**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Fenil éster do ácido caféico melhora a resposta ao estresse oxidativo em
modelo animal de obesidade induzida por dieta hiperlipídica**

Aline Camila Caetano

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre
em Ciências. Área de concentração: Ciência e Tecnologia
de Alimentos

**Piracicaba
2010**

Aline Camila Caetano
Bacharel em Ciências dos Alimentos

**Fenil éster do ácido caféico melhora a resposta ao estresse oxidativo em modelo animal de
obesidade induzida por dieta hiperlipídica**

Orientador:
Prof. Dr. **SEVERINO MATIAS DE ALENCAR**

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre
em Ciências. Área de concentração: Ciência e Tecnologia
de Alimentos

Piracicaba
2010

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP**

Caetano, Aline Camila

Fenil éster do ácido caféico melhora a resposta ao estresse oxidativo em modelo animal de obesidade induzida por dieta hiperlipídica / Aline Camila Caetano. - - Piracicaba, 2010. 100 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2010. Bibliografia.

1. Antioxidantes 2. Enzimas 3. Estresse oxidativo 4. Obesidade I. Título

CDD 616.398
C128f

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

Ao meu bem maior, minha família...
Papai Toninho e Mamãe Zácia;
Ar e Jaime; Cé, Ana Paula e Ana Luísa;
Andy, To e Laurinha...
E a todas as outras pessoas que
com um sorriso, uma palavra ou um gesto amigo,
fizeram a minha caminhada
mais fácil de ser percorrida.

DEDICO

A idade de ser feliz

Mário Quintana

Existe somente uma idade para a gente ser feliz, somente uma época na vida de cada pessoa em que é possível sonhar e fazer planos e ter energia bastante para realizá-los a despeito de todas as dificuldades e obstáculos.

Uma só idade para a gente se encontrar com a vida e viver apaixonadamente e desfrutar tudo com toda intensidade sem medo nem culpa de sentir prazer. Fases douradas em que a gente pode criar e recriar a vida à nossa própria imagem e semelhança e vestir-se com todas as cores e experimentar todos os sabores e entregar-se a todos os amores sem preconceito nem pudor.

Tempo de entusiasmo e coragem em que todo desafio é mais um convite à luta que a gente enfrenta com toda disposição de tentar algo NOVO, de NOVO e de NOVO, e quantas vezes for preciso.

Essa idade tão fugaz na vida da gente chama-se PRESENTE e tem a duração do instante que passa.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me conceder vida e saúde para realizar este trabalho e por iluminar o meu caminho;

À minha família, por estar sempre presente, me incentivando, apoiando e fortalecendo;

À Dra. Rosângela Maria Neves Bezerra, por ter me acolhido no seu grupo de trabalho, pela orientação e por ter proporcionado, sempre, condições excelentes de trabalho, além da amizade compartilhada;

Ao Prof. Dr. Severino Matias de Alencar, pela orientação, amizade e ajuda antes e durante o mestrado;

Ao Prof. Dr. Ricardo Antunes de Azevedo, pela acolhida, orientação e abertura do laboratório para as análises de estresse oxidativo;

Ao Prof. Dr. Pedro Rosalen, pela concessão das salas do biotério na Faculdade de Odontologia de Piracicaba (FOP/UNICAMP);

Ao Prof. Dr. Flávio Cesar Almeida Tavares e ao Dr. Luiz Humberto Gomes (Beto) e todos do Laboratório de Genética de Leveduras – Departamento de Genética (ESALQ/USP) – pela ajuda durante a utilização do software para a densitometria dos géis de eletroforese;

Ao Prof. Dr. Leonardo Oliveira Médici (Universidade Federal Rural – RJ) e ao amigo Fernando Piotto pelo auxílio nas análises estatísticas;

À amiga e companheira de trabalho, Lucimara, pela ajuda, amizade, cumplicidade e compreensão;

À Flávia, pela amizade, ajuda e atenção sem medida durante todas as análises no Laboratório de Genética Bioquímica de Plantas – Departamento de Genética (ESALQ/USP) e na elaboração / correção da dissertação;

Às amigas, colegas, irmãs e cúmplices Marcela (Morãguete), Paula (Martini), Letícia, Camila, Luciane, Ira e Clemetine da República “Saia Daki”, pelo companheirismo e força, em especial, a Priscilla (C/pota), Talita (Sábado) e Selma (Rapel) pelos acessos de riso proporcionados e compartilhados durante as tantas “baladas” nas Lojas Americanas Express, gravando o nosso videoclipe ou qualquer outro “evento”;

Às amigas Leila Priscila (Xiua) e Carolina (Carol) pelo companheirismo, ajuda, força e, principalmente, pela amizade;

Às colegas de laboratório e de mestrado: Adna, Ana Paula (Fubá), Keityane, Mirian (Trakinas) e; todas as pessoas e amigos do Laboratório de Bioquímica de Alimentos e Análise Instrumental – Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição (ESALQ/USP): Ivani, Tatiane, Ingridy Luciana Mourão, Luciana Ferracini e Juliana;

Às amigas Bertha, Daiana, Gisele (Gicka), Mariana, Milca, Mônica, Paula, Priscila e Salete e aos amigos Rogério e Tiago, além das outras amigas conquistadas durante a convivência e trabalho no Laboratório de Genética Bioquímica de Plantas – Departamento de Genética (ESALQ/USP);

Às amigas / irmãs Silvia (Sil) e Elisangela (Eh) e aos amigos Adriana e Andriago, Renata e Guerino, Cirineu, Ângela e Daniel P. pelos momentos de alegria e descontração, cumplicidade e companheirismo;

Aos amigos Roque, Luzimario e Paulo Henrique (Ispiño) pelos momentos de descontração;

Aos amigos Dirceu, Ademilson e Iraciara, Pedro Mac e Rodrigo Moretto pela confiança, força e oportunidade de crescimento;

Às amigas Aline F. (Risadinha), Aline M., Amanda (Amêndoa), Ana Amelia, Ana Carolina, Fernanda, Priscila Martinatti e Tamara e, aos amigos Marcelo (P-zão) e Fernando (Zen), pelas conversas, companhia, força e pela amizade e presença, apesar da distância;

Aos colegas de curso (à IV Turma de Ciências dos Alimentos e às outras turmas) pela convivência e amizade;

Aos amigos que fazem parte da minha vida, que mesmo distantes, sempre me incentivaram de alguma forma;

Às funcionárias das Bibliotecas Central e do Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição (ESALQ/USP), pela ajuda e correção da dissertação;

À ESALQ e ao Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição, pela oportunidade e toda estrutura concedida na realização do Mestrado;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP – Processo 08/52721-5) pela concessão das bolsas de estudo;

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização desse trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO	15
ABSTRACT	17
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	19
1 INTRODUÇÃO.....	21
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	23
2.1 Obesidade	23
2.2 Estresse Oxidativo	26
2.2.1 Sistema antioxidante de defesa.....	29
2.2.1.1 Sistema de defesa enzimático	29
a. Superóxido dismutase	30
b. Catalase.....	31
c. Glutathione Peroxidase	32
d. Glutathione Redutase.....	33
2.2.1.2 Sistema de defesa não-enzimático.....	33
a. Glutathione	33
b. Outros antioxidantes não enzimáticos	34
2.3 Produtos Naturais: Própolis e CAPE.....	36
3 OBJETIVOS.....	39
3.1 Objetivo Geral	39
3.2 Objetivo Específico	39
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	41
4.1 Delineamento Experimental – Efeito do CAPE no estresse oxidativo induzido pela obesidade	41
4.1.1 Protocolo Experimental	41

4.2 Caracterização do modelo experimental	42
4.2.1 Controle de peso corporal e de peso do fígado e da gordura epididimal	42
4.2.3 Determinação sérica da enzima gama glutamil transferase (γ -GT)	43
4.3 Determinação da peroxidação de lipídeos	43
4.4 Determinação dos níveis de peróxido de hidrogênio	43
4.5 Extração de proteínas solúveis totais	44
4.6 Determinação de proteína solúveis totais.....	44
4.7 Atividade das enzimas antioxidantes	44
4.7.1 Atividade da superóxido dismutase (SOD).....	45
4.7.1.1 Atividade da SOD em espectrofotômetro	45
4.7.1.2 Identificação das isoformas ativas da SOD em gel não desnaturante (PAGE).....	45
4.7.1.3 Determinação das isoformas da SOD	46
4.7.2 Atividade da catalase (CAT) em espectrofotômetro.....	47
4.7.3 Atividade da glutathione peroxidase (GSH-Px) em espectrofotômetro.....	48
4.7.4 Atividade da glutathione reductase (GR) em espectrofotômetro.....	48
4.8 Delineamento Experimental e Análises Estatísticas	49
5 RESULTADOS.....	51
5.1 Caracterização do modelo experimental	51
5.2 Efeito antioxidante do CAPE no tecido hepático.....	52
5.2.1 Avaliação da peroxidação lipídica pela determinação dos níveis de malondialdeído (MDA)	52
5.2.2 Avaliação dos efeitos do CAPE nos níveis de peróxido de hidrogênio.....	53
5.2.3 Efeito do CAPE no sistema de defesa enzimático contra o estresse oxidativo.....	54
5.2.3.1 Identificação das isoformas da superóxido dismutase (SOD)	54
5.2.3.2 Atividade da superóxido dismutase (SOD) em espectrofotômetro.....	55
5.2.3.3 Atividade da catalase (CAT) em espectrofotômetro.....	56

5.2.3.4 Atividade da glutathione peroxidase (GSH-Px) em espectrofotômetro	57
5.2.3.5 Atividade da glutathione reductase (GR) em espectrofotômetro	58
5.3 Efeito antioxidante do CAPE no tecido adiposo	59
5.3.1 Avaliação dos efeitos do CAPE na produção de peróxido de hidrogênio.....	59
5.3.2 Análises das enzimas antioxidantes.....	60
5.3.2.1 Identificação das isoformas ativas da superóxido dismutase (SOD).....	60
5.3.2.2 Atividade da catalase (CAT) em espectrofotômetro	61
5.3.2.3 Atividade da glutathione peroxidase (GSH-Px) em espectrofotômetro	62
5.3.2.4 Atividade da glutathione reductase (GR) em espectrofotômetro	63
6 DISCUSSÃO.....	65
6.1 Caracterização do modelo experimental.....	66
6.2 Resposta antioxidante	68
7 CONCLUSÃO.....	77
REFERÊNCIAS	79
APÊNDICES	93

RESUMO

Fenil éster do ácido caféico melhora a resposta ao estresse oxidativo em modelo animal de obesidade induzida por dieta hiperlipídica

A obesidade é uma doença que vem aumentando de maneira assustadora em todo o mundo e está implicada em várias condições patológicas, como resistência à insulina, diabetes tipo 2, dislipidemia, esteatose hepática, hipertensão e risco de doenças cardiovasculares. Evidências demonstram que a obesidade é um estado de estresse oxidativo crônico que está associado às alterações metabólicas e fisiológicas presentes no organismo humano que incidem no aparecimento das patologias citadas. Para combater o excesso de espécies reativas geradas, os organismos possuem um complexo sistema de defesa que inclui mecanismos enzimáticos e não enzimáticos de desintoxicação. O presente trabalho utilizou camundongos SWISS alimentados com dieta hiperlipídica, modelo experimental de obesidade, tratados com CAPE, composto isolado da própolis descrito como tendo várias atividades biológicas, nas doses de 13 e 30 mg/kg de peso vivo e dois tempos de tratamento, 15 e 22 dias. Neste trabalho, as respostas das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GSH-Px) e glutathione redutase (GR) foram analisadas nos tecidos hepático e adiposo. Além disso, outros parâmetros importantes foram determinados, como a quantificação da peroxidação lipídica, o conteúdo de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), a atividade da enzima hepática γ -GT e o controle do ganho de peso, peso relativo do fígado e da gordura (%). Os resultados mostraram que o CAPE não interferiu no ganho de peso dos animais. A dieta hiperlipídica e o tratamento com o CAPE não levaram a alterações significativas nos níveis séricos da enzima hepática, γ -GT. Os resultados obtidos na resposta ao estresse oxidativo estão de acordo com os encontrados na literatura que têm o CAPE como um potente antioxidante, sendo capaz de melhorar a atividade de algumas enzimas antioxidantes nos tecidos estudados. No tecido hepático, pôde-se observar que a dose de 13 mg/kg de peso vivo foi mais eficiente no combate ao estresse oxidativo induzido pela obesidade, combatendo a produção de peróxido de hidrogênio e, conseqüente, peroxidação lipídica. Já no tecido adiposo, a dose de 30 mg/kg de peso vivo melhorou a atividade da GSH-Px, mas não afetou de forma significativa a atividade das outras enzimas avaliadas. Com isso, pode-se sugerir que o CAPE na dose de 13 mg/kg de peso vivo por 15 dias e a dose de 30 mg/kg de peso vivo por 22 dias melhora a resposta ao estresse oxidativo induzido pela obesidade nos tecidos hepático e adiposo, respectivamente.

Palavras-chave: Fenil éster do ácido caféico; CAPE; Obesidade; Dieta hiperlipídica; Estresse oxidativo; Enzimas antioxidantes

ABSTRACT

Caffeic acid of phenethyl ester improves the oxidative stress response in animal model of obesity induced by high fat diet

Obesity is a disease that is increasing in a drastically way around the world and is implicated in many pathological conditions, such as insulin resistance, type 2 diabetes, dyslipidemia, fatty liver disease, hypertension and cardiovascular risk. Evidence has shown that obesity is a chronic oxidative stress state that is associated with metabolic and physiological changes present in human organism that emerge pathologies mentioned. To prevent excessive reactive oxygen species (ROS) generated, the organisms have a complex system of defense mechanisms including enzymatic and non-enzymatic detoxification. The present study utilized SWISS mice fed with high fat (HF) diet, an experimental model of obesity, treated with CAPE, an isolated compound from propolis that present many biological activities, at doses of 13 and 30 mg/kg body weight and two treatment times, 15 and 22 days. In this study, the responses of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GSH-Px) and glutathione reductase (GR) were analyzed in liver and adipose tissues. In addition, other important parameters were performed, such as lipid peroxidation, hydrogen peroxide (H₂O₂) content, liver enzyme activity γ -GT and the weight gain, relative weight of liver and adipose tissue (%). The results showed that CAPE did not interfere with the daily weight gain of animals. The high fat diet and treatment with CAPE did not lead to significant changes in serum liver enzyme γ -GT. The results obtained in response to oxidative stress are in agreement with the literature that have CAPE as a potent antioxidant, being able to improve the activity of some antioxidant enzymes in the tissues studied. In liver, it was observed that the dose of 13 mg/kg body weight was more effective preventing oxidative stress induced by obesity, the production of hydrogen peroxide and, consequently, lipid peroxidation. In adipose tissue, the dose of 30 mg/kg body weight improved the activity of GSH-Px, but did not affect significantly the activity of other enzymes evaluated. Thus, we can suggest that CAPE at a dose of 13 mg/kg body weight for 15 days and 30 mg/kg body weight for 22 days improves the response to oxidative stress induced by obesity in the liver and adipose tissue, respectively.

Keywords: Caffeic acid phenethyl ester; CAPE; Obesity; Fat diet; Oxidative stress; Antioxidant enzymes

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1O_2	oxigênio singlet
γ -GT	gama glutamil-transferase
AIN	American Institute of Nutrition
ALT	alanina aminotransferase
BSA	bovine serum albumin
CAPE	fenil éster do ácido caféico
CAT	catalase
CRP	proteína C-reativa
EC	Enzyme Commission
EDTA	ácido etileno diamino tetracético
ERO	espécies reativas de oxigênio
DTNB	5,5'-dithio-bis(2-ácido nitrobenzóico)
DTT	ditiotreitól
GO	glutathione oxidase
GR	glutathione reductase
Grx	glutaredoxina
GSH	glutathione, forma reduzida
GSH-Px	glutathione peroxidase
GSSG	glutathione, forma oxidada
GST	glutathione-S-transferase
HO	heme oxygenase
H_2O_2	peróxido de hidrogênio
IL-6	interleucina 6
KI	iodeto de potássio
LDL	lipoproteína de baixa densidade
MCP-1	proteína quimiotática de monócito-1
MDA	malondialdeído
NADP ⁺	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato, forma oxidada
NADPH	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato, forma reduzida

NBT	nitroblue tetrazolium
$NO^{\bullet}$	óxido nítrico
$O_2^{\bullet-}$	radical superóxido
$^{\bullet}OH$	radical hidroxila
PA	persulfato de amônio
PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida
SOD	superóxido dismutase
Cu/Zn-SOD	cobre / zinco – superóxido dismutase
Fe-SOD	ferro – superóxido dismutase
Mn-SOD	manganês – superóxido dismutase
TBA	ácido 2-tiobarbitúrico
TCA	ácido tricloroacético
TNF- α	fator-alfa de necrose tumoral
TEMED	N,N,N',N'-tetrametilenodiamina
TRIS	Tris (hidroximetil)-aminometano
U	unidades de atividade

1 INTRODUÇÃO

A obesidade é uma doença que vem aumentando em todo o mundo, acarretando em aumento de gastos para o sistema de saúde, principalmente dos países industrializados. Ela está implicada em várias condições patológicas, como resistência à insulina, diabetes tipo 2, dislipidemia, esteatose hepática, hipertensão e risco de doenças cardiovasculares. Evidências demonstram que a obesidade é um estado de estresse oxidativo crônico que está associado às alterações metabólicas e fisiológicas presentes nos seres humanos incidindo no aparecimento das patologias citadas (HIGDON; FREI, 2003).

O estresse oxidativo é resultante do aumento de produção de radicais livres e espécies reativas de oxigênio (ERO) e/ou da diminuição na defesa antioxidante, causando graves danos a macromoléculas biológicas e produzindo alterações no metabolismo e na fisiologia normal dos indivíduos. Estudos recentes têm demonstrado que os antioxidantes têm um papel importante na proteção enzimática e não enzimática contra a toxicidade induzida pelos radicais livres e pelas ERO, por meio do seqüestro ou da inativação das mesmas. Antioxidantes são moléculas heterogêneas presentes em baixas concentrações e capazes de prevenir, proteger ou reduzir a extensão da destruição oxidativa que ocorre nas biomoléculas (proteínas, lipídeos, carboidratos, ácidos nucleicos, etc), quando o estresse oxidativo é desencadeado (NOVELLI, 2005). O conceito de antioxidante inclui vitaminas C e E, carotenóides, clorofilina, glutathione, L-cisteína, selênio, flavonóides, as enzimas antioxidantes, ligações de ferro e proteínas transportadoras e outros compostos que afetam o sinal de transdução e expressão gênica *in vivo* (BIANCHI; ANTUNES, 1999; BECKER; NISSEN; SKIBSTED, 2004).

Produtos naturais com altos teores de flavonóides têm a capacidade de seqüestro de espécies reativas de oxigênio, além de quelar metais de transição, impedindo assim, a formação das ERO. Dentre estes produtos, tem-se atribuído à própolis e seus compostos diversas atividades biológicas, como antioxidante, antimicrobiana, antiinflamatória, cicatrizante, anestésica e antiviral. Entre estes compostos, o fenil éster do ácido caféico (CAPE) demonstrou ser capaz de melhorar o mecanismo de defesa contra diversas desordens no organismo causadas por radicais livres. Estudos usando diferentes modelos animais de estresse oxidativo, como isquemia/reperfusão da medula espinhal de coelhos, animais submetidos ao frio ou uso de drogas

citotóxicas, mostraram que o tratamento com CAPE foi capaz de aumentar a atividade das enzimas envolvidas na resposta antioxidante, e de reduzir os danos hepáticos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Obesidade

Nos últimos anos a obesidade vem se tornando a patologia de caráter nutricional de maior frequência e de maiores custos para o sistema de saúde dos países industrializados (HSU; YEN, 2007) e representa uma das principais causas de mortes evitáveis nesses países (RIPPE; CROSSLEY; RINGER, 1998).

A obesidade é considerada a característica central que aumenta o risco de várias doenças, com significativa morbidade e mortalidade (HOTAMISLIGIL, 2006). Não se trata de uma doença isolada, mas o resultado da interação complexa entre fatores genéticos, metabólicos, ambientais e psicossociais que conduz a um desequilíbrio (RIPPE; CROSSLEY; RINGER, 1998), caracterizado pela alteração no balanço entre a ingestão e o gasto energético, decorrência de alterações nos hábitos alimentares e no estilo de vida dos povos ocidentais (WISSE; KIM; SCHWARTZ, 2007). No entanto, as causas ou fatores que podem levar à obesidade são tão incertos quanto os seus efeitos (COHEN, 1985), mas pode-se caracterizar a perda importante não só na qualidade como também no tempo de vida de indivíduos obesos (FONTAINE et al., 2003).

