), a ciclooxygenase-2 (COX-2), quimiocinas, como a proteína quimiotática de monócito 1 (MCP-1) e a síntese de óxido nítrico (iNOS) (LAPPAS et al., 2005; BARNES et al., 1997).

Estudos para qualificar e determinar as fontes de antioxidantes naturais mostram que a ingestão de alimentos ou extratos naturais ricos em antioxidantes reduzem a inflamação e o estresse oxidativo (MORAES et al., 2012; NAIR et al., 2014). Espécies da *Garcinia* têm sido utilizada na medicina popular brasileira, pois é rica em inúmeros derivados do fenol, incluindo as benzofenonas. Alguns dos compostos presentes nestas espécies têm atividade biológica como, antifúngicos, anti-inflamatórios, anti-tumurais e propriedades antioxidantes, sendo que uma variedade de compostos, principalmente benzofenonas, flavonoides e xantonas foram isolados a partir da família Guttiferae (MARTINS et al., 2008; SANTA-CECÍLIA, 2011). O nosso grupo de pesquisa identificou que o extrato de bacupari foi capaz de reduzir a obesidade de ratos tratados com dieta hiperlipídica em função da composição do extrato, como por exemplo, os compostos bioativos morelloflavona da classe dos flavonoides e 7-epiclusianona das benzofenonas (MOREIRA et al.). Em continuidade a este trabalho o objetivo deste estudo foi avaliar se o extrato de bacupari pode modular a composição da microbiota intestinal, o estresse oxidativo e a inflamação de ratos obesos alimentados com dieta hiperlipídica.

15. MATERIAS E MÉTODOS

15.1. Coleta do material vegetal

Os frutos de *G. brasiliensis* foram coletados em fevereiro de 2011 na região de Viçosa, Minas Gerais, Brasil (latitude 20° 45' 14'' sul e longitude 42° 52' 55'' oeste). A identificação botânica foi realizada no Horto Botânico da Universidade Federal de Viçosa, pelo Dr. João Augusto Alves Meira Neto. A espécie encontra-se catalogada pela exsicata sob o número VIC2604, depositada no Herbário da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, Brasil.

15.2. Preparo dos extratos

Os epicarpes de *G. brasiliensis* foram secos em estufa com circulação de ar a uma temperatura de 40°C durante 8 dias com monitoramento de umidade. Após a secagem completa, o material foi pulverizado em moinho de facas e posteriormente foi submetido à extração exaustiva em extrator Soxhlet utilizando o etanol como solvente. A seguir o extrato foi filtrado à pressão reduzida, obtendo-se o extrato etanólico (CASTRO et al., 2015).

15.3. Ensaio biológico

Animais / Dietas

Foram utilizados 24 ratos machos recém-desmamados com 21 dias de idade (*Rattus norvegicus*, variedade albinus, classe Rodentia), linhagem Wistar, provenientes do Biotério Central do Centro de Ciências Biológicas e de Saúde da UFV. Até o 60º dia de idade, fase adulta, os animais ficaram mantidos em caixas de polietileno, consumindo ração comercial (Presence/InVivo® Nutrição Animal) e água destilada *ad libitum*. A temperatura da sala de experimentação foi controlada em 22 ± 3°C, com ciclo claro/escuro de 12 horas. No 61º dia os animais foram alocados em gaiolas individuais, de aço inoxidável e divididos em dois grupos de forma sistemática, de modo que não houvesse diferença maior que 5,0 g entre as médias dos pesos dos grupos, atendendo à recomendação da AOAC (1997). Os animais do grupo controle normal (n=8) receberam dieta AIN-93M (REEVES; NIELSEN; FAHEY JR., 1993), e os outros animais (n=16) receberam dieta hiperlipídica (HFD) (40% de banha animal) e água destilada *ad libitum*,

segundo a formulação da RESEARCH DIETS® (2006), para indução de obesidade (SAMPEY et al., 2011), por 49 dias . Após a indução da obesidade o grupo controle AIN-93M foi mantido e os animais obesos (n=16) foram realocados, de forma que apresentassem as medidas biométricas semelhantes em dois grupos: o grupo controle obeso (HFD) e o grupo obeso que recebeu HFD adicionada de extrato de bacupari (BHFD) na dose de 300 mg por animal/dia. A dose foi calculada para oferecer aos animais 42 mg/animal/dia de 7- epiclusianona e 10,76 mg/animal/dia de moreloflavona por gramas de extrato de acordo com MOREIRA e colaboradores (2017) onde a concentração encontra em HPLC foi de 140 mg de 7-epiclusianona e 35,86 mg de moreloflavona (MOREIRA et al., 2017). Ao final do experimento, os ratos ficaram em jejum por 12 horas e foram anestesiados com isoflurano 100% (Isoforine, Cristália®) e o sangue foram coletados por punção cardíaca. O sangue foi centrifugado sob refrigeração por 10 minutos a 1009 xg, para obtenção de soro. Os fígados foram retirados e em seguida, armazenados a -80° C.

A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética no uso de animais da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais. Protocolo número: 98/2015.

15.4. Análise da microbiota intestinal a partir do DNA fecal

As análises de RT-qPCR foram realizadas em um sistema de detecção de sequência CFX96 Touch (BioRad,Berkeley,Califórnia) (Primer Express software). O DNA microbiano foi extraído de amostras fecais dos ratos utilizando o mini kit QIAamp DNA stool (Qiagen, Valencia, CA, USA) seguindo as instruções do fabricante. Todas as análises foram realizadas em duplicata utilizando SYBR® Green PCR Master Mix (Promega, Madison, EUA) contendo em cada poço 2 µL de amostra ou padrão, iniciadores senso e anti-senso na concentrações de 300 nM e água livre de nucleases para um total de 25 µL. As condições térmicas do ciclo de PCR utilizadas foram as seguintes: uma desnaturação inicial do DNA a 95° C durante 10 minutos, seguido por 40 ciclos de desnaturação a 95° C durante 10 segundos, anelamento do iniciador à temperatura ótima de 60°C durante 20 segundos e extensão a 72° C durante 15 segundos. Uma análise da curva de *melting* após amplificação foi realizada para garantir a qualidade e especificidade da PCR.

