ELIANA ALVIÁREZ GUTIERREZ

EFEITO HIPOCOLESTEROLÊMICO DO EXTRATO FENÓLICO DE INFLORESCÊNCIA DE CAPIM GORDURA (Melinis minutiflora) EM COELHOS

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do título de Magister Scientiae

VIÇOSA
MINA GERAIS- BRASIL
2015

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

T
A475e
2015

Alviárez Gutierrez, Eliana, 1988-
Efeito hipocolesterolêmico do extrato fenólico de inflorescência de capim gordura (*Melinis minutiflora*) em coelhos / Eliana Alviárez Gutierrez. – Viçosa, MG, 2015.
xv, 78f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui apêndices.
Orientador: Paulo César Stringheta.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Referências bibliográficas: f. 52-64.

1. *Melinis minutiflora. 2.* Fenóis. 3. Colesterol. 4. Colesterol LDL. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Tecnologia de Alimentos. Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. II. Título.

CDD 22. ed. 584.9

ELIANA ALVIÁREZ GUTIERREZ

EFEITO HIPOCOLESTEROLÊMICO DO EXTRATO FENÓLICO DE INFLORESCÊNCIA DE CAPIM GORDURA (Melinis minutiflora) EM COELHOS

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do título de Magister Scientiae

APROVADA: 20 de fevereiro 2015.

_____
Sergio Luís Pinto Da Matta
(Coorientador)

_____
Tania Toledo de Oliveira
(Coorientadora)

_____
Frederico Augusto Ribeiro de Barros

_____
Paulo Cesar Stringheta
(Orientador)

Dedico

À minha mãe Maria Nuria Gutierrez;

Aos meus irmãos;

Aos meus sobrinhos.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo presente da vida, da saúde e todas as bençoes dadas diariamente.

A minha mãe por ter me apojado sempre e dado sua ajuda na realização do mestrado.

À Universidade federal de Viçosa e ao Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, pela oportunidade de fazer o mestrado.

A meu orientador o Professor Paulo Cesar Stringheta, pela orientação durante todo o mestrado, paciência, amizade, conselho e ajuda em todo momento.

Ao Professor Sergio Luís Pinto da Matta na co-orientação e ajuda, ensinamento e realização da parte de histologia e amizade.

À Professora Tania Toledo pela co-orientação, permitir a realização do experimento no seu laboratório e na avaliação dos parâmetros bioquímicos.

Ao Professor Jorge e o Laboratório BEAGLE, pela disposição e facilitação para o uso do Microscópio eletrônico.

Ao Professor José Francisco Da silva, do Departamento da Zootecnia pelo fornecimento dos coelhos.

A Pollyana pela disposição e ajuda na coleta de sangue dos coelhos.

Ao Paúl pela ajuda durante todo o experimento, confiança e carinho durante o tempo que levamos de amizade.

Aos meus amigos, pelo apojo e paciência em tudo momento.

Aos meus colegas do laboratório de pigmentos naturais e Compostos bioativos, pela ajuda no experimento, amizade, momentos de diversão e alegria.

Ao Valerio Poleto, pela ajuda durante todo o experimento, especialmente na ajuda no cuidado dos coelhos.

Aos colegas do Laboratório de Biologia celular e estrutural pela ajuda na parte de realização da Histologia.

BIOGRAFIA

ELIANA ALVIÁREZ GUTIERREZ, filha de Edgar Alviárez Triviño e Maria Nuria Gutiérrez, natural de Ibagué- Tolima- Colômbia. Nasceu no dia 12 de março de 1988.

Em 2007 iniciou o curso de graduação na Biologia na Universidad del Tolima, recebendo o título de Biólogo em fevereiro de 2012.

Em novembro de 2012 iniciou o curso de mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos na Universidade Federal de Viçosa- MG, concluindo em fevereiro de 2015.

SUMÁRIO

Pagina

LISTA DE FIGURAS ix
LISTA DE TABELAS x
RESUMO xii
ABSTRACT xiv
1. INTRODUÇÃO..... 1
2. OBJETIVOS..... 3
2.1. Objetivo geral..... 3
Objetivos específicos..... 3
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA..... 4
3.1.Capim Gordura (Melinis minutiflora) 4
3.2.Compostos bioativos..... 5
3.3. Compostos fenólicos..... 6
3.3.1. Biodisponibilidade de Compostos Fenólicos..... 11
3.4. Colesterol 14
3.4.1. Lipoproteínas 15
3.4.2. Quilomícrons 16
3.4.3. Lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL) 16
3.4.4. Lipoproteínas de baixa densidade (LDL) 17
3.4.5. Lipoproteínas de alta densidade (HDL) 17
3.5. Hiperlipidemia 17
3.5.1. Hipercolesterolemia 17
3.6. Efeito dos Compostos Fenólicos na Saúde 19
3.7. O fígado 19
4. MATERIAL E MÉTODOS 22
4.1. Local do experimento 22
4.2. Preparação do extrato do capim gordura (Mellinis minutiflora) 22
4.3. Análise dos compostos fenólicos 22
4.3.1. Determinação de fenólicos totais 22
4.3.2. Determinação de antocianinas totais 23
4.3.3. Determinação da capacidade antioxidante 23

4.3.3.1. Teste de estabilização do radical ABTS (2,2'-azinobis-3-etil-benzotiazolina-6-sulfonado) 23
4.4. Ensaio animal 24
4.5. Determinações bioquímicas..... 25
4.5.1. Determinações bioquímicas 25
4.5.2. Determinações das enzimas plasmáticas..... 25
4.6. Avaliação histológica e morfológica do fígado..... 26
4.6.1. Eutanásia..... 26
4.6.2. Inclusão em resina..... 26
4.6.3. Morfometria do fígado..... 26
4.7. Análise estatística 27
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO..... 28
5.1. Quantificação de compostos fenólicos 28
5.1.1. Fenólicos totais 28
5.1.2. Antocianinas 28
5.2. Determinação de atividade antioxidante pelo método ABTS 29
5.3. Efeito do extrato de capim gordura nos níveis do colesterol plasmático 29
5.3.1. Colesterol total 29
5.3.2. Colesterol LDl e HDL 31
5.3.3. Colesterol VLDL e Triacilgliceróis 33
5.4. Efeito do extrato de capim gordura nas proteínas plasmáticas 35
5.4.1. Proteínas totais 35
5.4.2. Creatinina 36
5.4.3. Albumina 38
5.5. Glicose 39
5.6. Efeito do extrato de capim gordura nas enzimas hepáticas 41
5.6.1 Aminotranferases Alanina transferase (ALT) e Aspartato aminotransferase (TGO) 41
5.6.2. Gamma GT 43
5.6.3. Fosfatasse alcalina 45
5.7. Avaliação morfológica do fígado nos diferentes tratamentos 47
6. CONCLUSÕES..... 50
7. SUGESTÕES 51

8. REFERÊNCIAS..... 52
APÊNDICE 65
APÊNDICE A 66
APÊNDICE B 67
APÊNDICE C 68
APÊNDICE D 69
APÊNDICE E 73
APÊNDICE F 77

LISTA DE FIGURAS

		Pagina
1	Capim Gordura (Melinis minutiflora)	4
2	Vias da biossíntese dos compostos bioativos	6
3	Estrutura química dos principais flavonoides. No centro a estrutura básica do flavonoide mostrando os anéis A, B e C e os números para as diferentes posições na estrutura flavan	7
4	Estrutura geral de um flavonoide	8
5	Estrutura química das antocianinas	9
6	Vias hipotéticas da absorção, distribuição, metabolismo excreção das antocianinas com base na informação	10
7	Processos digestivos e de absorção envolvidos na biodisponibilidade de fenóis	12
8	Conjugação pode ocorrer numa variedade de posições na molécula	13
9	Esquema dos processos que afetam a biodisponibilidade sistêmica e o metabolismo dos fenóis na dieta. As linhas pontilhadas indicam metabolismo/ metabolitos	14
10	Biossínteses do colesterol	15
11	Estrutura geral de uma lipoproteína plasmática	16
12	Mecanismo de ação dos Compostos fenólicos sobre o colesterol	19
13	Esquema de um lóbulo hepático	20
14	Estrutura do fígado	48

LISTA DE TABELAS

Pagina

1 Valores médios dos parâmetros de colesterol total (mg/dL) no soro sanguíneo dos coelhos com ração normal e extrato fenólico da inflorescência de capim gordura 30

2 Valores médios do colesterol total (mg/dL) no soro sanguíneo dos coelhos dos tratamentos com colesterol e extrato fenólico da inflorescência de capim gordura 30

3 Valores médios dos parâmetros de colesterol LDL e HDL (mg/dL) no soro sanguíneo dos coelhos com ração normal e extrato fenólico da inflorescência de capim gordura 31

4 Valores médios dos parâmetros de colesterol LDL e HDL (mg/dL) no soro sanguíneo dos coelhos dos tratamentos com colesterol e extrato fenólico da inflorescência de capim gordura 32

5 Valores médios dos parâmetros de colesterol VLDL e triacilgliceróis (mg/dL) no soro sanguíneo dos coelhos com ração normal e extrato fenólico da inflorescência de capim gordura..... 33

6 Valores médios dos parâmetros de colesterol VLDL e triacilgliceróis (mg/dL) no soro sanguíneo dos coelhos dos tratamentos com colesterol e extrato fenólico da inflorescência de capim gordura 34

7 Valores médios dos parâmetros de proteínas totais (g/L) no soro sanguíneo dos coelhos com ração normal e extrato fenólico da inflorescência de capim gordura 35

8 Valores médios dos parâmetros das proteínas totais (g/L) no soro sanguíneo dos coelhos dos tratamentos com colesterol e extrato fenólico da inflorescência de capim gordura 36

9 Valores médios da Creatinina (mg/dL) no soro sanguíneo dos coelhos com ração normal e extrato fenólico da inflorescência de capim gordura 37

10 Valores médios dos parâmetros da Creatinina (mg/dL) no soro sanguíneo dos coelhos dos tratamentos com colesterol e extrato fenólico da inflorescência de capim gordura 37
11 Valores médios da albumina (g/dL) no soro sanguíneo dos coelhos com ração normal e extrato fenólico da inflorescência de capim gordura..... 38
12 Valores médios dos parâmetros da Albumina (g/dL) no soro sanguíneo dos coelhos dos tratamentos com colesterol e extrato fenólico da inflorescência de capim gordura 39
13 Valores médios da Glicose (mg/dL) no soro sanguíneo dos coelhos com ração normal e extrato fenólico da inflorescência de capim gordura 40
14 Valores médios dos parâmetros da Glicose (mg/dL) no soro sanguíneo dos coelhos dos tratamentos com colesterol e extrato fenólico da inflorescência de capim gordura 40
15 Valores médios dos parâmetros de Aspartato aminotransferase (AST) (U/L) no soro sanguíneo dos coelhos com ração normal e extrato fenólico da inflorescência de capim gordura 41
16 Valores médios dos parâmetros de Aspartato aminotransferasa (ASAT) (U/L) no soro sanguíneo dos coelhos dos tratamentos com colesterol e extrato fenólico da inflorescência de capim gordura 42
17 Valores médios dos parâmetros de Alanina aminotransferase (ALT) (U/L) no soro sanguíneo dos coelhos com ração normal e extrato fenólico da inflorescência de capim gordura 43
18 Valores médios dos parâmetros de Alanina aminotransferasa (ALT) (U/L) no soro sanguíneo dos coelhos dos tratamentos com colesterol e extrato fenólico da inflorescência de capim gordura 43
19 Valores médios dos parâmetros de Gamma (γ-GT) (U/L) no soro sanguíneo dos coelhos com ração normal e extrato fenólico da inflorescência de capim gordura 44
20 Valores médios dos parâmetros de Gamma (γ-GT) (U/L) no soro sanguíneo dos coelhos dos tratamentos com colesterol e extrato fenólico da inflorescência de capim gordura 45

21 Valores médios dos parâmetros de fosfatasse alcalina (U/L) no soro sanguíneo dos coelhos com ração normal e extrato fenólico da inflorescência de capim gordura 46
22 Valores médios dos parâmetros de fosfatasse alcalina (U/L) no soro sanguíneo dos coelhos dos tratamentos com colesterol e extrato fenólico da inflorescência de capim gordura 46
23 Valores médios da morfometria do hepatócito no fígado dos coelhos 49

RESUMO

ALVIÁREZ GUTIERREZ, Eliana, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2015. **Efeito hipocolesterolêmico do extrato fenólico de inflorescência de capim gordura (Melinis minutiflora) em coelhos.** Orientador: Paulo Cesar Stringheta. Coorientadores: Sergio Luís Da Matta e Tânia Toledo de Oliveira.

O consumo de alimentos com compostos fenólicos tem aumentado na redução de risco de doenças como câncer, diabetes, hipercolesterolemia. Na procura de novas fontes com potencial terapêutico, este trabalho teve como um dos objetivos quantificar os compostos fenólicos presentes no extrato da inflorescência de capim gordura mediante a quantificação de fenóis totais por Follin ciocalteu, antocianinas totais e determinação antioxidante pelo método $ABTS^{\bullet+}$. A capacidade para reduzir o nível de colesterol sérico foi feita por meio da avaliação do perfil lipídico no plasma sanguíneo e mediante a histomorfometria foi determinada sua capacidade hepatoprotetora nos coelhos de raça Nova Zelândia. No estudo foram utilizados 25 coelhos de raça Nova Zelândia que tiveram um período de adaptação de 5 dias e mantidos em condições controladas, e foram divididos em 5 grupos que receberam os seguintes tratamentos: Grupo 1 (R), 125g de ração e água a vontade; Grupo 2 (RCA), 125g de ração contendo 1% de colesterol, 0,1% ácido cólico e água a vontade; Grupo 3 (RE), 125g de ração, água a vontade e 2mL de extrato (0,88mg/2mL); Grupo 4 (RCAE1), 125g de ração contendo 1% de colesterol, 0,1% ácido cólico, água a vontade e 2mL de extrato de capim gordura (0,88mg/2mL); Grupo 5 (RCAE2), 125g de ração contendo 1% de colesterol, 0,1% ácido cólico, água a vontade e 1mL de extrato de capim gordura (0,44mg/1mL). Foram realizadas três coletas de sangue antes de iniciar o experimento (dia 0), nos dias 30 e 60, na última coleta foi feita a coleta do fígado dos animais. As analises sanguíneos foram realizadas mediante método colorimétrico e se avaliaram os parâmetros de colesterol total, colesterol de baixa densidade (LDL), colesterol de alta densidade (HDL), colesterol de muito baixa densidade (VLDL), triacilgliceróis, proteínas totais, albumina, creatinina, glicose, aspartato aminotransferase (AST), alanina transferase (ALT), gamma GT e fosfatasse alcalina. Na análise histológica foi realizada a histomorfometria do fígado.

O extrato da inflorescência de capim gordura apresentou um teor de fenóis totais de 603 mg AGE.$100g^{-1}$, para antocianinas foi de 99,4 mg.$100g^{-1}$ cianidina 3 glicosídeos e a atividade antioxidante do extrato foi de 3672 µMTrolox. 100 g^{-1} de inflorescência sendo

valore similares a frutos de consumo diário. Na avaliação do efeito hipocolesterolêmico se observou que os tratamentos que tiveram dieta com colesterol e adição do extrato fenólico da inflorescência de capim gordura, apresentaram diminuição do colesterol total e LDL de 59 e 60% aos 30 dias do experimento respectivamente. Além disso, se observou que os tratamentos com dieta rica em colesterol e extrato fenólico, tiveram efeito hepatoprotetor.

Com estes resultados obtidos o extrato fenólico da inflorescência de capim gordura, pode se considerar uma nova fonte natural de antioxidante com aplicação industrial e clínica.

ABSTRACT

ALVIÁREZ GUTIERREZ, Eliana, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February 2015. **Hipercolesterolemic effect of Phenolic extract of Capim gordura's Inflorescence (Melinis minutiflora).** Adviser: Paulo Cesar Stringheta. Co-advisers: Sergio Luís Da Matta and Tânia Toledo de Oliveria.

The consumption of foods with phenolic compounds has increased in reducing risk of diseases like cancer, diabetes, hypercholesterolemia. The search for new sources with therapeutic potential, this work aimed to quantify the phenolic compounds present in the capim gordura's inflorescence (Melinis minutiflora) by the total phenols quantification by Follin Ciocalteu, anthocyanin quantification and antioxidant determination by the $ABTS^{\bullet+}$. Was determined the ability to reduce serum cholesterol level by assessing the lipid profile in blood plasma and was determined its hepatoprotective capacity by histomorphometry in New Zealand white rabbits.

Were used 25 male New Zealand rabbits, had an adaptation period of five days, under controlled conditions, and were divided into five groups to the following treatments:

Group 1 (R), 125g of food and water; Group 2 (RCA), 125g diet containing 1% cholesterol, 0.1% cholic acid and water; Group 3 (SR), 125g of feed, 2 mL of extract and water (0.88mg/2mL); Group 4 (RCAE1) 125g diet containing 1% cholesterol, 0.1% cholic acid, 2ml of extract and water (0.88mg/2mL); Group 5 (RCAE2), 125g diet containing 1% cholesterol, 0.1% cholic acid, water and 1 mL of extract (0,44mg / 1mL).

These were submit to three-blood samples collection; before to starting the experimental study (0 days), to 30 days and 60 days, on the last collection in addition the liver tissues was collect. Blood analyzes were performed by colorimetric method and evaluated the parameters of total cholesterol, low density cholesterol(LDL), high density lipoprotein cholesterol (HDL), very low density lipoprotein cholesterol (VLDL), triglycerides, total protein, albumin, creatinine, glucose, aspartate aminotransferase (AST), alanine transferase (ALT), gamma GT and alkaline phosphatase. The histological analysis was performed morphometric of the liver.

The inflorescence extract presented a total phenol content of 603 mg AGE.100g-1 for anthocyanins was 99.4 mg.100g-1 cyanidin 3 glycosides and the antioxidant activity of the extract was 3672 μMTrolox. 100 g-1 inflorescence being value similar to fruit daily consumption.

In assessing the hypocholesterolemic effect was observe that the treatments had high cholesterol diet and phenolic extract addition, showed a decrease in total and LDL cholesterol of 59 and 60% at 30 days of the experiment respectively. Furthermore, it was observe that the treatment with a high cholesterol diet and phenolic extract had hepatoprotective effect.

With these results, the inflorescence extract, can be considered a new source of natural antioxidant that could have industrial and clinical application.

1. INTRODUÇÃO

Várias pesquisas têm sido focadas na identificação e avaliação dos compostos antioxidantes presentes em alimentos, principalmente em frutas e hortaliças, que contêm um alto teor de compostos fenólicos com capacidade antioxidante (HASSAN & ABDEL-AZIZ, 2010; CONTRERAS-CALDERON et al, 2011).

O consumo desses compostos está relacionado com a redução de radicais livres que provocam doenças crônicas não transmissíveis como alguns tipos de câncer, doenças neurodegenerativas, cardiovasculares, entre outras (ESPIN et al, 2007; BARBOSA et al, 2008). Dentre os compostos fenólicos estudados, as antocianinas possuem elevada capacidade antioxidante (YI et al, 2006).

Estudos têm associado que o consumo moderado de vinho tinto, tem efeito neuro-nefroprotetor, contra o estresse oxidativo e a hipercolesterolemia, devido ao alto teor de antocianinas, (MONTILLA et al, 2006; TEIXEIRA, 2011).

Outros estudos têm demonstrado que os compostos fenólicos, principalmente as antocianinas, têm ação anti-inflamatória como reportado por Xia et al. (2009), auxiliam na inibição da oxidação do LDL (CHANG et al. 2006), e na diminuição dos riscos de doenças cardiovasculares (WALLACE 2011), apresentando ajuda na propriedade anti-obesidade (TSUDA et al., 2003) e na diminuição de câncer (MUÑOZ-ESPADA & WATKINS, 2006). ARABLOU et al., (2014) reportou que os compostos fenólicos presentes no extrato de gengibre têm capacidade redutora na diabetes, glicose e no colesterol total.

Os extratos fenólicos da Opuntia ficus-indica (PADILLA- CAMBERO et al., 2015), o extrato de Vitex montevidensis (ARANEGA 2014), o extrato e folhas de videira orgânica, da variedade Bordô (Vitis labrusca, L.) (LACERDA 2014), extrato de alecrim (Rosmarinus officinalis) (AFONSO et al., 2013), microemcapsulado de óleo da semente de kenaf (Hibiscus cannabinus L.) (KAI et al., 2015) apresentaram capacidade hipocolesterolêmica.

O capim gordura, considerada uma planta invasora agressiva e utilizada como uma espécie forrageira; apresenta um elevado teor de compostos fenólicos, destacando-se as antocianinas que correspondem cerca de 25% do total dos fenólicos do capim gordura,

sendo uma fonte com potencial de redução no risco de doenças relacionadas com o aumento dos radicais livres (OLIVEIRA, 2011).

Objetiva-se com o presente trabalho quantificar os compostos fenólicos presentes no extrato da inflorescência de capim gordura e determinar sua capacidade para reduzir o nível de colesterol sérico através da avaliação do perfil lipídico no plasma sanguíneo e a avaliação do efeito hepatoprotetor em coelhos.

OBJETIVOS

1.1. Objetivo geral

Quantificar os compostos fenólicos totais presentes na inflorescência do capim gordura e avaliar a capacidade antioxidante e hipocolesterolêmica em coelhos de raça Nova Zelândia.

1.2. Objetivos específicos

- Determinar o teor de compostos fenólicos e de antocianinas no extrato de capim gordura (Melinis minutiflora);

- Determinar a capacidade antioxidante do extrato de Capim gordura pelo método de ABTS;

- Avaliar o perfil lipídico no plasma sanguíneo de coelhos alimentados com dietas contendo extratos de antocianinas de capim gordura;

- Avaliar a histomorfometria dos fígados dos coelhos alimentados com dietas contendo extratos de antocianinas de capim gordura.

REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Capim Gordura (Melinis minutiflora)

A Melinis minutiflora, conhecida comumente como capim gordura, é uma gramínea perene de origem africana, que se reproduz tanto por semente como vegetativamente, apresenta folha e talos cobertos por tricomas glandulares e tem ramos de inflorescência de cor roxa (Figura 1), tem sido introduzida nos países tropicais como uma espécie forrageira (MARTINS et al., 2004). É muito sensível à geada e está adaptada às regiões tropicais e subtropicais desenvolvendo-se também em solos de fertilidade baixa (PRATES et al., 1993).

Figura 1. Capim Gordura (Melinis minutiflora)
Fonte. http://sitiodapk.blogspot.com.br/2010/06/conceitos-para-um-jardim.html

O capim gordura é caracterizado por apresentar uma secreção oleorresinosa por tricomas longos e numerosos presentes em suas folhas e caules, responsáveis por um forte odor de melaço e utilizada como repelente e acaricida (HERNANDEZ, PARRA & AHUMADA, 1989; PRATES, LEITE, CRAVEIRO & OLIVEIRA, 1998; MURO-CASTREJON, CRUZ-VASQUEZ, FERNANDEZ & MOLINA, 2004)

Segundo as pesquisas de Baruch et al., (1985) e Pivello et al., (1999), as gramíneas no Brasil foram introduzidas acidentalmente ou para fins comerciais, e se espalharam por amplas extensões dos ecossistemas naturais, competindo com espécies nativas.