Complicações relacionadas à obesidade podem ser as principais causas de morbidade e mortalidade prematura entre indivíduos obesos (VINCENT; INNES; VINCENT, 2007). O excesso de nutrientes leva a disfunções metabólicas em diferentes tipos de células: endotelial (vascular), hepatócitos, miócitos, adipócitos e monócitos ou macrófagos (WISSE; KIM; SCHWARTZ, 2007), resultando no aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), o que causa um desbalanço entre a produção e a inativação destas, pelo próprio aumento na produção e/ou pela diminuição da eficiência do sistema antioxidante celular, resultando no processo de “estresse oxidativo”. Dessa forma, a obesidade prejudica a homeostase sistêmica metabólica e, como tal, exige uma resposta ao estresse oxidativo, responsável por danos na estrutura celular, disparando a resposta inflamatória (Figura 1) (HOTAMISLIGIL, 2006) com ativação de fatores de transcrição e regulação da expressão de genes pró-inflamatórios, como as adipocinas TNF- α , IL-6, MCP-1, CRP (BRASIER; RECINOS III; ELEDRISSI, 2002, HAN; RUNGE; BRASIER, 1999, MULLER et al., 2000, NATHAN, 2003), envolvidos com o processo inflamatório subclínico observado nos quadros de obesidade e resistência à insulina (UYSAI et

al., 1997, WILLERSON; RIDKER, 2004), além de ter um papel importante na patogênese da disfunção endotelial, na hipertensão, na inflamação e na doença cardiovascular aterosclerótica presente na grande maioria dos pacientes obesos.

Figura 1 - Conjunto de doenças metabólicas. Em geral, o mecanismo básico de ligação entre a obesidade e as doenças listadas à direita é mal compreendido quando comparado com a daqueles listados à esquerda (Adaptado de HOTAMISLIGIL, 2006)

Sob estresse, o organismo busca o restabelecimento do seu equilíbrio, por meio de respostas fisiológicas adaptativas (HALLIWELL, 1987). O eixo hipotálamo-hipófise-adrenal e os componentes centrais e periféricos do sistema nervoso autônomo, constituem as duas principais funções vitais do sistema de estresse (CHROUSOS; GOLD, 1992). O estresse crônico representa uma ameaça prolongada à homeostase que pode, progressivamente, levar a complicações causadas tanto pelos estressores como pelo prolongamento da resposta adaptativa. Esse estresse induzido pelo consumo excessivo na dieta perturba o equilíbrio entre as funções metabólicas e imunológicas e, contribui para o desenvolvimento da obesidade visceral, diabetes tipo 2, aterosclerose e síndrome metabólica (KARALIS et al., 2009). A secreção de citocinas pró-inflamatórias – proteínas de baixo peso molecular com diversas funções metabólicas e endócrinas que participam da inflamação e resposta do sistema imune - pelo tecido adiposo pode atuar como um estímulo crônico adicional para a ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal. Todos esses fatores promovem a manutenção de um ciclo vicioso entre as respostas metabólica e imune em estados de sobrecarga de nutrientes, tal como a obesidade, resultando em uma condição inflamatória ativa crônica (KARALIS et al., 2009).

Em estudo recente com ratos alimentados com dieta hiperlipídica por 7 meses, foi observado que nos rins e no tecido cardiovascular o estresse oxidativo pode estar relacionado com o aumento da regulação de NAD(P)H oxidase e com a redução da atividade das enzimas

superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-Px), catalase (CAT) e heme oxigenase (HO). A NAD(P)H oxidase catalisa a transferência de elétrons para a molécula de oxigênio produzindo os radicais superóxido ($O_2 + e^- \rightarrow O_2^{\bullet-}$). Em condições de normalidade, os radicais superóxidos são convertidos a peróxido de hidrogênio pela SOD ($O_2^{\bullet-} + O_2^{\bullet-} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$). O peróxido de hidrogênio é inativado pela catalase ($2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$) ou pela glutathione peroxidase ($H_2O_2 + 2GSH \rightarrow GSSG + 2H_2O$). A heme oxigenase catalisa a conversão de radical heme (fator pró-oxidante) para monóxido de carbono e biliverdina/bilirrubina que são potentes antioxidantes (ROBERTS et al., 2006). Sob condições de estresse, a produção de ERO aumenta causando danos oxidativos às biomoléculas, como a peroxidação lipídica e a oxidação protéica nas biomembranas. Naturalmente, sob estas condições há uma diminuição na eficiência do sistema antioxidante, alterando as vias de ativação das enzimas antioxidantes, na conversão de espécies tóxicas em produtos pouco ou não tóxicos, desencadeando uma cascata de reações caracterizada como estresse oxidativo (ROBERTS; SINDHU, 2009).

Estudos com pacientes obesos mostraram uma redução na resposta antioxidante quando comparados aos indivíduos com índice de massa corporal dentro da faixa de normalidade. Essa redução na resposta ao estresse oxidativo foi caracterizada pela redução nos níveis séricos de cobre e zinco, e das enzimas Cu/Zn-SOD e da GSH-Px (OZATA et al., 2002; OLUSI, 2002).

Várias disfunções possíveis de gerar estresse oxidativo em indivíduos obesos têm sido identificadas (Figura 2). Dentre estas, a hiperglicemia, níveis elevados de lipídeos nos tecidos, defesas antioxidantes inadequadas, inflamação crônica, infiltração e ativação excessiva de leucócitos, produção endotelial de ERO, produção hormonal do sistema renina-angiotensina e hiperleptinemia. Nestas condições, a produção de radicais livres está aumentada ou a resposta antioxidante é insuficiente para atenuar os danos causados (VINCENT; INNES; VINCENT, 2007).

Figura 2 - Relação entre influências pró-oxidantes e antioxidantes no estresse oxidativo induzido pela obesidade. O símbolo (+) representa aumento no estresse oxidativo e o (-) representa efeito atenuado (Adaptada de VINCENT; TAYLOR, 2006)

2.2 Estresse Oxidativo

A existência e o desenvolvimento de organismos na presença de O_2 estão associados com a geração de radicais livres e ERO, mesmo sob condições fisiológicas normais (DIPLOCK et al., 1998; GRATÃO et al., 2005). Os radicais livres são moléculas altamente reativas com um ou mais elétrons não pareados, com meia vida muito curta, altamente instáveis pela sua própria configuração e que se ligam rapidamente a moléculas vizinhas (HALLIWELL, 1994). Já as ERO são moléculas contendo oxigênio que possuem ou não elétrons não pareados, mas são altamente reativas nos tecidos. Os radicais livres e as ERO podem ser gerados nas mitocôndrias, membranas e no citoplasma, podendo atacar todas as principais biomoléculas vitais ao organismo, estando o seu alvo principal relacionado ao seu sítio de formação. A formação destes

radicais ocorre durante processos catalíticos enzimáticos, transporte de elétrons e exposição do organismo a fatores exógenos de estresse (BIANCHI; ANTUNES, 1999).

Em organismos aeróbios, a presença de baixas concentrações de radicais livres, ERO e outras espécies relacionadas é importante para a manutenção do equilíbrio redox celular, para o funcionamento dos tecidos e no processo de sinalização intracelular (YU, 1994). Sob condições normais de desenvolvimento, a produção de ERO e radicais livres é baixa, resultante do metabolismo dos organismos, sendo eficientemente inativada pelo sistema antioxidante celular.

Entretanto, distúrbios no balanço entre a produção destas moléculas e a ação do sistema de defesa antioxidante resultam em danos celulares e nos tecidos, caracterizando o processo de estresse oxidativo (HALLIWELL, 1996; GRATÃO et al., 2005), que pode ser considerado como um importante mecanismo no desencadeamento da co-morbidade associada à obesidade (HIGDON; FREI, 2003).

Sob condições de estresse, as ERO são formadas em grandes quantidades, como subprodutos inevitáveis de muitos processos bioquímicos, deliberadamente como em neutrófilos ativados (BETTERIDGE, 2000) ou em resposta a processos oxidantes diversos (RICE-EVANS, 1994; BETTERIDGE, 2000), como radiação, ozônio, frio intenso, assim como a alimentação inadequada. Radicais superóxido ($O_2^{\bullet-}$) e outras espécies reativas de oxigênio, como os radicais hidroxila ($\bullet OH$), peridroxila ($HO_2^{\bullet}$), peroxila ($ROO^{\bullet}$) e alcóxila ($\bullet RH$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o oxigênio singlet (1O_2), são produtos de ação de oxidases e são geradas por uma variedade de células que desempenham importantes funções no organismo (RICE-EVANS, 1994).

Diversas análises e técnicas são utilizadas para se determinar os níveis de estresse oxidativo; alguns biomarcadores são altamente sensíveis e específicos a alterações entre as ERO e o balanço antioxidante e, são formados quando há desequilíbrio (VINCENT; INNES; VINCENT, 2007). O malondialdeído (MDA) é um aldeído formado em quantidade significativa durante a peroxidação lipídica das biomembranas, sendo a peroxidação lipídica um dos principais indicadores da ocorrência do estresse oxidativo, estando também envolvida na diminuição do metabolismo normal da glicose em pessoas obesas (VINCENT; TAYLOR, 2006). As ERO reagem com ácidos graxos das membranas e lipoproteínas iniciando a reação em cadeia de peroxidação lipídica (HALLIWELL, 1996), sendo o MDA um dos principais subprodutos que indicam a ocorrência deste processo (VINCENT; TAYLOR, 2006).

A peroxidação lipídica é uma reação em cadeia e que pode ser dividida em três etapas. Ela pode ser catalisada por íons ferro e por conversão de hidroperóxidos lipídicos em radicais altamente reativos que iniciam nova cadeia de reações. A maioria dos fosfolipídios, componentes da membrana, é rica em ácidos graxos polinsaturados, suscetíveis ao ataque do radical hidroxila ($\bullet\text{OH}$), espécie mais reativa que é capaz de iniciar o processo de peroxidação pela separação de um átomo de hidrogênio dos ácidos graxos insaturados (FERREIRA; MATSUBARA, 1997). Esta etapa (iniciação) leva à geração de peróxidos de lipídios, que se combinam com o oxigênio molecular (O_2) propagando assim a cadeia de reações denominadas peroxidação lipídica (FERREIRA; MATSUBARA, 1997, HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999; NORDBERG; ARNER, 2001).

Iniciação

Propagação

Terminação

Legenda:

$\text{OH}^\bullet$ – radical hidroxila

L – lipídio

LH – ácido graxo insaturado

$\text{LO}^\bullet$ – radical alcoxila

$\text{L}^\bullet$ – radical lipídico

$\text{LOO}^\bullet$ – radical peroxila

LOOH – hidroperóxido lipídico

Se as defesas antioxidantes são insuficientes para reduzir os efeitos das ERO ou inativá-las, os danos podem ocorrer em uma variedade de tecidos (BETTERIDGE, 2000), assim como em macromoléculas biológicas, tais como, lipídeos, carboidratos, proteínas e ácidos nucleicos (IRMAK et al., 2002; SOGUT et al., 2003). As ERO, incluindo radical superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), hidroxila ($\bullet\text{OH}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), oxigênio singlet ($^1\text{O}_2$) e óxido nítrico ($\text{NO}^\bullet$) – espécie reativa de nitrogênio, ERN -, podem ser causa ou consequência de doenças humanas associadas ao estresse oxidativo (FERREIRA; MATSUBARA, 1997). Com isso, há uma enorme quantidade de dados que indicam que espécies reativas livres estão envolvidas no desenvolvimento de diferentes formas de patologias humanas, sendo as ERO implicadas nas condições relacionadas à obesidade tais como aterosclerose, diabetes tipo 2 e artrite (HADJIGOGOS, 2003; TANAKA et al., 1998; CERIELLO; MOTZ, 2004; SCHULZE; LEE, 2005).

Dessa forma, as ERO são formadas e degradadas por todos os organismos aeróbicos, conduzindo a concentrações fisiológicas necessárias para a função celular normal, sendo que, em

quantidades excessivas, leva ao estado de estresse oxidativo (NORDBERG; ARNÉR, 2001). A desintoxicação das ERO é um dos pré-requisitos desses organismos e, muitos mecanismos estão envolvidos neste processo, provendo um importante sistema de defesa antioxidante de defesa, prevenção, interceptação e reparo que consiste no sistema antioxidante não enzimático de “scavengers” – quando há formação de um composto menos nocivo – e “quenchers” – quando o radical livre é neutralizado totalmente, e no sistema antioxidante enzimático, no qual estão incluídas as enzimas antioxidantes (SIES, 1991; RENZ, 2003).

2.2.1 Sistema antioxidante de defesa

O sistema antioxidante tem a função de manter o estado reduzido das células, protegendo assim a integridade estrutural e funcional de macromoléculas biologicamente fundamentais (FREI, 1999; TAVAZZI et al., 2000). Nesse sentido, antioxidantes são definidos como moléculas, presentes em concentrações menores que as biomoléculas, e que são capazes de prevenir, proteger ou reduzir a extensão da destruição oxidativa dessas biomoléculas (NOVELLI, 2005). No entanto, esta definição não limita a atividade antioxidante a um grupo específico de compostos químicos e nem se refere a um mecanismo particular de ação, como já citado acima, mas para a situação *in vivo*, o conceito de antioxidante, inclui as enzimas antioxidantes, ligações de ferro e proteínas transportadoras e outros compostos que afetam o sinal de transdução e expressão gênica (BECKER; NISSEN; SKIBSTED, 2004).

2.2.1.1 Sistema de defesa enzimático

As enzimas envolvidas na proteção antioxidante do organismo humano fazem parte de um sistema de proteção intrínseco que compreende a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathiona peroxidase (GSH-Px), glutathiona redutase (GR), entre outras. Elas são caracterizadas pela especificidade, seja nas células, nos órgãos ou localizações subcelulares que muitas vezes se sobrepõem de forma complementar, e pela participação de metais na catálise, incluindo o cobre, zinco, manganês, ferro (heme) e selênio (DRÖGE, 2002; NORDBERG; ARNÉR, 2001). Estes sistemas antioxidantes são amplamente distribuídos na natureza sublinhando a sua importância na

prevenção dos efeitos nocivos dos metabólitos de oxigênio reativo em sistemas biológicos e sua distribuição é crucial para a prevenção da toxicidade nos órgãos-alvo (DUTHIE, 2003), como ilustra a Figura 3.

Figura 3 – Esquema ou representação simplificada dos sistemas oxidativo e antioxidante nas células enfatizando a ação de algumas enzimas. Radical superóxido é produzido em quantidades significativas intracelularmente, tanto no citosol via enzimas contendo flavina, e nas mitocôndrias, principalmente devido ao escape de elétrons da cadeia respiratória. Duas moléculas de superóxido dismutam rapidamente, espontaneamente ou através de superóxido dismutase formando oxigênio molecular e peróxido de hidrogênio, este último permitindo o fluxo de ERO entre os compartimentos celulares. Peróxido de hidrogênio pode ser metabolizado enzimaticamente para oxigênio molecular e água por diferentes sistemas enzimáticos ou convertido para o radical hidroxila, que é extremamente reativo, através de uma reação química catalisada por metais de transição (Adaptada de NORDBERG; ARNÉR, 2001)

a. Superóxido dismutase

O termo superóxido dismutase (SOD, EC 1.15.1.1) tem sido usado para uma variedade de metaloproteínas que catalisam a reação de dismutação do radical superóxido em peróxido de hidrogênio e oxigênio molecular, $2O_2^{\bullet-} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$, (FLOHÉ; ÖTTING, 1984) e é considerada, juntamente com a catalase, como a primeira linha de defesa contra as ERO, influenciando a concentração de $O_2^{\bullet-}$ e H_2O_2 , os dois substratos para a reação de Haber-Weiss (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

Uma vez que, em sistemas biológicos, o radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) só pode ser formado na presença de oxigênio molecular (O_2) que é variável para os diferentes tipos de célula, pode-se esperar que o nível de SOD seja sensível ao grau de oxigenação (HASSAN; FRIDOVICH, 1977). No entanto, não se sabe se o oxigênio molecular é o próprio indutor, ou se é o radical superóxido que serve de controle da função enzimática (GREGORY; FRIDOVICH, 1973).

O estudo da distribuição da SOD nas várias células e tecidos conduz à localização de suas diferentes isoformas, o que pode indicar os sítios de maior produção e efeito das ERO no organismo. Tecidos animais contêm dois tipos de isoenzimas que são classificadas de acordo com o metal cofator; Mn ou Cu/Zn. A primeira se localiza, exclusivamente, na matriz mitocondrial, enquanto que a Cu/Zn-SOD está localizada principalmente no citosol (Figura 3) (GREGORY; GOSCIN; FRIDOVICH, 1974).

b. Catalase

A enzima catalase (CAT, EC 1.11.1.6) de vários organismos contém, principalmente, um grupo heme (AEBI, 1974) e sua localização subcelular predominantemente nos mamíferos é nos peroxissomos, onde catalisa a reação de dismutação do peróxido de hidrogênio, quando presente em altas concentrações, em água e oxigênio molecular (BETTERIDGE, 2000).

Um papel antioxidante importante da catalase é diminuir o risco de formação do radical hidroxila pelo H_2O_2 via reação de Fenton catalisada por íons Cu e Fe (FRIDOVICH, 1999).

A catalase liga-se ao NADPH, o qual protege a enzima da inativação e aumenta sua eficiência (KIRKMAN; GAETANI, 1984; KIRKMAN et al., 1999).

c. Glutathione Peroxidase

Há pelo menos quatro isoformas da glutathione peroxidase (GSH-Px, EC 1.11.1.9) em mamíferos (GSH-Px 1-4), todas contendo selenocisteína (BRIGELIUS-FLOHÉ, 1999). A glutathione peroxidase presente no citosol e na mitocôndria tem um papel importante na decomposição do peróxido de hidrogênio (BETTERIDGE, 2000) e dos hidroperóxidos orgânicos utilizando o tripeptídeo glutathione na sua forma reduzida (GSH) como substrato para as reações (HERMES-LIMA, 2004), resultando na forma oxidada da glutathione (GSSG). Sua ação ocorre em conjunto com a glutathione oxidase (GO), enzima que pertence à classe de sulfidril oxidase dependente de flavina, que catalisa a oxidação de proteínas e peptídeos com a formação de dissulfetos e peróxido de hidrogênio (HUBER; ALMEIDA, 2008).

O mecanismo catalítico proposto para a redução de hidroperóxidos pela GSH-Px envolve a oxidação do sítio ativo selenolato (Se^-) a ácido selenínico ($SeOH$) (EPP; LADENSTEIN; WENDEL, 1983). Com a adição de uma molécula de GSH, o ácido selenínico é transformado em sulfeto de selênio com glutathione ($Se-SG$), o qual pode ser regenerado a selenolato ativo e glutathione oxidada (GSSG) pela adição de uma segunda molécula de GSH. Assim, na reação, duas moléculas de GSH são oxidadas a GSSG, que posteriormente pode ser reduzida pela GR (NORDBERG; ARNÉR, 2001).

Alguns dados indicam que GSH-Px é de grande importância antioxidante sob condições fisiológicas (JONES; KENNEDY, 1983), enquanto outros apontam sua importância apenas durante o estresse oxidativo (KELNER; BAGNELL, 1990). A importância da GSH-Px pode ser mostrada em estudo com ratos knockout para os genes dessa enzima, onde a ausência da GSH-Px1 mostrou que estes animais apresentam desenvolvimento normal e em condições de hiperoxia foram capazes de responder ao estresse oxidativo (HO et al., 1997). Assim, a função das isoenzimas da GSH-Px na defesa antioxidante não está clara, mas as propriedades cinéticas e distribuição generalizada ainda implicam que constituem os principais contribuintes para a proteção contra danos oxidativos (NORDBERG; ARNÉR, 2001).

d. Glutathione Redutase

A glutathione redutase (GR, EC 1.6.4.2) é uma enzima auxiliar, contendo flavina envolvida na defesa antioxidante e tem como função reciclar a glutathione, convertendo a forma oxidada deste composto (glutathione dissulfeto, GSSG) em sua forma reduzida utilizando o poder redutor do NADPH, conforme a reação (HERMES-LIMA, 2004):

Essa enzima é considerada a principal redutora de GSSG dos mamíferos (NORDBERG; ARNÉR, 2001) e age conjuntamente com a glutathione peroxidase. A recuperação da glutathione em sua forma reduzida é uma etapa essencial para manter o sistema de proteção celular perfeito em funcionamento (FERREIRA; MATSUBARA, 1997, NORDBERG; ARNÉR, 2001).

2.2.1.2 Sistema de defesa não-enzimático

A maior parte dos constituintes do sistema de defesa não-enzimático é obtida a partir da dieta, pois a maioria não é sintetizada pelos próprios animais (HERMES-LIMA, 2004).

