

**UNIVERSIDADE DA REGIÃO DE JOINVILLE – UNIVILLE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E MEIO AMBIENTE**

**ALINE BARBOSA LIMA**

**EFEITOS HIPOLIPEMIANTE E ANTIOXIDANTE de *Eugenia brasiliensis* EM  
MODELO ANIMAL DE HIPERTRIGLICERIDEMIA INDUZIDA POR ÓLEO DE  
COCO EM RATOS**

JOINVILLE – SC

2017

ALINE BARBOSA LIMA

**EFEITOS HIPOLIPEMIANTE E ANTIOXIDANTE DE *Eugenia brasiliensis* EM  
MODELO ANIMAL DE HIPERTRIGLICERIDEMIA INDUZIDA POR ÓLEO DE  
COCO EM RATOS**

Dissertação de mestrado apresentada  
como requisito parcial para obtenção do  
título de Mestre em Saúde e Meio  
Ambiente, na Universidade da Região de  
Joinville-UNIVILLE.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Daniela Delwing  
de Lima.

JOINVILLE

2017

Catálogo na publicação pela Biblioteca Universitária da Univille

L732e Lima, Aline Barbosa  
Efeitos hipolipemiante e antioxidante de *Eugenia brasiliensis* em modelo animal de hipertrigliceridemia induzida por óleo de coco em ratos/ Aline Barbosa Lima; orientadora Dra. Daniela Delwing de Lima. – Joinville: UNIVILLE, 2017.

96 f. : il. ; 30 cm

Dissertação (Mestrado em Saúde e Meio Ambiente – Universidade da Região de Joinville)

1. Plantas medicinais. 2. Eugenia (Planta). 3. Hipertrigliceridemia. 4. Estresse oxidativo . 5. Óleo de coco. I. Lima, Daniela Delwing de (orient.). II. Título.

CDD 615.537

**Termo de Aprovação**

**“Efeitos Hipolipemiante e Antioxidante de *Eugenia brasiliensis* em Modelo Animal de Hipertrigliceridemia Induzida por Óleo de Coco em Ratos”**

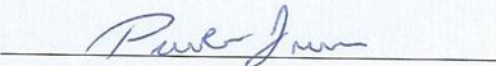
por

Aline Barbosa Lima

Dissertação julgada para a obtenção do título de Mestre em Saúde e Meio Ambiente, área de concentração Saúde e Meio Ambiente e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Saúde e Meio Ambiente.

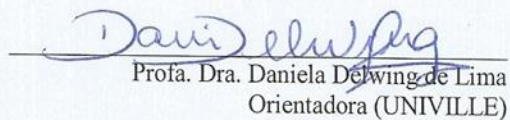


Prof. Dra. Daniela Delwing de Lima  
Orientadora (UNIVILLE)

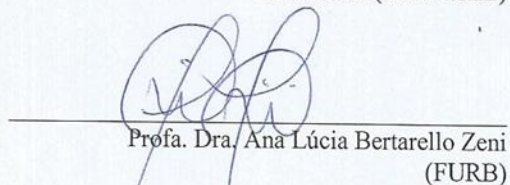


Prof. Dr. Paulo Henrique Condeixa de França  
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Saúde e Meio Ambiente

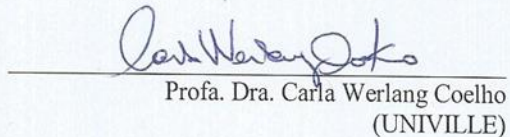
**Banca Examinadora:**



Prof. Dra. Daniela Delwing de Lima  
Orientadora (UNIVILLE)



Prof. Dra. Ana Lúcia Bertarello Zeni  
(FURB)



Prof. Dra. Carla Werlang Coelho  
(UNIVILLE)

Joinville, 20 de fevereiro de 2017

*Dedico esse trabalho primeiramente a  
minha família, pelo constante incentivo,  
amor e compreensão nessa caminhada.*

## **AGRADECIMENTOS**

Em especial agradeço a Deus, por me amparar nos momentos difíceis, me dar força interior para superar as dificuldades, mostrar os caminhos nas horas incertas e pelas bênçãos que me tem concedido.

Aos meus pais Clemência e Hélio, e meus irmãos. Família a base de tudo, obrigada pelo constante incentivo, amor e compreensão nessa caminhada, não tenho palavras para expressar o quão sou grata a vocês.

Também agradeço a minha orientadora Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Daniela Delwing de Lima, por ser exemplo de profissional e acreditar em mim, me mostrando o caminho da ciência nessa etapa da minha vida, a você minha eterna gratidão e sincero MUITO OBRIGADO, pelos ensinamentos, paciência, compreensão, apoio e incentivo prestados.

Ao grupo de pesquisa da Univille: Eduardo, Eloise, Mariana, Marina, Nariana e tantos outros que ajudaram na execução desse trabalho, sem vocês certamente este trabalho não seria possível, o meu MUITO OBRIGADO pelas contribuições prestadas.

A equipe da Farmácia Confiança por compreender as minhas ausências, pelo apoio, e por contribuir para que esse sonho se tornasse realidade.

A todos os professores do mestrado pelos ensinamentos, e a todos aqueles que de alguma forma estiveram ao meu lado durante a execução deste trabalho.

Aos membros da banca, pelas contribuições.

Á UNIVILLE, CAPES e a FURB.

*“A tarefa não é ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.”*

Arthur Schopenhauer

## RESUMO

O objetivo do presente estudo foi investigar os efeitos da administração crônica de óleo de coco, extrato bruto hidroalcoólico (EBH) e extrato bruto acetônico (EBA), obtidos a partir das folhas de *Eugenia brasiliensis*, sobre os níveis de triglicerídeos, acúmulo lipídico em células hepáticas, substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS), conteúdo total de sulfidrilas, conteúdo total de proteínas carboniladas e a atividade das enzimas antioxidantes catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e glutathione peroxidase (GSH-Px) em sangue e fígado de ratos. Foram utilizados 98 ratos machos Wistar de 60 dias de idade neste experimento. Inicialmente, os animais receberam por 15 dias, 2 mL/dia óleo de coco ou 2 mL/dia de soro fisiológico; subsequentemente, receberam EBH ou EBA (50, 100 ou 150 mg/kg) durante 30 dias e na metade do tratamento (15 dias) 2 mL/dia de óleo de coco ou 2 mL/dia de soro fisiológico. Os resultados mostraram que o óleo de coco aumentou os níveis de triglicerídeos, gerando hipertrigliceridemia (HTG) e promoveu acúmulo de lipídeos em células hepáticas de ratos, como foi observada na análise histopatológica. Aumentou TBA-RS e reduziu o conteúdo total de sulfidrilas em plasma e reduziu a atividade da CAT em eritrócitos, porém não alterou o conteúdo total de proteínas carboniladas em plasma e a atividade das enzimas SOD e GSH-Px em eritrócitos de ratos. Além disso, aumentou a atividade da CAT e diminuiu a atividade das enzimas SOD e GSH-Px, mas não alterou TBA-RS, conteúdo total de sulfidrilas e de proteínas carboniladas em fígado de ratos. A administração crônica do EBH e do EBA de *E. brasiliensis* foi capaz de prevenir a HTG e diminuir as gotículas lipídicas, verificadas através da análise histopatológica das células hepáticas. Também foi capaz de prevenir muitas das alterações causadas nos parâmetros de estresse oxidativo em sangue e fígado de ratos; uma vez que preveniu as alterações nas atividades enzimáticas, na peroxidação lipídica e no conteúdo total de sulfidrilas. A planta *E. brasiliensis* possui diversos compostos bioativos presentes em sua constituição química, dentre eles, diversos compostos fenólicos e agentes flavonoides. Através desse estudo, evidenciamos que ambos os extratos obtidos a partir das folhas de *E. brasiliensis* apresentam compostos de elevado efeito hipolipidêmico e capacidade antioxidante. No entanto, estudos adicionais são necessários para avaliar se *E. brasiliensis* poderia ser útil como um potencial adjuvante para a prevenção de HTG e danos oxidativos.

**Palavras Chave:** Hipertrigliceridemia; Estresse oxidativo; Antioxidantes; *Eugenia brasiliensis*; Sangue; Fígado; Análise histopatológica.



## ABSTRACT

The aim of the present study was to investigate the effects of chronic administration of coconut oil, crude hydroalcoholic extract (CHE) and crude acetonic extract (CAE), obtained from the leaves of *Eugenia brasiliensis*, on triglyceride levels, lipid accumulation in liver cells, on substances reactive to thiobarbituric acid (TBA-RS), total sulfhydryl content, protein carbonyl content, and on the activities of antioxidant enzymes catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), and glutathione peroxidase (GSH-Px) in blood and liver of rats. 98 Sixty-day-old male Wistar rats were used in this experiment. Initially, the animals received for 15 days, 2 mL/day coconut oil or 2 mL/day of saline; subsequently, they received CHE or CAE (50, 100 or 150 mg/kg) for 30 days and in the middle of the treatment (15 days) 2 mL/day of coconut oil or 2 mL/day of saline. The results showed that coconut oil enhanced triglyceride levels, generating hypertriglyceridemia (HTG) and promoted accumulation of lipids in hepatic cells of rats, as was observed in the histopathological analysis. It enhanced TBA-RS and reduced total sulfhydryl content in plasma and reduced CAT activity in erythrocytes, but did not alter the protein carbonyl content in plasma and the activity of SOD and GSH-Px enzymes in rat erythrocytes. In addition, increased CAT activity and decreased the activity of SOD and GSH-Px enzymes, but did not alter TBA-RS, total sulfhydryl content and protein carbonyl content in the liver of rats. Chronic administration of CHE and CAE from *E. brasiliensis* was able to prevent HTG, and to decrease the lipid droplets, verified through the histopathological analysis of the hepatic cells. Was also able to prevent many of the alterations caused in the parameters of oxidative stress in rat blood and liver; since it prevented changes in enzymatic activities, lipid peroxidation and total sulfhydryl content. The *E. brasiliensis* plant has several bioactive compounds present in its chemical constitution, among them, several phenolic compounds and flavonoid agents. Through this study, we show that both extracts obtained from the leaves of *E. brasiliensis* show compounds with a high hypolipidemic effect and antioxidant capacity. However, further studies are needed to evaluate whether *E. brasiliensis* could be useful as a potential adjuvant for the prevention of HTG and oxidative damage.

**Keywords:** hypertriglyceridemia; oxidative stress; antioxidants; *Eugenia brasiliensis*; blood; liver; histopathological analysis.

## LISTA DE FIGURAS REFERÊNCIAL TEÓRICO

Figura 1- Produção de água a partir de oxigênio .....	25
Figura 2- Geração do radical superóxido a partir do oxigênio .....	26
Figura 3- Processo de dismutação .....	26
Figura 4- Reação de Fenton.....	26
Figura 5- Reação de Haber-Weiss .....	27
Figura 6- Formação do ONOO <sup>-</sup> e OH <sup>•</sup> a partir do O <sub>2</sub> <sup>•-</sup> e NO .....	28
Figura 7- Lipoperoxidação catalizada por íons de Ferro e Cobre.....	30
Figura 8- Reação de dismutação realizada pela SOD resultando em H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> e O <sub>2</sub> .....	33
Figura 9- Reação de decomposição do peróxido de hidrogênio pela enzima catalase .....	34
Figura 10- Reação catalisada pela enzima glutaciona peroxidase .....	34
Figura 11- Reação catalisada pela enzima glutaciona reduzida .....	35
Figura 12- Aspecto das folhas, flores e frutos de <i>Eugenia brasiliensis</i> .....	38

## LISTA DE TABELAS REFERÊNCIAL TEÓRICO

Tabela 1- Etapas da peroxidação lipídica .....	29
Tabela 2- Principais agentes que possuem defesa antioxidante.....	32

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AVC: Acidente Vascular Cerebral

CAT: Catalase

DCVs: Doenças Cardiovasculares

DNA: Ácido Desoxiribonucleico

EBA: Extrato Bruto Acetônico

EBH: Extrato Bruto Hidroalcoólico

ERO: Espécies Reativas de Oxigênio

ERN: Espécies Reativas de Nitrogênio

*Eugenia brasiliensis: E.brasiliensis*

GSH: Glutathione

GSH-Px: Glutathione Peroxidase

GSSG: Glutathione Oxidada

HTG: Hipertrigliceridemia

HDL: Lipoproteína de alta densidade

LDL: Lipoproteína de baixa densidade

L<sup>•</sup>: Radical Lipídico

LOO<sup>•</sup>: Radical Peroxila

LOOH: Hidroperóxidos

MDA: Malondialdeído

NADPH: Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato

NO: Óxido Nítrico

NOS: Óxido Nítrico Sintase

O<sub>2</sub>: Oxigênio

O<sub>2</sub><sup>•-</sup>: Radical Superóxido

OH<sup>•</sup>: Radical Hidroxil

ONOO<sup>-</sup>: Ânion Peroxinitrito

SOD: Superóxido Dismutase

TBA-RS: Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

VLDL: Lipoproteína de muito baixa densidade

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>15</b>
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>18</b>
<b>2.1 Objetivo geral .....</b>	<b>18</b>
<b>2.2 Objetivos Específicos .....</b>	<b>18</b>
<b>3 REVISÃO .....</b>	<b>19</b>
<b>3.1 Doenças Cardiovasculares .....</b>	<b>19</b>
<b>3.2 Colesterol; triglicédeos .....</b>	<b>20</b>
3.2.1 Transporte de lipídeos.....	21
<b>3.3 Dislipidemias .....</b>	<b>21</b>
3.3.1 Hipertrigliceridemia.....	22
<b>3.4 Radicais livres .....</b>	<b>24</b>
3.4.1 Formação das principais espécies reativas.....	25
<b>3.5 Estresse oxidativo .....</b>	<b>28</b>
<b>3.6 Mecanismo de dano a biomoléculas .....</b>	<b>29</b>
3.6.1 Peroxidação lipídica .....	29
3.6.2 Danos proteicos .....	31
3.6.3 Danos ao DNA .....	31
<b>3.7 Sistemas de defesa antioxidante .....</b>	<b>32</b>
3.7.1 Enzimas com ação antioxidante.....	33
3.7.1.1 Superóxido dismutase (SOD).....	33
3.7.1.2 Catalase (CAT) .....	33
3.7.1.3 Glutaciona Peroxidase (GSH-Px) e glutaciona (GSH) .....	34
3.7.2 Principais Antioxidantes exógenos.....	35
3.7.2.1 Compostos polifenólicos e flavonóides.....	36
<b>3.8 Utilização de plantas medicinais como fonte terapêutica .....</b>	<b>37</b>
3.8.1 Efeitos biológicos de <i>Eugênia brasiliensis</i> .....	38
<b>3.9 Caracterização e uso de medicamentos fitoterápicos no Brasil.....</b>	<b>39</b>
<b>4 METODOLOGIA .....</b>	<b>41</b>

<b>4.1 Animais</b> .....	<b>41</b>
<b>4.2 Extratos provenientes das folhas de <i>Eugenia brasiliensis</i></b> .....	<b>41</b>
4.2.1 Material vegetal .....	41
4.2.2 Preparo do material vegetal de <i>E. brasiliensis</i> .....	42
<b>4.3 Tratamentos</b> .....	<b>42</b>
4.3.1 Protocolos experimentais .....	42
<b>4.4 Estudos bioquímicos</b> .....	<b>43</b>
4.4.1 Preparação dos eritrócitos e do plasma .....	43
4.4.2 Preparação do tecido .....	44
4.4.3 Análise histopatológica .....	44
4.4.4 Dosagem de triglicerídeos .....	45
4.4.5 Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) .....	45
4.4.6 Conteúdo Total de Sulfidrilas .....	45
4.4.7 Catalase(CAT).....	46
4.4.8 Glutationa Peroxidase (GSH-PX) .....	46
4.4.9 Superóxido Dismutase (SOD) .....	46
4.4.10 Conteúdo de proteínas carboniladas .....	47
4.4.11 Dosagem de Proteínas .....	47
<b>4.5 Análise estatística</b> .....	<b>47</b>
<b>5 INTERDISCIPLINARIDADE</b> .....	<b>49</b>
<b>6 RESULTADOS E DISCUSSÕES</b> .....	<b>50</b>
<b>6.1 Artigo: HYPOLIPEMIANANT AND ANTIOXIDANT EFFECTS FROM <i>Eugenia brasiliensis</i> IN ANIMAL MODEL OF HYPERTRIGLYCERIDEMIA INDUCED BY COCONUT OIL IN RATS.</b>	
<b>7 CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>80</b>
<b>8 REFERÊNCIAS</b> .....	<b>82</b>
<b>ANEXO1. Termo de Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa</b> .....	<b>97</b>

## 1 INTRODUÇÃO

As doenças cardiovasculares (DCVs) são consideradas a principal causa de mortalidade em todo o mundo, sendo as dislipidemias um fator de risco importante (ROGER *et al.*, 2012; YUSUF *et al.*, 2004). Envolvida na produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), podendo desencadear danos, como a peroxidação lipídica, isso pode resultar na deterioração de tecidos e conseqüentemente contribuir para o surgimento de DCVs (MCINTYRE, HAZEN, 2010).

Existem aproximadamente 3 a 4 milhões de adultos nos Estados Unidos com hipertrigliceridemia (HTG), um tipo de dislipidemia que é definida pelos níveis de triglicerídeos  $\geq$  a 150 mg/dL e HTG grave definida por níveis de triglicerídeos  $\geq$  a 500 mg/dL, ambas estão associados a um risco aumentado de DCVs tanto em homens e mulheres (CHRISTIAN *et al.*, 2011; AUSTIN *et al.*, 1998).

A HTG pode estar relacionada com risco aumentado de acidente vascular cerebral (AVC) e outras formas de doença cardiovascular aterosclerótica (LABREUCHE *et al.*, 2009). De acordo com o estudo conduzido por Lloret-Linares e colaboradores (2008) se observou que 20% dos pacientes com HTG grave apresentam pelo menos um episódio de pancreatite aguda, que é uma condição de elevada morbidade e potencial de mortalidade. Além disso, a HTG grave se correlaciona com um risco ainda maior de doença coronária prematura (GREENBERG *et al.*, 1977) e mortalidade por doença cardiovascular (NEIL *et al.*, 2010). Alguns dos fatores de risco associados a HTG grave incluem fatores genéticos, estilo de vida (excesso de consumo de álcool, tabagismo, inatividade física e dieta rica em carboidratos), medicamentos (terapia hormonal), e outras doenças (diabetes tipo 2, insuficiência renal crônica e síndrome metabólica) (NATIONAL CHOLESTEROL EDUCATIONS PROGRAM, 2002). Outras complicações associadas com HTG incluem manifestações cutâneas como xantoma eruptivo e esteatose hepática (MILLER *et al.*, 2011).

Portanto, as recomendações clínicas primárias para pacientes com HTG grave são para diminuir os níveis plasmáticos de triglicerídeos com o objetivo primário de reduzir o risco de pancreatite aguda, e secundário para diminuir o

risco de DCVs (LLORET-LINARES *et al.*, 2008). Existem diversas opções terapêuticas que podem ser utilizadas para redução dos triglicerídeos, como por exemplo, os fibratos, as estatinas e a niacina, todavia esses fármacos podem causar efeitos colaterais durante o uso em longo prazo (SAHEBKAR *et al.*, 2014).

Radicais livres são constantemente produzidos e possuem importantes papéis em diversas funções biológicas, mas também podem estar presentes em condições patológicas em resultado à sua descompensação; o estresse oxidativo é considerado um dano tissular ocasionado pelo desequilíbrio entre fatores pró e antioxidantes. Tal desequilíbrio resulta na oxidação de importantes biomoléculas como lipídeos, proteínas, carboidratos e Ácido desoxirribonucléico (DNA), da qual é observado em uma ampla variedade de condições patológicas e acredita-se que atue como agente patogênico em muitas delas, podendo propiciar disfunções relacionadas a processos inflamatórios, propiciando a progressão de muitos processos patológicos de importância clínica, como a aterosclerose, considerada um importante fator de risco para as DCVs (COSTA-HONG *et al.*, 2009; HALLIWELL, GUTTERIDGE, 1999; MCINTYRE, HAZEN, 2010).

De acordo com a literatura, as plantas são utilizadas como fonte de tratamento há milhares de anos. Os primeiros registros da utilização delas como fonte medicinal datam da Mesopotâmia em 2600 a.C. (TUROLLA, NASCIMENTO, 2006). Com o passar dos anos e com os avanços tecnológicos, as plantas se tornaram fonte de grande interesse na procura de novos compostos bioativos, seja para doenças ainda sem tratamento ou para compostos que possuam menos efeitos adversos. Muitas espécies de plantas têm sido usadas etnofarmacologicamente ou experimentalmente para tratar os sintomas de várias patologias (DI STASI, 1996), dentre elas a espécie *Eugenia brasiliensis*, para a qual foram descritos diversos flavonoides como a quercetina, rutina, galangina e miricetina, além de outros compostos fenólicos como catequina, galocatequina e ácido gálico (PIETROVSKI *et al.*, 2008); os triterpenos betulina,  $\alpha$ -amirina e  $\beta$ -amirina, ácido 29-hidroxi-oleanólico (MAGINA *et al.*, 2012) e ácido ursólico (FRIGHETTO *et al.*, 2005).

Considerando o potencial terapêutico da planta *Eugenia brasiliensis*, esse estudo tem por objetivo verificar os efeitos da sua administração, sobre a HTG



e sobre o estresse oxidativo causados pela administração de óleo de coco em ratos.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Verificar os efeitos da administração crônica de extratos brutos hidroalcoólico e acetônico obtidos das folhas da espécie de *Eugenia brasiliensis* sobre a hipertrigliceridemia e sobre o estresse oxidativo causados pela administração crônica de óleo de coco em ratos de 60 dias.

### 2.2 Objetivos específicos

- 1) Verificar os níveis de triglicerídeos após a administração crônica de óleo de coco;
- 2) Analisar o efeito da hipertrigliceridemia sobre o TBA-RS, conteúdo total de sulfidrilas e carbonilas em fígado e plasma de ratos;
- 3) Analisar o efeito da hipertrigliceridemia sobre a atividade das enzimas antioxidantes (catalase, glutathione peroxidase e superóxido dismutase) em fígado e eritrócitos de ratos;
- 4) Verificar a influência da administração crônica dos extratos brutos hidroalcoólico e acetônico obtidos das folhas da espécie de *Eugenia brasiliensis* sobre os efeitos causados pela hipertrigliceridemia sobre os níveis de TBA-RS, conteúdo total de sulfidrilas e CAT em sangue de ratos;
- 5) Verificar a influência da administração crônica dos extratos brutos hidroalcoólico e acetônico obtidos das folhas da espécie de *Eugenia brasiliensis* sobre os efeitos causados pela hipertrigliceridemia sobre a atividade das enzimas catalase, superóxido dismutase e glutathione peroxidase em fígado de ratos;
- 6) Avaliar a ação hipolipemiante dos extratos obtidos das folhas da espécie de *Eugenia brasiliensis* através da dosagem de triglicerídeo plasmático;
- 7) Investigar a presença ou ausência de inclusões lipídicas no fígado dos ratos submetidos a administração crônica de óleo de coco e a ação dos extratos brutos hidroalcoólico e acetônico, através da análise histológica.

