

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Avaliação farmacológica de *Capsicum baccatum* var. *pendulum* L. em um protocolo experimental padronizado de síndrome metabólica *in vivo*

BIANCA FRANCO LEONARDI

PORTO ALEGRE, 2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Avaliação farmacológica de *Capsicum baccatum* var. *pendulum* L. em um protocolo experimental padronizado de síndrome metabólica *in vivo*

Dissertação apresentada por **Bianca Franco Leonardi** para obtenção do GRAU DE MESTRE em Ciências Farmacêuticas

Orientadora: Profa. Dra. Aline Rigon Zimmer

PORTO ALEGRE, 2017

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Mestrado Acadêmico da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 28 de março de 2017, pela Banca Examinadora constituída por:

Prof. Dra. Aline Marcadenti de Oliveira

Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA)

Prof. Dra. Caroline Guerini de Souza

Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

Profa. Dra. Cláudia Marlise Balbinotti Andrade

Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT)

Profa. Dra. Grace Gosmann

Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

Leonardi, Bianca Franco

Avaliação farmacológica de *Capsicum baccatum* var. *pendulum* L. em um protocolo experimental padronizado de síndrome metabólica in vivo / Bianca Franco

Leonardi. -- 2017.

137 f.

Orientadora: Aline Rigon Zimmer.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, BR-RS, 2017.

1. *Capsicum baccatum*. 2. Pimenta dedo-de-moça. 3. Síndrome metabólica. 4. Camundongo C57BL/6. I. Zimmer, Aline Rigon, orient. II. Título.

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Fitoquímica e Síntese Orgânica (Lab 105) da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, na cidade de Porto Alegre, com financiamento da FAPERGS, CAPES e CNPq. A autora recebeu bolsa de estudos da CAPES.

AGRADECIMENTOS

À professora Aline Zimmer, por me apresentar ao mundo da pesquisa, pela excelente orientação, amizade, apoio, confiança e incentivo na realização deste trabalho e principalmente pelo exemplo profissional e entusiasmo.

Às professoras Grace Gosmann e Simone Gnoatto, por dividirem o laboratório conosco e por sempre estarem à disposição para nos ajudar e apoiar nos obstáculos que encontramos durante essa caminhada.

Aos colegas do Lab 105, pela amizade, ajuda e momentos descontraídos ao longo desses 7anos, especialmente ao Rafa e a Débora companheiros da pimenta.

À Tainara, por toda ajuda e dedicação na realização dos experimentos e amizade.

Ao Igor, meu companheiro de mestrado, pela amizade, desabafos e risadas.

Ao laboratório 28 do departamento de bioquímica da UFRGS, especialmente ao Eduardo Zimmer e Leo Meira pelo apoio nos experimentos e discussões.

Ao LAPPS, pelas amizades e disponibilização do espaço para realização de diversos experimentos.

À Médica Veterinária Fabíola e à bioterista Luíza, pela ajuda, ética e cuidado com os animais.

À minha família, que tanto amo, pela educação, por sempre apoiarem minhas decisões e entenderem minha ausência na busca pela minha realização profissional e pessoal.

Aos meus amigos por estarem sempre presentes, inclusive nos momentos difíceis.

À UFRGS e ao Programa de pós-graduação em ciências farmacêuticas pela oportunidade.

Às agências de fomento CNPq, FAPERGS e em especial à CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

Enfim, à todos que contribuíram para a realização deste trabalho, o meu imenso agradecimento!

RESUMO

O gênero *Capsicum* compreende mais de 200 espécies de pimentas e pimentões e diversas atividades farmacológicas são descritas na literatura. Estudos prévios do nosso grupo de pesquisa têm explorado diferentes atividades biológicas de *Capsicum baccatum* var. *Pendulum* (Solanaceae), como antioxidante, anti-inflamatória, hipoglicemiante e antidislipidêmica. A prevalência da síndrome metabólica, caracterizada por fatores como obesidade, resistência à insulina, dislipidemia e hipertensão, tem atingido proporções epidêmicas e acomete cerca de 20% da população mundial. Muitas vezes, apenas a mudança no estilo de vida não é eficaz para impedir a progressão da doença, sendo necessário aderir ao tratamento farmacológico. No entanto, não existem fármacos específicos para o tratamento da síndrome, levando à utilização de polifarmácia, que gera dificuldades de adesão ao tratamento e risco de interações medicamentosas. O principal objetivo desse estudo foi avaliar o efeito do extrato butanólico (BUT) e da fração ativa (AF) dos frutos de *C. baccatum* em um modelo de síndrome metabólica induzido por dieta em camundongos C57BL/6. Inicialmente apresentamos uma revisão de estudos publicados, que utilizam diferentes tipos de dietas hipercalóricas para induzir a síndrome metabólica em roedores. Ao compararmos esses estudos, observamos a forte tendência à utilização de camundongos da linhagem C57BL/6 machos e jovens, respondendo de forma satisfatória à indução da síndrome metabólica. Após, apresentamos o efeito do BUT e AF, nas doses de 200 e 50 mg/kg, respectivamente, sobre os parâmetros glicídicos e lipídicos em modelo de síndrome metabólica em camundongos C57BL/6 submetidos a uma dieta hiperpalatável (HPD) durante 120 dias. Nesse estudo foi visto que o tratamento com *C. baccatum* via oral, preveniu o ganho de peso, o desenvolvimento de um perfil de intolerância à glicose, o acúmulo de gordura na região abdominal e a elevação nos níveis de insulina e leptina plasmáticas quando comparados ao grupo HPD. Além disso, também preveniu o acúmulo de colesterol e triglicerídeos no fígado e preservou a morfologia do tecido hepático. Assim, *C. baccatum* se mostrou promissor, prevenindo alterações dos diversos componentes importantes da síndrome metabólica.

Palavras-chave: *Capsicum baccatum*, pimenta, síndrome metabólica, camundongos C57BL/6.

ABSTRACT

The genus *Capsicum* comprises more than 200 species of peppers and a range of pharmacological activities are described in the literature. Previous studies of our research group have explored several activities for *Capsicum baccatum* var. *pendulum* (Solanaceae) species, as antioxidant, anti-inflammatory, hypoglycemic and antidyslipidemic, since the studies with this species are scarce. The prevalence of metabolic syndrome, characterized by the association of factors such as obesity, insulin resistance, dyslipidemia and hypertension, is reaching epidemic proportions worldwide, affecting approximately 20% of world's population. Often, only lifestyle change is not effective in preventing the progression of the disease, being necessary adherence to pharmacological treatment. However, there are no specific drugs for the treatment of the syndrome, leading to the use of polypharmacy, which generates an increase in public spending, difficulties of adherence to treatment, and enhanced risk to drug interactions. The main objective of this study was to evaluate the effect of butanolic extract (BUT) and the active fraction (AF) of *C. baccatum* on a model of diet-induced metabolic syndrome in C57BL/6 mice. We first present a review of published studies, which use different types of hypercaloric diets to induce metabolic syndrome in rodents. When comparing these studies, we observed a strong trend towards the use of male and young C57BL/6 mice, responding satisfactorily to the metabolic syndrome induction through hypercaloric diets. After, we present the effect of BUT and AF, on glucose and lipid parameters in a model of metabolic syndrome in C57BL/6 mice submitted to a hyperpalatable diet (HPD) for 120 days. In this study, it was seen that oral *C. baccatum* treatment prevented weight gain, development of a glucose intolerance profile, accumulation of fat in the abdominal area and the increase in plasma insulin and leptin levels when compared to group HPD. Also, it prevented the accumulation of cholesterol and triglycerides in the liver, and preserved the liver tissue morphology. Thus, these results showed the effects of *C. baccatum*, especially AF, preventing changes in several important components of the metabolic syndrome

Key-words: *Capsicum baccatum*, pepper, metabolic syndrome, C57BL/6 mice.