As concentrações das bactérias por amostra fecal foram feitas por comparação dos valores de Ct obtidos pelas curvas - padrão a partir do software Primer Express.

Foram construídas as curvas padrão para cada experimento utilizando diluições seriadas de cinco vezes de DNA genômico bacteriano (concentrações conhecidas) de culturas puras variando de 20 ng a 0,032 ng do gene 16S rRNA. As diferentes cepas utilizadas foram obtidas da *American Type Culture Collection* e da Coleção de Culturas Tropical (UFV H2b20 CCT 3744). Para a caracterização das bactérias totais (16S) e do filo proteobactérias, foi utilizada a bactéria *Escherichia Coli*, para o filo Firmicutes, a bactéria *Lactobacillus delbrueckii* e para o filo dos Bacteroidetes a bactéria *Bacteroides Ovatus*. Foram utilizados as sequencias de oligonucleotídeos (Alpha e diagnósticos moleculares LTDA) para avaliar as bactérias totais :senso 5'-GCA GGC CTA ACA CAT GCA AGT C -3' e anti-senso 5'- CTG CTG CCT CCC GTA GGA GT – 3'), *Bacteriodetes* : senso 5'- CAT GTG GTT TAA TTC GAT GAT- 3' anti-senso 5'- AGC TGA CGA CAA CCA TGC AG – 3'), *Firmicutes* 5'-ATG TGG TTT AAT TCG AAG CA 3' e anti-senso 5'- AGC TGA CGA CAA CCA TGC AC-3'), *Proteobactéria* : senso (5'-CAT GAC GTT ACC CCG CAG AAG AAG- 3'e anti-senso 5'CTC TAC GAG ACT CAA GCT TGC 3').

15.5. Determinação dos Ácidos orgânicos

Foram diluídos 300 mg de amostras de fezes para 2,5 ml de água, centrifugadas (12 000 xg, 10 minutos) e os sobrenadantes isentos de células foram tratados como descrito por SIEGFRIED e colaboradores (1984). As concentrações de ácidos orgânicos (acético, propiônico e n-butírico) foram determinadas por HPLC num Dionex Ultimate 3000 Detector duplo HPLC (Dionex Corporation, Sunnyvale, CA, EUA) acoplado a um índice de refração (RI) Shodex RI-101, utilizando uma coluna Bio-Rad HPX-87H, 300 mm x 4,6 mm mantido a 45°C. A fase móvel foi preparada com 5 mmol/L de ácido sulfúrico (H₂SO₄) e o fluxo foi de 0,7 mL / min. Os seguintes ácidos orgânicos foram utilizados para a calibração da curva padrão: acético, succínico, fórmico, propiônico, valérico, isovalérico, isobutírico e butírico. Todos os ácidos foram preparados na concentração final de 10 mmol, exceto os ácidos isovalérico (5 mmol/L) e acético (20 mmol/L).

15.6. Análises do estresse oxidativo e das defesas antioxidantes no tecido hepático

O estresse oxidativo em nível hepático foi determinado em homogeneizado de fígado por meio das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e concentrações de óxido nítrico (ON) (BUEGE; AUST, 1978; GREEN et al., 1982). A atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase e glutathione-S transferase (GST) foi determinada em tecido hepático segundo métodos descritos por MARKLUND (1985), AEBI (1984) e HABIG (1996), respectivamente. As concentrações de proteínas nos homogeneizados de fígado foram quantificadas segundo o método de BRADFORD (1976).

15.7. Extração de RNA, Síntese de cDNA e PCR em tempo real

A extração total de mRNA foi realizada no fígado, utilizando reagente trizol (Invitrogen, CA, EUA). A integridade do RNA foi avaliada, por eletroforese em gel de agarose a 1% e a quantificação feita em espectrofotômetro (Multiskan GO Thermo Cientific).

O mRNA isolado foi usado para sintetizar o cDNA utilizando kit de transcrição Reversa (M-MLV Invitrogen Corp, Grand Island, NY) de acordo com o protocolo do fabricante. A expressão dos níveis de mRNA foi realizada pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real (RT-PCR) com SYBR green fast PCR master mix da Applied Biosystems (Foster City, CA) com volume de reação de 10 µL e todos os oligonucleotídeos utilizados na concentração final de 100 nmol/L. Para a quantificação no equipamento AB StepOne Real Time PCR System, utilizou-se o sistema de quantificação por fluorescência SYBR-Green e o Primer Express software (Applied Biosystems, Foster City, CA). O ciclo da PCR envolveu a desnaturação a 95°C (20seg), 40 ciclos de 95°C por 3 segundos e 60 °C por 30 segundos, seguidos da curva padrão de dissociação. Os dados de PCR real time foram analisados pelo método de $2^{-\Delta\Delta CT}$ (LIVAC, 2001).

Foram utilizados as sequências de oligonucleotídeos (Sigma- Aldrich®) senso e anti-senso; relacionado ao estresse oxidativo: fator nuclear kappa B (NFκB) (senso: 5'-CTG CGC GCT GAC GGC -3; anti-senso: 5'- TCG TCG TCT GCC ATG TTG AA-3'), proteína do choque térmico (HSP72) (senso: 5'- AGG CCA ACA AGA TCA CCA

TC- 3'; anti-senso: 5'- TAG GAC TCG AGC GCA ATT CTT - 3') e (SOD) (senso: 5'- GAG CAG AAG GCA AGC GGT GAA - 3'; anti-senso: 5'- CCA CAT TGC CCA GGT CTG - 3'. A expressão relativa dos níveis de mRNA foi normalizada pelo controle endógeno GAPDH (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase) (senso: 5'- AGG TTG TCT CCT GTC ACT TC- 3'; anti-senso: 5'- CTG TTG CTG TAG CCA TAT TC- 3') para ratos. Utilizou-se os valores do grupo controle normal como padrão.