### 3 REVISÃO

#### 3.1 Doenças cardiovasculares

As DCVs são uma das principais causas de deficiência e morte prematura em todo o mundo, sendo as dislipidemias um importante fator para o risco cardiovascular. As DCVs afetam o sistema circulatório, uma vez que atingem os vasos sanguíneos (artérias, veias, capilares) e o coração. Caracterizam-se como eventos de doença coronariana aguda (ataques cardíacos) e doença vascular cerebral (ROGER *et al.*, 2012; WHO 2007; YUSUF *et al.*, 2004).

A aterosclerose é a patologia adjacente, ocasionada pela deposição na parede do vaso de células os lipídeos, gerando danos oxidativos. Essa patologia desenvolve-se de forma gradativa ao longo dos anos, e tende a manifestar seus sintomas quando a mesma já está em estado avançado de acometimento (GIANNINI, 1998).

De acordo com a I Diretriz de prevenção da aterosclerose na infância e na adolescência (2005), existem várias comorbidades que podem desencadear o risco do desenvolvimento de DCVs; como os fatores genéticos e os ambientais que são passíveis de intervenção (hábitos alimentares, obesidade, hipertensão arterial, sedentarismo, tabagismo e surgimento de doenças crônico-degenerativas).

Dados previdenciários apontaram que no Brasil ocorreram aproximadamente um milhão de internações acometidas por DCVs, nos anos 90 (GIANNINI, 1998), e a projeção tem sido ascendente. Estima-se que as DCVs sejam responsáveis por cerca de 17 milhões de óbitos no mundo a cada ano (30% de todos os óbitos), sendo que 80% ocorrem em países de baixa renda e de renda média, e esta estimativa deve crescer para 23,6 milhões até 2030 (MENDIS, PUSKA, NORRVING, 2011). Esses aspectos possuem grandes repercussões, e possui custo social elevado, tratando-se de um problema de saúde pública no Brasil e no mundo. De acordo com o risco no desenvolvimento de eventos cardiovasculares, é preciso adoção de estratégias globais com base na eficácia das intervenções médicas, triagem dos fatores de risco e medidas de prevenção e tratamento. Devem ser aplicadas essas

medidas nas diferentes regiões geográficas e entre grupos étnicos distintos com o intuito de minimizar os riscos de desenvolvimento de DCVs e consequentemente o número de mortes associadas (WONG, 2014; WHO, 2007; YUSUF *et al.*, 2004)

### **3.2 Colesterol; triglicerídeos**

Em níveis fisiológicos, o colesterol tem papel fundamental como componente das membranas celulares, como precursor dos hormônios esteróides (mineralocorticóides, glicocorticóides, androgênios, progestagênios e estrogênios), dos ácidos biliares e da vitamina D (NELSON, COX, 2011).

Com relação aos níveis plasmáticos de colesterol, são dependentes da quantidade ingerida pela dieta (em torno de 25%) e da síntese hepática de colesterol, que corresponde ao restante. Os níveis plasmáticos de colesterol também são dependentes da quantidade de gordura saturada ou insaturada presente na dieta, dos níveis de estrogênio, realização de exercícios físicos e do consumo de etanol, além de variar de acordo com a idade e ser dependente de fatores raciais (MOTTA, 2009).

Os triglicerídeos são constituídos por três moléculas de ácidos graxos e um glicerol, fazem parte dos componentes lipídicos, podendo ser provenientes de forma endógena (fígado) e de forma exógena (dieta); sendo que compreendem cerca de 90% da gordura ingerida, proveniente da alimentação. Desempenham função de estoque energético (quando em níveis fisiológicos) e podem ser depositados em tecidos e até mesmo no fígado, como um mecanismo que o organismo utiliza para estocar a energia excedente. São sintetizados principalmente no fígado, sendo que são transportados em quilomicrons e lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL) que são sintetizadas no intestino e fígado, respectivamente. Também corresponde em torno de 10% da lipoproteína de densidade baixa (LDL). A lipólise destas lipoproteínas ricas em triglicerídeos pela enzima lipase lipoproteica, resulta na formação de partículas remanescentes menores enriquecidas em ésteres de colesterol (DALLINGA-THIE *et al.*, 2010; MOTTA, 2009; NELSON, COX, 2011).

Os estudos mostraram que concentrações séricas elevadas de colesterol total e de suas principais frações, como o LDL, triglicerídeos e

concentrações reduzidas de lipoproteínas de alta densidade (HDL) tem correlação positiva com DCVs (NELSON, COX, 2011; MOTTA, 2009).

### 3.2.1 Transporte de lipídeos

Os lipídeos são transportados na corrente sanguínea na forma de complexos de lipídeos e proteínas chamados de lipoproteínas. Uma das principais funções das lipoproteínas é estrutural e realizar o transporte dos triglicerídeos (GIANNINI, 1998). As lipoproteínas apresentam distinção na sua composição lipídica, proteica e densidade, sendo que cada uma apresenta uma função específica. Os lipídeos provenientes da dieta são transportados para a circulação sanguínea na forma de quilomicrons, os quais são formados principalmente por triglicerídeos. Estes são responsáveis pelo transporte exógeno e posteriormente sob ação da enzima lipase de lipoproteína, presente nas membranas endoteliais dos capilares do tecido adiposo e muscular, darão origem aos remanescentes de quilomicrons que serão captados pela célula hepática por processo de endocitose. Já os lipídeos endógenos e o colesterol hepático são transportados para o tecido adiposo e muscular via lipoproteína VLDL (HENRY, 2008; NELSON, COX, 2011). Posteriormente, a lipoproteína VLDL, por hidrólise de triglicerídeos e de outros constituintes, dará origem à lipoproteína de densidade intermediária (IDL), e posteriormente, a lipoproteína LDL, a qual tem função importante no transporte de lipídeos para os tecidos e membranas, porém também associada à aterosclerose (MOTTA, 2009).

### 3.3 Dislipidemias

As dislipidemias são decorrentes de desordens no metabolismo lipídico e componentes lipoproteicos, acarretando desta forma, anormalidades diante do perfil lipídico do indivíduo. As dislipidemias podem ter associação com fatores genéticos e/ou ambientais (HANEY *et al.*, 2007).

Quanto à classificação das dislipidemias, são divididas em: Hipercolesterolemia isolada, a qual apresenta elevação isolada de colesterol

total, em geral representada por aumento do LDL; HTG isolada, a qual apresenta elevação isolada dos triglicerídeos, em geral representada por aumento do VLDL, ou do quilomícron, ou de ambos; hiperlipidemia mista, a qual apresenta valores aumentados de colesterol total e de triglicerídeos; e HDL baixo, o qual apresenta colesterol HDL baixo isolado ou em associação com aumento de LDL e/ou triglicerídeos (SANTOS *et al.*, 2001).

De acordo com o estudo conduzido por Ogden e colaboradores (2012), em 2009-2010, através da análise do Índice de Massa Corpórea (IMC), se observou prevalência de obesidade em 16,9% de crianças e adolescentes norte-americanos. Considerando que as dislipidemias e os processos ateroscleróticos podem ocorrer desde a infância; que o estilo de vida e a obesidade podem contribuir para esse quadro crescente, tornam-se importantes medidas de rastreio precoce para a contenção de possíveis eventos cardiovasculares ao longo da vida (LOIO, MAIA, 2014). Ressalta-se que para vários autores a dislipidemia é um dos principais fatores desencadeadores das DCVs no Brasil e no mundo (WHO, 2007; ROGER *et al.*, 2012).

### 3.3.1 Hipertrigliceridemia

Dados na literatura revelam que níveis plasmáticos elevados de triglicerídeos estão sendo considerados como fator de risco independente para diabetes Tipo 2, síndrome metabólica e DCV aterosclerótica (MILLER *et al.*, 2011; GRUNDY, 2004). De acordo com um estudo randomizado da Mendelian, a perda de função mutante no gene que codifica a apolipoproteína C-III (APOC3) está associada a baixas concentrações plasmáticas de triglicerídeos e uma redução do risco de DCV isquêmica na população em geral; evidenciando o papel entre HTG e DCVs (JØRGENSEN *et al.*, 2014).

A HTG pode ser de origem genética, devido deficiência da lipase lipoproteica, HTG familiar ou hiperlipidemia familiar combinada; ou ser secundária a outras doenças como diabetes *mellitus*, doenças renais e hipotireoidismo; ou associada a fatores ambientais que afetam a produção e depuração de lipoproteínas ricas em triglicerídeos (HEGELE, 2009; HEGELE *et al.*, 2014). Além disso, existem numerosas condições secundárias, incluindo

medicamentos, que interagem com os fatores genéticos para causar HTG (CHAPMAN *et al.*, 2011; MILLER *et al.*, 2011; WATTS, OOI, CHAN, 2013; REAVEN, 1989).

Existem aproximadamente 3 a 4 milhões de adultos nos Estados Unidos com HTG grave, definida como níveis de triglicerídeos  $\geq$  500 mg/dL (CHRISTIAN *et al.*, 2011). Níveis de triglicerídeos  $\geq$  150 mg/dL estão associados a um risco aumentado de DCVs tanto em homens como em mulheres (AUSTIN *et al.*, 1998). A HTG também está associada com risco aumentado de AVC e outras formas de DCVs ateroscleróticas (LABREUCHE *et al.*, 2009).

De acordo com Brewer-Junior (1999), os triglicerídeos representam um importante biomarcador de risco para DCVs por causa de sua associação com partículas aterogênicas remanescentes e a Apo C-III, uma proteína pró-inflamatória e pró-aterogênica encontrada em todas as classes de lipoproteínas plasmáticas. Várias espécies de lipoproteínas ricas em triglicerídeos como a VLDL e os remanescentes de VLDL, bem como remanescentes de quilomicrons parecem promover aterogênese independentemente de LDL.

Apesar de ainda ser um pouco especulativo, uma possível explicação para a relação entre os níveis de triglicerídeos elevados e o risco de DCVs é que a VLDL e as partículas de quilomicrons tornam-se parcialmente delipidadas, e os remanescentes resultantes destas lipoproteínas ricas em triglicerídeos podem ser aterogênicos, e estes estão elevados em pacientes com HTG (GINSBERG, 2002; GOLDBERG *et al.*, 2011). Outra explicação possível é que a HTG propicia um aumento de partículas de LDL na circulação (CROMWELL, BARRINGER, 2009; OTVOS *et al.*, 2011).

De acordo com o estudo de Lloret-Linares e colaboradores (2008) observou-se que 20% dos pacientes com HTG grave apresentam pelo menos um episódio de pancreatite aguda. A pancreatite aguda é uma condição com elevada morbidade e potencial de mortalidade. Além disso, a HTG grave se correlaciona com um risco ainda maior de doença coronária prematura (GREENBERG *et al.*, 1977) e risco de mortalidade por DCVs (NEIL *et al.*, 2010).

A deposição de triglicerídeos no fígado pode gerar um quadro patológico que caracteriza a esteatose hepática não alcoólica, e conseqüentemente

causar lesão do tecido, pela inflamação e danos oxidativos, podendo evoluir para falência do órgão. Estudos apontam que anormalidades metabólicas como aumento da resistência à insulina, obesidade e as dislipidemias (principalmente o aumento dos níveis de triglicerídeos e diminuição do HDL) são as causas mais comuns de deposição de gordura hepática (CHOIA, DIEHLA, 2008; PAGANO *et al.*, 2002; REAVEN, 1993). Não há consenso sobre o tratamento farmacológico, o mesmo será dependente do fator desencadeador, mas acredita-se que agentes hipolipemiantes possam ser utilizados (LAM, YOUNOSSE, 2010). Estudos apontam também que a utilização de agentes antioxidantes também pode ser realizada, uma vez que o estresse oxidativo está presente na lesão hepática, e os mesmos podem agir de maneira positiva a evitar os danos oxidativos, no entanto ainda são necessários mais estudos para estabelecer critérios de utilização (LI *et al.*, 2015; PEREIRA, BARROS, FERREIRA, 2016).

Portanto, as recomendações clínicas primárias para pacientes com HTG grave são para diminuir os níveis plasmáticos de triglicerídeos com o objetivo primário de reduzir o risco de pancreatite aguda e o risco de DCVs (LLORET-LINARES *et al.*, 2008).

Existem diversas opções terapêuticas que podem ser utilizadas para redução da HTG, como por exemplo, os fibratos, as estatinas, e a niacina; em adição com mudanças no estilo de vida como dieta, redução de peso corporal e realização de atividade física; todavia esses fármacos podem causar efeitos colaterais durante o uso em longo prazo (SAHEBKAR *et al.*, 2014).

### **3.4 Radicais livres**

Os radicais livres são espécies químicas relativamente instáveis que apresentam um ou mais elétrons não-pareados no exterior dos orbitais atômicos ou moleculares, e devido à instabilidade tendem a buscar avidamente combinações com a matéria circulante (SIGNORINI, SIGNORINI, 1993). O elétron não-emparelhado da última camada de valência lhe confere alta reatividade em sistemas biológicos (LUSHCHAK, 2012; FERREIRA, MATSUBARA, 1997).



Os radicais livres participam de processos fisiológicos importantes, são continuamente produzidos em processos metabólicos e atuam como mediadores para transferência de elétrons em várias reações bioquímicas (SIGNORINI, SIGNORINI, 1993).

Na busca do emparelhamento podem causar danos celulares importantes, resultando numa reação em cadeia, caso não haja ação suficiente de agentes antioxidantes. A mitocôndria por ser responsável pela cadeia transportadora de elétrons é a maior geradora de ERO em sistemas fisiológicos (HALLIWELL, GUTTERIDGE, 1999; BARBOSA *et al.*, 2010; GREEN, BRAND, MURPHY, 2004).

De acordo com Nelson e Cox (2011), o oxigênio (O<sub>2</sub>) é elemento indispensável em seres aeróbios, e participa da produção eficiente de energia em plantas e animais pelo sistema de balanço redox. A mitocôndria responsável pela respiração celular e produção energética, promove reações dinâmicas a todo o momento, através da cadeia de transporte de elétrons, onde a enzima citocromo C oxidase adiciona quatro elétrons a molécula de O<sub>2</sub> para reduzi-la a duas moléculas de água (Figura-1) (HALLIWELL, GUTTERIDGE, 1999). Nesse processo, a maior parte do O<sub>2</sub> é metabolizado, mas cerca de 5% do O<sub>2</sub> que nela permeiam, podem ser desviados da rota enzimática principal, e acabam sendo reduzidos monoeletronicamente, originando ERO. A partir daí o trabalho compete aos agentes *scavengers*, que na medida do possível, tem o papel de neutralizá-las (SIGNORINI, SIGNORINI, 1993).



Figura 1- Produção de água a partir de oxigênio. Fonte: (HALLIWELL, GUTTERIDGE, 1999).

### 3.4.1 Formação das principais espécies reativas

A configuração eletrônica do O<sub>2</sub> favorece a forte tendência que ele tem de receber um elétron de cada vez. Assim sendo, a adição de um elétron a uma molécula de O<sub>2</sub>, no estado fundamental, causa a formação do radical superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) (Figura- 2) (SCHNEIDER, OLIVEIRA, 2004).

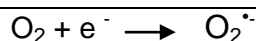


Figura 2- Geração do radical superóxido a partir do oxigênio (SCHNEIDER; OLIVEIRA, 2004).

Conseqüentemente, o  $\text{O}_2^{\bullet -}$  ao receber mais um elétron e dois íons hidrogênio forma o peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) (Figura-3), que não se constitui em uma espécie radical, pois não apresenta elétrons não pareados, mas uma espécie intermediária que se torna um elo no processo de formação da reação em cascata dos radicais livres. Essa reação é catalisada pela enzima superóxido dismutase (SOD), que é encontrada em quantidades elevadas nas células de mamíferos e que catalisa essa reação, aumentando a frequência para dismutação espontânea em pH fisiológico (HALLIWELL, GUTTERIDGE, 1999; SCHNEIDER, OLIVEIRA, 2004; SIGNORINI, SIGNORINI, 1993).

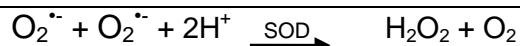


Figura 3- Processo de dismutação adaptado de (HALLIWELL, GUTTERIDGE, 1999).

Quando o  $\text{H}_2\text{O}_2$  recebe mais um elétron e um íon hidrogênio, é formado o radical hidroxil ( $\text{OH}^{\bullet}$ ), que é o mais reativo dos intermediários (SCHNEIDER; OLIVEIRA, 2004), o qual pode disparar reações amplificadoras. O  $\text{OH}^{\bullet}$  possui atividade citotóxica acentuada e não há sistema de defesa eficiente contra ele, podendo reagir com uma série de estruturas biológicas, podendo causar alterações na estrutura do DNA, danos em proteínas, inativação enzimática e peroxidação lipídica. O  $\text{OH}^{\bullet}$  pode ser formado quando o  $\text{H}_2\text{O}_2$  reage com íons ferro ou cobre (Figura- 4). A reação é conhecida como Reação de Fenton (VASCONCELOS *et al.*, 2007; SIGNORINI, SIGNORINI, 1993).

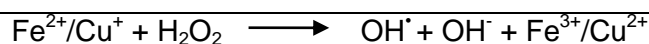


Figura 4- Reação de Fenton (SCHNEIDER, OLIVEIRA, 2004).

A participação de metais de transição, que atuam como agentes redutores, propicia uma via alternativa, não-enzimática, para a formação de radicais livres. O  $\text{OH}^\bullet$  é o mais citotóxico das ERO (SIGNORINI, SIGNORINI, 1993).

Em nosso organismo, os metais de transição são importantes para uma infinidade de processos. O ferro tem uma importância pronunciada, devido a sua biodisponibilidade no organismo, sendo que na maior parte do tempo encontra-se complexado com proteínas de transporte (ex: transferrina), e armazenamento (ex: ferritina e hemosiderina) (BARREIROS, DAVID, DAVID, 2006). No entanto, em alguns casos os metais podem causar reações com ações potencialmente deletérias, como a reação de Fenton. O ferro, em concentrações elevadas, pode causar degeneração cerebral, devido a esse local não ter defesas antioxidantes suficientes para combater esse dano (HALLIWELL, 1992).

Os íons de metais de transição podem também catalisar a reação entre  $\text{H}_2\text{O}_2$  e  $\text{O}_2^{\bullet-}$ , conduzindo à produção de  $\text{OH}^\bullet$  (Figura- 5), através da chamada Reação de Haber-Weiss (SCHNEIDER, OLIVEIRA, 2004).

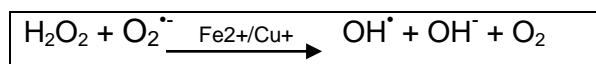


Figura 5- Reação de Haber-Weiss (SCHNEIDER, OLIVEIRA, 2004).

Outra espécie reativa é o óxido nítrico (NO), o qual nos organismos vivos é sintetizado pela ação de um grupo de enzimas óxido nítrico sintase (NOS), que converte o aminoácido L-arginina em NO e L-citrulina (HALLIWELL, GUTTERIDGE, 1999). É um radical abundante que participa de diversos processos biológicos, tendo função importante no controle da pressão arterial, devido sua ação vasodilatadora; também promove o relaxamento muscular; regula a neurotransmissão; a plasticidade sináptica; a expressão gênica e as defesas imunológicas. O NO se difunde rapidamente no meio celular e quando exposto reage com o  $\text{O}_2$  para formar dióxido de nitrogênio ( $\text{NO}_2$ ) (VASCONCELOS *et al.*, 2007).

Além disso, o  $\text{O}_2^{\bullet-}$  pode reagir diretamente com o NO, um radical livre centrado de nitrogênio, gerando peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ). Este pode levar à

formação de um oxidante de grande reatividade (Figura- 6) (SCHNEIDER, OLIVEIRA, 2004).

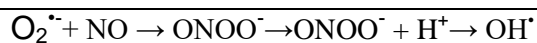


Figura 6- Formação do ONOO<sup>-</sup> e OH<sup>•</sup> a partir do O<sub>2</sub><sup>•-</sup> e NO (SCHNEIDER, OLIVEIRA, 2004).

As espécies reativas de nitrogênio (ERN), como o NO, ONOO<sup>-</sup>, o dióxido de nitrogênio (NO<sub>2</sub><sup>•</sup>) e o Cloreto de nitrila (NO<sub>2</sub>Cl), em níveis fisiopatológicos, apresentam alta instabilidade e podem reagir com moléculas biológicas através de reações de oxidação, favorecendo à geração de estresse oxidativo (VASCONCELOS *et al.*, 2007; WISEMAN, HALLIWELL, 1996).

### 3.5 Estresse oxidativo

A geração de ERO/ERN é inevitável no âmbito da vida, sob condições aeróbias eles são continuamente produzidos como produtos secundários de certas vias metabólicas e também por alguns sistemas específicos (intrínsecos e extrínsecos) do organismo. Da mesma forma podem ser degradados por meio de vários mecanismos específicos e inespecíficos, gerando certo equilíbrio entre os diferentes processos de geração de espécies reativas e a degradação dessas espécies, para que dessa forma tenhamos a manutenção da homeostase celular. No entanto, sob algumas circunstâncias, pode existir um desequilíbrio entre a formação de espécies reativas e as defesas antioxidantes, da qual o primeiro prevalece, dando origem ao estresse oxidativo, o qual está presente em muitos estados patológicos (HALLIWELL, GUTTERIDGE, 1999; LUSHCHAK, 2011).

O estresse oxidativo é uma condição resultante da descompensação gerada entre a formação de espécies reativas e as defesas existentes, podendo gerar danos estruturais em compostos orgânicos e a uma ampla variedade de biomoléculas (DNA, proteínas, carboidratos, lipídeos). Esses danos têm sido associados a diversas patologias, como por exemplo, inflamação, dislipidemias, processo de carcinogênese, envelhecimento, entre outras (MCINTYRE, HAZEN, 2010; SIES, 1986).

Para Lushchack (2012), as espécies reativas que atacam o organismo podem ser extrínsecas (xenobióticos), ligadas a fatores ambientais, poluentes, drogas, radiação, entre outras, que podem contribuir para a formação de potenciais agentes lesivos; e/ou intrínsecas, que podem não estar diretamente relacionadas com o metabolismo de espécies reativas, mas podem induzir estresse oxidativo de maneira indireta, como em situações em que ocorre depleção energética.

### 3.6 Mecanismo de dano a biomoléculas

#### 3.6.1 Peroxidação lipídica

Os lipídeos são componentes da membrana celular e cumprem papéis importantes como revestimento, proteção e permeabilidade seletiva (NELSON, COX, 2011; YIN, XU, PORTER, 2011). A peroxidação lipídica se constitui numa reação que deteriora os ácidos graxos de cadeia poli-insaturada. Na peroxidação lipídica as espécies reativas atacam os ácidos graxos poli-insaturados da bicamada lipídica, alterando o conteúdo transmembrana das células (HALLIWELL, GUTTERIDGE, 1999).

O mecanismo de peroxidação envolve reações em cadeia que ocorrem devido aos ataques das espécies reativas, que são descritas nas etapas a seguir (Tabela- 1) (YIN, XU, PORTER, 2011).

Tabela 1- Etapas da peroxidação lipídica

$LH + OH^{\bullet}$ (ou $LO^{\bullet}$ )	$\longrightarrow$ $L^{\bullet} + H_2O$ (ou $LOH$ )	Iniciação
$L^{\bullet} + O_2$	$\longrightarrow$ $LOO^{\bullet}$	propagação
$LH + LOO^{\bullet}$	$\longrightarrow$ $L^{\bullet} + LOOH$	propagação
$LOO^{\bullet} + L^{\bullet}$	$\longrightarrow$ $LOOL$	terminação
$LOO^{\bullet} + LOO^{\bullet}$	$\longrightarrow$ $LOOL + O_2$	terminação

Fonte: Adaptado de FERREIRA, MATSUBARA (1997).

