UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos

Área de Bromatologia

Efeito dos compostos fenólicos do fruto camu-camu (*Myrciaria dubia*
(H. B. K.) Mc Vaugh) na doença hepática gordurosa não-alcoólica
(DHGNA) em camundongos

Luana Jorge de Sousa

São Paulo

2016

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos

Área de Bromatologia

Efeito dos compostos fenólicos do fruto camu-camu (*Myrciaria dubia*
(H. B. K.) Mc Vaugh) na doença hepática gordurosa não alcoólica
(DHGNA) em camundongos

Luana Jorge de Sousa

Versão Original

Dissertação para obtenção do título de **MESTRE**

Orientador: Prof. Dr. Maria Inés Genovese

São Paulo

2016

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Sousa, Luana Jorge de
S725e Efeito dos compostos fenólicos do fruto camu-camu (*Myrciaria dubia* (H. B. K.) Mc Vaugh) na doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) em camundongos / Luana Jorge de Sousa. -- São Paulo, 2016.
67p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental .

Orientador: Genovese, Maria Inés

1. Alimentos : Compostos fenólicos : Ciência dos alimentos
2. Fígado gorduroso I. T. II. Genovese, Maria Inés, orientador.

641 CDD

LUANA JORGE DE SOUSA

**Efeito dos compostos fenólicos do fruto camu-camu (*Myrciaria dubia*
(H. B. K.) Mc Vaugh) na doença hepática gordurosa não alcoólica
(DHGNA) em camundongos**

Comissão Julgadora da
Dissertação para obtenção do Título de Mestre

Prof. Dr. Maria Inés Genovese
Presidente

1º examinador

2º examinador

3º examinador

São Paulo, _____ de _____ de 2016

Este trabalho é dedicado aos meus pais A. Luis e Maria,
e aos meus irmãos Jorge, André e Léo.

AGRADECIMENTOS

Ao meu pai Antônio Luis, o amante da natureza, pela educação que me deu, a qual serei eternamente grata. O homem em quem me espelho por ser persistente e nunca desistir, mesmo com as dificuldades que a vida lhe impôs por diversas vezes. Enfim, por me ensinar que na vida devemos sorrir sempre e que tudo deve ser feito com paciência e dedicação. Não tenho palavras para descrever a pessoa incrível que ele representa para mim, apenas me alegra saber que tenho o melhor pai do mundo e me orgulho disto.

A minha mãe Maria, por me incentivar a estudar e sempre cuidar de mim com muito amor e afinho. Pelas conversas, pelas broncas e conselhos construtivos que foram fundamentais para que eu pudesse enxergar a vida de uma forma realista, me preparando para todos os obstáculos que aparecessem. Por me ensinar, desde criança, a amar a cultura de nosso país, nas pausas nos estudos, nos cafés da manhã e da tarde regados ao som do rei do baião Luiz Gonzaga. Querida mãe, um cheiro!

Ao “trio virgulino” representado pelos meus queridos irmãos Jorge, André e Léo, por me proporcionarem – eu, uma menina no meio de três ‘marmanjos’ – momentos maravilhosos de risadas incansáveis, destas de darem câimbra na barriga, amenizando o estresse do dia a dia.

Ao meu amado Igor Thomaz, meu companheiro de sempre, pelo incentivo e, principalmente, pela paciência e amor que dedicou a mim nesta jornada. À minha sogra e segunda mãe Astkhig, pelo carinho e pelos abraços de acalanto.

A minha orientadora Prof^a Maria Inés Genovese por me aceitar em seu laboratório e me dar a chance de desenvolver este trabalho. Também agradeço ao Prof^o Bruno Cogliati e toda sua equipe pela paciência e pelo auxílio, fundamentais para a realização deste projeto.

A todos os meus colegas de trabalho Alice, Carlos, Daniel, Flávia, Gabriela Cunha, Gabriela Lima, Helena, Heloísa, Marcela, Márcio, Renata, Rosa e Tatyane, principalmente aqueles que sempre estiveram mais próximos a mim, pela amizade e carinho. Só tenho a agradecer.

À Fundação de Amparo à Pesquisa (Fapesp) (processo nº 2014/14625-5) pela concessão da bolsa de estudos e apoio financeiro, essencial para o desenvolvimento deste projeto.

Meus sinceros agradecimentos.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Regulação da síntese de novo de ácidos graxos através da SRBP-1c e ChREBP. Em condições de aumento de glicose, a ChERBP é fosforilada pela PP2A, facilitando sua entrada no núcleo para formar um dímero com o ChORE (Elemento de Resposta ao Carboidrato), resultando na transcrição de enzimas glicolíticas e lipolíticas, incluindo a L-PK, ACC (acetil-CoA carboxilase), SCD1 (estearoil-CoA dessaturase) e Elovl6. Ao mesmo tempo, a glicemia elevada estimula a secreção de insulina no pâncreas, que ativa a AKT e a mTOC1, aumentando a transcrição e a clivagem da SRBP-1c. A SRBP-1c ativada entra no núcleo e promove a transcrição de GK (glicoquinase), ACC, FAS (ácido graxo sintase), SCD1 e Elovl6. Adaptado de James M. Ntambi (2016).....20
- Figura 2.** Relações fisiológicas entre o metabolismo de ácidos graxos, resistência à insulina, dislipidemia e aumento do conteúdo intra-hepático de TAG na doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA). Além da síntese *de novo* de ácidos graxos, a liberação de ácidos graxos livres (AGL) a partir do tecido adiposo para o fígado é aumentada em indivíduos obesos com DHGNA, resultando em maior acúmulo de TAG intra-hepático. Adaptado de Fabrini et al. (2010).....21
- Figura 3.** Dano celular causado pela inflamação na DHGNA. A resistência à insulina aumenta a captação de ácidos graxos pelos hepatócitos, resultando em acúmulo de TAG e desenvolvimento de esteatose (setas verdes). A via da β -oxidação mitocondrial e peroxissomal fica hiperativada para liberar o excesso de ácidos graxos (setas laranjas). Quando ativadas, as vias catabolizantes geram um *loop* de estresse oxidativo, induzindo à morte celular e à liberação de moléculas associadas ao dano celular (setas vermelhas). (Disponível em <http://www.liebertpub.com/ars>).....22
- Figura 4.** Interação entre dieta, microbiota intestinal e fígado na doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA). Adaptado (YU et al., 2016).....22
- Figura 5.** Frutos de camu-camu (Fonte: <http://www.amazonorigins.com/camu-fruit>).....27
- Figura 6.** Ingestão alimentar. Ingestão de ração (g/animal/dia) e energia (kcal/animal/dia) (A), ingestão de lipídios (mg/animal/dia) (B) e eficiência alimentar* (C) de camundongos C57BL/6 alimentados com dieta HFS e água (grupo HFHS) ou extratos fenólicos de camu-camu por gavagem em concentrações diferentes (CCEF 1 e CCEF 2). Valores expressos como média $\pm$ DP (n=9-10/grupo). *Calculado como: [ganho de massa corporal (g)/ingestão energética (kcal)] $\times$ 100. ^{A,B,C} Letras maiúsculas diferentes sobre as colunas indicam diferença estatística ($p<0,05$). ^{a,b,c} Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística ($p<0,05$).....41

Figura 7. Composição corporal. Ganho de peso corporal (g) durante 8 semanas (A), ganho de peso (%) (B), tecido adiposo epididimal (%) (C), tecido adiposo inguinal (%) (D) e tecido adiposo retroperitoneal (%) (E) de camundongos C57BL/6 alimentados com dieta HFS e água (grupo HFHS) ou extratos fenólicos de camu-camu por gavagem em concentrações diferentes (CCEF 1 e CCEF 2). Valores expressos como média $\pm$ DP (n=9-10/grupo). ^{a,b,c} Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística ($p<0,05$). # ($p<0,05$) HFHS *versus* CCEF 1e CCEF 2.....43

Figura 8. Metabolismo da glicose. Glicemia inicial e final (A), teste intraperitoneal de tolerância à glicose (ipGTT) e área sob a curva (AUC) (B), insulina e HOMA-IR* (C) de camundongos C57BL/6 alimentados com dieta HFS e água (grupo HFHS) ou extratos fenólicos de camu-camu por gavagem em concentrações diferentes (CCEF 1 e CCEF 2). Valores expressos como média $\pm$ DP (n=9-10/grupo). *Calculado como: $\text{HOMA/IR} = (\text{insulina} \times \text{glicose})/22,5$. ^{A,B,C} Letras maiúsculas diferentes sobre as colunas indicam diferença estatística ($p<0,05$). ^{a,b,c} Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística ($p<0,05$). # ($p<0,05$) HFHS *versus* CCEF 1e CCEF 2.....45

Figura 9. Glicogênio hepático. Coloração em P.A.S do tecido hepático (A), quantificação de glicogênio hepático (μmol de glicose/g de tecido hepático) (B) de camundongos C57BL/6 alimentados com dieta padrão (Ct) ou dieta HFS e água (grupo HFHS) ou extratos fenólicos de camu-camu por gavagem em concentrações diferentes (CCEF 1 e CCEF 2). Valores expressos como média $\pm$ DP (n= 7-8/grupo). ^{a,b,c} Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística ($p<0,05$).....47

Figura 10. Metabolismo de lipídios plasmáticos. Triacilglicerol (mg/dL) (A), Colesterol total (mg/dL) (B), LDL-c (mg/dL) (C), HDL-c (mg/dL) (D), VLDL (mg/dL) (E) de camundongos C57BL/6 alimentados com dieta HFS e água (grupo HFHS) ou extratos fenólicos de camu-camu por gavagem em concentrações diferentes (CCEF 1 e CCEF 2). Valores expressos como média $\pm$ DP (n=9-10/grupo). ^{a,b,c} Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística ($p<0,05$).....49

Figura 11. Atividade das enzimas hepáticas aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT). Aspartato aminotransferase (AST) (U/L) (A) e alanina aminotransferase (ALT) (U/L) (B) de camundongos C57BL/6 alimentados com dieta HFS e água (grupo HFHS) ou extratos fenólicos de camu-camu por gavagem em concentrações diferentes (CCEF 1 e CCEF 2). Valores expressos como média $\pm$ DP (n=5/grupo). ^{a,b,c} Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística ($p<0,05$).....50

Figura 12. Alterações hepáticas. Peso absoluto (A) e relativo (B) do fígado e conteúdo de triacilglicerol (TAG) intra-hepático e histopatologia em Oil Red (C) de camundongos C57BL/6 alimentados com dieta HFS e água (grupo HFHS) ou extratos fenólicos de camu-camu por gavagem em concentrações diferentes (CCEF 1 e CCEF 2). Valores expressos como média $\pm$ DP (n=5/grupo). ^{a,b,c} Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística ($p<0,05$).....54

Figura 13. Biomarcadores de inflamação hepática. Proteína – C Reativa (mg/dL) (A) e PGE₂ (pg/mL) (B) no fígado de camundongos C57BL/6 alimentados com dieta HFS e água (grupo HFHS) ou extratos fenólicos de camu-camu por gavagem em concentrações diferentes (CCEF 1 e CCEF 2). Valores expressos como média $\pm$ DP (n=5/grupo). ^{a,b,c} Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística ($p<0,05$).....55

LISTA DE TABELA

Tabela 1. Caracterização química do extrato fenólico do camu-camu (CCEF) obtido por EFS em coluna C18.....	37
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS

%: por cento	OMS: organização mundial da saúde
h: horas	COX: ciclooxigenase
min: minutos	AGL: ácido graxo livre
®: registrado	TNF- α : fator de necrose tumoral-alfa
$\pm$: mais ou menos	SGLT1: transportador de glicose dependente de sódio
°C: grau Celsius	ChoRE: elemento de resposta ao carboidrato
g: aceleração gravitacional	ACC: acetil-CoA carboxilase
μ : micro	SCD1: estearoil-CoA dessaturase
μ L: microlitro	GK: glicoquinase
mg: miligrama	SRBP1-C: Proteína de ligação ao Elemento Regulador de Esterol 1-c
g: grama	Vigitel: Vigilância de fatores de risco e proteção para
mL: mililitro	doenças crônicas por Inquérito Telefônico
nM: nanomol	ChREBP: proteína de ligação ao elemento responsivo de carboidratos
μ M: micromol	DHGNA: doença hepática gordurosa não alcoólica
mM: milimol	ApoB: apolipoproteína B
M: molar	EGCG: epigallocatequina-3-galato
PA: poliamida	AEL: ácido elágico livre
C18: C18	AET: ácido elágico total
CLAE: cromatografia líquida de alta eficiência	ECG: epigallocatequina
ipGTT: teste intraperitoneal de tolerância à glicose	AUC: área sob a curva
CF: compostos fenólicos	OLETF: Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty
CCEF: camu-camu extrato fenólico	LDL: lipoproteína de baixa densidade
EAG: equivalente de ácido gálico	HDL: lipoproteína de alta densidade
DMAC: 4-dimetilaminocinamaldeído	AG: ácidos graxos
DAD: detector de arranjo de diodos	SM: síndrome metabólica
EC: equivalente de cianidina	
EPC: equivalente de procianidina B2	
EH: esteatose hepática	

IMC: índice de massa corporal

PCR: proteínas – C reativa

TAG: triacilglicerol

AST: aspartato aminotransferase

ALT: alanina aminotransferase

PGE₂: prostaglandina E₂

H&E : hematoxilina & eosina

DCNT: doenças crônicas não transmissíveis

P.A.S.: ácido periódico-Schiff

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	16
1.1 Obesidade associada à doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA).....	17
1.2 DHGNA e inflamação.....	21
1.3 O impacto da dieta na DHGNA.....	23
1.4 Compostos fenólicos e DHGNA.....	25
1.5 Camu-camu: um fruto brasileiro rico em compostos fenólicos.....	26
1.6 Justificativa.....	28
2. OBJETIVOS.....	29
2.1 Objetivo geral.....	29
2.2 Objetivos específicos.....	29
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	30
3.1 Materiais.....	30
3.2 Métodos.....	30
3.2.1 <i>Extração e purificação de compostos fenólicos.....</i>	<i>30</i>
3.2.2 <i>Quantificação de compostos fenólicos.....</i>	<i>30</i>
3.2.3 <i>Quantificação de proantocianidinas pelo método butanol acidificado.....</i>	<i>31</i>
3.2.4 <i>Quantificação de proantocianidinas pelo método DMAC.....</i>	<i>31</i>
3.2.5 <i>Ácido elágico total por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a detector com arranjo de diodos (CLAE-DAD).....</i>	<i>32</i>
3.2.6 <i>Flavonoides e ácido elágico livre por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a detector com arranjo de diodos (CLAE-DAD).....</i>	<i>32</i>
3.2.7 <i>Avaliação do efeito dos extratos ricos em compostos fenólicos do camu-camu em camundongos alimentados com dieta rica em lipídios e sacarose.....</i>	<i>33</i>
3.2.7.1 <i>Ingestão alimentar, peso corporal e glicemia.....</i>	<i>34</i>
3.2.7.2 <i>Teste intraperitoneal de tolerância à glicose (ipGTT)</i>	<i>34</i>
3.2.7.3 <i>Coleta de tecidos e soro.....</i>	<i>34</i>

3.2.7.4 Perfil bioquímico.....	35
3.2.7.5 Conteúdo de triacilglicerol intra-hepático.....	35
3.2.7.6 Conteúdo de glicogênio intra-hepático.....	35
3.2.7.7 Determinação da concentração de PGE_2 no tecido hepático.....	36
3.2.7.8 Histopatologia.....	36
3.2.7.9 Análise estatística.....	36
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	38
4.1. Caracterização química do extrato fenólico de camu-camu (CCEF).....	38
4.2 Efeitos <i>in vivo</i> da administração dos extratos fenólicos do camu-camu (CCEF).....	40
4.2.1 Ingestão alimentar e composição corporal.....	41
4.2.2 Metabolismo da glicose.....	44
4.2.3. Metabolismo lipídico.....	48
4.2.4. Função hepática.....	50
5. CONCLUSÃO.....	56
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	57
7. ANEXO	

RESUMO

SOUSA, L.J. Efeito dos compostos fenólicos do fruto camu-camu (*Myrciaria dubia* H. B. K. Mc Vaugh) na doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) em camundongos. (Dissertação de mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo, 2016.