Vários metais (tais como o cobre, o ferro, o zinco e o manganês) e outros não-metais (como o selênio) podem ser considerados como parte deste sistema de defesa antioxidante, já que participam como cofatores para a atividade de várias enzimas antioxidantes e de numerosas outras enzimas que mantêm o organismo vivo (HERMES-LIMA, 2004). O sistema antioxidante não enzimático inclui também, compostos lipofílicos (Vitamina E) e hidrofílicos (Vitamina C) (SIES, 1991), flavonóides, proteínas do plasma, β -caroteno, clorofilina e glutathione (BIANCHI; ANTUNES, 1999).

a. Glutathione

Glutathione é o mais abundante tiol antioxidante intracelular, prevalente em concentrações da ordem de milimolar em todas as células aeróbicas vivas. A glutathione detoxifica compostos tanto via reações de conjugação catalisada pela glutathione-S-transferase (GST) ou, diretamente, como no caso do peróxido de hidrogênio na reação catalisada pela GSH-Px (NORDBERG; ARNÉR, 2001). A forma reduzida da glutathione (GSH) é derivada da glicina, glutamato e

cisteína, atuando como antioxidante e sua forma oxidada (GSSG), produzida nas atividades redox, contém duas moléculas ligadas por uma ponte dissulfeto (LEHNINGER; NELSON; COX, 2006). A GSSG é reduzida pela flavoenzima GR NADPH-dependente (NORDBERG; ARNÉR, 2001) podendo ainda ser reduzida com eficiência pela tioredoxina (BJÖRNSTEDT et al., 1994). A manutenção dos níveis de GSH é essencial para manter os grupos sulfidril das proteínas no estado reduzido e o ferro heme no estado ferroso (Fe^{2+}), além de agir como agente redutor para a glutaredoxina (Grx) na síntese de desoxirribonucleotídeo (LEHNINGER; NELSON; COX, 2006). A Grx apresenta as mesmas funções das tioredoxinas, diferenciando-se qualitativamente por ser capaz de reduzir a GSH misturada com proteínas dissulfetos formadas no estresse oxidativo, exercendo importante papel na defesa antioxidante celular total (BJÖRNSTEDT et al., 1994).

Figura 4 - Resumo esquemático do principal sistema antioxidante associado à glutatona. O peróxido de hidrogênio é reduzido pela glutatona peroxidase (GSH-Px) pela oxidação de duas moléculas de glutatona (GSH) formando glutatona oxidada (GSSG), que posteriormente pode ser reduzida pela glutatona redutase (GR) com consumo de NADPH. Glutatona também reduz glutaredoxina (Grx), que por sua vez, reduz vários substratos. Específicas para glutaredoxina é a redução da mistura de glutatona dissulfeto, como proteínas glutationiladas. Glutatona S-transferases (GST) catalisam a conjugação de glutatona com outras moléculas, assim, funcionam como um passo intermediário na desintoxicação de diversas substâncias tóxicas (Adaptada de NORDBERG; ARNÉR, 2001)

b. Outros antioxidantes não enzimáticos

Um grande número de compostos de baixo peso molecular é considerado como antioxidantes de importância biológica, incluindo vitamina C e E, carotenóides (precursores da vitamina A) diferentes compostos de selênio, ácido lipóico e ubiquinonas (NORDBERG; ARNÉR, 2001).

As vitaminas C, E e o β -caroteno são capazes de sequestrar radicais livres com grande eficiência. Dada a primazia ao α -tocoferol na proteção contra a peroxidação dos lipídeos de membrana, é importante que ele seja substituído ou reciclado quando oxidado, sendo que o

mecanismo mais plausível envolve o ascorbato, portanto, as vitaminas C (ascorbato) e E (α -tocoferol) agem em conjunto na inibição da peroxidação dos lipídeos da membrana e na proteção do DNA (MAY, 1998).

A vitamina E está presente nos óleos vegetais e pode ser encontrada em quatro formas diferentes α , β , γ e δ -tocoferol, sendo o α -tocoferol o antioxidante lipossolúvel mais abundante nos humanos, presente nas membranas celular e subcelular e nas lipoproteínas (FREI, 1999). Essa vitamina impede a propagação das reações em cadeia induzidas pelos radicais livres nas membranas biológicas, diminuindo a peroxidação lipídica de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e diminuindo a incidência de doenças cardiovasculares e infarto do miocárdio (BRIGELIUS-FLOHÉ; TRABER, 1999). Os danos oxidativos podem ser inibidos pela ação conjunta do sistema de defesa enzimático com os compostos antioxidantes não enzimáticos (glutathione, vitaminas C e E, carotenóides e minerais) (MACHLIN; BENDICH, 1987).

O ácido ascórbico ou vitamina C é um antioxidante pelo seu alto poder redutor na dupla ligação carbono-carbono, a qual doa um ou dois hidrogênios ou elétrons a uma variedade de oxidantes. Isso ocorre pela termodinâmica de seus radicais (ascorbato ou ascorbato monoânion) que proporciona bom potencial redutor a vários radicais, incluindo $\text{HO}^\bullet$, $\text{RO}^\bullet$, $\text{LOO}^\bullet$, $\text{GS}^\bullet$, urato e o radical tocoferil ($\text{TO}^\bullet$), reparando-os (BUETTNER; JURKIEWICZ, 1996).

O β -caroteno, encontrado em vários alimentos apresentando ação antioxidante, é o mais importante precursor da vitamina A, que é um fator importante no crescimento e na diferenciação celular (BIANCHI; ANTUNES, 1999).

O mecanismo pelo qual esses compostos antioxidantes agem no nível molecular e celular inclui papel na expressão e regulação de genes, apoptose e transdução de sinal (FREI, 1999). Dessa forma, eles estão envolvidos em processos metabólicos e homeostáticos fundamentais (FREI, 1999). Entretanto, indivíduos obesos consomem menos alimentos ricos em fitoquímicos (frutas, vegetais, grãos integrais, legumes, vinho, óleo de oliva, sementes e frutos secos), quando comparados com pessoas não-obesas, levando ao déficit de antioxidantes e podendo acarretar em doenças relacionadas à obesidade (VINCENT; INNES; VINCENT, 2007).

2.3 Produtos Naturais: Própolis e CAPE

Produtos naturais têm sido fontes de agentes medicinais por milhares de anos, e um impressionante número de drogas tem sido isolado dessas fontes naturais (CRAGG; NEWMAN, 2001) permitindo, assim, o avanço na descoberta de agentes terapêuticos para diversas doenças (CLARDY; WALSH, 2004). Vários estudos têm demonstrado que o consumo de substâncias antioxidantes na dieta pode produzir uma ação protetora efetiva contra os processos oxidativos que naturalmente ocorrem no organismo. Pesquisas na área da fitoterapia têm influenciado positivamente os aspectos de nutrição e controle de doenças (KALE; GAWANDE; KOTWAL, 2008). A ingestão de cereais, vegetais, frutas, vinho e chás representa a principal fonte de antioxidantes / fitoquímicos presente na dieta (COENTRÃO, 2005; KALE; GAWANDE; KOTWAL, 2008). Estes compostos têm grande capacidade em modificar o risco de doenças e, por causa do seu potencial papel na prevenção e cura de doenças crônicas, há grande interesse no estudo dos seus efeitos na saúde e em desvendar os mecanismos que mediam estas ações (KALE; GAWANDE; KOTWAL, 2008). Em alguns estudos com obesidade, dietas contendo formas variadas de antioxidantes se mostraram capazes de modificar a oxidação lipídica, mesmo sem redução do peso (VINCENT; INNES; VINCENT, 2007).

Entre os produtos naturais está a própolis, um produto resinoso coletado por abelhas *Apis mellifera* a partir de diferentes partes das plantas, como brotos, botões florais e exsudados resinosos (MARCUCI, 1995; BURDOCK, 1998). Sua composição química é bastante complexa e variada, estando relacionada com a ecologia da flora de cada região visitada pelas abelhas (BANKOVA et al., 1998; PARK et al., 2002), o período de coleta da resina, além da variabilidade genética das abelhas rainhas (PARK et al., 1998, BANKOVA et al., 1998). A própolis é utilizada pelas abelhas como forma de proteção contra insetos e microrganismos, no reparo de frestas ou danos à colméia ou ainda na preparação do local de postura da abelha rainha (MARCUCI, 1995).

Além de agente protetor da colméia, há uma longa história do uso da própolis na medicina popular, desde meados de 300 a.C. até hoje, sendo utilizada em remédios caseiros e produtos para usos pessoais (BURDOCK, 1998). Alguns componentes estão presentes em todas as variedades de própolis, mas outros ocorrem somente em espécies particulares de plantas (LUSTOSA et al., 2008). No entanto, diversas atividades biológicas foram descritas para própolis e seus

constituintes, tais como anticâncer, antioxidante, antiinflamatória, antibiótica (BANSKOTA; TEZUCA; KADOTA, 2001).

Os principais compostos químicos isolados da própolis, organizados em grupos, são: ácidos e ésteres alifáticos, ácidos e ésteres aromáticos, açúcares, alcoóis, aldeídos, ácidos graxos, aminoácidos, esteróides, cetonas, charconas e di-hidrocharconas, flavonóides (flavonas, flavonóis e flavononas), terpenóides, proteínas, vitaminas e minerais (MENEZES, 2005). Os flavonóides, que são compostos fenólicos e potentes antioxidantes, podem agir como redutores de oxigênio singlet, atuando nas reações de oxidação lipídica, assim como na quelação de metais (DUARTE-ALMEIDA et al., 2006). A atividade antioxidante dos compostos fenólicos é devida principalmente à sua propriedade redox, que permite que eles ajam como agentes redutores ou doadores de hidrogênio (BARREIROS; DAVID, 2006).

Dentre o grupo de compostos presentes na própolis, o fenil éster do ácido caféico (caffeic acid phenethyl ester – CAPE) (Figura 5), apresenta diversas propriedades biológicas, como antioxidante, antiinflamatória, antiviral, antibacteriana e antifúngica (PASCUAL; GONZALEZ; TORRICELA, 1994; ILHAN et al., 1999).

Figura 5 - Estrutura química do (a) Ácido Caféico (CA) e, seu derivado (b) fenil éster do ácido cafeico (CAPE)
Fonte: Wang et al. (2008)

Estudos *in vitro* e *in vivo*, demonstraram que o CAPE é capaz de bloquear a produção de ERO em neutrófilos humanos (SUD'INA et al., 1993) e aumentar a atividade das enzimas antioxidantes (SOD, CAT, GSH-Px e GR) sob condições de estresse oxidativo em ratos submetidos ao frio, em coelhos submetidos à isquemia e à reperfusão, e em ratos com danos hepáticos causados por drogas (ILHAN et al., 1999; ATES et al., 2006; IRAZ et al., 2006). Em estudo recente, o CAPE mostrou ter um papel protetor contra a toxicidade hepática induzida por

cisplatina, um quimioterápico amplamente utilizado no tratamento de diferentes tipos de câncer e, esses efeitos foram atribuídos ao seu poder antioxidante levando ao aumento da atividade da SOD (YILMAZ et al., 2005). Em animais diabéticos induzidos por streptozotocina, o tratamento com CAPE acarretou em proteção contra a peroxidação lipídica e na ativação das enzimas antioxidantes (YILMAZ et al., 2004, CELIK; ERDOGAN 2008). O mecanismo exato pelo qual o CAPE altera a atividade das enzimas antioxidantes, não está claro, sendo especulado que o CAPE pode agir através das vias de transcrição e/ou tradução das enzimas (YILMAZ et al., 2005). Modelos experimentais de obesidade e resistência à insulina induzida por dieta hiperlipídica são descritos como apresentando alterações no potencial de resposta antioxidante da célula, até o presente pouco se sabe dos efeitos do CAPE no estresse oxidativo observado em obesidade. Sendo assim, este trabalho tem como objetivo estudar os efeitos do CAPE na atividade das enzimas antioxidantes em modelo experimental de obesidade induzida por dieta hiperlipídica.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito antioxidante do CAPE na resposta ao estresse oxidativo em modelo animal de obesidade induzida por dieta hiperlipídica.

3.2 Objetivo Específico

Considerando os aspectos acima, foram estabelecidos os seguintes objetivos específicos:

- Avaliar o efeito do tratamento com CAPE no ganho de peso dos animais durante todo o experimento,
- Avaliar o efeito do tratamento com CAPE no peso do fígado e tecido adiposo epididimal,
- Avaliar o efeito do CAPE na função hepática, através da determinação dos níveis séricos da enzima γ -GT (gama glutamil-tranferase),
- Avaliar a ação antioxidante de diferentes doses e tempos de tratamento com CAPE, na resposta ao estresse oxidativo induzido pela obesidade nos tecidos hepático e adiposo de camundongos através de:
 - Determinação da peroxidação lipídica e quantificação de peróxido de hidrogênio, indicadores de estresse oxidativo,
 - Análise da atividade das enzimas antioxidantes: SOD, CAT, GSH-Px e GR.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Bioquímica e Análise Instrumental do Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição e no Laboratório de Genética Bioquímica de Plantas do Departamento de Genética, ambos na Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” da Universidade de São Paulo (ESALQ-USP), campus Piracicaba/SP.

4.1 Delineamento Experimental – Efeito do CAPE no estresse oxidativo induzido pela obesidade

Foram desenvolvidos dois experimentos independentes utilizando camundongos machos da linhagem SWISS com 23 dias (recém-desmamados), provenientes do Centro de Bioterismo da UNICAMP. Todos os animais foram inicialmente mantidos com dieta comercial por um período de 3 dias para adaptação às condições do biotério e então pesados e separados em gaiolas individualizadas. Os animais foram mantidos no biotério da Faculdade de Odontologia de Piracicaba (FOP/UNICAMP) com condições controladas de temperatura ($20 \pm 4^{\circ}\text{C}$), umidade relativa do ar (45-65%) e ciclo claro/escuro de 12/12 horas.

O procedimento experimental foi aprovado pela Comissão de Bioética da Faculdade de Odontologia de Piracicaba (FOP/UNICAMP), sob o protocolo n° CEEA 888-1, (Efeitos do CAPE e Apigenina, compostos da própolis, no mecanismo molecular da resistência à insulina).

4.1.1 Protocolo Experimental

Durante os experimentos, os camundongos foram divididos em dois grupos com média de peso e desvio padrão semelhantes. O grupo de animais controle (10 animais), recebendo dieta comercial (Nuvilab CR-1 autoclavada[®], Nuvital Nutrientes S/A, PR-Brasil), e o grupo experimental (40 animais) recebendo dieta AIN93 (American Institute of Nutrition) modificada para hiperlipídica, por 8 semanas. No segundo experimento foi adicionado um grupo de animais controle recebendo a dieta AIN 93, para eliminar o efeito da diferença dos teores de vitaminas entre a dieta controle comercial e a dieta purificada AIN 93 modificada para hiperlipídica.

Tabela 1 - Composição das dietas utilizadas durante os experimentos

	Nuvilab CR-1 autoclavada®	AIN93	AIN93 modificada para hiperlipídica
Carboidratos	64 % amido vegetal	71,56 %	26,84 %
Proteínas	26,5 % proteína animal	21,06 %	14,93 %
Lipídeos	9,5 % óleos insaturados	7,37 %	58,24 % 88,64 % banha de porco 11,36 % óleo vegetal
Vitamina E	6%	15%	15%

Após este período, os animais com dieta hiperlipídica foram divididos em 5 grupos, um grupo controle de modelo experimental, e 4 grupos tratamento. Os grupos tratamento foram: os grupos tratados com CAPE (Bachem Americas, Inc, Torrance, CA, USA) 45 $\mu\text{M/kg}$ de peso (13 mg/kg) e 100 $\mu\text{M/kg}$ de peso (30 mg/kg) por 15 dias, e os grupos tratados com CAPE (Bachem Americas, Inc, Torrance, CA, USA) 45 $\mu\text{M/kg}$ de peso (13 mg/kg) e 100 $\mu\text{M/kg}$ de peso (30 mg/kg) por 22 dias. Os animais receberam as doses diárias via gavagem, e os animais controle receberam apenas a solução veículo. Durante todo o experimento os animais tiveram livre acesso à dieta e à água. Ao final do experimento, os animais foram anestesiados, e após a perda dos reflexos de pata e córnea a dor, foi colhido sangue de alguns desses animais e o fígado e a gordura epididimal. Os órgãos foram pesados e imediatamente congelados em nitrogênio líquido e armazenados em freezer -80 °C para determinação da atividade das enzimas antioxidantes e o soro sanguíneo foi imediatamente utilizado para a determinação da enzima hepática.

4.2 Caracterização do modelo experimental

4.2.1 Controle de peso corporal e de peso do fígado e da gordura epididimal

Os animais permaneceram recebendo estas dietas (Tabela 1) por um período experimental de 11 e 12 semanas. Semanalmente, às segundas-feiras no período da manhã, todos os animais em estado alimentado foram pesados e avaliados quanto ao ganho de peso.

Alguns animais de cada grupo experimental foram anestesiados, e após a perda dos reflexos corneanos e das patas, foi aberta a cavidade abdominal e extraído integralmente o fígado e a gordura epididimal. Estes tecidos foram pesados e congelados em nitrogênio líquido.

4.2.3 Determinação sérica da enzima gama glutamil transferase (γ -GT)

A enzima γ -GT (gama glutamil-transferase), juntamente com outras enzimas, atua como marcadora de distúrbios metabólicos hepáticos. Dessa forma, a γ -GT foi analisada nas amostras de soro usando kit (LABORLAB) seguindo as instruções do fabricante. Resumidamente, a γ -GT catalisa a transferência do grupamento glutamil da L- γ -glutamil-3-carboxy-4-nitroanilida para a glicilglicina liberando L- γ -glutamilglicilglicina e 5-amino-2-nitro-benzoato. A atividade da enzima foi determinada espectrofotometricamente (Shimadzu) a 405 nm e foi expressa em unidades internacionais (U) por litro de soro.

4.3 Determinação da peroxidação de lipídeos

A peroxidação de lipídeos foi determinada através da produção de metabólitos reativos ao ácido 2-tiobarbitúrico (TBA), principalmente o malondialdeído (MDA), segundo Heath e Packer (1968). Amostras contendo 0,3 g de tecido hepático foram maceradas em 5 mL de TCA (ácido tricloroacético) 0,1% e após a completa homogeneização, foram transferidas para tubos e centrifugadas a 10.000 rpm por 5 minutos. Do sobrenadante, foram retirados 250 μ L e transferidos para outros tubos juntamente com 1 mL de solução contendo TCA 20% e TBA 0,5%. A mistura foi colocada em banho-seco por 30 minutos, a 95°C e resfriada em banho de gelo, na sequência. As amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 10.000 rpm para retirar a espuma. A leitura foi realizada em espectrofotômetro (Lambda 40, Perkin Elmer) a 535 e 600 nm. A concentração de MDA, em η mol/g de massa fresca, foi calculada de acordo com o coeficiente de extinção da reação:

$$\eta molMDA = [(A_{535} - A_{600}) / 155000] * 10^6$$

4.4 Determinação dos níveis de peróxido de hidrogênio

O conteúdo de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) foi determinado através da reação com iodeto de potássio (KI), segundo Alexieva et al. (2001). As amostras frescas (0,3 g) foram

maceradas com 5 mL de TCA 0,1% para o tecido hepático e com 1 mL de TCA 0,1% para o tecido adiposo. Após a completa homogeneização, foram transferidas para tubos e centrifugados a 10.000 rpm por 15 minutos, a 4°C. Do sobrenadante, foram retirados 200 µL aos quais foram adicionados 200 µL de tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,5) e 800 µL de solução 1 M de KI. O branco consistiu na mesma mistura descrita acima, porém, ao invés do sobrenadante da amostra, colocou-se 200 µL de TCA 0,1%. Os tubos com a reação foram colocados em banho de gelo e permaneceram no escuro durante uma hora. A leitura foi realizada em espectrofotômetro (Lambda 40, Perkin Elmer) a 390 nm. A quantidade de H₂O₂ foi expressa em µmol/g de tecido fresco utilizando-se curva de calibração com concentrações conhecidas de peróxido de hidrogênio.

4.5 Extração de proteínas solúveis totais

As amostras dos tecidos congelados foram maceradas em nitrogênio líquido e homogeneizadas em tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 7,5, contendo 1 mM EDTA e 3 mM DTT (GOMES-JUNIOR et al., 2007). O homogeneizado foi centrifugado à 10.000 rpm por 30 minuto à 4°C (J2-MC, Beckman). O sobrenadante foi coletado, aliquotado e estocado em freezer -80°C até o momento das análises.

4.6 Determinação de proteína solúveis totais

A concentração das proteínas solúveis totais das amostras foi determinada espectrofotometricamente a 595 nm (Lambda 40, Perkin Elmer), segundo o método de Bradford (1976), utilizando-se o BSA (“bovine serum albumin”) como padrão. Os resultados foram expressos em mg proteína/mL.

4.7 Atividade das enzimas antioxidantes

Para os ensaios enzimáticos foram utilizados extratos protéicos provenientes dos tecidos hepático e adiposo estocados em freezer -80°C. Foram realizados ensaios de atividade específica

das enzimas Superóxido Dismutase (SOD) em géis de poliacrilamida não desnaturantes (PAGE) e espectrofotômetro e, Catalase (CAT), Glutathione Peroxidase (GSH-Px) e Glutathione Redutase (GR) em espectrofotômetro.