Atualmente encontra-se em grande parte do território brasileiro, sendo identificadas 305 espécies de gramíneas no Distrito Federal, das quais o 20% total representa as espécies exóticas (FILGUEIRAS 1991). O capim gordura é considerado uma espécie naturalizada no Brasil (SARAIVA et al., 1993).

3.2. Compostos Bioativos

Os compostos bioativos são metabólitos secundários que se encontram naturalmente em plantas, são produzidos numa fase subsequente ao crescimento e não têm função no crescimento. São produzidos por certos grupos taxonômicos restritos de microrganismos, têm estruturas químicas usuais, e muitas vezes são formados como misturas de membros de uma família química. A produção de metabólitos secundários nas diferentes espécies é devido às necessidades especiais de cada espécie (AZMIR, ZAIDUL, et al., 2013). Entre os metabólitos secundários, algumas destas substâncias têm efeitos farmacológicos ou toxicológicos sobre os sistemas biológicos em humanos e animais (BERNHOFT, 2010).

Segundo Croteau et al. (2000), os metabólitos secundários podem-se dividir em: terpenos e terpenoides, alcaloides e compostos fenólicos. Esses compostos são sintetizados em diferentes vias, como via do ácido chiquímico e via do ácido malônico. Os alcaloides são produzidos pelos aminoácidos aromáticos (vêm da via do ácido chiquímico) e pelos aminoácidos alifáticos (vêm do ciclo do ácido tricarboxílico) e os terpenos são produzidos através da via do ácido mevalônico caminho e a via não mevalonato (AZMIR, ZAIDUL, et al., 2013). Na Figura 2, pode-se observar as diferentes vias de biossínteses dos compostos bioativos.

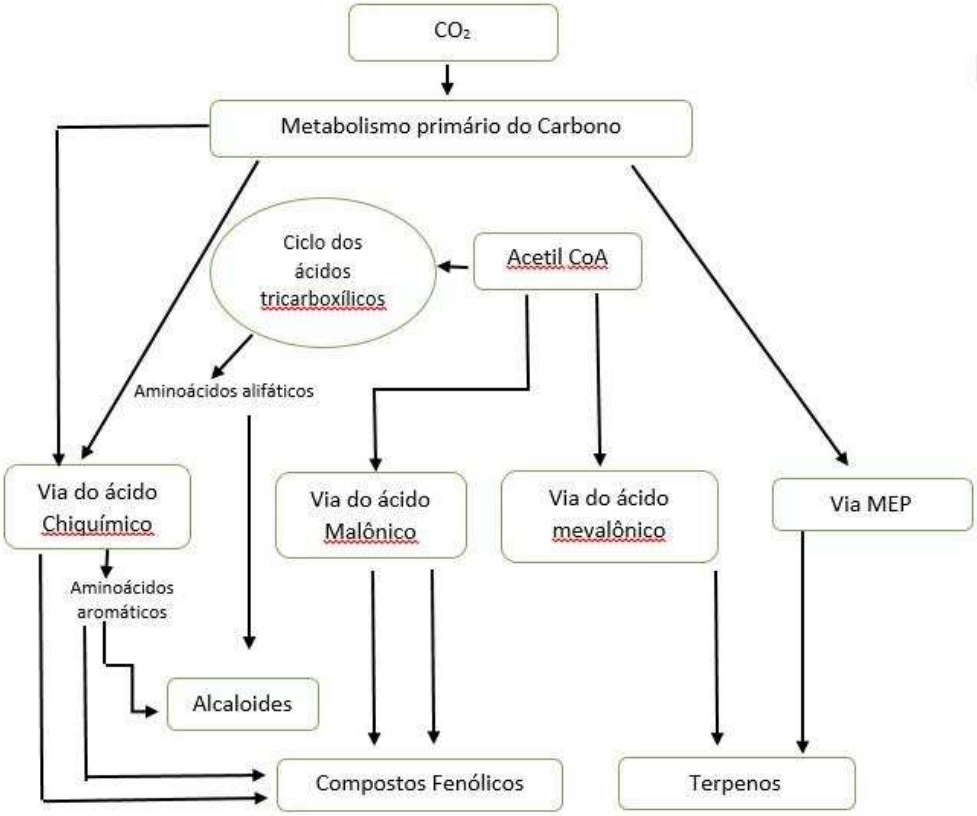


Figura 2. Vias da biossíntese dos compostos bioativos
Fonte. AZMIR, ZAIDUL, et al., (2013)

3.3. Compostos Fenólicos

Entre os compostos fenólicos estão os flavonoides, ácidos fenólicos, benzoquinonas, ácidos hidroxibenzóicos, xantonas e estilbenos. Os flavonoides constituem a maior parte dos compostos fenólicos das plantas e são divididos nas classes flavonóis, flavonas, flavanonas, flavonoides, isoflavonas e antocianidinas (Figura 3) (MARTINS et al., 2011).

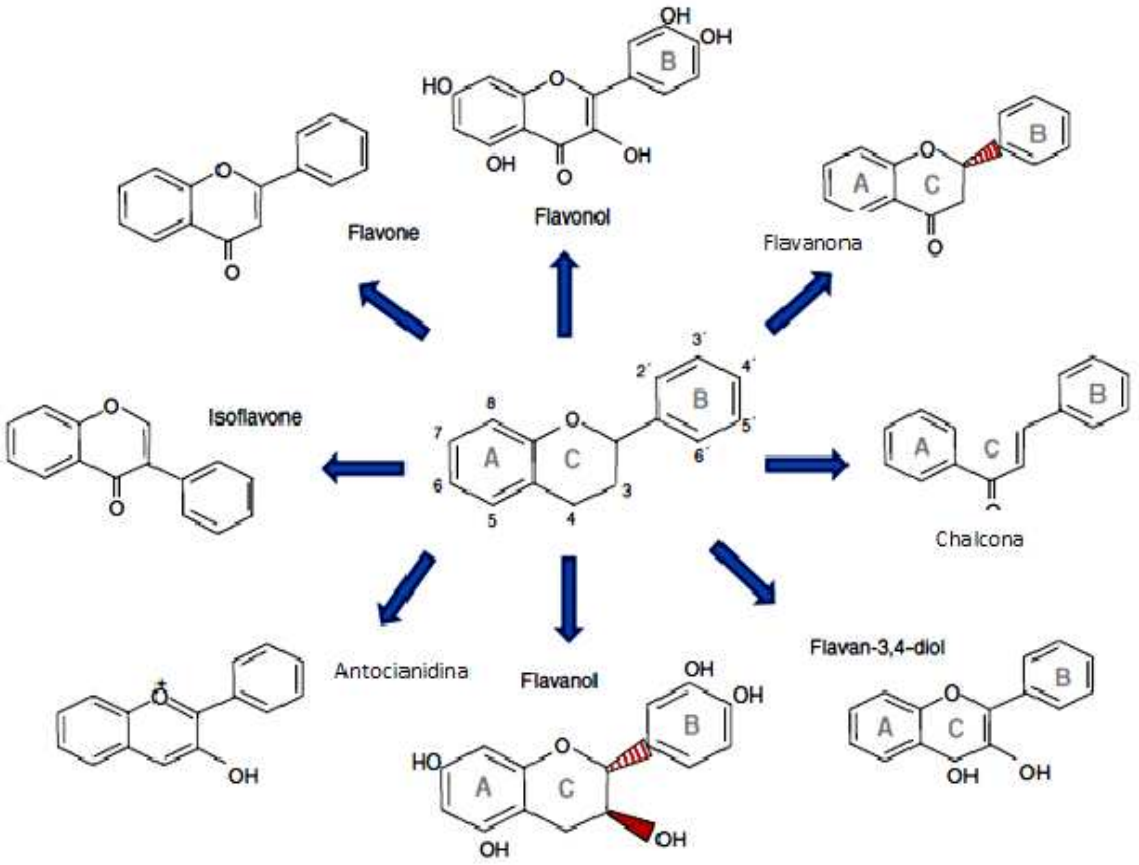


Figura 3. Estrutura química dos principais flavonoides. No centro a estrutura básica do flavonoide mostrando os anéis A, B e C e os números para as diferentes posições na estrutura flavan.
Fonte. FRAGA & OTEIZA, 2011

Os compostos fenólicos estão presentes em frutas, legumes, folhas, castanhas, sementes, flores e cascas de vegetais. Além disso, os flavonoides (antocianinas) e ácidos fenólicos apresentam a capacidade de reduzir doenças crônicas como diabetes, câncer e cardiovasculares (SELLAPPAN et al., 2002; KIM et al., 2009).

A atividade antioxidante dos compostos fenólicos é devido a sua capacidade de estabilizar os radicais livres, doando átomos de hidrogênio, elétrons ou complexando-se com cátions metálicos. Nesse sentido, a estrutura dos compostos fenólicos é um fator determinante na sua atividade antioxidante, referido como relação estrutura-atividade (REA). No caso dos ácidos fenólicos, por exemplo, a atividade antioxidante depende do número e da posição dos grupos hidroxilas (SAMMAN, et al., 2006).

Segundo SAMMAN, et al., (2006), nos flavonoides, a complexidade das estruturas é devido à natureza das substituições nos anéis B e C que determinam a atividade antioxidante (figura 4):

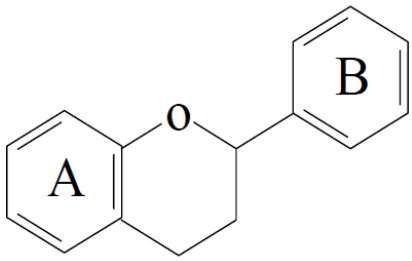
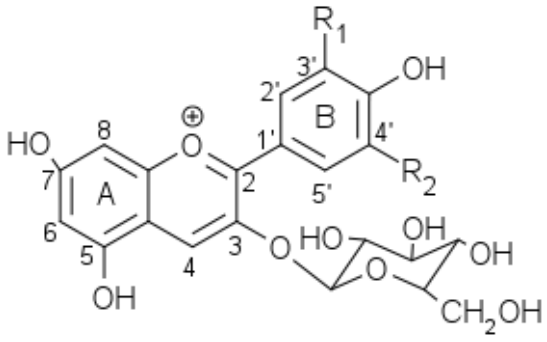


Figura 4. Estrutura geral de um flavonoide
Fonte. MARTÍNEZ-FLÓREZ et al., 2002.

- O grau de hidroxilação e as posições dos grupos -OH no anel B, em particular uma estrutura o-dihidroxil do anel B (grupo catecol) resulta em atividade mais elevada, pois confere maior estabilidade ao radical aroxilo por deslocalização de elétrons, ou atua como sítio preferencial para ligações de metais.
- A presença de grupos hidroxila nas posições 3´, 4´ e 5´ de anel B (um grupo pirogalol) tem sido relacionada com o aumento da atividade antioxidante dos flavonoides em comparação com aqueles que têm um único grupo hidroxila. No entanto, sob certas condições, tais compostos podem atuar como pró-oxidantes, compensando assim o efeito antioxidante.
- A ligação dupla entre C-2 e C-3, conjugado com o grupo 4-oxo no anel C aumenta a capacidade de eliminação de radicais;
- Uma ligação dupla entre C-2 e C-3, combinado com um 3-OH no anel C,
- também melhora a capacidade de eliminação dos radicais;
- Substituição de grupos hidroxila no anel B por grupos metoxil reduz o potencial redox e, consequentemente, a capacidade antioxidante.

Dos flavonoides, principalmente, destaca-se as antocianinas, que são encontradas principalmente em frutas vermelhas e hortaliças escuras. A estrutura geral das antocianinas possui um anel aromático (A) ligado a um anel heterocíclico (C) que contém oxigênio, ligado a um segundo anel aromático (B) (Figura 5) (KONCZAK & ZHANG, 2004).

Devido aos diferentes números de grupos hidroxílicos, a natureza dos carboidratos (açúcares) ligados a sua estrutura, aos carboxilados alifáticos ou aromáticos ligados ao açúcar e a posição dessas uniões, se tem diferentes tipos de antocianinas (Figura 5) (KONG et al., 2003).



Aglicona (antocianidina)		Substituição glicosídica (antocianina)	Acilação
Estrutura do anel B		Substituição nas posições 3 e 5	Esterificação das hidroxilas do açúcar
$R_1 = R_2 = H$	Pelargonidina	D-glicose	Ácidos sinâmicos
$R_1 = OH$ e $R_2 = H$	Cianidina	D-galactose	p-cumárico
$R_1 = R_2 = OH$	Delfinidina	D-xilose	Ferúlico
$R_1 = OCH_3$ e $R_2 = H$	Peonidina	L-ramnose	Caféico
$R_1 = OCH_3$ e $R_2 = OH$	Petunidina	L-arabinose	
$R_1 = R_2 = OCH_3$	Malvidina	Rutinose	Ácidos alinfáticos
		Soforose	Acético
		Sambubiose	Malônico
		Gentiobiose	Succínico

Figura 5 – Estrutura química das antocianinas
Fonte: MALACRIDA & MOTA, (2006).

Os estudos reportam mais de 500 diferentes antocianinas (ANDERSEN & JORDHEIM, 2006) e 23 antocianidinas (KONG et al., 2003; REIN, 2005; ANDERSEN & JORDHEIM, 2006), dos quais só seis são as mais comuns nas plantas vasculares, pelargonidina, peonidina, cianidina, malvidina, delfinidina e petunidina (CLIFFORD, 2000). Dependendo do tipo pH e da presença de íons de metal quelante, as antocianinas apresentam diferentes cores, como azuis, violeta, laranja ou vermelha, contribuindo substancialmente para a coloração natural de uma infinidade de alimentos (FERNANDES et al., 2010).

Nas antocianinas, a atividade antioxidante, se relaciona com a presença de grupos hidroxila nas posições 3' e 4' do anel B, que conferem alta estabilidade ao radical formado. Os grupos hidroxila livres em posição 3 do anel C e na posição 5 do anel A, em conjunto

com o grupo carbonilo na posição 4 são dadores de elétrons (KUSKOSKI, 2004). Outro fator é a posição e os tipos de grupos químicos nos anéis aromáticos, variando assim a capacidade de aceitar elétrons desemparelhados de moléculas de radicais (GALVANNO, 2004).

Tem sido demostrado que a concentração de antocianinas no plasma é aproximadamente 1% da quantidade consumida, devido à absorção intestinal, altas taxas de absorção celular, metabolismo e excreção, podem contribuir para uma baixa biodisponibilidade de antocianinas (Figura 6) (FERNANDES et al., 2013).

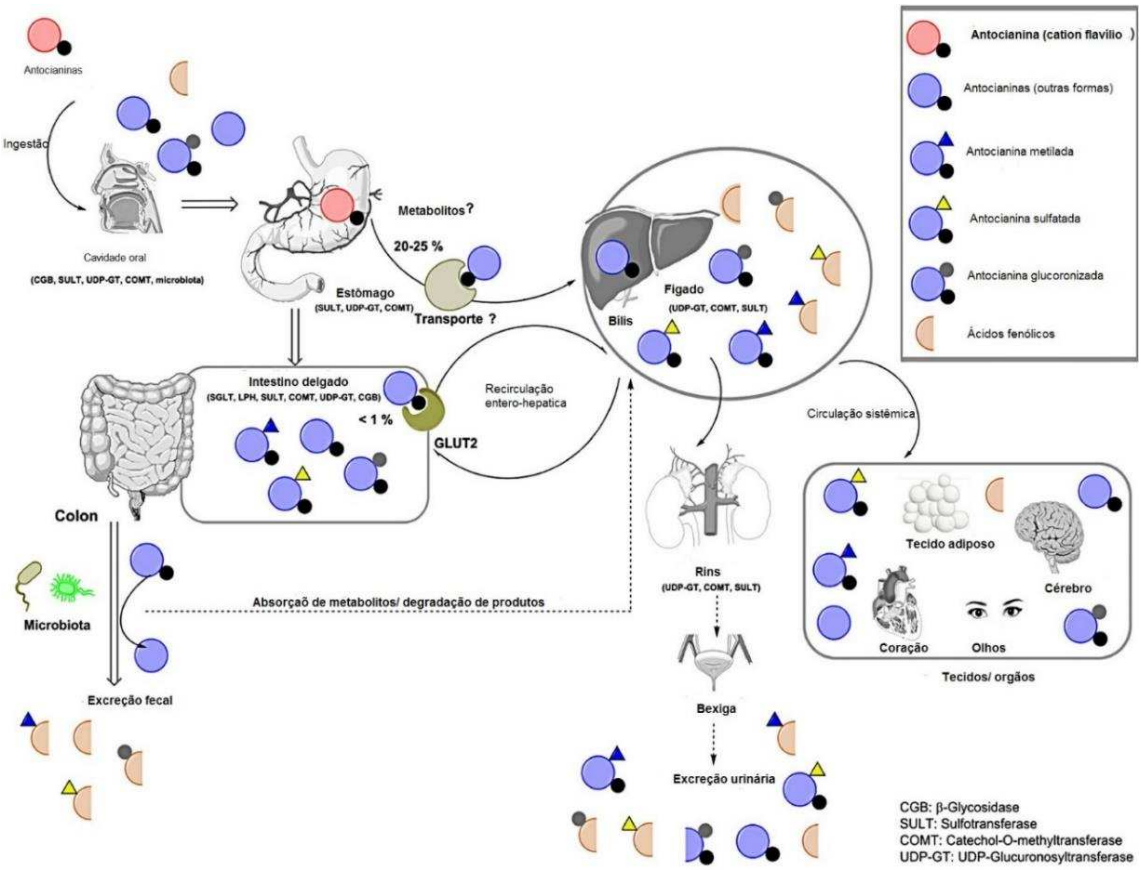


Figura 6. Vias hipotéticas da absorção, distribuição, metabolismo excreção das antocianinas com base na informação

Fonte. (FERNANDES et al., 2013)

Após a ingestão, as antocianinas são facilmente detectadas no plasma na sua forma original, possivelmente como resultado da sua absorção por difusão facilitada através da parede gástrica. Tal fato é confirmado por estudos que determinaram suas concentrações no estômago, entretanto as antocianinas nativas e metiladas seriam encontradas em outros órgãos como: jejuno, fígado e rim (FERNANDES et al., 2013).

A absorção das antocianinas depende das interações que possam ocorrer: com as proteínas dos alimentos, com as proteínas salivares, com as enzimas digestivas, sendo algumas antocianinas absorbidas no estômago. A fração de antocianina que não é absorvida no estômago atinge o intestino delgado. Uma vez que as antocianinas estão em condições básicas no intestino delgado são rapidamente absorvidas, onde pode envolver uma transportadora glicose específico, como a proteína transportadora de sódio-glicose (SGLT1), como é sugerido para outros flavonoides, ou pode ser hidrolisada pela ação da lactase floridzina hidrolase (LPH). As antocianinas que não são absorvidas são excretadas na urina tanto na forma intacta ou metabolizadas (FERNANDES et al., 2013).

3.3.1. Biodisponibilidade de Compostos Fenólicos

A biodisponibilidade de compostos fenólicos depende de fatores como: o efeito sinergístico da mistura dos fenóis contidos na matriz alimenta são fatores ambientais, como a exposição ao sol, chuva, os tipos de cultura, a quantidade de produção de frutos, etc. Além disso, o grau de maturação das frutas e hortaliças afeta as concentrações e as proporções dos compostos fenólicos de diferentes maneiras, pois geralmente as concentrações deles diminuem durante a maturação, enquanto as concentrações de antocianinas aumentam. Por outro lado, os tratamentos térmicos, o armazenamento e a interação com outros compostos afetam o teor dos fenólicos (D'ARCHIVIO et al., 2010).

Outro fator importante é a estrutura química do composto. Na maioria dos alimentos, os compostos fenólicos estão como aglicona ou ligados a um açúcar (glicona), estes últimos por tanto, devem ser hidrolisados pelas enzimas gastrointestinais ou pela microbiota do cólon antes da absorção (D'ARCHIVIO et al., 2010).

Por tanto, ao início da digestão, na cavidade oral, no processo de mastigação e trituração dos alimentos, os compostos fenólicos são liberados da matriz alimentar, continuando no estomago e o intestino delgado que pela ação das enzimas gastrointestinais, vai facilitar a difusão através da camada superficial do enterócito e posteriormente estará disponível para absorção (Figura 7) (LEWANDOWSKA, et al. 2013; NEILSON & FERRUZZI, 2013).

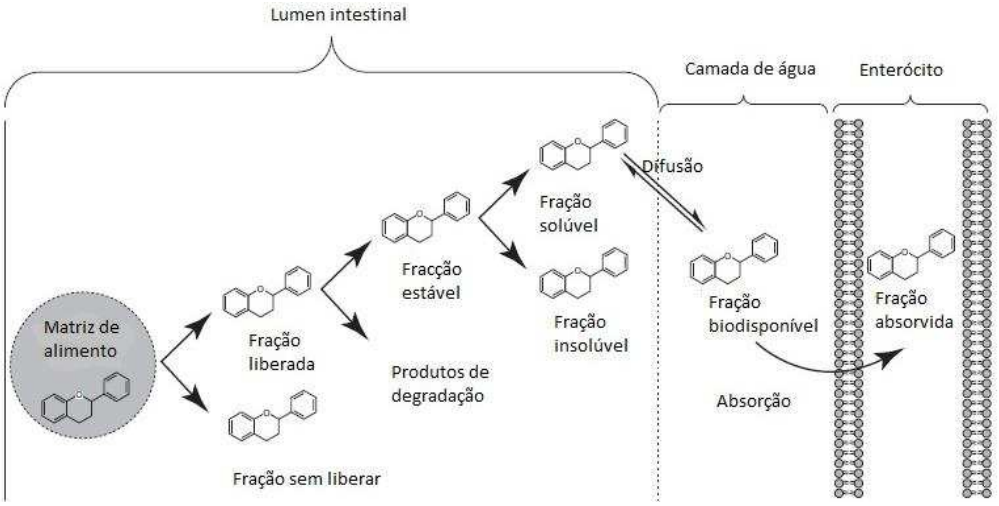


Figura 7. Processos digestivos e de absorção envolvidos na biodisponibilidade de fenóis.
Fonte. NEILSON & FERRUZZI, (2013).

A porção do fenol que atinge a superfície do intestino delgado está disponível para absorção pelos enterócitos. Os fenóis devem passar através dos enterócitos, para acessar o fluxo sanguíneo e ter uma distribuição sistêmica. Embora a identificação de sistemas de transporte específicos dos fenóis seja motivo de pesquisa, ainda acredita-se que a absorção de fenóis nos enterócitos ocorre através da ação do ácido monocarboxílico (MCT), por difusão facilitada (NEILSON & FERRUZZI, 2013). A difusão facilitada parece contribuir de forma significativa para a absorção de alguns flavonoides (isoflavonas e flavanonas), devido a sua lipofilicidade que parece estar altamente correlacionada com a permeabilidade intestinal (CRESPY, et al., 2003), mas esta difusão contribui pouco para a absorção de outros flavonoides, especialmente aqueles que são altamente hidroxilados (NEILSON & FERRUZZI, 2013).

Após de atingir o interior dos enterócitos, compostos fenólicos são transportados pela veia porta para o fígado, onde eles sofrem outras reações de acoplamento, de forma semelhante a outros xenobióticos. A principal função das reações de acoplamento é para limitar a ação dos compostos químicos e facilitar a sua eliminação na bile e urina, causando um incremento em sua solubilidade. No fígado, as principais reações de acoplamento são sulfatação, metilação, e (em menor escala) glucuronidação (LEWANDOWSKA, et al. 2013).