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1. Exemplar de <i>C. baccatum</i> var. <i>pendulum</i> | 21 |
| Figura 2. Características da flor de <i>C. baccatum</i> | 21 |
| Figura 3. Esquema representando o mecanismo pelo qual a gordura visceral e a resistência à insulina podem contribuir para a doença cardiovascular..... | 25 |

SUMÁRIO

| | | |
|------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 1 | INTRODUÇÃO | 21 |
| I. | <i>Capsicum</i> spp | 19 |
| II. | <i>Capsicum baccatum</i> | 20 |
| III. | DISTÚRBIOS METABÓLICOS | 23 |
| IV. | <i>Capsicum</i> spp. x DISTÚRBIOS METABÓLICOS | 25 |
| 2 | OBJETIVOS..... | 24 |
| I. | OBJETIVO GERAL..... | 31 |
| II. | OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 31 |
| 3 | CAPÍTULO I: Experimental protocols for inducing metabolic syndrome in rodents by hypercaloric diets as a potential drug discovery platform..... | 36 |
| 4 | CAPÍTULO II: Influence of active fraction of <i>Capsicum baccatum</i> var. <i>pendulum</i> L. on metabolism in animal model of metabolic syndrome | 97 |
| 5 | DISCUSSÃO GERAL | 123 |
| 6 | CONCLUSÕES | 126 |
| 7 | REFERÊNCIAS..... | 134 |
| | ANEXOS..... | 137 |
| I. | Carta de aprovação do CEUA..... | 137 |

Produtos naturais, especialmente à base de plantas, são utilizados pela humanidade há milhares de anos e adquirem importância cada vez maior na terapêutica mundial (1).

O gênero *Capsicum*, pertencente à família Solanaceae, é composto por diversas espécies de pimentas e pimentões, sendo algumas delas largamente cultivadas e utilizadas na indústria alimentícia e na medicina alopática ou tradicional. Dentre elas, pode-se citar a espécie *Capsicum baccatum* var. *pendulum*, cultivada no Brasil, sendo a variedade mais consumida nas regiões Sul e Sudeste do país. Devido à sua ampla utilização, as pimentas do gênero *Capsicum* posicionam-se como culturas de elevada importância socioeconômica para a agricultura brasileira, sendo o Rio Grande do Sul um dos principais estados produtores (2, 3). Na literatura são descritas diversas atividades para plantas pertencentes ao gênero *Capsicum*, tais como analgésica, antioxidante, anti-inflamatória e hipocolesterolêmica, porém para a espécie *C. baccatum*, são escassos os estudos que exploram o seu potencial terapêutico (4-7).

A prevalência do sobrepeso e obesidade na população mundial aumentou dramaticamente nas últimas décadas, sendo um dos principais desafios na saúde pública. Segundo a OMS, em 2014, mais de 1,9 bilhões de adultos, com 18 anos ou mais, estavam acima do peso, e destes mais de 600 milhões eram obesos. Juntamente com essa condição, geralmente estão associados diversos outros distúrbios metabólicos como hiperglicemia, dislipidemia, hipertensão arterial e resistência a insulina, os quais, em associação, são critérios diagnósticos para a síndrome metabólica, fortemente correlacionada com o aumento do risco para diabetes tipo 2, doenças cardiovasculares e mortalidade precoce (8).

I. *Capsicum* spp.

Dentre as espécies mais conhecidas do gênero *Capsicum* estão: *Capsicum annuum*, *Capsicum baccatum*, *Capsicum chinense*, *Capsicum frutescens* e *Capsicum pubescens*. Essas plantas são nativas da América, principalmente América Central e América do Sul, mas atualmente são cultivadas em diversos países pelo mundo (9, 10).

No Brasil, são produzidas em praticamente todas as regiões, sendo o Rio Grande do Sul, um dos cinco estados de maior produção, atrás de Minas Gerais, São Paulo, Goiás e Ceará. O cultivo de pimentas e pimentões representa um importante agronegócio para o país, envolvendo diferentes segmentos, desde as pequenas agroindústrias artesanais até a exportação de páprica por empresas multinacionais que competem no mercado de especiarias e temperos (11).

As espécies de *Capsicum* são conhecidas popularmente como: tili, pimenta-quente, páprica, pimenta-malagueta e pimenta-vermelha, e apresentam uma grande variabilidade morfológica destacando-se as múltiplas formas, tamanhos, colorações e graus de pungência (3).

Como componentes majoritários deste gênero, encontram-se os capsaicinóides, que possuem várias das atividades farmacológicas atribuídas à droga vegetal. Entre eles está a capsaicina, principal responsável pela pungência característica desses frutos. Além dos capsaicinóides, estão presentes também os carotenóides, como a capsantina e o caroteno, que dão a coloração vermelha aos frutos, vitaminas A e C, óleos essenciais, entre outros (12).

Na literatura, estão presentes diversos estudos com os frutos do gênero *Capsicum*, onde são descritas diversas atividades biológicas e farmacológicas, destacando-se a ação antioxidante, analgésica e anti-inflamatória (4-6, 13).

II. ***Capsicum baccatum***

Diversos tipos de pimentas da espécie *C. baccatum* são cultivadas no Brasil, dentre elas, as mais conhecidas são a 'Dedo-de-Moça', 'Chifre-de-Veadado' e 'Cambuci' ou 'Chapéu de Frade', que diferem entre si principalmente pela morfologia (3).

As pimentas popularmente conhecidas como Dedo-de-Moça, pertencentes à espécie *Capsicum baccatum* var. *pendulum* (Willd.) Eshbaug, são amplamente consumidas no país, de diversas formas, como em molhos, conservas, desidratadas ou frescas. Seus frutos são alongados e pendentes, intensamente vermelhos quando maduros, com baixa pungência, e medem entre 6,8 e 8 cm de comprimento e 1 a 1,5 cm de largura (Figura 1). Suas flores possuem corola branca com um par

de manchas amareladas ou esverdeadas na base de cada lobo das pétalas e estão distribuídas de uma a duas por nó (Figura 2). (3).



Figura 1. Exemplar de *C. baccatum* var. *pendulum*. Arbusto repleto de frutos (esquerda) e Fruto maduro (direita). Fonte: Autor (2015)



Figura 2. Características da flor de *C. baccatum*. Fonte: Autor (2015)

Quanto à composição química da espécie, são descritos na literatura a presença de substâncias fenólicas, capsaicinóides, carotenóides e compostos voláteis.

Em estudo realizado por Kappel e colaboradores (2008), foram investigados o teor de compostos fenólicos, o potencial antioxidante e a atividade antimicrobiana de extratos hidroetanólicos obtidos de diferentes partes do fruto de *Capsicum baccatum* var. *pendulum*. Foi demonstrada atividade antioxidante para todos os extratos testados, que pôde ser correlacionada com a quantidade de compostos fenólicos

presentes. A atividade antimicrobiana dos extratos foi considerada fraca contra bactérias gram-positivas e gram-negativas (14).