4.7.1 Atividade da superóxido dismutase (SOD)

4.7.1.1 Atividade da SOD em espectrofotômetro

A atividade da SOD foi determinada como descrito por Giannopolitis e Ries (1977).

Em espectrofotômetro (Lambda 40, Perkin Elmer), a atividade da SOD foi determinada pela adição de 50 μL do extrato enzimático bruto a 5 mL de meio de reação constituído de tampão fosfato de sódio 50 mmol.L^{-1} , pH 7,8, contendo metionina 13 mmol.L^{-1} , NBT 75 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, EDTA 0,1 mmol.L^{-1} e riboflavina 2 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. A reação foi conduzida a 25 °C, numa câmara de reação, sob iluminação de lâmpada fluorescente de 15 W, mantida no interior de uma caixa coberta com papel alumínio. Após 5 minutos de exposição à luz, a iluminação foi interrompida e o composto blue formazana, produzido pela fotorredução do NBT, foi medido a 560 nm. Um meio de reação exatamente igual ao anterior, mas mantido no escuro por igual período, serviu de branco e foi subtraído da leitura da amostra que recebeu iluminação. Os resultados foram expressos em U SOD/mg de proteína.

4.7.1.2 Identificação das isoformas ativas da SOD em gel não desnaturante (PAGE)

A identificação das isoformas ativas da SOD foi determinada em gel não desnaturante (PAGE) através dos extratos dos tecidos hepático e adiposo, cujas proteínas foram separadas por eletroforese em gel 14 e 12% de poliacrilamida, para os respectivos tecidos. Foi utilizado o sistema Mini Protean II (Bio-Rad). O gel possui espessura de 1,5 mm, altura de 6,5 cm e largura 7,3 cm. Para a confecção de um mini gel foram utilizados 3,0 mL de uma solução 40% de acrilamida, 2,5 mL de tampão TRIS 3 M pH 8,9 e 4,5 mL de água deionizada. Como catalisadores foram utilizados 19 μL de TEMED e 25 μL de PA 1%.

Após a polimerização desse gel de resolução (cerca de 30 minutos), foi aplicado o gel de empacotamento segundo o protocolo: 500 µL de acrilamida, 1,25 mL tampão TRIS 500 mM, pH 6,7 e 2,75 mL de água deionizada. Para a polimerização foram utilizados 10 µL de TEMED e 50 µL de PA 1%.

A eletroforese foi realizada a 4°C em corrente constante de 15 mA/placa. O tampão de eletrodo constituiu da mistura entre TRIS 25 mM, pH 8,3 e glicina 192 mM. Para cada gel foram aplicadas 2 unidades de padrão de SOD de fígado de boi (Sigma) e 50 µg de proteína do extrato hepático de cada amostra referente a cada tratamento e 100 µg de proteína do extrato adiposo. Após a separação das proteínas por eletroforese, a atividade da SOD foi determinada de acordo com Beuchamp e Fridovich (1971).

Revelação dos géis: após a corrida eletroforética, os géis foram lavados rapidamente em água deionizada e incubados no escuro à temperatura ambiente em uma mistura de reação contendo tampão fosfato de potássio 50 mM pH 7,8, EDTA 1 mM, riboflavina 0,05 mM, NBT 0,1 mM e 0,3% TEMED. Ao final de 30 minutos, a mistura de reação foi descartada, os géis enxaguados com água deionizada e colocados diretamente sob iluminação por alguns minutos até o aparecimento de bandas brancas sob fundo roxo.

Nestas condições ocorre a fotoxidação do gel. A riboflavina, por fotólise, é reduzida na presença do TEMED (substância oxidante), em seguida, providencia um elétron para o O_2 , resultando em íon superóxido, O_2^- , o qual atua como redutor do composto NBT (incolor) para o blue formazana.

Com isto, ocorre a formação de uma coloração púrpura no gel e as bandas correspondentes à atividade de SOD – pela eliminação do radical superóxido -, permanecem sem coloração (ou sem se fotoxidar), promovendo uma revelação negativa. A fotoxidação foi interrompida mergulhando-se o gel em solução de ácido acético (7%) por 15 minutos. Os géis foram documentados no Image Scanner (Amersham Biosciences).

4.7.1.3 Determinação das isoformas da SOD

Para a determinação das isoformas da SOD foi realizada uma eletroforese não desnaturante em gel de poliacrilamida com 200 µg de proteína do extrato hepático ou adiposo nas

mesmas condições descritas anteriormente para SOD (item 4.7.1.2). Ao final da eletroforese, o gel foi dividido verticalmente em três partes. A primeira parte foi mantida a 4°C em tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 7,8. A segunda foi imersa em 100 mL do mesmo tampão contendo KCN 2 mM e 0,0292 g de EDTA. A terceira, imersa em 100 mL do referido tampão contendo H₂O₂ 5 mM e 0,0292 g de EDTA. Todos os passos descritos foram realizados no escuro.

Após 20 minutos de incubação nestas soluções, os géis foram submetidos à revelação com NBT e riboflavina, como citado anteriormente no item 4.7.1.2 para a identificação das isoformas ativas da SOD. Ao final da revelação, as bandas foram analisadas quanto à presença ou ausência de bandas, conforme o fator inibidor presente nas soluções de tratamento. As isoformas foram classificadas como (AZEVEDO et al., 1998):

- Cu/Zn-SOD quando inativada na presença de KCN e H₂O₂
- Fe-SOD se a banda foi inativada somente na presença de H₂O₂, sendo resistente ao KCN
- Mn-SOD se a isoforma se mostrou resistente aos dois tratamentos.

4.7.2 Atividade da catalase (CAT) em espectrofotômetro

A atividade da CAT foi determinada como descrito por Kraus; Mickerse e Fletcher. (1995) com algumas modificações conforme Azevedo et al. (1998).

Em espectrofotômetro (Lambda 40, Perkin Elmer), a atividade da CAT foi determinada a 25°C em solução de reação formada por 10 mL de tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,5) e 25 µL de peróxido de hidrogênio (solução de 0,25%) preparada imediatamente antes do uso. A reação foi iniciada pela adição de 25 µL do extrato protéico (hepático ou adiposo) à mistura de reação e a atividade enzimática foi determinada seguindo-se a decomposição de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) por 1 minuto, através das alterações na absorbância a 240 nm em cubetas de quartzo. Os resultados foram expressos em µmol/minuto/mg de proteína.

Foram feitas análises da atividade enzimática em gel não-desnaturante, porém os resultados não foram satisfatórios, não sendo apresentados neste trabalho.

4.7.3 Atividade da glutathiona peroxidase (GSH-Px) em espectrofotômetro

A atividade da GSH-Px foi determinada como descrito por Flohé e Günzler (1984), com algumas modificações.

Em espectrofotômetro (Lambda 40, Perkin Elmer), a atividade da glutathiona peroxidase foi determinada em uma mistura de reação consistindo de 550 µL de tampão fosfato de potássio 100 mM e EDTA 3 mM (pH 7,0), 100 µL de glutathiona redutase (0,24U de GR por mL), 100 µL de glutathiona reduzida (GSH) 10 mM, 25 µL azida sódica 1 mM e 25 µL do extrato protéico hepático ou adiposo. Essa mistura foi incubada a 37 °C, por 10 minutos. A reação foi iniciada pela adição de 100 µL de NADPH 1,5 mM e 100 µL de H₂O₂ 1,5 mM e monitorada por 5 minutos através da oxidação do NADPH a 340 nm. Os valores de atividade da GSH-Px foram expressos em µmol/minuto/mg de proteína.

4.7.4 Atividade da glutathiona redutase (GR) em espectrofotômetro

A atividade da GR foi determinada como descrito por Gomes-Junior et al. (2006), com algumas modificações.

Em espectrofotômetro (Lambda 40, Perkin Elmer), a atividade da GR foi determinada a 30°C em uma mistura de reação consistindo de 1 mL tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,5), 500 µL de DTNB 1 mM, 100 µL de GSSG 1 mM e 100 µL de NADPH 0,1 mM. A reação foi iniciada pela adição de 50 µL do extrato protéico (hepático ou adiposo) à mistura de reação e monitorada por 1 minuto através da redução da glutathiona oxidada a 412 nm. A glutathiona reduzida, por sua vez, reduziu o composto DTNB, que representa cromóforo amarelo, dando a coloração característica do ensaio. Os valores de atividade da GR foram expressos em µmol/minuto/mg de proteína.

Assim como para CAT, foram feitas análises da atividade enzimática de GR em gel não-desnaturante, porém os resultados não foram satisfatórios, não sendo apresentados neste trabalho.

4.8 Delineamento Experimental e Análises Estatísticas

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com seis repetições em cada tratamento dos tecidos hepático e adiposo e, três aferições de cada amostra. Aos dados quantitativos foi aplicada a Análise de Variância (ANOVA) e Teste de Média (Teste de Duncan), utilizando o software R (<http://www.r-project.org/>) a 5% de probabilidade.

5 RESULTADOS

5.1 Caracterização do modelo experimental

Para avaliar os efeitos metabólicos do tratamento com CAPE, foi feito um controle semanal do peso corporal de todos os grupos estudados. Como demonstrado na tabela 2, os animais alimentados com dieta hiperlipídica apresentaram ganho de peso superior aos animais controle (dieta comercial). O tratamento por 2 e 3 semanas com CAPE não resultou em diferenças no peso dos animais tratados quando comparados ao grupo com dieta hiperlipídica. Ao final do experimento, o fígado e gordura epididimal dos animais foram pesados e os resultados mostraram que o CAPE não tem efeito significativo no peso desses órgãos quando estimados em relação ao peso corporal. A avaliação do peso da gordura epididimal dos diferentes grupos mostrou que os animais com dieta hiperlipídica aumentaram significativamente a deposição de gordura quando comparados aos animais controle. Nos animais tratados com Cape 13 e 30 mg a deposição de gordura foi semelhante a observada nos animais com dieta hiperlipídica sem tratamento. Entretanto, o Cape 30 mg administrado por 22 dias se mostrou eficiente na redução da deposição de gordura na porção epididimal mostrando porcentagem de peso significativamente semelhante ao grupo controle.

Para avaliar se o tratamento com CAPE ocasionou alterações hepáticas nos camundongos foi determinado o nível sérico da enzima γ -GT. Os resultados observados mostraram que não houve diferença significativa entre os grupos em estudo, entretanto os valores obtidos mostraram que os animais alimentados com dieta hiperlipídica e tratados com Cape 13 mg – 15 e 22 dias apresentaram valores superiores aos observados nos animais controle e os animais tratados com Cape 30 mg – 15 dias e 22 dias (Figura 6) podendo indicar que as maiores concentrações de CAPE aplicadas aos camundongos submetidos à dieta hiperlipídica podem agir protegendo o tecido hepático da ocorrência de alterações causadas pela dieta.

Tabela 2 - Avaliação do peso vivo e do peso do fígado e da gordura dos camundongos antes do sacrifício e a porcentagem relativa do fígado e da gordura expressas como fígado/PV (%) e gordura/PV (%), respectivamente, e determinada através da relação do peso do órgão e o peso vivo do animal

Animais	Peso Vivo (g)	Fígado (g)	Fígado / PV (%)	Gordura (g)	Gordura / PV (%)
	Média ± S _χ	Média ± S _χ	Média ± S _χ	Média ± S _χ	Média ± S _χ
Controle Comercial (n=5)	40,96 (1,17) c	1,51 (0,09) a	3,67 (0,13) a	1,12 (0,10) d	2,74 (0,23) c
Hiperlipídico (n=5)	53,88 (1,07) a	2,11 (0,15) a	3,91 (0,22) a	2,39 (0,34) ab	4,43 (0,60) ab
Cape 13 mg - 15 dias (n=5)	51,13 (0,82) ab	2,19 (0,35) a	4,32 (0,76) a	1,67 (0,30) bcd	3,25 (0,56) BC
Cape 13 mg - 22 dias (n=5)	49,36 (1,70) b	1,94 (0,17) a	3,91 (0,31) a	2,45 (0,27) a	5,05 (0,68) a
Cape 30 mg - 15 dias (n=5)	51,17 (1,47) ab	2,36 (0,31) a	4,57 (0,49) a	2,18 (0,03) abc	4,29 (0,16) ab
Cape 30 mg - 22 dias (n=3)	54,73 (0,29) a	2,53 (0,16) a	4,63 (0,37) a	1,44 (0,22) cd	2,64 (0,39) c

p < 0,05 em relação ao controle. Os resultados estão expressos como a média e erro padrão da média.

Figura 6 - Efeito do CAPE sobre a atividade da gama glutamil transferase (γ-GT) avaliada no soro sanguíneo (n=5, com exceção do Cape 30 mg – 22 dias com n=3, p < 0,05 em relação ao controle. Os resultados estão expressos como a média e erro padrão da média)

5.2 Efeito antioxidante do CAPE no tecido hepático

5.2.1 Avaliação da peroxidação lipídica pela determinação dos níveis de malondialdeído (MDA)

Para avaliar se o CAPE foi capaz de proteger da peroxidação lipídica os animais em dieta hiperlipídica, foi determinada a concentração de MDA no tecido hepático dos diferentes grupos. Os resultados obtidos mostraram que os animais com dieta hiperlipídica, e os animais tratados com Cape 13 mg – 15 dias e Cape 30 mg – 15 e 22 dias apresentaram uma redução significativa

nos níveis de MDA quando comparados aos animais controle de dieta comercial. Para avaliar se os teores elevados de MDA observados nos animais com dieta controle comercial são decorrentes de diferenças no conteúdo de vitamina E entre as duas dietas, um novo grupo controle foi analisado, onde os animais receberam por 12 semanas a dieta controle purificada AIN 93. Os teores de MDA dos animais tratados com dieta hiperlipídica e dos animais tratados com Cape 13 mg - 15 dias e Cape 30 mg - 15 e 22 dias foram significativamente maiores que os animais controle AIN 93. Quando avaliados os animais tratados com Cape 13 mg - 22 dias observou-se uma redução significativa dos valores de MDA ao compará-los aos animais hiperlipídicos, apresentando valores semelhantes ao grupo controle AIN 93 (Figura 7), sugerindo que nesta concentração e tempo de tratamento o CAPE foi efetivo para reduzir a peroxidação lipídica decorrente da ingestão por 12 semanas de uma dieta hiperlipídica.

Figura 7 - Conteúdo de MDA em tecido hepático (n=6, $p < 0,05$ em relação ao AIN93. Os resultados estão expressos como a média e erro padrão da média)

5.2.2 Avaliação dos efeitos do CAPE nos níveis de peróxido de hidrogênio

O conteúdo de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) presente no tecido hepático foi quantificado nas amostras de todos os grupos experimentais. Os resultados obtidos mostraram que os animais com dieta hiperlipídica e aqueles tratados com Cape 13 mg - 15 dias e Cape 30 mg - 15 e 22 dias não diferiram significativamente dos animais com dieta controle comercial, entretanto os animais tratados com Cape 13 mg - 22 dias mostraram uma redução significativa nos níveis de H_2O_2 .

quando comparados aos animais com dieta controle comercial. Quando analisados os resultados em relação aos animais com dieta controle AIN 93, foi observado que a dieta hiperlipídica aumenta significativamente os níveis de peróxido de hidrogênio no fígado destes animais e que o Cape 13 mg – 22 dias foi capaz de reduzir significativamente os níveis desta ERO.

Figura 8 - Conteúdo de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em tecido hepático ($n=6$, $p < 0,05$ em relação ao AIN93. Os resultados estão expressos como a média e erro padrão da média)

5.2.3 Efeito do CAPE no sistema de defesa enzimático contra o estresse oxidativo

5.2.3.1 Identificação das isoformas da superóxido dismutase (SOD)

Para identificar a presença das isoformas ativas da SOD, concentrações idênticas de proteínas totais foram separadas em gel de poliacrilamida não desnaturante e identificadas pela reação de inibição por KCN e/ou por H_2O_2 . As isoformas observadas foram a Mn-SOD presente nas mitocôndrias (resistente ao tratamento com KCN e H_2O_2) e a Cu/Zn-SOD (I), (II) e (III) (inativada pelo tratamento com KCN e H_2O_2) presente no citoplasma (Figura 10). Os resultados obtidos demonstram a presença da isoforma Mn-SOD em todos os grupos experimentais, entretanto quando avaliados os animais alimentados com dieta controle AIN 93 é possível verificar uma menor intensidade desta banda quando comparados aos outros grupos experimentais, da mesma forma quando analisados os animais tratados com CAPE comparados ao grupo com dieta hiperlipídica é possível verificar que a intensidade desta banda reduziu no grupo que recebeu CAPE nas duas doses em estudo pelo período de 22 dias. A presença das

isoformas I e II da Cu/Zn-SOD foi observada de maneira ativa em todos os grupos experimentais, entretanto quando avaliada a isoforma III Cu/ZN-SOD nos diferentes grupos experimentais verificou-se que a intensidade desta banda é menor nos animais com dieta controle AIN 93 e nos animais tratados com Cape 13 e 30 mg - 22 dias quando comparados aos outros grupos experimentais.

Figura 9 - Atividade específica de SOD em PAGE (14%) em fígado. P. Padrão SOD bovino; 1. AIN 93; 2. Controle Comercial; 3. Hiperlipídico; 4. Cape 13 mg – 15 dias; 5. Cape 13 mg - 22 dias; 6. Cape 30 mg - 15 dias; 7. Cape 30 mg – 22 dias

Figura 10 - Determinação das isoformas de SOD em PAGE (14%) em fígado. P. Padrão SOD bovino; 1. Controle na condição padrão; 2. Controle com KCN; 3. Controle com H₂O₂

5.2.3.2 Atividade da superóxido dismutase (SOD) em espectrofotômetro

Em adição a identificação das isoformas ativas de SOD no tecido hepático dos diferentes grupos experimentais, a análise quantitativa da atividade total da SOD foi performeda para avaliar se o tratamento com CAPE altera a resposta desta enzima em condição de estresse oxidativo induzido pela obesidade. Os dados obtidos demonstraram que os animais com dieta hiperlipídica e com dieta comercial apresentaram valores significativamente maiores que os animais tratados com CAPE nas duas doses e tempo de tratamento. Os valores observados na atividade da SOD nos animais tratados com CAPE foram significativamente semelhantes à atividade observada para os animais controle de dieta AIN 93, com exceção do tratamento com

Cape 30 mg - 15 dias que mostrou valores significativamente menores que os demais tratamentos. Esses resultados somados as mudanças observadas na intensidade das bandas das diferentes isoformas da SOD, sugere que o CAPE na dose de 13 mg possa estar agindo como agente antioxidante em ação conjunta com a enzima SOD nas primeiras etapas de defesa do estresse oxidativo gerado pela obesidade.

Figura 11 - Atividade específica da superóxido dismutase em fígado (n=6, $p < 0,05$ em relação ao controle. Os resultados estão expressos como a média e erro padrão da média).

5.2.3.3 Atividade da catalase (CAT) em espectrofotômetro

A CAT foi estudada através de sua atividade em espectrofotômetro e o cálculo da atividade específica da enzima foi relacionada à quantificação das proteínas solúveis totais.

Analisando os resultados obtidos nos diferentes grupos experimentais é possível observar que a dieta hiperlipídica por 12 semanas aumenta significativamente a atividade da CAT quando comparada aos animais controle comercial. O tratamento com CAPE nas duas doses e tempos estudados mostrou agir como um antioxidante coadjuvante à enzima CAT levando a uma redução significativa da atividade desta quando comparada aos animais hiperlipídicos, com valores semelhantes aos observados nos animais controle com dieta comercial. Não foi observada diferença significativa na atividade desta enzima ao comparar-se os grupos controle AIN 93 e hiperlipídico. Apesar desta semelhança na atividade da CAT entre estes dois grupos, a resposta

antioxidante nos animais controle AIN 93 foi significativamente diferente dos animais com dieta hiperlipídica demonstrada pelos níveis de peróxido de hidrogênio observado entre os dois grupos.

Figura 12 - Atividade específica da catalase em fígado (n=6, $p < 0,05$ em relação ao controle. Os resultados estão expressos como a média e erro padrão da média)

5.2.3.4 Atividade da glutathiona peroxidase (GSH-Px) em espectrofotômetro

Em adição a ação das enzimas SOD e CAT, a GSH-Px tem um papel importante na redução dos níveis de peróxido de hidrogênio gerados nos processos celulares normais e nas condições de estresse oxidativo, como na obesidade. A atividade da GSH-Px foi determinada em espectrofotômetro e o cálculo da atividade específica da enzima foi baseado na quantificação das proteínas solúveis totais.