A incidência da obesidade tomou proporções epidêmicas nos últimos anos, atingindo bilhões de indivíduos mundialmente. A DHGNA é uma manifestação hepática das alterações metabólicas causadas pela obesidade e os casos desta doença vêm crescendo cada vez mais. Alternativas capazes de reduzir estas alterações são fundamentais para minimizar o impacto na qualidade de vida da população e na economia do país. Diversos estudos têm mostrado que os compostos bioativos de alimentos possuem efeitos benéficos à saúde. O camu-camu (*Myrciaria dubia* (H. B. K). Mc Vaugh) é um fruto nativo da região amazônica com potencial agroeconômico ainda inexplorado, que contém um grande número de compostos fitoquímicos que podem atuar sobre o metabolismo corporal. Desta forma, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito dos compostos fenólicos do camu-camu no desenvolvimento da DHGNA em camundongos C57BL/6 que receberam dieta rica em lipídios e sacarose (HFS). O extrato rico em compostos fenólicos da polpa comercial deste fruto foi obtido através de extração em fase sólida e caracterizado por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE/DAD). Os extratos obtidos foram testados em doses de 7 mg e de 14 mg equivalentes de ácido gálico/Kg de peso corporal. Foram investigados os efeitos destes compostos sobre as homeostases glicídica e lipídica através de análises séricas, testes de tolerância à insulina e à glicose e conteúdo de glicogênio e triacilglicerol intra-hepático. O extrato do camu-camu apresentou flavonóis, ácido elágico e elagitaninos em sua composição. A suplementação com extrato fenólico de camu-camu diminuiu a intolerância à glicose, independente da dose administrada, e melhorou a sensibilidade à insulina e regulou o conteúdo de glicogênio intra-hepático na maior dose. Não foi observado efeito sobre os lipídios plasmáticos. Entretanto, nota-se que houve uma melhora na função hepática em decorrência da redução da atividade da alanina aminotransferase (ALT), indicadora de dano celular, independente da dose. Além disso, a suplementação com extratos fenólicos do camu-camu na maior dose reduziu o conteúdo de triacilglicerol intra-hepático ($p = 0,0001$) e de biomarcadores inflamatórios, como Proteína – C Reativa (PCR) ($p = 0,0359$) e prostaglandina E_2 (PGE_2) ($p = 0,004$). Estes efeitos foram associados, principalmente, à menor ingestão alimentar. Portanto, neste estudo, os compostos fenólicos do camu-camu foram eficientes em prevenir a progressão da DHGNA em camundongos alimentados com dieta HFS.

Palavras-chave: camu-camu, compostos fenólicos, esteatose, DHGNA, dislipidemia.

ABSTRACT

SOUSA, L.J. **Effect of camu-camu fruit phenolic compounds (*Myrciaria dubia* H. B. K. Mc Vaugh) on nonalcoholic fatty liver disease. (NAFLD) in mice.** (Dissertação de mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo, 2016.

Obesity has reached epidemic proportions in recent years, affecting billions of people worldwide. Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) is a hepatic disorder induced by the metabolic changes caused by obesity and its incidence has been growing increasingly. Alternatives designed to reduce such changes are crucial to minimize their impact on the population's quality of life and countries economy. Several studies have shown that food bioactive compounds have beneficial effects on health. Camu-camu (*Myrciaria dubia* (H. B. K.) Mc Vaugh) is a native fruit from Amazonian, with unexplored agro-economic potential, which contains a large number of phytochemical compounds that can act on body metabolism. Therefore, this study was designed to assess the effect of the phenolic compounds of camu-camu in the development of NAFLD in C57BL/6 mice fed with a lipid and saccharose-rich diet (HFS). The phenolic compound-rich extract was obtained from the commercial pulp of this fruit using solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography with diode array detector (HPLC/DAD). The resulting extracts were tested at 7 mg and 14 mg gallic acid equivalents/kg body weight. The effects of these compounds on glucose and lipid homeostasis were investigated by serum analyses, insulin and glucose tolerance tests and intrahepatic content of glycogen and triacylglycerol. Camu-camu extract presented flavonols, ellagic acid and ellagitannins in its composition. Supplementation with camu-camu phenolic extract decreased glucose intolerance, regardless the dose, improved insulin sensitivity and normalized the intra-hepatic glycogen content at the highest dose. No effects on plasma lipid were found. However, an improvement in liver function due to the decrease in alanine aminotransferase (ALT) was observed, suggestive of cell damage, regardless the dose. Moreover, the supplementation with phenolic extracts of camu-camu at the highest dose decreased the intrahepatic content of triacylglycerol ($p = 0.0001$) and inflammatory biomarkers, such as C-reactive protein (CRP) ($p = 0.0359$) and prostaglandin E₂ (PGE₂) ($p = 0.004$). Such effects were primarily associated with lower food intake. Therefore, in this study, the phenolic compounds of camu-camu have shown to be effective in preventing the progression of NAFLD in mice fed with HFS (high-fat/sucrose) diet.

Key words: camu-camu, phenolic compounds, steatosis, NAFLD, dyslipidemia.

1. INTRODUÇÃO

A Organização Mundial da Saúde (OMS) define a etiologia da obesidade como uma complicação multifatorial crônica caracterizada como aumento excessivo de gordura corporal. O índice de massa corporal (IMC) é comumente utilizado na prática clínica para avaliar o excesso de gordura corporal, assim indivíduos com IMC igual ou superior a 25 são classificados com sobrepeso e aqueles com IMC maior que 30, com obesidade (OMS, 2015). Estes indivíduos possuem maior propensão a desenvolver doenças crônicas não transmissíveis (DCNTs), porém, apenas o IMC não é um indicador suficiente para mensurar a gravidade das complicações causadas pela obesidade (BRASIL, 2013). Acredita-se que a causa mais comum da obesidade é o desequilíbrio do balanço energético, decorrente da combinação de uma alimentação hiperenergética, sedentarismo e susceptibilidade genética (KUSHNER, 2007; FLEMING et al., 2014).

A OMS relatou que a maioria da população mundial vive em países onde o sobrepeso e a obesidade matam mais indivíduos que o baixo peso. Em 2014, cerca de 1,9 bilhões de adultos apresentavam sobrepeso e ao menos 600 milhões estavam obesos, apontando que a prevalência mundial de obesidade mais que duplicou entre os anos de 1980 e 2014 (OMS, 2015). Tendo em vista estes dados, as projeções para os próximos anos são alarmantes, pois indicam que em 2030 cerca de 3,3 bilhões de indivíduos adultos apresentarão sobrepeso ou obesidade – o que corresponde a 57,8% da população mundial (KELLY et al., 2008).

Recentemente, a Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico (Vigitel) de 2014 (BRASIL, 2015) demonstrou que, pela primeira vez, o percentual de indivíduos que estão acima do peso ideal ultrapassou mais da metade da população brasileira (52,5%) – indicando um aumento de 23% desde a última pesquisa, em 2006 – e atingiu aproximadamente 18% de indivíduos com obesidade. Além disso, o excesso de peso foi observado em 58,9% das crianças entre 0 e 8 anos e se mostrou inversamente proporcional à escolaridade. Os casos de sobrepeso e obesidade na infância têm sido mais do que 30% superiores em países considerados emergentes em relação aos desenvolvidos (OMS, 2015).

Com o aumento da prevalência da obesidade, identificou-se a associação entre o acúmulo de tecido adiposo visceral e diversas alterações de origem metabólica, como o depósito de lipídios nos tecidos periféricos (DAY; TEIXEIRA, 2007; ELOBEID;

ALLISSON, 2013). A síndrome metabólica é responsável pela relação entre os fatores que aumentam diretamente o risco de doenças cardiovasculares e diabetes tipo 2, como obesidade, dislipidemia, hipertensão arterial sistêmica (HAS) e resistência à insulina, impactando na qualidade de vida e longevidade da população (KOPELMAN, 2000; BRASIL, 2006; KAUR, 2014).

A obesidade se tornou, sem dúvida alguma, um problema de saúde pública em todo o mundo, principalmente em países emergentes (ELOBEID; ALLISSON, 2008; WHO, 2013). Esta doença representa um desafio importante para a saúde. Estima-se que o custo médio relacionado ao tratamento de doenças associadas à obesidade no Brasil seja de aproximadamente R\$ 2,4 bilhões ao ano (BAHIA; ARAÚJO, 2012).

Em contrapartida, estudos têm demonstrado uma correlação inversa entre a ingestão de frutas, legumes e verduras e a ocorrência de DCNT (BOHN, 2014; LIU et al., 2014; VON RUESTEN et al., 2013). As frutas, legumes e verduras fornecem compostos bioativos como fibras, vitaminas, minerais, carotenoides e compostos fenólicos que promovem benefícios à saúde e reduzem o risco de desenvolvimento dessas doenças (SLAVIN; LLOYD, 2012; TORRES-FUENTES et al., 2014). Entre estes diferentes compostos bioativos presentes nos vegetais, os compostos fenólicos destacam-se por suas propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e mais recentemente por seus efeitos sobre a sinalização celular, a expressão gênica e a microbiota intestinal, mecanismos importantes na prevenção do desenvolvimento da obesidade (ANHÊ et al. 2013, GARCÍA-CONESA, 2015; HANHINEVA et al., 2010; MEYDANI; HASSAN, 2010; XIAO; HÖGGER, 2015; WILLIAMSON, 2013).

1.1 Obesidade associada à doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA)

A obesidade é uma doença multifatorial e está associada a diversas anormalidades metabólicas no fígado, conduzindo a um risco elevado de desenvolver doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) (MARCHESINI et al., 2003; ADAM et al., 2005). Esta doença é considerada uma manifestação hepática da síndrome metabólica, que é um conjunto de condições complexas, incluindo obesidade central, hipertensão, hiperglicemia, hipertrigliceridemia e baixo HDL (lipoproteína de alta densidade), que colaboram para a ocorrência de doenças cardiovasculares (BELLENTANI; MARINO, 2009; DUMAS et al., 2014).

O aumento da incidência da obesidade e da síndrome metabólica favoreceu o surgimento de doenças que acometem o fígado, especialmente em países desenvolvidos (MÉNDEZ-SÁNCHEZ; ARRESE; ZAMORA-VALDÉS, 2007; RHEM et al., 2010; YOUNOSSI et al., 2011). Estima-se que a DHGNA afete cerca de 30% da população mundial. Este percentual cresce substancialmente em indivíduos obesos, chegando a aproximadamente 70% (SANYAL, 2002; CLARK, 2003; WILLIAMS et al., 2011). Segundo a Sociedade Brasileira de Hepatologia (2012), a esteatose hepática está presente em 20% da população geral e na maioria dos casos está associada ao diabetes. Um estudo previamente realizado com 1.280 pacientes assintomáticos revelou que 53,3% apresentavam DHGNA e que 36% destes foram classificados na fase inicial e 15% na fase avançada da doença (COTRIM, 2011). A relevância clínica da DHGNA está relacionada à sua potencial progressão, que representa um espectro que vai desde a esteatose, sem a presença de inflamação, ou até mesmo à esteatohepatite, que pode evoluir para um quadro irreversível de fibrose, cirrose ou hepatocarcinoma (MÁRQUEZ, 2008; DOWMAN et al., 2009).

No final dos anos 90, Day e James propuseram a DHGNA como uma condição patológica com um processo de 2- *hits*. Fundamentalmente, o *primeiro hit* é o desenvolvimento da esteatose através do acúmulo de TAG nos hepatócitos, o que aumenta a suscetibilidade do fígado a desencadear o *segundo hit*, em decorrência da lesão celular por meio da peroxidação lipídica, conduzindo à inflamação, fibrose e morte celular, característicos da esteatohepatite. O *segundo hit* pode estar relacionado a diversos fatores, tais como o estresse oxidativo e do retículo endoplasmático e citocinas pró-inflamatórias. Ainda não está elucidado se a inflamação pode proceder ao acúmulo de TAG, porém, acredita-se que os fatores para os *hits* podem atuar simultaneamente, interagindo entre si e favorecendo o desenvolvimento de DHGNA. Este é o conceito que sustenta o atual modelo de *múltiplos hits* (TILG, MOSCHEN; TINIAKOS, 2010; DEMIR et al., 2015).

A fisiopatologia da DHGNA é complexa. Sabe-se que a esteatose hepática é uma de suas funções características e ocorre quando a taxa de absorção intra-hepática de ácidos graxos, a partir do plasma, e a síntese *de novo* de ácidos graxos são maiores do que a taxa de oxidação e de exportação (KLEINER et al., 2005; PETERSEN et al., 2006; KOO, 2013). A absorção de ácidos graxos pelo fígado depende diretamente da concentração de ácidos graxos no plasma e também da capacidade dos hepatócitos em incorporá-los, a qual está relacionada com a atividade e quantidade de carreadores de ácidos graxos e de proteínas transportadoras

(BRADBURY, 2006; TARANTINO et al., 2007).

O transporte hepático de ácidos graxos é mediado, em sua maioria, pela proteína transportadora FABP (Proteína de ligação aos ácidos graxos), FAT (Ácido Graxo Translocase) e FATP (Polipeptídeo Transportador de Ácidos Graxos) (BRADBURY, 2006; MUSSO et al., 2009). A principal fonte de ácidos graxos para o fígado é do *pool* proveniente do plasma e chega até o órgão através da artéria hepática e da veia porta. Isto indica que a DHGNA está associada a uma maior distribuição dos ácidos graxos circulantes para o fígado (GRECO et al.; PARDINA et al., 2008). A capacidade do fígado de captar os ácidos graxos é um provável mecanismo envolvido na DHGNA, devido ao aumento da expressão gênica de diversas proteínas-chave que participam na absorção e transporte intracelular (AUGUET et al., 2014).

A síntese *de novo* de ácidos graxos é uma via intra-hepática fundamental, contribuindo para a estocagem e secreção dos lipídios pelos hepatócitos (JENSEN-URSTAD; SEMENKOVICH, 2012). Este processo é uma extensão das complexas vias metabólicas do fígado e seu principal substrato provém da glicólise e do metabolismo de carboidratos. Sendo assim, não somente uma dieta rica em lipídios, mas uma dieta rica em carboidratos de fácil absorção pode ativar a via da síntese *de novo* de ácidos graxos (SCHWARZ et al., 2003). Em indivíduos obesos, o aumento da síntese *de novo* de ácidos graxos pode contribuir para o desenvolvimento da DHGNA (DONNELLY et al. 2005; FERRÉ; FOUFELLE, 2010).

A regulação da transcrição da síntese *de novo* de ácidos graxos possui duas principais vias de ativação, uma através da SRBP1-c (Proteína de ligação ao Elemento Regulador de Esterol 1-c) e outra pela ChREBP (Proteína de ligação ao Elemento Responsivo de Carboidratos) (**Figura 1**). Estes dois importantes fatores de transcrição envolvidos na DHGNA são ativados pelo aumento da glicemia e da insulina, ambos induzidos pela dieta (KAWANO; COHEN, 2013; OOSTERVEER, SCHOONJAS, 2014).