15.8. Análise de *western blotting*

O tecido hepático foi homogeneizado, para a separação das proteínas da fração nuclear e citoplasmática. Foi utilizado o *Kit NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents* (Thermo Scientific Fisher) de acordo com as instruções do fabricante. As quantidades conhecidas (15 µg) de proteína das amostras (fração nuclear e citoplasmática) e 5 µL do padrão de referência (Broad Range Markers – Santa Cruz Biotechnology) foram separadas por eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida (PAGE) e eletrotransferidas para membrana de Fluoreto Polivinidileno (PVDF) (BioRad®). As membranas foram bloqueadas com solução de bloqueio a 5% (Blotting-grade blocker, BioRad) e foram incubadas sob agitação *overnight* com o anticorpo primário monoclonal anti-NFκB-p65 (65 kDa) (ab13594; Abcam, Cambridge, Reino Unido). As membranas passaram pelo processo de várias lavagens com 15µL de TBS 1x, foram incubadas com o anticorpo secundário conjugado a *horseradish peroxidase* (HRP) (A-9044, Sigma-Aldrich Brasil Ltda.) durante 2 horas a 4° C. A detecção das bandas foram realizadas com tetracloridrato de 3,3-diaminobenzidina.

15.9. Quantificação de resistina plasmática

Foi realizada a análise de concentração sérica de resistina utilizando o Kit: Resistin, (SE A847 RA, USCV, USA), seguindo as instruções do fabricante. A placa de microtitulação. Foi revestida com um anticorpo específico para resistina. Os padrões e as amostras foram adicionados aos poços da placa de ELISA apropriada com um anticorpo conjugado com biotina específico para resistina.

15.10. Análises estatísticas

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de média Newman Keuls. Foi adotado o nível de significância menor que 5%. Todas as análises estatísticas foram realizadas pelo programa GraphPad Prism versão 6.01.

16. RESULTADOS

O extrato de bacupari adicionado a dieta hiperlipídica (HFD) proporcionou um consumo do composto 7-epiclusianona, na proporção de $41,38 \pm 2,4$ mg/animal/dia e de morelloflavona de $10,60 \pm 0,55$ mg/animal/dia (MOREIRA et al., 2017).

16.1. Efeito do extrato de bacupari na microbiota intestinal e nos ácidos orgânicos

A abundância das bactérias do filo *Bacteroidetes* foi maior ($p < 0,05$) no grupo BHFD, enquanto nos filos *Firmicutes* e *Proteobactérias* foram menores ($p < 0,05$) em relação aos grupos controles obeso e normal (Fig. 1A-C). A produção de ácido propiônico foi maior ($p < 0,05$) no grupo tratado EEB em relação aos grupos controles (Fig. 1.F). A concentração de ácido acético e ácido butírico não diferiu entre os grupos experimentais (Fig. 1 D-E).

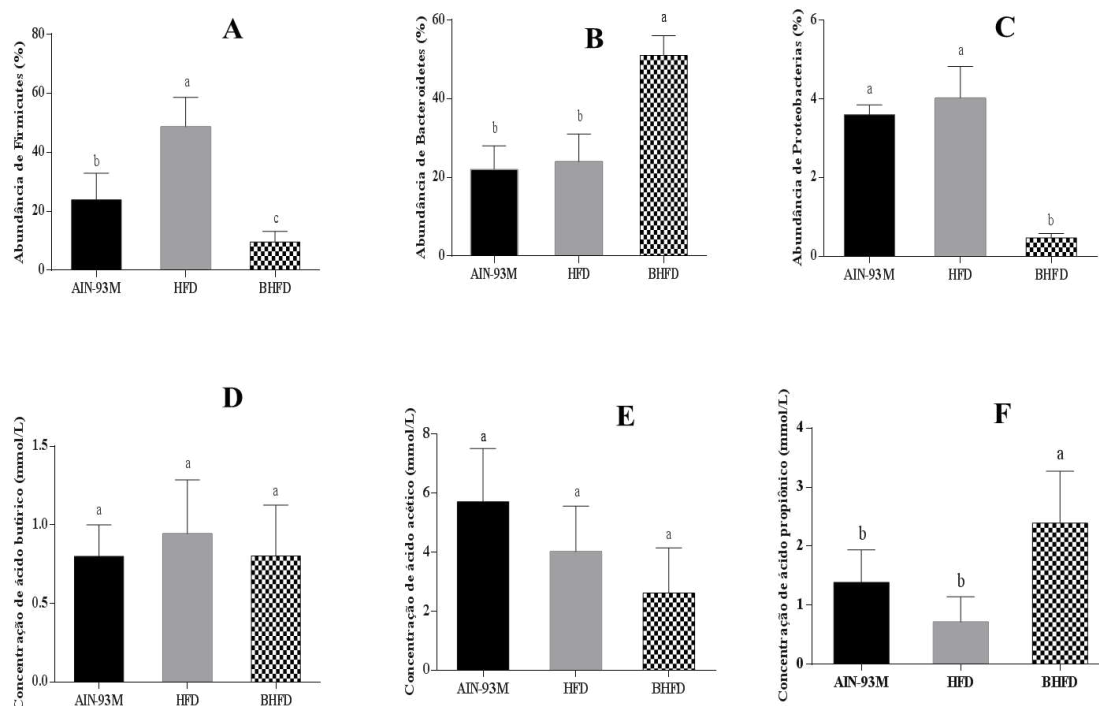


Figura 1: Abundância das bactérias dos filos *Firmicutes*, *Bacteroidetes* e *Proteobactérias* e concentração dos ácidos graxos de cadeia curta (AGCC): butírico, acético e propiônico em ratos obesos alimentados com dieta hiperlipídica adicionado de extrato de bacupari por oito semanas. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste post hoc Newman Keuls a 5% de probabilidade. Grupo controle normal (AIN-93M); grupo controle obeso alimentado com dieta hiperlipídica (HFD); HFD adicionado de extrato de bacupari (BHFD).

16.2. Efeito do extrato etanólico de bacupari no estresse oxidativo

O extrato de bacupari no grupo BHFD reduziu ($p < 0,05$) as concentrações de malondialdeído (MDA) e de óxido nítrico (ON) hepáticos em relação ao grupo de animais obesos (Fig.2 A-B).