No fígado, os compostos fenólicos atuam como substratos de desintoxicação do corpo, desenhados para reduzir a toxicidade de compostos estranhos, metabolizando-os para que sejam eliminados rapidamente. Este sistema de desintoxicação consiste de três

atividades principais, chamados metabolismos de fase I, fase II e fase III. O metabolismo de fase I é realizado pelos membros do citocromo P450 (CYP) e enzimas que envolvem a hidroxilação (LEWANDOWSKA, et al. 2013; NEILSON & FERRUZZI, 2013).

O metabolismo de fase II envolve reações de conjugação em que um grupo hidroxila no xenobiótico é modificado pela adição de um sulfato, ácido glucurónico, ou um grupo metila. A glucuronização é realizada por uridina difosfato glucuronil-transferase (UDPGT), a sulfatação é realizada por sulfotransferase (SULT) ou fenol sulfo-transferase (PDT), e a O-metilação é efetuada pelo catecol-O-metil-transferase (COMT) (Figura 8). Os produtos destas reações podem também ser substratos para o metabolismo de fase II ou podem ser excretados pela bile ou na urina (NEILSON & FERRUZZI, 2013).

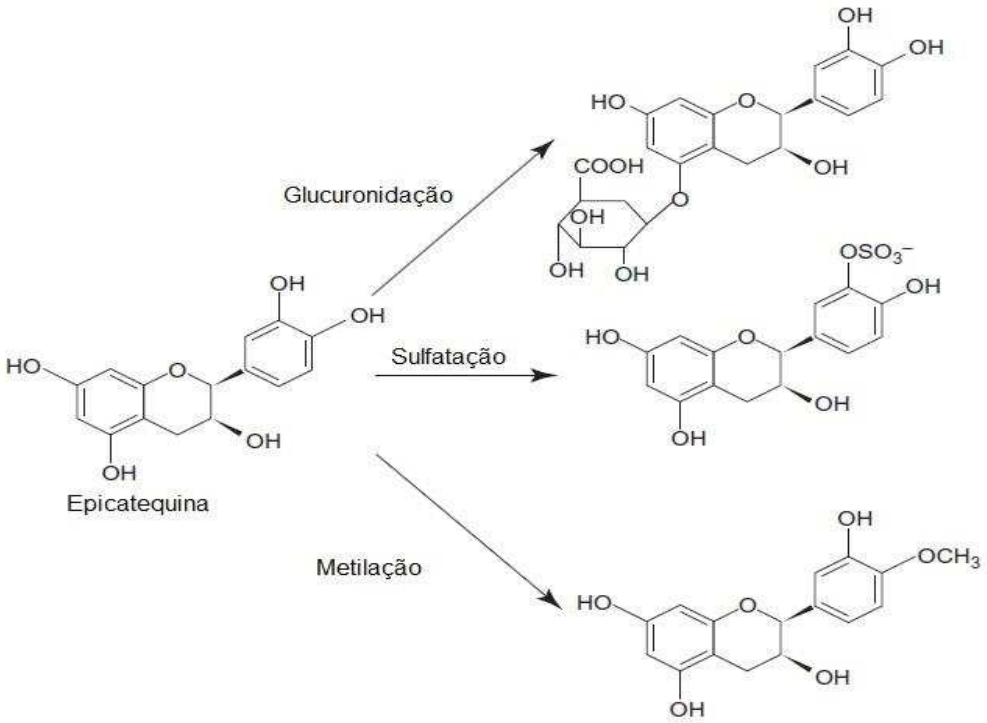


Figura 8. A conjugação pode ocorrer numa variedade de posições na molécula.
Fonte. NEILSON & FERRUZZI, (2013)

O metabolismo fase III, envolve o fluxo de ambos xenobióticos nativos e seus metabolitos em fase I/II do enterócito como um meio para diminuir a sua concentração intracelular. Devido à sua hidroxilação, os fenóis não são substratos para a ativação pela CYP fase I. Os fenóis são rapidamente submetidos a conjugação da fase II, em diferentes tecidos, particularmente o epitélio intestinal, fígado e rins (Figura 9). (NEILSON & FERRUZZI 2013).

Os fenóis que são absorvidos a partir do lúmen intestinal pelos enterócitos são sujeitos a reações da fase II de desintoxicação no interior da célula, os conjugados formados na fase II, são jogados na corrente sanguínea e posteriormente no fígado antes da circulação sistêmica, os fenóis que não são absorbidos são excretados na urina (Figura 9) (NEILSON & FERRUZZI 2013).

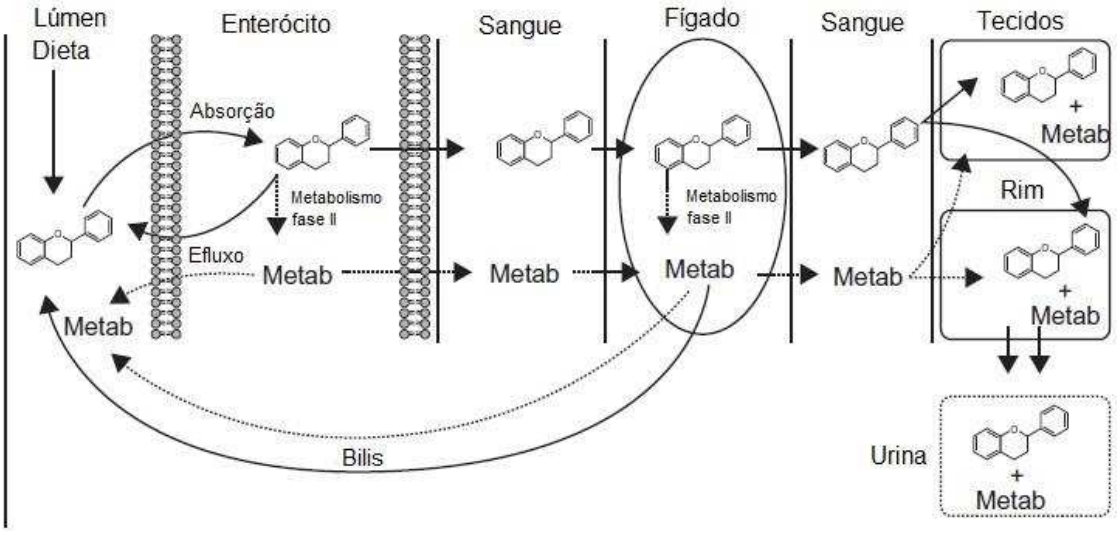


Figura 9. Esquema dos processos que afetam a biodisponibilidade sistêmica e o metabolismo dos fenóis na dieta. As linhas pontilhadas indicam metabolismo/ metabolitos.
Fonte. NEILSON & FERRUZZI, (2013)

3.4. Colesterol

O colesterol é o mais abundante dos compostos esteróis. É um componente estrutural essencial das membranas de células animais que tem como função estabelecer a permeabilidade da membrana adequada e fluidez. Também é um composto muito importante no interior das células, funcionando como um precursor para a biossíntese de hormônios esteroides, aldosterona, corticosterona, os ácidos biliares, e vitamina D (MORZYCKI, 2014).

Anormalidades na biossíntese ou metabolismo do colesterol e ácido biliar estão associados com a formação de cálculos biliares e doenças cardiovasculares (PARISH et al. 2002).

A biossíntese do colesterol é iniciada pela condensação de duas moléculas de acetil-CoA, formando acetoacetil-CoA. O acetoacetil-CoA mais uma acetil-coA são convertidos em 3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA (HMG-CoA) pela ação da HMG-CoA

sintetase. A HMG-CoA é convertida em mevalonato pela ação da HMG-CoA redutase. O mevalonato é convertido a uma molécula de isoprenóide, o pirofosfato de isopentenilo (PP), com a perda do CO_2. O geranil-PP e farnesil-PP são produzidos a partir de isopentenil-PP. Duas subunidades farnesil-PP são combinados para formar esqualeno. O esqualeno é convertido em lanosterol e por mudanças na cadeia, são eliminados os grupos metilo em C4 e C14 para formar o 14-desmetil lanosterol e depois o zimosterol. A dupla ligação do C8-C9 muda para a posição C5-C6, e forma o desmosterol, e por último é eliminado a dupla ligação da cadeia lateral e gera o colesterol (figura 10) (BOTHAM & MAYES, 2003; VAN DER WULP et al., 2013).

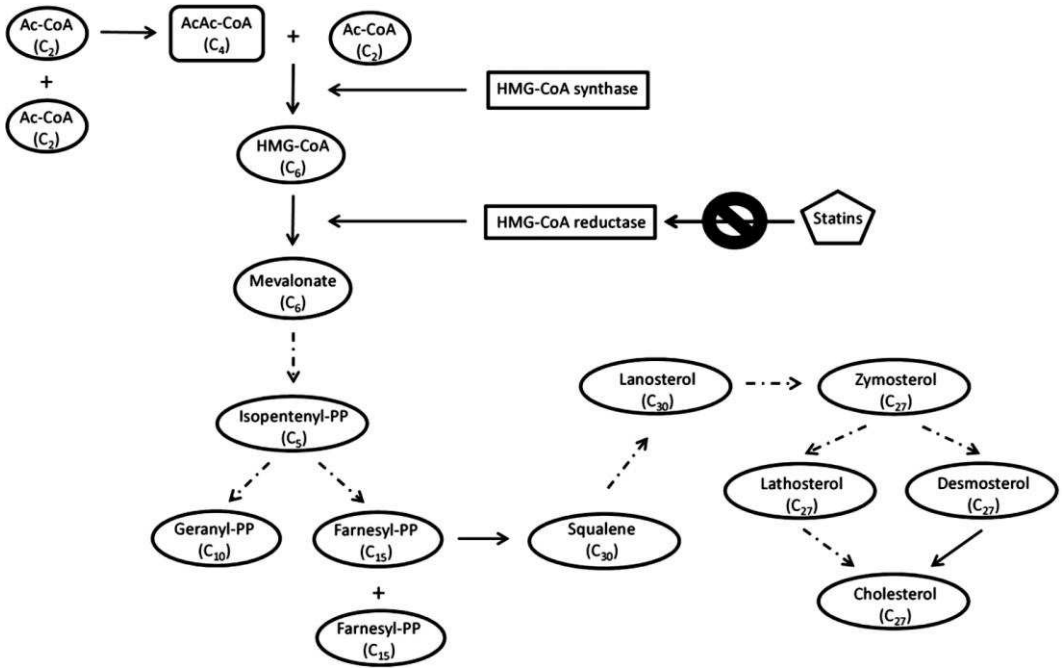


Figura 10. Biossínteses do colesterol
Fonte. VAN DER WULP et al., 2013

3.4.1. Lipoproteínas

As lipoproteínas são encarregadas de transportar o colesterol, sendo identificadas quatro principais lipoproteínas citoplasmáticas que são os quilomícrons, Lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL), Lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e Lipoproteínas de alta densidade (HDL) (BOTHAM & MAYES, 2003).

A estrutura de uma lipoproteína baseia-se por um centro apolar formado principalmente por triacilgliceróis e ésteres de colesterol, que se encontram rodeados por uma superfície formada de moléculas de fosfolipídios e colesterol. (Figura 11), as quais

estão orientadas de maneira que seus grupos polares estão o lado de fora (médio aquoso) (BOTHAM & MAYES, 2003).

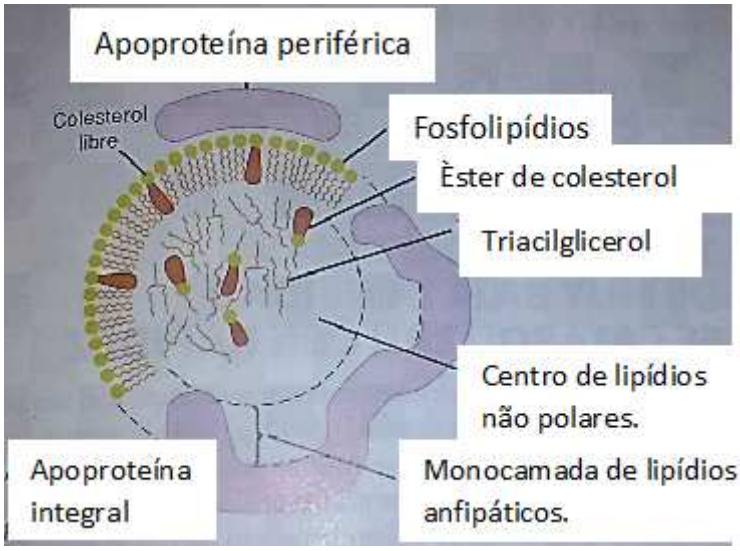


Figura 11. Estrutura geral de uma lipoproteína plasmática.
Fonte. BOTHAM & MAYES, 2003.

As apoproteínas tem várias funções: formar parte da estrutura das lipoproteínas, cofatores das enzimas e pode ainda atuar com ligações para as interações com receptores de lipoproteínas nos tecidos (BOTHAM & MAYES, 2003).

3.4.2.Quilomícrons

São derivados da absorção intestinal do triacilglicerol e outros lipídios, sendo a apoproteína B-48 sua principal proteína estrutural. A função dos quilomícrons é transportar todos os lipídios da dieta até a circulação (BOTHAM & MAYES, 2003; SALES et al., 2003).

3.4.3. Lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL)

São produzidas do fígado, são estão compostas de apoproteína B-100, mas contém também apoproteína C-II e apoproteína E na sua superfície. São encarregadas de transportar os triacilgliceróis até os tecidos extra-hepáticos (BOTHAM & MAYES, 2003; SALES et al., 2003).

3.4.4. Lipoproteínas de baixa densidade (LDL)

As lipoproteínas LDL, possuem o núcleo central composto de ésteres de colesterol e na superfície só uma proteína: apo B-100 (SALES et al., 2003).

3.4.5. Lipoproteínas de alta densidade (HDL)

São um grupo heterogêneo de partículas compostas por um núcleo de ésteres de éster de colesterol e triacilgliceróis, rodeado por uma camada anfipática de colesterol livre, fosfolipídios e apolipoproteínas (BOES et al., 2009). Estão encarregadas de transporte do colesterol no metabolismo de LDL e dos quilomícrons (BOTHAM & MAYES, 2003).

As moléculas de HDL apresentam múltiplos efeitos antiaterogênico e as concentrações de colesterol HDL mostram uma forte correlação inversa com o risco de doença arterial coronariana (BOES et al., 2009). O HDL também tem outras propriedades ateroprotetoras como a inibição da oxidação do LDL, capacidade anti-inflamatória pela inibição da sínteses e expressão de moléculas de adesão endoteliais, ação citoprotetora, ação vasodilatadora e ação antitrombótica (CORRAL & SCHREIER, 2014).

3.5. Hiperlipidemia

Hiperlipidemia ou dislipidemia, é caracterizada pelo aumento das lipoproteínas de baixa densidade (LDL) / lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL) / triglicerídeos e redução do nível de lipoproteína de alta densidade (HDL). Além disso, desempenha um papel importante no desenvolvimento de aterosclerose e está amplamente conhecido como fator de risco para doenças cardiovasculares (DCV) e infarto do miocárdio, causa comum de mortalidade (KAUP et al., 2011).

3.5.1. Hipercolesterolemia

Representa altos níveis de colesterol no sangue, principalmente colesterol-LDL (LDL-c) sendo responsável pelas doenças cardiovasculares (KAUP et al., 2011). As pesquisas têm identificado a hipercolesterolemia como o principal fator de risco para as doenças cardiovasculares (BOIX & PICÓ 2005; SHANMUGANAYAGAM et al. 2007).

Hipercolesterolemia leva ao aumento da atividade plaquetária acima dos níveis normais e reforça o papel das plaquetas em DCV. O aumento nos níveis de LDL aumenta a sensibilidade de plaquetas para agentes de ativação através da cascata de sinalização mediada pelo receptor e a troca de lipídios entre as partículas de LDL e a membrana plasmática (SHANMUGANAYAGAM et al. 2007).

Tem-se estudos que sugerem que o aumento do consumo de antocianinas reduz o risco de doenças cardiovasculares (DCV). O consumo de frutas e hortaliças tem sido associado à redução das doenças DCV, devido ao alto teor de compostos bioativos (WALLACE, 2011; TEIXEIRA, 2011). Os compostos fenólicos têm capacidade para reduzir os níveis de colesterol no plasma sanguíneo, como reportado por Thilakarathna et al., (2013), (PADILLA- CAMBERO et al., 2015), (ARANEGA 2014). Foi determinada a capacidade das cascas de maçã, de inibir a oxidação do colesterol-LDL no sistema in vitro. Já o estudo de Shanmuganayagam et al. (2007) foi verificado que o consumo de suco de uva, rico em compostos fenólicos pode inibir a agregação plaquetária, hipercolesterolemia, pressão sanguínea, colesterol total no soro e o desenvolvimento de ateroma em coelhos.

Na figura 12, se pode observar o mecanismo de ação dos compostos fenólicos, na redução dos lipídios:

1. À redução da atividade proteína de transferência microssomal (MTP) e acil-Coa; colesterol aciltranferase (ACAT);

2. Degradação da Apo B-100;

3. Diminuição da síntese e da secreção do VLDL;

4. alteração da cascata de delipidação;

5. Diminuição da Apo E, que leva a um aumento da atividade da lipoproteína lipase (LPL), e por tanto, se dá uma diminuição da concentração de VLDL e triacilgliceróis no plasma;

6. Redução da atividade da proteína de transferência de colesterol esterificado (CETP);

7. A diminuição do VLDL, leva a uma diminuição da concentração do LDL.

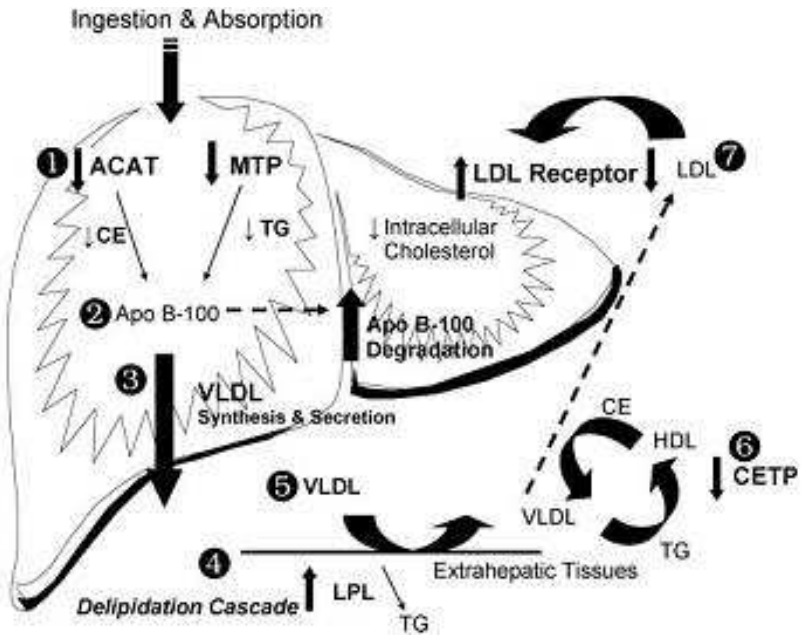


Figura 12. Mecanismo de ação dos Compostos fenólicos sobre o colesterol.
Fonte. ZERN & FERNANDEZ, 2005.

3.76. Efeito dos Compostos Fenólicos na Saúde

Os fenóis têm propriedades antioxidantes, vasodilatadoras, anti-inflamatórios, anti-fibrose e antiapoptose. Eles têm efeito nos vasos sanguíneos, células endoteliais e aumentam os fatores vaso protetores reduzindo o estresse oxidativo vascular e a hipertensão (MOHAMED, 2013). Os fenóis como os flavonoides, resveratrol, quercetina, epigalocatequina-3-galato e curcumina, podem retardar o armazenamento elevado da gordura, pressão arterial e glicemia (CHERNIACK, 2011).

3.7. O Fígado

O fígado é a maior glândula do corpo humano, é um órgão multilobado (4 lóbulos), localizado na cavidade abdominal. O fígado é fornecido por dois vasos sanguíneos, a veia porta que transporta sangue dos intestinos, baço e pâncreas; e a artéria hepática, encarregada de fornecer a sangue oxigenada para o fígado a traves das artérias interlobares e interlobulares (BERNE et al., 2009; KIERSZENBAUM & TRES, 2012).

O fígado, é o primeiro local de processamento da maior parte dos nutrientes absorvidos, também secreta ácidos biliares. Além disso, armazena e produz substâncias

como glicose, aminoácidos e proteínas do plasma. Também é fundamental na conversão de substancias residuais em substâncias que possam ser excretadas (BERNE et al., 2009; JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2013; KIERSZENBAUM & TRES, 2012).

O lóbulo hepático é a unidade estrutural e funcional do fígado, está constituído por cordões de hepatócitos anastomosados, organizados de forma radial e são separados dos capilares sinusoides pelo espaço de disse. A veia central se encontra localizada no centro de cada um dos lóbulos hepáticos, que contém uma mistura de sangue originado pelos ramos da veia porta dos ramos da artéria hepática, estes dois últimos formam a tríade portal que é encontrada e, cada um dos espaços porta que envolve o lóbulo hepático em formato hexagonal (Figura 13) (KIERSZENBAUM & TRES, 2012).

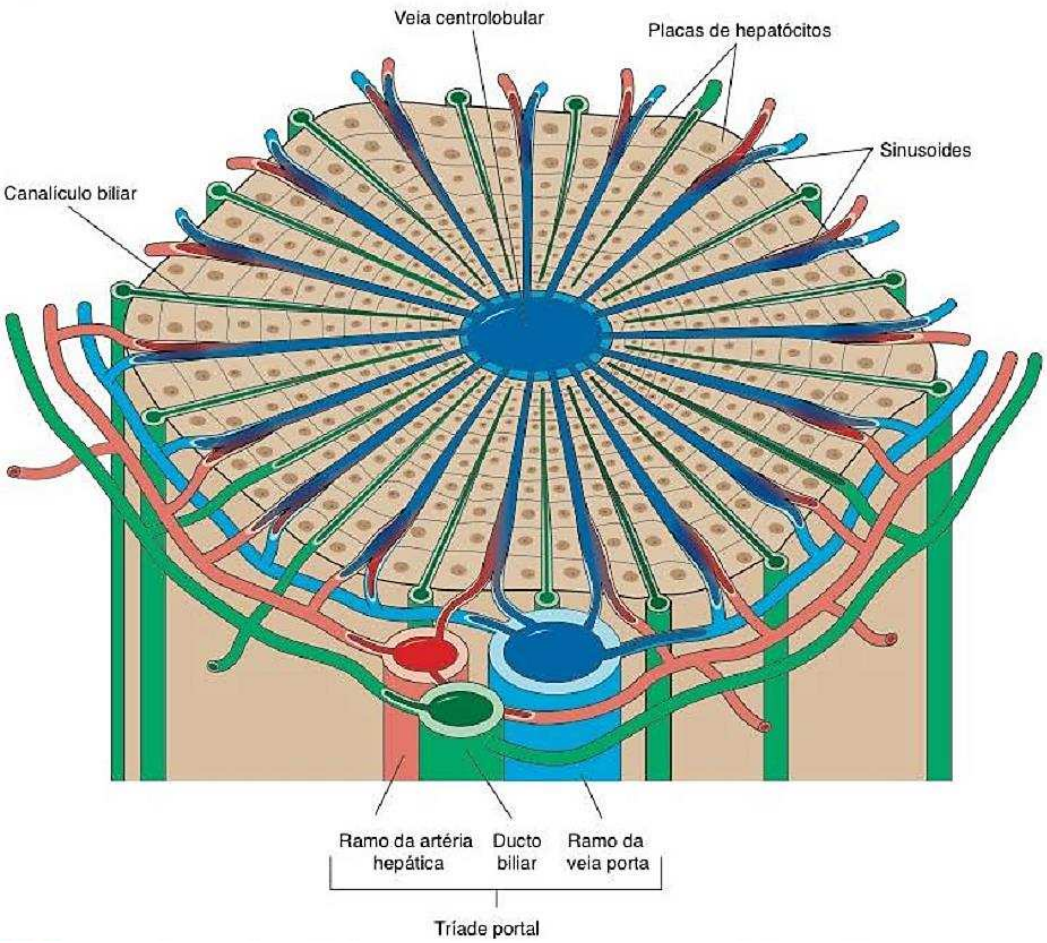


Figura 13. Esquema de um lóbulo hepático.
Fonte. JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2013.