Figura 1. Regulação da síntese de novo de ácidos graxos através da SRBP-1c e ChREBP. Em condições de aumento de glicose, a ChREBP é fosforilada pela PP2A, facilitando sua entrada no núcleo para formar um dímero com o ChORE (Elemento de Resposta ao Carboidrato), resultando na transcrição de enzimas glicolíticas e lipolíticas, incluindo a L-PK, ACC (acetil-CoA carboxilase), SCD1 (estearoil-CoA dessaturase) e Elov16. Ao mesmo tempo, a glicemia elevada estimula a secreção de insulina no pâncreas, que ativa a AKT e a mTORC1, aumentando a transcrição e a clivagem da SRBP-1c. A SRBP-1c ativada entra no núcleo e promove a transcrição de GK (glicoquinase), ACC, FAS (ácido graxo sintase), SCD1 e Elov16. Adaptado de James M. Ntambi (2016).

O tecido adiposo também tem relevância na patogênese da DHGNA, uma vez que contribui para o aumento de ácidos graxos nos hepatócitos através da lipólise. Embora esta contribuição seja considerada pequena, é importante ressaltar que o tecido adiposo possui um papel fundamental na disfunção metabólica e na produção de marcadores inflamatórios (TARANTINO et al., 2007; DEMIR et al., 2015; YU, 2016).

Com o remodelamento do tecido a capacidade de estocar lipídios se torna prejudicada, resultando no extravasamento de ácidos graxos livres para a circulação. O excesso de ácidos graxos circulantes leva ao acúmulo de triacilglicerídeos e de metabólitos dos ácidos graxos (diacilglicerol, acetil-CoA e ceramidas) ectopicamente em tecidos como fígado, músculo esquelético e pâncreas (SAMUEL; SHULMAN, 2012; STINKENS et al., 2015) (**Figura 2**).

A existência de uma relação entre o acúmulo de TAG intra-hepático e a resistência à insulina causa divergências. Porém, estudos sugerem que fatores associados à DHGNA, como estresse do retículo endoplasmático (RE), adiponectinas circulantes e inflamação, possam afetar a sensibilidade a este hormônio nos tecidos periféricos (PETERSON et al.; YAMAGUCHI, 2007).

Figura 2. Relações fisiológicas entre o metabolismo de ácidos graxos, resistência à insulina, dislipidemia e aumento do conteúdo intra-hepático de TAG na doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA). Além da síntese *de novo* de ácidos graxos, a liberação de ácidos graxos livres (AGL) a partir do tecido adiposo para o fígado é aumentada em indivíduos obesos com DHGNA, resultando em maior acúmulo de TAG intra-hepático. Adaptado de Fabrini et al. (2010).

1.2 DHGNA e inflamação

Diversos tipos celulares, incluindo os adipócitos e os hepatócitos, produzem moléculas envolvidas na resposta inflamatória, como as citocinas. A infiltração de macrófagos e marcadores inflamatórios é maior em indivíduos portadores de DHGNA do que naqueles com conteúdo intra-hepático de TAG considerado normal (WEISBERG et al., 2003; KOLAK et al., 2007). Um biomarcador importante na fase aguda da inflamação em indivíduos com DHGNA é a Proteína C Reativa (PCR), sintetizada pelo fígado e, em menor escala, pelo tecido adiposo. Esta proteína é regulada por citocinas como a IL-1, IL-6 e TNF- α (ABDELLAOUI; KHAFFAF, 2008). Além disso, entre todos os marcadores inflamatórios, a PCR parece ser a única que, sozinha, apresenta maior capacidade em prever risco para o surgimento de inflamação tecidual e estresse oxidativo, principalmente no retículo endoplasmático e peroxissomos (FRANSCICO; HERNÁNDEZ; SIMÓ, 2006). Estes eventos desempenham um importante papel no desenvolvimento de resistência à insulina em indivíduos com DHGNA (SHOELSON et al., 2007; FABBRINI; SULLIVAN; KLEIN, 2010; JOHNSON; MILNER; MAKOWSKI, 2012) (**Figura 3**).

Figura 3. Dano celular causado pela inflamação na DHGNA. A resistência à insulina aumenta a captação de ácidos graxos pelos hepatócitos, resultando em acúmulo de TAG e desenvolvimento de esteatose (setas verdes). A via da β -oxidação mitocondrial e peroxissomal fica hiperativada para liberar o excesso de ácidos graxos (setas laranjas). Quando ativadas, as vias catabolizantes geram um *loop* de estresse oxidativo, induzindo à morte celular e à liberação de moléculas associadas ao dano celular (setas vermelhas). (Disponível em <http://www.liebertpub.com/ars>).

Além da participação das citocinas, produtos do metabolismo do ácido araquidônico também estão ligados aos processos inflamatórios na DHGNA. Por intermédio de processos metabólicos catalisados especialmente pelo complexo cicloxigenase (COX), este ácido presente nas membranas biológicas é liberado pelas enzimas fosfolipases e convertido em prostaglandinas (TILLEY et al., 2001). As prostaglandinas, particularmente a prostaglandina E_2 (PGE_2), são importantes mediadores lipídicos de ação parácrina da resposta inflamatória local. Além deste importante papel, a PGE_2 também é capaz de induzir a síntese de $TNF-\alpha$, IL-6 e IL-1 em macrófagos e outros tipos celulares (WILLIAMS et al., 1997; CHEN et al., 2015).

Citocinas e prostaglandinas liberadas a partir de células do fígado não parenquimatosas, principalmente as células de Kupffer, modulam a função de células parenquimais de forma parácrina, mas também podem exercer função autócrina. As prostaglandinas secretadas pelas células de Kupffer podem modular a produção de glicose hepática, impactando no surgimento de resistência à insulina (PÜSCHEL; JUNGGERMANN, 1994; TREFFKORN et al., 2004; NEYRINCK et al., 2009). Existem evidências de que a PGE_2 pode favorecer o acúmulo de TAG nos hepatócitos, pelo bloqueio da β -oxidação, através da inibição da CPT-1 (Carnitina

Palmitoil Transferase 1). Entretanto, ainda não há um consenso sobre a atuação da PGE₂ na inibição da síntese *de novo* de ácidos graxos, via SRBP-1c e ChREBP (ENOMOTO et al., 2000; HENKEL et al., 2012).

1.3 O impacto da dieta na DHGNA

O aumento do consumo de alimentos processados, a rápida urbanização e as mudanças no estilo de vida têm levado a uma transformação nos padrões alimentares da população. O consumo de alimentos com alta densidade calórica, ricos em lipídios saturados, açúcares e sódio é um ponto chave no surgimento de DCNT (OMS, 2015). Está associado ao aumento da glicemia, ácido graxo livre, biomarcadores da inflamação e até mesmo com alterações de hormônios de saciedade, como a leptina. Todavia, a introdução de novos hábitos, como o consumo de alimentos mais saudáveis, incluindo frutas, legumes e verduras, pode prevenir estas alterações (RAHMAN; BIWS; KIRKHAM, 2006; SANDE-LEE; VELLOSO, 2012).

A ingestão de carboidratos de fácil absorção, especialmente os açúcares, contribui para o aumento de TAG intra-hepático, através da síntese *de novo* de AG, e diminuição da sensibilidade hepática à insulina (MAERSK; BELZA, 2012; FEROLLA et al., 2013). A preferência por alimentos com alto teor de frutose e sacarose, especialmente na forma de refrigerantes, cresce em todo o mundo. Consequentemente, aumentam os casos de obesidade, diabetes tipo 2, dislipidemias e DHGNA (CHALASANI et al., 2012; MCCARTHY; RINELLA, 2012). O consumo elevado de alimentos com alto teor de frutose predispõe à DHGNA, gerando aumento da massa adiposa, inflamação e um perfil metabólico desordenado (TEFF et al., 2004; HUANG et al., 2011).

Frequentemente, indivíduos com esteatose hepática consomem mais ácidos graxos saturados do que os poliinsaturados. Os ácidos graxos saturados têm efeitos adversos sobre a homeostase dos lipídios e da glicose. Como resultado, aumentam a progressão de síndrome metabólica e DHGNA. Além disso, a alta ingestão de ácidos graxos saturados e colesterol dietético interagem de forma sinérgica, induzindo característica de esteatohepatite, o que aumenta o risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares (CARVALHANA; MACHADO; CORTEZ-PINTO, 2012; MCCARTHY; RINELLA, 2012). A deficiência de alguns micronutrientes também está associada à patogênese da DHGNA. A colina é um micronutriente essencial para os seres humanos. Dietas com restrição de colina geram

aumento do estresse oxidativo decorrente de processos inflamatórios, ativados pelas ciclooxygenases 2 (COX 2), causando sérios danos ao tecido hepático (CORBIN; ZEISEL, 2012).

A microbiota intestinal vem sendo estudada ao longo dos anos e, recentemente, foi associada ao desenvolvimento de doenças hepáticas, proposto como o eixo microbiota-fígado. Alterações na microbiota intestinal podem contribuir para o surgimento de DHGNA através de diversos mecanismos, incluindo redução na absorção de ácidos graxos de cadeia curta no intestino, alteração no metabolismo da colina de origem dietética, alteração biliar e na permeabilidade intestinal e, principalmente, na interação entre dieta e microbiota (MUSSO et al.; KIRPICH et al.; LIN; LU; WANGETAL, 2015) (**Figura 4**).

Figura 4. Interação entre dieta, microbiota intestinal e fígado na doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA). Adaptado (YU et al., 2016).

A alimentação é o principal foco das estratégias para a promoção de saúde em todo o mundo. Atualmente, um desafio importante é buscar reverter o aumento acelerado do número de casos de DCNT, especialmente obesidade, doenças cardiovasculares, diabetes e câncer. Um dos fatores para a ocorrência destas doenças é a alimentação inadequada, como a troca de alimentos ricos em nutrientes por alimentos altamente energéticos e pobres em vitaminas, minerais e fibras (RAHMAN; BIWAS; KIRKHAM, 2006; OMS, 2015a; YU et al. 2016).

As frutas, legumes e verduras são importantes componentes de uma alimentação saudável e seu consumo equilibrado pode ajudar a prevenir DCNT. A maioria dos casos de

doenças hepáticas é relacionada ao consumo excessivo de álcool e à má alimentação. Estima-se que 1,7 milhões das mortes em todo o mundo sejam atribuíveis ao baixo consumo de frutas e vegetais (OMS, 2004). Estes, além de fornecerem fibras, vitaminas e minerais, também possuem compostos bioativos como os compostos fenólicos, que atuam na manutenção da saúde e na redução dos fatores de risco para DCNT (DASKALOPOULOU et al., 2004; PARK et al., 2009).

1.4 Compostos fenólicos e DHGNA

Entre os grupos que abrangem os compostos bioativos de alimentos estão os compostos fenólicos. São caracterizados por possuírem um anel aromático com um ou mais grupos hidroxila e normalmente encontram-se conjugados com mono e polissacarídeos (RAHMAN; BIWAS; KIRKHAM, 2006; CARDONA et al., 2013; REIN et al., 2013).

Os compostos fenólicos, assim como os terpenos e os alcaloides, são produtos do metabolismo secundário de plantas e são produzidos em menor escala em relação aos produtos do metabolismo primário (carboidratos, proteínas e lipídios). A função dos compostos fenólicos nos vegetais é totalmente adaptativa, ou seja, garantem vantagens para a sobrevivência e a perpetuação da espécie em seu ecossistema. Em seres humanos, as propriedades benéficas destes compostos podem ser atribuídas à sua capacidade de sequestrar radicais livres, de modular a sinalização celular e de influenciar a expressão de genes relacionados ao desenvolvimento de DCNT (FRAGA; OTEIZA, 2011; THILAKARATHNA; RUPASINGHE, 2013).

Além de suas propriedades antioxidantes, estudos apontam seus efeitos positivos na redução dos fatores de risco associados à obesidade, melhorando a dislipidemia, resistência à insulina, inflamação e, conseqüentemente, o metabolismo hepático (BLADÉ; AROLA; SALVADÓ, 2010; MONTAGU et al., 2011). Dentre os possíveis mecanismos relacionados aos benefícios ressaltam-se os efeitos diretos no transporte de glicose e lipídios no fígado, no metabolismo hormonal e na modulação da microbiota intestinal (KIM et al., 2011; ANHÊ et al., 2013; NEYRINCK et al., 2013).

Devido aos diversos efeitos benéficos à saúde, os compostos fenólicos têm sido cada vez mais investigados na busca de alternativas para o tratamento e/ou prevenção das alterações metabólicas causadas pela obesidade. Inúmeros estudos têm demonstrado que os

ácidos fenólicos, flavonoides e taninos possuem efeitos positivos quanto à redução de ganho de peso corporal, de lipídios plasmáticos, da glicemia, da pressão arterial sistêmica e da inflamação crônica em modelos animais de obesidade, além de causar melhora da sensibilidade à insulina (GARCÍA-CONESA, 2015).

Um ponto importante que contribui para o mecanismo de regulação do metabolismo energético na DHGNA pelos compostos fenólicos é o retardo ou a redução da absorção de lipídios oriundos da dieta. As proantocianidinas presentes na maçã (VIDAL et al., 2005) e nos extratos de canela ricos em polifenóis (QIN et al., 2012) e o resveratrol, presente no vinho, (DASH et al., 2013) possuem efeitos benéficos na síntese e secreção de ApoB (apolipoproteína rica em TAG) que podem alterar a produção e a secreção de quilomícrons (rico em TAG) pelas células intestinais. Ainda, a perfusão intestinal com compostos fenólicos causou uma redução significativa da absorção de colesterol (FREJNAGEL; WROBLEWSKA, 2010). Recentemente, mostrou-se que alguns flavonoides, incluindo apigenina, quercetina e epigallocatequina-3-galato (EGCG), atuam como importantes auxiliares na redução de absorção de ácidos graxos (IKEDA et al., 2010; NGAMUKOTE et al., 2011; NEKOHASHI et al., 2014).

1.5 Camu-camu: um fruto brasileiro rico em compostos fenólicos

O Brasil possui uma flora extremamente rica e diversificada, chegando a 46 mil espécies (incluindo plantas, algas e fungos). Cerca de 40% são endêmicas do território nacional. Isto coloca o Brasil como um dos países de maior riqueza de plantas do mundo, seguido por China, Indonésia, México e África do Sul, perdendo apenas para as grandes ilhas como Austrália, Madagascar e Papua Nova Guiné (COSTA et al.; MAIA et al.; PRADO et al., 2015). Segundo a *Flora brasiliensis* (2015), o grupo predominante, com 32.813 espécies, é o das plantas com sementes protegidas por frutos carnosos ou secos, as chamadas angiospermas. Por serem pouco explorados, os verdadeiros benefícios que estes frutos podem trazer à saúde não são conhecidos. Entretanto, sabe-se que são ricos em compostos bioativos (ZANATA et al., 2005; PRIOR et al., 2006; RUFINO et al., 2010).

O arbusto camucamuzeiro é uma angiosperma pertencente à região da Amazônia, do qual se origina o fruto camu-camu (*Myrciaria dubia* (H.B.K) McVaugh). Este fruto pertence à família Myrtaceae e foi descrito pela primeira vez pelos botânicos Humboldt, Bonpland e

Kunth (H.B.K.). Nos anos 60, Roger McVaugh transferiu a espécie para o gênero *Myrciaria*, implicando a alteração do nome já conhecido atualmente. No Brasil, o camu-camu é conhecido popularmente por *caçari*, *araçá-d'água* ou *sarão* (RIBEIRO et al., 2002). Morfologicamente, são frutos do tipo baga esférica de superfície lisa e brilhante, coloração vermelho púrpura, chegando a ter de 2 cm a 4 cm e de uma a quatro sementes aplanadas cobertas por uma lâmina com fibrilas brancas (RIBEIRO et al., 2001; DOSTERT et al., 2009; CHIRINOS et al., 2011) (**Figura 5**).