Com relação aos capsaicinóides, diferentes autores demonstraram a presença de capsaicina, dihidrocapsaicina e nordihidrocapsaicina nos frutos de *C. baccatum* (15-17). Kollmannsberger *et al.* (2011) também demonstraram a presença de diversos compostos voláteis como ésteres saturados, ésteres acil-insaturados, ésteres de alcoóis secundários e monoterpenos. Além desses compostos, *C. baccatum* também possui carotenóides, responsáveis pela coloração dos frutos, sendo a capsantina o mais abundante (18).

Entre os escassos estudos encontrados na literatura que descrevem as propriedades biológicas de *C. baccatum* var. *pendulum*, podemos encontrar relatos de atividades como antioxidante, anti-inflamatória, antidislipidêmica e hipoglicemiantes. Spiller *et al.* (2006) avaliaram o efeito do suco extraído dos frutos de *C. baccatum* var. *pendulum*, na dose de 2,0 g/kg, o qual demonstrou potencial anti-inflamatório, reduzindo significativamente a migração de leucócitos e volume de exsudato em modelo de inflamação aguda de pleurisia e peritonite induzidos por carragenina. A ação anti-inflamatória nesse estudo foi atribuída à presença de capsaicina (5).

Estudos prévios realizados em nosso grupo de pesquisa com a espécie *Capsicum baccatum* var. *pendulum*, mostraram diferentes atividades biológicas. Zimmer *et al.* (2012) testou diferentes extratos dos frutos e das sementes obtidos com solventes de diferentes polaridades, os quais demonstraram potencial antioxidante *in vitro* e anti-inflamatório *in vivo* em modelo de pleurisia (200mg/kg, v.o.) (6). Posteriormente, foram selecionados dois dos extratos (etanólico e butanólico) que apresentaram as melhores atividades para avaliação da toxicidade após administração oral na dose de 200 mg/kg, durante 60 dias. Os resultados obtidos não demonstraram nenhum nível de toxicidade para os animais nos parâmetros avaliados (19). Zimmer (2011), também testou o potencial hipoglicemiante e antidislipidêmico do extrato butanólico de *C. baccatum*, na dose de 200mg/kg via oral, em ratos Wistar tratados com uma dieta hiperpalatável durante 130 dias. O extrato apresentou resultados positivos, prevenindo tanto o aumento nos níveis de colesterol total e LDL-c como também a intolerância à glicose, em condições de dieta desfavorável. Também, não houve alterações significativas nos

parâmetros bioquímicos, hematológicos e comportamentais, sugerindo segurança após seu uso prolongado (20).

Mais recentemente, Molon (2016) fracionou o extrato butanólico de *C. baccatum* em três porções, de acordo com a polaridade, e avaliou a atividade anti-inflamatória dessas frações na dose de 100 mg/kg, via oral, no modelo de pleurisia induzida por carragenina em camundongos. Todas as frações apresentaram diminuição significativa na migração de leucócitos para a cavidade pleural. Concomitantemente, foi realizado o isolamento e a elucidação dos compostos presentes no extrato, com destaque especial para o capsianosídeo XV, presente na fração mais polar do extrato (21).

Por fim, Allemand e colaboradores (2016), avaliaram os efeitos anti-inflamatórios *in vivo* de três extratos enriquecidos obtidos por fracionamento bioguiado de *C. baccatum* e sua influência sobre mediadores inflamatórios produzidos por macrófagos *in vitro*. Todos os extratos apresentaram atividade, porém o extrato butanólico e o aquoso se mostraram mais eficazes. Além disso, diferentemente do relatado por Spiller (2006), esses efeitos parecem ser independentes da presença de capsaicina (22).

III. DISTÚRBIOS METABÓLICOS

A prevalência da obesidade na população cresce drasticamente com o passar dos anos e associados a ela surgem diversos outros distúrbios metabólicos como hiperglicemia, dislipidemia, resistência à insulina e hipertensão arterial, que aumentam o risco para o desenvolvimento de diabetes e doenças cardiovasculares. Quando associados estes fatores, o paciente é diagnosticado com a chamada síndrome metabólica, que segundo o *International Diabetes Federation* define-se como obesidade central (circunferência abdominal elevada) acompanhada de pelo menos dois dos seguintes critérios: triglicerídeos séricos maior ou igual a 150 mg/dL; nível de HDL-c (lipoproteína de alta densidade) no soro inferior a 40 mg/dL em homens e 50 mg/dL em mulheres; pressão arterial maior ou igual a 130/85 mmHg; e glicemia de jejum maior ou igual a 100 mg/dL (23).

Dentre essas condições, sabe-se que a obesidade central e a resistência à insulina, são os principais fatores relacionados com o desenvolvimento da síndrome

metabólica. A obesidade, principalmente a adiposidade central, devido a todas as condições que surgem em sua consequência, está associada independentemente com o aumento do risco cardiovascular. O tecido adiposo, considerado um órgão endócrino ativo, secreta adipocinas como leptina e adiponectina, citocinas pró-inflamatórias e fatores hipofibrinolíticos, que contribuem para o aumento do estresse oxidativo e da disfunção endotelial, promovendo aterosclerose (24). A resistência à insulina é caracterizada pela diminuição da sensibilidade à insulina pelo organismo, que faz com que a glicose não seja captada pelas células, permanecendo na circulação sanguínea, o que gera um aumento da secreção desse hormônio na tentativa de remover o excesso de glicose do sangue. Com o tempo, esse mecanismo faz com que as células beta-pancreáticas percam sua função, não produzindo mais insulina suficiente, tornando o indivíduo hiperglicêmico, sendo diagnosticado com diabetes tipo 2 (25). Na figura 3, está representado o mecanismo pelo qual esses dois fatores podem contribuir para a doença cardiovascular, onde a gordura visceral, através da liberação de adipocinas, contribui por si só para a disfunção endotelial e a resistência à insulina, induzida por diversos mediadores, pode resultar em aumento no estresse oxidativo e disfunção endotelial. O acúmulo de gordura, a resistência à insulina e o processo inflamatório e a dislipidemia induzidos pelo fígado podem levar ao processo aterosclerótico que ao progredir leva ao aumento do risco cardiovascular (24).

O diabetes tipo 2 é a forma presente em 90-95% dos casos de diabetes e sua natureza crônica, gravidade das complicações e meios necessários para controlá-la, a torna uma doença muito onerosa não apenas para os indivíduos afetados e suas famílias, mas também para o sistema de saúde. Pacientes portadores desta doença apresentam diversos fatores de risco para doenças aterotrombóticas, entre eles destaca-se a dislipidemia, que é caracterizada por hipertrigliceridemia e colesterol da lipoproteína de alta densidade (HDL-c) baixo. Assim, ressalta-se a importante correlação dessas condições na contribuição potencial do aumento do risco cardiovascular (26).