Segundo o KIERSZENBAUM & TRES (2012), os hepatócitos têm dois domínios celulares, o domínio basolateral, que contem Microvilos e está volteado para o espaço disse, este domínio participa da absorção das substancias que chegam do sangue e da

secreção das proteínas plasmáticas, como albumina, fibrinogênio e fatores de coagulação. O domínio apical, encontrasse volteado para a formação do canalículo biliar, está revestido por microvilos e apresenta uma grande quantidade de junções de oclusão para impedir o vazamento da bile. O reticulo endoplasmático rugoso dos hepatócitos, estão encarregados das sínteses de proteínas plasmáticas, e o reticulo endoplasmático liso estão associados às sínteses de glicogênio, lipídios e aos mecanismos de desintoxicação.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. LOCAL DO EXPERIMENTO

O experimento foi realizado na Universidade Federal de Viçosa, nos laboratórios de Compostos Bioativos e Pigmentos Naturais, do Departamento de Tecnologia de Alimentos (DTA), Biofármacos, do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular (DBBM) e Biologia Estrutural do Departamento da Biologia Geral (DBG).

4.2. PREPARAÇÃO DO EXTRATO DO CAPIM GORDURA (Melinis minutiflora)

Foi utilizada a inflorescência do capim gordura coletadas no município de Viçosa, Minas Gerais. Os compostos fenólicos foram extraídos com uma solução de etanol- água (70:30), seguido de homogeneização. A mistura foi deixada no escuro sob refrigeração (7 ± 1ºC) durante 24 horas e após este tempo essa mistura foi filtrada a vácuo em papel Whatman n° 1, em funil de Büchner. O extrato foi concentrado até eliminação total do solvente em evaporador rotativo (MA, 120 Marconi) a 40 °C.

4.3. Análise dos compostos fenólicos

4.3.1. Determinação de fenólicos totais

A determinação de fenólicos totais foi realizada segundo a metodologia descrita por Singleton e Rossi (1965), mediante a utilização do reagente Folin Ciocalteau.
Para isto, foram adicionados 600 µL do extrato e 3 mL do reagente de Folin Ciocalteau diluído 10 vezes com água destilada, sendo o tubo de ensaio agitado vigorosamente. Foram colocados em repouso durante 3 minutos, e posteriormente adicionados 2,4 mL de solução de carbonato de sódio (7,5%). Os tubos permaneceram no escuro por uma hora a temperatura ambiente (±25°C). A absorbância foi lida a 760nm em espectrofotômetro UV-1601 PC Shimadzu.
A quantificação de fenólicos totais foi determinada mediante a interpolação da curva padrão de ácido gálico, os resultados foram expressos em mg AGE·100 g^{-1} amostra (miligramas equivalentes de ácido gálico por 100 gramas de amostra).

4.3.2. Determinação de antocianinas totais

Para a determinação das antocianinas totais, foi realizada a metodologia descrita por Lees e Francis (1972), baseada no método de pH único.

Para a determinação foi utilizada uma alíquota do extrato obtido que foi diluída em etanol: HCl 1,5 mol L^{-1} (85:15) v/v e a leitura foi feita no espectrofotômetro UV-1601 PC Shimadzu a um comprimento de onda de 535 nm. Para a quantificação de antocianinas presentes no extrato, foi determinado mediante a equação seguinte:

$$A = \varepsilon_{1cm} * b * C \qquad \text{(Equação 5)}$$

Em que:

A - Absorbância em 535 nm

ε_{1cm} - Coeficiente de absortividade (98,2 $Lcm^{-1}g^{-1}$) cianidina 3-glicosídio

C - Concentração (g L^{-1})

b - caminho óptico (1 cm)

Os resultados serão expressos em mg de cianidina-3-glucosideo·100 g^{-1} de amostra.

4.3.3. Determinação da capacidade antioxidante

4.3.3.1. Teste de estabilização do radical ABTS (2,2'-azinobis-3-etil-benzotiazolina-6-sulfonado)

A metodologia foi feita segundo o descrito por Re et al. (1999). O radical $ABTS^{\bullet+}$ foi formado a partir da reação entre ABTS (7 mM) e de persulfato de potássio (2,45mmolL^{-1}) (1:1). Esta solução foi incubada a temperatura ambiente (25 ± 1ºC) no escuro durante 12 a 16 horas. Após esse tempo, a solução foi diluída em etanol até obter leitura da absorbância de 0,700 (± 0,05) no comprimento de onda de 734 nm.

Para ter a reação do padrão Trolox com o radical $ABTS^{\bullet+}$, foram adicionados em seguida 0,5 mL do extrato num tubo de ensaio e 3,5 mL da solução do radical $ABTS^{\bullet+}$. Esta solução foi colocada no escuro durante 6 minutos e em seguida foi lida a absorbância a 734 nm em espectrofotômetro (UV-1601 PC Shimadzu). O mesmo procedimento de reação foi realizado no Trolox e utilizado na amostra. Na realização do ensaio com o radical $ABTS^{\bullet+}$, foram realizadas diluições do extrato, para obter uma curva com a relação concentração vs absorbância.

A curva analítica foi feita com o Trolox em diferentes concentrações, e a partir da equação obtida pela curva padrão com o Trolox foi obtida a capacidade redutora do radical $ABTS^{\bullet+}$, pelo extrato nas diferentes concentrações. Os resultados foram expressos em $\mu molL^{-1}$ equivalente de Trolox por grama de amostra ($\mu molL^{-1}$ $Trolox \cdot g^{-1}$).

4.4. ENSAIO ANIMAL

Foram utilizados 25 coelhos machos de raça Nova Zelândia com idade entre 80-85 dias de vida, adquiridos no setor de Cunicultura do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa. Segundo as exigências do Comitê de ética da Universidade Federal de Viçosa (Processo 102/2013).

Os coelhos foram acondicionados em gaiolas individuais, onde permaneceram por cinco dias em período de adaptação, mantidos em ambiente com controle de temperatura e umidade e com ciclos de luz/escuros por um período de 12 horas. Foram alimentados com 125 g diários de ração comercial para coelhos e água ad libitum. Depois do período de adaptação os coelhos foram divididos em cinco grupos e o experimento foi realizado durante 60 dias.

A hipercolesterolemia foi induzida fornecendo aos coelhos diariamente durante 60 dias uma ração preparada de 125 g de ração mais 1% de colesterol cristalino e 0,1% de ácido cólico, para todos os grupos exceto do grupo 1 e 2. A ração hipercolesterolêmica foi preparada na fábrica de ração do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa. Para isto, o colesterol (SIGMA Aldrich) foi adicionado à ração da purina (marca Presence) dos coelhos e posteriormente submetido ao processo de peletização e secagem. Os extratos foram fornecidos aos animais pelo processo de gavagem oral. Os animais foram submetidos a três coletas do sangue nos dias 0, 30 e 60 dias, após de deixar os animais em jejum por 12 horas. Aos 60 dias foi feito o sacrifício (eutanásia) dos coelhos com coleta de fígado, rins, próstata, coração e intestino para estudos posteriores.

- Grupo 1 (R). Controle negativo (CN, n=5). Foram alimentados com 120g de ração e água a vontade.

- Grupo 2 (RE). (n=5). Foram alimentados com 120g de ração, água a vontade e 2mL de extrato (0,88mg/2mL).
- Grupo 3. (RCA). (n=5). Foram alimentados com 120g de ração contendo 1% de colesterol, 0,1% ácido cólico e água a vontade.
- Grupo 4 (RCAE1). (n=5). Foram alimentados com 120g de ração contendo 1% de colesterol, 0,1% ácido cólico, água a vontade e 2mL de extrato de capim gordura (0,88mg/2mL).
- Grupo 5 (RCAE2). (n=5). Foram alimentados com 120g de ração contendo 1% de colesterol, 0,1% ácido cólico, água a vontade e 1mL de extrato de capim gordura (0,44mg/1mL).

4.5. DETERMINAÇÕES BIOQUIMICAS

4.5.1. Determinações bioquímicas

Foram determinados no plasma sanguíneo dos coelhos mediante os métodos enzimáticos colorimétrico, usando kit comercial (Bioclin, Brasil), o colesterol total, o HDL, LDL, o triacilglicerol, a creatinina, as proteínas totais e albumina. Para isto, foram coletados aproximadamente 3 mL de sangue em tubos heparinizados, pela veia marginal da orelha, após 12 horas de jejum. Em seguida foram centrifugados a 7100 xG por 15 minutos para separação do plasma. Posteriormente foram tomadas alíquotas de 1mL e diluições com soluções salina (0,9%). Foram realizadas preparações dos reagentes de acordo ao indicado por cada kit e a leitura foi realizada no analisador multiparamétrico de bioquímica- Alizé.

4.5.2. Determinações das enzimas plasmáticas

As determinações das enzimas plasmáticas aspartato amino transferase (AST), alanina amino transferase (ALT), a glutamiltranspeptidase (γ-GT) e a enzima fosfatasse alcalina no plasma sanguíneo foram feitas pelo método cinético mediante o uso do kit comercial (Bioclin, Brasil).

Foram coletados aproximadamente 3 mL de sangue em tubos heparinizados, pela via marginal da orelha, após 12 horas de jejum. A amostra foi centrifugada a 7100 xG por

15 minutos para separação do plasma, após foram tomadas alíquotas de 1mL do sobrenadante as diluições foram realizadas com soluções salina (0,9%). A preparação dos reagentes foi feita de acordo ao indicado por cada kit e a leitura foi realizado no analisador multiparamétrico de bioquímica- Alizé.

4.6. Avaliação histológica e morfológica do fígado

4.6.1. Eutanásia

No final do experimento, foram administrados os anestésicos Xilazina (5mgkg^{-1}) e Cetamina (20 mgkg^{-1}) por via muscular, e se realizou a exsanguinação (punção cardíaca).

4.6.2. Inclusão em resina

O lobo esquerdo do fígado foi dissecado e analisado histologicamente após os 60 dias do experimento. Para isto, foi fixado em solução paraformaldeido durante 24 horas e transferido para álcool ao 70%. Para a desidratação, os fragmentos hepáticos passaram por uma serie etanólica crescente (80%, 90%, 95% e 100%), com trocas cada 30 minutos, realizando-se a inclusão em glicol-metacrilato (Historesin®, Leica).

Secções de 3µm de espessura foram obtidas utilizando micrótomo rotativo (Leica) e navalhas de vidro. As preparações foram coradas com azul de toluidina/borato de sódio 1% (m/v) e montadas com Entellan® (Merck) sendo as imagens obtidas pelo uso do fotomicroscópio.

4.6.3. Morfometria do fígado

Foi realizada a quantificação dos elementos constituintes do fígado em cortes histológicos com destaque para hepatócitos, grandes vasos, capilares sinusoides, infiltrados leucocitários, gotículas de gordura, células degeneradas, núcleo e citoplasma de hepatócitos. Após a obtenção do diâmetro nuclear, foram calculados o volume nuclear, volume citoplasmático e volume total dos hepatócitos. Para a quantificação se utilizou uma grade de 494 pontos.

O diâmetro nuclear foi medido em 10 núcleos esféricos de hepatócitos por corte histológico. Foram feitas cinco repetições por animal para todos as análises. Para calcular

os volumes do núcleo, citoplasma e total do hepatócito, foram utilizadas as seguintes equações 6,7 e 8:

$$volume\ nuclear = \frac{4}{3} * \pi r^3 \qquad \text{(Equação 6)}$$

$$volume\ citoplasmático = \frac{\%citoplasma * volume\ nuclear}{\%núcleos} \qquad \text{(Equação 7)}$$

$$volume\ celular(hepatócito) = volume\ nuclear + volume\ citoplasmático \qquad \text{(Equação 8)}$$

Estas analises morfométricas foram realizadas mediante o programa Image Pro Plus 4.0 (Media Cybernects) ajustado para o aumento utilizado.

4.7. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Para as análises da atividade antioxidante foram realizados nos ensaios quadruplicado de cada concentração para cada material. Cada réplica foi analisada individualmente e os dados foram registrados como a média das quatro determinações (n = 4x4) DP (n = 4x4). Foram também analisadas as correlações entre os fenóis e as antocianinas totais com a atividade antioxidante por meio de análise multivariada de componentes principais, com correlações significativas (r) para aqueles tiveram um valor de $p < 0,05$.

Para o ensaio animal, a análise estatística foi realizada mediante parcelas subdivididas, onde as parcelas foram os grupos e as subdivisões foram os tempos num delineamento inteiramente casualizado com 5 repetições. Os dados foram analisados mediante analises de variância. A comparação entre a média de cada tratamento com a média do tratamento positivo e negativo foi feito pelo teste SNK, com um 5%.

Na análise estatística da morfometria do fígado, também foi realizado o teste SNK, mediante a comparação das medias dos diferentes tratamentos.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Quantificação de compostos fenólicos

5.1.1. Fenólicos totais

O valor dos fenóis totais na inflorescência do capim gordura pelo método de Folin Ciocalteu, foi de 603,5 mg AGE·100 g^{-1} da inflorescência de capim gordura. Este resultado foi superior ao reportado por REBOUÇAS (2011) 519,79 mg AGE·100 g^{-1}; além disso o valor foi maior para frutas como a pitanga (141,38 mg AGE·100 g^{-1}), a carambola (127,26 mg AGE·100 g^{-1}), o morango (178,56 mg AGE·100 g^{-1}), a goiaba (83,43 mg AGE·100 g^{-1}) (BATISTON et al. 2013), a jaca (29 mg AGE·100 g^{-1}) (ALMEIDA et al. 2011), mas foi inferior ao de frutas como jambolão (635,32 mg AGE·100 g^{-1}) e acerola (675,73 mg AGE·100 g^{-1}) (BATISTON et al. 2013).

Se tem sabido que os fenóis naturais têm benefícios na doença cardiovascular, doença coronária, diminuição de certos tipos de câncer (ZERN & FERNANDEZ 2005). Com este resultado, os compostos fenólicos presentes no extrato da inflorescência de capim gordura, poderiam ser considerados uma nova fonte de compostos bioativos.

5.1.2. Antocianinas

A quantificação de antocianinas pelo método de pH único, para o extrato concentrado da inflorescência de capim gordura apresentou um teor de 99,40 mg de cianidina 3-glicosídio·100g^{-1} inflorescência de capim gordura. Este resultado é superior ao encontrado por TEIXEIRA et al (2008) em frutas como açaí (21,23 mg/100g amostra), e morango (21,69 mg/100g amostra), sendo similar ao reportado na inflorescência de capim-gordura (96,90 mg/100g amostra) mas inferior ao reportado por REBOUÇAS (2011) (163,65 mg de cianidina 3-glicosídio·100g^{-1} capim gordura). Além disso, o extrato da inflorescência de capim gordura teve resultados maiores a outros frutos como jabuticaba (58,1 mg·100g^{-1}fruta) e jambolão (93,3 mg·100g^{-1}fruta) (RUFINO et al. 2010). As antocianinas são conhecidas por possuir uma elevada atividade antioxidante e por ter propriedades anticancerígenas, anti-inflamatória, antiobesidade (GALVANO et al. 2007), portanto, estes resultados indicam que o extrato da inflorescência de capim gordura poderia ser uma nova fonte alternativa para diminuir este tipo de doenças.

5.2. Determinação de atividade antioxidante pelo método ABTS

A capacidade de inibir o radical $ABTS^{\bullet+}$ do extrato fenólico da inflorescência de capim gordura foi de 3672 µMTrolox 100 g^{-1} de inflorescência, sendo similar ao reportado por REBOUÇAS (2011). Mediante o analise de componentes principais se encontrou uma alta correlação entre os fenóis totais e a atividade antioxidante ($p<0,05$), o que indica que os fenóis presentes na inflorescência do capim gordura são os responsáveis pela capacidade antioxidante do extrato da inflorescência de capim gordura. A capacidade antioxidante pelo método ABTS do extrato da inflorescência de capim gordura foi superior em relação a frutos como uva, açaí, goiaba, morango, cupuaçu, mas o resultado foi inferior que na acerola (KUSKOSKI et al. 2005), açaí, camu camu e murici (RUFINO et al. 2010).

5.3. Efeito do extrato fenólico de capim gordura nos níveis do colesterol plasmático

Os resultados mostram que o extrato fenólico de inflorescência de Capim gordura favoreceu aos coelhos durante os 60 dias, aparentemente não apresentou efeitos tóxicos, pois não foi observado nenhum sintoma de toxicidade durante o experimento.

Além disso, não se observaram diferenças entre os tratamentos na primeira coleta de sangue em nenhum dos parâmetros avaliados. Depois de iniciada a alimentação dos tratamentos com dieta rica em colesterol, na segunda coleta se evidenciou o aumento do colesterol nos tratamentos que tinham adição deste.

5.3.1. Colesterol total

O colesterol é um componente primordial nas estruturas das membranas biológicas, ajuda na síntese de ácido biliar, na produção de hormonas esteroide e da vitamina D; no entanto, seu aumento no plasma sanguíneo do organismo pode levar a aumentar o risco de desenvolver doenças cardiovasculares (ZOU & WEI, 2005), como é a ateroscleroses (RAFIEIAN-KOPAEI, et al. 2011); assim é importante a procura de fontes naturais que ajudem na redução do Colesterol sem ter danos adversos.

Na tabela 1 se mostra os resultados do colesterol total do tratamento que só teve adição de extrato da inflorescência de capim gordura (RE), onde os valores do colesterol total foram similares ao tratamento controle (R) durante todo o experimento.

Tabela 1. Valores médios do colesterol total (mg/dL) no soro sanguíneo dos coelhos com ração normal e extrato fenólico da inflorescência de capim gordura

Tempo (dias)	Tratamentos	n	Colesterol total (mg/dL)	Porcentagem de variação (R)
0	**R**	5	41,78±11,15[a]	-
	RE	5	35,64±7,37[a]	-14,69
30	**R**	5	37,72±14,08[a]	-
	RE	5	29,02±7,31[a]	-23,06
60	**R**	5	40,06±19,91[a]	-
	RE	5	34,56±5,51[a]	-13,73

R. Ração; RE. Ração + Extrato (0,88mg/2mL). n =número de repetições. Mesma letra na coluna não tem diferença ao nível de 5% de probabilidade pelo Teste de SNK.

Na seguinte tabela, se encontram os valores dos tratamentos que tiveram dieta com colesterol e extrato fenólico da inflorescência de capim gordura. Se observa que aos 30 dias do experimento os tratamentos RCAE1 e RCAE2 apresentaram uma diminuição significativa em relação ao tratamento controle com colesterol, com uma porcentagem de variação de 59,91% e 59,31% respetivamente.

Tabela 2. Valores médios do colesterol total (mg/dL) no soro sanguíneo dos coelhos dos tratamentos com colesterol e extrato fenólico da inflorescência de capim gordura

Tempo (dias)	Grupos	n	Colesterol total (mg/dL)	Porcentagem de variação (RCA)
0	**RCA**	5	35,38±7,96[a]	-
	RCAE1	5	49,86±22,71[a]	40,93
	RCAE2	5	49,50±7,17[a]	39,91
30	**RCA**	5	3214,07±853,00[a]	-
	RCAE1	5	1288,62±287,63[b]	-59,91
	RCAE2	5	1307,70±221,46[b]	-59,31
60	**RCA**	5	1417,76±383,55[a]	-
	RCAE1	5	1066,26±189,64[a]	-24,79
	RCAE2	5	1232,28±265,41[a]	-13,08

RCA. Ração+ Colesterol (1%) + ácido cólico (0,1); RCAE1. Ração+ Colesterol (1%) + ácido cólico (0,1) + Extrato (0,88mg/2mL); RCAE2. Ração+ Colesterol (1%) + ácido cólico (0,1) + Extrato (0,44mg/2mL). n =número de repetições. Mesma letra na coluna não tem diferença ao nível de 5% de probabilidade pelo Teste SNK.

Aos 60 dias do experimento se observa que o colesterol total do RCAE1 e RCAE2 apresentaram valores em menor proporção respeito ao RCA, com uma porcentagem de variação de 24,79 e 13,08% respetivamente. Além disso, se observou que o RCA baixou em quase um 50% em relação aos 30 dias, possivelmente à adaptação do metabolismo dos coelhos e também a que os coelhos desse tratamento diminuíram sua alimentação.

Resultados similares foram reportados por autores como GHUFFAR & MUSHTAQ (2014), LAKSHMI et al., (2011), DJERROUA et al., (2011) e PARK et al., (2014).

5.3.2. Colesterol LDL e HDL

Na tabela 3, se observam os valores das medias do colesterol LDL e HDL plasmáticos, nas três coletas de sangue dos coelhos dos tratamentos R e RE. Durante todo o experimento, os valores entre estes dois tratamentos foram similares, o que indica que o extrato da inflorescência de capim gordura ajuda a manter os níveis de colesterol LDL e HDL.

Tabela 3. Valores médios dos parâmetros de colesterol LDL e HDL (mg/dL) no soro sanguíneo dos coelhos com ração normal e extrato fenólico da inflorescência de capim gordura

Tempo (dias)	Grupos	n	Colesterol LDL (mg/dL)	Porcentagem de variação	Colesterol HDL (mg/dL)	Porcentagem de variação
0	**R**	5	11,56±2,01ª	-	15,44±3,92ª	-
	RE	5	35,64±7,37ª	208,30	12,93±2,56ª	-16,25
30	**R**	5	11,94±4,11ª	-	14,67±4,0a	-
	RE	5	10,70±3,92ª	-10,38	10,91±3,10ª	-25,63
60	**R**	5	3,51±2,51ª	-	25,94±12,81ª	-
	RE	5	2,18±2,52ª	-37,90	24,78±3,74ª	-4,47

T1. Ração (R); T2. Ração + Extrato (0,88mg/2mL) (RE). n =número de repetições. Mesma letra na coluna não tem diferença ao nível de 5% de probabilidade pelo Teste de SNK.

Os resultados do colesterol LDL e HDL, para os tratamentos RCA, RCAE1 e RCAE2, são mostrados na tabela 4. Destaca-se que os tratamentos RCAE1 e RCAE2, apresentaram uma redução do LDL com uma porcentagem de variação significativa respeito ao tratamento controle com colesterol, com 60,62 e 59,78% respetivamente. Embora na terceira coleta os valores do colesterol LDL foram similares para os três tratamentos.

O LDL é o responsável do deposito do colesterol nas paredes das artérias, reduzindo o fluxo sanguíneo, a parte de ser um risco para as doenças coronárias (ZOU & WEI, 2005; KLASSA, B. et al. 2013). Sua diminuição neste estudo, pode ser porque os compostos fenólicos presentes no extrato fenólico da inflorescência de capim gordura aumentaram a ação dos receptores LDL que resulta na degradação do colesterol LDL (LIMA et al. 2010) ou também devido à função dos flavonoides respeito à diminuição na secreção da apoproteína B levando a uma redução da atividade da enzima acil-COA (OLIVEIRA et al 2002; LIMA et al, 2010).