Figura 5. Frutos de camu-camu (Fonte: <http://www.amazonorigins.com/camu-fruit>).

Nos últimos anos, o camu-camu vem despertado interesse devido ao seu elevado teor de vitamina C, maior que o da acerola, podendo variar de 2,4 g a 3,0 g/100 g de polpa (RUFINO et al., 2010). Além disso, este fruto é fonte importante de compostos bioativos, como os compostos fenólicos e carotenoides (CHIRINOS et al., 2010; FRACASSETI et al., 2013; ZANATTA; MERCADANTE, 2007). Entre os compostos fenólicos destacam-se os ácidos fenólicos, como o gálico, flavonoides, como catequina, quercetina, naringerina e kaempferol e antocianinas, como a cianidina-3-glicosídeo e a delphinidina-3-glicosídeo, além de altos teores de taninos, como os elagitaninos (CHIRINOS et al., 2010; AKTER et al., 2011; FRACASSETI et al., 2013).

Sendo o camu-camu um fruto rico em compostos fenólicos, alguns estudos foram realizados com o intuito de verificar os possíveis efeitos benéficos deste fruto. A ingestão do extrato de camu-camu melhorou o perfil lipídico e reduziu o estresse oxidativo de ratos com diabetes induzida por estreptozotocina (GONÇALVES et al., 2014). A ingestão do suco de camu-camu por ratos com obesidade por glutamato foi capaz de reduzir os níveis plasmáticos de glicose, insulina e lipídios (NASCIMENTO et al., 2013). Outros estudos demonstraram propriedades anti-inflamatórias (INOUE et al., 2008; YAZAWA et al., 2011),

hepatoprotetoras (AKACHI et al., 2010) e antimicrobianas (MYODA et al., 2010), o que sugere que este fruto pode ser utilizado como um ingrediente funcional no controle de doenças crônicas ligadas à obesidade.

1.6 Justificativa

Tendo em vista o aumento acelerado de doenças relacionadas ao metabolismo, como a obesidade, e sua importância no impacto gerado na saúde pública (WHO, 2015), faz-se necessária a investigação minuciosa de alternativas para reduzir os fatores de risco para estas doenças, principalmente no quadro de DHGNA. Recentemente, vem sendo demonstrado o papel que frutas sub-exploradas poderiam ter no controle de risco para as DCNT (BABIO et al., 2009).

O camu-camu, neste contexto, destaca-se como fonte rica não apenas de vitamina C, como também de compostos fenólicos, principalmente os elagitaninos, com importantes propriedades biológicas (FRACASSETTI et al., 2013), já citadas neste trabalho.

No entanto, nenhum estudo foi realizado, até o momento, para avaliar o efeito que esses componentes poderiam ter nos fatores de risco para DHGNA.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito de compostos fenólicos do camu-camu no desenvolvimento da doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) de camundongos com obesidade induzida pela dieta.

2.2 Objetivos específicos

- Obter extratos fenólicos a partir de polpas comerciais congeladas de camu-camu;
- Determinar o teor de compostos fenólicos totais, proantocianidinas, flavonoides e elagitaninos dos extratos de camu-camu;
- Avaliar os efeitos da suplementação diária de extratos fenólicos do camu-camu em camundongos alimentados com dieta rica em lipídios e sacarose em relação ao:
 - ganho de peso corporal, ingestão alimentar e adiposidade;
 - homeostase glicídica;
 - homeostase lipídica;
 - função hepática

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais

As polpas comerciais congeladas de camu-camu foram adquiridas da empresa Bela Iaça Indústria e Comércio de Polpas de Frutas Ltda. Os frutos utilizados para a produção das polpas foram adquiridos de árvores localizadas em Castanhal, Estado do Pará, Brasil.

3.2 Métodos

3.2.1 Extração e purificação de compostos fenólicos

A extração dos compostos fenólicos foi realizada segundo Arabbi, Genovese e Lajolo (2004). As amostras foram extraídas com metanol aquoso 70% com 0,5% de ácido acético na proporção de 1:20 (m/v), através de agitação com barra magnética por duas horas em temperatura ambiente. Os extratos obtidos foram filtrados em papel-filtro Whatman nº 6 e o resíduo foi re-extraído mais duas vezes, obtendo-se então um extrato bruto. Para a purificação dos compostos fenólicos, os extratos brutos obtidos foram concentrados utilizando rotaevaporador com temperatura de banho de 37°C. O extrato foi purificado em coluna com resina C18 (Phenomenex Ltd., Torrance, EUA), preparada em seringa própria (HPLC Technology). A coluna foi pré-condicionada com a passagem de metanol e água. Após a passagem do extrato aquoso, a coluna foi lavada com água e a eluição dos compostos fenólicos foi feita com metanol. Após secagem completa através de rotaevaporação, o extrato foi ressuspenso em água. Este extrato foi posteriormente caracterizado através da quantificação de fenólicos totais, proantocianidinas, flavonoides e elagitaninos e administrados aos animais nos experimentos *in vivo*.

3.2.2 Quantificação de compostos fenólicos

O conteúdo de fenólicos totais dos extratos purificados foi determinado pelo método de Singleton, Orthofer e Lamuela-Raventos (1999), com adaptações propostas por Genovese et al. (2003). Uma alíquota de 0,25 mL do extrato foi misturada com 0,25 mL de reagente de

Folin-Ciocalteu e 2 mL de água destilada. Em seguida, adicionou-se 0,25 mL de solução saturada de carbonato de sódio e esta mistura foi colocada em banho-maria a 37 °C por 30 minutos. A absorbância foi determinada a 750 nm em espectrofotômetro (Ultrospec 2000, Pharmacia Biotec, Cambridge, Reino Unido). O ácido gálico (Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA) foi utilizado para fazer a curva padrão. Esta análise foi realizada em triplicata e os resultados obtidos foram expressos em mg equivalente de ácido gálico (EAG)/mL de extrato.

3.2.3 Quantificação de proantocianidinas pelo método butanol acidificado

As proantocianidinas foram quantificadas pelo método do butanol acidificado descrito por Porter; Hrstich e Chan (1985). Preparou-se uma solução 2:3 de HCl e n-butanol (200 mL de HCl com 300 mL de n-butanol) e adicionou-se 77 mg de FeSO₄.7H₂O. Uma alíquota de 0,25 mL do extrato previamente diluído foi então misturada a 2,5 mL da solução de n-butanol em tubo de ensaio com tampa. Os tubos foram tampados e aquecidos em banho-maria a 95 °C por 15 minutos. Após o tempo da reação, a amostra foi resfriada em banho de gelo e realizada a leitura em espectrofotômetro a 540 nm. A cianidina-3-rutnosídeo (Extrasynthèse, Genay, França) foi utilizada para fazer a curva padrão. Esta análise foi realizada com 5 replicatas e os resultados obtidos foram expressos em mg de cianidina equivalentes/mL de extrato.

3.2.4 Quantificação de proantocianidinas pelo método DMAC

A metodologia DMAC (4-dimetilaminocinamaldeído) para quantificação de proantocianidinas foi utilizada de acordo com Prior et al. (2010), com algumas modificações. Uma alíquota de 210 µL da solução de DMAC foi acrescentada a 70 µL da solução controle (etanol aquoso 80%), padrões e extratos (diluídos quando necessário) em uma microplaca de 96 poços. Após incubação por 25 minutos a 25 °C, a absorbância foi lida a 640 nm a cada minuto utilizando-se um espectrofotômetro de microplaca (Synergy H1 hybrid reader, Biotek, IL, EUA). O conteúdo de proantocianidinas foi calculado a partir de uma curva padrão de procianidina B2 (Extrasynthèse, Lyon, França) na concentração de 100 µg/mL. Os resultados foram expressos em mg equivalente de procianidina B2 por mL de extrato.

3.2.5 Ácido elágico total por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a detector com arranjo de diodos (CLAE-DAD)

O teor de ácido elágico total foi determinado de acordo com Pinto et al. (2008). A amostra (0,5 g de polpa base seca) foi extraída com acetona aquosa a 80% (20 mL) e uma alíquota (2 mL) foi seca sob nitrogênio (Evaporador Analítico Organomation Berlim, MA). A amostra foi então hidrolisada através da adição de 2 mL de ácido trifluoroacético 2N e autoclavada a 120°C por 90 minutos. Após a hidrólise, foi adicionado 1 mL de álcool tercbutílico e, em seguida, a amostra foi novamente seca em nitrogênio. Por fim, a amostra foi ressuspensa em 1 mL de metanol grau analítico e filtrada com filtro de polietileno de 0,22 µm (Millipore Ltd, Bedford, MA) para posterior análise por CLAE-DAD.

3.2.6 Flavonoides e ácido elágico livre por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a detector com arranjo de diodos (CLAE-DAD)

O mesmo extrato seco obtido por rotaevaporação no item 3.1.2 foi ressuspensa em metanol de grau analítico e filtrado através de filtro de polietileno de 0,22 µm (Millipore Ltd., Bedford, MA). A identificação e a quantificação dos flavonoides foram obtidas por um cromatógrafo líquido de alta eficiência (Hewlett-Packard 1100) com injetor automático de amostras e bomba quaternária acoplada a um detector de arranjo de diodos, de acordo com o método de Arabbi, Genovese e Lajolo (2004). A coluna utilizada foi uma Prodigy 5 µm ODS3 de fase reversa (250-4.6mm-Phenomenex Ltd., Torrance, CA) e os solventes de eluição foram (A) água/tetra-hidrofurano/ácido trifluoroacético (98:2:0,1) e (B) acetonitrila. Os cromatogramas foram registrados a 270 nm e os flavonoides foram quantificados usando quercetina, miricetina e ácido elágico (Sigma, St Louis, EUA) como padrões. Os compostos fenólicos foram identificados através da comparação do tempo de retenção e do espectro com os dos padrões. Os resultados foram expressos em µg de cada um dos compostos por mL de extrato.

3.2.7 Avaliação do efeito dos extratos ricos em compostos fenólicos do camu-camu em camundongos alimentados com dieta rica em lipídios e sacarose

Para verificar os efeitos dos compostos fenólicos do fruto camu-camu no desenvolvimento da obesidade e DHGNA, camundongos C57BL/6 receberam dieta padrão ou dieta rica em lipídios e sacarose (HFS) para a indução da obesidade. O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (CEUA/FCF/USP), protocolo CEUA nº 353 (Anexo A). Todos os experimentos foram realizados em conformidade com a legislação vigente sobre o assunto no país. Camundongos com 8 semanas de vida, procedentes do Biotério do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, foram divididos em 4 grupos de 10 animais cada e submetidos a uma adaptação de 7 dias ao ambiente experimental, recebendo dieta padrão de laboratório. A suplementação com extratos fenólicos de camu-camu (CCEF) foi realizada durante 8 semanas e iniciou-se juntamente com a administração da dieta HFS. Os extratos fenólicos purificados obtidos anteriormente foram administrados por gavagem uma vez ao dia em duas doses diferentes, estabelecidas em estudos anteriores pelo grupo de pesquisa. Os grupos que não receberam suplementação do CCEF receberam água por gavagem, como descrito a seguir:

- Grupo controle (Ct) = dieta padrão + gavagem de água
- Grupo HFHS = dieta rica em lipídios e sacarose (HFS) + gavagem de água
- Grupo HFS + CCEF 1 = dieta rica em lipídios e sacarose + gavagem de CCEF 1 (7 mg de ácido gálico equivalentes/kg peso corporal)
- Grupo HFS + CCEF 2 = dieta rica em lipídios e sacarose + gavagem de CCEF 2 (14 mg de ácido gálico equivalentes/kg peso corporal)

A dieta padrão Nuvilab CR1 (Nuvital Nutrientes SA, Curitiba, PR, Brasil) utilizada fornece 3,6 Kcal/g, sendo 23,7% da energia proveniente de proteínas, 12% de lipídios e 56% de carboidratos. A dieta rica em lipídios e sacarose foi elaborada como descrito anteriormente por Lemieux et al. (2003) e fornece 4,6 Kcal/g, sendo 20% da energia proveniente de proteínas, 41% proveniente de carboidratos (39% proveniente da sacarose) e 39% proveniente de lipídios (19% óleo de soja, 19% banha de porco). No decorrer dos experimentos, os animais foram mantidos com água e dieta *ad libitum* e as condições ambientais controladas (temperatura de 22°C, umidade relativa de 65% e ciclo de claro e escuro de 12 horas).

3.2.7.1 Ingestão alimentar, peso corporal e glicemia

A ingestão alimentar e o peso dos animais foram verificados em dias alternados. A glicemia foi avaliada semanalmente após jejum de 5 horas com glicosímetro Accu-check® a partir de amostras de sangue coletadas através de pequena incisão na ponta da cauda dos camundongos. A eficiência alimentar foi calculada pela razão entre o ganho de peso corporal (g) e a quantidade total de calorias consumidas (Kcal) por camundongo, multiplicado por 100.

3.2.7.2 Teste intraperitoneal de tolerância à glicose (ipGTT)

O teste intraperitoneal de tolerância à glicose (ipGTT) foi realizado após 6 horas de jejum na última semana do experimento. A primeira coleta de sangue foi feita através de corte na extremidade da cauda do animal no tempo 0. Em seguida, uma solução de glicose a 10% (1 g/kg de peso corporal) foi administrada aos camundongos intraperitonealmente. A concentração de glicose no sangue foi então determinada com o glicosímetro Accu-check® nos tempos 15, 30, 45, 60 e 90 minutos após administração da carga de glicose. Para análise de insulina durante o ipGTT, amostras de sangue foram coletadas através de pequena incisão na ponta da cauda dos camundongos nos tempos 0, 30 e 90 minutos após a injeção de glicose. As amostras foram centrifugadas a 2000 g por 10 minutos a 4°C, e o soro foi recolhido para análise de insulina utilizando kit de insulina para camundongos ELISA (EZRMI-13K) da Millipore (Billerica, MA, EUA). Posteriormente, a sensibilidade à insulina foi determinada pelo índice HOMA.

3.2.7.3 Coleta de tecidos e soro

Nos últimos dias do experimento, os animais foram anestesiados e, em seguida, o sangue foi coletado através de punção cardíaca. As amostras de sangue foram centrifugadas a 2000 g durante 10 minutos a 4° C. Fígado e tecido adiposo (epididimal, inguinal e retroperitoneal) foram coletados, pesados, congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -80°C.

3.2.7.4 Perfil bioquímico

Os níveis de glicose, triacilglicerol (TAG), colesterol total (CT), lipoproteína de alta densidade- colesterol (HDLc), lipoproteína de baixa densidade-colesterol (LDLc), proteína-C reativa (PCR), alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) foram quantificados por analisador automático LabMax 240 (Labtest Diagnóstica, Minas Gerais, Brasil).

3.2.7.5 Conteúdo de triacilglicerol intra-hepático

O conteúdo de TAG intra-hepático foi determinado conforme a metodologia descrita por Folch (1957) e adaptada por Hara e Radin (1978). Em um tubo de polipropileno com tampa pesou-se 62,5 mg de tecido hepático e adicionou-se 1,125 mL de isopropanol. Com o auxílio de uma tesoura cirúrgica devidamente higienizada, o tecido foi homogeneizado e depois deixado sob agitação por 24h. Após esta etapa, os tubos com o homogenato foram centrifugados a 1000 g por 15 minutos. Em seguida, foi retirado o sobrenadante e colocado em outro tubo adicionado de 1,5 mL de solução de sulfato de Na (6,6%), agitando-se imediatamente em vórtex. Após agitação, esperou-se 10 minutos para a separação das fases, em seguida foram retirados 200 µL do sobrenadante e secos em N₂. Após secagem, as amostras foram ressuspensas em 0,5 mL de isopropanol. O conteúdo intra-hepático de triacilgliceróis foi determinado utilizando-se um analisador para testes bioquímicos (LABMAX 240®, Lagoa Santa, MG, Brasil).