A peroxidação lipídica envolve uma série de reações (Tabela- 1), que tem início com o sequestro do hidrogênio do ácido graxo poliinsaturado (LH) da

membrana celular. Esse sequestro pode ser realizado pelo  $\text{OH}^\bullet$  ou pelo radical  $\text{LO}^\bullet$  (radical alcóxila) com conseqüente formação de  $\text{L}^\bullet$  (radical lipídico). Na primeira equação de propagação, o  $\text{L}^\bullet$  reage rapidamente com o  $\text{O}_2$ , resultando em  $\text{LOO}^\bullet$  (radical peróxila), que por sua vez sequestra novo hidrogênio do ácido graxo poliinsaturado, formando novamente o  $\text{L}^\bullet$  na segunda equação de propagação. O término da lipoperoxidação ocorre quando os radicais ( $\text{L}^\bullet$  e  $\text{LOO}^\bullet$ ) produzidos na etapa anterior se propagam até autodestruição (SALLES, 2007).

Essas modificações oxidativas causam mudanças nas propriedades químicas e físicas das membranas, alterando sua fluidez e permeabilidade, com expansão do líquido intracelular e risco de ruptura das estruturas da membrana celular e das organelas, gerando um processo de morte celular (VASCONCELOS, *et al.*, 2007). Essas reações geram como produto o malondialdeído (MDA), um produto de decomposição de hidroperóxidos de lipídeos, que é utilizado como um indicador do dano oxidativo à células e tecidos que são reativas ao ácido tiobarbitúrico (BONNES, GUÉRIN, 1992; HALLIWELL, GUTTERIDGE, 1999).

A lipoperoxidação pode ser acelerada por íons metálicos, como o  $\text{Fe}^{2+}$  e  $\text{Cu}^+$  (Figura-7), que catalisam a decomposição dos hidroperóxidos lipídicos ( $\text{LOOH}$ ), levando a formação de radical peróxil ( $\text{ROO}^\bullet$ ) e alcóxil ( $\text{RO}^\bullet$ ), os quais continuam a peroxidação lipídica (FERREIRA, MATSUBARA, 1997; HALLIWELL, GUTTERIDGE, 1999).

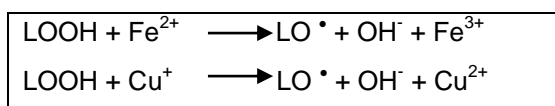


Figura 7- Lipoperoxidação catalizada por íons de Ferro e Cobre (FERREIRA, MATSUBARA, 1997; HALLIWELL, GUTTERIDGE, 1999).

Vários autores têm demonstrado o envolvimento do estresse oxidativo em doenças ateroscleróticas (MARTELLI, 2014; CORRÊA-CAMACHO, DIAS-MELICIO, SOARES, 2007). A oxidação da lipoproteína LDL tem papel decisivo na formação das células espumosas e causa lesão de células endoteliais, contribuindo dessa forma para a aterogênese. Por outro lado, as substâncias

antioxidantes tem potencial terapêutico importante para prevenir essa patologia (GIANINI, 1998).

### 3.6.2 Danos proteicos

A estrutura primária de uma proteína é composta de sequências de aminoácidos, o que faz com que cada proteína apresente funcionalidade distinta no organismo dos seres vivos. Alterações na cadeia polipeptídica de uma proteína, podem levar à desnaturação proteica e perda da sua função (NELSON, COX, 2011). As espécies reativas podem causar oxidação de cadeias laterais de aminoácidos em proteínas nos sistemas biológicos causando dano, o qual poderá ser de natureza reversível (oxidação da metionina) ou irreversível (clivagem do anel de histidina ou em triptofano) (SIES, 1986).

Durante o estresse oxidativo, o ataque às proteínas ocorre pela formação de um radical centrado no carbono, por extração de H<sup>•</sup> do carbono  $\alpha$ , em uma ligação peptídica, causando fragmentação das cadeias e oxidação dos aminoácidos mais susceptíveis, propiciando a geração de compostos carbonilados. As proteínas também podem conter sítios de ligação com metais, da qual são susceptíveis a reações que envolvem oxidação e redução, podendo gerar sinais que podem ser reconhecidos por proteases celulares que gerarão degradação proteica (VASCONCELOS *et al.*, 2007).

### 3.6.3 Danos ao DNA

O DNA detém as informações genéticas dos seres vivos e é fundamental manter sua integridade, porém constantemente é alvo de agentes químicos e físicos, que podem afetar sua função biológica. O DNA conta com diversos sistemas de reparo; um deles é o sistema de reparação de excisão de nucleotídeos (NER), que tem a função de monitorar sua estrutura e reparar os eventuais danos que possam ocorrer, e evitar possíveis lesões e/ou mutações que podem ser gerados nos genes, como por exemplo, na sequência de bases nitrogenadas que compõe os nucleotídeos (LAAT, JASPERS, HOEIJMAKERS,

1999; NELSON, COX 2011). As EROs podem provocar reações no DNA, por estresse oxidativo, capazes de induzir lesões devido a oxidação direta dos ácidos nucleicos, ou levar a quebra em uma das cadeias de DNA e erros no processo de replicação celular (BERRA, MENCK, MASCIO, 2006).

Para Barreiro, David e David (2006), os danos que podem ocorrer com o DNA e o Ácido Ribonucleico (RNA) são graves, pois podem desencadear vários processos patogênicos como a oncogênese.

### 3.7 Sistemas de defesa antioxidante

Em razão ao ataque de espécies reativas às principais biomoléculas, o organismo conta com compostos protetores, os agentes antioxidantes, que tem a função de promover defesa contra as ações agressoras provocadas pelas espécies reativas, para que assim haja equilíbrio favorável, evitando dessa forma lesões nas estruturas celulares e patologias advindas do processo de estresse oxidativo (HALLIWELL, GUTTERIDGE, 1999).

Sies e Stahl (1995) definem antioxidantes como qualquer substância que presente em baixas concentrações (em relação ao substrato oxidável), atrasa ou inibe a oxidação deste substrato de maneira efetiva. Esses agentes que protegem as células das espécies reativas podem ser classificados em antioxidantes enzimáticos e não-enzimáticos (Tabela- 2).

Tabela 2- Principais agentes que possuem defesa antioxidante

Não enzimática		Enzimática
α-tocoferol (vit. E)	Selênio	Superóxido dismutase (SOD)
β-caroteno	Glutathione	Catalase (CAT)
Ácido ascórbico (vit. C)	Clorofilina	NADPH-quinona oxidoreductase
Flavonóides	L-cisteína	Glutathione peroxidase(GSH-Px)
Proteínas do plasma	Curcumina	Enzimas de reparo

Fonte: Adaptado de BIANCHI, ANTUNES (1999).

Os antioxidantes podem ter origem endógena ou exógena; provenientes da dieta, como por exemplo, os alimentos ricos em vitamina C. Esses compostos podem agir de maneiras distintas, objetivando neutralizar a ação



dos radicais livres e de espécies não-radicais (SCHNEIDER, OLIVEIRA, 2004; VANNUCCHI *et al.*, 1998).

Os antioxidantes podem ser divididos em dois tipos principais de acordo com seu mecanismo de ação, sendo nomeados como antioxidantes primários e secundários. Os antioxidantes primários podem inibir ou retardar a oxidação de radicais livres por doação de átomos de hidrogênio ou elétrons, o que os converte em um produto mais estável. Já os antioxidantes secundários retardam a reação de autooxidação por muitos mecanismos, incluindo a ligação de íons metálicos, sequestro de oxigênio, conversão de hidroperóxidos em espécies não-radicais, absorvendo a radiação ultravioleta ou desativando o oxigênio *singlet* (GORDON 1990; MAISUTHISAKUL, SUTTAJIT, PONGSAWATMANIT, 2007).

### 3.7.1 Enzimas com ação antioxidante

#### 3.7.1.1 Superóxido dismutase (SOD)

A SOD é uma metaloenzima com ação antioxidante. Em sistemas eucarióticos, a SOD possui como grupo prostético cobre (Cu) e zinco (Zn) e se encontra presente no citosol. Por outro lado, a SOD manganês (Mg) é encontrada primariamente na mitocôndria, e a SOD com grupo prostético ferro (Fe), está presente em procariontes. As diferentes formas relacionadas da SOD catalisam a mesma reação, a de dismutação do radical superóxido (Figura- 8) (FERREIRA, MATSUBARA, 1997; VANNUCCHI *et al.*, 1998).

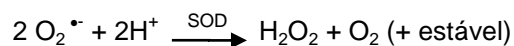


FIGURA 8- Reação de dismutação realizada pela SOD resultando em H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e O<sub>2</sub>. Adaptado de VANNUCCHI *et al.*, (1998).

#### 3.7.1.2 Catalase (CAT)

A CAT é uma hemeproteína citoplasmática que pode ser encontrada na matriz peroxomal (SIES, 1986), presente nos principais órgãos, estando especialmente concentrada no fígado e eritrócitos. É uma das principais

enzimas que atuam na eliminação do  $\text{H}_2\text{O}_2$ . A CAT apresenta importantes funções tanto catalíticas quanto peroxidativas no organismo (Figura- 9) (VANNUCCHI, *et al.*, 1998; HALLIWELL, GUTTERIDGE, 1999).

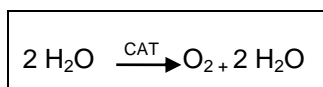


FIGURA 9- Reação de decomposição do peróxido de hidrogênio pela enzima catalase. Fonte: (SCHNEIDER, OLIVEIRA, 2004).

A enzima CAT remove o  $\text{H}_2\text{O}_2$ , resultando em duas moléculas de água e uma de  $\text{O}_2$  (HALLIWELL, GUTTERIDGE, 1999).

### 3.7.1.3 Glutationa Peroxidase (GSH-Px) e glutaciona (GSH)

A GSH atua no processo de desintoxicação por agentes xenobióticos, na correção dos danos causados por esses agentes e também em muitos processos biológicos importantes, incluindo a síntese de proteínas, metabolismo e proteção celular. É um cofator nas reações de isomerização e é considerada uma forma de armazenamento e de transporte da cisteína (MEISTER, ANDERSON, 1983; TEKMAN *et al.*, 2008).

A Glutationa peroxidase (GSH-Px) é uma selenoenzima que catalisa a redução dos hidroperóxidos. Atua na proteção contra o estresse oxidativo, convertendo a glutaciona reduzida (GSH) em glutaciona oxidada (GSSG), e dessa forma removendo  $\text{H}_2\text{O}_2$  e formando água (Figura- 10) (FERREIRA, MATSUBARA, 1997; HALLIWELL, GUTTERIDGE, 1999).



Figura 10 - Reação catalisada pela enzima glutaciona peroxidase. Fonte: (SCHNEIDER, OLIVEIRA, 2004).



Figura 11- Reação catalisada pela enzima glutatona reduzida. Adaptado de Halliwell, Gutteridge (1999).

A molécula de GSSG, formada nessa reação (Figura- 10), é regenerada à sua forma reduzida (GSH), cuja reação utiliza elétrons provenientes da nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) formado na via pentose-fosfato. Essa reação é catalisada por uma segunda enzima, a glutatona redutase (GS-red) (Figura- 11). Apesar desta enzima não atuar diretamente na remoção de espécies radicalares, ela age juntamente com a GSH-Px, impedindo a paralização do ciclo metabólico da glutatona (HUBER, ALMEIDA, FÁTIMA, 2008; FERREIRA, MATSUBARA, 1997; VANNUCCHI *et al.*, 1998; ROVER-JÚNIOR *et al.*, 2001).

As enzimas CAT e GSH-Px, possuem ações similares, pois agem com o mesmo propósito, impedindo o acúmulo de  $H_2O_2$ . Essa ação integrada é de grande importância, uma vez que essa espécie reativa, por meio das reações de Fenton e Haber-Weiss, mediante a participação dos metais ferro e cobre, culmina na geração do radical  $OH^\bullet$ , da qual não há sistema enzimático de defesa (FERREIRA, MATSUBARA, 1997; SCHNEIDER, OLIVEIRA, 2004).

### 3.7.2 Principais Antioxidantes exógenos

Dentre os principais antioxidantes exógenos cita-se o ácido ascórbico, alfa tocoferol e os flavonoides.

O ácido ascórbico (vitamina C) apresenta solubilidade em água (SIES, 1983). É considerado um importante antioxidante, sendo que após ingestão é absorvido de forma rápida e eficiente por um processo dependente de energia (BIANCHI, ANTUNES, 1999). A vitamina C cumpre diversas funções biológicas e pode atuar como cofator enzimático em diversas reações e atua também na varredura de diversas espécies reativas (HALLIWELL, GUTTERIDGE, 1999).

O alfa tocoferol (vitamina E) é um componente encontrado em oleaginosas, sendo que na natureza é encontrado em diferentes formas  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$

e  $\delta$ -tocoferol. O  $\alpha$ -tocoferol é a forma mais pronunciada de ação antioxidante no organismo (BIANCHI, ANTUNES, 1999). Sua ação é centrada na conversão dos radicais livres em produtos eletricamente com maior estabilidade ou menos reativos, a qual ocorre pela doação de um átomo de hidrogênio. Nesse processo, a vitamina E, converte-se no radical tocoferil, que após é reduzido novamente a alfa tocoferol sob ação do ácido ascórbico, da GSH e da coenzima Q10. Também participa da proteção contra a peroxidação lipídica, uma vez que reduz o  $ROO^{\bullet}$  e o  $RO^{\bullet}$  (NWOSE *et al.*, 2008).

Estudos revelam que o consumo de antioxidantes presentes em frutas e vegetais traz diversos benefícios terapêuticos e profiláticos, associados à redução do risco de doenças crônicas relacionadas ao estresse oxidativo. Algumas plantas apresentam ação antioxidante, como os compostos fenólicos e os flavonoides que agem neutralizando as espécies reativas. Os flavonoides são antioxidantes eficazes e podem proteger contra várias doenças crônicas como câncer, DCVs, diabetes, Alzheimer, envelhecimento precoce, entre outras moléstias e até mesmo poluição ambiental, que são responsáveis pela geração de radicais livres (LUSHCHAK, 2012; SUN *et al.*, 2002; WU *et al.*, 2004).

### 3.7.2.1 Compostos polifenólicos e flavonóides

Os compostos polifenólicos são originários do metabolismo secundário das plantas. Quimicamente sua fórmula apresenta pelo menos um anel aromático ligado a uma ou mais hidroxilas. Estes compostos compõem uma ampla classe de fitoquímicos e podem ser categorizados em flavonoides e não-flavonoides. São de grande interesse nutricional para a saúde humana e sua utilização traz diversos benefícios ao indivíduo, uma vez que possuem ação antioxidante, combatendo a propagação dos radicais livres e os efeitos deletérios causados por eles (BRAVO, 1998; FRAGA *et al.*, 2010; KARAKAYA, 2004; MAISUTHISAKUL, SUTTAJIT, PONGSAWATMANIT, 2007).

As moléculas de flavonoides estão difundidas nos componentes das plantas, especialmente em folhas e frutos, seja como glicosídeos ou agliconas. Os flavonoides possuem estrutura química ideal para o sequestro de radicais livres, o que os confere atividade antioxidante. Esses atuam como agente

doador de hidrogênio e elétrons, formando o radical flavanoil que é estável, também possui capacidade de sequestro de radicais livres e ação quelante de metais de transição, demonstrando dessa forma sua ação antioxidante. Além de atuarem como agentes redutores sequestrando as EROs, também agem numa multiplicidade de funções em células eucariotas, desempenhando funções protetoras, eficazes também contra reações de lipoperoxidação (BARREIROS, DAVID, DAVID 2006; HUDSON, 1990).

Estudos tem reportado a importância dos compostos bioativos presentes nas plantas e sua aplicabilidade na farmacologia (BALIGA *et al.*, 2011; FARNSWORTH, 1985). Os compostos polifenóis, especialmente os flavonoides, apresentam compostos bioativos que podem ser utilizados com fins terapêuticos, como em doenças crônico-degenerativas, DCVs, especialmente hiperlipidemia, evitando danos oxidativos induzidos pelos radicais livres a biomoléculas, como exemplo agindo na prevenção da peroxidação lipídica, devido a suas propriedades antioxidantes (HODGSON, PUDDEY, 2005; HUDSON, 1990).

### **3.8 Utilização de plantas medicinais como fonte terapêutica**

A utilização de plantas medicinais e suas virtudes terapêuticas foram sendo adquiridas durante séculos, sendo que o conhecimento empírico proveniente de comunidades e grupos étnicos permanece na atualidade, apresenta valor inexorável e contribui para execução de pesquisas (DI STASI, 1996).

Ao longo da evolução foi se desenvolvendo o conhecimento a respeito da utilização das plantas medicinais e de seus respectivos compostos bioativos, sendo largamente investigados para uso fitoterápico, através da exploração do vasto arsenal terapêutico dos recursos naturais existentes. Essas fontes naturais são estudadas com o objetivo de descobrir princípios ativos capazes de fornecer alternativas terapêuticas seguras, padronizadas, eficazes e não tóxicas. A farmacologia possibilita o estudo dos efeitos farmacológicos de extratos e/ou de seus constituintes químicos com propósito de descobrir substâncias ativas eficazes e seguras (ALBUQUERQUE, HANAZAKI, 2006; FARNSWORTH, 1985; MACIEL *et al.*, 2002).

### 3.8.1 Efeitos biológicos de *Eugênia brasiliensis*

A família Myrtaceae, a maior na ordem das Myrtales, contém cerca de 100 gêneros, destacando-se *Eugenia*, *Plinia*, *Psidium*, e aproximadamente 3.000 espécies, com dois centros de dispersão, nas Américas e na Austrália, embora ocorra em todo o mundo (SCHUTZ, 1980). Dentre os gêneros pertencentes à família Myrtaceae estão as espécies de *Eugenia*. A espécie *Eugenia brasiliensis* Lam. (Figura- 12) é conhecida pelos nomes de “grumixama”, “grumixameira” e “cereja-brasileira”, é uma árvore de 10 a 15 metros de altura, de tronco curto, casca fina e descamante, galhos racemosos, finos e abundantes, que formam uma copa estreita e muito alongada. Suas folhas são coriáceas, oblongas ou ovaladas, verde-escuras e muito densas, opostas, de 6,5 a 10 cm de comprimento e 2,5 a 5 cm de largura, atenuadas na base, com pecíolo de 4 a 7 mm. Possui pedúnculos com apenas uma flor, de 2 a 4 cm. Possui frutos globosos roxo-escuros, vermelhos ou amarelos tipo baga, com cerca de 1 cm, coroados pelas sépalas resistentes e contém uma semente. Esta espécie está presente desde os estados do Nordeste até a mata pluvial atlântica do Sul do Brasil, e em Santa Catarina nas regiões de Florianópolis, Brusque, Ibirama, Itajaí e Joinville (REITZ, KLEIN, 1969).



Figura 12. Aspecto das folhas, flores e frutos de *Eugenia brasiliensis*. Fonte: MAGINA (2008).

A planta *Eugenia brasiliensis* é utilizada na medicina popular, na forma de infusão das folhas. Já seus frutos, são usados como alimento e para a preparação de bebidas fermentadas (REVILLA, 2002). Dos extratos de suas folhas foram descritos flavonoides como a quercetina, rutina, galangina e miricetina, além de outros compostos fenólicos como catequina, galocatequina

e ácido gálico (PIETROVSKI *et al.*, 2008); os triterpenos betulina,  $\alpha$ - amirina e  $\beta$ -amirina, ácido 29-hidroxi-oleanólico (MAGINA *et al.*, 2012) e ácido ursólico (FRIGHETTO *et al.*, 2005).

São encontrados poucos estudos químicos e/ou farmacológicos sobre a planta *Eugenia brasiliensis*, e a mesma têm sido descrita como uma espécie que apresenta compostos bioativos diversificados. É utilizada na medicina popular e apresenta várias aplicabilidades, como alimento, pelo consumo de seus frutos, e utilização para vários fins terapêuticos; sendo que foram descritas atividades antimicrobianas (BENFATTI *et al.*, 2010; MAGINA *et al.*, 2012). De acordo com os estudos de Pietrovski e colaboradores (2008), o extrato bruto hidroalcoólico das folhas de *Eugenia brasiliensis* apresentou atividade anti-inflamatória; no tratamento de reumatismo e artrite; antidiarreica e diurética (REVILLA, 2002). Flores *et al.* (2012), descreveram que a *Eugenia brasiliensis* apresenta atividade antioxidante e anti-inflamatória na terapia à Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC) e a relacionaram com a presença de antocianinas, que é um subgrupo pertencente aos flavonoides. Magina e colaboradores (2010) também destacam atividade antioxidante à planta e a associaram ao conteúdo de fenólicos totais e de flavonoides contidos nos extratos e frações.

### **3.9 Caracterização e uso de medicamentos fitoterápicos no Brasil**

Como órgão responsável pelo registro de medicamentos, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) atribui que o medicamento fitoterápico é empregado exclusivamente de matérias-primas proveniente de vegetais, sendo caracterizado pelo conhecimento prévio da eficácia e dos riscos inerentes ao seu uso (toxicidade, interações medicamentosas), assim como pela reprodutibilidade, estabilidade na sua fórmula e segurança validadas, através de levantamentos etnofarmacológicos, documentações tecnocientíficas em publicações e ensaios clínicos com as devidas padronizações e obediência das legislações vigentes (NICOLETTI *et al.*, 2007).

Com relação ao estudo e desenvolvimento de novos fármacos, a atuação do Brasil ainda é incipiente e não possui atuação destacada no

mercado mundial de fitoterápicos. O que se contrapõe pelo fato do Brasil deter uma extensa biodiversidade de flora vegetal, contendo aproximadamente um terço da flora mundial (YUNES, PEDROSA, CECHINEL-FILHO, 2001).

Estima-se que no mercado mundial a comercialização de fitoterápicos gira cerca de 22 bilhões de dólares (YUNES, PEDROSA, CECHINEL-FILHO, 2001), sendo que na Europa e nos Estados Unidos da América (EUA) 8,5 e 6,3 bilhões de dólares, respectivamente. No Brasil estima-se que girou em torno de 500 milhões de dólares no ano de 2000 (SIMÕES, SCHENKEL, 2002). Apesar do mercado farmacêutico dos medicamentos sintéticos dominarem o mercado, os fitoterápicos apresentam-se como um mercado em constante ascensão (CARVALHO *et al.*, 2007). Para a obtenção de novos fármacos contendo substâncias fitoterápicas, tornam-se necessários mais estudos para análise detalhada de substâncias ativas eficazes, capazes de serem administradas em doses adequadas e com o mínimo de efeitos indesejados, tendo em vista a riqueza da flora vegetal existente no Brasil.



## 4 METODOLOGIA

### 4.1 Animais

No experimento foram utilizados ratos Wistar machos de 60 dias de idade (230-280 g), provenientes da Univali (Itajaí), Santa Catarina, Brasil. Os animais foram desmamados aos 21 dias de idade. Antes do processo de experimentação, os animais foram acomodados e aclimatados por 7 dias, para a adaptação ao novo ambiente. Foram mantidos em um ciclo 12 h claro/escuro a temperatura constante de 22°C com livre acesso à comida e água. Os animais foram mantidos 6 por gaiola. Os cuidados com os animais seguiram as diretrizes governamentais oficiais conforme a Federação das Sociedades Brasileiras para Biologia Experimental aprovada pelo Comitê de Ética da Universidade da Região de Joinville sob o protocolo de número 002/2015 – PRPPG/CEP. Todos os produtos químicos foram adquiridos da Sigma Chemical Co., St Louis, MO, EUA, exceto o óleo de coco e os extratos.