Tabela 4. Valores médios dos parâmetros de colesterol LDL e HDL (mg/dL) no soro sanguíneo dos coelhos dos tratamentos com colesterol e extrato fenólico da inflorescência de capim gordura

Tempo (dias)	Grupos	n	Colesterol LDL (mg/dL)	Porcentagem de variação	Colesterol HDL (mg/dL)	Porcentagem de variação
0	RCA	5	8,90±5,93[a]	-	17,86±3,90[a]	-
	RCAE1	5	3,68±3,27[a]	-58,65	17,46±4,09[a]	-2,24
	RCAE2	5	7,90±4,73[a]	-11,23	21,38±5,06a	19,71
30	RCA	5	3111,53±823,67[a]	-	56,64±10,40[a]	-
	RCAE1	5	1225,36±259,95[b]	-60,62	22,00±3,77[b]	-57,19
	RCAE2	5	1251,46±204,92[b]	-59,78	21,70±4,76[b]	-57,81
60	RCA	5	1417,76±383,55[a]	-	34,59±9,95[a]	-
	RCAE1	5	1066,26±189,64[a]	-24,79	41,73±9,82[a]	16,56
	RCAE2	5	1232,28±265,41[a]	-13,08	37,58±6,32[a]	6,87

RCA. Ração+ Colesterol (1%) + ácido cólico (0,1); RCAE1. Ração+ Colesterol (1%) + ácido cólico (0,1) + Extrato (0,88mg/2mL); RCAE2. Ração+ Colesterol (1%) + ácido cólico (0,1) + Extrato (0,44mg/2mL). n =número de repetições. Mesma letra na coluna não tem diferença ao nível de 10% de probabilidade pelo Teste de Tukey. As médias com asterisco são diferentes do controle ao nível de 10% probabilidade pelo teste de Dunnett.

Aos 30 dias se observou um aumento do colesterol HDL nos três tratamentos, no entanto o teor em RCAE1 e RCAE2 foi menor ao encontrado no RCA. Embora o aumento do colesterol HDL não foi significativo, respeito ao tratamento com colesterol, se observou na tabela 2 a capacidade do extrato fenólico da inflorescência de capim gordura na redução total do colesterol.

Estes resultados foram similares ao reportado por Lima et al. (2010), onde a quercetina, a crisina e a rutina apresentaram diminuição do HDL, embora tiveram uma boa redução do colesterol total.

Os valores médios encontrados do HDL, são similares ao reportado pelo Plate, e Arêas (2002), avaliaram o efeito do amaranto em coelhos hipercolesterolêmicos, durante 21 dias e determinaram que o extrato de amaranto extrusado ajudou à diminuição do colesterol total, o LDL, triglicerídeos, VLDL em um 43,7%, do LDL e um aumento do HDL em 17%. O aumento moderado do HDL nosso estudo pode estar relacionado, ao aumento moderado dos triacilgliceróis existindo uma correlação entre o aumento dos triacilgliceróis e a diminuição do HDL, similar ao reportado (SCHIAVO, LUNARDELLI, & OLIVEIRA 2003).

5.3.3. Colesterol VLDL e Triacilgliceróis

Na tabela 5, se observam os valores médios do colesterol VLDL e triacilgliceróis para os grupos R e RE. Os resultados do VLDL foram proporcionais aos resultados encontrados nos triacilgliceróis. Se mostra que o RE apresentou menor proporção de variação de 33,33 e 28,37% nos 30 e 60 dias em relação ao R.

Tabela 5. Valores médios dos parâmetros de colesterol VLDL e triacilgliceróis (mg/dL) no soro sanguíneo dos coelhos com ração normal e extrato fenólico da inflorescência de capim gordura

Tempo (dias)	Grupos	n	Colesterol VLDL (mg/dL)	Porcentagem de variação	Triacilgliceróis (mg/dL)	Porcentagem de variação
0	**R**	5	29,50±14,91[a]	-	147,48±74,53[a]	-
	RE	5	15,32±9,90[a]	-48,06	76,44±49,47[a]	-48,17
30	**R**	5	11,13±9,03[a]	-	55,56±45,07[a]	-
	RE	5	7,42±1,91[a]	-33,33	37,08±9,62[a]	-33,26
60	**R**	5	10,61±5,01[a]	-	53,06±25,06[a]	-
	RE	5	7,60±1,54[a]	-28,37	38,00±7,68[a]	-28,38

T1. Ração (R); T2. Ração + Extrato (0,88mg/2mL) (RE). n =número de repetições. Mesma letra na coluna não tem diferença ao nível de 5% de probabilidade pelo Teste de SNK.

O aumento do VLDL, é dependente do aumento dos triacilgliceróis disponíveis no fígado. Na tabela 6 se pode observar que a diminuição do VLDL foi similar à

diminuição dos triacilgliceróis para os tratamentos que tiveram adição de extrato fenólico da inflorescência de Capim gordura em maior concentração (RCAE1) aos 60 dias do experimento, embora estes resultados foram similares ao grupo RCAE; portanto se pode dizer que o extrato fenólico da inflorescência de Capim gordura não influenciou os resultados do colesterol VLDL e dos triacilgliceróis.

Tabela 6. Valores médios dos parâmetros de colesterol VLDL e triacilgliceróis (mg/dL) no soro sanguíneo dos coelhos dos tratamentos com colesterol e extrato fenólico da inflorescência de capim gordura

Tempo (dias)	Grupos	n	Colesterol VLDL (mg/dL)	Porcentagem de variação	Triacilgliceróis (mg/dL)	Porcentagem de variação
0	RCA	5	8,82±4,02[a]	-	44,04±20,21[a]	-
	RCAE1	5	33,6±26,23 [a]	280,95	168,12±131,15[a]	281,74
	RCAE2	5	20,22±8,65[a]	129,25	101,16±43,26[a]	129,70
30	RCA	5	45,30±28,01[a]	-	226,49±140,07[a]	-
	RCAE1	5	41,26±32,40[a]	-8,92	206,28±162,03[a]	-8,92
	RCAE2	5	34,54±23,70[a]	-23,75	172,68±118,46[a]	-23,76
60	RCA	5	35,15±28,22[a]	-	175,74±141,12[a]	-
	RCAE1	5	29,98±31,43[a]	-14,71	149,88±157,14[a]	-14,71
	RCAE2	5	39,95±36,40a	13,65	197,76±181,40[a]	12,53

RCA. Ração+ Colesterol (1%) + ácido cólico (0,1); RCAE1. Ração+ Colesterol (1%) + ácido cólico (0,1) + Extrato (0,88mg/2mL); RCAE2. Ração+ Colesterol (1%) + ácido cólico (0,1) + Extrato (0,44mg/2mL). n =número de repetições. Mesma letra na coluna não tem diferença ao nível de 5% de probabilidade pelo Teste de SNK.

De forma geral, se pode dizer, que o efeito hipocolesterolêmico apresentado pelo extrato fenólico da inflorescência de capim gordura nos coelhos avaliados, foi devido a seu mecanismo de ação. Segundo o ZERN & FERNANDEZ (2005), consiste na redução da atividade da ACAT, que inibe a esterificação do colesterol e do MTP, levando à degradação da apoproteína B, principal componente do colesterol LDL, além de ter uma redução na sínteses e secreção do VLDL. Essas alterações, ativam a LPL encarregada da diminuição das concentrações de triacilgliceróis, quilomícrons e VLDL no plasma.

Além disso, a diminuição obtida do colesterol total e LDL, se viu influenciado, pelo aumento dos receptores do LDL, que atuaram como antioxidantes do LDL e consequentemente uma diminuição do colesterol intracelular.

Devido a estas ações, o extrato fenólico da inflorescência de capim gordura, alcançou em trinta dias uma diminuição de colesterol total de 60% comparado com o grupo RCA. Além, estes resultados, são similares ao reportado com o uso da estatina, medicamento atualmente utilizado para a diminuição do colesterol total, embora tem se descoberto que o uso excessivo deste medicamente leva a ter danos no organismo (CARRASCOSA et al., 2004).

5.4. Efeito do extrato fenólico de capim gordura nas proteínas plasmáticas

5.4.1. Proteínas totais

As proteínas totais constituem 7- 7.5 g/dL no plasma do ser humano, são uma mistura de proteínas simples, conjugadas, como glicoproteínas e lipoproteína, principalmente são sintetizadas no fígado (MURRAY et al. 2012).

Nas tabelas 7 e 8 se observam que em relação com este parâmetro não houve diferença estatisticamente significativa pelo teste SNK, ao nível de 5% de probabilidade. O que indica que o extrato fenólico da inflorescência de capim gordura não teve efeito em relação ao teor das proteínas totais. No entanto, os valores obtidos de proteínas totais nos grupos avaliados se encontram dentro dos valores normais de proteínas plasmáticas no ser humano, segundo o reportado por MURRAY et al. (2012) e em coelhos que é de 54 a 75 g/L (VARGA 2014).

Tabela 7. Valores médios das proteínas totais (g/L) no soro sanguíneo dos coelhos com ração normal e extrato fenólico da inflorescência de capim gordura

Tempo (dias)	Tratamentos	n	Proteínas totais (g/L)	Porcentagem de variação (R)
0	**R**	5	68,39±4,54ª	-
	RE	5	66,30±7,66ª	-3,06
30	**R**	5	67,50±5,70ª	-
	RE	5	63,68±1,76ª	-5,66
60	**R**	5	56,56±16,88ª	-
	RE	5	72,00±3,75ª	27,30

R. Ração; RE. Ração + Extrato (0,88mg/2mL). n =número de repetições. Mesma letra na coluna não tem diferença ao nível de 5% de probabilidade pelo Teste de SNK.

Tabela 8. Valores médios dos parâmetros das proteínas totais (g/L) no soro sanguíneo dos coelhos dos tratamentos com colesterol e extrato fenólico da inflorescência de capim gordura

Tempo (dias)	Grupos	n	Proteínas totais (g/L)	Porcentagem de variação (RCA)
0	**RCA**	5	68,70±3,89ª	-
	RCAE1	5	69,06±5,93ª	0.52
	RCAE2	5	69,84±5,21ª	1,70
30	**RCA**	5	84,06±8,22ª	-
	RCAE1	5	93,24±25,11ª	10,92
	RCAE2	5	89,28±12,68ª	6,21
60	**RCA**	5	86,70±6,49ª	-
	RCAE1	5	81,00±6,64ª	-6,60
	RCAE2	5	79,80±6,24ª	-7,96

RCA. Ração+ Colesterol (1%) + ácido cólico (0,1); RCAE1. Ração+ Colesterol (1%) + ácido cólico (0,1) + Extrato (0,88mg/2mL); RCAE2. Ração+ Colesterol (1%) + ácido cólico (0,1) + Extrato (0,44mg/2mL). n =número de repetições. Mesma letra na coluna não tem diferença ao nível de 5% de probabilidade pelo Teste de SNK.

5.4.2. Creatinina

A creatinina é um composto nitrogenado, encontrado no sangue e na urina, é considerada como um indicador da função renal, junto com a ureia são excretadas na urina (MIZOI, et al. 2008). O aumento da creatinina pode indicar dano renal e pode se indicador de uma doença cardiovascular já que estão relacionados (CARDA BARRIO, et al. 2007).

Na tabela 9, se mostra os valores médios da creatinina para o grupo com dieta normal (R) e o grupo com dieta normal, mais adição de extrato fenólico de inflorescência de capim gordura (RE), sem encontrar se uma diferença estatisticamente significativa.

Tabela 9. Valores médios da Creatinina (mg/dL) no soro sanguíneo dos coelhos com ração normal e extrato fenólico da inflorescência de capim gordura

Tempo (dias)	Tratamentos	n	Creatinina (mg/dL)	Porcentagem de variação (R)
0	**R**	5	1,18±0,14[a]	-
	RE	5	1,21±0,13[a]	2,54
30	**R**	5	1,02±0,06[a]	-
	RE	5	0,99±0,05[a]	-2,94
60	**R**	5	1,27±0,24[a]	-
	RE	5	1,23±0,02[a]	-3,15

R. Ração; RE. Ração + Extrato (0,88mg/2mL). n =número de repetições. Mesma letra na coluna não tem diferença ao nível de 5% de probabilidade pelo Teste de SNK.

Os valores médios da creatinina para os grupos que tiveram uma dieta com colesterol e ácido cólico, são observados na tabela 10. O grupo que teve adição de extrato fenólico de inflorescência de capim gordura mais concentrado (RCAE1), foi menor em uma porcentagem de 66,67% em relação ao grupo RCA aos 30 dias do experimento e uma porcentagem menor de 10 e 12,33% aos 30 e 60 dias respetivamente em relação ao RCA.

Tabela 10. Valores médios dos parâmetros da Creatinina (mg/dL) no soro sanguíneo dos coelhos dos tratamentos com colesterol e extrato fenólico da inflorescência de capim gordura

Tempo (dias)	Grupos	n	Creatinina (mg/dL)	Porcentagem de variação (RCA)
0	**RCA**	5	1,13±0,08[a]	-
	RCAE1	5	1,22±0,09[a]	7,96
	RCAE2	5	1,16±0,20[a]	2,65
30	**RCA**	5	0,60±0,38[a]	-
	RCAE1	5	0,20±0,39[a]	-66,67
	RCAE2	5	0,54±0,50[a]	-10,00
60	**RCA**	5	1,46±0,28[a]	-
	RCAE1	5	1,46±0,21[a]	0,00
	RCAE2	5	1,28±0,22[a]	-12,33

RCA. Ração+ Colesterol (1%) + ácido cólico (0,1); RCAE1. Ração+ Colesterol (1%) + ácido cólico (0,1) + Extrato (0,88mg/2mL); RCAE2. Ração+ Colesterol (1%) + ácido cólico (0,1) + Extrato (0,44mg/2mL). n =número de repetições. Mesma letra na coluna não tem diferença ao nível de 5% de probabilidade pelo Teste de SNK.

5.4.3. Albumina

A albumina é a principal proteína plasmática no ser humano (3,4 a 4,7 g/dL), é sintetizada no fígado como uma preproteína. A diminuição das sínteses da albumina, principalmente no fígado, é devido à aparição de doenças hepáticas, produzindo uma baixa proporção entre albumina e globulina (MURRAY et al. 2012).

Nas tabelas 11 e 12, se observa os valores médios da concentração plasmática de albumina. Aos 60 dias do experimento, o grupo RE, teve uma maior concentração de albumina em relação ao grupo R ($P<0,05$). Para os grupos RCAE1 e RCAE2, se observa que no final do experimento, seus valores foram menores em 2,14% e 4,60%, respetivamente, em relação ao grupo RCA.

Os níveis da albumina obtido neste estudo foram maiores ao reportado pelo reportado por RIBEIRO et al. (2006), no entanto, nossos resultados foram similares ao tratamento controle (R), o que indica que o extrato fenólico da inflorescência de capim gordura não ocasionou alterações significativas nos valores da albumina dos coelhos avaliados.

Tabela 11. Valores médios da albumina (g/dL) no soro sanguíneo dos coelhos com ração normal e extrato fenólico da inflorescência de capim gordura

Tempo (dias)	Tratamentos	n	Albumina (g/dL)	Porcentagem de variação (R)
0	**R**	5	5,54±0,33[a]	-
	RE	5	4,88±0,86[a]	-11,91
30	**R**	5	5,55±0,38[a]	-
	RE	5	5,38±0,16[a]	-3,06
60	**R**	5	5,25±0,35[a]	-
	RE	5	5,65±0,16[b]	7,62

R. Ração; RE. Ração + Extrato (0,88mg/2mL). n =número de repetições. Mesma letra na coluna não tem diferença ao nível de 5% de probabilidade pelo Teste de SNK.

Tabela 12. Valores médios dos parâmetros da Albumina (g/dL) no soro sanguíneo dos coelhos dos tratamentos com colesterol e extrato fenólico da inflorescência de capim gordura

Tempo (dias)	Grupos	n	Albumina (g/dL)	Porcentagem de variação (RCA)
0	RCA	5	5,09±0,52ª	-
	RCAE1	5	5,52±0,30ª	8,45
	RCAE2	5	5,43±0,31ª	6,68
30	RCA	5	6,05±0,23ª	-
	RCAE1	5	6,20±0,25ª	2,48
	RCAE2	5	5,84±0,56ª	-3,47
60	RCA	5	6,08±0,41ª	-
	RCAE1	5	5,95±0,35ª	-2,14
	RCAE2	5	5,80±0,28ª	-4,60

RCA. Ração+ Colesterol (1%) + ácido cólico (0,1); RCAE1. Ração+ Colesterol (1%) + ácido cólico (0,1) + Extrato (0,88mg/2mL); RCAE2. Ração+ Colesterol (1%) + ácido cólico (0,1) + Extrato (0,44mg/2mL). n =número de repetições. Mesma letra na coluna não tem diferença ao nível de 5% de probabilidade pelo Teste de SNK.

5.5. Efeito do extrato fenólico de capim gordura na Glicose

A média da glicose dos tratamentos avaliados é mostrada nas Tabelas 13 e 14. Observa se que durante o experimento não se encontraram diferenças significativas entre os grupos (P>0,05).

Os valores normais da glicose nos coelhos são de 75,6-144 g/dL (VARGA 2014), portanto, os valores obtidos foram maiores nos grupos, possivelmente o aumento dos níveis da glicose nos coelhos, deve-se ao estresse apresentado na hora da coleta de sangue.

Tabela 13. Valores médios da Glicose (mg/dL) no soro sanguíneo dos coelhos com ração normal e extrato fenólico da inflorescência de capim gordura

Tempo (dias)	Tratamentos	n	Glicose (mg/dL)	Porcentagem de variação (R)
0	**R**	5	163,80±10,85[a]	-
	RE	5	174,86±20,75[a]	6,75
30	**R**	5	162,36±11,77[a]	-
	RE	5	155,10±4,28[a]	-4.47
60	**R**	5	154,14±23,78[a]	-
	RE	5	164,68±23,45[a]	6.84

R. Ração; RE. Ração + Extrato (0,88mg/2mL). n =número de repetições. Mesma letra na coluna não tem diferença ao nível de 5% de probabilidade pelo Teste de SNK.

Tabela 14. Valores médios dos parâmetros da Glicose (mg/dL) no soro sanguíneo dos coelhos dos tratamentos com colesterol e extrato fenólico da inflorescência de capim gordura

Tempo (dias)	Grupos	n	Glicose (mg/dL)	Porcentagem de variação (RCA)
0	**RCA**	5	174,06±34,17[a]	-
	RCAE1	5	163,16±9,47[a]	-6,26
	RCAE2	5	164,80±3,48[a]	-5,32
30	**RCA**	5	128,19±21,80[a]	-
	RCAE1	5	133,50±11,70[a]	4,14
	RCAE2	5	144,52±12,70[a]	12,74
60	**RCA**	5	157,14±24,27[a]	-
	RCAE1	5	157,74±8,56[a]	0,38
	RCAE2	5	158,82±7,95[a]	1,07

RCA. Ração+ Colesterol (1%) + ácido cólico (0,1); RCAE1. Ração+ Colesterol (1%) + ácido cólico (0,1) + Extrato (0,88mg/2mL); RCAE2. Ração+ Colesterol (1%) + ácido cólico (0,1) + Extrato (0,44mg/2mL). n =número de repetições. Mesma letra na coluna não tem diferença ao nível de 5% de probabilidade pelo Teste de SNK.

5.6. EFEITO DO EXTRATO DE CAPIM GORDURA NAS ENZIMAS HEPÁTICAS

5.6.1. Aminotranferases Alanina trasnferase (ALT) e Aspartato aminotransferase (AST)

As aminotransferases a alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) são encontradas no fígado, músculos e cérebro, encarregadas de catalisar a transferência de uma amina para um cetoácido, principalmente para o α-cetoglutarato e são encarregadas de indicar lesões celulares hepáticas (SILVA, et al. 2005; RIBEIRO et al. 2006).

Nas tabelas 15 e 16, se pode observar os valores obtidos na enzima AST. A partir da segunda avaliação da enzima AST, ficaram dentro do rango permitido (10-98 U/L) segundo o descrito por VARGA (2014) e foram similares ao reportado por RIBEIRO et al. (2006) e LIMA (2000).

Segundo o LIMA (2000), citado por RIBEIRO et al. (2006), alguns flavonoides não alteram significativamente a atividade da AST em coelhos machos albinos da raça Nova Zelândia.

Tabela 15. Valores médios dos parâmetros de Aspartato aminotransferase (AST) (U/L) no soro sanguíneo dos coelhos com ração normal e extrato fenólico da inflorescência de capim gordura

Tempo (dias)	Tratamentos	n	AST (U/L)	Porcentagem de variação (R)
0	**R**	5	54,60±25,35[a]	-
	RE	5	82,40±38,81[a]	50,92
30	**R**	5	54,00±28,01[a]	-
	RE	5	61,80±26,31[a]	14,4
60	**R**	5	59,60±47,96[a]	-
	RE	5	49,40±21,78[a]	-17,11

R. Ração; RE. Ração + Extrato (0,88mg/2mL). n =número de repetições. Mesma letra na coluna não tem diferença ao nível de 5% de probabilidade pelo Teste de SNK.

Tabela 16. Valores médios dos parâmetros de Aspartato aminotransferasa (AST) (U/L) no soro sanguíneo dos coelhos dos tratamentos com colesterol e extrato fenólico da inflorescência de capim gordura

Tempo (dias)	Grupos	n	AST (U/L)	Porcentagem de variação (RCA)
0	RCA	5	81,60±79,56[a]	-
	RCAE1	5	135,60±79,90[a]	66,18
	RCAE2	5	148,00±93,78[a]	81,37
30	RCA	5	33,60±19,60[a]	-
	RCAE1	5	12,00±16,02[a]	-64,29
	RCAE2	5	97,20±155,33[a]	189,29
60	RCA	5	57,00±9,95[a]	-
	RCAE1	5	54,60±31,64[a]	-4,21
	RCAE2	5	37,80±9,39[a]	-33,68

RCA. Ração+ Colesterol (1%) + ácido cólico (0,1); RCAE1. Ração+ Colesterol (1%) + ácido cólico (0,1) + Extrato (0,88mg/2mL); RCAE2. Ração+ Colesterol (1%) + ácido cólico (0,1) + Extrato (0,44mg/2mL). n =número de repetições. Mesma letra na coluna não tem diferença ao nível de 5% de probabilidade pelo Teste de SNK.

A alanina aminotransferase (ALT), é utilizada como indicador de dano hepático, e seu grau de aumento, está correlaciona com a gravidade da doença hepática ou doenças no cérebro ou musculo. (RIBEIRO et al., 2006; VARGA 2014).

Os valores médios da enzima ALT, são mostrados nas tabelas 17 e 18. Para o grupo RE, os valores foram normais durante todo o experimento, o que indica que o extrato fenólico da inflorescência de capim gordura em organismos sadios não apresentou alterações nesta enzima.