3.2.7.6 Conteúdo de glicogênio intra-hepático

O conteúdo intra-hepático de glicogênio foi determinado de acordo com Bidinotto (1997). Em um tubo de ensaio pesou-se 50 mg de tecido hepático e adicionou-se 1 mL de KOH. Em seguida, o tubo foi levado para o banho-maria a 95°C durante 10 minutos, depois agitado em vórtex para completa homogeneização. Posteriormente, foram transferidos 250 µL

desta solução para tubo falcon adicionados de 3 mL de etanol 95%. Imediatamente, foi agitado em vórtex. Na sequência, foram adicionados 100 μ L de solução K_2SO_4 e novamente foram agitados em vórtex. Este homogenato foi centrifugado a 1000 g por 3 minutos e o sobrenadante foi descartado. Após a adição de 2,5 mL de água destilada, a solução foi agitada até sua completa dissolução. Foram transferidos 500 μ L desta solução para tubos de ensaio e, em seguida, adicionou-se 700 μ L de solução de fenol. Após a agitação em vórtex, foi adicionado 2 mL de H_2SO_4 . Passados 15 minutos, a solução foi agitada novamente e a leitura foi feita a 490 nm. O conteúdo de glicogênio da amostra foi analisado através de uma curva de glicose e os resultados foram expressos em μ mol de glicose/g de tecido hepático.

3.2.7.7 Determinação da concentração de PGE_2 no tecido hepático

Para a realização desta análise, foram preparados homogenatos do tecido a partir de 50 mg de fígado adicionados de 500 μ L de solução tampão PBS, com pH de 7,4. A concentração de PGE_2 foi determinada através do teste ELISA de acordo com as especificações do fabricante (R&D Systems, Minneapolis).

3.2.7.8 Histopatologia

Uma fração do fígado foi retirada, lavada com solução salina tamponada com fosfato (PBS) e colocada em formalina a 10%. Pequenas seções do tecido (4-5 micrômetros) foram preparadas e coradas com ácido periódico-Schiff (P.A.S.). Outra fração do tecido congelado foi retirada para coloração em Oil Red. As imagens foram visualizadas no microscópio óptico (LEICA® DM 4000B com câmera LEICA® DFC 280 ligada ao computador AMD Athon™64 2.00GHz equipado com placa de vídeo NVIDIA GeForce4 MX4000) e capturadas no programa NIS Elements BR 3.1 *software*, com objetiva de 40x.

3.2.7.9 Análise estatística

Todos os resultados foram apresentados como média $\pm$ erro padrão (EP). As análises estatísticas foram realizadas com o software GraphPad Prism 6 (San Diego, CA, EUA). Os

dados experimentais foram testados quanto à normalidade pelo teste de Shapiro Wilk. As diferenças entre os grupos foram analisadas por meio de análise de variância (ANOVA), seguida de teste de Tukey para os testes com distribuição normal. Para os dados não paramétricos, foi utilizada ANOVA seguida do teste Kruskal-Wallis. O grupo controle foi usado apenas como referência, com o intuito de mostrar os efeitos da dieta rica em lipídios e sacarose em relação aos animais que receberam dieta padrão de laboratório. Seus valores foram incorporados apenas na análise estatística de peso semanal e glicogênio intra-hepático. O valor de probabilidade de $p < 0,05$ foi utilizado como o critério para a significância estatística.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Caracterização química do extrato fenólico de camu-camu (CCEF)

O extrato fenólico de camu-camu (CCEF) foi obtido por extração em fase sólida (EFS), utilizando-se um agente adsorvente. A **tabela 1** apresenta a caracterização química do extrato purificado de camu-camu, por EFS com octadecil silano (C18), em relação aos conteúdos de fenólicos totais, proantocianidinas, flavonoides e ácidos fenólicos. Observa-se que os taninos foram os compostos fenólicos em maior abundância no CCEF. Destacaram-se os elagitaninos como um dos principais compostos fenólicos encontrados no extrato de camu-camu. Esta caracterização química foi fundamental para a base de cálculo da quantidade de fenólicos a ser administrada, considerando o peso corporal de cada animal ao longo do experimento.

Tabela 1. Caracterização química do extrato fenólico do camu-camu (CCEF) obtido por EFS em coluna C18

	Extrato C18
<i>Fenólicos totais (µg EAG/mL)</i>	2,53 ±0,02
<i>Proantocianidinas (PACs)</i>	
Butanol-HCl ^a (µg EC3R/mL)	269±3
DMAC ^b (µg EPB2/mL)	173±1
<i>Flavonoides e ácidos fenólicos (µg/mL)</i>	
Derivados de Miricetina	15,2±0,4
Derivados de Quercetina	18,7±0,3
Ácido Elágico Livre (AEL)*	17,6±0,8
Ácido Elágico Total (AET)	215±7
Elagitaninos**	196,05±7

Valores expressos em média e desvio padrão de análises realizadas em triplicata. ^aMétodo de Porter *et al.* (1986); ^bmétodo de Prior *et al.* (2010). EAG = equivalente ácido gálico; EC3R = equivalente de cianidina-3-rutinosídeo; EPB2 = equivalente de procianidina B2. *Soma do ácido elágico livre e glicosídeos de ácido elágico. **Calculado: AET-AEL.

A EFS com C18 permite a extração de todos os compostos fenólicos, ou seja, os taninos, flavonoides e ácidos fenólicos. Neste estudo, foi realizada a administração de duas doses do CCEF, uma de 7 mg EAG/kg de peso corporal (CCEF 1) e outra de 14 mg EAG/kg de peso corporal (CCEF 2). A maior dose do extrato corresponde, para um indivíduo de 70 kg, ao consumo de 980 mg de polifenóis/dia. A ingestão média de polifenóis para um adulto é de 1 g de polifenóis/dia (PÉREZ-JIMENEZ, 2011). As frutas são fontes importantes de compostos bioativos, como os polifenóis. De acordo com a *World Health Organization/Food and Agricultural Organization of the United Nations* (WHO/FAO, 2004), recomenda-se o consumo diário de frutas, verduras e legumes para a prevenção de DCNT, como cardiovasculares, câncer, diabetes e obesidade.

As principais classes de compostos fenólicos presentes no camu-camu são as proantocianidinas e os derivados de ácido elágico, em especial os elagitaninos, e em menor proporção estão os flavonoides, como a miricetina e a quercetina (GONÇALVES *et al.*, 2008). Os taninos abrangem tanto as proantocianidinas (PACs), conhecidas como taninos condensados, quanto os elagitaninos (ETs), pertencentes ao grupo dos taninos hidrolisáveis, e possuem capacidade de precipitarem proteínas (KÄHKÖNEM *et al.*, 1999; CLIFFORD & SCALBERT, 2000; HARBORNE & WILLIAMS, 2000). As PACs são polímeros formados por uma ou mais unidades monoméricas de flavan-3-óis (+)-catequina e (-)-epicatequina (BLADÉ *et al.*, 2010). Já os ETs são compostos fenólicos solúveis em água de alto peso molecular, ésteres de ácido hexahidroxidifênico (HHDP) e um açúcar, geralmente o D-glicopirranose (YOSHIDA *et al.*, 2008; POUYSÉGU *et al.*, 2011).

Como visto anteriormente na caracterização química do extrato (**Tabela 1**), os principais compostos fenólicos encontrados no CCEF obtidos neste estudo foram os elagitaninos. A predominância de taninos (condensados ou hidrolisados) em frutas está associada às características como sabor amargo e adstringência, encontradas também no camu-camu. Os ETs já foram relacionados à proteção contra fatores de risco para doenças cardiovasculares e síndrome metabólica. Além do camu-camu, estes compostos podem ser encontrados em diversas frutas, tais como as *berries* e a romã (DEL RIO *et al.*, 2010). Entre as proantocianidinas, a epigallocatequina (EGC) e a epigallocatequina galato (EGCG), que também são encontradas no chá verde, foram previamente identificadas em pós de camu-camu (FRACASSETTI; COSTA; MOULAY; TOMÁS-BARBERÁN, 2013).

4.2 Efeitos *in vivo* da administração dos extratos fenólicos do camu-camu (CCEF)

No presente estudo, analisaram-se os efeitos que a administração dos CCEF, em diferentes doses, teria na proteção contra os distúrbios metabólicos causados pela dieta HFS em camundongos C57BL/6. Esta dose foi escolhida a partir de estudos realizados anteriormente pelo grupo de pesquisa. O conteúdo de fenólicos totais foi utilizado para o cálculo das doses a serem administradas aos animais diariamente, com o intuito de garantir 7 mg EAG/kg de peso corporal para os animais do grupo CCEF 1 e 14 mg EAG/kg de peso corporal para o grupo CCEF 2.

4.2.1 Ingestão alimentar e composição corporal

A **figura 6** apresenta os dados relacionados à ingestão alimentar. Os animais suplementados com a maior dose do extrato (CCEF 2) consumiram menos ração (g) e quilocalorias (kcal) por dia do que aqueles que receberam apenas a dieta HFS, sem suplementação (**Figura 6A**). Isto refletiu positivamente no consumo de lipídios (mg), que foi 17% menor no grupo CCEF 2 em relação ao grupo HFHS (**Figura 6B**). Além disso, a eficiência alimentar foi significativamente menor para ambos os grupos suplementados (CCEF 1 e 2), quando comparados ao grupo HFHS (**Figura 6C**). Estes primeiros dados sugerem que os polifenóis presentes no extrato de camu-camu possam ter um efeito sob a redução do apetite dos animais que receberam a maior dose do extrato (CCEF 2).

A restrição calórica é usualmente considerada como abordagem inicial para auxiliar na redução das alterações metabólicas associadas à obesidade (SOUZA et al., 2005; KELLY; YANG; CHEN; REYNOLDS; HEL, 2008). Aos fenólicos já foram atribuídos possíveis mecanismos de ação com propriedades antiobesogênicas, como o aumento do gasto energético, diminuição de absorção de nutrientes e redução de apetite (RAINS; AGARWAL; MAKI, 2011). Estudos previamente realizados com a administração de mirtilo e lingonberry demonstraram efeitos significativos na redução da ingestão alimentar e na saciedade dos animais (EID; BRAULT, OUCHFOUN&THONG, 2014; LILA; MAWSON, 2008). Neste sentido, sugeriu-se que o consumo de polifenóis poderiam ter efeitos sobre a produção de hormônios envolvidos na saciedade, tais como a leptina, *insulin-like growth factor* (IGF-1),

neuropeptídeo Y (NPY), resistina e grelina (PANICKAR, 2013; GARCÍA-CONESA, 2014; WANG et al., 2014).

Figura 6. Ingestão alimentar. Ingestão de ração (g/animal/dia) e energia (kcal/animal/dia) (A), ingestão de lipídios (mg/animal/dia) (B) e eficiência alimentar* (C) de camundongos C57BL/6 alimentados com dieta HFS e água (grupo HFHS) ou extratos fenólicos de camu-camu por gavagem em concentrações diferentes (CCEF 1 e CCEF 2). Valores expressos como média $\pm$ DP (n=9-10/grupo). *Calculado como: [ganho de massa corporal (g)/ingestão energética (kcal)]x100. ^{A,B,C} Letras maiúsculas diferentes sobre as colunas indicam diferença estatística ($p<0,05$). ^{a,b,c} Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística ($p<0,05$).

No início do protocolo experimental, todos os grupos apresentaram massa corporal similar. No decorrer do tratamento de 8 semanas, o aumento de massa corporal dos grupos que receberam a dieta HFS foi significativamente maior do que para o grupo Ct (**Figura 7A**), decorrente do maior acúmulo de tecido adiposo. Em contrapartida, os animais que receberam a suplementação com extrato de camu-camu, independente da dose, tinham massa corporal (g) significativamente menor na 7ª e 8ª semanas em relação ao grupo HFHS, sem suplementação. Mesmo não havendo diferença significativa entre o ganho relativo de peso corporal (%) (**Figura 7B**) e nos tecidos adiposos epididimal (**Figura 7C**), inguinal (**Figura 7D**) e retroperitoneal (**Figura 7D**), os polifenóis presentes no camu-camu foram eficientes em reduzir aproximadamente 9% do ganho de peso corporal dos animais suplementados com ambas as doses.

Os animais que receberam dieta HFS consumiram aproximadamente quatro vezes mais lipídios que aqueles alimentados com dieta padrão de laboratório (dados não mostrados), refletindo em aproximadamente três vezes mais tecido adiposo. O maior acúmulo de tecido adiposo visceral está intimamente associado à evolução do quadro clínico de DHGNA, em decorrência do acúmulo intra-hepático de ácidos graxos (COTRIM et al., 2011). Dietas hiperlipídicas, principalmente aquelas com grande quantidade de lipídios saturados provenientes de banha, possuem alta densidade energética e muita eficiência em transformar as calorias em depósito de tecido adiposo, quando comparadas a uma dieta normolipídica (PRIOR; TOWNSEND, 2008).

Neste contexto, os polifenóis do camu-camu não foram eficazes em reduzir a adiposidade em relação ao grupo HFHS. Em estudos *in vivo* previamente realizados com extratos de frutas ricas em elagitaninos (com teores semelhantes ao camu-camu), como a romã (8% de elagitaninos) e o cambuci (18 mg EAG/kg peso corporal e 32 mg EAG/kg peso corporal), também não foram observados efeitos positivos na adiposidade dos animais que receberam o extrato por gavagem durante 8 semanas (NEYRINCK et al., 2013; DONADO-PESTANA et al., 2015).

Figura 7. Composição corporal. Ganho de peso corporal (g) durante 8 semanas (A), ganho de peso (%) (B), tecido adiposo epididimal (%) (C), tecido adiposo inguinal (%) (D) e tecido adiposo retroperitoneal (%) (E) de camundongos C57BL/6 alimentados com dieta HFS e água (grupo HFHS) ou extratos fenólicos de camu-camu por gavagem em concentrações diferentes (CCEF 1 e CCEF 2). Valores expressos como média $\pm$ DP (n=9-10/grupo). ^{a,b,c} Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$). # ($p < 0,05$) HFHS versus CCEF 1 e CCEF 2.

4.2.2 Metabolismo da glicose

A suplementação com os extratos fenólicos do camu-camu foi efetiva na redução da glicemia de jejum ao final do experimento, sendo que os grupos CCEF 1 e CCEF 2 apresentaram glicemia significativamente menor quando comparados ao grupo HFHS (**Figura 8A**).

Para investigar melhor o efeito do CCEF no metabolismo da glicose, foi realizado o teste intraperitoneal de tolerância à glicose (ipGTT). A principal finalidade deste teste é observar se há uma redução na glicemia após a administração da solução de glicose, através da captação de glicose pelos tecidos. Nos primeiros tempos do teste não houve diferença significativa entre os grupos estudados (**Figura 8B**). Nos tempos 45, 60 e 90 min foi possível observar uma melhora na absorção de glicose nos grupos suplementados com CCEF, independente da dose, sugerindo que esta suplementação possa ter um efeito benéfico na manutenção da glicemia, o que foi confirmado no resultado do incremento de glicose demonstrada na área sob a curva (AUC) (**Figura 8B – insert**) dos animais que receberam CCEF em ambas as doses. Sendo assim, os extratos fenólicos proporcionaram menor incremento de glicose quando comparados ao grupo HFHS.