Neste estudo, o tratamento com Cape 13 mg apresentou atividade da GSH-Px significativamente semelhante a observada para os animais com dieta controle AIN 93 e dieta comercial, esses dados em conjunto com os dados acima vem confirmar o potencial antioxidante do CAPE no tratamento da obesidade. O tratamento com Cape 30 mg, embora significativamente semelhante às dietas controle, não mostrou diferença significativa quando comparados aos animais com dieta hiperlipídica. A maior atividade observada nos grupos tratados com Cape 30 mg se justifica por uma menor atividade observada na enzima CAT e níveis elevados de peróxido de hidrogênio, mostrando que nesta dose o CAPE tem um efeito reduzido no combate a produção de ERO (Figura 13).

Figura 13 - Atividade específica da glutathione peroxidase em fígado (n=6, $p < 0,05$ em relação ao controle. Os resultados estão expressos como a média e erro padrão da média)

5.2.3.5 Atividade da glutathione redutase (GR) em espectrofotômetro

A glutathione redutase (GR) age de maneira indireta no combate das ERO regenerando a GSH a partir da sua forma oxidada GSSG. Essa enzima também foi estudada por espectrofotômetro, calculada com base na quantificação das proteínas totais e os resultados estão demonstrados em gráfico.

O aumento da atividade da GR nos animais que receberam dieta hiperlipídica está correlacionado ao aumento da atividade específica da GSH-Px, uma das enzimas capaz de oxidar a glutathione, o principal agente antioxidante não-enzimático presente nos organismos e que necessita ser regenerada pela GR à sua forma reduzida. Os tratamentos com Cape 13 mg e 30 mg por 15 dias em animais alimentados com dieta hiperlipídica não apresentaram diferenças significativas na atividade da GR quando comparados aos animais que receberam dieta hiperlipídica por 12 semanas. Quando o tratamento com CAPE, nas duas doses em estudo, foi administrado por 22 dias, esses animais apresentaram uma redução significativa na atividade da GR, semelhante à observada nos animais controle AIN 93. Esses dados sugerem que o tratamento com CAPE na dose de 13 mg contribui de maneira efetiva para melhorar a resposta ao estresse oxidativo gerado no tecido hepático dos animais com obesidade induzida por dieta hiperlipídica (Figura 14).

Figura 14 - Atividade específica da glutathione redutase em fígado (n=6, $p < 0,05$ em relação ao controle. Os resultados estão expressos como a média e erro padrão da média)

5.3 Efeito antioxidante do CAPE no tecido adiposo

5.3.1 Avaliação dos efeitos do CAPE na produção de peróxido de hidrogênio

No tecido adiposo, os teores de peróxido de hidrogênio representam apenas 10 % dos níveis observados no tecido hepático, o que sugere que neste modelo experimental os maiores danos decorrentes da produção de ERO são observados no fígado e estão associados ao aumento no metabolismo de nutrientes devidos à ingestão energética. O menor teor de vitaminas com ação antioxidante (vitamina E, por exemplo) na dieta comercial autoclavada levou a um aumento na geração de peróxido de hidrogênio no tecido adiposo destes animais quando comparados aos animais que receberam as dietas AIN 93 e AIN 93 modificada para hiperlipídica (Figura 15).

Figura 15 - Conteúdo de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em tecido adiposo ($n=6$, $p < 0,05$ em relação ao controle. Os resultados estão expressos como a média e erro padrão da média)

5.3.2 Análises das enzimas antioxidantes

5.3.2.1 Identificação das isoformas ativas da superóxido dismutase (SOD)

Assim como para o fígado, a SOD foi analisada através de gel de poliacrilamida não desnaturante (PAGE) e as mesmas isoformas foram identificadas no tecido adiposo dos diferentes grupos experimentais (Figura 17). A intensidade das bandas não diferiu entre os tratamentos.

As isoformas Cu/Zn-SOD no tecido adiposo foram mais expressivas para todos os tratamentos aplicados em relação à Mn-SOD. Existe uma expressão diferencial da isoforma III da Cu/Zn-SOD, principalmente no animal controle de dieta AIN 93, porém não é possível determinar a origem de cada uma das isoformas utilizando esta análise e, portanto, a organela onde a expressão é diferenciada.

Figura 16 - Atividade específica de SOD em PAGE (12%) em gordura. P. Padrão SOD bovino; 1. AIN 93; 2. Controle Comercial; 3. Hiperlipídico; 4. Cape 13 mg – 15 dias; 5. Cape 13 mg - 22 dias; 6. Cape 30 mg - 15 dias; 7. Cape 30 mg – 22 dias

Figura 17 - Determinação das isoformas de SOD em PAGE (12%) em gordura. P. Padrão SOD bovino; 1. Controle na condição padrão; 2. Controle com KCN; 3. Controle com H_2O_2

5.3.2.2 Atividade da catalase (CAT) em espectrofotômetro

Após 12 semanas de experimento, a atividade da CAT foi aproximadamente duas vezes menor no tecido adiposo comparado ao tecido hepático (Figura 18). Os resultados apresentados na Figura 18 mostraram que os animais tratados com CAPE 13 e 30 mg/kg de peso tiveram uma ativação da CAT semelhante aos animais com dieta hiperlipídica e controle comercial, mostrando que nesses animais o mecanismo de defesa contra a geração de peróxido de hidrogênio não sofreu alterações significativas. Entretanto, quando avaliados os diferentes grupos experimentais em comparação ao controle AIN 93, a atividade da CAT apresentou uma redução significativa, 25 a 30 % (Figura 18). O tratamento com CAPE no tecido adiposo não alterou a resposta à ativação da CAT nos animais em dieta hiperlipídica.

Figura 18 - Atividade específica da catalase em gordura (n=6, $p < 0,05$ em relação ao controle. Os resultados estão expressos como a média e erro padrão da média)

5.3.2.3 Atividade da glutathione peroxidase (GSH-Px) em espectrofotômetro

A GSH-Px, é uma classe de enzimas que catalisa a redução de peróxido de hidrogênio, hidroperóxido-fosfolipídico e outros hidroperóxidos orgânicos ao oxidar a glutathione. Neste estudo, os animais com dieta hiperlipídica apresentaram valores de ativação da GSH-Px semelhantes aos animais com dieta controle comercial, resultados também observados para a CAT. Analisando os dados dos animais tratados com CAPE, foi observado um aumento crescente nos níveis de atividade da GSH-Px. Quando comparados estes valores aos observados para os animais com dieta AIN 93, o tratamento com CAPE mostrou uma ativação na GSH-Px que variou de 41% a 80%. Na dose de 30 mg – 22 dias, o tratamento com CAPE levou a um aumento significativo de 243% na atividade desta enzima quando comparado ao grupo que recebeu dieta hiperlipídica.

Figura 19 - Atividade específica da glutatona peroxidase em gordura (n=6, $p < 0,05$ em relação ao controle. Os resultados estão expressos como a média e erro padrão da média)

5.3.2.4 Atividade da glutatona redutase (GR) em espectrofotômetro

A atividade da GR, responsável pela regeneração da glutatona por intermédio da oxidação de NADPH, não apresentou diferenças significativas nos tratamentos com CAPE quando comparados ao grupo controle comercial (Figura 20). A dose de 30 mg de CAPE nos dois tempos de administração não mostrou diferença significativa da atividade da GR observada nos animais com dieta hiperlipídica. Enquanto que, a dose de 13 mg de CAPE por 15 dias mostrou valores semelhantes àqueles observados nos animais controle com dieta AIN 93.

Figura 20 - Atividade específica da glutatona redutase em gordura (n=5, $p < 0,05$ em relação ao controle. Os resultados estão expressos como a média e erro padrão da média)

6 DISCUSSÃO

O consumo excessivo de energia somado à ingestão insuficiente de compostos bioativos constitui um importante componente de risco para várias patologias (BASTOS; ROGERO; ARÊAS, 2009). Muitos trabalhos vêm demonstrando forte relação entre a mudança dos hábitos alimentares nas últimas décadas e o desenvolvimento de diversas doenças crônicas não transmissíveis, como a resistência à insulina, o diabetes tipo 2, a aterosclerose, a hipercolesterolemia, a hipertensão, o ovário policístico, entre outras (BASTOS; ROGERO; ARÊAS, 2009). A associação dessas doenças tem sido relatada como Síndrome Plurimetabólica, tendo a obesidade como fator central. Estudos demonstram que o seu desenvolvimento pode ocorrer pelo desequilíbrio entre a produção de radicais livres e espécies reativas de oxigênio (ERO) e as defesas antioxidantes (endógena e exógena) gerando o estresse oxidativo (STUMP et al., 2006) e/ou por um processo inflamatório, no qual há o aumento da síntese de moléculas pró-inflamatórias (STUMP et al., 2006; COOPER et al., 2007).

A hiperglicemia, associada à obesidade e a resistência à insulina, é tida como uma das causas do estresse oxidativo por diferentes mecanismos, tendo início com aumento da produção de ERO mitocondrial, glicação não enzimática de proteínas e auto-oxidação da glicose. O aumento de ácidos graxos livres pode elevar o desacoplamento mitocondrial e a beta-oxidação, induzindo a maior geração de ERO (VINCENT; TAYLOR, 2006). Essas espécies podem afetar várias vias de sinalização dependendo do tipo de espécie reativa, do tipo de célula, da duração da exposição e outros fatores (WEI et al., 2008). O organismo possui mecanismos de defesa antioxidante enzimáticos e não-enzimáticos. Os antioxidantes exógenos, há tempos, têm sido propostos como compostos úteis no controle do diabetes e outras patologias (FARDOUN, 2007). Esses compostos podem ativar vias de sinalização intracelulares adaptativas contra o estresse oxidativo e à exposição ao ambiente, exercendo benefícios à saúde como agentes de estresse de baixa dose ou pró-oxidantes: doses baixas ativam vias de sinalização que resultam no aumento da expressão de genes, os quais codificam proteínas visando à proteção celular (BASTOS; ROGERO; ARÊAS, 2009).

O consumo de substâncias antioxidantes na dieta pode produzir uma ação protetora efetiva contra os processos oxidativos que naturalmente ocorrem no organismo. A ingestão de vegetais, frutas, vinho e chás representam a principal fonte de antioxidante presente na dieta.

Antioxidantes são definidos como moléculas que são capazes de prevenir, proteger ou reduzir a extensão da destruição oxidativa de biomoléculas (SIES; STAHL 1995). Derivados do ácido caféico, um subtipo de ácido cinâmico, são amplamente distribuídos no reino vegetal e são encontrados em café, trigo, aveia e várias frutas e vegetais. Eles tipicamente não ocorrem com ácidos livres, mas na forma de éster, amidas e glicosídeos, ou como dímeros e outras formas mais complexas (HERRMANN, 1989). Essa família de compostos vem sendo alvo de muitas pesquisas nos últimos anos e uma gama de atividades tem sido atribuída a eles, incluindo bactericidas, anticâncer, antiinflamatória, antioxidante, imunomoduladora e neuroprotetora. O fenil éster do ácido caféico (CAPE) é um dos membros desta família de compostos e mais bem conhecido por seus vários efeitos biológicos, sendo um dos principais compostos bioativos encontrados em própolis (BANSKOTA; TEZUKA; KADOTA, 2001).

6.1 Caracterização do modelo experimental

A fim de estudar a obesidade de forma mais aprofundada, diversos modelos experimentais têm sido utilizados. Embora nenhum animal possa ser considerado exatamente igual aos modelos de obesidade humana, todos têm grande valor no estudo das causas e conseqüências da obesidade. Vários estudos relataram o efeito da dieta hiperlipídica na etiologia da obesidade em macacos, cães, suínos, esquilos, hamsters e ratos (WILLETT, 1998). Acredita-se que esse tipo de dieta conduza a hiperfagia, ou cause efeitos metabólicos diversos (WEST; YORK, 1998), como redução na secreção de leptina (PEREIRA; FRANCISCHI; LANCH JR, 2003) ou limitação na sua capacidade de atuação (FREDERICH et al., 1995). Em alguns trabalhos, ratos alimentados com dieta hiperlipídica desenvolveram obesidade (PEREIRA; FRANCISCHI; LANCH JR, 2003), hipertensão (MODAN et al., 1985) e redução na ação da insulina sistêmica muscular e em adipócitos (WILKES; BONEN; BELL, 1998). De acordo com Duarte et al. (2006) a dieta hiperlipídica durante 15 semanas foi capaz de induzir a obesidade em ratos WISTAR machos, resultando em pesos significativamente maiores que os animais do grupo controle, os quais receberam dieta comercial. Nossos resultados mostraram um aumento de aproximadamente 22 % no peso corporal dos camundongos SWISS alimentados com dieta hiperlipídica por 12 semanas, valores também observados por Cintra et al. (2008) usando esse mesmo modelo experimental. O tratamento com CAPE nas doses de 13 e 30 mg e nos tempos de 15 e 22 dias não interferiu na adiposidade observada neste modelo experimental, o que indica que o CAPE age por mecanismo

diferente do que está envolvido no aumento da deposição de gordura corporal. O aumento de adiposidade observado neste estudo, não levou a alteração significativa no peso do fígado normalizado para o peso corporal dos diferentes grupos em estudo, como já observado por Duarte et al. (2006) em estudo com ratos obesos por dieta hiperlipídica. O aumento no ganho de peso no grupo de animais alimentados com dieta hiperlipídica está associado ao aumento na deposição de gordura corporal distribuída nos diferentes locais de deposição, como a gordura epididimal e gordura visceral (ao redor do mesentério, coração, pulmão e rins) (YANG et al., 2006). No presente trabalho, os resultados mostraram que os animais com dieta hiperlipídica aumentaram em 62 % o peso da gordura epididimal normalizada ao peso corporal. Esta alteração foi reduzida pelo tratamento com Cape 30 mg – 22 dias, mostrando valores muito próximos aos observados nos animais alimentados com dieta controle, sugerindo uma melhora metabólica na função hepática, possivelmente levando a redução na produção de triglicerídeos. Dados semelhantes foram observados por Wang et al. (2010) em estudo com camundongos LDLR, alimentados com dieta hiperlipídica composta de dieta controle adicionada de 15 g de manteiga de cacau e 3 g de colesterol e tratados com extrato de folhas de *Corchorus olitorius* L.

Alterações na função hepática de animais alimentados com dieta hiperlipídica e indivíduos obesos são descritas na literatura pelo aumento das enzimas hepáticas (LEE; BLOMHOFF; JACOBS Jr, 2004). Os níveis séricos da enzima gama glutamil-transferase (γ -GT) neste trabalho, embora não apresentem diferença significativa entre os grupos, mostraram um aumento de aproximadamente 37 % nos animais alimentados com dieta hiperlipídica. O tratamento com Cape 30 mg se mostrou capaz de reduzir a atividade enzimática a valores próximos aos observados nos animais controle. Segundo Rantala et al. (2000), um mecanismo de elevação da atividade da γ -GT pode ser devido à maior quantidade de gordura no fígado. Alterações nas enzimas hepáticas γ -GT e alanina aminotransferase (ALT) têm sido associadas à incidência de diabetes tipo 2 (SATTAR; WANNAMETHEE; FOROUHI, 2008). A dieta hiperlipídica é um modelo experimental de indução da resistência à insulina e diabetes tipo 2 associados à obesidade, tendo como alterações característica a presença de esteatose hepática (WANNAMETHEE et al., 2005). Em modelo experimental de ratos com lesão hepática colestática, administração do CAPE na dose de 10 μ mol /kg intraperitonal foi capaz de reduzir a atividade da enzima γ -GT além de outras enzimas hepáticas que servem como marcadores de distúrbios hepáticos (COBAN et al., 2010).

6.2 Resposta antioxidante

As ERO agem como sinalizadoras em vários processos fisiológicos normais. Está claro que o excesso na produção dessas espécies causa danos ao material biológico e é um evento essencial na etiopatogênese de várias doenças (JURÁNEK, BEZEK, 2005). Na obesidade, a produção de ERO também aparece como um importante fenômeno na alteração da homeostase da glicose associada com o desenvolvimento do tecido adiposo (SOHET et al., 2009), além do aparecimento do processo inflamatório claramente associado com a interrupção da sinalização da insulina (SHOELSON; LEE; GOLDFINE, 2006). No entanto, a questão que tem sido levantada é se a formação descontrolada das ERO (Figura 21) está relacionada à causa ou pode ser considerada consequência do processo patológico.

Figura 21 - Vias de formação das ERO, o processo de peroxidação lipídica e o papel da glutatona (GSH) e outros antioxidantes (vitamina E, C e ácido lipóico) no estresse oxidativo (equações não estão balanceadas)
Fonte: Valko et al. (2007)

O fígado é a maior glândula do organismo e desempenha importantes funções, como: armazenamento e liberação de glicose, metabolismo dos lipídeos, emulsificação de gorduras no processo digestivo através da secreção da bile, síntese do colesterol, produção de triglicerídeos, metabolismo das proteínas (conversão de amônia em uréia), síntese de proteínas do plasma, purificação de diversas toxinas assim como processamento de drogas e hormônios, produção de precursores das plaquetas, destruição das células sanguíneas desgastadas e bactérias, etc (LEHNINGER; NELSON; COX, 2006). Além disso, age no armazenamento de vitaminas e minerais, participa da regulação do volume sanguíneo e, possui importante ação contra

substâncias nocivas ao organismo como o álcool, a cafeína, gorduras, entre outras (VIEIRA, 1974).

O tecido adiposo, que até pouco tempo acreditava-se ter basicamente a função de armazenar energia, atualmente, é tido como um complexo reservatório energético regulado funcionalmente por nervos, hormônios, nutrientes, por mecanismos autócrinos e parácrinos (GUIMARÃES et al., 2007). Devido à importância nos processos metabólicos e fisiológicos que acontecem nestes dois tecidos, a ingestão energética excessiva torna-os mais susceptíveis aos danos causados pelo aumento nos níveis de radicais livres e ERO gerados pelo aumento do metabolismo dos nutrientes. Estudos recentes têm descrito uma significância patológica das ERO derivadas do tecido adiposo em doenças metabólicas associadas à obesidade (FURUKAWA et al., 2004; FUJITA et al., 2006). Furukawa et al. (2004) mostraram que o aumento na adiposidade está correlacionado com estresse oxidativo sistêmico em humanos e camundongos, com produção de ERO seletivamente aumentada em tecido adiposo de camundongos obesos, acompanhada pelo aumento na expressão de NAD(P)H oxidase e diminuição na expressão das enzimas antioxidantes (FURUKAWA et al., 2004).

Entre as alterações geradas pelo aumento dos radicais livres e ERO, o processo de peroxidação lipídica nas biomembranas tem como um dos principais indicadores a formação de MDA. No presente estudo, o grupo controle (dieta comercial) apresentou maior concentração deste marcador de peroxidação lipídica. De acordo com Sohet et al. (2009), dietas comerciais apresentaram menores teores de vitaminas com ação antioxidante, como a vitamina E, acarretando em maiores valores de MDA no tecido hepático dos animais. Os teores de vitamina E encontrados na dieta comercial da Nuvilab CR-1 autoclavada[®] mostrou ser 40 % menor do que foi utilizado nas dietas AIN 93 modificada para hiperlipídica. Sendo assim, outro grupo de animais, recebendo a dieta AIN93 foi utilizado para minimizar essas diferenças nos níveis de vitaminas antioxidantes. Neste estudo, o fígado dos animais com dieta hiperlipídica apresentou uma elevação de 100 % nos níveis de MDA, mostrando que o excesso de energia e/ou o tipo de gordura dessa dieta aumenta o ataque às biomembranas. Estudo com pessoas severamente obesas que receberam uma carga de gordura numa refeição mostrou um aumento significativo dos níveis de MDA no período pós-prandial (TINAHONES et al., 2008). O tratamento com CAPE na dose de 10 $\mu\text{M.mL}^{-1}.\text{dia}$ foi visto reduzir os níveis de MDA em diferentes modelos de estresse oxidativo (CELIK; ERDOGAN, 2008; OKTAR et al., 2009; YILMAZ et al., 2004). Em modelos

de obesidade induzida por dieta hiperlipídica, nada se sabe dos efeitos antioxidantes do CAPE no combate a peroxidação lipídica. Neste estudo os resultados obtidos no tecido hepático mostraram que o Cape 13 mg/kg de peso por 22 dias reduz os níveis teciduais de MDA, sugerindo uma ação no combate à peroxidação lipídica das biomembranas.

Assim como o MDA, a concentração de peróxido de hidrogênio foi determinada como indicador do estresse oxidativo. A peroxidação lipídica e a concentração de peróxido de hidrogênio estão intimamente relacionadas (Figura 21 – reações 5 a 12), já que o peróxido de hidrogênio na célula pode ser convertido a radical hidroxila, altamente reativo e iniciador do processo de peroxidação lipídica. Dessa forma, pôde-se observar semelhante tendência na quantificação de MDA e peróxido de hidrogênio, onde os grupos hiperlipídico, Cape 13 mg e 30 mg – 15 dias e Cape 30 mg – 22 dias exibiram as maiores concentrações de peróxido de hidrogênio e, conseqüentemente, aumento na peroxidação lipídica no tecido hepático. Já os animais tratados com Cape 13 mg – 22 dias apresentaram resultados próximos aos encontrados para o animais de dieta controle AIN 93 nas duas determinações, H_2O_2 e MDA. A atividade antioxidante do CAPE, observada na dose de 13 mg/kg de peso e no período de tratamento de 22 dias, pode ser descrita como na Figura 22 (WANG et al., 2008), a qual demonstra que a função orto-dihidroxil é essencial para a atividade antioxidante do composto estudado (FANG et al., 2002).