A expressão gênica da enzima superóxido dismutase (SOD) foi maior nos grupos controle obeso e no grupo tratado com o extrato de bacupari ($p < 0,05$) (1,78 e 2,44 vezes, respectivamente) em relação ao grupo controle normal (Fig. 2 C). Porém a atividade da enzima SOD no fígado de ratos obesos tratados BHFD diminuiu ($p < 0,05$) em relação ao grupo HFD equiparando ao AIN-93M (Fig. 2D). A expressão gênica da proteína do choque térmico (HSP72; Fig 2E) e a atividade hepática da enzima catalase (CAT; Fig 2F) foi maior no grupo tratado com extrato de bacupari ($p < 0,05$) comparado ao controle obeso, enquanto a glutathione transferase (GST) não alterou ($p > 0,05$) sua

atividade no BHFD em relação ao grupo HFD e aumentou ($p<0,05$) em relação ao controle normal (Fig.2G).

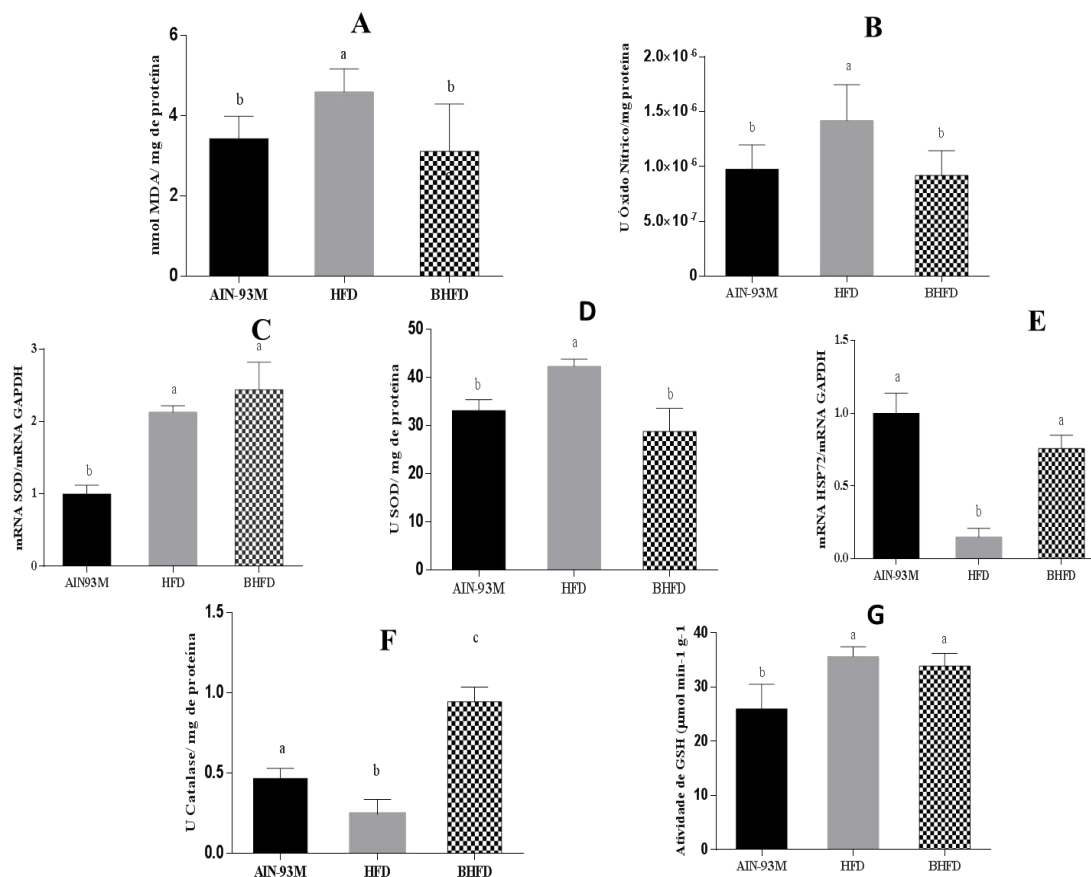


Figura 2: Concentrações de Malondialdeído (MDA), Óxido Nítrico (ON), Superóxido Dismutase (SOD), Catalase (CAT) e Glutathione Transferase (GSH) e expressão gênica relativa da SOD e da proteína do choque térmico (HSP72) em ratos obesos alimentados com dieta hiperlipídica adicionado de extrato de bacupari por oito semanas. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste post hoc Newman Keuls a 5% de probabilidade. Grupo controle normal (AIN-93M); grupo controle obeso alimentado com dieta hiperlipídica (HFD); HFD adicionado de extrato de bacupari (BHFD).

16.3. Efeito do extrato de bacupari na inflamação

A resistina é uma citocina pró-inflamatória que ativa a via de sinalização do NFκB (WU et al., 2007). O grupo HFD tratado com extrato de bacupari reduziu ($p<0,05$) a concentração de resistina no soro em relação ao grupo controle obeso, equiparando-a ao controle normal (Fig. 3C).

O fator nuclear Kappa B (NFκB), tem como função a codificação de proteínas envolvidas na resposta inflamatória (BASTOS; ROGER; ARÊAS, 2009). O grupo

controle obeso apresentou maior ($p<0,05$) expressão gênica (1,41 vezes) do gene NF κ B, enquanto o grupo tratado com o EEB reduziu ($p<0,05$) a expressão gênica (0,82 vezes) em relação ao grupo controle normal (Fig. 3A). Em relação à identificação da proteína NF κ B, a banda presente no grupo que recebeu a dieta HFD com EEB apresentou intensidade menor ($p<0,05$) em relação ao controle obeso (Fig. 3B).