Além disso, com base nos dados obtidos de insulinemia e glicemia, foi calculado o índice HOMA-IR (**Figura 8C – insert**). O grupo que recebeu apenas dieta HFS demonstrou uma redução significativa da sensibilidade à insulina em relação ao grupo suplementado com CCEF 2 (**Figura 8C**). Considerando-se que o HOMA-IR seja uma ferramenta amplamente utilizada em estudos epidemiológicos para verificar a presença de resistência à insulina em indivíduos com DHGNA (SALGADO et al., 2010), pode-se dizer a suplementação com a maior dose do extrato foi eficiente em melhorar a sensibilidade à insulina em relação ao grupo HFHS.

Extratos aquosos de camu-camu também já foram relacionados com a eficácia na inibição da α -glicosidase (FUJITA et al., 2015). Alguns polifenóis encontrados no camu-camu, incluindo a quercetina, a miricetina, elagitaninos e EGCG, têm sido demonstrados como importantes inibidores do transportador de glicose dependente de sódio (SGLT 1) e GLUT 2 *in vitro* (HANHINEVA et al., 2010). Entretanto, como a tolerância à glicose foi analisada via intraperitoneal, não é possível afirmar que a melhoria da homeostase glicídica obtida neste estudo possa ser atribuída à redução de absorção intestinal de carboidratos.

Alguns estudos mostraram que os extratos de *berries* aumentaram significativamente a absorção de glicose, induzindo a translocação de GLUT 4 e inibindo a produção hepática de glicose, que normalmente está elevada em indivíduos com DHGNA, através de um mecanismo independente de insulina envolvendo AMPK (EID; BRAULT; OUCHFON & THONG; HEYMAN; LINDÉN et al., 2014).

Figura 8. Metabolismo da glicose. Glicemia inicial e final (A), teste intraperitoneal de tolerância à glicose (ipGTT) e área sob a curva (AUC) (B), insulina e HOMA-IR* (C) de camundongos C57BL/6 alimentados com dieta HFS e água (grupo HFHS) ou extratos fenólicos de camu-camu por gavagem em concentrações diferentes (CCEF 1 e CCEF 2). Valores expressos como média $\pm$ DP (n=9-10/grupo). *Calculado como: $HOMA-IR = (insulina \times glicose) / 22,5$. ^{A,B,C} Letras maiúsculas diferentes sobre as colunas indicam diferença estatística ($p < 0,05$). ^{a,b,c} Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$). # ($p < 0,05$) HFHS versus CCEF 1e CCEF 2.

Os animais suplementados com CCEF apresentaram menores níveis de glicose de jejum ao final do experimento. Particularmente o grupo CCEF 2 demonstrou melhora efetiva na sensibilidade à insulina, como demonstrado pelo HOMA-IR. Sendo assim, a ingestão reduzida de alimentos associada à diminuição da ingestão de sacarose total em animais suplementados com CCEF pode ser parcialmente responsável pela melhora da homeostase da glicose, o que, conseqüentemente, protege as células pancreáticas contra a toxicidade da glicose em excesso.

A resistência à insulina no músculo esquelético também ocorre conjuntamente em outros órgãos periféricos. Entretanto, o desvio dos substratos a partir do músculo comprometido pode ser direcionado para o fígado, que ainda não apresenta sinais de resistência à insulina, para que possam ser metabolizados. Os mecanismos envolvidos não estão totalmente esclarecidos, porém, já foi descrito que a resistência à insulina no músculo esquelético pode ser um fator inicial para o desenvolvimento da DHGNA (KIM et al., 2001; WANG et al., 2013). O desenvolvimento da DHGNA em camundongos alimentados com uma dieta com elevado teor de lipídios saturados demonstrou estar relacionada, em um primeiro momento, com a resistência à insulina no músculo, e não necessariamente no fígado (ASSAI et al., 2014).

A **figura 9** apresenta o conteúdo intra-hepático de glicogênio, representado pela coloração em P.A.S. Observa-se que o CCEF na maior dose foi eficiente em regular o metabolismo de glicogênio intra-hepático, ficando similar ao grupo Ct. No entanto, nota-se que os grupos HFHS e CCEF 1 apresentaram uma saturação na síntese de glicogênio nos hepatócitos, possivelmente ocasionado pelo maior consumo de ração e conseqüentemente de sacarose ofertada pela dieta HFS, como mostrado anteriormente (**Figura 6A**).

Neste contexto, ressalta-se a importância da atuação da insulina em diversos mecanismos celulares, como, por exemplo, a síntese de glicogênio hepático (CAVELHEIRA; ZECCHIN; SAAD, 2002). Como mencionado anteriormente, o CCEF na maior dose foi eficiente em melhorar a sensibilidade à insulina quando comparado ao grupo HFHS (**Figura 8C**). O glicogênio é a principal fonte de armazenamento de carboidratos no fígado e, quando necessário, é convertido em glicose para ser distribuído para todos os tecidos (MONETTI, 2007). Existem evidências de que a resistência à insulina no músculo esquelético em indivíduos não obesos possa predispor ao aumento da síntese *de novo* de ácidos graxos no fígado, favorecendo o acúmulo de TAG intra-hepático (PETERSEN et al., 2007).

Atualmente discute-se a dissociação da resistência à insulina no fígado como um dos fatores iniciais para o desenvolvimento da DHGNA. A glicose proveniente de dietas ricas em carboidratos, especialmente a sacarose, é direcionada para o músculo esquelético para que possa ser armazenada como glicogênio. Entretanto, devido à resistência à atuação da insulina em seus receptores, a glicose é direcionada para o fígado, que ainda não está comprometido, para ser estocada na forma de glicogênio (PETERSEN et al., 2007; RABOR et al., 2011; WANG et al., 2013). Sendo assim, a saturação do glicogênio intra-hepático contribui para que a glicose excedente seja conduzida para a síntese *de novo* de ácidos graxos, atuando progressivamente na patogenia da DHGNA (SCHUTZ, 2004).

Figura 9. Glicogênio hepático. Coloração em P.A.S do tecido hepático (A), quantificação de glicogênio hepático (μmol de glicose/g de tecido hepático) (B) de camundongos C57BL/6 alimentados com dieta padrão (Ct) ou dieta HFS e água (grupo HFHS) ou extratos fenólicos de camu-camu por gavagem em concentrações diferentes (CCEF 1 e CCEF 2). Valores expressos como média $\pm$ DP (n= 7-8/grupo). ^{a,b,c} Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$).

Em contrapartida, Nagao et al. (2013) suplementaram camundongos geneticamente modificados com 0,5% de resveratrol, um importante polifenol presente no vinho, durante 4 semanas, e obtiveram um aumento de glicogênio hepático em relação ao grupo não tratado. Diferentemente do presente estudo, foi utilizada apenas uma dieta hiperlipídica sem adição de sacarose. Além disso, utilizaram como modelo experimental camundongos OLETF (*Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty*) que possuem susceptibilidade a desenvolverem resistência à insulina no fígado. A obesidade e a hiperfagia destes animais devem-se a um alelo nulo para a síntese do receptor de colecistocinina A, um importante hormônio gastrointestinal que participa do metabolismo lipídico (LIN; THOMAS; STORLIEN; HUANG, 2000).

4.2.3. Metabolismo lipídico

A suplementação com CCEF não foi eficiente em melhorar o perfil lipídico dos animais que receberam a dieta HFS (**Figura 10**). Da mesma forma, os grupos que receberam dieta HFS apresentaram valores de colesterol total, LDL-c e VLDL significativamente maiores (aproximadamente duas vezes) em relação ao grupo Ct (dados não mostrados). A suplementação com CCEF não foi capaz de diminuir os níveis séricos de colesterol total (**Figura 10B**), LDL-c (**Figura 10C**) e VLDL (**Figura 10E**) associados ao consumo da dieta HFHS.

O aumento de TAG, colesterol total e LDL-c e diminuição da HDL-c são características essenciais para o diagnóstico de dislipidemias (FORTI; DIAMENT, 2006; PEREIRA et al., 2008). Este aumento também é considerado um dos fatores primordiais para o desenvolvimento de DCV, como a aterosclerose definida pelo acúmulo de LDL-oxidada no espaço subendotelial (KANETO et al., 2010; XAVIER et al., 2013). Além disso, a análise do perfil lipídico é uma ferramenta importante na investigação da patogênese da DHGNA em indivíduos obesos (SOUZA et al., 2005; MACHADO; SHAAN; SERAPHIM et al., 2006; FERRARI, 2007).

No presente estudo, não foi possível observar o efeito direto dos fenólicos sobre o perfil lipídico dos animais, porém, observou-se uma tendência para a diminuição do TAG plasmático ($p = 0,0528$) do grupo CCEF 2 em relação ao grupo que não recebeu suplementação do extrato de camu-camu. Extratos de outros frutos, como o mirtilo, a groselha

e a framboesa, foram associados aos efeitos benéficos sobre o perfil lipídico de camundongos alimentados com uma dieta rica em lipídios saturados através do aumento de excreção de TAG (HEYMAN et al., 2014). Da mesma forma, DONADO-PESTANA et al. (2015) apontaram que os extratos fenólicos do fruto cambuci (*Campomanesia phaea* O. Berg), na dose de 32 mg/kg de peso corporal, reduziram efetivamente as concentrações plasmáticas de LDL-c, aumentando o HDL, agindo como um fator protetor para DCV em camundongos.

Figura 10. Metabolismo de lipídios plasmáticos. Triacilglicerol (mg/dL) (A), Colesterol total (mg/dL) (B), LDL-c (mg/dL) (C), HDL-c (mg/dL) (D), VLDL (mg/dL) (E) de camundongos C57BL/6 alimentados com dieta HFS e água (grupo HFHS) ou extratos fenólicos de camu-camu por gavagem em concentrações diferentes (CCEF 1 e CCEF 2). Valores expressos como média $\pm$ DP (n=9-10/grupo). ^{a,b,c} Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$).

4.2.4. Função hepática

A suplementação com CCEF foi eficiente em prevenir o aumento de atividade enzimática da ALT em relação ao grupo HFHS (**Figura 11**), sugerindo que o extrato fenólico do camu-camu utilizado neste estudo pudesse ter um efeito protetor para a lesão hepática causada pela dieta HFS.

Além do conteúdo intra-hepático de lipídios, a atividade das transaminases ou aminotransferases (AST e ALT) é um importante biomarcador para determinar o dano celular devido à correlação entre a quantidade encontrada no plasma e as alterações histomorfológicas no parênquima hepático (COTRIM et al., 2011). Estas transaminases estão distribuídas nos tecidos como rim, fígado, músculo e cérebro e sua liberação para os espaços extracelulares danifica as células, causando um estresse oxidativo e um quadro inflamatório produzido pela dislipidemia. Podem estar presentes no citosol da célula, na mitocôndria ou em ambas. A AST é encontrada tanto na matriz mitocondrial quanto no citosol. Já a ALT é predominantemente citosólica e está envolvida no metabolismo de aminoácidos e gliconeogênese (VROON, D.H.; ISRAILI, Z, 1990).

Figura 11. Atividade das enzimas hepáticas aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT). Aspartato aminotransferase (AST) (U/L) (A) e alanina aminotransferase (ALT) (U/L) (B) de camundongos C57BL/6 alimentados com dieta HFS e água (grupo HFHS) ou extratos fenólicos de camu-camu por gavagem em concentrações diferentes (CCEF 1 e CCEF 2). Valores expressos como média $\pm$ DP (n=5/grupo). ^{a,b,c} Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$).

Embora a elevação das aminotransferases seja relacionada com dano celular na maioria dos casos de indivíduos com DHGNA, representado pelo aumento unicamente da ALT, apenas esta análise como investigação na patogenia desta doença não é suficiente para indicar o grau de lesão hepática (FISHBEIN; MINER; MOGREN, 2003).

Neste sentido, os compostos fenólicos presentes no extrato do camu-camu foram capazes de minimizar esse dano celular a nível citosólico, reduzindo significativamente a atividade da enzima alanina aminotransferase. Do mesmo modo, a suplementação por 8 semanas com extrato de chá verde (3,2 g EGCG/kg peso corporal), também rico em compostos fenólicos, em especial a epigallocatequina-3-galato (EGCG) - neste caso, um precursor dos taninos condensados -, foi eficiente na menor incidência da DHGNA nos animais, prevenindo o aumento do peso relativo do fígado, de conteúdo de lipídios hepáticos e da atividade enzimática da alanina aminotransferase (BOSE et al., 2008). Todavia, ressalta-se que esta dose foi aproximadamente 200 vezes maior que a dose utilizada neste estudo.

Como descrito previamente neste estudo, o fígado é o órgão central do metabolismo, pois compartilha substratos e energia como um sistema metabólico, processando e sintetizando múltiplas substâncias que são transportadas para outras áreas do organismo e realiza dezenas de outras funções, como participação no metabolismo de carboidratos, proteínas e lipídios. Embora a maioria das células metabolize lipídios, algumas peculiaridades do metabolismo lipídico ocorrem, principalmente, no fígado (ANDERSON; BORLAK, 2008).

A **figura 12** mostra o efeito da suplementação do CCEF na patogenia da DHGNA. Verificou-se que o CCEF na maior dose foi eficiente na prevenção do aumento do peso absoluto (**Figura 12A**) e relativo do fígado (**Figura 12B**) e do TAG intra-hepático, claramente representado na histopatologia em Oil Red, em relação ao grupo que recebeu apenas a dieta HFS, sem suplementação, e ao grupo com a menor dose do CCEF (**Figura 12C**). Estes dados sugerem que os compostos fenólicos presentes no extrato do camu-camu na maior dose, possam ter um efeito positivo no desenvolvimento da DHGNA.

Um estudo realizado por CAO et al. (2014) também obteve o mesmo efeito encontrado neste trabalho em relação aos depósitos lipídicos nas células hepáticas. Nele foram administradas duas doses de hidroxitirosol (10 mg/kg/dia e 50 mg/kg/dia, por gavagem), um composto fenólico presente no azeite de oliva, em animais com síndrome metabólica induzida pela dieta por 17 semanas. Além da redução do TAG intra-hepático, confirmada nas análises histopatológicas, houve redução da expressão gênica da SREBP 1-c e a diminuição da

atividade enzimática da FAS. A SREBP 1-c é um fator de transcrição essencial para a síntese *de novo* de ácidos graxos, pois ativa genes como a FAS e a ACC após sua clivagem e direcionamento para o núcleo do hepatócito. Considerando os resultados obtidos até o momento, os compostos fenólicos presentes no extrato do camu-camu poderiam ter um efeito importante na regulação das enzimas envolvidas no metabolismo lipídico.

Alguns estudos defendem que o nível de energia contida no fígado funcione com um regulador de apetite, sinalizando para o cérebro, via neurônios sensoriais vagais, a necessidade de alimentar-se. Dessa forma, quando a oxidação hepática de ácidos graxos está baixa, o apetite está aumentado. Como mencionado anteriormente, os animais que receberam a maior dose do extrato fenólico de camu-camu consumiram menos ração em relação aos outros grupos (**Figura 6A**). Portanto, considerando que os fenólicos possam regular o apetite, é possível que isto seja um reflexo da estimulação da oxidação de ácidos graxos no fígado (KAMPHUS; MELA; WESTERTERP-PLANTENGA, 2003; RAINS; AGARWAL; MAKI, 2011).

Outras evidências de que os polifenóis podem modular a oxidação de ácidos graxos já foram descritas. MURASE et al. (2011) mostraram que a suplementação com extrato de café, sem a cafeína, em camundongos, durante 15 semanas, poderia modular a expressão do malonil-CoA, em decorrência da redução do acetil-CoA carboxilase (ACC2), resultando em aumento da oxidação dos ácidos graxos contribuindo para a redução de TAG intra-hepático.