As condições de ambiente, iluminação, acomodação e nutrição seguiram as recomendações exigidas pelo "*Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*, 1996".

Os experimentos foram realizados conforme as normas da legislação e ética para a prática didático-científica da vivisseção de animais de acordo com a Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008 que estabelece os procedimentos para o uso científico de animais (BRASIL, 2008).

### 4.2 Extratos provenientes das folhas de *Eugenia brasiliensis*

#### 4.2.1 Material vegetal

As folhas de *E. brasiliensis* foram coletadas em Florianópolis, Estado de Santa Catarina (27 ° 36'13.65 "S, 48 ° 31'14.75" W), em março de 2012. Material vegetal foi identificado pelo Dr. Daniel de Barcellos Falkenberg do Departamento de Botânica Da Universidade Federal de Santa Catarina

(UFSC), e um espécime voucher foi depositado no herbário FLOR da mesma instituição sob o registro número 34675.

#### 4.2.2 Preparo do material vegetal de *E. brasiliensis*

Para a obtenção dos extratos foram utilizadas folhas frescas, inteiras, jovens e sadias da espécie *E. brasiliensis*.

Para a obtenção do Extrato bruto hidroalcolólico (EBH), as folhas foram submetidas à estufa com circulação de ar à 50°C e moídas em moinho de facas, para obtenção de folhas secas e trituradas. Este material foi submetido a procedimento de maceração em etanol 92,8 % (p/p) durante sete dias. O extrato obtido foi filtrado e o solvente extrator evaporado em rota-evaporador (com temperatura inferior a 60°C) com condensador acoplado sob vácuo, sendo concentrado até seu volume ser reduzido. Este mesmo procedimento foi realizado por mais duas vezes e, após a evaporação total do solvente, foi obtido o extrato.

Para a obtenção do extrato bruto acetônico (EBA), as folhas foram submetidas a um processo de extração em acetona. As folhas foram imersas em acetona durante 5 minutos (LUZ, 2003). Após esse tempo, o extrato obtido foi filtrado e o solvente extrator evaporado em rota-evaporador (com temperatura inferior a 60°C) com condensador acoplado sob vácuo, até sua completa evaporação, subsequentemente triturado via maceração, obtendo-se dessa forma o extrato.

### 4.3 Tratamentos

#### 4.3.1 Protocolos experimentais

Para a indução da HTG, os animais receberam óleo de coco, a uma dose de 2 mL por dia via oral (gavagem) durante 15 dias. A quantidade administrada de óleo de coco seguiu o protocolo estabelecido por Jun *et al.*, (2007).

Inicialmente os ratos foram divididos em 2 grupos (n = 7): Grupo controle: recebeu 1 mL de salina via gavagem, duas vezes por dia (15 dias); e

grupo dislipêmico recebeu 1 mL de óleo de coco via gavagem duas vezes por dia (15 dias).

Em seguida, os ratos foram divididos em 14 grupos (n = 6), como se segue: **Grupo controle:** recebeu 1 mL de salina via gavagem uma vez por dia durante 15 dias e depois receberam 1 mL de salina via gavagem, três vezes por dia (num total de 30 dias); **Grupo dislipêmico** recebeu 1 mL de salina via gavagem uma vez ao dia durante 30 dias e na metade do tratamento (15 dias) 1 mL de óleo de coco via gavagem duas vezes ao dia (totalizando de 30 dias); **Grupo tratamento controle+ EBH:** foi administrado EBH de *E. brasiliensis* (50, 100 ou 150 mg/kg) via gavagem uma vez ao dia durante 30 dias e na metade do tratamento (15 dias) 1 mL de salina via gavagem, duas vezes ao dia (totalizando 30 dias); **Grupo tratamento controle+ EBA:** recebeu EBA de *E. brasiliensis* (50, 100 ou 150 mg/kg) via gavagem uma vez por dia durante 30 dias e na metade do tratamento (15 dias) 1 mL de salina via gavagem, duas vezes por dia (totalizando 30 dias); **Grupo tratamento dislipêmico+ EBH:** recebeu EBH de *E. brasiliensis* (50, 100 ou 150 mg/kg) via gavagem uma vez por dia durante 30 dias e na metade do tratamento (15 dias) receberam 1 mL de óleo de coco via gavagem duas vezes ao dia (totalizando 30 dias de tratamento); **Grupo tratamento dislipêmico+ EBA:** recebeu EBA de *E. brasiliensis* (50, 100 ou 150 mg/kg) via gavagem uma vez ao dia durante 30 dias e na metade do tratamento (15 dias) receberam 1 mL de óleo de coco via gavagem duas vezes ao dia (totalizando de 30 dias de tratamento). 24 horas após a última administração, os animais foram sacrificados por decapitação, na ausência de anestesia e em seguida, o sangue foi coletado e o fígado removido para a avaliação dos parâmetros de estresse oxidativo, triglicerídeos e análise histopatológica.

As doses dos extratos EBH (50, 100 e 150 mg/kg) e EBA (50, 100 e 150 mg/kg) foram escolhidas com base nos estudos de Kar *et al.*, (2003); Ravi *et al.*, (2005) e Ravi *et al.*, (2004).

#### 4.4 Estudos bioquímicos

##### 4.4.1 Preparação dos eritrócitos e do plasma

Os eritrócitos e o plasma foram preparados a partir de amostras de sangue total obtidas dos ratos. As amostras de sangue foram identificadas e centrifugadas a 1,000 x g, o plasma foi separado e congelado para posterior determinação. Os eritrócitos foram lavados 3 vezes com solução salina gelada (0,153 mol/L cloreto de sódio). Os lisados foram preparados através da adição de 1 mL de água destilada para 100 µL de eritrócitos lavados e congelados (-80°C) até a determinação da atividade das enzimas antioxidantes.

Para determinação da atividade das enzimas antioxidantes, eritrócitos foram congelados e descongelados 3 vezes e centrifugados a 13,500 x g por 10 min. O sobrenadante foi diluído para conter cerca de 0,5 mg/mL de proteína.

#### 4.4.2 Preparação do tecido

O fígado foi removido e mantido em tampão fosfato de sódio gelado (154 mM NaCl, 5 mM Tris-HEPES, pH 7.5). O fígado foi homogeneizado em dez volumes (1: 10 W/v) de tampão adequado conforme técnica realizada. Homogeneizados foram preparados utilizando um homogeneizador Potter-Elvehjem (motores Remi, Mumbai, Índia); pela passagem de 5 impulsos e centrifugação a 800 x g durante 10 min a 4°C para remoção de resíduos celulares. O sedimento foi descartado e o sobrenadante foi estocado em alíquotas e armazenado a -80°C para determinação da atividade das enzimas antioxidantes, TBA-RS, proteínas carboniladas e conteúdo total de sulfidrilas (FERREIRA *et al.*, 2012).

#### 4.4.3 Análise histopatológica

Após o sacrifício dos animais, rapidamente o fígado foi removido, e fixado em formalina a 10% durante 24 horas e depois transferido para solução etanólica a 70%. Depois, os órgãos foram passados através de soluções com concentrações crescentes de álcool e incorporados em parafina para o procedimento de histologia de rotina.

As secções de 7 µm foram coradas com hematoxilina e eosina (HE) e observadas com um microscópio Olympus (Olympus CX3). A acumulação lipídica nas células hepáticas foi classificada numa escala de gravidade

variando de 0 a 5 (0 = ausente, 1 = mínimo, 2 = ligeiro, 3 = moderado, 4 = marcado e 5 = grave) (ZENI *et al.*, 2013). Esta classificação foi determinada com uma escala que considerou a extensão média das inclusões lipídicas hepáticas.

#### 4.4.4 Dosagem de triglicerídeos

A dosagem de triglicerídeos foi realizada utilizando o kit de Triglicerídeos Liquiform. As determinações foram realizadas por espectrofotometria.

#### 4.4.5 Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS)

TBA-RS foi determinada de acordo com o método descrito por Ohkawa *et al.*, (1979). A metodologia para análise do TBA-RS mensura o Malondialdeído (MDA), um produto da lipoperoxidação, causada principalmente por radicais livres hidroxil. Para as medições *in vitro*, plasma e tecido foram misturados com ácido tricloroacético a 10% e 0,67% de ácido tiobarbitúrico e aqueceu-se num banho de água a ferver durante 25 min. TBA-RS foi determinada pela absorvância a 535 nm. Uma curva de calibração foi obtido utilizando 1,1,3,3-tetrametoxipropano como o precursor de MDA e cada ponto da curva foi submetido ao mesmo tratamento que o dos sobrenadantes. Os resultados foram expressos em nmol de MDA por mg de proteína.

#### 4.4.6 Conteúdo Total de Sulfidrilas

O conteúdo total de sulfidrilas foi determinado de acordo com o método descrito por Aksenov e Markesbery (2001), o qual se baseia na redução do ácido ditionitrobenzóico (DTNB) por tióis, gerando um derivado amarelo (TNB) que é mensurado espectrofotometricamente em 412 nm. Resumidamente, 50 µL de homogeneizado foram adicionados a 1 mL de tampão PBS pH 7,4 contendo EDTA 1 mM. A reação foi iniciada pela adição de 30 µl de DTNB 10,0 mM e incubada durante 30 minutos à temperatura ambiente em local escuro. Os resultados foram expressos em nmol TNB/mg de proteína.

#### 4.4.7 Catalase

A atividade de CAT foi ensaiada pelo método de Aebi (1984), usando um espectrofotômetro Shimadzu UV-visível. O método utilizado baseia-se no desaparecimento de  $\text{H}_2\text{O}_2$  a 240 nm num meio de reação contendo 20 mM de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 0,1% de Triton X-100, 10 mM de tampão de fosfato de potássio, pH 7,0, e a proteína 0,1-0,3 mg/mL. Uma unidade é definida como CAT 1  $\mu\text{mol}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  consumido por minuto e a atividade específica é calculada como unidades de CAT/mg de proteína.

#### 4.4.8 Glutathione Peroxidase (GSH-Px)

A atividade de GSH-Px foi mensurada pelo método de Wendel (1981), utilizando terc-butil-hidroperóxido como substrato. A decomposição do NADPH monitorada em espectrofotômetro a 340 nm por 4 minutos usando um espectrofotômetro Shimadzu UV-visível. O meio continha 2 mM de GSH, 0,15U/ml GSH redutase, 0,4 mM de azida, 0,5 mM e 0,1 mM tertbutyl-hidroperóxido de NADPH. Uma unidade de GSH-Px é definida como 1  $\mu\text{mol}$  de NADPH consumido por minuto e a atividade específica é apresentada como unidades de GSH-Px /mg de proteína.

#### 4.4.9 Superóxido Dismutase (SOD)

A atividade da SOD foi determinada pelo método de auto-oxidação do pirogalol, como descrito por Marklund (1985), um processo altamente dependente de superóxido ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ), que é um substrato para a SOD. Resumidamente, 15  $\mu\text{l}$  de cada amostra, 215  $\mu\text{l}$  de uma mistura contendo 50  $\mu\text{M}$  de tampão Tris, pH 8,2 foram adicionados 1  $\mu\text{M}$  de EDTA e 30  $\mu\text{M}$  de CAT. Subsequentemente, foram adicionados 20  $\mu\text{L}$  de pirogalol e a absorvância foi registrada imediatamente a cada 30 segundos durante 3 minutos a 420 nm usando um espectrofotômetro Shimadzu UV-visível. A inibição da auto-oxidação do pirogalol ocorre na presença de SOD, cuja atividade pode ser indiretamente testada espectrofotometricamente. Uma curva de calibração foi realizada com SOD purificada como referência, para calcular a atividade da

SOD presente nas amostras. Uma unidade de SOD é definida como a quantidade de SOD necessária para inibir 50% da auto-oxidação de pirogallol e a atividade específica é relatado como unidades/mg de proteína SOD.

#### 4.4.10 Conteúdo de proteínas carboniladas

O teor de carbonilas foi verificado através de um método descrito por Reznick e Packer (1994), com base na reação de carbonilação de proteínas com dinitrofenilhidrazina formando dinitrofenilhidrazona, um composto amarelo, medido espectrofotometricamente a 370 nm. Resumidamente, 200 mL de homogeneizado foram adicionados a tubos de plástico contendo 400 µL de 10 mM dinitrofenilhidrazina 10 mM (preparado em HCl 2 M). As amostras foram mantidas no escuro durante 1 h e agitada em vórtex a cada 15 min. Subsequentemente, 500 µL de ácido tricloroacético a 20% foram adicionados a cada tubo. A mistura foi submetida ao vórtex e centrifugadas a 14.000 x g durante 3 min e o sobrenadante obtido foi descartado. O sedimento foi lavado com 1 mL de etanol/acetato de etila (1: 1 v/v), agitadas e centrifugadas a 14000 x g durante 3 min. O sobrenadante foi rejeitado e o sedimento ressuspensionado em 600 µL de guanidina 6 M (preparado numa solução de fosfato de potássio 20 mM, pH 2,3), antes de agitação em vórtex e incubação a 60°C durante 15 min. As amostras foram em seguida centrifugadas a 14.000 x g durante 3 min e o sobrenadante foi usado para medir a absorvância a 370 nm (UV) numa cubeta de quartzo. Os resultados foram relatados como conteúdo total de carbonilas (nmol/mg de proteína).

#### 4.4.11 Dosagem de Proteínas

A determinação das proteínas foi realizada pelo método de Lowry (1951), utilizando-se albumina sérica bovina como padrão.

### 4.5 Análise estatística

Os dados foram analisados por ANOVA, seguido pelo teste *post-hoc* de Duncan, quando o teste F foi significativo. Todas as análises foram realizadas

com o software *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS) com computador compatível. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados significativos. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  DP para sete experiências independentes (animais) realizadas em duplicata. \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*  $p < 0,01$  e \*  $p < 0,05$ , em comparação com o grupo de controle (*Duncan's multiple range test*). Para análise histológica, as pontuações foram comparadas estatisticamente utilizando o teste de Kruskal-Wallis, seguido do pós teste de *Dunns* (Graph Pad versão 5.0).



## 5. INTERDISCIPLINARIDADE

As DCVs fazem parte de um grupo de doenças de elevada prevalência, e acentuada taxa de morbimortalidade, é considerada um problema de saúde pública de origem multifatorial. Consequentemente impactam a qualidade de vida da população e a economia global, uma vez que gera elevado custo ao sistema de saúde, sendo as dislipidemias um importante fator desencadeador.

A HTG é caracterizada pelo aumento dos níveis plasmáticos de triglicérides, considerada um fator de risco independente para o desenvolvimento de DCVs, sendo a aterosclerose um importante marcador, nela ocorrem danos oxidativos e inflamatórios no espaço intimal dos vasos sanguíneos, danificando-os e dessa forma aumentando a fragilidade vascular, contribuindo para o acometimento por DCVs.

A utilização de plantas medicinais é tida como milenar, ao longo dos anos essa busca por plantas com potenciais farmacológicos foi ganhando destaque e vem sendo alvo de pesquisas de cunho científico, para atestar a atividade farmacológica das substâncias de origem vegetal, uma vez que existe preocupação do homem com a cura de doenças, e que ao mesmo tempo possam viabilizar medicamentos de qualidade, eficácia e segurança em sua composição; sendo dessa forma possível aliá-las à medicina, trazendo grandes avanços do ponto de vista terapêutico à população.

Para isso tornam-se necessárias medidas para suprir as necessidades da população de forma a promover ações que integrem saúde e meio ambiente, com o objetivo de melhorar a qualidade de vida da população e integrá-la de forma sustentável, para que dessa forma seja preservado o direito individual e coletivo; bem como o acesso à saúde e ao meio ambiente às futuras gerações. Tendo em vista a riqueza e a biodiversidade da flora brasileira, é necessária uma melhor triagem do potencial medicinal das plantas no Brasil, enfocando sua preservação e utilização sustentável. O estudo com a utilização de *E. brasiliensis* proposto nesse trabalho, tem por objetivo estudar o potencial terapêutico dessa planta, afim de buscar terapias adjuvantes no tratamento da HTG e potencial antioxidante.

## 6 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 6.1 Artigo:

#### **HYPOLIPEMIANT AND ANTIOXIDANT EFFECTS OF *Eugenia brasiliensis* IN AN ANIMAL MODEL OF COCONUT OIL-INDUCED HYPERTRIGLYCERIDEMIA**

Aline Barbosa Lima<sup>2</sup>, Daniela Delwing-de Lima<sup>1,2\*</sup>, Mariana Ramos Vieira<sup>1</sup>, Marina Zordan Poletto<sup>1</sup>, Débora Delwing-Dal Magro<sup>4</sup>, Sara Cristiane Barauna<sup>4</sup>, Michele Debiasi Alberton<sup>5</sup>, Eduardo Manoel Pereira<sup>3</sup>, Nariana Regina Pereira<sup>3</sup>, Eloise Mariane Salamaia<sup>1</sup>, Diogo Alexandre Siebert<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Departamentode Medicina, Universidade da Região de Joinville– UNIVILLE, Rua Paulo Malschitzki, 10- Zona Industrial Norte, CEP 89201-972, Joinville, SC, Brazil.

<sup>2</sup> Programa de Pós-Graduação em Saúde e Meio Ambiente, Universidade da Região de Joinville– UNIVILLE, Rua Paulo Malschitzki, 10- Zona Industrial Norte, CEP 89201-972, Joinville, SC, Brazil.

<sup>3</sup> Departamento de Farmácia, Universidade da Região de Joinville– UNIVILLE, Rua Paulo Malschitzki, 10-Zona Industrial Norte, CEP 89201-972, Joinville, SC, Brazil.

<sup>4</sup> Departamento de Ciências Naturais, Centro de Ciências Exatas e Naturais, Universidade Regional de Blumenau, Rua Antônio da Veiga, 140, CEP 89012-900, Blumenau, SC, Brazil.

<sup>5</sup> Departamento de Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Regional de Blumenau, Rua Antônio da Veiga, 140, CEP 89012-900, Blumenau, SC, Brazil.

\*Address for correspondence: Dr. Daniela Delwing de Lima, Departamento de Medicina, Universidade da Região de Joinville, Rua Paulo Malschitzki, 10 - Zona Industrial Norte, CEP 89201-972, Joinville, SC, Brazil, Phone 55 47 3461 9112, E-mail: [daniela.delwing@univille.br](mailto:daniela.delwing@univille.br); [danidelwing@hotmail.com](mailto:danidelwing@hotmail.com)

## ABSTRACT

We investigated the effects of the chronic administration of crude hydroalcoholic extract (CHE) and crude acetic extract (CAE), obtained from the leaves of *Eugenia brasiliensis*, on the blood and liver parameters of rats subjected to coconut oil-induced hypertriglyceridemia (HTG). Triglyceride levels, liver cell lipid accumulation, thiobarbituric acid reactive substances (TBA-RS), total sulfhydryl content, protein carbonyl content, and the activities of the antioxidant enzymes, catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GSH-Px), were evaluated. Initially, animals received 15 days of coconut oil or saline administration; subsequently they received CHE or CAE (50, 100 or 150 mg/kg) for 30 days, plus coconut oil or saline for 15 days. Results showed that coconut oil enhanced triglyceride levels by promoting lipid accumulation in hepatocytes, enhanced TBA-RS and reduced total sulfhydryl content and CAT activity, but did not alter protein carbonyl content, or SOD and GSH-Px activities, in the blood of rats. Furthermore, coconut oil increased CAT and decreased SOD and GSH-Px activities, but did not alter TBA-RS, total sulfhydryl content and protein carbonyl content in the livers of rats. Chronic administration of CHE or CAE for 30 days was able to prevent HTG and decrease the lipid droplets in liver cells, as well as the majority of alterations caused by oxidative stress parameters in the blood and liver of rats. These findings indicate that both extracts, obtained from the leaves of *Eugenia brasiliensis*, may have hypolipidemic effects and high antioxidant capacities, however, further studies are necessary to evaluate their pharmacologic effect.

**Keywords:** hypertriglyceridemia; oxidative stress, antioxidants; *Eugenia brasiliensis*; blood; liver; histopathological analysis.

## 1 INTRODUCTION

Dyslipidemia is a risk factor for cardiovascular diseases, causing lipid peroxidation and contributing to reactive oxygen species (ROS) production, resulting in the deterioration of tissues [1, 2]. Triglycerides are an important biomarker of cardiovascular disease risk, due to their association with atherogenic remnant particles and apo C-III, a proinflammatory and pro-atherogenic protein found in all classes of plasma lipoproteins. Several species of triglyceride-rich lipoproteins, such as very low-density lipoprotein (VLDL) remnants, VLDL and chylomicron remnants seem to promote atherogenesis, regardless of low-density lipoprotein (LDL) levels [3].

Epidemiological data show that about 25% of adults in the United States present hypertriglyceridemia (HTG), a lipid disorder usually characterized by elevated plasma triglyceride levels (>150 mg/dL) and severe HTG (> 500 mg/dL) (4, 5]. According to a study by Lloret-Linares [6] and colleagues (2008), HTG increases the risk for the development of acute pancreatitis, a clinical condition with high morbidity and mortality. HTG may be associated with genetic and environmental factors, including lifestyle (alcohol, tobacco, high-carbohydrate diet and obesity) [7,8] and it is recommended that those demonstrating increased plasma triglyceride levels to measures to reduce these levels.

Free radicals are continuously produced and have important biological functions; however, they may also play a role in pathological conditions. These molecules can be degraded by several mechanisms, and a fine balance exists between the generation and degradation of these species for the maintenance of cellular homeostasis. Under some circumstances, however, an imbalance between the formation of reactive species and antioxidant defenses occurs, where the failure to degrade or neutralize these ROS can cause the oxidative stress that is associated with a number of pathological conditions, including dyslipidemia [2,1].

The use of medicinal plants dates from the beginning of humanity, and constitutes an area of research that aims to identify bioactive chemicals with potential for the development of new drugs with therapeutic benefit [9]. The Myrtaceae family, is the biggest family in the Myrtales order and comprises about 100 genera, including *Eugenia*, *Plinia* and *Psidium*, and about 3.000 species. The family has two major dispersion centers, in the Americas and Australia, although these plants can be found all over the world [10]. The species, *Eugenia brasiliensis* (*E. brasiliensis*) Lam is also

known by the names “grumixama”, “grumixameira” and “cereja-brasileira”. This species can be found between the Northeast region of Brazil and the pluvial Atlantic forest of south Brazil, as well as in Santa Catarina state, in the region of Florianópolis, Brusque, Ibirama, Itajaí and Joinville [11].

The family Myrtaceae, particularly the *E. Brasiliensis* species, presents several bioactive compounds and, in addition to its fruit being used as food, it is also consumed for therapeutic purposes, with reports that it displays antidiarrheal and diuretic [12]; antimicrobial [13, 14]; antiinflammatory [15] and antioxidant activities [16, 17]. Flavonoids such as quercetin, rutin, myricetin and galangin can be extracted from the leaves of this plant, in addition to other phenolic compounds such as catechin, gallic acid [15], triterpenebetulin,  $\alpha$ -amyrin,  $\beta$ -amyrin acid, 29-hydroxy-oleanolic [14] and ursolic acid [18].