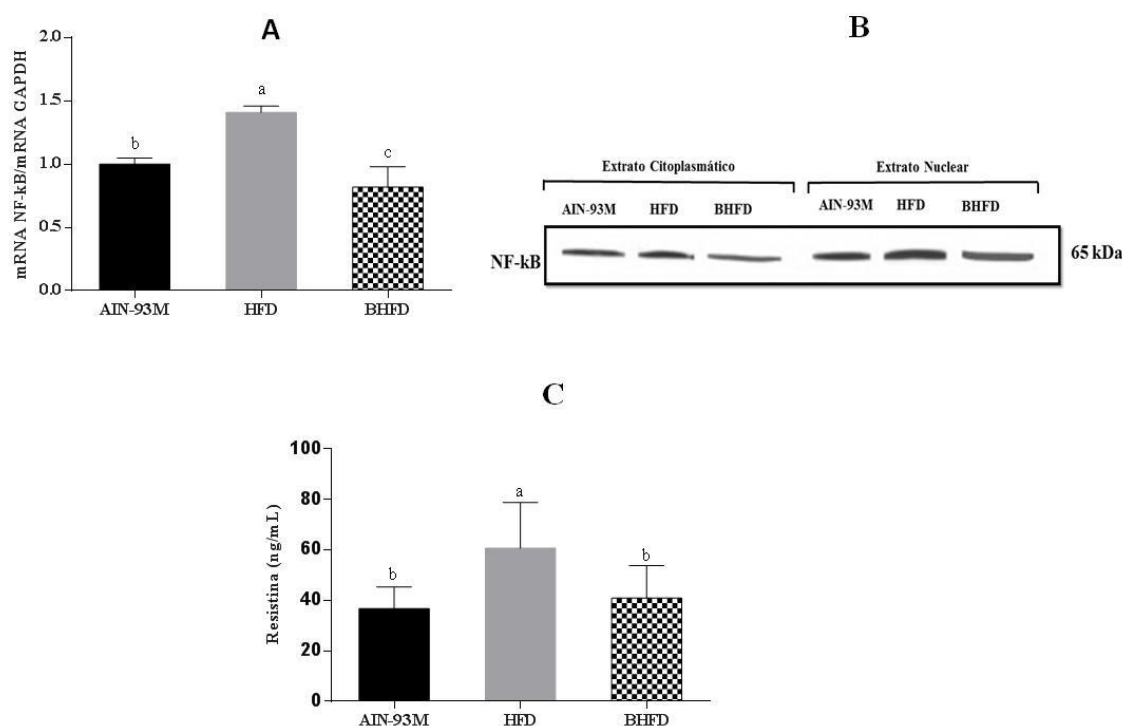


Figura 3: Expressão gênica relativa do Fator Nuclear Kappa B (NF κ B) (A), análise qualitativa da proteína NF κ B (B) e quantificação de resistina (C) de ratos obesos alimentados com dieta hiperlipídica adicionado de extrato de bacupari por oito semanas. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste post hoc Newman Keuls a 5% de probabilidade. Grupo controle normal (AIN-93M); grupo controle obeso alimentado com dieta hiperlipídica (HFD); HFD adicionado de extrato de bacupari (BHFD).

17. DISCUSSÃO

O presente estudo investigou o potencial benefício do extrato etanólico da casca de bacupari, que contém elevada concentração de 7-epiclusianona e morelloflavona, com efeito anti-obesogênico em ratos Wistar (MOREIRA et al., 2017) em modular a composição da microbiota intestinal, o estresse oxidativo e a inflamação de ratos obesos alimentados com dieta hiperlipídica.

A dieta hiperlipídica possui grande capacidade de modulação da microbiota intestinal, influenciando assim a obesidade por mecanismos de indução da inflamação

sistêmica mediada por lipopolissacarídeos (LPS). Os LPS são derivados da parede celular de bactérias gram-negativas presentes no lume intestinal e normalmente estão presentes em baixas concentrações no sangue de indivíduos saudáveis. Quando em níveis aumentados, elas são responsáveis pela inflamação de baixo grau, resistência insulínica, hiperplasia adipocitária e diminuição da função das células beta-pancreáticas. (KRAJMALNIK-BROWN et al., 2012). De acordo com BRUN e colaboradores (2007) a microbiota intestinal presente em obesos pode favorecer o aumento da permeabilidade intestinal e, com isso, contribuir para o aumento dos níveis sistêmicos de endotoxinas.

No presente estudo, a redução da abundância intestinal do filo *Firmicutes* e o aumento de *Bacteroidetes* pelo EEB, pode ser atribuído à presença de compostos fenólicos no extrato de bacupari observado em nosso grupo de pesquisa (MOREIRA et al., 2017). Estudos revelam que a microbiota intestinal transforma compostos fenólicos em metabólitos bioativos contribuindo para a manutenção da homeostase intestinal estimulando o crescimento de bactérias benéficas (*Lactobacillus* spp. e *Bifidobacterium* spp.) e inibindo as bactérias patogênicas, exercendo um efeito prebiótico (DUEÑAS et al., 2015; GUGLIELMETTI et al., 2013; PARKAR; TROWER & STEVENSON, 2013).

A redução da abundância intestinal do filo *Firmicutes* e o aumento de *Bacteroidetes* pelo EEB também pode estar relacionado com a redução da gordura corporal constatada pelo Índice de Lee observado por MOREIRA e colaboradores (2017) em ratos obesos utilizando o mesmo EEB nas mesmas condições experimentais. Nossos resultados corroboram com vários estudos que relatam que animais obesos apresentam maior abundância do filo *Firmicutes*, ao passo que o filo *Bacteroidetes* são associados à magreza (MORAES et al., 2014; TAGLIABUE e ELLI, 2013; TURNBAUGH et al., 2008; LEY et al., 2005).

A obesidade está associada com alterações na composição da microbiota intestinal em nível de filo, gênero ou espécie (EVERARD; CANI, 2013). A composição da microbiota de obesos é ainda questionável, sendo necessário mais evidências científicas para elucidar a relação entre a composição da microbiota intestinal com o desenvolvimento da obesidade e alterações metabólicas. A modulação da microbiota intestinal a partir da dieta saudável está associada a um melhor estado de saúde do indivíduo e à redução dos riscos de obesidade e outras doenças associadas (GROOTAERT et al., 2011).

No presente estudo foi encontrado o aumento da concentração do ácido propiônico no grupo tratado com EEB, que promoveu maior crescimento do filo *Bacteroidetes*. O estudo anterior (MOREIRA et al., 2017), demonstrou que o EEB reduziu o ganho de peso e o índice de adiposidade, o que está de acordo com Shoaie et al., (2013) que relata que o ácido propiônico regula o armazenamento de tecido adiposo. Os flavonóides presentes no EEB provavelmente estimularam a produção do ácido graxo de cadeia curta (AGCC), como os ácido propiônico, pelas bactérias (PARKAR; TROWER; STEVENSON, 2013). Estes ácidos podem interferir na absorção dos produtos finais da digestão e na homeostase energética do hospedeiro (PARK et al., 2013).