Salamone et al. (2012) estudaram o efeito do suco de laranja moro (*Citrus sinensis*), rico em antocianinas, no desenvolvimento da DHGNA em camundongos C57BL/6 durante 12 semanas. Foi observado que houve uma redução significativa no conteúdo de TAG intra-hepático. Isto foi justificado pelo aumento da expressão do receptor ativado por proliferadores de peroxissoma- α (PPAR- α) e da acil-CoA oxidase (ACOX), indicando aumento na oxidação de ácidos graxos.

Recentemente, ANHÊ et al. (2014) suplementaram extrato bruto de compostos fenólicos do fruto cranberry (200 mg/kg peso corporal) por gavagem, durante 8 semanas, e obtiveram como resultado a redução do conteúdo de TAG intra-hepático e peroxidação lipídica de camundongos C57BL/6. Diferentemente deste estudo, o extrato de cranberry não continha somente os compostos bioativos da fruta, como as proantocianidinas, mas também açúcares e fibras

O aumento da atividade de enzimas envolvidas na síntese *de novo* de ácidos graxos, tais como a ACC, esterol-CoA dessaturase (SCD) e a FAS, pode ocasionar maiores depósitos de triacilgliceróis no citosol das células, acarretando mudança drástica da morfologia celular e dificultando o funcionamento das organelas. O aumento da atividade destas enzimas lipogênicas é comumente encontrado em indivíduos obesos que apresentam DHGNA. A redução de suas atividades pode ser um ponto fundamental para a regulação no metabolismo de ácidos graxos nestes indivíduos, melhorando o prognóstico para esta doença (LOFTUS et al., 2000).

A patogenia da DHGNA é complexa e está intimamente associada à obesidade. Com o aumento substancial da obesidade, o interesse pelo esclarecimento da etiologia desta doença vem crescendo cada vez mais. Sabe-se que o desenvolvimento da DHGNA pode ou não estar associado à resistência à insulina e à inflamação hepática. Entretanto, alguns indivíduos apresentam inflamação no parênquima hepático, sem sinais de resistência à insulina. Possivelmente, a ativação de vias inflamatórias pode ocorrer como um mecanismo que antecede o surgimento da resistência à insulina propriamente dita, sendo este um processo que ocorre de maneira gradual (JORNAYVAZ et al.; RABOR et al.; 2011; WANG et al., 2013).

Sendo assim, foi realizada a análise de alguns marcadores inflamatórios, como a Proteína-C Reativa (PCR) e a prostaglandina E₂ (PGE₂). Observa-se que o CCEF na maior dose foi eficiente em reduzir significativamente a PCR (**Figura 13A**) e a PGE₂ (**Figura 13B**) de animais alimentados com dieta HFS.

A PCR é considerada uma proteína de fase aguda, sintetizada pelo fígado e regulada por citocinas, como a IL-6, o TNF- α e a IL-1 (ABDELLAOUI; KHAFFAF, 2007). Ainda que o fígado seja a principal fonte de PCR, este marcador pode ser encontrado também nos adipócitos (FRANCISCO; HERNÁNDEZ; SIMÓ, 2006; DARVALL et al., 2007). Os níveis aumentados de PCR em indivíduos obesos com DHGNA estão comumente presentes em situações crônicas inflamatórias, como a aterosclerose. Portanto, o aumento da PCR pode predizer a presença de eventos cardiovasculares independente do nível de dislipidemia (RIDKER; WILLERSON, 2004). Além disso, a redução gradual na sensibilidade à insulina no fígado e a presença de fatores de risco para síndrome metabólica e DHGNA podem acarretar a elevação da PCR (BROWNING, 2004; BAHIA et al., 2008).

Figura 12. Alterações hepáticas. Peso absoluto (A) e relativo (B) do fígado e conteúdo de triacilglicerol (TAG) intra-hepático e histopatologia em Oil Red (C) de camundongos alimentados com dieta HFS e água (grupo HFHS) ou extratos fenólicos de camu-camu por gavagem em concentrações diferentes (CCEF 1 e CCEF 2). Valores expressos como média $\pm$ DP ($n=5$ /grupo). ^{a,b,c} Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística ($p<0,05$).

Em indivíduos obesos em estado de inflamação crônica, a liberação de PGE_2 a partir das células de Kupffer desencadeia o processo de resistência hepática à insulina, podendo predispor estes indivíduos a outros tipos de doenças hepáticas consideradas mais graves, como a esteatohepatite não alcoólica (NEYRINCK et al., 2009; HENKEL et al., 2011). Diversos estudos demonstram os efeitos das *berries* na redução da inflamação de indivíduos com DHGNA (FRANK et al., 2002; GUO et al., 2012; CHANG et al., 2013). Neste contexto, o resveratrol já foi descrito como um potente modulador dos eicosanoides através da inibição da via das ciclooxigenases (COX) (KUNDU et al., 2006). Os compostos fenólicos presentes no extrato de camu-camu foram eficientes em reduzir os biomarcadores inflamatórios na DHGNA em camundongos obesos, impactando em uma melhora da progressão da doença.

Figura 13. Biomarcadores de inflamação hepática. Proteína – C Reativa (mg/dL) (A) e PGE_2 (pg/mL) (B) no fígado de camundongos alimentados C57BL/6 com dieta HFS e água (grupo HFHS) ou extratos fenólicos de camu-camu por gavagem em concentrações diferentes (CCEF 1 e CCEF 2). Valores expressos como média $\pm$ DP (n=5/grupo). ^{a,b,c} Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$).

Em suma, a alimentação com uma dieta rica em lipídios e sacarose favoreceu o desenvolvimento de DHGNA em camundongos C57BL/6. Entretanto, neste estudo, a administração de compostos fenólicos na maior dose foi capaz em reduzir a eficiência energética, melhorar a homeostase glicídica e sensibilidade à insulina, além de regular o conteúdo de glicogênio intra-hepático e reduzir o TAG intra-hepático e biomarcadores inflamatórios, evitaram o avanço do quadro da DHGNA. No entanto, mais estudos são essenciais para elucidar os mecanismos exatos destes efeitos moduladores e avaliar os potenciais efeitos terapêuticos do CCFE sobre a homeostase lipídica.

5. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho mostraram que os compostos fenólicos presentes no fruto camu-camu foram eficientes em reduzir os fatores de risco para a progressão da DHGNA. Este efeito foi associado, principalmente, com a ingestão reduzida de alimentos, gerando menor glicolipotoxicidade. Tais compostos fenólicos melhoraram a sensibilidade à insulina, níveis de glicose de jejum, auxiliaram na regulação de glicogênio e na redução de TAG intra-hepático e do dano celular causado pela elevação da ALT. Além disso, o CCEF na maior dose demonstrou ter propriedades anti-inflamatórias importantes. A inclusão de alimentos que auxiliem no aumento da saciedade pode atuar como adjuvantes na manutenção do peso corporal, diminuindo o risco de desenvolvimento de doenças metabólicas.

Estes dados são importantes para ajudar a esclarecer o possível efeito que estes compostos fenólicos teriam na patogênese da DHGNA, assim como contribuir para elucidar os principais mecanismos envolvidos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDELLAOUI, A.; AL-KHAFFAF, H. C-reactive protein (CRP) as a marker in peripheral vascular disease. **Eur J Vasc Endovasc Surg.** 20:1-5, 2007.
- ADAMS, L.S.; SEERAM, N.P.; AGGARWAL, B.B.; TAKADA, Y.; SAND, D.; HEBER, D. Pomegranate juice, total pomegranate tannins and punicalagin suppress inflammatory cell signaling in colon cancer cells. **J Agric Food Chem.** 54:980–5, 2006.
- ADAMS, L.A.; ÂNGULO, P. Recent concepts in non-alcoholic fatty liver disease. **Diabetic Med.** 22:1129–33. 9, 2005.
- ADAMS, L.A.; LYMP, J.F.; SAUVER, J.; SANDERSON, S.O.; LINDOR, K.D.; FELDSTEIN, A. et al. The natural history of nonalcoholic fatty liver disease: a population-based cohort study. **Gastroenterology.** 129:113–121, 2005.
- ANGULO, P. Long-term mortality in nonalcoholic fatty liver disease: is liver histology of any prognostic significance? **Hepatology.** 51(2):373-5, 2010.
- ANHÊ, F.F. et al. Polyphenols and type 2 diabetes: A prospective review. **PharmaNutrition**, v. 1, n. 4, p. 105–114, 2013.
- ARABBI, P.R.; GENOVESE, M.I.; LAJOLO, F.M. Flavonoids in vegetable foods commonly consumed in Brazil and estimated ingestion by the Brazilian population. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 52, n. 5, p. 1124–1131, 2004.
- AUGUET, T.; BERLANGA, A.; GUIU-JURADO, E.; MARTINEZ, S.; PORRAS, J.A.; ARAGONES, G.; SABENCH, F.; HERNANDEZ, M.; AGUILAR, C.; SIRVENT, J.J.; et al. Altered fatty acid metabolism-related gene expression in liver from morbidly obese women with non-alcoholic fatty liver disease. **Int. J. Mol. Sci.** 15, 22173–22187, 2014.
- BAHIA, L.; AGUIAR, L.G.; VILLELA, N.; BOTTINO, D.; GODOY-MATOS, A.F.; GELO NEZE, B. et al. Relationship between adipokines, inflammation, and vascular reactivity in lean controls and obese subjects with metabolic syndrome. **Clin Sci.** 61(5):433-40, 2006.
- BAHIA, L. R.; ARAÚJO, D.V. Impacto econômico da obesidade no Brasil. **Rev Hos. Univers. Pedro Ernesto.** Disponível em: http://revista.hupe.uerj.br/detalhe_artigo.asp?id=455 .Acesso em 20/06/2016.
- BELLENTANI, S.; MARINO, M. Epidemiology and natural history of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). **Ann Hepatol.** 8:S4–8, 2009.
- BRADBURY, M.W. Lipid metabolism and liver inflammation. I. Hepatic fatty acid uptake: Possible role in steatosis. **Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.** 290, G194–G198, 2006.

BRASIL. VIGITEL - VIGILÂNCIA DE FATORES DE RISCO E PROTEÇÃO PARA DOENÇAS CRÔNICAS POR INQUÉRITO TELEFÔNICO. Estimativas sobre frequência e distribuição sociodemográfica de fatores de risco e proteção para doenças crônicas nas capitais dos 26 estados brasileiros e no Distrito Federal em 2014. **Ministério da saúde**. p164. 70-89. Brasília, 2015.

BROWNING, L.M.; JEBB, S.A; MISHRA, G.D.; COOKE, J.H.; O'CONNELL, M.A.; CROOK, M.A. et al. Elevated sialic acid, but not CRP, predicts features of the metabolic syndrome independently of BMI in women. **Inter J Obes**. 28:1004-10, 2004.

CARVALHANA, S.; MACHADO, M.V.; CORTEZ-PINTO, H. Improving dietary patterns in patients with nonalcoholic fatty liver disease. **Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care**. 15: 468–73, 2012.

CLARK, J.M.; BRANCATI, F.L.; DIEHL, A.M. The prevalence and etiology of elevated aminotransferase levels in the United States. **Am. J. Gastroenterol**. 98: 960–67, 2003.

CROZIER, A.; JAGANATH, I. B.; CLIFFORD, M. N. Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. **Natural Product Reports**, v. 26, p. 1001-1043, 2009.

CORBIN, K.D.; ZEISEL, S.H. Choline metabolism provides novel insights into nonalcoholic fatty liver disease and its progression. **Curr. Opin. Gastroenterol**. 28: 159–65, 2012.

CHALASANI, N.; YOUNOSSI, Z.; LAVINE, J.E. et al. The diagnosis and management of non-alcoholic fatty liver disease: practice guideline by the American Gastroenterological Association, American Association for the Study of Liver Diseases, and American College of Gastroenterology. **Gastroenterology**.142: 1592–609, 2012.

CHANG, J.J; HSU, M. J.; HUANG H. P. et al., “Mulberry anthocyanins inhibit oleic acid induced lipid accumulation by reduction of lipogenesis and promotion of hepatic lipid clearance,” **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, vol. 61, no. 25, pp. 6069–6076, 2013.

DARVALL, K.A.L.; SAM R.C.; SILVERMAN, S.H.; BRADBURY, A.W.; ADAM, DJ. Obesity and thrombosis. **Eur J Vasc Endovasc Surg**. 33:223-33, 2007.

DAY, C. P.; JAMES, O. F. W. Steatohepatitis: a tale of two ‘hits’? **Gastroenterology**, vol. 114, no. 4 I, pp. 842–845, 1998.

DAY, C.R.M; TEIXEIRA, R.J. Prevalência de obesidade e obesidade abdominal em amostra populacional do Ambulatório de Medicina Integral. **Arq Bras Endocrinol Metabol**. 51(6):S385, 2007.

DEL RIO; et al. Dietary (Poly) phenolics in Human Health: Structures, Bioavailability, and Evidence of Protective Effects Against Chronic Diseases (review). **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 18, n. 14, p. 1818-1891, 2013.

DEMIR, M.; LANG, S.; STEFFEN, H. Nonalcoholic fatty liver disease: current status and future directions. **Journal of Digestive Diseases**, vol. 16, no. 10, pp. 541–557, 2015.

DONNELLY, K.L.; SMITH, C.I.; SCHWARZENBERG, S.J.; JESSURUN, J.; BOLDT, M. D.; PARKS, E. J. Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. **Journal of Clinical Investigation**. 115, 1343–135, 2005.

DUMAS, M. E.; KINROSS, J.; NICHOLSON, J. K. Metabolic phenotyping and systems biology approaches to understanding metabolic syndrome and fatty liver disease. **Gastroenterology**, vol. 146, no. 1, pp. 46–62, 2014.

ENOMOTO, N.; IKEJIMA, K.; YAMASHINA, S.; et al. Kupffer cell-derived prostaglandin E(2) is involved in alcohol-induced fat accumulation in rat liver. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**. 279:G100–G106, 2000.

FARRELL, G.C.; LARTER, C.Z. Nonalcoholic fatty liver disease: from steatosis to cirrhosis. **Hepatology**. 43:S99–112, 2006.

FEROLLA, S.M; FERRARI, T.C.; LIMA, M.L.; et al. Dietary patterns in Brazilian patients with nonalcoholic fatty liver disease: a cross-sectional study. **Clinics** (São Paulo). 68: 11–17, 2013.

FLEMING, T.; NG, M. et al. Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study. **Lancet**. Aug 30; 384 (9945): 766-81, 2014.

FRANCISCO, G.; HERNÁNDEZ, C.; SIMÓ, R. Serum markers of vascular inflammation in dyslipidemia. **Clin Chim Acta**. 369:1-16. 15, 2006.

FRACASSETTI, D; COSTA, C; MOULAY, L; BARBERÁN, F.A.T. Ellagic acid derivatives, ellagitannins, proanthocyanidins and other phenolics, vitamin C and antioxidant capacity of two powder products from camu-camu fruit (*Myrciaria dubia*). **Food Chem**. 15;139(1-4):578-88, 2013.

FRAGA, C. G.; OTEIZA, P. I. Dietary flavonoids: Role of (-)-epicatechin and related procyanidins in cell signaling. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 51, n. 4, p. 813–823, 2011.

FRANK J.; KAMAL-ELDIN, A.; LUND, H.; VESSBY, B. “Effects of dietary anthocyanins on tocopherols and lipids in rats,” **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, vol. 50, no. 25, pp. 7226–7230, 2002.

GONÇALVES, A. E. S. S.; LAJOLO, F. M.; GENOVESE, M. I. Chemical composition and antioxidant/antidiabetic potential of brazilian native fruits and commercial frozen pulps. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 8, p. 4666–4674, 2010.