Figura 22 - Mecanismo antioxidante do CAPE
Fonte: Wang et al. (2008)

No tecido adiposo, o tratamento com CAPE não apresentou diferença significativa no conteúdo de peróxido de hidrogênio quando comparado aos animais com dieta hiperlipídica. O menor teor de vitaminas antioxidantes (Vitamina E) na dieta comercial autoclavada pode ter levado a um aumento na geração de peróxido de hidrogênio no tecido adiposo destes animais. Estes resultados diferem do encontrado por Furukawa et al. (2004) que obtiveram a maior produção de H_2O_2 no tecido adiposo dos animais obesos e sugeriu que este tecido seria a principal fonte de aumento das ERO no plasma. Alguns trabalhos reportam que a infiltração de macrófagos no tecido adiposo é uma importante fonte de citocinas inflamatórias (WEISBERG et al., 2003; XU et al., 2003), além desses macrófagos serem conhecidos por produzirem ERO e estarem envolvidos no aumento da NAD(P)H oxidase e na produção elevada de ERO no tecido adiposo de indivíduos obesos. Furukawa et al. (2004) relataram que no fígado, músculo esquelético e aorta a produção de H_2O_2 foi reduzida, diferente do encontrado neste trabalho onde o tecido hepático apresentou maiores valores, essa diferença observada pode ser devida a atividade aumentada da SOD, ou mesmo de outras enzimas que não foram quantificadas, além de outros mecanismos de geração de H_2O_2 . Desse modo, a elevação de ERO pelo aumento da taxa metabólica devido ao excesso de energia conferida pela dieta, gera o estresse oxidativo descrito como prejudicial à secreção de insulina pelas células β pancreáticas e o transporte de glicose no músculo (MATSUOKA et al., 1997) e tecido adiposo (RUDICH et al., 1998) em modelos experimentais de resistência à insulina e obesidade.

Estudos têm associado atividade da SOD à obesidade e, alguns dos resultados demonstram que em indivíduos obesos a atividade dessa enzima esteve reduzida quando comparada ao grupo controle (TUNGTRONGCHITR et al., 2003), além de sugerirem que a atividade física moderada pode melhorar a função de defesa antioxidante das enzimas Mn-SOD e GSH-Px e da GSH em ratos Zucker obesos (CHANG et al., 2004). Os resultados obtidos diferem dos encontrados na literatura, onde o grupo hiperlipídico apresentou menor atividade dessa enzima entre os grupos experimentais estudados. No entanto, segundo Shih et al. (2006), o aumento na atividade da SOD pode ser devido ao aumento do estresse oxidativo produzido pela leptina, hormônio regulador do gasto energético e homeostase e, fortemente correlacionada à atividade da SOD, o que pode justificar a maior atividade obtida no presente trabalho para os indivíduos obesos. Convém ainda ressaltar, que o aumento de ERO no tecido hepático também está relacionado à fisiopatologia da esteatose hepática, uma complicação normalmente observada

em modelos de obesidade (ROSKAMS et al, 2003). Para os grupos tratados com CAPE, a atividade total da SOD reduziu significativamente quando comparados ao grupo hiperlipídico. Esta redução na atividade de SOD também não pôde ser atribuída a uma ou outra isoforma especificamente, mas a uma ação geral a todas isoformas. Dessa forma, o CAPE se mostrou eficiente na proteção do fígado contra o estresse induzido pela obesidade, levando a uma redução da atividade dessa enzima a valores próximos aos encontrados nos animais do grupo controle com dieta AIN 93, sendo o que tratamento com Cape 30 mg – 15 dias apresentou a melhor resposta antioxidante. No tecido adiposo, a SOD foi determinada apenas por PAGE, não sendo quantificada a atividade espectrofotometricamente. Diferenças significativas entre os tratamentos e os animais controle comercial não puderam ser observadas, identificando-se a ativação de todas as isoformas presentes nesse tecido. Em relação ao grupo AIN93, os resultados mostraram uma ausência da banda referente a isoforma CuZn-SOD III, sem que alterações específicas mais significativas pudessem ser verificadas para as distintas isoformas.

Para a CAT, o grupo hiperlipídico apresentou alta atividade específica quando comparado ao grupo controle com dieta comercial. A mesma tendência se deu para a atividade da GSH-Px. Esses resultados diferem do encontrado por Vincent et al. (1999), no miocárdio em modelo de estresse oxidativo induzido pela obesidade, que não observaram aumento significativo nas atividades da CAT, GSH-Px e também da isoforma Cu/Zn-SOD comparando-se com o grupo controle. É importante salientar a existência de outras peroxidases que tanto nesse, como em outros estudos, não foram investigadas, e que podem estar participando ativamente dos processos de dismutação do H_2O_2 gerado em excesso. Degasperri et al. (2009) encontrou maiores atividades da SOD e CAT em monócitos de indivíduos obesos. As enzimas CAT e GSH-Px agem diretamente sobre o peróxido de hidrogênio, sendo que a GSH-Px também atua na inativação de hidroperóxidos orgânicos. Uma hipótese provável, é que a CAT em conjunto com a GSH-Px tiveram suas atividades aumentadas na tentativa de manter a homeostase, pela inativação do peróxido de hidrogênio produzido em excesso no grupo hiperlipídico, entretanto esta elevação não foi suficiente para atingir os níveis de peróxidos de hidrogênio encontrados no grupo controle, caracterizando a presença do estado de estresse oxidativo induzido pelo aumento de ingestão energética. No grupo AIN 93 as enzimas exerceram o papel de equilíbrio esperado, reduzindo a concentração de peróxido de hidrogênio e a peroxidação lipídica. O aumento da atividade de algumas enzimas nos animais controle comercial ou AIN 93 pode ser devido à

diferença comportamental, onde os animais controles são muito mais ativos enquanto aos animais obesos apresentam comportamento mais calmo, essa mudança na atividade física normal pode contribuir para a redução no estresse oxidativo pela melhora nas defesas antioxidantes, na redução da massa adiposa, no controle da glicemia e na redução de lipídios no sangue (VINCENT; INNES; VINCENT, 2007). Essa tendência na redução da peroxidação lipídica e da concentração de peróxido de hidrogênio pode ser notada também entre os grupos tratados com o CAPE, principalmente no grupo Cape 13 mg – 22 dias no qual o estresse induzido pela dieta estava presente, mas o antioxidante foi capaz de combater o desequilíbrio inativando as ERO produzidas em excesso. Yilmaz et al. (2004) demonstraram que o CAPE na dose de $10 \mu\text{M.mL}^{-1}.\text{kg}^{-1}$ foi capaz de reduzir a peroxidação lipídica e a atividade das enzimas SOD e CAT do fígado de ratos diabéticos, sem alterar a atividade da GSH-Px. Contudo, no estresse gerado pela falência renal induzida por cisplatina, o CAPE não alterou os valores de peroxidação lipídica, mas a enzima CAT teve sua atividade aumentada substancialmente com a administração do CAPE (YILMAZ et al., 2005). Um dos mecanismos de defesa mais importante dos antioxidantes obtidos na dieta é a interceptação dos radicais livres gerados pelo metabolismo celular ou por fontes exógenas, impedindo o ataque sobre as biomoléculas, dupla ligação de ácidos graxos insaturados e bases do DNA, evitando a formação de lesões e perda da integridade celular (BIANCHI; ANTUNES, 1999).

Em estudo com camundongos obesos por dieta hiperlipídica (30% de gordura), o tecido adiposo mostrou uma menor expressão e atividade das enzimas CAT, SOD e GSH-Px (FURUKAWA et al., 2004). Esta alteração mostrou estar associada ao aumento na expressão e ativação da NAD(P)H oxidase na gordura dos animais obesos sugerindo que o aumento da produção de ERO no tecido adiposo acumulado prejudica o sistema de defesa antioxidante (FURUKAWA et al., 2004). Estes dados sugerem a existência de um limiar de adiposidade que o sistema de defesa não pode prover antioxidantes adequados para as ERO produzidas (VINCENT; TAYLOR, 2006), ou seja, quebrando a homeostase celular na geração e quebra das ERO, estabelecendo a condição de estresse oxidativo. As menores atividades das enzimas CAT e GSH-Px no tecido adiposo podem ser devidas à geração de outras espécies reativas que não foram quantificadas no presente trabalho. Um outro mecanismo possível foi visto em estudo com células 3T3-L1 diferenciadas em adipócitos, que mostraram um aumento na indução da expressão de PPAR γ de maneira paralela ao aumento observado na expressão do RNAm da CAT. Essas

células quando tratadas com $\text{TNF-}\alpha$, citocina sabidamente inibitória da atividade transcricional do $\text{PPAR}\gamma$ em adipócitos hiperplásicos, resultou em uma diminuição na expressão do $\text{PPAR}\gamma$ com concomitante redução da expressão do RNAm da CAT (OKUNO et al, 2008). O tratamento com CAPE nas doses de 13 e 30 mg/kg de peso administrado por 22 dias demonstrou um aumento na ativação da CAT semelhante aos animais controle, mostrando que esses animais obesos tratados com as referidas doses do antioxidante durante o maior período de tratamento provavelmente apresentaram um mecanismo de defesa a geração de peróxidos semelhantes aos animais controle com dieta comercial, ou seja, melhorando o sistema de defesa antioxidante. Nesse mesmo sentido, a atividade da GSH-Px pode ter sido restaurada nos grupos tratados com o CAPE, sendo observado um aumento gradual da atividade dessa enzima ao se aumentar o tempo de tratamento e as doses utilizadas. O CAPE pode ter agido sobre as espécies reativas que estariam prejudicando o sistema de defesa, resultando na melhora da atividade da GSH-Px.

A GR, responsável por regenerar a GSSG ao seu estado reduzido (GSH) através da oxidação do NADPH, tem sua ação antioxidante de forma indireta ao agir como coadjuvante no processo de defesa. Os grupos hiperlipídico, Cape 13 e 30 mg – 15 dias e Cape 30 mg – 22 dias apresentaram as maiores atividades específicas, podendo ser associadas a ação de outras enzimas, como a GSH-Px e GO, todas pertencentes à família da glutathione. Do mesmo modo, no tecido adiposo, a atividade da GR está aumentada nos grupos hiperlipídico e Cape 30 mg. De acordo com Souza et al. (2008), atividade da GR se mostrou aumentada no grupo com dieta rica em sacarose e no grupo que recebeu a mesma dieta e o antioxidante N-acetilcisteína, um organosulfurado presente no alho.

A superprodução de ERO no tecido adiposo e hepático de camundongos precedeu o aparecimento da obesidade e resistência à insulina induzida por dieta hiperlipídica (ANDO; FUJITA, 2009). Vários relatos indicam que drogas antioxidantes melhoram a resistência à insulina em modelos de síndrome metabólica (FURUKAWA et al., 2004). O CAPE têm demonstrado alta atividade antioxidante *in vitro*, como a inibição da formação do ânion superóxido (RUSSO; LONGO; VANELLA, 2002, WU et al., 2007). Esses resultados mostram a potente capacidade antioxidante deste composto fenólico. Entretanto, em meios mais complexos, como sistemas biológicos, essa ação pode não ocorrer de forma tão clara e direta e, diferenças podem ocorrer de acordo com o tecido estudado e o modelo experimental.

7 CONCLUSÃO

- ✓ O modelo experimental de obesidade induzida por dieta hiperlipídica produziu alterações em marcadores moleculares de estresse oxidativo.
- ✓ O tratamento com CAPE na dose de 30 mg/kg de peso mostrou exercer efeito hepatoprotetor, modulando a atividade da enzima hepática γ -GT.
- ✓ O CAPE agiu como antioxidante no combate ao estresse oxidativo induzido pela obesidade.
- ✓ O CAPE administrado na dose de 13 mg/kg de peso melhorou a resposta ao estresse oxidativo no tecido hepático de camundongos SWISS alimentados com dieta hiperlipídica.

REFERÊNCIAS

AEBI, H. Catalase. In: Bergmeyer, H. U., (Ed.) **Methods of enzymology analyses**. New York: Academic Press, 1974. p. 673-683.

ALEXIEVA, V.; SERGIEV, I.; MAPELLI, S.; KARANOV, E. The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat. **Plant, Cell and Environment**, London, v. 24, p. 1337-1344, 2001.

ANDO, K.; FUJITA, T. Metabolic syndrome and oxidative stress. **Free Radical Biology and Medicine**, New York, n. 47, p. 213-218, 2009.

ATES, B.; DOGRU, M.I.; GUL, M.; ERDOGAN, A.; DOGRU, A.K.; YILMAZ, I.; YUREKLI, M.; ESREFOGLU, M. Protective role of caffeic acid phenethyl ester in the liver of rats exposed to cold stress. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, Paris, v. 20, p. 283-289, 2006.

AZEVEDO, R.A.; ALAS, R.M.; SMITH, R.J.; LEA, P.J. Response of antioxidant enzymes to transfer from elevated carbon dioxide to air and ozone fumigation, in the leaves and roots of wild-type and a catalase-deficient mutant of barley. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 104, n. 2, p. 280-292, 1998.

BANKOVA, V.; BOUDOUROVA-KRASTEVA, G.; POPOV, S.; SFORCIN, J.M.; FUNARI, S.R.C. Seasonal variations of the chemical composition of Brazilian propolis. **Apidologie**, Paris, v. 29, p. 361-367, 1998.

BANSKOTA, A. H.; TEZUKA, Y.; KADOTA, S. Recent Progress in Pharmacological Research of Propolis. **Phytotherapy Research**, London, v. 15, p. 561-571, 2001.

BARREIROS, A.L.B.S.; DAVID, J.M. Estresse oxidativo: Relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006.

BASTOS, D.H.M.; ROGERO, M.M.; ARÊAS, J.A.G. Mecanismos de ação de compostos bioativos dos alimentos no contexto de processos inflamatórios relacionados à obesidade. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, São Paulo, v. 53, n. 5, p. 646-656, 2009.

BEAUCHAMP, C.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: improve assays and an assay applicable to acrylamide gels. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 44, n. 1, p. 276-287, 1971.

BECKER, E.M., NISSEN, L.R., SKIBSTED, L.H. Antioxidant evaluation protocols: Food quality or health effects. **European Food Research and Technology**, Heidelberg, v. 219, p. 561-571, 2004.

BETTERIDGE, D.J. What is Oxidative Stress? **Metabolism**, Philadelphia, v. 49, n. 2, suppl., p. 3-8, 2000.

BIANCHI, M.L.P.; ANTUNES, L.M.G. Radicais Livres e os Principais Antioxidantes da Dieta. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 12, n. 2, p. 123-130, 1999.

BJÖRNSTEDT, M.; XUE, J.; HUANG, W.; AKESSON, B; HOLMGREN, A. The thioredoxin and glutaredoxin systems are efficient electron donors to human plasma glutathione peroxidase. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 269, n. 47, p. 29382-29384, 1994.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 72, n. 1, p. 248-254, 1976.

BRASIER, A.R.; RECINOS III, A.; ELEDRISI, M.S., Vascular Inflammation and the Renin-Angiotensin System. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, Dallas, v. 22, p. 1257-1266, 2002.

BRIGELIUS-FLOHÉ, R. Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases. **Free Radical Biology and Medicine**, New York, v. 27, p. 951-965, 1999.

BRIGELIUS-FLOHÉ, R.; TRABER, M.G. Vitamin E: function and metabolism. **FASEB Journal**, Bethesda, v. 13, p. 1145-1155, 1999.

BUETTNER, G.R.; JURKIEWICZ, B.A. Catalytic Metals, Ascorbate and Free Radicals: Combinations to Avoid. **Radiation Research**, New York, v. 145, n. 5, p.532-541, 1996.

BURDOCK, G.A. Review of the Biological Properties and Toxicity of Bee Propolis (Propolis). **Food and Chemical Toxicology**, London, v. 36, p. 347-363, 1998.

CELIK, S.; ERDOGAN, S. Caffeic acid phenethyl ester (CAPE) protects brain against oxidative stress and inflammation induced by diabetes in rats. **Molecular Cell Biochemistry**, Gravenhage, v. 312, p. 39-46, 2008.

CERIELLO, A, MOTZ, E. Is oxidative stress the pathogenic mechanism underlying insulin resistance, diabetes, and cardiovascular disease? The common soil hypothesis revisited. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, Dallas, v. 24, p. 816-823, 2004.

CINTRA, D.E.; PAULI, J.R.; ARAÚJO, E.P.; MORAES, J.C.; SOUZA, C.T.; MILANSKI, M.; MORARI, J.; GAMBERO, A.; SAAD, M.J.; VELLOSO, L.A. Interleukin-10 is a protective factor against diet-induced insulin resistance in liver. **Journal of Hepatology**, Amsterdam, v. 48, p. 628-637, 2008.

CHANG, S.-P.; CHEN, Y.-H.; CHANG, W.-C.; LIU, I.-M.; CHENG, J.-T. Increase of anti-oxidation by exercise in the liver of obese Zucker rats. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, Victoria, v. 31, p. 506-511, 2004.

CHROUSOS, G.P.; GOLD, P.W. The concepts of stress and stress system disorders. Overview of physical and behavioral homeostasis. **JAMA**, Chicago, v. 267, n. 9, p. 1244–1252, 1992.

CLARDY, J., WALSH, C. Lessons from natural molecules. **Nature**, London, v. 432, p. 829-837, 2004.

COBAN, S.; YILDIZ, F.; TERZI, A.; AL, B.; OZGOR, D.; ARA, C.; POLAT, A.; ESREFOGLU, M. The effect of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) against cholestatic liver injury in rats. **Journal of Surgical Research**, Philadelphia, v. 159, n. 2, p. 674-679, 2010.

COENTRÃO, P.A.M. **Avaliação de três técnicas de isolamento de polifenóis: aplicação em amostras de chocolate meio amargo**. 2005. 111p. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) – Centro de Estudo Gerais, Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2005.

COHEN, J. Obesity: a review. **Journal of the Royal College of General Practitioners**, London, v. 35, p. 435-441, 1985.

COOPER, S.A.; WHALEY-CONNELL, A.; HABIBI, J.; WEI, Y.; LASTRA, G.; MANRIQUE, C.; STAS, S.; SOWERS, J.R. Renin-angiotensin-aldosterone system and oxidative stress in cardiovascular insulin resistance. **American Journal Physiology Heart Circulation Physiology**, Bethesda, v. 293, p. 2009-2023, 2007.

CRAGG, G.M.; NEWMAN, D.J. Natural Product Drug Discovery in the Next Millennium. **Pharmaceutical Biology**, Lisse, v. 39, suppl., p. 8-17, 2001.

DEGASPERI, G.R.; DENIS, R.G.P.; MORARI, J.; SOLON, C.; GELONEZE, B.; STABE, C.; PAREJA, J.C.; VERCESI, A.E.; VELLOSO, L.A. Reactive oxygen species production is increased in the peripheral blood monocytes of obese patients. **Metabolism Clinical and Experimental**, Philadelphia, v. 58, p. 1087-1095, 2009.

DIPLOCK, A.T; CHARLEUX, J.-L.; CROZIER-WILLI, G.; KOK, F.J.; RICE-EVANS, C.; ROBERFROID, M.; STAHL, W; VIÑA-RIBES, J. Functional food science and defence against reactive oxidative species. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 80, suppl. 1, p. 77-112, 1998.

DRÖGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiological Reviews**, Bethesda, v. 82, p. 47-95, 2002.

DUARTE-ALMEIDA, J.M.; SANTOS, R.J.; GENOVESE, M.I.; LAJOLO, F.M. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema β -caroteno/ácido linoléico e método de sequestro de radicais DPPH. **Ciência Tecnologia dos Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 2, p. 446-452, 2006.

DUARTE, A.C.G.O.; FONSECA, D.F.; MANZONI, M.S.J.; SOAVE, C.F.; SENE-FIORESE, M.; SÂMASO, A.R.; CHEIL, N.C. Dieta hiperlipídica e capacidade secretória de insulina em ratos. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 19, n. 3, p. 341-348, 2006.

DUTHIE, G. Antioxidants. **Medicine**, New York, v. 31, n. 4, p. 25-26, 2003.

EPP, O.; LADENSTEIN, R.; WENDEL, A. The refined structure of the selenoenzyme glutathione peroxidase at 0.2-nm resolution. **European Journal of Biochemistry**, Oxford, v. 133, p.51–69, 1983.

FANG, J.-G.; LU, M.; CHEN, Z.-H.; ZHU, H.-H.; LI, Y.; YANG, L.; WU, L.-M.; LIU, Z.-L. Antioxidants effects of resveratrol and its analogues against the free-radical-induced peroxidation of linoleic acid in micelles. **Chemistry**, Easton, v. 8, n. 18, p. 4191-4198, 2002.