O filo *Firmicutes* tem como seu principal substrato o butirato, onde os níveis desse ácidos graxos podem ser influenciados por mudanças na dieta, sendo que altos teores de carboidratos não digeríveis aumentam os seus níveis plasmáticos (SHOAIE et al., 2013; GAO et al., 2009). No entanto, não foi observado no grupo controle obeso, que apresentou maior abundância do filo *Firmicutes*, maior produção de butirato. Tal fato pode ter ocorrido em função da homogenia de carboidratos e fibras alimentares nas dietas experimentais.

O EEB promoveu redução da concentração de MDA e SOD e o aumento da concentração da catalase. É provável que a redução da concentração da SOD seja devido à presença dos compostos bioativos, como 7-epiclusianona e morelloflavona no EEB, que estaria atuando como defesa antioxidante em conjunto com a SOD. Assim, não foi necessário o aumento enzimático da primeira linha de defesa antioxidante, como a SOD e a glutathione transferase. Gontijo e colaboradores (2013) constatou o efeito antioxidante da morelloflavona presente no extrato de acetato de etila da casca de *Garcinia Brasiliensis* pela atividade sequestrante de radicais livres DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo). No estudo de POSUWAN e colaboradores (2013), ao suplementar ratos diabéticos obesos com óleo de farelo de *riceberry* (arroz roxo enriquecido com antioxidantes lipídicos) nas concentrações de 5, 7,5 e 15% por 12 semanas, obteve-se que todos os grupo tratados com *riceberry* reduziram significativamente o MDA e restauraram a superóxido dismutase, a catalase e a glutathione peroxidase hepática em relação ao grupo tratado com dieta hiperlipídica. Estudo recente do nosso grupo (MOREIRA et al., 2017) observou o aumento da atividade antioxidante total do plasma dos animais obesos tratados com EEB, empoderando que este efeito seja devido a composição do extrato em 7-epiclusianona e morelloflavona. Esses resultados sugerem

uma ação direta dos antioxidantes não enzimáticos presentes no EEB, que provavelmente funcionaram como sequestrantes de radicais, demonstrando o efeito sinérgico desses componentes alimentares com os sistemas antioxidantes endógenos na promoção do reequilíbrio redox celular de animais obesos.

Recentemente foi descoberto que a família da chaperona HSP70 é necessária para a degradação da p65 inibindo assim a via de sinalização do NFκB (TANAKA et al., 2014). Portanto, a indução de proteínas de choque térmico, HSP70, pode diminuir a inflamação e a resistência à insulina na obesidade e diabetes melittus tipo 2 (HOOPER; HOOPER, 2009; SIMAR et al., 2012). A HSP72 é a primeira linha das proteínas HSP70 induzida rapidamente durante o estresse apresentando funções citoprotetora e anti-inflamatória (DRUMMOND, 2013).

Sabe-se que dieta hiperlipídica, contendo ácidos graxos saturados ativa a via de sinalização do NFκB. Esses ácidos graxos podem se ligar ao receptor do tipo Toll (TLR-4), aumentando o fator de necrose tumoral alfa (TNF-α), ativando o NFκB (NAVARRO et al., 2016; CANCELLO, CLÉMENT, 2006) levando a uma inflamação sistêmica. Em nosso estudo houve aumento da expressão da HSP72 no grupo tratado com extrato de bacupari em relação ao grupo obeso, que inibiu NFκB e diminuiu a concentração de resistina, demonstrando efeito protetor ao combate a inflamação e ao estresse oxidativo. No estudo de Santa-Cecília e colaboradores (2011), o extrato etanólico da casca de bacupari administrados a ratos wistar demonstrou a ação antiinflamatória e antinociceptiva, ao administrar doses de 30-300 mg/kg de peso corpóreo. Días, Farías & Marin (2014) também observaram que os flavonóides (curcumina, resveratrol e quercetina), apresentaram efeito antiinflamatório, reduzindo as citocinas IL-6, IL-1β, IL-8 e MCP-1.

18. CONCLUSÃO

Esse estudo indica o potencial efeito protetor dos compostos bioativos presentes no EEB na melhoria da disbiose intestinal, na inflamação e no estresse oxidativo em ratos obesos alimentados com dieta hiperlipídica. O extrato etanólico da casca de bacupari (EEB) aumentou a razão dos filos *Bacteroidetes/Firmicutes*. Este efeito foi acompanhado pelo aumento da expressão da proteína de choque térmico (HSP72), que inibiu o fator de transcrição NFκB e a citocina pró-inflamatória resistina. Além disto, o

EEB reduziu o estresse oxidativo, por reduzir a concentração de malondialdeído e aumentar a defesa antioxidante endógena, como a catalase.

19. REFERÊNCIAS

AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods Enzymology**, v.105, p.121-106, 1984.

BARBOSA, K. et al. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Rev. Nutr.**, v.23, n.4, p.629-643, 2010.

BARNES, Peter J.; KARIN, Michael. Nuclear factor- κ B—a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. **New England Journal of Medicine**, v.336, n.15, p.1066-1071, 1997.

BASTOS, Deborah H. M.; ROGERO, Marcelo M.; AREAS, José Alfredo G. Mecanismos de ação de compostos bioativos dos alimentos no contexto de processos inflamatórios relacionados à obesidade. **Arq Bras Endocrinol Metab**, São Paulo , v.53, n. 5, p. 646-656, July 2009 .

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248-254, 1976.

BRUN, P. et al. Increased intestinal permeability in obese mice: new evidence in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v.292, n.2, p.G518-G525, 2007.

BUEGE, J.A. AUST, S.D. Microsomal lipid peroxidation methods. **Enzymol.** v.52, p.302-310, 1978.

CANCELLO, Clément. Is obesity an inflammatory illness? Role of low-grade inflammation and macrophage infiltration in human white adipose tissue. **BJOG**, v.113, p.1141-1147, 2006.

CANI, P. D. et al. Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice. **Diabetes**, v.57, p.1470–1481, 2008.

CASTRO, A. P. et al. Potent Schistosomicidal Constituents from *Garcinia brasiliensis*. **Planta medica**, v.81, n.09, p.733-741, 2015.

DRUMMOND, L. et al. Expression of heat shock proteins (HSPs) in heart in response to exercise training: a systematic review. **Revista da Educação Física/UEM**, v.24, n.4, p.637-647, 2013.