GUO, H.; LIU, G; ZHONG, R.; .WANG Y; WANG, D.; XIA, M.; “Cyanidin-3-O- β -glucoside regulates fatty acid metabolism via an AMP-activated protein kinase-dependent signaling pathway in human HepG2 cells,” **Lipids in Health and Disease**, vol. 11, article 10, 2012.

GRECO, D.; KOTRONEN, A.; WESTERBACKA, J.; PUIG, O.; ARKKILA, P.; KIVILUOTO, T.; LAITINEN, S.; KOLAK, M.; FISHER, R.M.; HAMSTEN, A., et al. Gene expression in human NAFLD. **Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.** 294, G1281–G1287, 2008.

HUANG, D.; DHAWAN, T.; YOUNG, S.; YONG, W.H.; BOROS, L.G.; HEANEY, A.P. Fructose impairs glucose-induced hepatic triglyceride synthesis. **Lipids Health Dis.** 2011;10:20.

HENKEL; K.; SCHANZE, N.; VOGEL, H.; SCHÜRMAN, A.; SPRUSS, A.; BERGHEIM, I.; PÜSCHEL, G. Stimulation of fat accumulation in hepatocytes by PGE₂-dependent repression of hepatic lipolysis, β -oxidation and VLDL-synthesis, Janin, **Nature**, 2012.

JENSEN-URSTAD, A.P.L.; SEMENKOVICH, C. F. Fatty acid synthase and liver triglyceride metabolism: house keeper or messenger? **Biochimica et Biophysica Acta**. 1821, 747–753, 2012.

JOHNSON, A. R.; MILNER, J. J.; MAKOWSKI, L. The inflammation highway: metabolism accelerates inflammatory traffic in obesity. **Immunological Reviews**, vol. 249, no. 1, pp. 218–238, 2012.

JORNAYVAZ, F.R. et al. Hepatic insulin resistance in mice with hepatic overexpression of diacylglycerol acyltransferase 2. **Proc Natl Acad Sci USA**. 108:5748–5752, 2011.

KAUR, J. A. comprehensive review on metabolic syndrome. **Cardiol Res Pract.**;943162, 2014.

KELLY, T.; YANG, W.; CHEN, C. S.; REYNOLDS, K.; HE, J. Global burden of obesity in 2005 and projections to 2030. **International Journal of Obesity**, 32, 1431–1437, 2008.

KOPELMAN, PG. Obesity as a medical problem. **Nature**. 404(6778):635-43, 2000.

KOLAK, M.; WESTERBACKA, J.; VELAGAPUDI, V.R.; WAGSATER, D.; YETUKURI, L.; MAKKONEN, J.; et al. Adipose tissue inflammation and increased ceramide content characterize subjects with high liver fat content independent of obesity. **Diabetes**. 56:1960–1968, 2007.

KOO, S.H. Nonalcoholic fatty liver disease: Molecular mechanisms for the hepatic steatosis. **Clin. Mol. Hepatol.** 19, 210–215, 2013.

KIRPICH, I. A.; MARSANO, L. S.; MCCLAIN, C. J.; Gut-liver axis, nutrition, and non-alcoholic fatty liver disease. **Clinical Biochemistry**, vol. 48, no. 13-14, pp. 923–930, 2015.

KIM, H.J.; TSOY, I.; PARK, J.M.; CHUNG, J.I.; SHIN, S.C.; CHANG, K.C. Anthocyanins from soybean seed coat inhibit the expression of TNF- α -induced genes associated with ischemia/reperfusion in endothelial cell by NF- κ B-dependent pathway and reduce rat myocardial damages incurred by ischemia and reperfusion in vivo. **FEBS Lett.** 580(5):1391-7, 2006.

KUSHNER, R. Treatment of the Obese Patient (Contemporary Endocrinology) **Totowa: Humana Press.** p. 158. ISBN 1-59745-400-1, FLEMING 2007.

KLEINER, D.E.; BRUNT, E.M.; VAN NATTA, M.; BEHLING, C.; CONTOS, M.J.; CUMMINGS, O.W.; et al. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. **Hepatology.**41:1313–1321, 2005.

LIM, Y.S.; KIM, W.R. The global impact of hepatic fibrosis and end-stage liver disease. **Clin Liver Dis.**12:733-46, 2008.

LIN, P.; LU, J.; WANG ET AL, Y. Naturally occurring stilbenoid TSG reverses non-alcoholic fatty liver diseases via gut-liver axis. **PLoS ONE**, vol.10, no.10, 2015.

LIHONG, C.; YANG, G.; XU, X.; GRANT, G.; LAWSON, J.; BOHLOOLY-Y, M.; FITZGERALD, G. Cell Selective Cardiovascular Biology of Microsomal Prostaglandin E Synthase-1. **NIH Public Access**, 2015.

LUDWIG, M.M. A nova rainha da vitamina C: camu-camu, saúde é vital. São Paulo: **Azul.** p.15-23, 1996.

MAERSK, M.; BELZA, A.; STODKILDE-JORGENSEN, H. et al. Sucrose-sweetened beverages increase fat storage in the liver, muscle, and visceral fat depot: a 6-mo randomized intervention study. **Am. J. Clin. Nutr.** 95: 283–9, 2012.

MARCHESINI, G.; BUGIANESI, E.; FORLANI, G.; CERRELLI, F.; LENZI, M.; MANINI, R. et al. Nonalcoholic fatty liver, steatohepatitis, and the metabolic syndrome. **Hepatology.** 37:917–923, 2003.

MÁRQUEZ, M.F.; MORALES, M.M.R.; POUSAILLE, C.C.; MIRAS, A.G.; MARTIN, M.C.; ALBENDEA, J.V. et al. Prevalence and associated factors to non-alcoholic steatohepatitis in obese patients subjected to bariatric surgery. **Cir Esp.**84:313–7, 2008.

MÉNDEZ-SÁNCHEZ, N.; ARRESE, M.; ZAMORA-VALDÉS, D.; URIBE, M. Current concepts in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. **Liver Int.**27:423- 33, 2007.

MOTA, M.G.; SILVA, J.F.; BASTOS, T.X. Levantamento de ocorrência de camu-camu (*Myrciaria dubia* (H.B.K) McVaugh) na Amazônia e coleta de germoplasma no alto Solimões (Amazonas-Brasil). Belém: **Embrapa Amazônia Oriental**, 1996.

MUSSO, G.; GAMBINO, R.; CASSADER, M. Recent insights into hepatic lipid metabolism in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). **Prog. Lipid Res.** 48, 1–26, 2009.

MUSSO, G.; CASSADER, M.; COHNEY, S. et al. Emerging liver kidney interactions in nonalcoholic fatty liver disease. **Trends in Molecular Medicine**, vol.21, no.10, pp.645–662, 2015.

MACDONALD, P.E; RORSMAN, P. The in and out secretion from pancreatic beta cell: lessons from models of impaired insulin secretion. **Am J Physiology (Bethesda)** 22: 113, 2007.

MCCARTHY, E.M.; RINELLA, M.E. The role of diet and nutrient composition in nonalcoholic Fatty liver disease. **J. Acad. Nutr. Diet.** 112: 401–9, 2012.

MCCARTHY, E. Nonalcoholic Fatty Liver Disease. **Today's Dietitian**. vol. 16 No. 1p. 48, 2014. Disponível em <http://www.todaysdietitian.com/newarchives/010614p48.shtml>. Acesso em 21/06/2016.

NÓBREGA, A.C.; SANTOS, M. Camu-camu (*Myrciaria dubia* (H.B.X.) McVaugh), uma explosão de vitamina C. Belém: UFPA. 41 p, 1996.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). Obesity and overweight. Fact sheet N°311 (january 2015). Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>. Acesso em 21/06/2016.

NTAMBI, J.M.; BERNS, K.; STEENBOCK, V.D. Hepatic De Novo Lipogenesis and Regulation of Metabolism. Department of Chemistry, College of Agricultural and Life Sciences, at the University of Wisconsin, **Madison**, 215-230, 2016.

NEYRINCK, A.M.; CANI, P.D.; DEWULF, E.M. et al. Critical role of Kupffer cells in the management of diet-induced diabetes and obesity. **Biochem Biophys Res Commun.** 385:351-356, 2009.

TARANTINO, G.; LOBELLO, R.; SCOPACASA, F.; CONTALDO, F.; PASANISI, F.; CIRILLO, M.; DE CATERINA, M.; CONCA, P.; TERRACCIANO, D.; GENNARELLI, N.; et al. The contribution of omental adipose tissue to adipokine concentrations in patients with the metabolic syndrome. **Clin. Investig. Med.** 30, E192–E199, 2007.

PARDINA, E.; BAENA-FUSTEGUERAS, J.A.; CATALAN, R.; GALARD, R.; LECUBE, A.; FORT, J.M.; ALLENDE, H.; VARGAS, V.; PEINADO-ONSURBE, J. Increased expression and activity of hepatic lipase in the liver of morbidly obese adult patients in relation to lipid content. **Obes. Surg.** 19, 894–904, 2008.

PETERSEN, K.F.; DUFOUR, S.; FENG, J.; BEFROY, D.; DZIURA, J.; DALLA MAN, C. et al. Increased prevalence of insulin resistance and nonalcoholic fatty liver disease in Asian-Indian men. **Proc Natl Acad Sci. U. S. A.** 103:18273–18277. 2006.

PETERSEN, K.F.; DUFOUR, S.; SAVAGE, D.B.; BILZ, S.; SOLOMON, G.; YONEMITSU, S. et al. The role of skeletal muscle insulin resistance in the pathogenesis of the metabolic syndrome. **Proc Natl Acad Sci, U.S.A.**104:12587–12594. [PubMed: 17640906], 2007.

PETERS, C.M.; VASQUEZ, A. Estudios ecológicos de Camu-camu (*Myrciaria dubia* (H. B. K.) McVaugh. I. Produccion de frutas en poblaciones naturales. **Acta Amazônica**, Manaus, p. 161-173, 1986-1987.

PÜSCHEL, G.P.; JUNGGERMANN, K. Integration of function in the hepatic acinus: intercellular communication in neural and humoral control of liver metabolism. **Prog Liver Dis.**12:19–46. 4, 1994.

PÜSCHEL, G.P.; CHRIST, B. Inhibition by PGE2 of glucagon-induced increase in phosphoenolpyruvate carboxykinase mRNA and acceleration of mRNA degradation in cultured rat hepatocytes. **FEBS Lett.** 351:353–356,1994.

REHM, J.; TAYLOR, B.; MOHAPATRA, S.; IRVING, H.; BALIUNAS, D.; PATRA, J. et al. Alcohol as a risk factor for liver cirrhosis: : a systematic review and meta-analysis. **Drug Alcohol Rev.**29:437-45, 2010.

RIBEIRO, S. I.; MOTA, M. G. C.; SILVA, J. F. C.; CORRÊA, M.L.P. Camu-camu a nova modalidade de consumo de vitamina C *In Natura*. Belém: **Embrapa Amazônia Oriental**, 4p, 2000.

RIBEIRO, S. I.; MOTA, M. G. C.; SARMANHO, F. R. S.; CORRÊA, M. L .P. Herdabilidade em populações naturais de camu-camuzeiro. In: **Simpósio de recursos genéticos para a América Latina e Caribe**, 2., 2001, Londrina. Anais. Londrina, 2001.

RIBEIRO, S.I.; MOTA, M.G. C.; CORRÊA, M.L.P.; MONTEIRO, L.L. Banco ativo de camu-camu (*Myrciaria dubia* (H.B.X.) McVaugh) na Amazônia Oriental. In: **Simpósio de recursos genéticos para a América Latina e Caribe**, 3., Londrina. Anais. Londrina, 2002.

RIDKER, P.M; WILLERSON, J.T. Inflammation as a cardiovascular risk factor. **Circulation.**109(2):2-10, 2004.

SANYAL, A.J.; American Gastroenterological Association. AGA technical review on nonalcoholic fatty liver disease. **Gastroenterology.**123(5):1705-25, 2002.

SANDE-LEE, S.V.; VELLOSO, L. A. Hypothalamic dysfunction in obesity.**Arq Bras Endocrinol Metab.**56/6, 2012.

SAMUEL, V. T.; SHULMAN, G. I. Mechanisms for insulin resistance: Common threads and missing links. **Cell**, v. 148, n. 5, p. 852–871, 2012.

STINKENS, R.; GOOSSENS, G. H.; JOCKEN, J. W. E.; BLAAK, E. E. Targeting fatty acid metabolism to improve glucose metabolism. **Obesity Reviews**, v. 16, n. 9, p. 715-757, 2015.

SCHWARZ, J.M.; LINFOOT, P.; DARE, D.; AGHAJANIAN, K. Hepatic de novo lipogenesis in normoinsulinemic and hyperinsulinemic subjects consuming high-fat, low-carbohydrate and low-fat, high-carbohydrate isoenergetic diets. **American Journal of Clinical Nutrition** 77:43–50, 2003.

SHOELSON, S.E.; HERRERO, L.; NAAZ, A. Obesity, inflammation, and insulin resistance. **Gastroenterology**. 132:2169–2180, 2007.

TARANTINO, G.; SALDALAMACCHIA, G.; CONCA, P.; ARENA, A. et al. Non-alcoholic fatty liver disease: further expression of the metabolic syndrome. **J Gastroenterol Hepatol**. 22:293–303, 2007.

MURASE, T.; MISAWA, K.; MINEGISHI, Y.; AOKI, M.; OMINAMI, H.; SUZUKI, Y.; SHIBUYA, Y.; HASE, T. Coffee polyphenols suppress diet-induced body fat accumulation by downregulating SREBP-1c and related molecules in C57BL/6J mice. **Am J Physiol Endocrinol Metab**. 300: E122–E133, 2011.

TEFF, K.L.; ELLIOTT, S.S.; TSCHÖP, M. et al. Dietary fructose reduces circulating insulin and leptin, attenuates postprandial suppression of ghrelin, and increases triglycerides in women. **J Clin Endocrinol Metab**.; 89(6):2963–2972, 2004.

TREFFKORN, L.; SCHEIBE, R.; MARUYAMA, T. et al. PGE2 exerts its effect on the LPS-induced release of TNF- α , ET-1, IL-1 α , IL-6 and IL-10 via the EP2 and EP4 receptor in rat liver macrophages. **Prostaglandins Other Lipid Mediat**. 74:113–123, 2004.

TINIAKOS, D. G.; VOS, M. B.; BRUNT, E. M. Nonalcoholic fatty liver disease: pathology and pathogenesis. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, vol. 5, pp. 145–171, 2010.

TILG, H.; MOSCHEN, A. R. Evolution of inflammation in nonalcoholic fatty liver disease: the multiple parallel hits hypothesis. **Hepatology**, vol. 52, no. 5, pp. 1836–1846, 2010.

THILAKARATHNA, S. H.; RUPASINGHE, H. P. Flavonoid bioavailability and attempts for bioavailability enhancement. **Nutrients**, v. 5, n. 9, p. 3367–3387, 2013.

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

YAMAGUCHI, K.; YANG, L.; MCCALL, S.; HUANG, J.; YU X.X.; PANDEY, S.K. et al. Inhibiting triglyceride synthesis improves hepatic steatosis but exacerbates liver damage and fibrosis in obese mice with nonalcoholic steatohepatitis. **Hepatology**. 45:1366–1374, 2007.

YOUNOSSI, Z.M.; STEPANOVA, M.; AFENDY, M.; FANG, Y.; YOUNOSSI, Y.; MIR, H. et al. Changes in the Prevalence of the Most Common Causes of Chronic Liver Diseases in the United States from 1988-2008. **Clin Gastroenterol Hepatol.** 9:524-30, 2011.