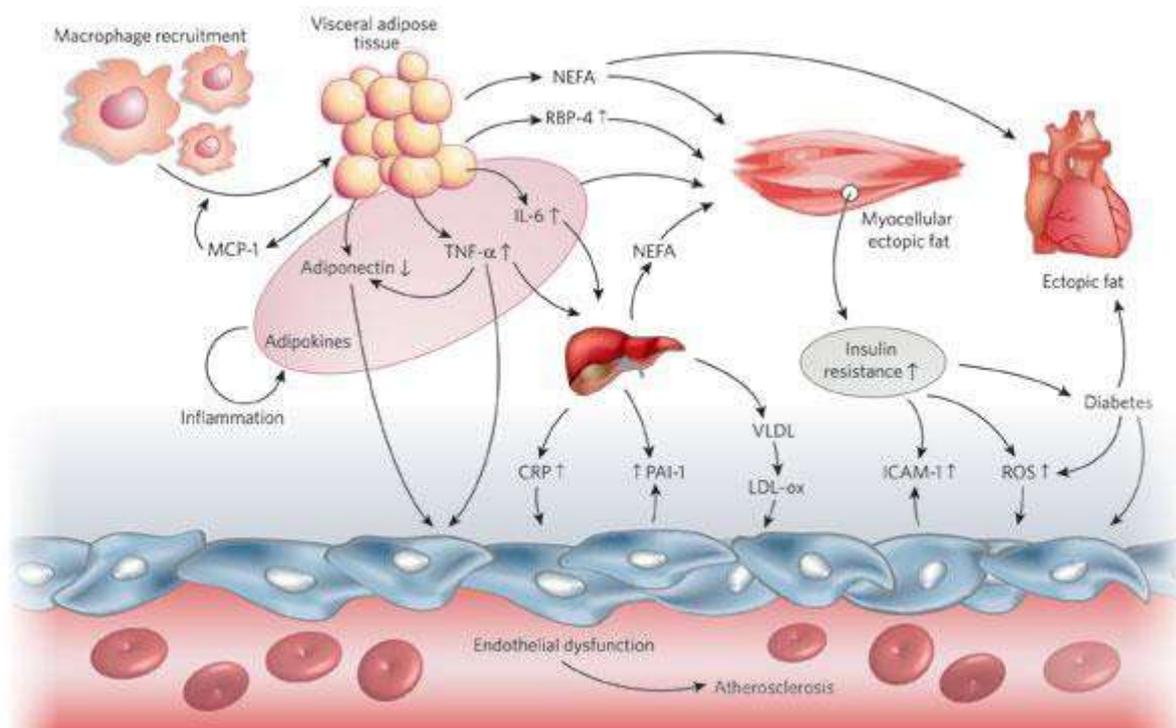


Figura 3. Esquema representando o mecanismo pelo qual a gordura visceral e a resistência à insulina podem contribuir para a doença cardiovascular. MCP-1 (proteína quimiotática de monócitos 1); RBP-4 (proteína transportadora de retinol 4); CRP (proteína C reativa); PAI-1 (inibidor do ativador do plasminogênio 1); ICAM-1 (molécula de adesão intercelular 1) Fonte: Modificado de Van Gaal et al., 2006.

Muitas vezes, apenas a mudança no estilo de vida, com hábitos alimentares saudáveis e aderindo a prática de exercício físico, não é suficiente para diminuir o risco cardiovascular do paciente, sendo necessário associar o tratamento farmacológico. No entanto, inexistem agentes farmacológicos específicos que regulem o metabolismo como um todo, sendo realizado o tratamento de cada componente individual da síndrome metabólica, na tentativa de reduzir o impacto no risco cardiovascular e o desenvolvimento do diabetes (27-29).

Sendo assim, a descoberta de uma nova classe agente farmacológica que associe as atividades que estão envolvidas em distúrbios metabólicos é de grande importância no tratamento e prevenção desses distúrbios e consequentemente na diminuição do risco cardiovascular dos pacientes.

IV. *Capsicum* spp. x DISTÚRBIOS METABÓLICOS

Na literatura encontram-se diversos estudos que relacionam os componentes presentes em diferentes espécies pertencentes ao gênero *Capsicum* com o seu papel na prevenção e/ou tratamento de distúrbios metabólicos como obesidade, diabetes tipo 2 e dislipidemia. Um exemplo, é a capsaicina, principal componente responsável pela pungência atribuída às pimentas e pimentões. Seu papel terapêutico é amplamente descrito, demonstrando diferentes atividades como analgésica, antipruriginosa, neuroprotetora, anti-apoptótica, anticâncer, antioxidante, anti-inflamatória, antiobesidade, hipoglicemiante, além de efeitos gastrointestinais e cardiovasculares (30-33).

Whiting e colaboradores (2012) publicaram um artigo de revisão, cujo objetivo foi investigar o potencial benefício dos capsaicinóides na manutenção do peso corporal, relatando que esses compostos podem atuar no aumento do gasto energético, aumento da oxidação lipídica e redução do apetite (34). Em outro estudo, Huang e colaboradores (2014) investigaram os efeitos de capsaicinóides e capsinóides, bioisómeros dos capsaicinóides, sobre os lipídios plasmáticos, o relaxamento da aorta, desenvolvimento da placa aterosclerótica e excreção fecal de esteróis em hamsters alimentados com uma dieta rica em colesterol. Os resultados mostraram que somente os capsaicinóides foram capazes de modular favoravelmente o perfil das lipoproteínas do plasma, além de possuírem atividade vascular benéfica (35).

A espécie *Capsicum annuum* é uma das mais conhecidas e difundidas mundialmente e inúmeros ensaios farmacológicos com esta espécie vegetal são encontrados na literatura. Entre eles, destaca-se o estudo realizado com ratos alimentados com dieta hiperlipídica adicionada de pequena quantidade do pó obtido a partir de *C. annuum*, o qual demonstrou efeito hipocolesterolêmico e hipotrigliceridêmico (36, 37). Aizawa e colaboradores (2009) investigaram os efeitos da capsantina, principal carotenoide encontrado em *C. annuum*, no metabolismo lipídico em ratos, observando um aumento no HDL-c sem alterar o colesterol total e os triglicerídeos (38). Em outro estudo com essa mesma espécie foi avaliado o potencial do suco de pimenta verde em reduzir o ganho de peso e seus efeitos sobre o perfil lipídico em camundongos C57BL/6 alimentados com uma dieta hiperlipídica. Como resultados foi relatado a redução do ganho de peso e regulação dos níveis de lipídeos no soro (39). Mais recentemente foi publicado um estudo que testou uma

fração rica em capsicosideo G, uma saponina obtida das sementes de *C. annuum*, nas doses de 10 e 100 mg/kg em camundongos C57BL/6 alimentados com uma dieta hiperlipídica (*high fat diet*, HFD) durante 7 semanas, onde foi observado que a suplementação com fração rica em capsicosideo G atenuou o ganho de peso corporal, deposição de gordura e concentração de TG no fígado, sem apresentar hepatotoxicidade e nefrotoxicidade (40).

I. OBJETIVO GERAL

Definir modelo *in vivo* mais adequado para indução da síndrome metabólica em roedores e avaliar, através desse modelo, a influência do tratamento com *Capsicum baccatum* var. *pendulum* L. sobre o metabolismo dos animais.

II. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar uma ampla revisão da literatura científica atual para definir o modelo *in vivo* mais adequado para indução da síndrome metabólica em roedores;
- Preparar e caracterizar as soluções extrativas obtidas a partir do fruto da espécie *Capsicum baccatum*;
- Avaliar o efeito sobre o metabolismo lipídico e glicídico do extrato butanólico e da fração ativa de *Capsicum baccatum* em modelo de síndrome metabólica induzida por dieta hipercalórica em camundongos C57BL/6;
- Mensurar parâmetros bioquímicos plasmáticos e o nível dos hormônios insulina e leptina;
- Avaliar o perfil lipídico e histológico do tecido hepático dos animais;
- Identificar o(s) componente(s) responsável(is) pela atividade farmacológica encontrada.

3 CAPÍTULO I: Experimental protocols for inducing metabolic syndrome in rodents by hypercaloric diets as a potential drug discovery platform

Manuscrito a ser submetido no periódico Journal of Functional Foods

O texto completo do capítulo I, que na dissertação defendida ocupa o intervalo de páginas compreendido entre as páginas 35-90, foi suprimido por tratar-se de manuscrito em preparação para publicação em periódico científico. Consta de uma revisão de estudos publicados que utilizaram diferentes tipos de dietas hipercalóricas para induzir a síndrome metabólica em roedores. Os artigos que cumpriram os critérios de inclusão foram analisados e comparados quanto às condições experimentais utilizadas e as alterações geradas no metabolismo dos animais, a fim de definir um modelo eficaz para o desenvolvimento da síndrome metabólica em roedores, que se assemelhe fisiologicamente à maneira como ocorre em humanos.

4 CAPÍTULO II: Influence of active fraction of *Capsicum baccatum* var. *pendulum* L. on metabolism in animal model of metabolic syndrome

Manuscrito a ser submetido no periódico Molecular Nutrition & Food Research

O texto completo do capítulo II, que na dissertação defendida ocupa o intervalo de páginas compreendido entre as páginas 93-116, foi suprimido por tratar-se de manuscrito em preparação para publicação em periódico científico. Consta de um estudo que avaliou o efeito da administração oral do extrato e da fração ativa de *Capsicum baccatum*, conhecida popularmente como pimenta dedo-de-moça, em um modelo de síndrome metabólica induzido por dieta hiperpalatável durante 120 dias em camundongos da linhagem C57BL/6, onde foram mensurados diferentes parâmetros que estão envolvidos no desenvolvimento da síndrome metabólica.

No presente estudo, primeiramente foi realizado uma busca na literatura científica, a fim de comparar os diferentes modelos animais de síndrome metabólica induzida por consumo de dietas hipercalóricas, visto que é uma epidemia crescente afetando cerca de 20% dos adultos do mundo ocidental. A síndrome metabólica é composta por um conjunto de fatores de risco inter-relacionados e coincidentes que incluem obesidade abdominal, intolerância à glicose, hipertrigliceridemia, diminuição do HDL-colesterol (lipoproteína de alta densidade) e/ou hipertensão, que aumentam substancialmente o risco de desenvolver diabetes mellitus tipo 2 e doença cardiovascular aterosclerótica (41). Visto que inexitem fármacos específicos para tratar a síndrome metabólica, torna-se de grande importância e urgência a pesquisa por novos agentes terapêuticos.

Um dos modelos que vem sendo amplamente utilizado é a indução da síndrome metabólica através de dietas com um alto aporte calórico em roedores, já que se assemelha à maneira como essa síndrome se desenvolve em humanos. Porém, é difícil encontrar um protocolo experimental padrão, sendo utilizadas diferentes espécies de animais, tipos de dietas e tempos de tratamento. Assim, optou-se primeiramente por fazer uma revisão nas bases de dados disponíveis a fim de comparar as diferentes variáveis e seus impactos no metabolismo glicídico e lipídico dos animais, visando a otimização da metodologia. Cruzando-se as palavras-chave de interesse, foram encontrados o total de 1426 publicações na base de dados *Web of Science* e 660 no *PubMed* entre 2013 e 2016, sendo selecionados 188 por preencherem os critérios de inclusão, das quais foram extraídas as informações necessárias para as análises.

Do total de publicações, 60% utilizaram camundongos, sendo a grande maioria da espécie C57BL/6. Algumas das justificativas por essa preferência, é que essa espécie possui uma susceptibilidade maior para desenvolver obesidade e resistência à insulina (camundongos *inbred* / isogênicos), além de possuírem outras vantagens como a facilidade na aquisição. Collins e colaboradores relataram a vulnerabilidade genética para a obesidade induzida por dieta nos camundongos C57BL/6J, afirmando que estes são um bom modelo para indução de síndrome

metabólica semelhante à humana, pois desenvolvem obesidade, hiperinsulinemia, hiperglicemia e hipertensão (42).

Considerando o grande volume de publicações que utilizam o modelo de síndrome metabólica induzida por dieta, e sendo 50% delas correspondentes a linhagem C57BL/6, optou-se por comparar os dados somente desta espécie a fim de verificar quais parâmetros são mais vantajosos quando se deseja estudar este tipo de desordem. Cabe ressaltar, que além de serem susceptíveis ao desenvolvimento da obesidade, esses animais são de pequeno porte, necessitando de menos espaço físico e menor quantidade de produto a ser testado, o que torna-se vantajoso para experimentos de longa duração que utilizam compostos de origem natural.

Comparando-se os estudos, foi possível observar que apenas 8% deles são realizados com fêmeas. A preferência por machos se deve por esses serem padrão em testes pré-clínicos farmacológicos, além de estarem mais disponíveis para aquisição, e terem menor variabilidade hormonal que as fêmeas. Além disso, estudos comparativos mostraram que machos parecerem ser mais susceptíveis a desregulação do metabolismo que as fêmeas (43-47). Já em relação à idade dos animais no início do estudo, foi identificada uma grande variabilidade, que ia de 3 até 72 semanas de vida, porém a maioria utiliza animais jovens, com até 2 meses de idade.

Maior do que a variabilidade na idade de início do tratamento, foi a variabilidade encontrada no tempo de exposição à dieta, onde 31 diferentes tempos, variando entre 1 e 64 semanas foram encontrados, o que dificulta a comparação entre os resultados obtidos nos estudos. No entanto, observou-se que 67% das publicações utiliza entre 8 e 16 semanas de exposição à dieta para indução dos distúrbios metabólicos. Ao serem feitas as correlações entre os diferentes tempos de exposição à dieta e alguns parâmetros metabólicos, verificou-se que existe correlação positiva apenas entre o tempo de exposição e o ganho de peso, indicando que quanto maior o tempo de exposição à dieta rica em lipídeos maior o ganho de peso dos animais, até um limite de 32 semanas. Após esse período os animais parecem não apresentar mais ganho de peso significativo. Os demais parâmetros, glicemia, insulinemia, HOMA-IR, triglicérides e HDL-c não apresentaram correlação significativa com o tempo de tratamento. Além disso, foi

possível verificar que um tempo mínimo de 8 semanas parece ser necessário para que o metabolismo dos animais comece a alterar, sendo que tempos mais longos tendem a alterar de forma mais significativa o metabolismo, porém acima de 48 semanas já não apresentam mais vantagens (48-56).