DUEÑAS, M. et al. Studies on modulation of gut microbiota by wine polyphenols: from isolated cultures to omic approaches. **Antioxidants**, v. 4, p.1-21, 2015.

EVERARD, A.; CANI, P. D. Diabetes, obesity and gut microbiota. **Best Pract Res Clin Gastroenterol**, v.27, p.73–83, 2013.

FRAZIER, T.; DIBASE, J.; MCCLAIN, C. Gut microbiota, intestinal permeability, obesity-induced inflammation, and liver injury. **JPEN J Parenter Enteral Nutr**, v.35(5), p.14S–20S, 2011.

GAO, Z. et al. Butyrate improves insulin sensitivity and increases energy expenditure in mice. **Diabetes**, v.58, n.7, p.1509-1517, 2009.

GARCÍA-DÍAZ, Diego F.; REYES-FARÍAS, Marjorie; OVALLE-MARÍN, Angélica. Compuestos bioactivos e inflamación ligada a obesidad. **Rev. chil. endocrinol. diabetes**, v.7, n.1, p.21-24, 2014.

GROOTAERT C. et al. Prebiotics to manage the microbial control of energy homeostasis. **Benef Microbes**, v.2, p.305–318, 2011.

GONTIJO, V. S. et al. Isolation and evaluation of the antioxidant activity of phenolic constituents of the *Garcinia brasiliensis* epicarp. **Food Chemistry**, v. 132, n. 3, p. 1230-1235, 2012.

GUGLIELMETTI, S. et al. Differential modulation of human intestinal *Bifidobacterium* populations after consumption of a wild blueberry (*Vaccinium angustifolium*) drink. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.61, n.34, p.8134-8140, 2013.

HABIG, W. H.; PABST, M. J.; JACOBY, W. B. Glutathione-S-transferases: the first enzymatic step in mescapturic acid formation. **Journal of Biological Chemistry**, v.249, n.22, p.7130-7139, 1974.

HILDEBRANDT, M. A. et al. High-fat diet determines the composition of the murine gut microbiome independently of obesity. **Gastroenterology**, v.137, p.1716–1724, 2009

HOOPER, Philip L.; HOOPER, Paul L. Inflammation, heat shock proteins, and type 2 diabetes. **Cell Stress and Chaperones**, v.14, n.2, p.113-115, 2009.

ISMAIL, N. et al. Frequency of Firmicutes and Bacteroidetes in gut microbiota in obese and normal weight Egyptian children and adults. **Arch Med Sci**, v.7, n.3, p.501-507, 2011.

KRAJMALNIK-BROWN, R. et al. Effects of gut microbes on nutrient absorption and energy regulation. **Nutrition in Clinical Practice**, v.27, n.2, p.201–214, 2012.

LAPPAS, M. et al. Release and regulation of leptin, resistin and adiponectin from human placenta, fetal membranes, and maternal adipose tissue and skeletal muscle from normal and gestational diabetes mellitus-complicated pregnancies. **Journal of Endocrinology**, v.186, n.3, p.457-465, 2005.

LEY, R. et al. Obesity alters gut microbial ecology. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.102, n.31, p.11070-11075, 2005.

LIM, H. et al. Effects of anti-inflammatory biflavonoid, ginkgetin, on chronic skin inflammation. **Biol. Pharm. Bull.** v.29, p.1046-1049, 2006.

LIN, H. Z. et al. Metformin reverses fatty liver disease in obese, leptin-deficient mice. **Nature Medicine**, v. 6, p.998–1003, 2000.

LOCKE, M.; NOBLE, E. G.; ATKINSON, B. G. Exercising mammals synthesize stress proteins. **Am. J. Physiol.**, v.258, p.C723-C729, 1990.

LYRA, A. et al. Intestinal microbiota and overweight. **Benef Microbes**; v.1, p.407–421, 2010.

MACHADO, A B. et al. **Microbiota gastrintestinal** – evidências da sua influência na saúde e na doença. Rio de Janeiro: Editora Rubio, 2015. 288p.

MACHADO, M.; CORTEZ, H. Gut microbiota and nonalcoholic fatty liver disease. **Ann Hepatol**, v.11, p.440–449, 2012.

MARKLUND, S. "Pyrogallol autooxidation". In: **Handbook of Methods for Oxygen Radical Research**. Boca Raton: CRC PRESS, 1985. p.243-247.

MARTINS, F. et al. Composition, and Anti-Inflammatory and Antioxidant Activities of the Volatile Oil from the Fruit Peel of *Garcinia brasiliensis*. **Chemistry & biodiversity**, v.5, n.2, p.251-258, 2008.

MAYER, M. P.; BUKAU, B. Hsp70 chaperones: Cellular functions and molecular mechanism. **Cell. Mol. Life Sci.**, v.62, p.670-684, 2005.

MORAES, A. C. F. et al. Microbiota intestinal e risco cardiometabólico: mecanismos e modulação dietética. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v.58, p. 317-327, 2014.

MORAES, É. A. et al. Sorghum genotype may reduce low-grade inflammatory response and oxidative stress and maintains jejunum morphology of rats fed a hyperlipidic diet. **Food Research International**, v.49, n.1, p.553-559, 2012.

MOREIRA, M. E. C. et al. Bacupari peel extracts (*Garcinia brasiliensis*) reduce high-fat diet-induced obesity in rats. **Journal of Functional Foods**, v.29, p.143-153, 2017.

NAIR, A. R. et al. Blueberry-Enriched Diet Improves Renal Function and Reduces Oxidative Stress in Metabolic Syndrome Animals: Potential Mechanism of TLR4-MAPK Signaling Pathway. **PLoS ONE**, v.9, n.11, p.1-12, 2014.

NAVARRO, M. et al. Renal inflammatory and oxidative and metabolic changes after 6 weeks of cafeteria diet in rats. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v.38, n.1, p.9-14, 2016.

PARKAR, S.; TROWER, T.; STEVENSON, D. Fecal microbial metabolism of polyphenols and its effects on human gut microbiota. **Anaerobe**, v.23, p.12-19, 2013.

PARK, J.; SEO, J.; YOUN, H.. Gut microbiota and clinical disease: obesity and nonalcoholic Fatty liver disease. **Pediatr Gastroenterol Hepatol Nutr**, v.16, p.22-27, 2013.