FARDOUN, R.Z. The use of vitamin E in type 2 diabetes mellitus. **Clinical and Experimental Hypertension**, New York, v. 29, p. 135-148, 2007.

FERREIRA, A.L.A; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, São Paulo, v. 43, n. 1, p. 61-68, 1997.

FLOHÉ, L.; ÖTTING, F. Superoxide Dismutase Assays. **Methods in Enzymology**, New York, v. 105, p. 93–104, 1984.

FLOHÉ, L.; GÜNZLER, W. A. Assays of glutathione peroxidase. **Methods in Enzymology**. New York, v. 105, p. 114-121, 1984

FONTAINE, K.R.; REDDEN, D.T.; WANG, C.; WESTFALL, A.O.; ALLISON, D.B. Years of life lost due to obesity. **JAMA**, Chicago, v. 289, n. 2, p. 187-193, 2003.

FREI, B. Molecular and biological mechanisms of antioxidant action. **FASEB Journal**, Bethesda, v. 13, p. 963-964, 1999.

FREDERICH, R.C.; HAMANN, A.; ANDERSON, S.; LÖLLMANN, B.; LOWELL, B.B.; FLIER, J.S. Leptin levels reflect body lipid content in mice: Evidence for diet-induced resistance to leptin action. **Nature Medicine**, London, v. 1, n. 12, p. 1311-1314, 1995.

FRIDOVICH, I. Fundamental aspects of reactive oxygen species, or what's the matter with oxygen? **Annals New York Academy of Sciences**, New York, v. 893, p. 13-18, 1999.

FUJITA, K.; NISHIZAWA, H.; FUNAHASHI, T.; SHIMOMURA, I.; SHINABUKURO, M. Systemic oxidative stress is associated with visceral fat accumulation and the metabolic syndrome. **Circulation Journal**, Kyoto, v. 70, p. 1437-1442, 2006.

FURUKAWA, S.; FUJITA, T.; SHIMABUKURO, M.; IWAKI, M.; YAMADA, Y.; NAKAJIMA, Y.; NAKAYAMA, O.; MIKISHIMA, M.; MATSUDA, M.; SHIMOMURA, I. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. **Journal of Clinical Investigation**, New Haven, v. 114, n. 12, p. 1752-1761, 2004.

GIANNOPOLITIS, C.N.; RIES, S.K. Superoxide dismutases: I. Occurrence in higher plants. **Plant Physiology**, Rockville, v. 59, p. 309-314, 1977.

GOMES-JUNIOR, R.A.; MOLDES, C.A.; DELITE, F.S.; POMPEU, G.B.; GRATÃO, P.L.; MAZZAFERA, P.; LEA, P.J.; AZEVEDO, R.A. Antioxidant metabolism of coffee cell suspension cultures in response to cadmium. **Chemosphere**, Oxford, v. 65, n. 8, p. 1330-1337, 2006.

GOMES-JUNIOR, R.A.; GRATÃO, P.L.; GAZIOLA, S.A.; MAZZAFERA, P.; LEA, P.J.; AZEVEDO, R.A. Selenium-induced oxidative stress in coffee cell suspension cultures. **Functional Plant Biology**, Victoria, v. 34, n. 5, p. 449-456, 2007.

GRATÃO, P.L.; POLLE, A.; LEA, P.J.; AZEVEDO, R.A. Making the life of heavy metal-stressed plants a little easier. **Functional Plant Biology**, Victoria v. 32, n. 6, p. 481-494, 2005.

GREGORY, E.M.; FRIDOVICH, I. Induction of superoxide dismutase by molecular oxygen. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v. 114, n. 2, p. 543-548, 1973.

GREGORY, E.M.; GOSCIN, S.A.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase and oxygen toxicity in a eucaryote. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v. 117, n. 2, p. 456-460, 1974.

GUIMARÃES, D.E.D.; SARDINHA, F.L.C.; MIZURINI, D.M.; TAVARES DO CARMO, M.G. Adipocitocinas: uma nova visão do tecido adiposo. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 20, n. 5, p. 549-559, 2007.

HADJIGOGOS, K. The role of free radicals in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. **Panminerva Medica**, Torino, v. 45, p. 7-13, 2003.

HALLIWELL, B. Oxidants and human disease: some new concepts. **FASEB Journal**, Bethesda, v. 1, p. 358-364, 1987.

_____. Free radicals and antioxidants: A personal view. **Nutrition Reviews**, Baltimore, v. 52, n. 8, p. 253-265, 1994.

_____. Antioxidants in human health and disease. **Annual Review of Nutrition**, Palo Alto, v. 16, p. 33-50, 1996.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free radicals in biology and medicine**, 3rd ed., Oxford, Oxford University Press, 1999. 968p.

HAN, Y.; RUNGE, M.S.; BRASIER, A.R. Angiotensin II induces interleukin-6 transcription in vascular smooth muscle cells through pleiotropic activation of nuclear factor-kappa B transcription factors. **Circulation Research**, Baltimore, v. 84, p. 695-703, 1999.

HASSAN, H.M.; FRIDOVICH, I. Regulation of the synthesis of superoxide dismutase in *Escherichia coli*. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 252, n. 21, p. 7667-7672, 1977.

HEATH, R.L.; PACKER, L. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. **Archives in Biochemistry Biophysics**, Dusseldorf, v. 125, p. 2141-2145, 1968.

HERRMANN, K. Occurrence and content of hydroxycinnamic and hydroxybenzoic acid compounds in foods. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v. 28, n. 4, p. 315-347, 1989.

HERMES-LIMA, M. Oxygen in Biology and Biochemistry: Role of Free Radicals. In: STOREY, K. B. (Ed.). **Functional Metabolism: Regulation and adaptation**. New Jersey: Wiley-Liss, 2004. chap 13, p. 369-382.

HIGDON, J.V.; FREI, B. Obesity and Oxidative Stress: A Direct Link to CVD? **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, Baltimore, v. 23, p. 365-367, 2003.

HO, Y.; MAGNENAT, J.; BRONSON, R.T.; CAO, J.; GARGANO, M.; SUGAWARA, M.; FUNK, C.D. Mice deficient in cellular glutathione peroxidase develop normally and show no increased sensitivity to hyperoxia. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 272, n. 26, p. 16644-16651, 1997.

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

HSU, C.-L., YEN, G.-C. Effect of gallic acid on high fat diet-induced dyslipidaemia, hepatosteatosis and oxidative stress in rats. **British Journal of Nutrition**, Wallingford, v. 98, p. 727-735, 2007.

HUBER, P.C.; ALMEIDA, W.P. Glutathione e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. **Química Nova**, São Paulo, v. 31, n. 5, suppl., p. 1-4, 2008.

ILHAN, A.; KOLTUKSUZ, U.; OZEN, S.; UZ, E.; CIRALIK, H.; AKYOL, O. The effects of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on spinal cord ischemia / reperfusion injury in rabbits. **European Journal of Cardio-thoracic Surgery**, Berlin, v. 16, p. 458-463, 1999.

IRAZ, M.; OZEROL, E.; GULEC, M.; TASDEMIR, S.; IDIZ, N.; FADILLIOGLU, E.; NAZIROGLU, M.; AKYOL, O. Protective effect of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) administration on cisplatin-induced oxidative damage to liver in rat. **Cell Biochemistry and Function**, Chichester, v. 24, p. 357-361, 2006.

IRMAK, M.K.; FADILHOGLU, E.; GÜLEÇ, M.; ERDOGAN, H.; YAGMURCA, M.; AKYOL, Ö. Effects of electromagnetic radiation from a cellular telephone on the oxidant and antioxidant levels in rabbits. **Cell Biochemistry and Function**, Chichester, v. 20, p. 279-283, 2002.

JONES, D.P.; KENNEDY, F.G. Function of glutathione peroxidase in decomposition of hydrogen peroxide in isolated liver and heart cells. In: LARSSON, A.; ORRENIUS, S.; HOLMGREN, A.; MANNERVIK, B. (Ed.). **Functions of Glutathione**. New York: Raven Press, 1983, p. 109–116.

JURÁNEK, I.; BEZEK, S. Controversy of free radical hypothesis: Reactive oxygen species – cause or consequence of tissue injury? **General Physiology and Biophysics**, Bratislava, v. 24, p. 263-278, 2005.

KALE, A., GAWANDE, S., KOTWAL, S. Cancer phytotherapeutics: role for flavonoids at the cellular level. **Phytotherapy Research**, Chichester, v. 22, n. 5, p. 567-577, 2008.

KARALIS, K.P.; GIANNOGONAS, P.; KODELA, E.; KOUTMANI, Y.; ZOUMAKIS, M.; TELI, T. Mechanisms of obesity and related pathology: linking immune responses to metabolic stress. **FEBS Journal**, Oxford, v. 276, p. 5747-5754, 2009.

KELNER, M.J.; BAGNELL, R. Alteration of endogenous glutathione peroxidase, manganese superoxide dismutase, and glutathione transferase activity in cells transfected with a copper-zinc superoxide dismutase expression vector: Explanation for variations in paraquat resistance. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 265, n. 19, p. 10872–10875, 1990.

KIRKMAN, H.N.; GAETANI, G.F. Catalase: a tetrameric enzyme with four tightly bound molecules of NADPH. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 81, p. 4343-4347, 1984.

KIRKMAN, H.N.; ROLFO, M.; FERRARIS, A.M.; GAETANI, G.F. Mechanisms of protection of catalase by NADPH: Kinetics and stoichiometry. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 274, n. 20, p. 13908-13914, 1999.

KRAUS, T.E., MCKERSIE, B.D., FLETCHER, R.A. Paclobutrazol induced tolerance of wheat leaves to paraquat may involve increased antioxidant enzyme activity. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 145, n. 4, 570-576, 1995.

LEE, D.; BLOMHOOF, R.; JACOBS Jr, D.R. Is serum gamma glutamyltransferase a marker of oxidative stress? **Free Radical Research**, London, v. 38, n. 6, p. 535-539, 2004.

LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. **Principles of Biochemistry**. 4th ed. New York: Worth Publishers, 2006. 1232 p.

LUSTOSA, S.R.; GALINDO, A.B.; NUNES, L.C.C.; RANDAU, K.P.; ROLIM NETO, P.J. Própolis: atualizações sobre a química e a farmacologia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, v. 18, n. 3, p. 447-454, 2008.

MACHLIN, L. J.; BENDICH, A. Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients. **FASEB Journal**, Bethesda, v. 1, p. 441-445, 1987.

MARCUCCI, M. C. Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. **Apidologie**, Paris, v. 26, p. 83-99, 1995.

MATSUOKA, T.; KAJIMOTO, Y.; WATADA, H.; KANETO, H.; KISHIMOTO, M.; Umayahara, Y.; FUJITANI, Y.; KAMADA, T.; KAWAMORI, R.; YAMASAKI, Y. Glycation-dependent, reactive oxygen species-mediated suppression of the insulin gene promoter activity in HIT cells. **Journal of Clinical Investigation**, New Haven, v. 99, p. 144-150, 1997.

MAY, J.M. Ascorbate function and metabolism in the human erythrocyte. **Frontiers in Bioscience**, Searington, v. 2, p. 1-10, 1998.

MENEZES, H. Própolis: Uma revisão dos recentes estudos de suas propriedades farmacológicas. **Arquivos do Instituto. Biológico**, São Paulo, v. 72, n.3, p. 405-411, 2005.

MODAN, M.; HALKIN, H.; ALMOG, S.; LUSKY, A.; ESHKOL, A.; SHEFI, M.; SHITRIT, A.; FUCHS, Z. Hyperinsulinemia: A link between hypertension obesity and glucose intolerance. **Journal of Clinical Investigation**, New Haven, v. 75, p. 809-817, 1985.

MULLER, D.N.; DECHEND, R.; MERVAALA, E.M.A.; PARK, J.K.; SCHMIDT, F.; FIEBELER, A.; THEUER, J.; BREU, V.; GANTEN, D.; HALLER, H; LUFT, F. C. NF- κ B inhibition ameliorates angiotensin II-induced inflammatory damage in rats. **Hypertension**, Dallas, v. 35, p. 193-201, 2000.

NATHAN, C. Specificity of a third kind: reactive oxygen and nitrogen intermediates in cell signaling. **Journal of Clinical Investigation**, New Haven, v. 111, p. 769-778, 2003.

NORDBERG, J.; ARNÉR, E.S.J. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. **Free Radical Biology and Medicine**, New York, v. 31, n. 11, p. 1287-1312, 2001.

NOVELLI, E.L.B. **Nutrição e vida saudável**: estresse oxidativo e metabolismo energético. São Paulo: Tecmedd, 2005. 288p.

OKTAR, S.; YÖNDEN, Z.; AYDIN, M.; ILHAN, S.; ALÇIN, E.; ÖZTÜRK, O. H. Protective effects of caffeic acid phenethyl ester on iron-induced liver damage in rats. **Journal of Physiology and Biochemistry**, Pamplona, v. 65, n. 4, p. 339-344, 2009.

OKUNO, Y.; MATSUDA, M.; KOBAYASHI, H.; MORITA, K.; SUZUKI, E.; FUKUHARA, A.; KOMURO, R.; SHIMABUKURO, M.; SHIMOMURA, I. Adipose expression of catalase is regulated via a novel remote PPAR γ -responsive region. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v. 366, p. 698-704, 2008.

OLUSI, S.O. Obesity is an independent risk factor for plasma lipid peroxidation and depletion of erythrocyte cytoprotective enzymes in humans. **International Journal of Obesity**, London, v. 26, p. 1159-1164, 2002.

OZATA, M.; MERGEN, M.; OKTENLI, C.; AYDIN, A.; SANISOGLU, Y.; BOLU, E.; YILMAZ, M.I.; SAYAL, A.; ISIMER, A.; OZDEMIR, I.C. Increased oxidative stress and hypozincemia in male obesity. **Clinical Biochemistry**, Winnipeg, v. 35, p. 627-631, 2002.

PARK, Y.K.; IKEGAKI, M.; ABREU, J.A.S.; ALCICI, N.M.F. Estudo da preparação dos extratos de própolis e suas aplicações. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 18, n. 3, p. 313-318, 1998.

PARK, Y.K.; ALENCAR, S.M.; SCAMPARINI, A.R.P.; AGUIAR, C.L. Própolis produzida no sul do Brasil, Argentina e Uruguai: evidências fitoquímicas de sua origem vegetal. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 32, n. 6, p. 997-1003, 2002.

PASCUAL, C.; GONZALEZ, R.; TORRICELLA, R.G. Scavenging action of propolis extract against oxygen radicals. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 41, p. 9-13, 1994.

PEREIRA, L.O.; de FRANCISCHI, R.P.; LANCH JR., A.H. Obesidade: Hábitos nutricionais, sedentarismo e resistência à insulina. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, Rio de Janeiro, v. 47, n. 2, p. 111-127, 2003.

RANTALA, A.O.; LILJA, M.; KAUMA, H.; SAVOLAINEN, M.J.; REUNANEN, A.; KESÄNIEMI, Y.A. Gamma-glutamyl transpeptidase and the metabolic syndrome. **Journal of Internal Medicine**, Oxford, v. 248, p. 230-238, 2000.

RENZ, S.V. Seminário apresentado na disciplina de Bioquímica do programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias da UFRGS no primeiro semestre de 2003. Disponível em: www6.ufrgs.br/favet/lacvet/restrito/pdf/oxid_antiox.pdf www.ufrgs.br/bioquimica. Acesso em: 26 jan. 2010.

RICE-EVANS, C.A. Formation of free radicals and mechanisms of action in normal biochemical processes and pathological states. In: RICE-EVANS, C. A.; BURDON, R. H. (Ed.). **Free Radical Damage and its Control**. Amsterdam: Elsevier, 1994. chap 5, p. 131-154.

RIPPE, J.M.; CROSSLEY, S.; RINGER, R. Obesity as a chronic disease: modern medical and lifestyle management. **Journal of the American Dietetic Association**, Baltimore, v. 98, n. 10, suppl. 2, p. 9-15, 1998.

ROBERTS, C.K.; SINDHU, R.K. Oxidative stress and metabolic syndrome. **Life Sciences**, Amsterdam, v. 84, p. 705-712, 2009.

ROBERTS, C.K.; BARNARD, R.J.; SINDHU, R.K.; JURCZAK, M.; EHDAIE, A.; VAZIRI, N.D. Oxidative stress and dysregulation of NAD(P)H oxidase and antioxidant enzymes in diet-induced metabolic syndrome. **Metabolism Clinical and Experimental**, Philadelphia, v. 55, p. 928-934, 2006.

ROSKAMS, T.; YANG, S.Q.; KOTEISH, A.; DURNEZ, A.; DEVOS, R.; HUANG, X.; ACHTEN, R.; VERSLYPE, C.; DIEHL, A.M. Oxidative stress and oval cell accumulation in mice and humans with alcoholic and nonalcoholic fatty liver disease. **American Journal of Pathology**, Philadelphia, v. 163, n. 4, p. 1301–1311, 2003.

RUDICH, A.; TIROSH, A.; POTASHNIK, R.; HEMI, R.; KANETY, H.; BASHAN, N. Prolonged oxidative stress impairs insulin-induced GLUT4 translocation in 3T3-L1 adipocytes. **Diabetes**, New York, v. 47, p.1562–1569, 1998.

RUSSO, A.; LONGO, R.; VANELLA, A. Antioxidant activity of propolis: role of caffeic acid phenethyl ester and galangin. **Fitoterapia**, Milano, v. 73, suppl. 1, p. 21-29, 2002.

SATTAR, N.; WANNAMETHEE, S.G.; FOROUHI, N.G. Novel biochemical risk factors for type 2 diabetes: pathogenic insights or prediction possibilities? **Diabetologia**, Heidelberg, v. 51, p. 926-940, 2008.

SCHULZE, P.C., LEE, R.T. Oxidative stress and atherosclerosis. **Current Atherosclerosis Reports**, Philadelphia, v. 7, p. 242–248, 2005.

SHIH, L.-Y.; LIOU, T.-H.; CHAO, J.C.-J.; KAU, H.-N.; WU, Y.-J.; SHIEH, M.-J.; YEH, C.-Y.; HAN, B.-C. Leptin, superoxide dismutase, and weight loss: initial leptin predicts weight loss. **Obesity**, Silver Spring, v. 14, n. 12, 2006.

SHOELSON, S.E.; LEE, J.; GOLDFINE, A.B. Inflammation and insulin resistance. **Journal of Clinical Investigation**, New Haven, v. 116, n. 7, p. 1793-1801, 2006.

SIES, H. Oxidative Stress: From Basic Research to Clinical Application. **The American Journal of Medicine**, New York, v. 91, suppl. 3C, p. 31-37, 1991.

SIES, H.; STAHL, W. Vitamins E and C, β -carotene, and other carotenoids as antioxidants. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 385, p. 28-40, 1995.

SOGUT, S.; ZOROGLU, S.S.; ÖZYURT, H.; YILMAZ, H.R.; ÖZUGURLU, F.; SIVASLI, E.; YETKIN, Ö.; YANIK, M.; TUTKUN, H.; SAVAS, H.A.; TARAKÇIOGLU, M.; AKYOL, Ö. Changes in nitric oxide levels and antioxidant enzyme activities may have a role in the pathophysiological mechanisms involved in autism. **Clinica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 331, p. 111-117, 2003.

SOHET, F.M.; NEYRINCK, A.M.; DEWULF, E.M.; BINDELS, L.B.; PORTOIS, L.; MALAISE, W.J.; CARPENTIER, Y.A.; CANI, P.D.; DELZENNE, N.M. Lipid peroxidation is not a prerequisite for the development of obesity and diabetes in high-fat-fed mice. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 102, p. 462-469, 2009.

SOUZA, G.A.; EBAID, G.X.; SEIVA, F.R.F.; ROCHA, K.H.R.; GALHARDI, C.M.; MANI, F.; NOVELLI, E.L.B. *N*-Acetylcysteine an *Allium* plant compound improves high-sucrose diet-induced obesity and related effects. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, Oxford, p.1-7, 2008. Disponível em:

<http://ecam.oxfordjournals.org/cgi/content/abstract/nen070v1>. Acesso em: 14 jul 2010.

STUMP, C.S.; HENRIKSEN, E.J.; WEI, Y.; SOWERS, J.R. The metabolic syndrome: role of skeletal muscle metabolism. **Annals of Medicine**, London, v. 38, p. 389-402, 2006.

SUD'INA, G.F.; MIRZOEVA, O.K.; PUSHKAREVA, M.A.; KORSHUNOVA, G.A.; SUMBATYAN, N.V.; VARFOLOMEEV, S.D. Caffeic acid phenethyl ester as a lipoxygenase inhibitor with antioxidant properties. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 329, p. 21-24, 1993.

TANAKA, S.; HAMANISHI, C.; KIKUCHI, H.; FUKUDA, K. Factors related to degradation of articular cartilage in osteoarthritis: a review. **Seminars in Arthritis and Rheumatism**, Philadelphia, v. 27, n. 6, p. 392-399, 1998.