Tabela 17. Valores médios dos parâmetros de Alanina aminotransferase (ALT) (U/L) no soro sanguíneo dos coelhos com ração normal e extrato fenólico da inflorescência de capim gordura

Tempo (dias)	Tratamentos	n	ALT (U/L)	Porcentagem de variação (R)
0	**R**	5	91,20±36,78[a]	-
	RE	5	123,20±73,27[a]	35,08
30	**R**	5	73,80±22,45[a]	-
	RE	5	92,20±44,16[a]	24,93
60	**R**	5	82,80±46,20[a]	-
	RE	5	95,80±25,59[a]	15,70

R. Ração; RE. Ração + Extrato (0,88mg/2mL). n =número de repetições**.** Mesma letra na coluna não tem diferença ao nível de 5% de probabilidade pelo Teste de SNK.

Tabela 18. Valores médios dos parâmetros de Alanina aminotransferasa (ALT) (U/L) no soro sanguíneo dos coelhos dos tratamentos com colesterol e extrato fenólico da inflorescência de capim gordura

Tempo (dias)	Grupos	n	ALT (U/L)	Porcentagem de variação (RCA)
0	**RCA**	5	96,80±37,69[a]	-
	RCAE1	5	109,40±42,31[a]	13,01
	RCAE2	5	164,20±33,7[a]	69,63
30	**RCA**	5	57,00±21,84[a]	-
	RCAE1	5	45,00±14,23[a]	-21,05
	RCAE2	5	103,80±44,27[b]	82,10
60	**RCA**	5	63,60±20,17[a]	-
	RCAE1	5	63,60±26,10[a]	0,00
	RCAE2	5	65,40±12,97[a]	2,83

RCA. Ração+ Colesterol (1%) + ácido cólico (0,1); RCAE1. Ração+ Colesterol (1%) + ácido cólico (0,1) + Extrato (0,88mg/2mL); RCAE2. Ração+ Colesterol (1%) + ácido cólico (0,1) + Extrato (0,44mg/2mL). n =número de repetições**.** Mesma letra na coluna não tem diferença ao nível de 5% de probabilidade pelo Teste de SNK.

Na tabela 18, se observa que aos 30 dias do experimento o grupo RCAE2, foi maior o valor da enzima ALT, em uma porcentagem de 82,1%, o que poderia indicar que a baixa concentração do extrato fenólico da inflorescência de capim gordura não estava

apresentando um efeito protetor no tecido hepático. Embora, os valores da enzima ficaram nos rangos normais segundo o descrito por VARGAS (2014).

O aumento dos níveis da ALT, é um indicador especifico de uma doença hepática (OCKNER, 1993, citado por RIBEIRO et al., 2006), isto indica que o extrato fenólico da inflorescência de capim gordura teve um efeito hepatoprotetor.

5.6.2. Gama glutamil tranferase (γ-GT)

A enzima γ-GT, encontra-se no tecido hepático e renal. É utilizado como um indicador de doença hepatobiliar, associada com danos no fígado a longo prazo. Embora a γ-GT, é encontrado também em altas concentrações na tubular renal (VARGAS 2014).

Na tabela 19, observa se os valores médios da enzima γ-GT, dos grupos R e RE. Os valores do grupo RE, foram normais durante todo o experimento, indicando que o extrato fenólico da inflorescência de capim gordura não alterou essa enzima, nem teve um efeito toxico no organismo.

Tabela 19. Valores médios dos parâmetros de Gamma (γ-GT) (U/L) no soro sanguíneo dos coelhos com ração normal e extrato fenólico da inflorescência de capim gordura

Tempo (dias)	Tratamentos	n	γ-GT (U/L)	Porcentagem de variação (R)
0	**R**	5	11,20±3,63ª	-
	RE	5	12,20±5,50ª	8,92
30	**R**	5	12,60±1,52ª	-
	RE	5	10,40±3,85ª	-17,46
60	**R**	5	8,80±2,77ª	-
	RE	5	10,60±3,05ª	20,45

R. Ração; RE. Ração + Extrato (0,88mg/2mL). n =número de repetições. Mesma letra na coluna não tem diferença ao nível de 5% de probabilidade pelo Teste de SNK.

Os grupos que tiveram uma dieta rica em colesterol, apresentaram valores altos da enzima (Tabela 20), provavelmente pode estar associado a uma doença hepatobiliar, como a colestase intra ou extra-hepática ou pode estar relacionado a uma doença renal (ALVES et al. 2003; MOTTA 2003; RIBEIRO et al. 2006EMANUELLI et al., 2008).

Porém, o extrato fenólico da inflorescência de capim gordura não teve efeito na proteção desses tecidos.

Tabela 20. Valores médios dos parâmetros de Gamma (γ-GT) (U/L) no soro sanguíneo dos coelhos dos tratamentos com colesterol e extrato fenólico da inflorescência de capim gordura

Tempo (dias)	Grupos	n	γ-GT (U/L)	Porcentagem de variação (RCA)
0	RCA	5	10,60±3,29[a]	-
	RCAE1	5	11,20±2,68[a]	5,66
	RCAE2	5	12,20±3,03[a]	15,09
30	RCA	5	415,63±137,15[a]	-
	RCAE1	5	399,12±281,51[ab]	-3,97
	RCAE2	5	69,00±120,07[b]	-83,40
60	RCA	5	301,92±216,74[ab]	-
	RCAE1	5	427,60±206,10[a]	41,63
	RCAE2	5	148,20±67,60[b]	-50,91

RCA. Ração+ Colesterol (1%) + ácido cólico (0,1); RCAE1. Ração+ Colesterol (1%) + ácido cólico (0,1) + Extrato (0,88mg/2mL); RCAE2. Ração+ Colesterol (1%) + ácido cólico (0,1) + Extrato (0,44mg/2mL). n =número de repetições. Mesma letra na coluna não tem diferença ao nível de 5% de probabilidade pelo Teste de SNK.

5.6.3. Fosfatase alcalina

A fosfatase alcalina está amplamente distribuída no corpo, encontrando-se principalmente no osso, fígado e na parede intestinal. Na tabela 21, estão os valores médios, para o grupo que teve uma dieta normal e um grupo que teve adição de extrato fenólico da inflorescência de capim gordura. Não se evidenciaram diferencias significativas entre os grupos, além disso, segundo o reportado por MURRAY et al. (2012), os valores encontrassem dentro do permitido entre 33-96 U/L, indicando que o extrato fenólico da inflorescência de capim gordura, manteve os níveis normais da enzima, sem evidenciar um efeito toxico nos tecidos hepáticos.

Tabela 21. Valores médios dos parâmetros de fosfatasse alcalina (U/L) no soro sanguíneo dos coelhos com ração normal e extrato fenólico da inflorescência de capim gordura

Tempo (dias)	Tratamentos	n	Fosfatasse alcalina(U/L)	Porcentagem de variação (R)
0	**R**	5	92,60±23,96[a]	-
	RE	5	83,00±27,54[a]	-10,37
30	**R**	5	74,60±20,77[a]	-
	RE	5	64,80±10,40[a]	-13,14
60	**R**	5	43,40±6,95[a]	-
	RE	5	47,40±10,45[a]	9,22

R. Ração; RE. Ração + Extrato (0,88mg/2mL). n =número de repetições. Mesma letra na coluna não tem diferença ao nível de 5% de probabilidade pelo Teste de SNK.

Tabela 22. Valores médios dos parâmetros de fosfatasse alcalina (U/L) no soro sanguíneo dos coelhos dos tratamentos com colesterol e extrato fenólico da inflorescência de capim gordura

Tempo (dias)	Grupos	n	Fosfatasse alcalina(U/L)	Porcentagem de variação (RCA)
0	**RCA**	5	68,60±14,21[a]	-
	RCAE1	5	101,00±25,84[a]	47,23
	RCAE2	5	88,00±27,92[a]	28,28
30	**RCA**	5	46,20±24,79[a]	-
	RCAE1	5	72,60±28,57[b]	57,14
	RCAE2	5	66,00±19,09[b]	42,86
60	**RCA**	5	37,20±6,57[a]	-
	RCAE1	5	70,80±36,78[a]	90,32
	RCAE2	5	72,60±19,26[a]	95,16

RCA. Ração+ Colesterol (1%) + ácido cólico (0,1); RCAE1. Ração+ Colesterol (1%) + ácido cólico (0,1) + Extrato (0,88mg/2mL); RCAE2. Ração+ Colesterol (1%) + ácido cólico (0,1) + Extrato (0,44mg/2mL). n =número de repetições. Mesma letra na coluna não tem diferença ao nível de 5% de probabilidade pelo Teste de SNK.

Na tabela 22, são mostrados os valores médios da fosfatase alcalina, para os grupos que tiveram uma dieta rica em colesterol (1%), ácido cólico, e extrato fenólico da inflorescência de capim gordura. Durante todo o experimento os níveis da fosfatasse alcalina estiveram dentro do rango normal.

Na terceira coleta de sangue, se observa que os grupos RCAE1 e RCAE2, aumentaram significativamente em um 90,32% e 95,16% respetivamente, em relação ao grupo que só teve uma dieta rica em colesterol (1%) e ácido cólico ($P< 0,05$). Este aumento embora foi alto, encontra-se dentro do teor normal, porém, pode influenciar no aumento da atividade osteoblástica que leva à formação óssea (GALI 2001; EMANUELLI, et al., 2008)

5.7. AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA DO FÍGADO NOS DIFERENTES TRATAMENTOS

Na figura 14, se apresenta a estrutura do fígado nos diferentes grupos avaliados. Pode se observar que na figura 14.I, a estrutura dos hepatócitos não sofreu alteração no grupo controle (R), ao igual que se observa na figura 14.II, o grupo que teve ração normal e adição de extrato da inflorescência do capim gordura (88 mg/mL), indicando que em condições normais o extrato não apresentou alteração toxica no tecido hepático, exibindo por tanto uma estrutura similar ao reportado por CHAGAS (2002), TEIXEIRA (2011).

No grupo que teve uma dieta com colesterol (1%) e ácido cólico (RCA), a figura 14.III, mostra uma grande quantidade de gotículas de gordura e a degeneração na estrutura de hepatócitos, que pode levar à esteatose, caracterizada pelo acumulo de gordura no parênquima hepático (KARNIKOWSKI et al., 2007).

Para os grupos que tiveram colesterol (1%), ácido cólico na ração e adição de extrato fenólico da inflorescência do capim gordura RCAE1 (88 mg/mL) e RCAE2 (44 mg/mL), se observa acúmulos de gordura, em menor proporção do que o grupo RCA (Figura 14.IV, 14.V), portanto, pode indicar que o extrato da inflorescência do capim gordura, ajudou na proteção do tecido hepático no aumento do colesterol.

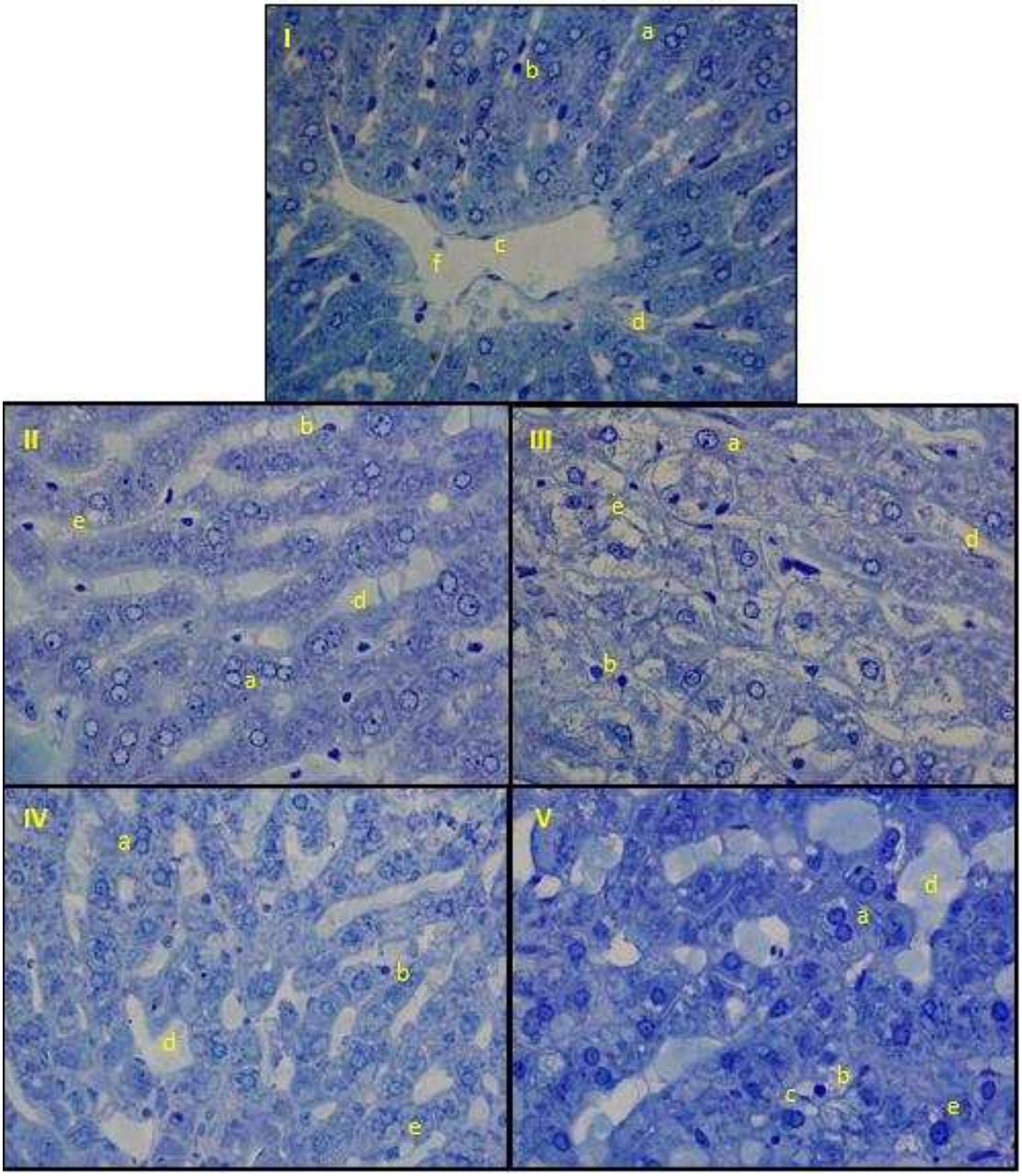


Figura 14. Estrutura do fígado. A. Grupo R. B. Grupo RE. C. Grupo RCA. D. Grupo RCAE1. E. Grupo RCAE2. a. hepatócito; b. célula de Kupffer; c. célula endotelial; d. sinusoide; e. gotícula de gordura; f. veia porta.

Os resultados da morfometria no fígado dos coelhos para os diferentes grupos, são mostrados na tabela 23. Não se encontraram diferenças significativas entre o volume do núcleo entre os grupos avaliados. Mas se observou também, que o volume citoplasmático e volume do hepatócito do grupo RCA, foi maior em comparação com os outros grupos avaliados.

Essas alterações no tamanho dos hepatócitos são devido ao aumento da atividade metabólica de origem patológico segundo o reportado por BRAUNBECK et al. (1990). Se observa que os grupos RCAE1 e RCAE2, apresentaram valores similares nestes parâmetros aos valores do grupo R, confirmando que a adição de extrato fenólico da inflorescência de capim gordura nesses grupos, ajudou a ter um efeito protetor no tecido hepático.

Tabela 23. Valores médios da morfometria do hepatócito no fígado dos coelhos

Grupos	Dieta	Volume núcleo (μm^3)	Volume citoplasma (μm^3)	Volume hepatócito (μm^3)
1	Ração (R)	1580,47[a]	21752,60[a]	23333,08[a]
2	R + Extrato (0,88mg/2mL) (RE)	1332,35[a]	19774,29[a]	21106,63[a]
3	R + colesterol + ácido cólico (RCA)	1569,98[a]	36512,97[b]	38082,95[b]
4	RCA + Extrato (0,88mg/2mL) (RCA1)	1121,60[a]	18790,98[a]	19912,58[a]
5	RCA + Extrato (0,44mg/1mL) (RCA2)	1344,30[a]	23896,77[a]	25241,07[a]

Mesma letra na coluna não tem diferença ao nível de 5% de probabilidade pelo Teste de SNK

6. CONCLUSÕES

- Os compostos fenólicos presentes na inflorescência de capim gordura, apresentaram uma redução do colesterol total de 59% e 60% na diminuição do colesterol LDL, aos 30 dias de experimento. Por tanto, o capim gordura, considerada uma espécie invasora, agora pode ser considerada uma nova fonte natural de compostos fenólicos que poderia ter aplicação industrial e clínica.

- O extrato fenólico da inflorescência de capim gordura em organismos sadios, não apresentou alterações na estrutura hepática. Se observou na avaliação morfometrica, que os grupos com dieta com colesterol e adição do extrato, houve um efeito hepatoprotetor.

7. SUGESTÕES

Os coelhos alimentados com colesterol e de ácido cólico na ração, este último facilitou uma máxima absorção. Por tanto, se sugere para próximos estudos não ter adição de ácido cólico na ração.

Diminuir a 30 dias de experimentação, já que se observou que é um tempo suficiente para obter bons resultados; além disso, se recomenda só fazer duas coletas de sangue durante o experimento (dia zero e final do experimento), para evitar aumentar o estresse nos coelhos.

7. REFERÊNCIAS

AFONSO, M. S., DE O, S. A., CARVALHO, E. B., RIVELLI, D. P., BARROS, S. B., ROGERO, M. M., LOTTENBERG, A. M., TORRES, R. & Mancini-Filho, J. Phenolic compounds from Rosemary (Rosmarinus officinalis L.) attenuate oxidative stress and reduce blood cholesterol concentrations in diet-induced hypercholesterolemic rats. **Nutrition and Metabolism (Lond)**, 10(1), 19, 2013

ALAM, N., YOON, K. N., LEE, J. S., CHO, H. J., SHIM, M. J., & LEE, T. S. Dietary effect of< i> Pleurotus eryngii</i> on biochemical function and histology in hypercholesterolemic rats. **Saudi Journal of Biological Sciences**, 18, 4, p. 403-409, 2011.

ALMEIDA, M. M. B., DE SOUSA, P. H. M., ARRIAGA, Â. M. C., DO PRADO, G. M., MAGALHÃES, C. E. D. C., MAIA, G. A., & DE LEMOS, T. L. G. Bioactive compounds and antioxidant activity of fresh exotic fruits from northeastern Brazil. **Food Research International**, 44, 7, p. 2155-2159, 2011.

ALVES JR, A., FONTES, D. A., MELO, V. A., MACHADO, M. C. C., CRUZ, J. F., & SANTOS, E. A. S. Hipertensão portal esquistossomótica: influência do fluxo sangüíneo portal nos níveis séricos das enzimas hepáticas. **Arquivos de Gastroenterologia**, 2003, 40, p. 203-208.

ANDERSEN, M. & JORDHEIM, M. (2006). The anthocyanins. In M. Andersen & K. R. Markham (Eds.), Flavonoids (2nd ed. Chemistry, biochemistry and applications, pp. 452–471). Boca Raton, FL: CRC Press.

APAK, REŞAT et al. Review "Comparative evaluation of various total antioxidant capacity assays applied to phenolic compounds with the CUPRAC assay." **Molecules Basel Switzerland**, 12.7, 1496-1547, 2007.

ARABLOU, T., Aryaeian, N., Valizadeh, M., Sharifi, F., Hosseini, A., & Djalali, M. The effect of ginger consumption on glycemic status, lipid profile and some inflammatory markers in patients with type 2 diabetes mellitus. **International Journal of Food Sciences and Nutritional**, 65 (4), p. 515-20, 2014.

ARANEGA, V. **Efeito da planta vitex montevidensis na aterosclerose experimental: uma abordagem sobre o desenvolvimento de um medicamento fitoterápico na indústria brasileira**. 2014. 154p. Teses (Doutorado em Farmacologia). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, 2014.

AZMIR, J., ZAIDUL, I. S. M. et. al. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. **Journal of Food Engineering**. 117, 426–436, 2013.

BARBOSA, K. B. F.; BRESSAN, J.; ZULET, M. A.; MARTINEZ, J. A. Influencia de la dieta sobre marcadores plasmáticos de estrés oxidativo en humanos. **Anales del Sistema Sanitario de Navarra**, 31 (3), 259-280, 2008.

BARUCH, Z.; LUDLOW, M. M.; DAVIS, R. Photosynthetic responses of native and introduced C4 grasses from Venezuela savannas. **Oecologia,** 67(3), 388-393, 1985.

BATISTON, W. P., MARUYAMA, S. A., GOMES, S. T. M., VISENTAINER, J. V., DE SOUZA, N. E., & MATSUSHITA, M. Total phenolic content and antioxidant capacity of methanolic extracts of ten fruits, doi: 10.4025/actascitechnol. v35i3. 18533. **Acta Scientiarum. Technology**, 35, 3, p. 581-585, 2013.

BERNE, R.M.; LEVY, M.N. KOLPPEN, B.M. & STANTON, B.A. capitulo 31, Transporte Hepático e Funções Metabólicas do Fígado. In: **Fisiología**, 6a Edição, Editora Elsevier. Rio de Janeiro, 2009, p 547-549.

BERNHOFT, A. A brief review on bioactive compounds in plants. In: Proceedings from a symposium held at The Norwegian Academy of Science and Letters, Oslo, Norway. 2010.

BOES, E., COASSIN, S., KOLLERITS, B., HEID, I. M., & KRONENBERG, F. Genetic-epidemiological evidence on genes associated with HDL cholesterol levels: a systematic in-depth review. **Experimental Gerontology**, 44 (3), 136-160, 2009.

BOIX, E. & PICÓ, A. M. Inhibidores de la absorción del colesterol. **Endocrinología y Nutrición**, 52 (6), 297-308, 2005.

BOTHAM, K. & MAYES, P. Capitulo 26, Síntesis transporte y excreción de colesterol. In: HARPER. **Bioquímica Ilustrada**. 29 ed. Lange Medical Books/McGraw-Hill, 2003, p. 224-234

BRAUNBECK, T., STORCH, V., & BRESCH, H. Species-specific reaction of liver ultrastructure in zebrafish (Brachydanio rerio) and trout (Salmo gairdneri) after prolonged exposure to 4-chloroaniline. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, 19, 3, p. 405-418, 1990.

BROWN, A. Cholesterol, statins and cancer. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, 34, 135 –141, 2007.

CALLAWAY, J.K., LAWRENCE, A.J., JARROTT, B. AM-36, a novel neuroprotective agent, profoundly reduces reactive oxygen species formation and dopamine release in the striatum of conscious rats after endothelin-1-inducedmiddle cerebral artery occlusion. **Neuropharmacology**, 44, 787–800, 2003.

CAMPOS, A. M, LISSI, E. A. Kinetics of the reaction between 2,2′-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) derived radical cations and phenols. **International Journal of Chemical Kinetics**. 29(3), 219–224. 1997.

CARDA BARRIO, R., DE AGUSTÍN, J. A., MANZANO, M. C., GARCÍA-RUBIRA, J. C., FERNÁNDEZ-ORTIZ, A., VILACOSTA, I., & MACAYA, C. Valor pronóstico intrahospitalario del filtrado glomerular en pacientes con síndrome coronario agudo y creatinina normal. **Revista Española de Cardiología**, 2007, 60, 7, p. 714-719.

CARRASCOSA, C. F., GALÁN, A. M., & TAIX, M. F. Estatinas: eficacia, seguridad e indicaciones. **Información Terapeutica del Sistema Nacional de Salud**, 28,4, 89-100. 2004.

CHAGAS, Cíntia Maria. **Avaliação de parâmetros bioquímicos e de aspectos toxicológicos de antocianina em coelhos Nova Zelândia**. 2002. 137p. Teses (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, 2002.