Given the high prevalence of HTG [4], and the vast number of diseases, medicines and environmental factors that can cause to HTG in the population, as well as the side effects caused by currently available drugs employed for HTG, the search continues to identify further substances to limit triglyceride levels. Studies regarding the therapeutic potential of the family Myrtaceae are scarce [14], as such the present study aimed to determine the *in vivo* effects of the chronic administration of crude hydroalcoholic and acetonetic extracts of *E. brasiliensis* on HTG and oxidative stress in a rat model of HTG induced by the administration of coconut oil.

## 2. MATERIALS AND METHODS

### 2.1 Animals and reagents

Sixty-day-old male Wistar rats (230-280g), obtained from the Univali University, Itajaí, Santa Catarina, Brazil, were used in experiments. The animals were weaned at 21 days of age. Before experimentation, the animals were housed and acclimated for 7 days to allow adaptation to the new environment, and were maintained on a 12 h light/12 h dark cycle at a constant temperature ( $22\pm 1^\circ\text{C}$ ), with free access to water and commercial chow. The animals were housed 6 per cage and the “Principles of Laboratory Animal Care” (NIH publication 85–23, revised 1985) were followed in all experiments. The experimental protocol was approved by the Ethics Committee for Animal Research of the University of Joinville Region, Joinville, Brazil, under the

protocol number 002/2015 – PRPPG/CEP. All chemicals were purchased from Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA.

Environmental conditions, lighting, accommodation and nutrition followed the recommendations required by the "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals".

## **2.2 Plant material**

Leaves from *E. brasiliensis* were collected in Florianópolis, Santa Catarina state, Brazil (27°36'13.65"S, 48°31'14.75"W), in March 2012. Plant material was identified by Dr. Daniel de Barcellos Falkenberg from the Botany Department of the Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), and a voucher specimen was deposited in the herbarium FLOR of the same institution under registry number 34675.

### **2.2.1 Preparation of the extracts of *E. brasiliensis***

Fresh, whole, young and healthy leaves of the species *E. brasiliensis* were used to obtain the extracts. To obtain the crude hydroalcoholic extract (CHE), the plant material was dried and milled, yielding 1, 813 g of material. This material was macerated in hydroalcoholic solution (92.8%, w.w<sup>-1</sup>) for seven days. The extract was filtered and solvent evaporated in a rotary evaporator (below 60°C) coupled with a vacuum condenser, and concentrated to a reduced volume. After total evaporation of the solvent, 192.5 g of crude extract was obtained, which represented a yield of 10.62% plant material. This same procedure was performed for twice more, and after total evaporation of the solvent, the extract was obtained.

To obtain the crude acetic extract (CAE), leaves were subjected to an extraction process in acetone for 5 minutes [19]. After this time, the extract obtained was filtered and the extract solvent evaporated in a rotary evaporator (temperature below 60°C) with a condenser under vacuum until complete evaporation to obtain the extract.

## **2.3 Experimental protocols**

For induction of HTG, the animals received coconut oil at a dose of 2 mL per day orally (gavage) for 15 days. The amount of coconut oil administered followed the

protocol established by Jun et al. (2007) [20]. Initially rats were divided into 2 groups (n=7): **Control group**: received 1 mL of saline by gavage twice a day (15 days); and **Dyslipidemic group**, received 1 mL of coconut oil by gavage twice a day (15 days).

Thereafter, the rats were divided into 14 groups (n=6), as follows: **Control group**: received 1 mL of saline by gavage once a day for 15 days and afterwards received 1 mL of saline by gavage three times a day (totaling 30 days); **Dyslipidemic group**: received 1 mL of saline by gavage once a day for 15 days and from then on received (for 15 days) 1 mL of saline by gavage once a day and 1 mL of coconut oil by gavage twice a day (totaling 30 days); **Control treatment group + CHE**: received CHE of *E. brasiliensis* (50, 100 or 150 mg/kg) by gavage once a day for 30 days and from the 15<sup>th</sup> day received 1 mL of saline by gavage twice a day for 15 days (totaling 30 days); **Control treatment group + CAE**: received CAE of *E. brasiliensis* (50, 100 or 150 mg/kg) by gavage once a day for 30 days and from the 15<sup>th</sup> day received 1 mL of saline by gavage twice a day for 15 days (totaling 15 days); **Treatment dyslipidemic-group + CHE**: received CHE of *E. brasiliensis* (50, 100 or 150 mg/kg) by gavage once a day for 30 days and from the 15<sup>th</sup> day received 1 mL of coconut oil by gavage twice a day for 15 days (totaling 30 days of treatment); **Treatment dyslipidemic-group + CAE**: received CAE of *E. brasiliensis* (50, 100 or 150 mg/kg) by gavage once a day for 30 days and from the 15<sup>th</sup> day received 1 mL of coconut oil by gavage twice a day for 15 days (totaling 30 days of treatment). Twenty-four hours after the last administration, animals were sacrificed by decapitation, in the absence of anesthesia, and the blood was collected and the liver removed for the evaluation of oxidative stress parameters, triglycerides and histopathological analysis.

The CHE (50, 100 and 150 mg/kg) and CAE (50, 100 and 150 mg/kg) doses were chosen based on the studies of [21, 22, 23].

## 2.4 Erythrocyte and plasma preparation

Erythrocytes and plasma were prepared from total blood samples obtained from rats. Peripheral blood was collected and transferred to heparinized tubes for erythrocyte separation. Blood samples were centrifuged at  $1,000 \times g$ , and the plasma was removed by aspiration and maintained frozen at  $-80^{\circ}\text{C}$  until assay. Erythrocytes were washed three times with cold saline solution (0.153 mol/L sodium chloride). Lysates were

prepared by the addition of 1 mL of distilled water to 100  $\mu$ L washed erythrocytes and maintained frozen at  $-80^{\circ}\text{C}$  until determination of the antioxidant enzyme activities.

For antioxidant enzyme activity determination, erythrocytes were frozen and thawed three times, and centrifuged at  $13,500 \times g$  for 10 min. The supernatant was diluted in order to contain approximately 0.5 mg/mL of protein.

## **2.5 Tissue preparation**

The liver was removed and kept on ice-cold buffered sodium phosphate (20 mM, pH 7.4, 140 mM KCl). The liver was homogenized in ten volumes (1:10 w/v) of appropriate buffer, according to the technique to be performed. Homogenates were prepared using a Potter-Elvehjem homogenizer (Remi motors, Mumbai, India) by passing 5 pulses and centrifuging at  $800 \times g$  for 10 min at  $4^{\circ}\text{C}$  before discarding nuclei and cell debris. The pellet was discarded and the supernatant was saved in aliquots and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  for assaying the activity of antioxidant enzymes, damage to proteins and estimation of lipid peroxidation [24].

## **2.6 Tissue analysis**

Briefly, after sacrificing the animals, the livers were removed and fixed in 10% formalin for 24 hours and then transferred to 70% ethanol solution. The organs were then passed through solutions with increasing concentrations of alcohol and embedded in paraffin for routine histology procedures. Sections of 7  $\mu\text{m}$  were stained with hematoxylin and eosin (HE) and observed with an Olympus microscope (Olympus CX3). Lipid accumulation in hepatic cells was graded on a severity scale ranging from 0 to 5 (0= absent, 1= minimal, 2= mild, 3= moderate, 4= marked, and 5= severe) [25]. This grading was determined with a scale that considered the average extent of the hepatic lipid inclusions.

## **2.7 Triglycerides dosage**

The dosage of triglycerides was performed using the Triglycerides Liquiform kit (Labtest). Absorbance was determined by spectrophotometry.



## 2.8 Thiobarbituric acid reactive substances (TBA-RS)

TBA-RS were determined according to the method described by Ohkawa et al. (1979) [26]. TBA-RS methodology measures malondialdehyde (MDA), a product of lipoperoxidation by hydroxyl free radicals. Briefly, plasma in 1.15% KCl was mixed with 20% trichloroacetic acid and 0.8% thiobarbituric acid and heated in a boiling water bath for 60 min. TBA-RS were determined by the absorbance at 535 nm. A calibration curve was obtained using 1,1,3,3-tetramethoxypropane as the MDA precursor and each curve point was subjected to the same treatment as that of the supernatants. TBA-RS content was calculated as nanomoles of MDA formed per milligram of protein.

## 2.9 Total Sulphydryl Content

The total thiol group concentration was determined by the method of Aksenov and Markesbery (2001) [27]. Briefly, 50  $\mu$ l of homogenate was added to 1 ml of phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.4, containing 1 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA). The reaction was started by the addition of 30  $\mu$ L of 10 mM 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) and incubated for 30 min at room temperature in a dark room. Total sulphydryl content was determined by measuring the absorbance at 412 nm. Analyses of a blank (DTNB absorbance) was also performed. Results are reported as nmol 3-thio-2-nitrobenzoic acid (TNB)/mg protein.

## 2.10 Catalase Assay (CAT)

CAT activity was assayed by the method of Aebi (1984) [28], using a UV-visible Shimadzu spectrophotometer. The method used is based on the disappearance of  $H_2O_2$  at 240 nm in a reaction medium containing 20 mM  $H_2O_2$ , 0.1 % Triton X-100, 10 mM potassium phosphate buffer, pH 7.0, and 0.1–0.3 mg protein/mL. One CAT unit is defined as 1  $\mu$ mol of  $H_2O_2$  consumed per minute and the specific activity is calculated as CAT units/mg protein.

## 2.11 Glutathione Peroxidase assay (GSH-Px)

GSH-Px activity was measured by the method of Wendel (1981) [29] using *tert*-butyl-hydroperoxide as substrate. NADPH disappearance was monitored at 340 nm

using a UV–visible Shimadzu spectrophotometer. The medium contained 2 mM GSH, 0.15U/mL GSH reductase, 0.4 mM Mazide, 0.5 mM *Mtertbutyl*-hydroperoxide and 0.1 mM NADPH. One GSH-Px unit is defined as 1  $\mu$ mol of NADPH consumed per minute and the specific activity is presented as GSH-Px units/mg protein.

### 2.12 Superoxide Dismutase assay (SOD)

The method used to assay SOD activity is based on the capacity of pyrogallol to autoxidize, a process highly dependent on superoxide ( $O_2^{\cdot-}$ ), which is a substrate for SOD [30]. Briefly, to 15  $\mu$ l of each sample, 215  $\mu$ l of a mixture containing 50  $\mu$ M Tris buffer, pH 8.2, 1 $\mu$ M EDTA and 30  $\mu$ M CAT were added. Subsequently, 20  $\mu$ l of pyrogallol were added and the absorbance was immediately recorded every 30 seconds for 3 minutes at 420 nm using a UV–visible Shimadzu spectrophotometer. The inhibition of autoxidation of pyrogallol occurs in the presence of SOD, whose activity can be indirectly assayed spectrophotometrically. A calibration curve was performed with purified SOD as reference, to calculate the activity of SOD present in the samples. One SOD unit is defined as the amount of SOD necessary to inhibit 50% of pyrogallol autoxidation and the specific activity is reported as SOD units/mg protein.

### 2.13 Protein carbonyl Content

Protein Carbonyl content was assayed by a method described by Reznick and Packer (1994) [31], based on the reaction of protein carbonyls with dinitrophenylhydrazine to form dinitrophenylhydrazone, a yellow compound that is measured spectrophotometrically at 370 nm. Briefly, 200  $\mu$ L of homogenate were added to plastic tubes containing 400  $\mu$ L of 10 mM dinitrophenylhydrazine (prepared in 2M HCl). Samples were kept in the dark for 1 h and vortexed every 15 min. Subsequently, 500  $\mu$ L of 20% trichloroacetic acid were added to each tube. The mixture was vortexed and centrifuged at 14,000  $\times$  g for 3 min and the supernatant obtained was discarded. The pellet was washed with 1 mL ethanol/ethyl acetate (1:1 v/v), vortexed and centrifuged at 14,000  $\times$  g for 3 min. The supernatant was discarded and the pellet re-suspended in 600  $\mu$ L of 6 M guanidine (prepared in a 20 mM potassium phosphate solution, pH 2.3), before vortexing and incubating at 60°C for 15 min. Samples were then centrifuged at 14,000  $\times$  g for 3 min and the supernatant was

used to measure absorbance at 370 nm (UV) in a quartz cuvette. Results were reported as carbonyl content (nmol/mg protein).

### **2.14 Protein determination**

Protein was measured by the Lowry et al. (1951) [32], method, using serum bovine albumin as standard.

### **2.15 Statistical analysis**

Data were analyzed by ANOVA, followed by the Duncan multiple range test, when the F-test was significant. All analyses were performed using the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) software with a PC compatible computer. Values of  $p < 0.05$  were considered to be significant. If not otherwise stated, results are expressed as mean  $\pm$  SD for seven independent experiments (animals) performed in duplicate. \*\*\* $p < 0.001$ , \*\* $p < 0.01$  and \* $p < 0.05$ , compared to the control group (Duncan's multiple range test). For histological analysis, scores were statistically compared using the Kruskal-Wallis test, followed by the Dunns posttest (Graph Pad version 5.0). A value of  $p < 0.05$  was considered significant.

## **3. RESULTS**

### **3.1 Effects of the chronic administration of coconut oil on triglyceride levels, lipid accumulation in hepatocytes and on the parameters of oxidative stress in the blood and liver of rats**

We first investigated the effects of chronic administration of coconut oil on triglyceride levels, lipid accumulation in hepatocytes and on TBA-RS, total sulfhydryl content and protein carbonyl contents in the blood and liver of rats. The activities of the antioxidant enzymes CAT, SOD and GSH-Px were also analyzed. Table 1 shows that coconut oil significantly enhanced triglyceride levels [ $T=34.359$ ;  $p < 0.001$ ] in the serum of treated rats, when compared to the control group. Histological analysis of the liver showed the presence of lipid vacuoles (as indicated by

the arrowheads) in hepatocytes of animals treated with coconut oil, which were absent in the control group (figures 1A and 2A). The statistical analysis demonstrated a significant increase in the number of lipid inclusions in the livers of animals treated with coconut oil, when compared to the vehicle-treated groups (figures 1B and 2B). As can be seen in Table 2, HTG induced by coconut oil enhanced TBA-RS [ $T=0.657$ ;  $p<0.001$ ] and reduced total sulfhydryl content [ $T=0.068$ ;  $p<0.001$ ], but did not alter protein carbonyl content [ $T=0.266$ ;  $p>0.05$ ] in the plasma of rats. With regard to the antioxidant enzymes, HTG reduced the activity of CAT [ $T=0.677$ ;  $p<0.01$ ], but did not alter SOD [ $T=0.005$ ;  $p>0.05$ ] and GSH-Px [ $T=1.205$ ;  $p>0.05$ ] activities, respectively, in the erythrocytes of rats, as compared to the control groups. Furthermore, Table 3 shows an increase in CAT activity [ $T=2.471$ ;  $p<0.001$ ] and decrease in SOD [ $T=0.052$ ;  $p<0.001$ ] and GSH-Px activities [ $T=3.270$ ;  $p<0.001$ ], when compared to the control groups, in the liver of rats. In contrast, HTG induced by coconut oil did not alter TBA-RS [ $T=0.953$ ;  $p>0.05$ ], total sulfhydryl content [ $T=0.001$ ;  $p>0.05$ ] or protein carbonyl content [ $T=0.011$ ;  $p>0.05$ ] in the livers of rats.

### **3.2 Effects of the chronic administration of *E. brasiliensis* CHE and CAE on coconut oil-induced HTG**

We then investigated the effects of the chronic administration of CHE (50, 100 and 150 mg/kg) and CAE (50, 100 and 150 mg/kg) obtained from the leaves of *E. brasiliensis* on HTG, induced by coconut oil, in the serum of rats. We also verified the presence of lipid droplets in the hepatocytes of animals by histological analysis. Results showed that the administration of CHE for 15 days, at doses of 50, 100 and 150 mg/kg, significantly decreased the levels of serum triglycerides [ $F(3,25)=46.011$ ;  $p<0.001$ ], when compared to the control group. The 150 mg/kg extract reduced the level of serum triglycerides to the greatest extent. On the other hand, CAE, at the same concentrations, did not alter the levels of serum triglycerides [ $F(3,24)=0.684$ ;  $p>0.05$ ] (data not shown). According to Figure 3 (A), CHE administration (50, 100 and 150 mg/kg) for 30 days prevented the induction of HTG by coconut oil [ $F(7,40)=38.040$ ;  $p<0.001$ ], and this decrease was more significant at the dose of 150 mg/kg. Consistent with these results, the administration of CAE (50, 100 and 150 mg/kg) for 30 days [Figure 3(B)] was also able to prevent the HTG induced by coconut oil [ $F(7,40)=46.092$ ;  $p<0.001$ ], and this decrease was more significant at the concentrations of 100 and 150 mg/kg CAE. Histological analyses showed a significant decrease in lipid vacuoles in the hepatocytes,

after treatment with CHE at all the doses tested [Figures 1(A) and 1(B)]. However, HE staining also identified numerous lipid vacuoles (arrowhead) within the hepatocytes of animals treated with CAE, especially at the doses of 50 and 100 mg/Kg [Figure 2(A)]. The dose of 150 mg/Kg CAE decreased the lipid inclusions, but this decrease was not statistically significant [Figure 2(B)]. Taken together, these histological findings are consistent with the biochemical data obtained.

### **3.3 Effects of the chronic administration of *E. brasiliensis* CHE and CAE on the alterations in the blood oxidative stress parameters caused by coconut oil-induced HTG in rats**

We next investigated the effects of the chronic administration of CHE (50, 100 and 150 mg/kg) and CAE (50, 100 and 150 mg/kg), obtained from the leaves of *Eugenia brasiliensis*, on the coconut oil-induced alterations in TBA-RS, total sulfhydryl content and CAT activity in the blood of rats. Post hoc analyzes showed that CHE and CAE per se did not alter TBA-RS levels, total sulfhydryl content or CAT activity in the blood of rats, when compared to the control groups. Figure 4 shows that the chronic administration of CHE (A1) and CAE (A2), at doses of 100 and 150 mg/kg, prevented the increases in TBA-RS levels [ $F(7,40)=8.022$ ;  $p<0.001$ ] and [ $F(7,40)=6.748$ ;  $p<0.001$ ], respectively, caused by coconut oil-induced HTG in the plasma of rats, while CHE and CAE, at doses of 50 mg/kg, did not prevent these alterations. As can be seen in Figure 4 (B1), only 150 mg/kg CHE prevented the reduction total sulfhydryl content [ $F(7,40)=6.974$ ;  $p<0.001$ ] caused by coconut oil-induced HTG in the plasma of rats. Figure 4 (B2) shows that CAE, at doses of 100 and 150 mg/kg, also prevented this alteration [ $F(7,40)=5.118$ ;  $p<0.001$ ]. Moreover, Figure 4 shows that CHE (C1) and CAE (C2), at doses of 50, 100 and 150 mg/kg, prevented the decrease in CAT activity [ $F(7,40)=2.539$ ;  $p<0.05$ ] and [ $F(7,40)=7.844$ ;  $p<0.001$ ], respectively, caused by coconut oil-induced HTG in the erythrocytes of rats, as compared to the control groups.

### **3.4 Effects of the chronic administration of *E. brasiliensis* CHE and CAE on the alterations in oxidative stress parameters caused by coconut oil-induced HTG in the livers of rats**

Finally, we investigated the effects of the chronic administration of CHE (50, 100 and 150 mg/kg) or CAE (50, 100 and 150 mg/kg), obtained from the leaves of *Eugenia brasiliensis*, on the alterations in liver antioxidant enzymes provoked by coconut oil-induced HTG in rats. Post hoc analyzes showed that CHE and CAE per se did not alter the CAT, SOD and GSH-Px activities in the livers of rats, when compared to the control groups. Figure 5 shows that chronic administration of CHE (A1) and CAE (A2), at doses of 50, 100 and 150 mg/kg, prevented the increases in CAT activity [F(7,40)=8.022; p<0.001] and [F(7,40)= 6.748; p<0.001], respectively, caused by coconut oil-induced HTG in the liver of rats. With regard to the antioxidant enzyme, SOD, Figure 5 shows that chronic administration of CHE (B1), at doses of 100 and 150 mg/kg, partially prevented the decrease in SOD activity [F(7,40)=12.200; p<0.001]; however, the dose of 50 mg/kg did not prevent this alteration. In contrast, the chronic administration of CAE (B2), at doses of 100 and 150 mg/kg, was able to prevent the decrease in the SOD activity [F(7,40)=11.068; p<0.001], when compared to the control group. Additionally, chronic administration of CHE (figure 5- C1), at a dose of 50 mg/kg, partially prevented the decrease in GSH-Px activity [F(7,40)=10.887; p<0.001], while 100 and 150 mg/kg CHE totally prevented this alteration. In contrast, chronic administration of 100 and 150 mg/kg CAE (Figure 5- C2), but not 50 mg/kg, partially prevented the alteration in GSH-Px activity caused by coconut oil-induced HTG in the liver of rats [F(7,40)=15.153; p<0.001].

#### 4. DISCUSSION

HTG can be caused genetically, but may also be secondary to other diseases, such as diabetes mellitus, kidney disease and hypothyroidism, or associated with environmental factors that affect the production and clearance of triglyceride-rich lipoproteins [8]. Additionally, other secondary conditions, including drugs that interact with genetic factors, can cause HTG. Data in the literature show that high plasma levels of triglycerides constitute an independent risk factor for the development of atherosclerosis, type 2 diabetes, metabolic syndrome and chronic degenerative diseases [5, 33, 34].

Oxidative stress results from an imbalance between the production of ROS and the cell's ability to mitigate damage through antioxidant pathways or mechanisms that repair or eliminate damaged molecules. Free radical damage is usually prevented by a series of enzymatic defenses, such as SOD, GSH-Px and CAT, enzymes that are

involved in the direct elimination of ROS; and by a series of non-enzymatic quenching antioxidants, such as vitamin E, A, C, bioflavonoids and carotenoids (35, 2).

As such, the aim of the present study was to investigate the effects of the chronic administration of crude hydroalcoholic and acetonic extracts of *E. brasiliensis* on the HTG and oxidative stress that derives from the *in vivo* administration of coconut oil in rats. Results showed that the administration of coconut oil significantly enhanced triglyceride levels in the serum of treated rats, generating HTG, and leading to the accumulation of lipid droplets in the hepatocytes of animals. Administration of CHE for 15 days, at doses of 50, 100 and 150 mg/kg, significantly decreased the levels of serum triglycerides, where a dose of 150 mg/kg produced the greatest reduction in serum triglyceride levels. On the other hand, CAE, at the same doses, did not alter the levels of serum triglycerides. Furthermore, CHE administration (50, 100 and 150 mg/kg) for 30 days was able to prevent the HTG induced by coconut oil; and the decrease in HTG was more significant at the dose of 150 mg/kg. The administration of CAE (50, 100 and 150 mg/kg) for 30 days also prevented the HTG induced by coconut oil and this decrease was more significant at the doses of 100 and 150 mg/kg. Our results corroborate those of the study by Bongioiolo (2008), [36] who showed that treatment with a hydroalcoholic extract of *Eugenia uniflora* (500 and 1000 mg/kg) reduced serum triglyceride levels, suggesting that this hypolipemiant effect was mediated by the flavonoid quercetin and myricetin present in the extract. Furthermore, according to Santana (2016) [37] and Kala et al. (2012) [38], other plants of the same genus, including *Eugenia dysenterica* and *Eugenia flocosa*, also showed a significant reduction in triglycerides.