TAVAZZI, B.; DI PIERRO, D.; AMORINI, A.M.; FAZZINA, G.; TUTTOBENE, M.; GIARDINA, B.; LAZZARINO, G. Energy metabolism and lipid peroxidation of human erythrocytes as a function of increased oxidative stress. **European Journal of Biochemistry**, Oxford, v. 267, p. 684-689, 2000.

TINAHONES, F.J.; MURRI-PIERRI, M.; GARRIDO-SÁNCHEZ, L.; GARCIA-ALMEIDA, J.M.; GARCIA-SERRANO, S.; GARCIA-ARNÉS, J.; GARCIA-FUENTES, E. Oxidative stress in severely obese persons is greater in those with insulin resistance. **Obesity**, Silver Spring, v. 17, p. 240-246, 2008.

TUNGTRONGCHITR, R.; PONGPAEW, P.; PHONRAT, B.; TUNGTRONGCHITR, A. VIROONUDOMPHOL, D.; VUDHIVAI, N.; SCHELP, F.P. Serum copper, zinc, ceruplasmin and superoxide dismutase in Thai overweight and obese. **Journal of the Medical Association of Thailand**, Bangkok, v. 86, n. 6, p. 543-551, 2003.

UYSAL, K.T.; WIESBROCK, S.M.; MARINO, M.W.; HOTAMISLIGIL, G.S. Protection from obesity-induced insulin resistance in mice lacking TNF- α function. **Nature**, London, v. 389, p. 610-614, 1997.

VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; CRONIN, M. T.D.; MAZUR, M.; TELSER, J. Free Radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, New York, v. 39, p. 44-84, 2007.

VIEIRA, Z.E.G. Anestesia e função hepática. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, Rio de Janeiro, v. 24, n. 2, p. 309-325, 1974.

VINCENT, H.K.; TAYLOR, A.G. Biomarkers and potential mechanisms of obesity-induced oxidant stress in humans. **International Journal of Obesity**, London, v. 30, p. 400-418, 2006.

VINCENT, H.K.; INNES, K.E.; VINCENT, K.R. Oxidative stress and potential interventions to reduce oxidative stress in overweight and obesity. **Diabetes, Obesity and Metabolism**, Oxford, v. 9, p. 813-839, 2007.

VINCENT, H.K.; POWERS, S.K.; STEWART, D.J.; SHAMELY, R.A.; DEMIREL, H.; NAITO, H. Obesity is associated with increased myocardial oxidative stress. **International Journal of Obesity**, London, v. 23, p. 67-74, 1999.

WANG, L.; YAMASAKI, M.; KATSUBE, T.; SUN, X.; YAMASAKI, Y.; SHIWAKU, K. Antiobesity effect of polyphenolic compounds from molokheiya (*Corchorus olitorius* L.) leaves in LDL receptor-deficient mice. **European Journal of Nutrition**, Darmstadt, 2010. Disponível em: <http://www.springerlink.com/content/qkw76478181r6944/fulltext.html>. Acesso em: 12 jul. 2010.

WANG, T.; CHEN, L.; WU, W.; LONG, Y.; WANG, R. Potencial cytoprotection: antioxidant defence by caffeic acid phenethyl ester against free radical-induced damage of lipids, DNA, and proteins. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, Ottawa, v. 86, p. 279-287, 2008.

WANNAMETHEE, S.G.; SHAPER, A.G.; LENNON, L.; WHINCUP, P.H. Hepatic enzymes, the metabolic syndrome, and the risk of type 2 diabetes in older men. **Diabetes Care**, New York, v. 28, n. 12, p. 2913-2918, 2005.

WEI, Y.; CHEN, K.; WHALEY-CONNELL, A.T.; STUMP, C.S.; IBDAH, J.A.; SOWERS, J.R. Skeletal muscle insulin resistance: role of inflammatory cytokines and reactive oxygen species. **American Journal of Physiology, Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, Bethesda, v. 294, p. 673-680, 2008.

WEISBERG, S.P.; McCANN, D.; DESAI, M.; ROSENBAUM, M.; LEIBEL, R.L.; FERRANTE Jr, A.W. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. **The Journal of Clinical Investigation**, New Haven, v. 112, n. 12, p. 1796-1808, 2003.

WEST, D.B.; YORK, B. Dietary fat, genetic predisposition, and obesity: lessons from animal models. **The American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 67, suppl, p. 505S-512S, 1998.

WILKES, J.J.; BONEN, A.; BELL, R.C. A modified high-fat diet induces insulin resistance in rat skeletal muscle but not adipocytes. **American Journal of Physiology, Endocrinology and Metabolism**, Bethesda, v. 275, p. 679-686, 1998.

WILLERSON, J.T.; RIDKER, P.M. Inflammation as a cardiovascular risk factor. **Circulation**, Dallas, v. 109, p. II-2-II-10, 2004.

WILLETT, W.C. Is dietary fat a major determinant of body fat? **The American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 67, suppl, p. 556-562, 1998.

WISSE, B.E.; KIM, F.; SCHWARTZ, M.W. An Integrative View of Obesity. **Science**, Washington, v. 318, p. 928-929, 2007.

WU, W.; LU, L.; LONG, Y.; WANG, T.; LIU, L.; CHEN, Q.; WANG, R. Free radical scavenging and antioxidative activities of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) and its related compounds in solution and membranes: A structure-activity insight. **Food Chemistry**, Barking, v. 105, p. 107-115, 2007.

XU, H.; BARNES, G.T.; YANG, Q.; TAN, G.; YANG, D.; CHOU, C.J.; SOLE, J.; NICHOLS, A.; ROSS, J.S.; TARTAGLIA, L.A.; CHEN, H. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. **The Journal of Clinical Investigation**, New Haven, v. 112, n. 12, p. 1821-1830, 2003.

YANG, J.Y.; LEE, S.-J.; PARK, H.-W.; CHA, Y.-S. Effect of genistein with carnitine administration on lipid parameters and obesity in C57BI/6J mice fed a high-fat diet. **Journal of Medicinal Food**, Larchmont, v. 9, n. 4, p. 459-467, 2006.

YILMAZ, H.R.; UZ, E.; YUCEL, N.; ALTUNTAS, I.; OZCELIK, N. Protective effect of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on lipid peroxidation and antioxidant enzymes in diabetic rat liver. **Journal of Biochemistry and Molecular Toxicology**, Hoboken, v. 18, n. 4, p. 234-238, 2004.

YILMAZ, H.R.; SOGUT, S.; OZYURT, B.; OZUGURLU, F.; SAHIN, S.; ISIK, B.; UZ, E.; OZYURT, H. The activities of liver adenosine deaminase, xanthine oxidase, catalase, superoxide dismutase enzymes and levels of malondialdehyde and nitric oxide after cisplatin toxicity in rats: protective effect of caffeic acid phenethyl ester. **Toxicology and Industrial Health**, London, v. 21, p. 67-73, 2005.

YU, B.P. Cellular Defenses Against Damage From Reactive Oxygen Species. **Physiological Reviews**, Bethesda, v. 74, n. 1, p. 139-162, 1994.

APÊNDICES

Tabela 1 - Resumo da análise de variância do peso vivo de camundongos, modelo experimental de obesidade, tratados com CAPE

FV	GL	SQ	QM	F	Pr (>F)	Tratamentos	Médias
Tratamentos	5	566,05	113,21	15,03**	1,83 ⁰⁶ **	Controle Comercial	40,96 c
Resíduo	22	165,75	7,534			Hiperlipídico	53,88 a
Total	27	731,80				Cape 13mg-15dias	51,13 ab
						Cape 13mg-22dias	49,36 b
CV %	5,50					Cape 30mg-15dias	51,17 ab
						Cape 30mg-22dias	54,73 a
* Diferenças significativas a 5% pelo teste F.						Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas na coluna não	
** Diferenças significativas a 1% pelo teste F.						diferem entre si pelo teste de Duncan a 5%.	
^{ns} Diferenças não significativas.							

Tabela 2 - Resumo da análise de variância do peso do fígado de camundongos, modelo experimental de obesidade, tratados com CAPE

FV	GL	SQ	QM	F	Pr (>F)	Tratamentos	Médias
Tratamentos	5	2,82	0,564	2,11 ^{ns}	0,10 ^{ns}	Controle Comercial	1,51 a
Resíduo	22	5,88	0,267			Hiperlipídico	2,11 a
Total	27	8,70				Cape 13mg-15dias	2,19 a
						Cape 13mg-22dias	1,94 a
CV %	24,89					Cape 30mg-15dias	2,36 a
						Cape 30mg-22dias	2,53 a
* Diferenças significativas a 5% pelo teste F.						Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas na coluna não	
** Diferenças significativas a 1% pelo teste F.						diferem entre si pelo teste de Duncan a 5%.	
^{ns} Diferenças não significativas.							

Tabela 3 - Resumo da análise de variância da relação peso fígado / peso vivo de camundongos, modelo experimental de obesidade, tratados com CAPE

FV	GL	SQ	QM	F	Pr (>F)	Tratamentos	Médias
Tratamentos	5	3,43	0,686	0,743 ^{ns}	0,60 ^{ns}	Controle Comercial	3,67 a
Resíduo	22	20,32	0,924			Hiperlipídico	3,91 a
Total	27	23,75				Cape 13mg-15dias	4,32 a
						Cape 13mg-22dias	3,91 a
CV %	23,23					Cape 30mg-15dias	4,57 a
						Cape 30mg-22dias	4,63 a
* Diferenças significativas a 5% pelo teste F.						Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas na coluna não	
** Diferenças significativas a 1% pelo teste F.						diferem entre si pelo teste de Duncan a 5%.	
^{ns} Diferenças não significativas.							

Tabela 4 - Resumo da análise de variância do peso da gordura de camundongos, modelo experimental de obesidade, tratados com CAPE

FV	GL	SQ	QM	F	Pr (>F)	Tratamentos	Médias
Tratamentos	5	7,07	1,41	5,12**	0,003**	Controle Comercial	1,12 d
Resíduo	22	6,078	0,28			Hiperlipídico	2,39 ab
Total	27	13,15				Cape 13mg-15dias	1,67 bcd
						Cape 13mg-22dias	2,45 a
CV %	27,54					Cape 30mg-15dias	2,18 abc
						Cape 30mg-22dias	1,44 cd

* Diferenças significativas a 5% pelo teste F.

** Diferenças significativas a 1% pelo teste F.

^{ns} Diferenças não significativas.

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas na coluna não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5%.

Tabela 5 - Resumo da análise de variância da relação peso gordura / peso vivo de camundongos, modelo experimental de obesidade, tratados com CAPE

FV	GL	SQ	QM	F	Pr (>F)	Tratamentos	Médias
Tratamentos	5	22,20	4,44	3,86*	0,012*	Controle Comercial	2,74 c
Resíduo	22	25,33	1,15			Hiperlipídico	4,43 ab
Total	27	47,53				Cape 13mg-15dias	3,25 bc
						Cape 13mg-22dias	5,05 a
CV %	28,18					Cape 30mg-15dias	4,28 ab
						Cape 30mg-22dias	2,64 c

* Diferenças significativas a 5% pelo teste F.

** Diferenças significativas a 1% pelo teste F.

^{ns} Diferenças não significativas.

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas na coluna não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5%.

Tabela 6 - Resumo da análise de variância da atividade da enzima hepática γ -GT em soro sanguíneo de camundongos, modelo experimental de obesidade, tratados com CAPE

FV	GL	SQ	QM	F	Pr (>F)	Tratamentos	Médias
Tratamentos	5	1432,66	286,53	1,97 ^{ns}	0,12 ^{ns}	Controle Comercial	43,83 a
Resíduo	22	3200,62	145,48			Hiperlipídico	59,58 a
Total	27	4633,29				Cape 13mg-15dias	60,97 a
						Cape 13mg-22dias	61,30 a
CV %	22,28					Cape 30mg-15dias	48,29 a
						Cape 30mg-22dias	48,58 a

* Diferenças significativas a 5% pelo teste F.

** Diferenças significativas a 1% pelo teste F.

^{ns} Diferenças não significativas.

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas na coluna não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5%.

Tabela 7 - Resumo da análise de variância da concentração de MDA em tecido hepático de camundongos, modelo experimental de obesidade, tratados com CAPE

FV	GL	SQ	QM	F	Pr (>F)	Tratamentos	Médias
Tratamentos	6	2094,23	349,04	12,71**	2,72 ⁻⁷ **	AIN 93	9,17 c
Resíduo	32	879,11	27,47			Controle Comercial	31,68 a
Total	38	2973,34				Hiperlipídico	18,25 b
						Cape 13mg-15dias	16,99 b
CV %	6,71					Cape 13mg-22dias	8,15 c
						Cape 30mg-15dias	19,97 b
						Cape 30mg-22dias	17,39 b
* Diferenças significativas a 5% pelo teste F.						Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas na coluna não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5%.	
** Diferenças significativas a 1% pelo teste F.							
^{ns} Diferenças não significativas.							

Tabela 8 - Resumo da análise de variância da concentração de H₂O₂ em tecido hepático de camundongos, modelo experimental de obesidade, tratados com CAPE

FV	GL	SQ	QM	F	Pr (>F)	Tratamentos	Médias
Tratamentos	6	1,93	0,322	6,86**	7,86 ⁻³ **	AIN 93	1,04 d
Resíduo	34	1,59	0,047			Controle Comercial	1,43 ab
Total	40	3,53				Hiperlipídico	1,58 ab
						Cape 13mg-15dias	1,34 bc
CV %	15,55					Cape 13mg-22dias	1,11 cd
						Cape 30mg-15dias	1,67 a
						Cape 30mg-22dias	1,54 ab
* Diferenças significativas a 5% pelo teste F.						Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas na coluna não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5%.	
** Diferenças significativas a 1% pelo teste F.							
^{ns} Diferenças não significativas.							

Tabela 9 - Resumo da análise de variância da atividade da enzima antioxidante SOD em tecido hepático de camundongos, modelo experimental de obesidade, tratados com CAPE

FV	GL	SQ	QM	F	Pr (>F)	Tratamentos	Médias
Tratamentos	6	31352,0	5225,30	32,77**	9,30 ⁻¹³ **	AIN 93	64,99 b
Resíduo	34	5421,3	159,50			Controle Comercial	106,07 a
Total	40	36773,3				Hiperlipídico	115,88 a
						Cape 13mg-15dias	63,10 b
CV %	17,53					Cape 13mg-22dias	52,58 b
						Cape 30mg-15dias	31,58 c
						Cape 30mg-22dias	68,42 b
* Diferenças significativas a 5% pelo teste F.						Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas na coluna não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5%.	
** Diferenças significativas a 1% pelo teste F.							
^{ns} Diferenças não significativas.							

Tabela 10 - Resumo da análise de variância da atividade da enzima antioxidante CAT em tecido hepático de camundongos, modelo experimental de obesidade, tratados com CAPE

FV	GL	SQ	QM	F	Pr (>F)	Tratamentos	Médias
Tratamentos	6	26703,90	4450,60	17,44**	1,41 ⁻⁸ **	AIN 93	203,15 a
Resíduo	30	7654,60	255,20			Controle Comercial	154,94 b
Total	36	34358,5				Hiperlipídico	215,60 a
						Cape 13mg-15dias	152,37 b
CV %	9,34					Cape 13mg-22dias	146,18 b
						Cape 30mg-15dias	154,67 b
						Cape 30mg-22dias	153,91 b
* Diferenças significativas a 5% pelo teste F.						Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas na coluna	
** Diferenças significativas a 1% pelo teste F.						não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5%.	
^{ns} Diferenças não significativas.							

Tabela 11 - Resumo da análise de variância da atividade da enzima antioxidante GSH-Px em tecido hepático de camundongos, modelo experimental de obesidade, tratados com CAPE

FV	GL	SQ	QM	F	Pr (>F)	Tratamentos	Médias
Tratamentos	6	23,84	3,97	3,39*	0,10*	AIN_93	7,20 bc
Resíduo	34	39,90	1,17			Controle Comercial	6,32 c
Total	40	87,57				Hiperlipídico	8,82 a
						Cape13mg-15dias	6,79 bc
CV %	14,66					Cape13mg-22dias	7,07 bc
						Cape30mg-15dias	7,74 abc
						Cape30mg-22dias	7,83 ab
* Diferenças significativas a 5% pelo teste F.						Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas na coluna não	
** Diferenças significativas a 1% pelo teste F.						diferem entre si pelo teste de Duncan a 5%.	
^{ns} Diferenças não significativas.							

Tabela 12 - Resumo da análise de variância da atividade da enzima antioxidante GR em tecido hepático de camundongos, modelo experimental de obesidade, tratados com CAPE

FV	GL	SQ	QM	F	Pr (>F)	Tratamentos	Médias
Tratamentos	6	0,668	0,111	16,22**	1,03 ⁻⁸ **	AIN_93	0,410 d
Resíduo	34	0,233	0,007			Controle Comercial	0,679 bc
Total	40	0,901				Hiperlipídico	0,810 a
						Cape13mg-15dias	0,788 a
CV %	12,33					Cape13mg-22dias	0,605 c
						Cape30mg-15dias	0,762 ab
						Cape30mg-22dias	0,668 bc
* Diferenças significativas a 5% pelo teste F.						Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas na coluna não	
** Diferenças significativas a 1% pelo teste F.						diferem entre si pelo teste de Duncan a 5%.	
^{ns} Diferenças não significativas.							

Tabela 13 - Resumo da análise de variância da concentração de H₂O₂ em tecido adiposo de camundongos, modelo experimental de obesidade, tratados com CAPE

FV	GL	SQ	QM	F	Pr (>F)	Tratamentos	Médias
Tratamentos	6	0,017	0,0030	3,36*	0,011*	AIN 93	0,136 ab
Resíduo	33	0,027	0,0003			Controle Comercial	0,160 a
Total	39	0,044				Hiperlipídico	0,102 b
						Cape 13mg-15dias	0,106 b
CV %	23,62					Cape 13mg-22dias	0,132 ab
						Cape 30mg-15dias	0,130 ab
						Cape 30mg-22dias	0,097 b
* Diferenças significativas a 5% pelo teste F.						Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas na coluna não	
** Diferenças significativas a 1% pelo teste F.						diferem entre si pelo teste de Duncan a 5%.	
ns Diferenças não significativas.							

Tabela 14 - Resumo da análise de variância da atividade da enzima antioxidante CAT em tecido adiposo de camundongos, modelo experimental de obesidade, tratados com CAPE

FV	GL	SQ	QM	F	Pr (>F)	Tratamentos	Médias
Tratamentos	6	4817,90	802,99	10,33**	1,41 ⁻⁶ **	AIN 93	83,60 a
Resíduo	35	2721,80	77,77			Controle Comercial	60,08 bc
Total	41	7539,70				Hiperlipídico	54,44 bc
						Cape 13mg-15dias	53,05 bc
CV %	14,67					Cape 13mg-22dias	56,36 bc
						Cape 30mg-15dias	48,53 c
						Cape 30mg-22dias	64,69 b
* Diferenças significativas a 5% pelo teste F.						Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas na coluna	
** Diferenças significativas a 1% pelo teste F.						não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5%.	
ns Diferenças não significativas.							

Tabela 15 - Resumo da análise de variância da atividade da enzima antioxidante GSH-Px em tecido adiposo de camundongos, modelo experimental de obesidade, tratados com CAPE

FV	GL	SQ	QM	F	Pr (>F)	Tratamentos	Médias
Tratamentos	6	15895,00	2649,16	22,48**	1,15 ⁻¹⁰ **	AIN 93	76,94 a
Resíduo	35	4125,10	117,86			Controle Comercial	20,95 d
Total	41	20020,10				Hiperlipídico	18,85 d
						Cape 13mg-15dias	33,22 c
CV %	3,35					Cape 13mg-22dias	45,40 b
						Cape 30mg-15dias	50,17 b
						Cape 30mg-22dias	59,67 ab
* Diferenças significativas a 5% pelo teste F.						Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas na coluna	
** Diferenças significativas a 1% pelo teste F.						não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5%.	
ns Diferenças não significativas.							

Tabela 16 - Resumo da análise de variância da atividade da enzima antioxidante GR em tecido adiposo de camundongos, modelo experimental de obesidade, tratados com CAPE

FV	GL	SQ	QM	F	Pr (>F)	Tratamentos	Médias
Tratamentos	6	5,27	0,878	5,08 **	8 ⁻⁴ **	AIN 93	1,41 b
Resíduo	34	5,87	0,173			Controle Comercial	1,87 ab
Total	40	11,14				Hiperlipídico	2,26 a
						Cape 13mg-15dias	1,60 b
CV %	21,17					Cape 13mg-22dias	1,86 ab
						Cape 30mg-15dias	2,34 a
						Cape 30mg-22dias	2,39 a

* Diferenças significativas a 5% pelo teste F.

** Diferenças significativas a 1% pelo teste F.

^{ns} Diferenças não significativas.

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas na coluna não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5%.