PARK, S. et al. Calorie restriction with a high-fat diet effectively attenuated inflammatory response and oxidative stress-related markers in obese tissues of the high diet fed rats. **Mediators of inflammation**, v. 2012, 11p., 2012.

POSUWAN, J. et al. Long-term supplementation of high pigmented rice bran oil (*Oryza sativa* L.) on amelioration of oxidative stress and histological changes in streptozotocin-induced diabetic rats fed a high fat diet; Riceberry bran oil. **Food chemistry**, v.138, n.1, p.501-508, 2013.

PSICHAS, A. et al. The short chain fatty acid propionate stimulates GLP-1 and PYY secretion via free fatty acid receptor 2 in rodents. **International journal of obesity**, v.39, n.3, p.424-429, 2015.

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

SAMPEY et al. Cafeteria diet is a robust model of human metabolic syndrome with liver and adipose inflammation: comparison to high-fat diet. **Obesity** (Silver Spring), v.19, p.1109–1117, 2011.

SANTA-CECÍLIA, F. V. **Efeito antinociceptivo e antiinflamatório do extrato etanólico e da benzofenona 7-epiclusianona isolada de folhas de *Garcinia brasiliensis* Mart.(Clusiaceae)**. 2011. 121 f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2011.

_____. et al. Anti-inflammatory and antinociceptive effects of *Garcinia brasiliensis*. **Journal of ethnopharmacology**, v.133, n.2, p.467-473, 2011.

_____ et al. 7-Epiclusianone, the Natural Prenylated Benzophenone, Inhibits Superoxide Anions in the Neutrophil Respiratory Burst. **Journal of Medicinal Food**, v.15, p.200-205, 2012.

SHOAIE S, Karlsson F, Mardinoglu A, Nookaew I, Bordel S, Nielsen J. Understanding the interactions between bacteria in the human gut through metabolic modeling. **Sci Rep**, v.3, p.252, 2013.

SIEGFRIED, B. R; RUCKEMANN, H; STUMPF, G. Method for the determination of organic acids in silage by high performance liquid chromatography. **Landwirtschaftliche Forschung**, v.37, n.6, p.298—304, 1984.

SIMAR, D. et al. Interaction between maternal obesity and post-natal over-nutrition on skeletal muscle metabolism. **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases**, v.22, n.3, p.269-276, 2012.

SPENCER, M et al. Association between composition of the human gastrointestinal microbiome and development of fatty liver with choline deficiency. **Gastroenterology**, v.140, p.976–986, 2011.

TAGLIABUE, A.; ELLI, M. The role of gut microbiota in human obesity: Recent findings and future perspectives. **Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases**, v.23, p.160-168, 2013.

TANAKA, Takashi et al. HSP70 mediates degradation of the p65 subunit of nuclear factor κ B to inhibit inflammatory signaling. **Sci. Signal.**, v. 7, n.356, p.ra119-ra119, 2014.

TURNBAUGH, P. et al. Diet-induced obesity is linked to marked but reversible alterations in the mouse distal gut microbiome. **Cell host & microbe**, v.3, n.4, p.213-223, 2008.

VAN DE WIELE, T. et al. Prebiotic effects of chicory inulin in the simulator of the human intestinal microbial ecosystem. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 51, n.1, p.143-153, 2004.

ZHANG, C. et al. Interactions between gut microbiota, host genetics and diet relevant to development of metabolic syndromes in mice. **ISME J**, v.4, p.232–241, 2010.

20. CONCLUSÃO GERAL

O EEB reduziu o IMC, o peso do fígado e o índice hepatossomático e o grau de esteatose hepática do grupo BHFD em relação ao grupo HFD. No grupo BHFD aumentou da expressão de mRNA do PPAR- α , ADIPOR2 e CPT-1 α e a reduziu do SRBP-1 α do NF-kB em relação ao grupo HFD. Os níveis de adiponectina aumentaram e de resistina reduziram no grupo BHFD em relação ao HFD.

Houve redução na abundância do filo *Firmicutes* e *Proteobacterias* e aumento da concentração do ácido propiônico. A concentração de malondialdeído, óxido nítrico e superóxido dismutase foram menores e a expressão de HSP72 e catalase aumentou no grupo BHFD .

Assim tem-se que o extrato etanólico da casca de bacupari (EEB) em ratos obesos apresentou melhoria da disbiose intestinal, pela modulação da microbiota intestinal, reduzindo o estresse oxidativo e a inflamação. Promoveu também um efeito protetor na DHGN pela regulação de genes envolvidos na lipogênese e na oxidação de gorduras do tecido hepático, melhorando também as medidas biométricas.

21. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A *Garcinia Brasiliensis*, um fruto não convencional cultivável em todo o território brasileiro, possui na sua casca compostos bioativos que podem ser extraídos e utilizados como nutracêuticos para a redução do risco de doenças crônicas não transmissíveis.

ANEXO 1

CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA/UFV certifica que o processo nº 98/2015, intitulado “Efeito do extrato de bacupari *Garcinia brasiliensis* no estresse oxidativo e nos marcadores da adiposidade em ratos”, coordenado pela professora Hércia Stampini Duarte Martino do Departamento de Nutrição e Saúde, está de acordo com a Legislação vigente (Lei Nº 11.794, de 08 de outubro de 2008), as Resoluções Normativas editadas pelo CONCEA/MCTI, a DBCA (Diretriz Brasileira de Prática para o Cuidado e a Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos) e as Diretrizes da Prática de Eutanásia preconizadas pelo CONCEA/MCTI, portanto sendo aprovado por esta Comissão em 23/03/2016, com validade de 12 meses.

CERTIFICATE

The Ethic Committee in Animal Use/UFV certify that the process number 98/2015, named “Bacupari extract of *Garcinia brasiliensis* effect on oxidative stress and markers of adiposity in rats”, is in agreement with the actual Brazilian legislation (Lei Nº 11.794, 2008), Normative Resolutions edited by CONCEA/MCTI, the DBCA (Brazilian Practice Guideline for the Care and Use of Animals for Scientific Purposes and Teaching) and the Guidelines of Practice the Euthanasia recommended by CONCEA/MCTI therefore being approved by the Committee on March 23, 2016 valid for 12 months.



Prof. Átima Clemente Alves Zuanon

Presidente

Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UFV