Histological analyses demonstrate decrease in lipid accumulation in the hepatocytes of animals treated with CHE at all doses tested, while treatment with CAE showed a tendency to reduce the lipid droplets only at dose of 150 mg/Kg. Other plants from the Myrtaceae family, such as *Psidium guajava*, demonstrated a decreased number of lipid droplets in the liver cells [39]. In a study by Takahashi et al. (2015) [40], the treatment of rats with *Eucalyptus globules* (Myrtaceae) extract led to a reduction in the hepatic steatosis induced by the excessive ingestion of fructose. These studies confirm our histological findings, indicating that plants of the Myrtaceae family may have a beneficial effect on the accumulation of lipids in liver cells. However, more studies are necessary to elucidate which compounds are responsible for this effect.

Coconut oil-induced HTG also enhanced TBA-RS and reduced total sulfhydryl content, but did not alter protein carbonyl content, in the plasma of rats. TBA-RS is a parameter of lipid oxidation and reflects the amount of malondialdehyde formation, an end product of membrane fatty acid peroxidation. Studies have shown a relationship between lipid peroxidation and atherosclerosis; furthermore, HTG is considered a risk factor for atherosclerosis and is strongly associated with the occurrence of cardiovascular disease [41, 5, 33]. Studies show that changes in the protein structure caused by reactive species may result in the fragmentation of polypeptide chains, modifications in amino acid side the chains, and hence protein damage, leading to loss of functionality and deleterious effects (42, 43). Thus, our data indicate that coconut oil-induced HTG is associated with oxidative damage to lipids and proteins in the blood of rats. With regard to antioxidant enzymes, HTG reduced the activity of CAT, but did not alter the SOD and GSH-Px activities, in the erythrocytes of rats. Since oxidative stress results from an imbalance between the total antioxidant defenses and the reactive species generated, our present data strongly indicate that coconut oil-induced HTG provokes oxidative stress in the blood, which induces oxidation of lipids and proteins and a reduction in CAT activity.

Coconut oil-induced HTG also altered the oxidative stress parameters in the rat liver, as shown by an increase in CAT activity and decreases in SOD and GSH-Px activities in the liver of rats. In contrast, coconut oil-induced HTG did not alter TBA-RS, total sulfhydryl content and protein carbonyl content in this tissue. SOD removes the anion superoxide by accelerating the rate of its dismutation to hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) [44], while CAT is a ferric heme protein involved in the decomposition of  $H_2O_2$ . GSH-Px catalyzes the decomposition of  $H_2O_2$  or organic peroxides, and oxidizes glutathione (GSH), forming glutathione oxidized (GSSG). To complete the redox cycle, glutathione reductase reduces GSSG to GSH [45]. According to Sanchez-Valle and colleagues (2012) [46], the liver is the organ that is most susceptible to ROS. As such, data indicate that coconut oil-induced HTG alters antioxidant defenses in the liver, as shown by the reductions in SOD and GSH-Px activities and increased CAT activity. Reduced SOD and GSH-Px enzyme activities increase the levels of superoxide anion and  $H_2O_2$ , favoring the formation of hydroxyl radicals, which damage lipids, proteins and DNA. The increase in CAT activity observed may have occurred in order to compensate the reduction in the activity of GSH-Px, and diminish liver damage.



Studies have shown that polyphenolic compounds, especially flavonoids, present bioactive compounds with antioxidant properties that can be used for therapeutic purposes in diseases such as chronic degenerative diseases, especially hyperlipidemia, in order to avoid the oxidative damage induced by free radicals and lipid peroxidation (17, 14). Corroborating the above data, Flores et al. (2012) [16] reported that *E. brasiliensis*, employed in the therapy of Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD), presents high antioxidant and anti-inflammatory properties due to the presence of anthocyanins, a subgroup belonging to the flavonoids. Magina and colleagues (2010) [17] also highlight *in vitro* antioxidant activities of this plant, possibly due to the total phenolic and flavonoid contents of the plant's extracts and fractions. Also, contributing to the antioxidant and anti-inflammatory actions, Siebert et al. (2017) [47] reported the presence of the flavonoids quercetin, myricetin, catechin, isoquercetin, rutin and galangin in the CHE of *E. brasiliensis*. Regarding the ethyl acetate fraction of *E. brasiliensis*, revealed the presence of the compounds catechin, isoquercetin, galangin and apigenin.

Considering the vast therapeutic potential of *E. brasiliensis*, we next verified the effects of the chronic administration of *E. brasiliensis* CHE (50, 100 and 150 mg/kg) and CAE (50, 100 and 150 mg/kg) on the effects provoked by coconut oil-induced HTG on TBA-RS, total sulfhydryl content and CAT activity in the blood of rats. Results showed that CHE and CAE per se did not alter TBARS levels, total sulfhydryl content and CAT activity in the blood of rats. Importantly, the chronic administration of CHE and CAE, at doses of 100 and 150 mg/kg, prevented the increase in TBA-RS levels caused by coconut oil-induced HTG in the plasma of rats, while CHE and CAE, at a dose of 50 mg/kg, did not prevent the augmentation in TBA-RS. With regard to the total sulfhydryl content, 150 mg/kg CHE prevented the reduction in total sulfhydryl content caused by coconut oil-induced HTG in the plasma of rats, while 100 and 150 mg/kg CAE also prevented the reduction in total sulfhydryl content. Moreover, CHE and CAE, at doses of 50, 100 and 150 mg/kg, prevented the decrease in CAT activity caused by coconut oil-induced HTG in the erythrocytes of rats.

Finally, we investigated the effects of the chronic administration of *E. brasiliensis* CHE (50, 100 and 150 mg/kg) and CAE (50, 100 and 150 mg/kg) on the effects provoked by coconut oil-induced HTG on the activities of antioxidant enzymes in the livers of rats. Results showed that the chronic administration of CHE and CAE in

rats, at doses of 50, 100 and 150 mg/kg, prevented the increases in liver CAT activity caused by coconut oil-induced HTG. With regard to the SOD antioxidant enzyme, data showed that the chronic administration of CHE (100 and 150 mg/kg, but not 50 mg/kg) partially prevented the decrease in SOD activity, whereas the chronic administration of CAE (100 and 150 mg/kg) was able to prevent the decrease in SOD activity, when compared to the control group. Additionally, chronic administration of 50 mg/kg CHE partially prevented the decrease in GSH-Px activity, while doses of 100 and 150 mg/kg totally prevented this alteration. In contrast, chronic administration of CAE (100 and 150 mg/kg, but not 50 mg/kg) partially prevented the alteration in liver GSH-Px activity caused by coconut oil-induced HTG.

In conclusion, this study shows that the chronic administration of coconut oil causes HTG in rats, in association with oxidative stress in the blood and liver and lipid accumulation in the hepatocytes. The chronic administration of both extracts (CHE and CAE) of *E. brasiliensis* was able to prevent HTG, decreased lipid accumulation in the hepatocytes, and reduced lipid peroxidation and protein damage in the blood of coconut oil-induced HTG rats. Furthermore, these extracts also prevented alterations in the activities of antioxidant enzymes in the blood and liver of these rats. Data indicate that CHE and CAE, obtained from the leaves of *E. brasiliensis*, may have hypolipidemic effects and a high antioxidant capacity, probably mediated by the action of the flavonoids present in these extracts. However, further studies are necessary to evaluate whether *E. brasiliensis* could be useful as a potential adjuvant for the prevention of HTG and associated oxidative damage.

### **Conflict of interest**

The authors declare that they have no conflicts of interests regarding the publication of this paper.

### **Acknowledgements**

This work was supported by grants from the Universidade da Região de Joinville and Universidade Regional de Blumenau.

## 5. REFERENCES

1. McIntyre TM, Hazen SL. Lipid Oxidation and Cardiovascular Disease: Introduction to a Review Series. *Circulation Research, Journal of the American Heart Association* 2010;**107**:1167–1169.
2. Halliwell B, Gutteridge JCM. *Free radicals in biology and medicine*. 3<sup>a</sup> ed. New York: Oxford University Press Inc; 1999.
3. Brewer HB Jr. Hypertriglyceridemia: changes in the plasma lipoproteins associated with an increased risk of cardiovascular disease. *Am J Cardiol* 1999; **83**:3F–12F.
4. Carroll MD, Kit BK, Lacher DA. Trends in elevated triglyceride in adults: United States, 2001–2012. *National Center for Health Statistics (NCHS) Data Brief* 2015;198:1–7.
5. Miller M, Stone NJ, Ballantyne C, Bittner V, Criqui MH, Ginsberg HN *et al.* Triglycerides and cardiovascular disease: a scientific statement from the American Heart Association. *Circulation* 2011;**123**:2292–2333.
6. Lloret-Linares C, Pelletier AL, Czernichow S, Vergnaud AC, Bonnefont-Rousselot D, Levy *Pet al.* Acute pancreatitis in a cohort of 129 patients referred for severe hypertriglyceridemia. *Pancreas* 2008;**37**:13–22.
7. Aguilar-Salinas, CA, Tusie-Luna T, Pajukanta P. Genetic and environmental determinants of the susceptibility of Amerindian derived populations for having hypertriglyceridemia. *Metabolism* 2014; **63**:887–94.
8. Hegele RA, Ginsberg HN, Chapman MJ, Hegele RA, Ginsberg HN, Chapman MJ, Nordestgaard BG, Kuivenhoven JA, Averna M *et al.* The polygenic nature of hypertriglyceridaemia: implications for definition, diagnosis, and management. *Lancet Diabetes Endocrinol* 2014;**8**: 655–666.
9. Newmann DJ, Cragg GM. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. *Journal of Natural Products* 2016;**79**:629–661.
10. Schutz AR. *Introdução à botânica sistemática*. 5 ed. Porto Alegre: Ed UFRGS. 1980.
11. Reitz RD, Klein R.M. *Mirtáceas. Flora Ilustrada Catarinense (Reitz, P.R., (Ed) I parte. Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues, p 63. 1969.*
12. Revilla J. *Plantas úteis da bacia amazônica*. Rio de Janeiro: INPA, p. 44, 2002.
13. Benfatti CS, Cordova S M, Guedes A., Magina MDA., Cordova CMM. Atividade antibacteriana in vitro de extratos brutos de espécies de *Eugenia sp* frente a cepas de mollicutes. *Revista Pan-Amazônica de Saúde* 2010; **1**: 33–39.
14. Magina MDA, Dalmarco EM, Dalmarco JB, Colla G, Pizzolatti MG, Brighente IMC. Bioactive triterpenes and phenolics of leaves of *Eugenia brasiliensis*. *Química Nova* 2012;**35**:1184–1188

15. Pietrovski EF, Magina MDA, Gomig F, Pietrovski CF, Micke GA, Barcellos M *et al.* Topical anti-inflammatory activity of *Eugenia brasiliensis* Lam. (Myrtaceae) leaves. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 2008;**60**:479–487.
16. Flores G, Dastmalchi K, Paulino S, Whalen K, Dabo A.J, Reynertson KA *et al.* Anthocyanins from *Eugenia brasiliensis* edible fruits as potential therapeutics for COPD treatment. *Food Chemistry* 2012;**134**:1256–1262.
17. Magina MDA, Gilioli A, Moresco H.H, Colla G, Pizzolatti MG, Brighente IMC. Atividade antioxidante de três espécies de *Eugenia* (Myrtaceae). *Latin American Journal of Pharmacy* 2010; **29**: 376–82.
18. Frighetto N, Welendorf RM, Silva AMP, Nakamura MJ, Siani AC. Aplicação de cromatografia centrífuga de contracorrente na purificação de ácido ursólico das folhas de *Eugenia brasiliensis* Lam. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 2005; **15**:338–343.
19. Luz, SCS. Estudo fitoquímico da cera epicuticular de *Baccharis uncinellae* comparação da atividade antioxidante com outras espécies do gênero *accharis*. [Dissertação]. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina; 2003.
20. Jun SW, Min-Soo K, Jeong-Soo K, J, Park HJ, Lee S, Jong-Soo *Wet al.* Preparation and characterization of simvastatin/hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin inclusion complex using supercritical antisolvent (SAS) process. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 2007; **66**:413–421.
21. Kar A, Choudhary BK, Bandyopadhyay NG. Comparative evaluation of hypoglycaemic activity of some Indian medicinal plants in alloxan diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology* 2003;**84**:105–108.
22. Ravi K, Ramachandran B, Subramanian S. Effect of *Eugenia Jambolana* seed kernel on antioxidant defense system in streptozotocin-induced diabetes in rats. *Life Sciences* 2004;**75**:2717–2731.
23. Ravi K, Rajasekaran S, Subramanian S. Antihyperlipidemic effect of *Eugenia jambolana* seed kernel on streptozotocin-induced diabetes in rats. *Food and Chemical Toxicology* 2005;**43**:1433–1439.
24. Ferreira AGK, Cunha AA, Machado FR, Pederzoli CD, Dalazen GR, Assis AM *et al.* Experimental Hyperprolinemia Induces Mild Oxidative Stress, Metabolic Changes, and Tissue Adaptation in Rat Liver. *J Cel Biochem* 2012; **113**: 174–183.
25. Zeni ALB, Albuquerque CAC, Gonçalves F, Latini A, Tasca CI, Podestá *Ret al.* Phytochemical profile, toxicity and antioxidante activity of *Aloysiagratisissima* (verbenaceae). *Quim Nova* 2013;**36**:69–73.
26. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry* 1979;**95**:351–358.

27. Aksenov MY, Markesbery WR. Changes in thiol content and expression of glutathione redox system genes in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease. *NeurosciLett*2001; **302**: 141–145.
28. Aebi H. Catalase in Vitro. *Method Enzym* 1984;**105**:121–126.
29. Wendel, A. Glutathione peroxidase. *Methods Enzymol*1081;**77**:325–333.
30. Marklund SL. Pyrogallol autoxidation. In: Greenwald RA (Eds.) *Handbook for oxygen radical research*. Boca Raton, Florida: CRC press,1885:243–247.
31. Reznick AZ, Packer L. Oxidative Damage to Proteins: Spectrophotometric Method for Carbonyl Assay. *Methods in Enzymology* 1994;**233**:357-363.
32. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin-Phenol reagents. *J. Biol. Chem.* 1951;**193**:265–275.
33. Penno G, Solini A, Zoppini G, Fondelli C, Trevisan R, Vedovato M, Gruden G *et al.* Hypertriglyceridemia Is Independently Associated with Renal, but Not Retinal Complications in Subjects with Type 2 Diabetes: A Cross-Sectional Analysis of the Renal Insufficiency And Cardiovascular Events (RIACE) Italian Multicenter Study. *Journal PLoS ONE* 2015; 10: 01–16.
34. Watts GF, Ooi EM, Chan DC. Demystifying the management of hypertriglyceridemia. *Nat Rev Cardiol* 2013;**10**:648–61.
35. Colin D, Anderson A, Lortie M, Parsons R, Bodnar A. Oxidative damage and cellular defense mechanisms in sea urchin models of aging. *Free\_Radic\_Biol\_Med* 2013; **63**: 254–263.
36. Bongioio AM. Efeito do extrato hidroalcoólico de *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae) sobre a hiperglicemia e dislipidemia de ratos diabéticos induzidos por aloxana. [Dissertação].Criciúma: Universidade do Extremo Sul Catarinense; 2008.
37. Santana LF. Efeitos do extrato etanólico das folhas da Cagaiteira (*Eugenia dysenterica* DC.) em camundongos diabéticos induzidos por estreptozotocina. [Dissertação].Campo Grande: Universidade Federal do Mato Grosso do Sul; 2016.
38. Kala MJ, Tresina PS, Mohan VR. Antioxidant, Antihyperlipidaemic and Antidiabetic Activity of *Eugenia Floccosa* Bedd Leaves in Alloxan Induced Diabetic Rats. *Journal of Basic and Clinical Pharmacy* 2012;**003**:235–240.
39. Oh WK, Lee CH, Lee MS, Bae EY, Sohn CB, Oh H, Kim BY, Ahn JS. Antidiabetic effects of extracts from *Psidium Guajava*. *J Ethnopharmacol* 2005;96:411–415.
40. Takahashi Y, Sugimoto K, Soejima Y, Kumagai A, Koeda T, Shojo *Aet al.* Inhibitory effects of Eucalyptus and Banaba leaf extracts on nonalcoholic steatohepatitis induced by a high-fructose/high-glucose diet in rats. *Biomed Res Int* 2015; **2015** 296–305.
41. Halliwell B, Chirico S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *The American Journal of Clinical Nutrition* 1993;**57**:715S-724S

42. Dalle-Donne I, Rossi R, Giustarini D, Milzani A, Colombo R. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clinica Chimica Acta* 2003; **329**:23– 38.
43. Fagan JM, Slecza BG, Sohar I. Quantitation of oxidative damage to tissue proteins. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 1999;**31**:751– 757.
44. Halliwell B. Cell culture, oxidative stress, and antioxidants: Avoiding pitfalls. *Biomed J* 2014;**37**: 99–105.
45. Young IS, Woodside JV. Antioxidants in health and disease. *J Clin Pathol* 2001;**54**: 176–186.
46. Sánchez-Valle V, Chávez-Tapia NC, Uribe M, Méndez-Sánchez N. Role of oxidative stress and molecular changes in liver fibrosis: A review. *Curr. Med. Chem.* 2012;**19**:4850–4860.
47. Siebert DA, Bastos J, Spudeit DA, Micke GA, Alberton MD. Determination of phenolic profile by HPLC-ESI-MS/MS and anti-inflammatory activity of crude hydroalcoholic extract and ethyl acetate fraction from leaves of *Eugenia brasiliensis* (in press). *Revista Brasileira de Farmacognosia* 2017; <doi.org/10.1016/j.bjp.2017.01.008>

Table 1- Effect of chronic administration of coconut oil on triglyceride levels

Groups	Triglyceride
Control	87.82 ±7.90
Coconut oil	199.42±31.34***

Data are mean ± S.D. for seven independent experiments (animals) performed in duplicate. The results are in mg/dL. Data were analyzed statistically by Students *t test*. Different from control, \*\*\* p<0.001.

Table 2- Effect of chronic administration of coconut oil-induced HTG on parameters of oxidative stress in rat blood

Analysis	Control Group	Coconut Oil Group
	Mean ±SD	Mean ±SD
TBA-RS (nmol TBA-RS/min.mgprotein)	2.10 ±0.62	3.91±0.69***
Sulphydryl content (nmol TNB/mg protein)	16.63±1.70	8.39±1.64***
Protein carbonyl content (nmol/mg protein)	2.17±0.38	2.19±0.31
CAT (units/mg protein)	7.52±1.13	5.95±0.99**
SOD (units/mg protein)	6.76 ±0.38	6.80 ±0.76
GSH-Px (units/mg protein)	40.56 ±5.99	41.39 ± 4.67

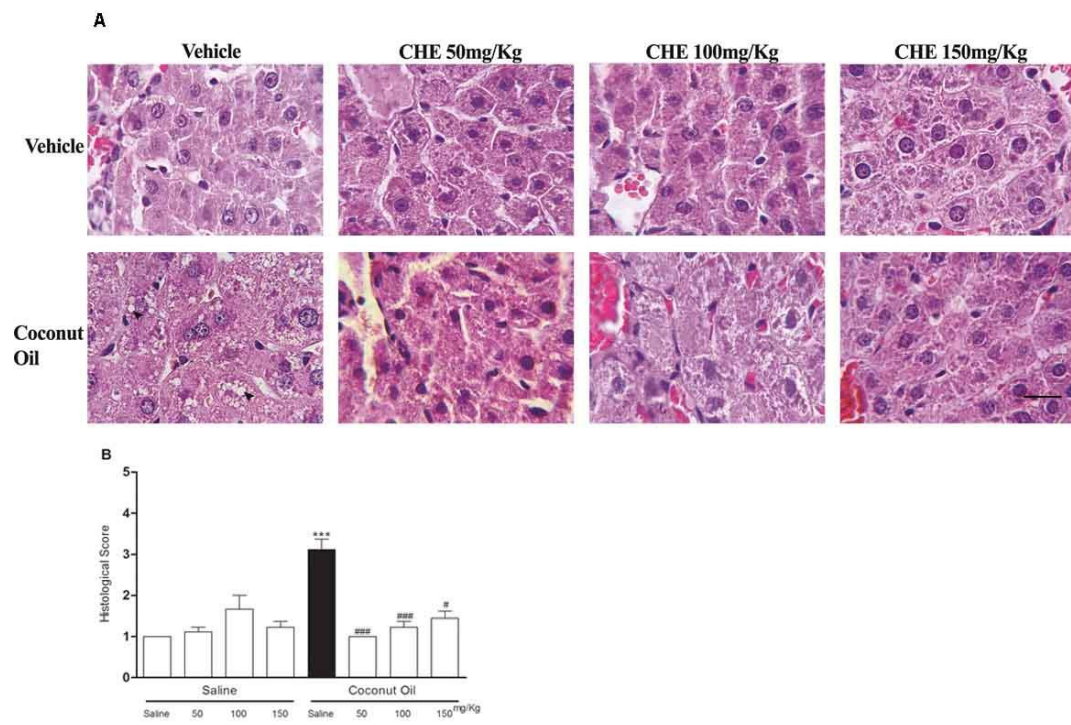
Data are mean ± S.D. for seven independent experiments (animals) performed in duplicate. The results are in mg/dL. Data were analyzed statistically by Duncan multiple range test. Different from control, \*\*\* p<0.001; \*\* p<0.01.

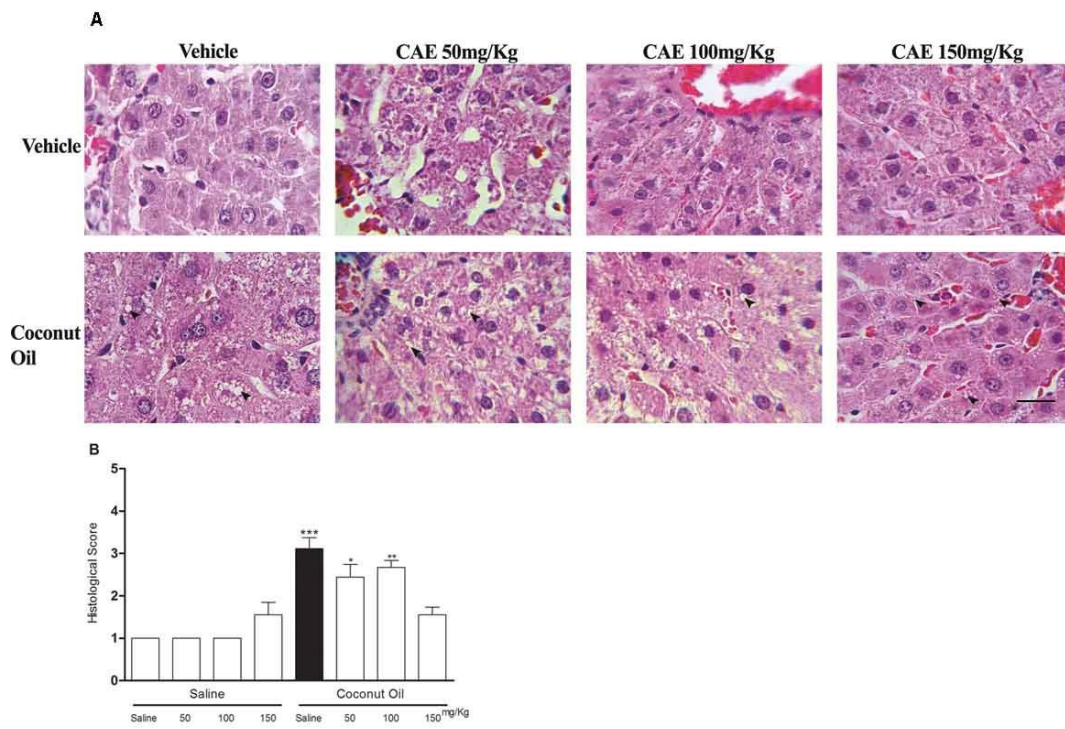
Table 3- Effect of chronic administration of coconut oil-induced HTG on parameters of oxidative stress in rat liver

Analysis	Control Group	Coconut Oil Group
	Mean $\pm$ SD	Mean $\pm$ SD
TBA-RS (nmol TBA-RS/min.mgprotein)	6.25 $\pm$ 1.32	6.12 $\pm$ 1.07
Sulphydryl content (nmol TNB/mg protein)	58.84 $\pm$ 7.40	54.71 $\pm$ 7.56
Protein carbonyl content (nmol/mg protein)	9.83 $\pm$ 1.28	10.01 $\pm$ 1.42
CAT (units/mg protein)	6.50 $\pm$ 0.87	9.87 $\pm$ 1.41***
SOD (units/mg protein)	5.39 $\pm$ 0.49	4.27 $\pm$ 0.37***
GSH-Px (units/mg protein)	25.38 $\pm$ 1.91	9.36 $\pm$ 1.03***

Data are mean  $\pm$  S.D. for seven independent experiments (animals) performed in duplicate. The results are in mg/dL. Data were analyzed statistically by Duncan multiple range test. Different from control, \*\*\* p<0.001.