Assim, diante desses resultados, pode-se afirmar que a mudança no padrão dietético dos animais, através da utilização de dietas hipercalóricas, com sobrecarga de carboidratos e/ou lipídeos, tem sido um dos modelos mais efetivos para induzir o desenvolvimento da síndrome metabólica, já que trata-se de uma condição multifatorial. Quando utilizam-se substâncias químicas ou animais geneticamente modificados para induzir essa condição, esses modelos devem ser utilizados com cuidado, pois não são capazes de induzir a totalidade das condições associadas à síndrome (57, 58). Vários tipos de dietas estão disponíveis comercialmente, e alguns estudos usam uma mistura de ingredientes purificados em diferentes proporções, porém 88 % deles utilizam uma dieta rica em gordura (HFD). Dietas ricas em gordura e dietas ricas em carboidratos e gorduras são mais vantajosas que dietas ricas somente em carboidratos. Embora a maioria use HFD, há grande variabilidade na quantidade e tipo de lipídio adicionado à dieta. Vários autores relatam que as gorduras animais ou vegetais, saturadas, parecem ser mais eficazes, exceto o óleo de peixe, que não induz obesidade (59-61). Devido a estas variações na composição das dietas, que podem gerar resultados com grande variabilidade, seria importante padronizar um tipo de dieta, preferencialmente aqueles comercialmente disponíveis, com tipo e teor de gordura definidos, para assim gerar resultados comparáveis e mais confiáveis.

Outro parâmetro que foi observado foi HOMA-IR (modelo de avaliação de homeostase) que é calculado com base nas dosagens de insulina e glicemia de jejum, e é usado para estimar o grau de resistência à insulina. Muitos dos estudos analisados mostraram aumentos significativos nos valores de HOMA-IR com o uso de dietas hipercalórica, quando comparados ao grupo controle, indicando um desenvolvimento de resistência à insulina (62).

Por fim, um importante hormônio que está relacionado com a regulação do metabolismo é a leptina, secretada pelos adipócitos e responsável pelo controle da ingestão alimentar e vários outros mecanismos biológicos. Diversos estudos

analisados mediram os níveis desse hormônio na corrente sanguínea, o qual apresentou um aumento acentuado nos animais que receberam dietas hipercalóricas. Isto indica uma possível resistência à leptina desenvolvida juntamente com a obesidade, provando que há um desequilíbrio no metabolismo dos animais (63).

Baseando-se nos parâmetros analisados na revisão apresentada no capítulo I, um modelo de síndrome metabólica em camundongos C57BL/6 machos, de 4 semanas de vida, recebendo uma dieta hiperpalatável (HPD) por 120 dias foi utilizado a fim de verificar os efeitos do extrato butanólico (BUT, 200 mg/kg, v.o.) e da fração ativa (AF, 50 mg/kg, v.o.) de *C. baccatum* no metabolismo desses animais.

Estudos anteriores do nosso grupo de pesquisa mostraram que BUT tem atividade anti-inflamatória, antidislipidêmica e hipoglicemiante (20). A fim de identificar o(s) composto(s) responsável (is) pelas atividades encontradas, o mesmo foi submetido a um processo de purificação dando origem a fração ativa AF, que concentrou um composto inédito, isolado e identificado recentemente pelo grupo (21).

A dieta HPD, alterou parâmetros importantes como peso corporal, glicemia, insulinemia, leptinemia, adiposidade central e deposição de lipídeos hepáticos dos camundongos após 120 dias. Ainda, a administração de *C. baccatum* atenuou estas alterações, apresentando um perfil metabólico semelhante ao grupo controle que recebeu dieta normal (SD).

Segundo a literatura, obesidade central e resistência à insulina são os critérios diagnósticos mais importantes para a síndrome metabólica (25). No presente estudo, observou-se que o grupo HPD desenvolveu uma tolerância reduzida à glicose e hiperinsulinemia, que foram prevenidas através do tratamento com *C. baccatum*, especialmente no grupo que recebeu a fração ativa (HPD+AF). Além disso, *C. baccatum* também diminuiu a adiposidade abdominal dos animais, sendo a diminuição mais significativa novamente no grupo HPD+AF.

A leptina, hormônio produzido predominantemente pelo tecido adiposo e liberado na corrente sanguínea proporcionalmente ao volume corporal da massa gorda, age através de receptores centrais, especialmente no hipotálamo, e tecidos

periféricos como pâncreas, fígado, tecido adiposo e sistema imunológico. Na obesidade, níveis aumentados desse hormônio são encontrados na corrente sanguínea e sua capacidade de diminuir a ingestão de alimentos e o peso corporal é prejudicada, caracterizando um estado de resistência à leptina (64). Neste estudo, a o estado de supernutrição dos animais gerado pela HPD aumentou os níveis de leptina circulante, e os tratamentos com BUT e AF evitaram esse aumento.

Em relação aos lipídios plasmáticos, neste estudo HPD elevou os níveis de CT dos animais e os tratamentos atenuaram esse aumento, não apresentando diferença do SD. No entanto, os níveis de TG e HDL-c não diferiram significativamente entre os grupos. Já na avaliação dos lipídios hepáticos, HPD aumentou significativamente o acúmulo de CT e TG, o que também foi verificado na análise histológica, onde foram observadas gotículas lipídicas e ruptura celular. Atualmente, a doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA), é considerada como componente hepático da síndrome metabólica, uma vez que sua incidência aumenta com o aumento de obesidade na população (65). A administração de *C. baccatum* diminuiu significativamente o acúmulo de CT e TG no fígado, principalmente a AF, que exibiu resultado superior a BUT, e na análise histologia hepática não apresentou gotículas de gordura visíveis. Na verificação de lipídeos fecais, nenhuma diferença foi observada entre os grupos.

Por fim, em um estudo prévio do grupo, Zimmer *et al.* demonstraram que *C. baccatum* não afetou aspectos específicos da fisiologia de camundongos CF-1 após 60 dias de tratamento oral, numa dose de 200 mg/kg, demonstrando um certo nível de segurança (19). Assim, o conjunto de resultados demonstrados pelo grupo de pesquisa até o momento nos impulsiona no sentido de investigar os mecanismos moleculares envolvidos na prevenção do desenvolvimento de distúrbios metabólicos crônicos pela fração ativa AF de *C. baccatum*.

Através da extração dos frutos de *Capsicum baccatum* var. *pendulum* foi obtido o extrato butanólico, que passou por um processo de purificação resultando na fração ativa. Esses produtos foram utilizados no presente estudo em modelo *in vivo*.

O modelo de síndrome metabólica em camundongos C57BL/6 induzido por dieta hiperpalatável, proposto com base nos resultados obtidos da revisão da literatura, mostrou-se efetivo, apresentando diversas alterações no metabolismo dos animais.

A administração de *C. baccatum* preveniu essas alterações metabólicas, reduzindo o ganho de peso, adiposidade visceral, níveis de insulina e leptina plasmáticos e prevenindo o desenvolvimento de intolerância a glicose nos animais. Além disso, mostrou redução no acúmulo de lipídeos no fígado e preservou a morfologia do tecido.

A fração ativa, obtida através da purificação do extrato butanólico de *C. baccatum*, mostrou um melhor desempenho na prevenção da síndrome metabólica nos animais, sendo pelo menos quatro vezes mais potente do que o extrato original, o que indica que o(s) composto(s) responsável(is) pela atividade farmacológica encontrada está presente nessa fração. O capsianosídeo XV é um dos principais componentes dessa fração (Molon, 2016), sendo esse um potencial candidato à ensaios futuros, visando a contribuição no desenvolvimento de medicamentos para prevenção e tratamento de doenças metabólicas crônicas.