CHANG, Y. C., HUANG, K. X., HUANG, A. C., HO, Y. C., & WANG, C. J. Hibiscus anthocyanins rich extract inhibited LDL oxidation and oxLDL mediated macrophages apoptosis. **Food and Chemical Toxicology**, 44(7), 1015-1023, 2006.

CHERNIACK, E. P. Polyphenols: Planting the seeds of treatment for the metabolic syndrome. **Nutrition**, 27(6), 617-623. 2011.

CLIFFORD, M. N.; SCALBERT, A. Ellagitannins - nature, occurrence and dietary burden. **Journal of the Science of Food and Agriculture.** 80(7), 1118-1125. 2000.

CONTRERAS-CALDERON, J.; CALDERON-JAIMES, L.; GUERRA-HERNANDEZ, E. & GARCIA-VILLANOVA, B. Antioxidant capacity, phenolic content and vitamin C in pulp, peel and seed from 24 exotic fruits from Colombia. **Food Research International.** 44, 2047–2053, 2011.

CORRAL P, SCHREIER L. Historia y revisión de los inhibidores de la proteína transportadora de ésteres de colesterol y su aporte a la comprensión de la fisiología y la fisiopatología de la lipoproteína de alta densidad. **Clínica e Investigación Arteriosclerosis**. 26 (2), 78-84, 2014.

CRESPY, V., MORAND, C., BESSON, C., COTELLE, N., VÉZIN, H., DEMIGNÉ, C., & RÉMÉSY, C. The splanchnic metabolism of flavonoids highly differed according to the nature of the compound. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, 284(6), 980-988, 2003.

CROTEAU, R., KUTCHAN, T.M., LEWIS, N.G. Natural products (secondary metabolites). In: Buchanan, B., Gruissem, W., Jones, R. (Eds.), Biochemistry and Molecular Biology of Plants. **American Society of Plant Physiologists**, Rockville, MD, pp. 1250–1318, 2000.

D'ARCHIVIO, M., FILESI, C., VARÌ, R., SCAZZOCCHIO, B., & MASELLA, R. Bioavailability of the polyphenols: status and controversies. **International Journal of Molecular Sciences**, 11 (4), 1321-1342, 2010.

DJERROUA, Z., HAMDI-PACHA, Y., BELKHIRI, A, M., RIACHIA, F., SERAKTA, M., BOUKELOUA, A. & MAAMERI, Z. Evaluation of Pistacia lentiscus fatty oil effects on glycemic index, liver functions and kidney functions of New Zealand rabbits. **African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines.** 8, 5S, p. 214-219, 2011.

DE PASCUAL-TERESA, S. Molecular mechanisms involved in the cardiovascular and neuroprotective effects of anthocyanins. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 559, p 68-74, 2014.

DURST, R. & WROLSTAD, R. E. Separation and Characterization of Anthocyanins by HPLC. **Current Protocols in Food Analytical Chemistry.** Wrolstad, R.E., E.; John Wiley & Sons: New York, p. 1-13, 2001.

EMANUELLI, M. P., DOS ANJOS LOPES, S. T., MACIEL, R. M., GARMATZ, B. C., & DE OLIVEIRA TAVARES, M. Concentração sérica de fosfatase alcalina, gama-glutamil transferase, uréia e creatinina em coelhos (Oryctolagus cuniculus). **Ciência Animal Brasileira**, 9(1), 251-255, 2008.

ESPIN, J.; GARCIA-CONESA, M. & TOMAS-BARBERAN, F. Nutraceuticals: Facts and fiction. **Phytochemistry**.68, 2986–3008, 2007.

FERNANDES, I.; FARIA, A.; AZEVEDO, J.; SOARES, S.; CALHAU, C.; FREITAS, V.; MATEUS, N. Influence of Anthocyanins, Derivative Pigments and Other Catechol and Pyrogallol-Type Phenolics on Breast Cancer Cell Proliferation. **Journal of Agricultural Food Chemistry**. 58, 3785–3792, 2010.

FERNANDES, I., FARIA, A., CALHAU, C., DE FREITAS, V., & MATEUS, N. Bioavailability of anthocyanins and derivatives. **Journal of Functional Foods**. 75(3), 588-602, 2013.

FILGUEIRAS, T. S. A floristic analysis of the gramineae of Brasil. Distrito Federal and a list of species occuring in the área. **Edinburgh Journal of Botany,** 48, 73-80, 1991.

FRAGA, Cesar G. & OTEIZA, Patricia I. Dietary flavonoids: role of (−)-epicatechin and related procyanidins in cell signaling. **Free Radical Biology and Medicine**, 51 (4,) 813-823, 2011.

GALI, Júlio Cesar. Osteoporose. **Acta Ortopédica Brasileira**. 9, 2, 53-62, 2001 .

GALVANO F, LA FAUCI L, LAZZARINO G, FOGLIANO V, RITIENI A, CIAPPELLANO S, et al. Cyanidins: metabolism and biological properties. **Journal Nutritional Biochemistry,** 15(1), 2-11, 2004.

GALVANO, F., LA FAUCI, L., VITAGLIONE, P., FOGLIANO, V., VANELLA, L., & FELGINES, C. Bioavailability, antioxidant and biological properties of the natural free-radical scavengers cyanidin and related glycosides. **Annali dell'Istituto Superiore di Sanità**, 43, 4, p. 382-393, 2007.

GHASI, S.; NWOBODO, E. & OFILI, J. O. Hypocholesterolemic effects of crude extract of leaf of< i> Moringa oleifera</i> Lam in high-fat diet fed wistar rats. **Journal of Ethnopharmacology**, 69, 1, p. 21-25, 2000.

GHUFFAR, A., AHMAD, T., & MUSHTAQ, M. N. Antihyperlipidemic effect of Berberis orthobotrys in hyperlipidemic animal models. **Bangladesh Journal of Pharmacology**, 9, 3, p. 377-382, 2014.

GUREVITCH, J. & PADILLA, D. K. Are invasive species a major cause of extinctions?. **Trends in Ecology & Evolution,** 19, 470-474, 2004.

HASSAN, H. A., & ABDEL-AZIZ, A. F. Evaluation of free radical-scavenging and antioxidant properties of black berry against fluoride toxicity in rats. **Food and Chemical Toxicology,** 48, 1999–2004, 2010.

HERNANDEZ, L., PARRA, D. & AHUMADA, A. Actividad repelente y acaricida del aceite y algunas fracciones cromatográficas del pasto Melinis minutiflora frente al Boophilus microplus. **Revista Colombiana de Ciências Químico Farmacêuticas.** N 17, 1989.

HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R. L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**. 53, 1841. 2005.

IZAR, M. C. O. Tratamento hipolemiante em situações especiais–Pós-transplante e/ou terapia imunossupressora. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 85, n. Suplemento V, 2005.

JEMAI, H., BOUAZIZ, M., FKI, I., EL FEKI, A., & SAYADI, S. Hypolipidimic and antioxidant activities of oleuropein and its hydrolysis derivative-rich extracts from Chemlali olive leaves. **Chemico-biological Interactions**, 176, 2, p. 88-98, 2008.

KAI, N. S., NEE, T. A., LING, E. L. C., PING, T. C., KAMARIAH, L., & LIN, N. K. Anti–hypercholesterolemic effect of kenaf (Hibiscus cannabinus L.) seed on high–fat diet Sprague dawley rats. **Asian Pacific journal of tropical medicine**, 8(1), p. 6-13, 2015.

KAUP, S. R., ARUNKUMAR, N., BERNHARDT, L. K., VASAVI, R. G., SHETTY, S. S., PAI, S. R., & ARUNKUMAR, B. Antihyperlipedemic activity of Cynodon dactylon extract in high-cholesterol diet fed Wistar rats. **Genomic Medicine, Biomarkers, and Health Sciences**, 3 (3), 98-102, 2011.

KARNIKOWSKI, M., CÓRDOVA, C., OLIVEIRA, R., KARNIKOWSKI, M. & NÓBREGA, O. Non-alcoholic fatty liver disease and metabolic syndrome in Brazilian middle-aged and older adults. **Sao Paulo Med. J**., São Paulo, 125, 6, Nov. 2007.

KIERSZENBAUM, A.L.; TRES, L.L. Histologia e Biologia Celular. Uma introdução à Patologia. 3ª Ed., Mosby, Elsevier, Rio de Janeiro, 2012. 514- 520.

KIM, D. et al. Vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of phenolic phytochemicals. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 50, 3713-3717, 2009.

KLASSA, B., GROSSELI, M. M., KIYOMURA, A. K., & ALVES, M. J. Q. F. Avaliação do efeito do alho (Allium sativum L.) sobre o colesterol plasmático em coelhos com hipercolesterolemia induzida. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, 15, 4, p. 557-565, 2013.

KONCZAK, I., & ZHANG, W. Anthocyanins-more than nature´s colours. **Biomed Research International.** 2004(5), 239–240, 2004.

KONG, J. M., CHIA, L. S., GOH, N. K., CHIA, T. F., & BROUILLARD, R. Analysis and biological activities of anthocyanins. **Phytochemistry**, 64(5), 923–933, 2003.

KUSKOSKI EM, ASUERO AG, GARCÍA-PARILLA MC, TRONCOSO AM, FETT R. Actividad antioxidante de pigmentos antociánicos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. 24(4), 691-3, 2004.

KUSKOSKI, E. MARTA, ASUERO, AGUSTÍN G., TRONCOSO, ANA M., MANCINI-FILHO, JORGE, & FETT, ROSEANE. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos.** Campinas, 25, 4, Dec. 2005 .

KRYCER, J.R. & BROWN, A.J. Cholesterol accumulation in prostate cancer: A classic observation from a modern perspective. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer.** 1835(2), 219-229, 2013.

LACERDA, DENISE. **Efeito do extrato das folhas de videira orgânica, da variedade Bordô (Vitis labrusca, L.) sobre parâmetros metabólicos e de estresse oxidativo me ratos diabéticos.** 2014. 103p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas: Fisiologia). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Minas Gerais, 2014.

LAKSHMI, B. V. S., NEELIMA, N., KASTHURI, N., UMARANI, V., & SUDHAKAR, M. Antihyperlipidemic activity of Bauhinia purpurea extracts in hypercholesterolemic albino rats. International Journal Pharmacology Tech Res, 3, 3, p. 1265-1272, 2011.

LEES, D. H.; FRANCIS, F. G. "Standardization of pigment analysis in cramberries". **Hortscience**, 7, 83-84, 1972.

LEWANDOWSKA, U., SZEWCZYK, K., HRABEC, E., JANECKA, A., & GORLACH, S. Overview of metabolism and bioavailability enhancement of polyphenols. **Journal of agricultural and food chemistry**, 61, 50, p. 12183-12199, 2013.

LIMA, L. R. P. D., OLIVEIRA, T. T. D., NAGEM, T. J., & PACHECO, S. Efeito de flavonóides e de corantes do urucum sobre a hiperlipidemia induzida em coelhos. **Revista. Brasileira de análises clínicas.** 42, 1, p. 69-74, 2010.

LUSHCHAK, V.I. Adaptive response to oxidative stress: Bacteria, fungi, plants and animals. **Comparative Biochemistry and Physiology Toxicology Pharmacology** CBP 153, 175-190, 2011.

MALACRIDA, C.R. & MOTTAS, S. Antocianinas em suco de uva: composição e estabilidade. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos.** 24(1), 59-82, 2006.

MARTÍNEZ-FLÓREZ S, GONZÁLEZ-GALLEGO J, CULEBRAS JM, TUÑÓN MJ. Los flavonoides: propriedades y acciones antioxidantes. **Nutrición Hospitalaria.** 17(6):271-8, 2002.

MARTINS, S.; MUSSATTO, S.; MARTINEZ-AVILA, G.; MONTAÑEZ-SAENZ, J.; AGUILAR, C. & TEIXEIRA, J. Bioactive phenolic compounds: production and extraction by solid-state fermentation. A review. **Biotechnology Advances** 29, 365-373, 2011.

MARTINS, C. R.; LEITE, L. L.; HARIDASAN, M. Capim gordura (Melinis minutiflora p. Beauv.), uma gramínea exótica que compromete a recuperação de áreas degradadas em unidades de conservação. **Revista Árvore,** 28, 739-747, 2004.

MIZOI, CRISTINA SATOKO, CASSIANE DEZOTI, & MARIA DE FÁTIMA FERNANDES VATTIMO. Função renal de pacientes de unidade de terapia intensiva: creatinina plasmática e proteína carreadora do retinol urinário. **Revista Brasileira Terapia Intensiva**, 2008, 20, 4, p. 385-393.

MOHAMED, S. Functional foods against metabolic syndrome (obesity, diabetes, hypertension and dyslipidemia) and cardiovasular disease. **Trends in Food Science & Technology**, 2013.

MONTILLA, P., ESPEJO, I., MUÑOZ, M. C., BUJALANCE, I., MUÑOZ-CASTAÑEDA, J. R., & TUNEZ, I. Protective effect of red wine on oxidative stress and antioxidant enzyme activities in the brain and kidney induced by feeding high cholesterol in rats. **Clinical Nutrition**, 25, 146-153, 2006.

MORZYCKI, Jacek W. Recent advances in cholesterol chemistry**. Steroids**, 83, 62-79, 2014.

MOTTA, V. T. Bioquímica Clínica para o Laboratório: princípios e interpretações. 4 ed. Porto Alegre: Editora Médica Missau; São Paulo: Robe Editorial, 419 p. 2003.

MOURE, A., CRUZ, J., FRANCO, D., DOMÍNGUEZ, J., SINEIRO, J., DOMÍNGUEZ, H. et al. Natural antioxidants from residual sources. **Food Chemistry**, 72(2), 145-171, 2001.

MUÑOZ-ESPADA, A.; WATKINS, B. Cyanidin attenuates PGE2 production and cyclooxygenase-2 expression in LNCaP human prostate cancer cells. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, 17(9), 589-596, 2006.

MURO-CASTREJON, F.; CRUZ-VASQUEZ, C.; FERNANDEZ, M. & MOLINA. J. Efecto repelente de extractos de Melinis minutiflora sobre larvas de la garrapata Boophilus microplus. **Veterinaria México**, 35 (2), 2004.

MURRAY, R.; JACOB, M. & VARGHESE, J. Capitulo 50, Proteínas Plasmáticas e Inmunoglobulinas. In: HARPER. **Bioquímica Ilustrada**. 29 ed. Lange Medical Books/McGraw-Hill, 2012, p. 631-633.

NEILSON, A. & Ferruzzi, M. Bioavailability and metabolism of bioactive compounds from foods. In: Coulston, Ann M. and Boushey, Carol J. and Ferruzzi, Mario G. **Nutrition in the prevention and treatment of disease (Third Edition)**. Academic Press. 2013, p. 407 – 423.

NIH. Triglyceride, High Density Lipoprotein, and Coronary Heart Disease. NIH Consens Statement 1992 Feb 26-28;10(2):1-28.

NORATTO, et al. Anticarcinogenic effects of polyphenolics from mango (Mangifera indica) varieties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 58, 4104-4112, 2010.

NUÑEZ, A. Terapia antioxidante, estrés oxidativo y produtos antioxidantes: retos y oportunidades. **Revista Cubana de Salud Pública**. 37, 644-660, 2011.

OHVO-REKILÄ, H., RAMSTEDT, B., LEPPIMÄKI, P. & SLOTTE, J.P. Cholesterol interactions with phospholipids in membranes. **Progress in Lipid Research.** 41, 66-97, 2002.

OLIVEIRA, Isadora. **Antocianinas extraídas de Capim gordura (Melinis minutiflora): atividade antioxidante, microencapsulamento por atomização e estabilidade**. 2011. 130p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, 2011.

OLIVEIRA, T. T. D., GOMES, S. M., NAGEM, T. J., COSTA, N. M. B., & SECOM, P. R. Efeito de diferentes doses de flavonoides em ratos hiperlipidêmicos. **Revista de nutrição**, 15, 1, p. 45-51, 2002.

OLIVEIRA, A.C.; VALENTIN, I.B.; GOULART, M.O.F.; SILVA, C.A.; BECHARA, E.J.F.; TREVISAN, M.T.S. Fontes vegetais naturais de antioxidantes. **Química. Nova**, 32, 3, p. 689-702, 2009.

OU, B., HUANG, D., HAMPSCH-WOODILL, M., FLANAGAN, J. A., & DEEMER, E. K. Analysis of antioxidant activities of common vegetables employing oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays: a comparative study. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 50(11), 3122-3128, 2002.

PADILLA-CAMBEROS, E., FLORES-FERNANDEZ, J., FERNANDEZ-FLORES, O., GUTIERREZ-MERCADO, Y., CARMONA-DE LA LUZ, J., SANDOVAL-SALAS, F., MENDEZ-CARRETO, C., & ALLEN, K. "Hypocholesterolemic Effect and In Vitro Pancreatic Lipase Inhibitory Activity of an Opuntia ficus-indica Extract." **BioMed Research International** 2015, ID837452, 4 pages, 2015. doi: 10.1155/2015/837452.

PARK, Y., PARK, E. M., KIM, E. H., & CHUNG, I. M. Hypocholesterolemic metabolism of dietary red pericarp glutinous rice rich in phenolic compounds in mice fed a high cholesterol diet. **Nutrition research and practice**, 8, 6, P. 632-637, 2014.

PARISH, E.; LI, S. & BELL, A. Chemistry of waxes and Sterols. Food Lipids, chemistry, nutrition and biotechnology. (pp. 409-413). Taylor & Francis Group, LLC. Edited by Casimir C. Akoh and David B. Min.3rd ed. (2002).

PIVELLO, V. R.; CARVALHO, V. M. C.; LOPES, P. F.; PECCININI, A. A.; ROSSO, S. Abundance and distribution of native and alien grasses in a cerrado. (Brazilian savanas) Biological Reserve. **Biotropica,** 31, 71-82, 1999.

PLATE, A. Y., & ARÊAS, J. A. Cholesterol-lowering effect of extruded amaranth (Amaranthus caudatus L.) in hypercholesterolemic rabbits. **Food Chemistry**, 76, 1, p. 1-6, 2002.

PRATES, H. T.; OLIVEIRA, A. B.; LEITE, R. C.; CRAVEIRO, A. A. Atividade carrapaticida e composição química do óleo essencial do capim-gordura. **Revista Agropecuária Brasileira**. 28(5), 621-625, 1993.

PRATES, H. T.; LEITE, R. C.; CRAVEIRO, A. A.; OLIVEIRA, A. B. Identification of some chemical componentes of the esential oil from molasses grass (Melinis minutiflora Beauv.) and their activity against Cattle- tick (Boophilus microplus). **Journal Brazilian Chemistry Society**, 9(2), 193-197, 1998.

PRIOR, R. L., HOANG, H., GU, L., WU, X., BACCHIOCCA, M., HOWARD, L.VV& JACOB, R. Assay for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORACFL)) of plasma and other biological and food samples. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 51(11), 3273-3279, 2003.

PUDDU, P., PUDDU, G.M., CRAVERO, E., ROSATI, M., MUSCARI, A., The molecular sources of reactive oxygen species in hypertension. **Blood Press**.17, 70–77. 2008.

PULIDO, R.; BRAVO, L.; SAURA-CALIXTO, F. Antioxidant Activity of Dietary Polyphenols as Determined by A Modified Ferric Reducing/Antioxidant Power Assay. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 48, 3396-3402, 2000.

RAFIEIAN-KOPAEI, M., ASGARY, S., ADELNIA, A., SETORKI, M., KHAZAEI, M., KAZEMI, S., & SHAMSI, F. The effects of cornelian cherry on atherosclerosis and atherogenic factors in hypercholesterolemic rabbits. **Journal of Medicinal Plants Research**, 5, 13, p. 2670-6, 2011.

RE, R., PELLEGRINI, N., PROTEGGENTE, A., PANNALA, A., YANG, M., & RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology & Medicine**, 26, 231-1237, 1999.

REUTER, S., GUPTA, S.C., CHATURVEDI, M.M. & AGGARWAL, B.B. Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked?. **Free Radical Biology & Medicine.** 49, 1603-1616. 2010.

RIBEIRO, J. N., OLIVEIRA, T. T. D., NAGEM, T. J., FERREIRA JÚNIOR, D. B., & PINTO, A. D. S. Avaliação dos parâmetros sangüíneos de hepatotoxicicidade em coelhos normais submetidos a tratamentos com antocianina e antocianina+ naringenina. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, 38(1): 23-27, 2006.

RIGOTTI, Attilio. Terapia hipolipemiante combinada. **Terapia**, 30, 1, 2005.

ROBERTS, C., & SINDHU, K. Oxidative stress and metabolic syndrome. **Life Sciences**. 84, 705–712. 2009.

ROCHA, D., ABREU, C., SOUSA, R., CORRÊA, A., & FONSECA, E. Avaliação preliminar in vivo do efeito hipocolesterolêmico do polvilho da fruta-de-lobo (Solanum lycocarpumA. St.-Hil.). **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, 14(2), 362-369. 2012.

RODRIGUEZ-PALLARES, J., PARGA, J.A., JOGLAR, B., GUERRA, M.J., LABANDEIRA-GARCIA, J. L. The mitochondrial ATP-sensitive potassium channel blocker 5-hydroxydecanoate inhibits toxicity of 6-hydroxydopamine on dopaminergic neurons**. Neurotoxicity Research**. 15, 82–95. 2009.

RUFINO, M. D. S. M., ALVES, R. E., DE BRITO, E. S., PÉREZ-JIMÉNEZ, J., SAURA-CALIXTO, F., & MANCINI-FILHO, J. Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. **Food chemistry**, 121, 4, 996-1002, 2010.

SALES, R., PELUZIO, M. D. C. G., & COSTA, N. M. B. Lipoproteínas: uma revisão do seu metabolismo e envolvimento com o desenvolvimento de doenças cardiovasculares. **Revista Nutrire. Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição**, 25, 71-86, 2003.

SAMMAN, S., BALASUNDRAM, N. & SUNDRAM, K. Phenolic compounds in plants and agro-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. **Food Chemistry**. 99, 191-203. 2006.

SARAIVA, O. F.; CARVALHO, M. M.; OLIVEIRA, F. T. T. Nutrientes limitantes ao crescimento de capim-gordura em um Latossolo Vermelho-amarelo álico. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira,** 8, 963-968, 1993.

SAX, D. F.; STACHOWICZ, J. J.; BROWN, J. H.; BRUNO, J. F.; DAWSON, M. N.; GAINES, S. D.; GROSBERG, R. K.; HASTING, A.; HOLT, R. H., O´CONNOR, M. I.; RICE, W. R. Ecological and evolutionary insights from species invasions. **Trends in Ecology and Evolution.** 22, 465-471, 2007.

SCHIAVO, M., LUNARDELLI, A., & OLIVEIRA, J. R. Influência da dieta na concentração sérica de triglicerídeos. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial,** 39, 4, p. 283-288, 2003.

SHANMUGANAYAGAM, D.; WARNER, T. F., KRUEGER, C. G., REED, J. D., & FOLTS, J. D. Concord grape juice attenuates platelet aggregation, serum cholesterol and development of atheroma in hypercholesterolemic rabbits. **Atherosclerosis**, 190(1), 135-142, 2007.

SILVA, E. J. R., AGUIAR, F. J. S., GONÇALVES, E. S., SOUSA, I. M. V., DIMECH, G. S., FRAGA, M. C. C. A., ... & WANDERLEY, A. G. Avaliação do tratamento subcrônico com o extrato hidroalcoólico de Calendula officinalis L. sobre os parâmetros bioquímicos e hematológicos em ratas Wistar. **Revista Brasileira Farmacognosia**, 15, 88-93, 2005.

SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. Jr. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**.16, 144–158, 1965.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTÓS, R. S. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. **Methods in Enzymology.** 299, 152-178, 1999.

SORG, O. Oxidative stress: a theoretical model or a biological reality?. **Comptes Rendus Biologies**. 327(7), 649-662. 2004

SOUZA, M. D., SILVA, M., SILVA, M. E., OLIVEIRA, R. P., & PEDROSA, M. L. Diet supplementation with açaí (Euterpe oleracea Mart.) pulp improves biomarkers of oxidative stress and the serum lipid profile in rats. **Nutrition**, 26, 7-8, p. 804-810, 2010.

STRINGHETA, P. C. **Identificação da estrutura e estudo da estabilidade das antocianinas extraídas da inflorescência de capim gordura (Mellinis minutiflora, Pal de Beauv).** 1991.152f. Tese (Doutorado em Ciências de Alimentos). Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1991.

TALAVERA, S., FELGINES, C., TEXIER, O., BESSON, C., GIL-IZQUIERDO, A., LAMAISON, J. L., et al. Anthocyanin metabolism in rats and their distribution to digestive area, kidney, and brain. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 53, 3902–3908, 2005.

TEIXEIRA, Fabiola. **Efeito da ingestão crônica de vinho tinto, vinho branco e suco de uva liofilizados, na aorta e fígado de coelhos adultos hipercolesterolêmicos**. 2011. 136p. Teses (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, 2011.

TEIXEIRA, L. N.; STRINGHETA, P. C.; OLIVEIRA, F. A. Comparação de métodos para quantificação de antocianinas. **Revista Ceres,** 55, 297-304, 2008.

THILAKARATHNA, H., Rupasinghe, H. P., & Needs, P. W. Apple peel bioactive rich extracts effectively inhibit in vitro human LDL cholesterol oxidation. **Food Chemistry**, 138(1), 463-470, 2013.

TSUDA, T.; HORIO, F.; UCHIDA, K.; AOKI, H.; OSAWA, T. Dietary cyanidin 3-O-β-D-glucoside-rich purple corn color prevents obesity and ameliorates hyperglycemia in mice. **The Journal of Nutrition**, 133(7), 2125-2130, 2003.

VAN DER WULP, M. Y., VERKADE, H. J., & GROEN, A. K. Regulation of cholesterol homeostasis. **Molecular and Cellular Endocrinology**, 368(1), 1-16, 2013.

VARGA, M. Capitulo 2, Clinical Pathology. In: **Textbook of Rabbit Medicine**. Second edition. El Sevier, 2014, p. 111-134.

VASCONCELOS, S. M. L.; GOULART, M. O. F.; MOURA, J. B. F.; MANFREDINI, V.; BENFATO, M. S.; KUBOTA, L. T. Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, antioxidantes e marcadores de estresse oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova.** 30, 1323-1338. 2007.

WALLACE, Taylor C. Anthocyanins in cardiovascular disease. **Advances in Nutrition: An International Review Journal**, 2(1), 1-7, 2011.

WATERHOUSE, A. Determination of Total Phenolics. **Current Protocols in Food Analytical Chemistry**. I1.1-I1.8, 2002.

ZULUETA, A.; ESTEVE, M.; & FRÍGOLA, A. ORAC and TEAC assays comparison to measure the antioxidant capacity of food products. **Food Chemistry**, 114(1), 310-316, 2009.

XIA, M., LING, W., ZHU, H., MA, J., WANG, Q., HOU, M. & YE, Q. Anthocyanin attenuates CD40-mediated endothelial cell activation and apoptosis by inhibiting CD40-induced MAPK activation, **Atherosclerosis**, 202(1), 41-47, 2009.

Yi, W., AKOH, C. C., FISCHER, J., & KREWER, G. Absorption of anthocyanins from blueberry extracts by Caco-2 human intestinal cell monolayers. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 54, 5651–5658, 2006.

ZERN, T. L., & FERNANDEZ, M. L. Cardioprotective effects of dietary polyphenols. **The Journal of Nutrition**, 135, 10, p. 2291-2294, 2005.

ZOU, Y., LU, Y., & WEI, D. Hypocholesterolemic effects of a flavonoid-rich extract of Hypericum perforatum L. in rats fed a cholesterol-rich diet. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 53, 7, p. 2462-2466, 2005.

APÊNDICES

APÊNDICE A

Aceite do comitê de ética

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA
Campus Universitário - Viçosa, MG - 36570-000 - Telefone: (31) 3899-3783

Viçosa, 10 de dezembro de 2013

Ilmo. Prof.
Paulo César Stringheta
Coordenador do projeto
DTA/UFV

Sr. Coordenador

Após avaliação da Metodologia utilizada no Projeto de Pesquisa intitulado "Compostos fenólicos, atividade antioxidante e efeito anti-hipercolesterolêmico de extrato de capim gordura (*Melinis minutiflora*) em coelhos", aqui nomeado Processo 102/2013, a CEUA/UFV emite parecer favorável ao protocolo de utilização de animais proposto, baseado nas Normas para o uso de animais no ensino, pesquisa e extensão do DVT, no Código de Ética Profissional do Médico Veterinário, nas Normas da SBCAL (Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório) e a legislação vigente.

Acresce a esse Parecer a exigência de Relatório Final de Atividades conforme itens a seguir:

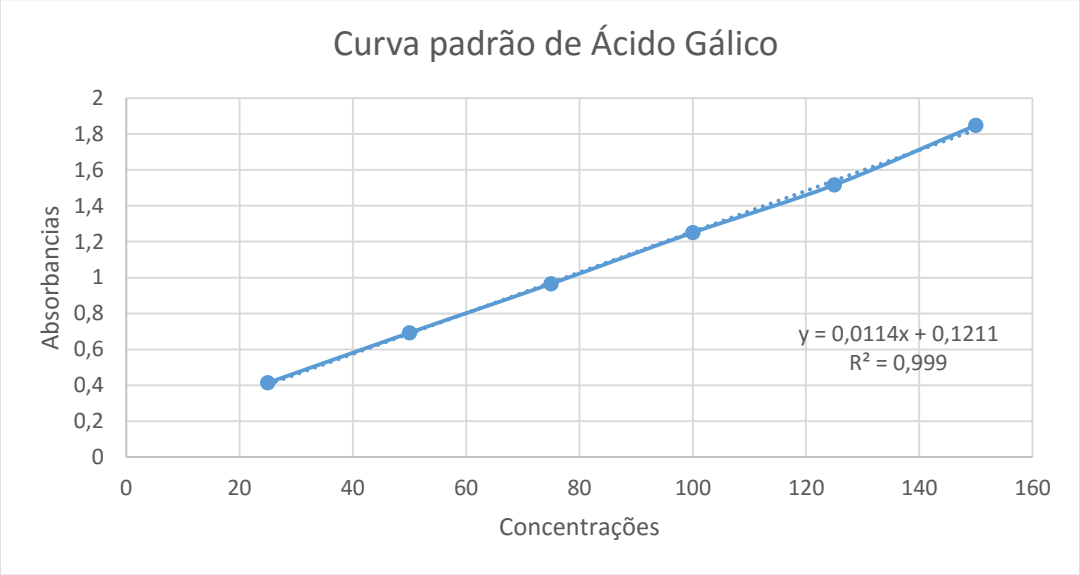
*RESUMO DOS RESULTADOS FINAIS OBTIDOS A PARTIR DOS EXPERIMENTOS ENVOLVENDO A **UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS** NO PROJETO DE PESQUISA*

1. Número do protocolo de submissão do projeto de pesquisa à CEUA/UFV:
2. Metodologia completa obrigatoriamente com:
   - Local (is) Geral e específico oficial (is) onde ocorreu a experimentação;
   - O nome científico do animal em questão;
   - Número Total de Animais Utilizados na Pesquisa.
3. Resultados:
4. Nome do Coordenador do Projeto:
   Assinatura:
5. Nome do Responsável Técnico:
   Assinatura:
   Inscrição em CRMV:

Prof. Cláudio César Fonseca
Coordenador
Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA/ UFV

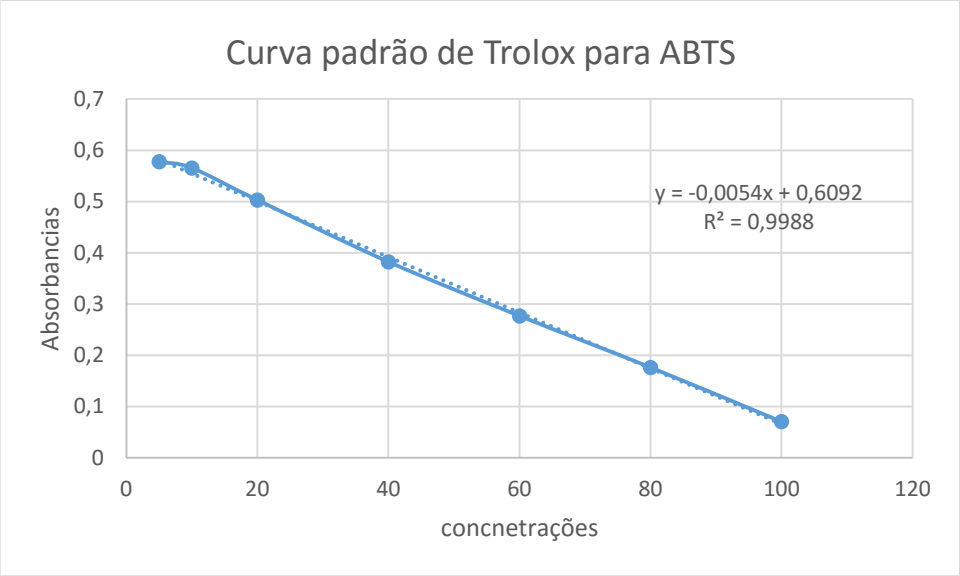
APÊNDICE B

Curva padrão de ácido gálico para determinação de compostos fenólicos



APÊNDICE C

Curva padrão de Trolox para determinação da atividade antioxidante pelo método ABTS



APÊNDICE D

Coleta 2. Teste SNK, Colesterol total

Error: 162,2725 gl: 4

fator	Medias	n	E.E.		
Ração 2mL extrato	29,02	5	5,70	A	
Ração	37,72	5	5,70	A	

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Error: 240593,2249 gl: 8

fator	Medias	n	E.E.		
Ração colesterol 2mL extra..	1288,62	5	219,36	A	
Ração colesterol 1mL extra..	1307,70	5	219,36	A	
Ração colesterol	3214,07	5	219,36		B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Coleta 2. Teste SNK, Colesterol LDL

Error: 24,3065 gl: 4

fator	Medias	n	E.E.		
Ração 2mL extrato	10,70	5	2,20	A	
Ração	11,94	5	2,20	A	

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Error: 220467,9176 gl: 8

fator	Medias	n	E.E.		
Ração colesterol 2mL extra..	1225,36	5	209,98	A	
Ração colesterol 1mL extra..	1251,46	5	209,98	A	
Ração colesterol	3111,53	5	209,98		B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Coleta 2. Teste SNK, Colesterol HDL

Error: 19,3695 gl: 4

fator	Medias	n	E.E.		
Ração 2mL extrato	10,92	5	1,97	A	
Ração	14,67	5	1,97	A	

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Error: 59,6403 gl: 8

fator	Medias	n	E.E.		
Ração colesterol 1mL extra..	21,70	5	3,45	A	
Ração colesterol 2mL extra..	22,00	5	3,45	A	
Ração colesterol	56,64	5	3,45		B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Coleta 2. Teste SNK, Colesterol VLDL

Error: 48,8344 gl: 4

fator	Medias	n	E.E.		
Ração 2mL extrato	7,42	5	3,13	A	
Ração	11,13	5	3,13	A	

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Error: 925,5971 gl: 8

fator	Medias	n	E.E.		
Ração colesterol 1mL extra..	34,54	5	13,61	A	
Ração colesterol 2mL extra..	41,26	5	13,61	A	
Ração colesterol	45,30	5	13,61	A	

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Coleta 2. Teste SNK, Triacilglicerol

Error: 1216,6560 gl: 4

fator	Medias	n	E.E.	
Ração 2mL extrato	37,08	5	15,60	A
Ração	55,56	5	15,60	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Error: 23138,7014 gl: 8

fator	Medias	n	E.E.	
Ração colesterol 1mL extra..	172,68	5	68,03	A
Ração colesterol 2mL extra..	206,28	5	68,03	A
Ração colesterol	226,49	5	68,03	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Coleta 2. Teste SNK, Creatinina

Error: 0,0029 gl: 4

fator	Medias	n	E.E.	
Ração 2mL extrato	0,99	5	0,02	A
Ração	1,02	5	0,02	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Error: 0,1887 gl: 8

fator	Medias	n	E.E.	
Ração colesterol 2mL extra..	0,20	5	0,19	A
Ração colesterol 1mL extra..	0,54	5	0,19	A
Ração colesterol	0,60	5	0,19	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Coleta 2. Teste SNK, Proteínas totais

Error: 20,0860 gl: 4

fator	Medias	n	E.E.	
Ração 2mL extrato	63,68	5	2,00	A
Ração	67,50	5	2,00	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Error: 357,6195 gl: 8

fator	Medias	n	E.E.	
Ração colesterol	84,06	5	8,46	A
Ração colesterol 1mL extra..	89,28	5	8,46	A
Ração colesterol 2mL extra..	93,24	5	8,46	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Coleta 2. Teste SNK, Glicose

Error: 44,2990 gl: 4

fator	Medias	n	E.E.	
Ração 2mL extrato	155,10	5	2,98	A
Ração	162,36	5	2,98	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Error: 269,0894 gl: 8

fator	Medias	n	E.E.	
Ração colesterol	128,19	5	7,34	A
Ração colesterol 2mL extra..	133,50	5	7,34	A
Ração colesterol 1mL extra..	144,52	5	7,34	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Coleta 2. Teste SNK, TGO/ASAT

Error: 295,6000 gl: 4

fator	Medias	n	E.E.	
Ração	54,00	5	7,69	A
Ração 2mL extrato	61,80	5	7,69	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Error: 8161,8000 gl: 8

fator	Medias	n	E.E.	
Ração colesterol 2mL extra..	12,00	5	40,40	A
Ração colesterol	33,60	5	40,40	A
Ração colesterol 1mL extra..	97,20	5	40,40	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Coleta 2. Teste SNK, TGP/ALT

Error: 868,1500 gl: 4

fator	Medias	n	E.E.	
Ração	73,80	5	13,18	A
Ração 2mL extrato	92,20	5	13,18	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Error: 878,4000 gl: 8

fator	Medias	n	E.E.		
Ração colesterol 2mL extra..	45,00	5	13,25	A	
Ração colesterol	57,00	5	13,25	A	
Ração colesterol 1mL extra..	103,80	5	13,25		B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Coleta 2. Teste SNK, Fosfatase alcalina

Error: 367,8500 gl: 4

fator	Medias	n	E.E.	
Ração 2mL extrato	64,80	5	8,58	A
Ração	74,60	5	8,58	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Error: 170,5500 gl: 8

fator	Medias	n	E.E.		
Ração colesterol	46,20	5	5,84	A	
Ração colesterol 1mL extra..	66,00	5	5,84		B
Ração colesterol 2mL extra..	72,60	5	5,84		B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Coleta 2. Teste SNK, Gamma GT

Error: 5,1000 gl: 4

fator	Medias	n	E.E.	
Ração 2mL extrato	10,40	5	1,01	A
Ração	12,60	5	1,01	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Error: 87639,6060 gl: 8

fator	Medias	n	E.E.		
Ração colesterol 1mL extra..	69,00	5	132,39		A
Ração colesterol 2mL extra..	333,60	5	132,39		A
Ração colesterol	588,36	5	132,39		A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Coleta 2. Teste SNK, Albumina

Error: 0,1420 gl: 4

fator	Medias	n	E.E.

Ração 2mL extrato	5,38	5	0,17	A
Ração	5,55	5	0,17	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Error: 0,1752 gl: 8

fator	Medias	n	E.E.	
Ração colesterol 1mL extra..	5,84	5	0,19	A
Ração colesterol	6,05	5	0,19	A
Ração colesterol 2mL extra..	6,20	5	0,19	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

APÊNDICE E

Coleta 3. Teste SNK, Colesterol total

Error: 212,3800 gl: 4

fator	Medias	n	E.E.	
Ração 2mL extrato	34,56	5	6,52	A
Ração	40,06	5	6,52	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Error: 68818,6607 gl: 8

fator	Medias	n	E.E.	
Ração colesterol 2mL extra..	1066,26	5	117,32	A
Ração colesterol 1mL extra..	1232,28	5	117,32	A
Ração colesterol	1417,76	5	117,32	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Coleta 3. Teste SNK, Colesterol LDL

Error: 8,6022 gl: 4

fator	Medias	n	E.E.	
Ração 2mL extrato	2,18	5	1,31	A
Ração	3,51	5	1,31	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Error: 66440,9889 gl: 8

fator	Medias	n	E.E.	
Ração colesterol 2mL extra..	994,55	5	115,27	A
Ração colesterol 1mL extra..	1154,75	5	115,27	A
Ração colesterol	1347,94	5	115,27	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Coleta 3. Teste SNK, Colesterol HDL

Error: 67,6615 gl: 4

fator	Medias	n	E.E.	
Ração 2mL extrato	24,78	5	3,68	A
Ração	25,94	5	3,68	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Error: 56,0065 gl: 8

fator	Medias	n	E.E.	
Ração colesterol	34,59	5	3,35	A
Ração colesterol 1mL extra..	37,58	5	3,35	A
Ração colesterol 2mL extra..	41,73	5	3,35	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Coleta 3. Teste SNK, Colesterol VLDL

Error: 18,0721 gl: 4

fator	Medias	n	E.E.	
Ração 2mL extrato	7,60	5	1,90	A
Ração	10,61	5	1,90	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Error: 771,1401 gl: 8

fator	Medias	n	E.E.	
Ração colesterol 2mL extra..	29,98	5	12,42	A
Ração colesterol	35,15	5	12,42	A
Ração colesterol 1mL extra..	39,95	5	12,42	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Coleta 3. Teste SNK, Triacilglicerol

Error: 451,8015 gl: 4

fator	Medias	n	E.E.	
Ração 2mL extrato	38,00	5	9,51	A
Ração	53,06	5	9,51	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Error: 19100,3370 gl: 8

fator	Medias	n	E.E.	
Ração colesterol 2mL extra..	149,88	5	61,81	A
Ração colesterol	175,74	5	61,81	A
Ração colesterol 1mL extra..	197,76	5	61,81	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Coleta 3. Teste SNK, Creatinina

Error: 0,0284 gl: 4

fator	Medias	n	E.E.	
Ração 2mL extrato	1,23	5	0,08	A
Ração	1,27	5	0,08	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Error: 0,0743 gl: 8

fator	Medias	n	E.E.	
Ração colesterol 1mL extra..	1,28	5	0,12	A
Ração colesterol	1,46	5	0,12	A
Ração colesterol 2mL extra..	1,46	5	0,12	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Coleta 3. Teste SNK, Proteínas totais

Error: 123,0940 gl: 4

fator	Medias	n	E.E.	
Ração	56,56	5	4,96	A
Ração 2mL extrato	72,00	5	4,96	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Error: 58,8075 gl: 8

fator	Medias	n	E.E.	
Ração colesterol 1mL extra..	79,80	5	3,43	A
Ração colesterol 2mL extra..	81,00	5	3,43	A
Ração colesterol	86,70	5	3,43	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Coleta 3. Teste SNK, Glicose

Error: 200,0215 gl: 4

fator	Medias	n	E.E.	
Ração	156,14	5	6,32	A
Ração 2mL extrato	164,68	5	6,32	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Error: 241,3215 gl: 8

fator	Medias	n	E.E.	
Ração colesterol	157,14	5	6,95	A
Ração colesterol 2mL extra..	157,74	5	6,95	A
Ração colesterol 1mL extra..	158,82	5	6,95	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Coleta 3. Teste SNK, TGO/ASAT

Error: 1442,8500 gl: 4

fator	Medias	n	E.E.	
Ração 2mL extrato	49,40	5	16,99	A
Ração	59,60	5	16,99	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Error: 429,4500 gl: 8

fator	Medias	n	E.E.	
Ração colesterol 1mL extra..	37,80	5	9,27	A
Ração colesterol 2mL extra..	54,60	5	9,27	A
Ração colesterol	57,00	5	9,27	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Coleta 3. Teste SNK, TGP/ALT

Error: 731,7500 gl: 4

fator	Medias	n	E.E.	
Ração	82,80	5	12,10	A
Ração 2mL extrato	95,80	5	12,10	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Error: 325,6500 gl: 8

fator	Medias	n	E.E.	
Ração colesterol	63,60	5	8,07	A
Ração colesterol 2mL extra..	63,60	5	8,07	A
Ração colesterol 1mL extra..	65,40	5	8,07	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Coleta 3. Teste SNK, Fosfatase alcalina

Error: 141,7500 gl: 4

fator	Medias	n	E.E.	
Ração	43,40	5	5,32	A
Ração 2mL extrato	47,40	5	5,32	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Error: 526,8000 gl: 8

fator	Medias	n	E.E.	
Ração colesterol	37,20	5	10,26	A
Ração colesterol 2mL extra..	70,80	5	10,26	A
Ração colesterol 1mL extra..	72,60	5	10,26	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Coleta 3. Teste SNK, Gamma GT

Error: 4,3500 gl: 4

fator	Medias	n	E.E.	
Ração	8,80	5	0,93	A
Ração 2mL extrato	10,60	5	0,93	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Error: 20056,7667 gl: 8

fator	Medias	n	E.E.		
Ração colesterol 1mL extra..	148,20	5	63,34	A	
Ração colesterol	264,60	5	63,34	A	B
Ração colesterol 2mL extra..	427,60	5	63,34		B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Coleta 3. Teste SNK, Albumina

Error: 0,1107 gl: 4

fator	Medias	n	E.E.	
Ração	5,25	5	0,15	A
Ração 2mL extrato	5,65	5	0,15	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Error: 0,1719 gl: 8

fator	Medias	n	E.E.	
Ração colesterol 1mL extra..	5,80	5	0,19	A
Ração colesterol 2mL extra..	5,95	5	0,19	A
Ração colesterol	6,08	5	0,19	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

APÊNDICE F

Morfometria do fígado pelo Teste SNK. Volume núcleo

Alfa 0.05
Error de grados de libertad 35
Error de cuadrado medio 103546.1

SNK Agrupamiento	Media	N	trat
A	1580.5	8	1
A			
A	1570.0	8	2
A			
A	1344.3	8	5
A			
A	1332.3	8	3
A			
A	1121.6	8	4

Morfometria do fígado pelo Teste SNK. Volume citoplasma

Alfa 0.05
Error de grados de libertad 35
Error de cuadrado medio 99848824

SNK Agrupamiento	Media	N	trat
A	36513	8	2
B	23897	8	5
B			
B	21753	8	1
B			
B	19774	8	3
B			
B	18791	8	4

Morfometria do fígado pelo Teste SNK. Volume hepatócito

Alfa 0.05
Error de grados de libertad 35
Error de cuadrado medio 1.0286E8

SNK Agrupamiento	Media	N	trat
A	38083	8	2
B	25241	8	5
B			
B	23333	8	1
B			
B	21107	8	3
B			
B	19913	8	4