**Figure 1- Histopatological analysis**

**Figure 2- Histopatological analysis**

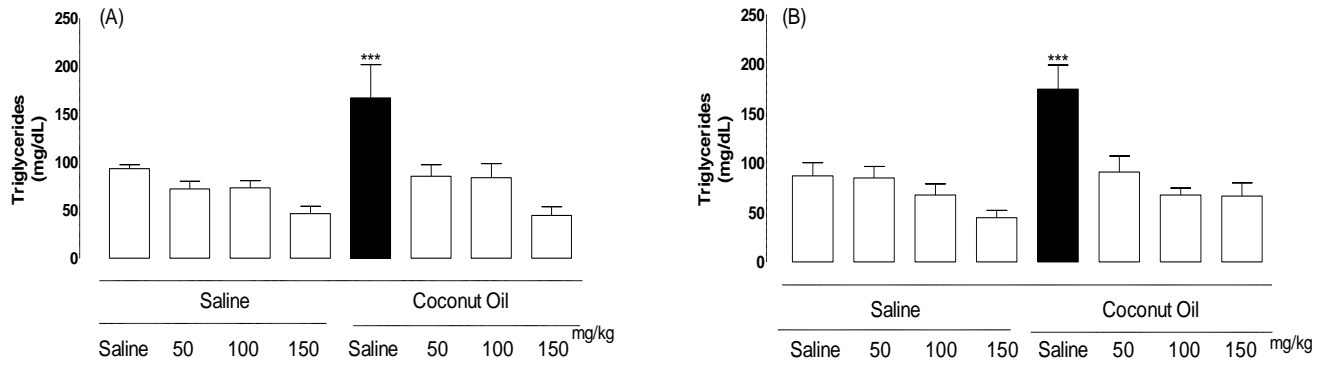
**Figure 3 - Triglyceride dosage**

Figure 4- Blood

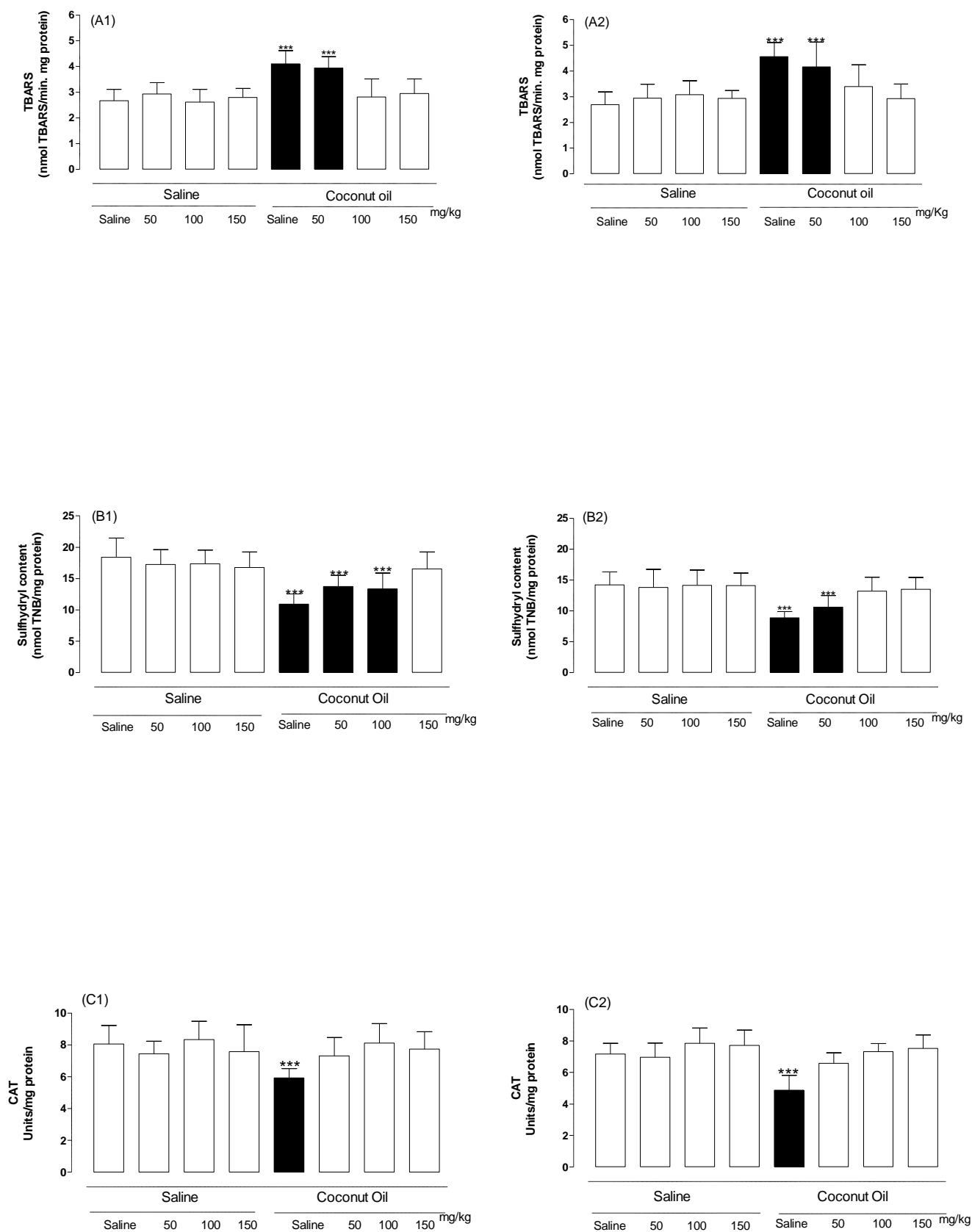
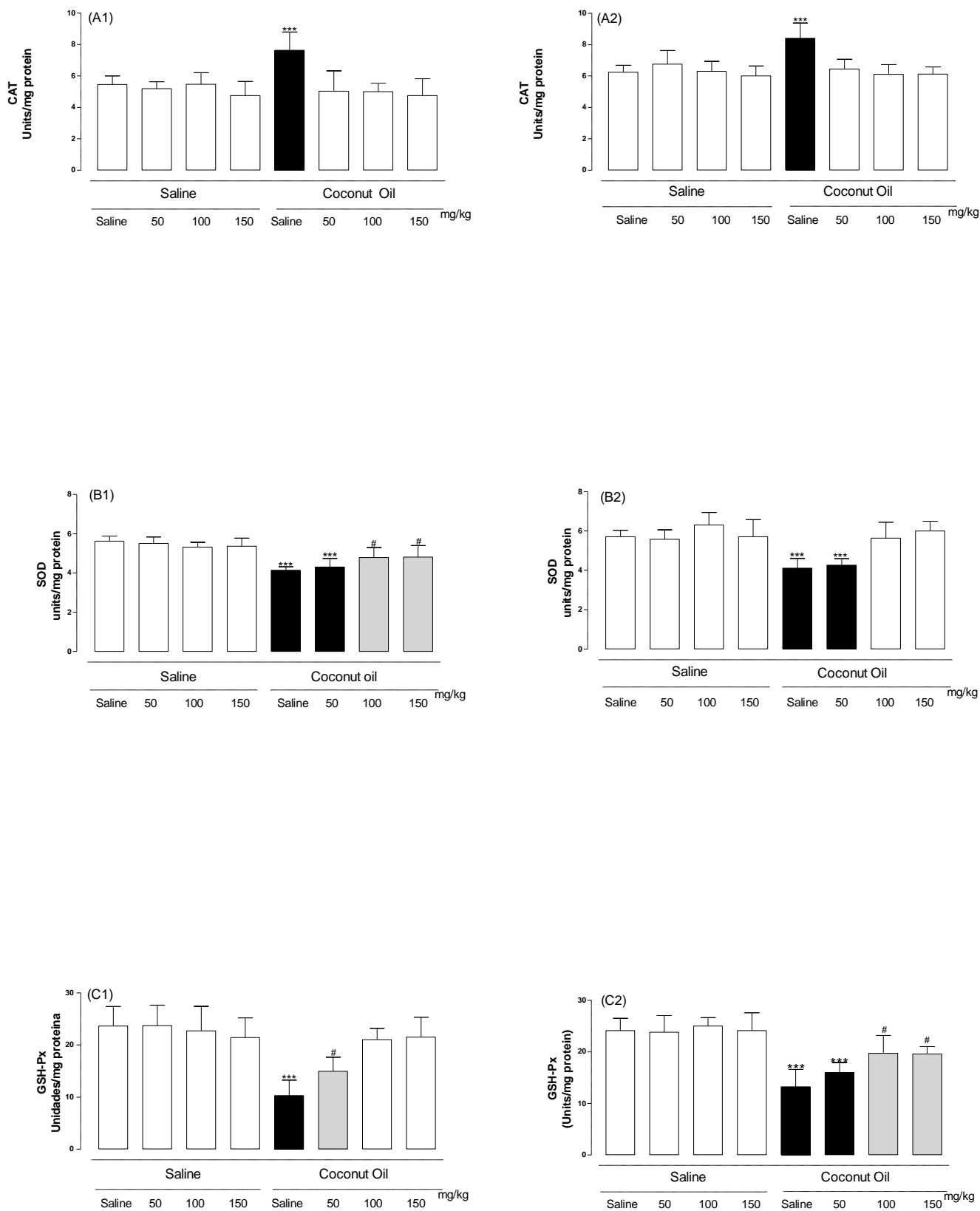


Figure 5- Liver



## Legends to figures

Table 1. Effect of chronic administration of coconut oil on triglyceride levels. Data are mean  $\pm$  S.D. for 7 independent experiments (animals) performed in duplicate. Results are in mg/dL. Data were analyzed statistically by Student's *t* test. Different from control, \*\*\*  $p < 0.001$ .

Table 2. Effect of the chronic administration of coconut oil on blood parameters of oxidative stress in rats. Data are mean  $\pm$  S.D. for 7 independent experiments (animals) performed in duplicate. Results are in mg/dL. Data were analyzed statistically by the Duncan multiple range test. Different from control, \*\*\*  $p < 0.001$ ; \*\*  $p < 0.01$ .

Table 3. Effect of the chronic administration of coconut oil on parameters of oxidative stress in rat liver. Data are mean  $\pm$  S.D. for 7 independent experiments (animals) performed in duplicate. Results are in mg/dL. Data were analyzed statistically by the Duncan multiple range test. Different from control, \*\*\*  $p < 0.001$ .

Figure 1. Histology and quantification of lipid accumulation in livers collected after the chronic administration of crude hydroalcoholic extract of *Eugenia brasiliensis* (CHE) (n=9). Micrographs of liver sections with lipid accumulation indicated by arrowheads (A). Treatment with coconut oil increased lipid inclusions (B). CHE at doses of 50, 100 and 150 mg/Kg decreased lipid inclusions when compared to the coconut oil group (B). \*\*\*  $p < 0.001$  compared to the saline group, #  $p < 0.05$ , ###  $p < 0.001$  compared with coconut oil group. Scale bar = 1000x.

Figure 2. Histology and quantification of lipid accumulation in livers collected after the chronic administration of crude acetic extract of *Eugenia brasiliensis* (CAE) (n=9). Micrographs of liver sections with lipid accumulation indicated by arrowheads (A). Treatment with coconut oil increased lipid inclusions (B). \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  compared to the saline group. Scale bar = 1000x.

Figure 3. Effects of the chronic administration of crude hydroalcoholic extract (A) and crude acetic extract (B) from the leaves of *Eugenia brasiliensis* on coconut oil-induced HTG. Data are mean  $\pm$  SD for 6-7 independent experiments (animals) performed in duplicate. Different from control, \*\*\*  $p < 0.001$  (Duncan multiple range test). CHE: crude hydroalcoholic extract; CAE: crude acetic extract.

Figure 4. Effects of the chronic administration of crude hydroalcoholic extract (1) and crude acetic extract (2) from the leaves of *Eugenia brasiliensis* on blood TBA-RS (A1 and A2), sulfhydryl content (B1 and B2) and catalase (CAT) (C1 and C2) in rats subjected to coconut oil-induced HTG. Data are mean  $\pm$  SD for 6-7 independent experiments (animals) performed in

duplicate. Different from control, \*\*\* $p < 0.001$  (Duncan multiple range test). CHE: crude hydroalcoholic extract; CAE: crude acetonc extract.

Figure 5. Effects of chronic administration of crude hydroalcoholic extract (1) and crude acetonc extract (2) from the leaves of *Eugenia brasiliensis* on liver catalase (CAT) (A1 and A2), superoxide dismutase (SOD) (B1 and B2) and glutathione peroxidase (GSH-Px) (C1 and C2) in rats subjected to coconut oil-induced HTG. Data are mean  $\pm$  SD for 6-7 independent experiments (animals) performed in duplicate. Different from control, \*\*\* $p < 0.001$ , # Partial prevention (Duncan multiple range test). CHE: crude hydroalcoholic extract; CAE: crude acetonc extract.

## 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo mostrou que a administração crônica de óleo de coco aumentou significativamente os níveis de triglicerídeos, dessa forma gerando um quadro de HTG, e conseqüentemente, promovendo o acúmulo de gotículas de gordura no fígado de ratos com 60 dias de idade. Também causou estresse oxidativo; uma vez que aumentou os níveis de TBA-RS e reduziu o conteúdo total de sulfidrilas em plasma e diminuiu a atividade da CAT em eritrócitos de ratos. Além disso, aumentou a atividade da CAT e diminuiu a atividade das enzimas SOD e GSH-Px em fígado de ratos. Com isso evidenciamos que a administração crônica de óleo de coco promoveu peroxidação lipídica, dano proteico e alterações na atividade das enzimas antioxidantes; dessa forma podemos também evidenciar o papel que a HTG exerce sobre a geração do quadro de estresse oxidativo, e conseqüentemente a alteração da homeostase corpórea.

Com a administração crônica dos extratos (EBH e EBA) provenientes das folhas de *Eugenia brasiliensis* evidenciamos a capacidade destes na prevenção do aumento basal dos triglicerídeos em todas as dosagens testadas (50, 100 e 150 mg/kg) e através da análise histopatológica no fígado de ratos verificamos que o EBH apresentou diminuição do acúmulo de gordura hepática em todas as concentrações testadas (50, 100 e 150 mg/kg), já o EBA não demonstrou redução das gotículas de gordura nas dosagens de 50 e 100 mg/kg, contudo, a atividade do extrato foi mais pronunciada na dosagem de 150 mg/kg, reduzindo parcialmente as gotículas de gordura. Esses dados corroboram com nossos achados bioquímicos, onde houve prevenção do quadro de HTG gerado pela administração de óleo de coco em ratos. Considerando os níveis de TBA-RS, a administração crônica de EBH e EBA, nas doses de 100 e 150 mg/kg, impediu o aumento dos níveis de TBA-RS causado pela HTG, enquanto EBH e EBA, na dose de 50 mg/kg, não impediu o aumento dos níveis de TBA-RS em plasma de ratos. Com relação ao conteúdo total de sulfidrilas, que avalia danos proteicos, o EBH, na dosagem de 150 mg/kg, impediu a redução do teor total de sulfidrilas causada pela HTG em plasma de ratos, enquanto 100 e 150 mg/kg de EBA também impediram a redução do teor total de sulfidrilas. Além disso, EBH e EBA, nas doses de 50,



100 e 150 mg/kg, impediram a diminuição da atividade de CAT causada pelo HTG em eritrócitos de ratos.

Finalmente, investigamos os efeitos da administração dos extratos sobre as alterações provocadas pela HTG induzida pelo óleo de coco sobre as atividades das enzimas antioxidantes no fígado de ratos. Os resultados mostraram que a administração crônica de EBH e EBA em ratos, em doses de 50, 100 e 150 mg/kg, impediu o aumento da atividade hepática da CAT causada pela HTG. Com relação à enzima antioxidante SOD, os dados mostraram que o EBH preveniu parcialmente a diminuição da enzima SOD nas dosagens de 100 e 150 mg/kg, já na dosagem de 50 mg/kg não impediu a diminuição da atividade da SOD, enquanto a administração crônica do EBA (100 e 150 mg/Kg) foi capaz de prevenir a diminuição da atividade da SOD, quando comparada com o grupo de controle, mas não na concentração 50 mg/kg. Adicionalmente, a administração crônica de 50 mg/kg de EBH impediu parcialmente a diminuição da atividade de GSH-Px, enquanto que doses de 100 e 150 mg/kg impediram totalmente esta alteração. Em contraste, a administração crônica de EBA, nas dosagens de 100 e 150 mg/kg, impediu parcialmente a alteração da atividade hepática da GSH-Px causada pela HTG induzida por óleo de coco, já na dosagem de 50 mg/kg não apresentou prevenção.

Em conclusão, nossos dados indicam que o EBH e EBA, obtidos a partir das folhas de *E. brasiliensis*, apresentam efeito hipolipemiante e elevada capacidade antioxidante. Esses resultados poderão contribuir para melhor consolidação das bases de dados dos componentes que possuem ação farmacológica na planta alvo desse estudo. No entanto, são necessários mais estudos para avaliar se *E. brasiliensis* pode ser útil como um adjuvante potencial para a prevenção de HTG e danos oxidativos.

## 8 REFERÊNCIAS

AEBI H. **Catalase in Vitro. Method Enzym** 105:121-126. 1984

AKSENOV MY, MARKESBERY WR. **Changes in thiol content and expression of glutathione redox system genes in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease.** *Neurosci Lett* 302: 141–145. 2001

ALBUQUERQUE, UP; HANAZAKI, N. **As pesquisas etnodirigidas na descoberta de novos fármacos de interesse médico e farmacêutico: fragilidades e perspectivas.** *Revista Brasileira de Farmacognosia.* V. 16, P 678-689. 2006

AUSTIN, MA; HOKANSON, JE; EDWARDS, KL. **Hypertriglyceridemia as a cardiovascular risk factor.** *Am J Cardiol* 81(4A):7B-12B. 1998

BALIGA, MS; BHAT, HP; BALIGA, BRV; WILSON, R; PALATTY, PL. **Phytochemistry, traditional uses and pharmacology of Eugenia jambolana Lam. (black plum): A review.** *Food Research International*, v. 44, p. 1776–1789. 2011.

BARBOSA, KBF; COSTA, NMB.; ALFENAS, RCG; PAULA, SO; MINIM, VPR; BRESSAN, J. **Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios.** *Rev. Nutr.* vol.23 no.4 Campinas. 2010.

BARREIROS, ALBS; DAVID, JM; DAVID, JP. **Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo.** *Quím. Nova* vol.29 no.1 São Paulo, 2006.

BENFATTI,CS; CORDOVA, SM; GUEDES, A; MAGINA, MDA; CORDOVA, CMM. **Atividade antibacteriana in vitro de extratos brutos de espécies de *Eugenia sp* frente a cepas de mollicutes.** *Revista Pan-Amazônica de Saúde*, v.1 n.2 Ananindeua jun. 2010

BERRA, CM; MENCK, CFM; MASCIO, P Di. **Estresse oxidativo, lesões no genoma e processos de sinalização no controle do ciclo celular.** Quim. Nova, Vol. 29, No. 6, 1340-1344, São Paulo, 2006

BIANCHI, ML; ANTUNES, LMG. **Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta.** Revista de Nutrição, Campinas, v. 12, n. 2, p. 123-130, 1999.

BONNES, T; GUÉRIN, T. **Is malonaldeyde a valuable of peroxidation?** Biochemical Pharmacology, Oxford, Biochemical Pharmacodgy. Vol. 44. No. 5. pp. 985-988. 1992.

BRASIL, Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008. **Ministério da Ciências e Tecnologia**, Concelho Nacional de Controle de Experimentação Animal, Brasília-DF, 2008.

BRAVO, L. **Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism, and Nutritional Significance.** Nutrition Reviews, Vol. 56, No. 11, P. 317- 333, 1998.

BREWER- Junior, HB. **Hypertriglyceridemia: changes in the plasma lipoproteins associated with an increased risk of cardiovascular disease.** Am J Cardiol 83:3Fe12F. 1999.

CARVALHO, ACB; NUNES, DSG; BARATELLI, TG; SHUQAIR, NSMSAQ.; MACHADO-NETTO, E. **Aspectos da legislação no controle dos medicamentos fitoterápicos.** T&C Amazônia, Ano V, Número 11, Junho de 2007

CHAPMAN MJ; GINSBERG HN; AMARENCO P; ANDREOTTI F; BORÉN J; CATAPANO AL; DESCAMPS OS; FISHER E; KOVANEN PT; KUIVENHOVEN JA; LESNIK P; MASANA L; NORDESTGAARD BG; RAY KK; REINER Z; TASKINEN MR; TOKGÖZOGLU L; TYBJÆRG-HANSEN A;

WATTS GF. **Triglyceride-rich lipoproteins and high-density lipoprotein cholesterol in patients at high risk of cardiovascular disease: evidence and guidance for management.** European Heart Journal 32:1345–61. 2011

CHOIA, S.S.; DIEHLA, A. M. **Hepatic triglyceride synthesis and nonalcoholic fatty liver disease.** Current Opinion Lipidology. 19(3):295-300. 2008.

CHRISTIAN, JB; BOURGEOIS, N; SNIPES, R; LOWE, KA. **Prevalence of severe (500 to 2,000 mg/dl) hypertriglyceridemia in United States adults.** Am J Cardiol 107:891-897. 2011

CORRÊA-CAMACHO, CR; DIAS-MELICIO, LA; SOARES, ÂMVC. **Aterosclerose, uma resposta inflamatória.** Arq Ciênc Saúde;14(1):41-48. 2007

COSTA-HONG, V; BORTOLOTTI, LA; Jorgetti, V; CONSOLIM-COLOMBO, F; KRIEGER EM; DE LIMA, JGG. **Estresse oxidativo e disfunção endotelial na doença renal crônica.** Arquivo Brasileiro Cardiologia. vol.92 no.5 São Paulo, 2009

CROMWELL, WC; BARRINGER, TA. **Low-density lipoprotein and apolipoprotein B: clinical use in patients with coronary heart disease.** Curr Cardiol Rep 11:468–475. 2009

DALLINGA-THIE, GM; FRANSSEN, R; MOOIJ, HL; VISSER, ME; HASSING, HC; PEELMAN, F; KASTELEIN, JJ; PÉTERFY, M; NIEUWDORP, M. **The metabolism of triglyceride-rich lipoproteins revisited: new players, new insight.** Atherosclerosis 211:1–8. 2010

I DIRETRIZ DE PREVENÇÃO DA ATEROSCLEROSE NA INFÂNCIA E NA ADOLESCÊNCIA. **Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia. Arquivos Brasileiros de Cardiologia - Volume 85, Suplemento VI, 2005.**

DI STASI, LC. **Plantas medicinais: Arte e ciência, um guia de estudo interdisciplinar.** Editora UNESP. São Paulo. P. 10-21. 1996.