1. Cragg GM, Newman DJ. Natural products: A continuing source of novel drug leads. *Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects*. 2013;1830(6):3670-95.
2. Votava PWBEJ. *Peppers: Vegetable and Spice Capsicums* Peppers: Vegetable and Spice Capsicums. 2nd edition ed2012. 248 p.
3. EMBRAPA EBdPA-. *Capsicum: pimentas e pimentões no Brasil* Capsicum: pimentas e pimentões no Brasil 2007 [Available from: <http://www.cnph.embrapa.br/capsicum/intro.htm>].
4. Costa LMd, Moura NFd, Marangoni C, Mendes CE, Teixeira AdO. Atividade antioxidante de pimentas do gênero *Capsicum*. *Food Science and Technology (Campinas)*. 2010;30:51-9.
5. Spiller F, Alves MK, Vieira SM, Carvalho TA, Leite CE, Lunardelli A, et al. Anti-inflammatory effects of red pepper (*Capsicum baccatum*) on carrageenan- and antigen-induced inflammation. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2008;60(4):473-8.
6. Zimmer AR, Leonardi B, Miron D, Schapoval E, de Oliveira JR, Gosmann G. Antioxidant and anti-inflammatory properties of *Capsicum baccatum*: From traditional use to scientific approach. *Journal of Ethnopharmacology*. 2012;139(1):228-33.
7. Zhang L, Fang G, Zheng L, Chen Z, Liu X. Hypocholesterolemic Effect of Capsaicinoids in Rats Fed Diets with or without Cholesterol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2013;61(18):4287-93.
8. WHO WHO-. Obesity and Overweight 2016 [Available from: www.who.int/entity/mediacentre/factsheets/fs311/en/].
9. Bosland PW. Capsicums: Innovative Uses of an Ancient Crop. *ASHS* ASHS 1996:479-87.
10. Menichini F, Tundis R, Bonesi M, Loizzo MR, Conforti F, Statti G, et al. The influence of fruit ripening on the phytochemical content and biological activity of *Capsicum chinense* Jacq. cv Habanero. *Food Chemistry*. 2009;114(2):553-60.
11. EMBRAPA EBdPA-. Pimenta: diversidade e usos 2015 [Available from: <https://www.embrapa.br/web/portal/busca-de-noticias/-/noticia/2675520/pimenta-diversidade-e-usos>].
12. Gonzalez-Zamora A, Sierra-Campos E, Guadalupe Luna-Ortega J, Perez-Morales R, Rodriguez Ortiz JC, Garcia-Hernandez JL. Characterization of Different Capsicum Varieties by Evaluation of Their Capsaicinoids Content by High Performance Liquid Chromatography, Determination of Pungency and Effect of High Temperature. *Molecules*. 2013;18(11):13471-86.
13. Chen L, Kang Y-H. Anti-inflammatory and antioxidant activities of red pepper (*Capsicum annum* L.) stalk extracts: Comparison of pericarp and placenta extracts. *Journal of Functional Foods*. 2013;5(4):1724-31.
14. Kappel VD, Costa GM, Scola G, Silva FA, Landell MF, Valente P, et al. Phenolic content and antioxidant and antimicrobial properties of fruits of *Capsicum baccatum* L. var. *pendulum* at different maturity stages. *Journal of Medicinal Food*. 2008;11(2):267-74.
15. Kollmannsberger H, Rodriguez-Burruezo A, Nitz S, Nuez F. Volatile and capsaicinoid composition of aji (*Capsicum baccatum*) and rocoto (*Capsicum pubescens*), two Andean species of chile peppers. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2011;91(9):1598-611.
16. Wahyuni Y, Ballester AR, Sudarmonowati E, Bino RJ, Bovy AG. Metabolite biodiversity in pepper (*Capsicum*) fruits of thirty-two diverse accessions: Variation in health-related compounds and implications for breeding. *Phytochemistry*. 2011;72(11-12):1358-70.
17. Sora GTS, Haminiuk CWI, da Silva MV, Zielinski AAF, Goncalves GA, Bracht A, et al. A comparative study of the capsaicinoid and phenolic contents and in vitro antioxidant activities of the peppers of the genus *Capsicum*: an application of chemometrics. *Journal of Food Science and Technology-Mysore*. 2015;52(12):8086-94.
18. Rodriguez-Burruezo A, Gonzalez-Mas MD, Nuez F. Carotenoid Composition and Vitamin A Value in Aji (*Capsicum baccatum* L.) and Rocoto (*C. pubescens* R. & P.), 2 Pepper Species from the Andean Region. *Journal of Food Science*. 2010;75(8):S446-S53.

19. Zimmer AR, Leonardi B, Zimmer ER, Kalinine E, de Souza DO, Portela LV, et al. Long-Term Oral Administration of Capsicum baccatum Extracts Does Not Alter Behavioral, Hematological, and Metabolic Parameters in CF1 Mice. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. 2012.
20. Zimmer AR. Avaliação química e farmacológica de capsicum baccatum var. pendulum (solanaceae): Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS; 2011.
21. Molon DF. Isolamento e elucidação estrutural de compostos com potencial anti-inflamatório na pimenta dedo-de-moça (*Capsicum baccatum* var. *pendulum*): Ufrgs; 2016.
22. Allemand A, Leonardi BF, Zimmer AR, Moreno S, Romao PRT, Gosmann G. Red Pepper (*Capsicum baccatum*) Extracts Present Anti- Inflammatory Effects In Vivo and Inhibit the Production of TNF-alpha and NO In Vitro. Journal of Medicinal Food. 2016;19(8):759-67.
23. IDF IDF-. The IDF consensus worldwide definition of the Metabolic Syndrome 2006 [Available from: http://www.idf.org/webdata/docs/IDF_Meta_def_final.pdf].
24. Van Gaal LF, Mertens IL, De Block CE. Mechanisms linking obesity with cardiovascular disease. Nature. 2006;444(7121):875-80.
25. IDF IDF-. IDF WORLDWIDE DEFINITION OF THE METABOLIC SYNDROME 2005 [Available from: <http://www.idf.org/metabolic-syndrome>].
26. -SBD SBdD. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes 2015 [Available from: <http://www.diabetes.org.br/images/2015/area-restrita/diretrizes-sbd-2015.pdf>].
27. Grundy SM. Obesity, metabolic syndrome, and cardiovascular disease. Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. 2004;89(6):2595-600.
28. Grundy SM, Cleeman JI, Daniels SR, Donato KA, Eckel RH, Franklin BA, et al. Diagnosis and management of the metabolic syndrome - An American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute Scientific Statement. Current Opinion in Cardiology. 2006;21(1):1-6.
29. Grundy SM. Controversy in clinical endocrinology - Metabolic syndrome: A multiplex cardiovascular risk factor. Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. 2007;92(2):399-404.
30. Gannon NP, Lambalot EL, Vaughan RA. The effects of capsaicin and capsaicinoid analogs on metabolic molecular targets in highly energetic tissues and cell types. Biofactors. 2016;42(3):229-46.
31. Basith S, Cui M, Hong S, Choi S. Harnessing the Therapeutic Potential of Capsaicin and Its Analogues in Pain and Other Diseases. Molecules. 2016;21(8).
32. Yuan LJ, Qin Y, Wang L, Zeng Y, Chang H, Wang J, et al. Capsaicin-containing chili improved postprandial hyperglycemia, hyperinsulinemia, and fasting lipid disorders in women with gestational diabetes mellitus and lowered the incidence of large-for-gestational-age newborns. Clinical Nutrition. 2016;35(2):388-93.
33. Sharma SK, Vij AS, Sharma M. Mechanisms and clinical uses of capsaicin. European Journal of Pharmacology. 2013;720(1-3):55-62.
34. Whiting S, Derbyshire E, Tiwari BK. Capsaicinoids and capsinoids. A potential role for weight management? A systematic review of the evidence. Appetite. 2012;59(2):341-8.
35. Huang W, Cheang WS, Wang X, Lei L, Liu Y, Ma KY, et al. Capsaicinoids but Not Their Analogue Capsinoids Lower Plasma Cholesterol and Possess Beneficial Vascular Activity. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2014;62(33):8415-20.
36. Kuda T, Iwai A, Yano T. Effect of red pepper *Capsicum annum* var. *conoides* and garlic *Allium sativum* on plasma lipid levels and cecal microflora in mice fed beef tallow. Food and Chemical Toxicology. 2004;42(10):1695-700.
37. Srinivasan K. Spices as influencers of body metabolism: an overview of three decades of research. Food Res Int. 2005;38(1):77-86.
38. Aizawa K, Inakuma T. Dietary capsanthin, the main carotenoid in paprika (*Capsicum annum*), alters plasma high-density lipoprotein-cholesterol levels and hepatic gene expression in rats. British Journal of Nutrition. 2009;102(12):1760-6.