FARNSWORTH, NR; AKERELE, O; BINGEL, AS; SOEJARTO, DD; GUO, Z. **Medicinal plants in therapy.** *Bulletin of the World Health Organization*, v. 63, n. 6, p. 965–981, 1985.

FERREIRA, ALA; MATSUBARA, LS. **Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo.** *Rev. Assoc. Med. Bras.* vol.43 n.1 São Paulo Jan./Mar. 1997

FERREIRA, AGK; CUNHA, AA; MACHADO, FR; PEDERZOLLI, CD; DALAZEN, GR; ASSIS, AM; LAMERS, ML; SANTOS, MF; DUTRA-FILHO, CS; WYSE, ATS. **Experimental Hyperprolinemia Induces Mild Oxidative Stress, Metabolic Changes, and Tissue Adaptation in Rat Liver.** *Journal of Cellular Biochemistry*, v. 113, n. 1, p. 174-183, 2012.

FLORES, G; DASTMALCHI, K; PAULINO, S; WHALEN, K; DABO, AJ; REYNERTSON, KA; FORONJY, RF; D'ARMIENTO, JM.; KENNELLY EJ. **Anthocyanins from *Eugenia brasiliensis* edible fruits as potential therapeutics for COPD treatment.** *Food Chemistry* 134, 1256–1262, 2012

FRAGA, CG; GALLEANO, M; VERSTRAETEN, SV; OTEIZA, PI. **Basic biochemical mechanisms behind the health benefits of polyphenols.** *Molecular Aspects of Medicine* 31, p. 435–445, 2010

FRIGHETTO, N; WELENDORF, RM; SILVA, AMP; NAKAMURA, MJ; SIANI, AC. **Aplicação de cromatografia centrífuga de contracorrente na purificação de ácido ursólico das folhas de *Eugenia brasiliensis* Lam.** *Revista Brasileira de Farmacognosia.* 15(4):338–343. 2005

GIANNINI, SD. **Aterosclerose e dislipidemias: Clínica terapêutica, fundamentos práticos.** BG editora. São Paulo, 1998

GINSBERG, HN. **New perspectives on atherogenesis: role of abnormal triglyceride-rich lipoprotein metabolism.** *Circulation* 106:2137–2142. 2002

GOLDBERG, IJ; ECKEL, RH; MCPHERSON, R. **Triglycerides and heart disease: Still a hypothesis?** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 31:1716–1725. 2011

GORDON, MH. **The mechanism of antioxidant action in vitro.** In B. J. F. Hudson (Ed.), *Food antioxidants.*: Elsevier. London, 1990

GREEN, K; BRAND, MD; MURPHY, MP. **Prevention of mitochondrial oxidative damage as a therapeutic strategy in diabetes.** *Diabetes*; 53(Suppl 1): 110-8.2004

GREENBERG, BH; BLACKWELDER, WC; LEVY, RI. **Primary type V hyperlipoproteinemia. A descriptive study in 32 families.** *Ann Intern Med* 87:526-534. (1977)

GRUNDY, SM. **Obesity, metabolic syndrome, and cardiovascular disease.** *J Clin Endocrinol Metab* 89:2595–600. 2004

HANEY, EM; HUFFMAN, LH; BOUGATSOS, C; FREEMAN, M; STEINER, RD; HEIDI, DN. **Screening and Treatment for Lipid Disorders in Children and Adolescents: Systematic Evidence Review for the US Preventive Services Task Force.** *PEDIATRICS* V.120, N. 1, 2007.

HALLIWELL, B; GUTTERIDGE, JCM. **Free radicals in biology and medicine.** 3<sup>a</sup> ed. New York: Oxford University Press Inc; 1999.

HALLIWELL B. **Reactive oxygen species and the central nervous system.** *J Neurochem* ; 59: 1.609-23. 1992

HEGELE, RA. **Plasma lipoproteins: genetic influences and clinical implications.** Nat Rev Genet 10:109–21. 2009

HEGELE, RA; GINSBERG, HN; CHAPMAN, MJ; NORDESTGAARD, BG; KUIVENHOVEN, JA; AVERNA, M; BORÉN, J; BRUCKERT, E; CATAPANO, AL; DESCAMPS, OS; HOVINGH, GK; HUMPHRIES, SE; KOVANEN, PT; MASANA, L; PAJUKANTA, P; PARHOFER, KG; RAAL, FJ; RAY, KK; SANTOS, RD; STALENHOF, AFH; STROES, E; TASKINEN, MR; TYBJÆRG-HANSEN, A; WATTS, GF; WIKLUND, O. **The polygenic nature of hypertriglyceridaemia: implications for definition, diagnosis, and management.** Lancet Diabetes Endocrinol 2:655-666. 2014

HENRY, JB. **Diagnósticos clínicos e tratamento por métodos laboratoriais.** 20º Ed. Manole. São Paulo, 2008

HODGSON, JM; PUDDEY, IB. **Dietary flavonoids and cardiovascular disease: does the emperor have any clothes?** Journal of Hypertension, 23:1461–1463. 2005

HUBER, PC; ALMEIDA, WP; FÁTIMA, A. **Glutathione e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos.** Química Nova, Vol. 31, No. 5, 1170-1179. 2008

HUDSON, BJF. **Food antioxidants.** Elsevier applied food sciences series. Ed Elsevier Applied Science, London and New York. 1990

JØRGENSEN, AB; FRIKKE-SCHMIDT, R; NORDESTGAARD, BG; TYBJÆRG-HANSEN, A. **Loss of-function mutations in APOC3 and risk of ischemic vascular disease.** The New England Journal Medicine, 371:32-41. 2014

JUN, SW; KIM, M; KIM, J; PARK, HJ; LEE, S; WOO, J; HWANG, S. **Preparation and characterization of simvastatin/hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin inclusion complex using supercritical antisolvent (SAS) process.** Eur J Pharm Biopharm 66(3):413-421. 2007

KAR A, CHOUDHARY BK, BANDYOPADHYAY NG. **Comparative evaluation of hypoglycaemic activity of some Indian medicinal plants in alloxan diabetic rats.** Journal of Ethnopharmacology 84:105-108. 2003

KARAKAYA, S. **Bioavailability of Phenolic Compounds. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 44, p. 453- 464, 2004.**

LAAT, WL; JASPERS, NGJ; HOEIJMAKERS, JHJ. **Molecular mechanism of nucleotide excision repair.** GENES & DEVELOPMENT 13:768–785 by Cold Spring Harbor Laboratory, 1999

LABREUCHE, J; TOUBOUL, PJ; AMARENCO, P. **Plasma triglyceride levels and risk of stroke and carotid atherosclerosis: a systematic review of the epidemiological studies.** Atherosclerosis 203:331–345. 2009

LAM, L.; YOUNOSSI, Z.M. **Treatment options for nonalcoholic fatty liver disease.** Therapeutic Advances in Gastroenterology. 3(2): 121–137. 2010

LI,S.; TAN, H.; WANG, N.; ZHANG, Z.; LAO, L.; WONG, C.; FENG, Y. **The Role of Oxidative Stress and Antioxidants in Liver Diseases.** International Journal of Molecular Science. 16(11): 26087–26124. 2015

LLORET-LINARES, LC; PELLETIER, AL; CZERNICHOW, S; VERGNAUD, AC; BONNEFONT-ROUSSELOT, DP; LEVY, P; RUSZNIEWSKI, P; BRUCKERT, E. **Acute pancreatitis in a cohort of 129 patients referred for severe hypertriglyceridemia.** Pancreas 37:13-22. 2008

LOIO, M; MAIA, DA. **Rastreo de dislipidemias em crianças e adolescentes – a evidência que sustenta as recomendações.** Portugal, Rev Port Med Geral Fam 2014;30:264-7



LOWRY, OH; ROSEBROUGH, NJ; FARR, AL; RANDALL, RJ. **Protein measurement with the Folin-Phenol reagents.** J Biol Chem 193:265-275. 1951

LUSHCHAK, VI. **Adaptive response to oxidative stress: Bacteria, fungi, plants and animals.** Comparative Biochemistry and Physiology, Part C 153, 175–190, Elsevier, 2011

LUSHCHAK, VI. **Oxidative stress – environmental induction and dietary antioxidants.** Ed Janeza Trdine 9, 51000 Rijeka, Croatia, 2012

LUZ, SCS. **Estudo fitoquímico da cera epicuticular de *Baccharis uncinella* e comparação da atividade antioxidante com outras espécies do gênero *accharis*. Florianópolis.** Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal de Santa Catarina. 2003

MCINTYRE TM;HAZEN SL. **Lipid Oxidation and Cardiovascular Disease: Introduction to a Review Series.** Circulation Research, Journal of the American Heart Association. 107:1167-1169. 2010

MAGINA, MDA. **Estudo fitoquímico e biológico de espécies do gênero *Eugenia*.** Tese apresentada ao Programa de Pós graduação em Química da Universidade Federal de Santa Catarina(UFSC). Florianópolis. 2008

MAGINA, MDA; GILIOLI, A; MORESCO, HH; COLLA, G; PIZZOLATTI, MG; BRIGHENTE, IMC. **Atividade antioxidante de três espécies de *Eugenia* (Myrtaceae).** Latin American Journal of Pharmacy. 29 (3): 376-82. 2010

MAGINA, MDA; DALMARCO, EM; DALMARCO, JB; COLLA, G; PIZZOLATTI, MG,; BRIGHENTE, IMC. **Bioactive triterpenes and phenolics of leaves of *Eugenia brasiliensis*.**Química Nova 35(6):1184-1188. 2012

MAISUTHISAKUL, P; SUTTAJIT, M; PONGSAWATMANIT, R. **Assessment of phenolic content and free radical-scavenging capacity of some Thai indigenous plants**. Food Chemistry, London, v. 100, p. 1409-1418, 2007.

MARKLUND, S. **Pyrogallol autooxidation**. **Handbook of Methods for Oxygen Radical Research**.Greenwald, Press boca raton: p. 243-247.1985

MARTELLI, A. **Aspectos fisiopatológicos da aterosclerose e a atividade física regular como método não farmacológico no seu controle**. Revista Saúde e Desenvolvimento Humano 30; 2(1): 41-52. 2014

MEISTER, A; ANDERSON, ME. **Glutathione**. Ann. Rev. Biochem. .52:711—60. 1983

MENDIS, S; PUSKA, P; NORRVING, B. (Eds). **Global Atlas on Cardiovascular Disease Prevention and Control**. Geneva, World Health Organization(WHO), 2011).

MILLER, M; STONE, NJ; BALLANTYNE, C; BITTNER, V; CRIQUI, MH; GINSBERG, HN; GOLDBERG, AC; HOWARD, WJ; JACOBSON, MS; KRIS-ETHERTON, PM; LENNIE, TA; LEVI, M; MAZZONE, T; PENNATHUR, S. **Triglycerides and cardiovascular disease: a scientific statement from the American Heart Association**.Circulation 123:2292–2333. 2011

MOTTA, VT. **Bioquímica clínica para o laboratório: Princípios e Interpretações**. 5.ed. Rio de Janeiro: MedBook, 2009.

NATIONAL CHOLESTEROL EDUCATION PROGRAM. **Detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults (Adult Treatment Panel III)**: Final Report 2002. Available at: <http://www.nhlbi.nih.gov/guidelines/cholesterol/index.htm>. Accessed May 05, 2015.

NEIL, HA; COOPER, J; BETTERIDGE, DJ; CAPPS, N; MCDOWELL, IFW; DURRINGTON, PN; SEED, M; MANN, JI; HUMPHRIES, SE . **All-cause and cardiovascular mortality in treated patients with severe hypertriglyceridaemia: a longterm prospective registry study.** *Atherosclerosis* 211:618-623. 2010

NELSON, DL; COX, MM. **Princípios de Bioquímica de Lehninger.** 5 Ed. Artimed, Porto Alegre, 2011

NICOLETTI, MA; OLIVEIRA-JÚNIOR, MA; BERTASSO, CC; CAPOROSSI, PY; TAVARES, APL. **Principais interações no uso de medicamentos fitoterápicos.** *Infarma*, v.19, n.1, p.32-50, 2007.

NWOSE, E.U.; JELINEK, H.F.; RICHARDS, S.S. KERR, P.G. **The ‘vitamin E regeneration system’ (VERS) and an algorithm to justify antioxidant supplementation in diabetes – A hypothesis.** *Medical Hypotheses*.70, 1002–1008. 2008

OGDEN, CL; CARROLL, MD; KIT, BK; FLEGAL, KM. **Prevalence of Obesity and Trends in Body Mass Index Among US Children and Adolescents, 1999-2010**  
. *JAMA*. 2012;307(5):483-490. 2012

OHKAWA, H; OHISHI, N. YAGI, K. **Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction.** *Anal Biochem* 95:351-358. 1979

OTVOS, JD; MORA, S; SHALAUROVA, I; GREENLAND, P; MACKEY, RH; GOFF Jr., DC. **Clinical implications of discordance between lowdensity lipoprotein cholesterol and particle number.** *J Clin Lipidol* 5:105–113. 2011

PAGANO, G.; PACINI, G.; MUSSO, G.; GAMBINO, R.; MECCA, F.; DEPETRIS, N.; CASSADER, M; DAVID, E.; CAVALLO-PERIN, P.; RIZZETTO, M. **Nonalcoholic Steatohepatitis, Insulin Resistance, and Metabolic**

**Syndrome: Further Evidence for an Etiologic Association.** Hepatology;35(2):367-72. 2002

PEREIRA, C.; BARROS, L.; FERREIRA, I.C.F.R. **Extraction, identification, fractionation and isolation of phenolic compounds in plants with hepatoprotective effects.** Journal of the Science of Food Agriculture. 96: 1068–1084. 2016

PIETROVSKI, EF; MAGINA, MDA; GOMIG, F; PIETROVSKI, CF; MICKE, GA; BARCELLOS, M; PIZZOLATTI, MG; CABRINI, DA; BRIGHENTE, IMC; OTUKI, MF. **Topical anti-inflammatory activity of *Eugenia brasiliensis* Lam. (Myrtaceae) leaves.**Journal of Pharmacy and Pharmacology 60:1–9. 2008

RAVI, K; RAJASEKARAN, S; SUBRAMANIAN, S. **Antihyperlipidemic effect of *Eugenia jambolana* seed kernel on streptozotocin-induced diabetes in rats.** Food and Chemical Toxicology 43:1433–1439. 2005

RAVI, K; RAMACHANDRAN, B; SUBRAMANIAN, S. **Effect of *Eugenia Jambolana* seed kernel on antioxidant defense system in streptozotocin-induced diabetes in rats.** Life Sciences 75:2717–2731. 2004

REAVEN, GM. **Role of insulin resistance in human disease (Syndrome X): an expanded definition.**Annu Rev Med;44:121-131. 1993

REAVEN, GM. **Insulin resistance and the development of cardiovascular disease.**Circulation 7:10-14. 1989

REITZ, RD; KLEIN, RM. **Mirtáceas. Flora Ilustrada Catarinense**(Reitz, P.R., Ed) I parte. Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues, p 63. 1969

REZNICK, AZ; PACKER, L. **Oxidative Damage to Proteins: Spectrophotometric Method for Carbonyl Assay.** Methods in enzymology, Vol. 233: 357-363, 1994

REVILLA, J. **Plantas úteis da bacia amazônica**. Rio de Janeiro: INPA, 44 p. 2002

ROGER, VL; GO, AS; LLOYD-JONES DM; BENJAMIN, EJ; BERRY, JD; BORDEN WB, *et al.* **Heart disease and stroke statistics-2012 Update: A report from the American Heart Association**. *Circulation* 125:188-97. 2012

ROVER-JÚNIOR, L; HÖEHR, NF; VELLASCO, AP; KUBOTA, LT. **Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutathiona associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo**. *Quim. Nova*, Vol. 24, N. 1, 112-119, 2001

SAHEBKAR, A; CHEW, GT; WATTS, GF. **Recent advances in pharmacotherapy for hypertriglyceridemia** *Progress in Lipid Research* 56:47–66. 2014

SALLES, MB. **Avaliação do estresse oxidativo agudo após trauma cirúrgico realizado em tecido ósseo de ratos Wistar**. Tese apresentada ao Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. São Paulo, 2007

SANTOS, RD; *et al.* **III Diretrizes Brasileiras sobre Dislipidemias e Diretriz de Prevenção da Aterosclerose**. *Sociedade Brasileira de Cardiologia. Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, Arq Bras Cardiol volume 77, (suplemento III ), 2001

SCHNEIDER, CD; OLIVEIRA, AR. **Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico**. *Rev Bras Med Esporte* \_ Vol. 10, Nº 4, 2004

SIES, H. **Biochemistry of oxidative stress**. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 25 1058-1071. 1986

SIES, H; STAHL, W. **Vitamins E and C,  $\beta$ -carotene, and other carotenoids as antioxidants.** American Journal of Clinical Nutrition;62(6 Suppl):1315S-1321S. 1995

SIGNORINI, JL; SIGNORINI, SL. **Atividade Física e Radicais Livres: Aspectos biológicos, químicos, fisiopatológicos e preventivos.** Ed da Universidade de São Paulo-Ícone. 1993.

SIMÕES, CMO; SCHENKEL, EP. **A pesquisa e a produção brasileira de medicamentos a partir de plantas medicinais: a necessária interação da indústria com a academia.** Revista Brasileira de Farmacognosia.V12, n. 1, p 35- 40, Florianópolis, 2002

SCHUTZ, AR. **Introdução à botânica sistemática.** 5 ed. Porto Alegre: Ed UFRGS. 1980

SUN, J; CHU, YF.; WU, X; LIU, RH. **Antioxidant and antiproliferative activities of common fruits.** Journal of Agricultural and Food Chemistry, Dec 4;50(25):7449-54.2002

TEKMAN, B; OZDEMIR, H; SENTURK, M; CIFTCI, M. **Purification and characterization of glutathione reductase from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) liver and inhibition effects of metal ions on enzyme activity.** Comparative Biochemistry and Physiology. Part C 148,117–121, 2008

TUROLLA, MSR; NASCIMENTO, ES. **Informações toxicológicas de Alguns Fitoterápicos Utilizados no Brasil.** Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas 42(2):289-306. (2006)

VANNUCCHI, H; MOREIRA, EAM; CUNHA, DF; JUNQUEIRA-FRANCO, MVM; BERNARDES, MM; JORDÃO-JUNIOR, AA. **Papel dos nutrientes na peroxidação lipídica e no sistema de defesa antioxidante.** Medicina, Ribeirão Preto, 31: 31-44, 1998.

VASCONCELOS, SML; GOULART, MOF; MOURA, JBF; BENFATO, VMMS; KUBOTA, LT. **Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: Principais métodos analíticos para sua determinação.** Química Nova, vol 30, No.5, 1323-1338, Alagoas, 2007

WATTS, GF; OOI, EM; CHAN, DC. **Demystifying the management of hypertriglyceridemia.** Nat Rev Cardiol 10:648–61. 2013

WENDEL, A. **Glutathione peroxidase.** Methods Enzymol 77:325-33. 1981

WISEMAN, H; HALLIWELL, B. **Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to câncer.** Biochem. J. 313, 17–29 (Printed in Great Britain). 1996

WONG, ND. **Epidemiological studies of CHD and the evolution of preventive cardiology.** Nature Review Cardiolgy. 11, 276–289, California, USA. 2014.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Prevention of Cardiovascular Disease Pocket Guidelines for Assessment and Management of Cardiovascular Risk.** Geneva, 2007.

WU, X; GU, L; HOLDEN, J; HAYTOWITZ, DB; GEBHARDT, SE; BEECHER, G; PRIOR, R L. **Development of a database for total antioxidant capacity in foods: a preliminary study.** Journal of Food Composition and Analysis, Volume 17, Issues 3–4, 2004.

YIN, H; XU, L; PORTER, NA. **Free radical lipid peroxidation. Mechanisms and analysis.** American Chemical Society. Chem. Rev. 2011, 111, 5944–5972, Unites States, 2011

YUNES, RA; PEDROSA, RC; CECHINEL-FILHO, V. **Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de**

**fitoterápicos e fitofármacos no Brasil.** Química Nova, Vol. 24, No. 1, 147-152, 2001.

YUSUF, S; HAWKEN, S; OUNPUU, S; DANS, T; AVEZUM, A; LANAS, F; McQUEEN, M; BUDAJ, A; PAIS, P; VARIGOS, J; LISHENG, L. **Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries, the INTERHEART study.** The Lancet 364:937-52. 2004

ZENI, ALB; ALBUQUERQUE, CAC; GONÇALVES, F; LATINI, A; TASCA, CI; PODESTÁ, R; PAGLIOSA, CM; DUARTE, FS; LIMA, TCM; MARASCHIN M. **Phytochemical profile, toxicity and antioxidante activity of *Aloysiagratisissima* (verbenaceae).** Quim Nova 36(1): 69-73. (2013).



## ANEXO 1. Termo de Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa

Joinville, 13 de Abril de 2015

OFÍCIO N.º 002/2015 – PRPPG/CEP

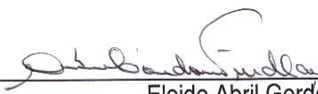
Para Profª Daniela Delwing de Lima  
Departamento de Pós-Graduação em Saúde e Meio Ambiente  
UNIVILLE

Assunto: Parecer do Projeto de Pesquisa nº 003/215

O Projeto de Pesquisa intitulado “**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL HIPOLIPEMIANTE E ANTIOXIDANTE DE *Eugenia brasiliensis* SOBRE O ESTRESSE OXIDATIVO DE RATOS HIPERLIPIDÊMICOS**”, sob sua responsabilidade, foi **APROVADO** pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UNIVILLE, após ter sido analisado e verificado que atende plenamente aos parâmetros descritos na Lei 11.794 de 08 de Outubro de 2008 e Resolução 19/07 CEP/UNIVILLE.

Lembramos que, ao finalizar a pesquisa, deverá ser encaminhado ao CEP/CEUA/UNIVILLE o Relatório Final do projeto de pesquisa.

Atenciosamente,



---

Eleide Abril Gordon Findlay  
Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa com Animais da UNIVILLE

## AUTORIZAÇÃO

Nome do autor: **Aline Barbosa Lima**

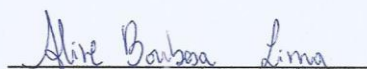
RG: 17.013.129 - MG

Título da Dissertação:

**“Efeitos hipolipemiante e antioxidante de *Eugenia brasiliensis* em modelo animal de hipertrigliceridemia induzida por óleo de coco em ratos”.**

Autorizo a Universidade da Região de Joinville – UNIVILLE, através da Biblioteca Universitária, disponibilizar cópias da dissertação de minha autoria.

Joinville, 20 de fevereiro de 2017.



Aline Barbosa Lima