39. Kim N-H, Park SH. Evaluation of green pepper (*Capsicum annuum* L.) juice on the weight gain and changes in lipid profile in C57BL/6 mice fed a high-fat diet. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2015;95(1):79-87.
40. Sung J, Jeong HS, Lee J. Effect of the Capsicoside G-rich Fraction from Pepper (*Capsicum annuum* L.) Seeds on High-fat Diet-induced Obesity in Mice. *Phytotherapy Research*. 2016;30(11):1848-55.
41. Tune JD, Goodwill AG, Sassoon DJ, Mather KJ. Cardiovascular consequences of metabolic syndrome. *Transl Res*. 2017.
42. Collins S, Martin TL, Surwit RS, Robidoux J. Genetic vulnerability to diet-induced obesity in the C57BL/6J mouse: physiological and molecular characteristics. *Physiology & Behavior*. 2004;81(2):243-8.
43. Samuel P, Khan MA, Nag S, Patki G, Lau Y-S, Inagami T, et al. Angiotensin At2 Receptor Contributes Towards Gender Bias in Weight Gain. *Hypertension*. 2011;58(5):E42-E.
44. Marin V, Rosso N, Dal Ben M, Raseni A, Boschelle M, Degraffi C, et al. An Animal Model for the Juvenile Non-Alcoholic Fatty Liver Disease and Non-Alcoholic Steatohepatitis. *Plos One*. 2016;11(7).
45. Asha GV, Reddy M, Mahesh M, Vajreswari A, Jeyakumar SM. Male mice are susceptible to high fat diet-induced hyperglycaemia and display increased circulatory retinol binding protein 4 (RBP4) levels and its expression in visceral adipose depots. *Archives of Physiology and Biochemistry*. 2016;122(1):19-26.
46. Pettersson US, Walden TB, Carlsson PO, Jansson L, Phillipson M. Female Mice are Protected against High-Fat Diet Induced Metabolic Syndrome and Increase the Regulatory T Cell Population in Adipose Tissue. *Plos One*. 2012;7(9).
47. Louwe MC, van der Hoorn JWA, van den Berg SAA, Jukema JW, Romijn JA, van Dijk KW, et al. Gender-dependent effects of high-fat lard diet on cardiac function in C57Bl/6J mice. *Applied Physiology Nutrition and Metabolism-Physiologie Appliquee Nutrition Et Metabolisme*. 2012;37(2):214-24.
48. Gu M, Fan S, Liu G, Guo L, Ding X, Lu Y, et al. Extract of Wax Gourd Peel Prevents High-Fat Diet-Induced Hyperlipidemia in C57BL/6 Mice via the Inhibition of the PPAR gamma Pathway. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2013.
49. Fan S, Zhang Y, Sun Q, Yu L, Li M, Zheng B, et al. Extract of okra lowers blood glucose and serum lipids in high-fat diet-induced obese C57BL/6 mice. *Journal of Nutritional Biochemistry*. 2014;25(7):702-9.
50. Tan S, Li M, Ding X, Fan S, Guo L, Gu M, et al. Effects of *Fortunella margarita* Fruit Extract on Metabolic Disorders in High-Fat Diet-Induced Obese C57BL/6 Mice. *Plos One*. 2014;9(4).
51. Eskens BJ, Leurgans TM, Vink H, Vanteeffelen JW. Early impairment of skeletal muscle endothelial glycocalyx barrier properties in diet-induced obesity in mice. *Physiol Rep*. 2014;2(1):e00194.
52. Yang Z-H, Miyahara H, Takeo J, Katayama M. Diet high in fat and sucrose induces rapid onset of obesity-related metabolic syndrome partly through rapid response of genes involved in lipogenesis, insulin signalling and inflammation in mice. *Diabetology & Metabolic Syndrome*. 2012;4.
53. Aoqui C, Chmielewski S, Scherer E, Eissler R, Sollinger D, Heid I, et al. Microvascular dysfunction in the course of metabolic syndrome induced by high-fat diet. *Cardiovascular Diabetology*. 2014;13.
54. Kopec AK, Joshi N, Towery KL, Kassel KM, Sullivan BP, Flick MJ, et al. Thrombin Inhibition with Dabigatran Protects against High-Fat Diet-Induced Fatty Liver Disease in Mice. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2014;351(2):288-97.
55. Song HZ, Chu Q, Xu DD, Xu Y, Zheng XD. Purified Betacyanins from *Hylocereus undatus* Peel Ameliorate Obesity and Insulin Resistance in High-Fat-Diet-Fed Mice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2016;64(1):236-44.

56. Tessitore A, Cicciarelli G, Del Vecchio F, Gaggiano A, Verzella D, Fischietti M, et al. MicroRNA expression analysis in high fat diet-induced NAFLD-NASH-HCC progression: study on C57BL/6J mice. *Bmc Cancer*. 2016;16.
57. Panchal SK, Brown L. Rodent Models for Metabolic Syndrome Research. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 2011.
58. Cesaretti MLR, Junior OK. Modelos experimentais de resistência à insulina e obesidade: lições aprendidas. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*. 2006.
59. Buettner R, Schoelmerich J, Bollheimer LC. High-fat diets: Modeling the metabolic disorders of human obesity in rodents. *Obesity*. 2007;15(4):798-808.
60. Murakami Y, Tanabe S, Suzuki T. High-fat Diet-induced Intestinal Hyperpermeability is Associated with Increased Bile Acids in the Large Intestine of Mice. *Journal of Food Science*. 2016;81(1):H216-H22.
61. Lonzetti Bargut TC, Frantz EDC, Mandarim-de-Lacerda CA, Aguila MB. Effects of a Diet Rich in n-3 Polyunsaturated Fatty Acids on Hepatic Lipogenesis and Beta-Oxidation in Mice. *Lipids*. 2014;49(5):431-44.
62. Ghiringhello MT, Vieira JGH, Tachibana TT, Ferrer C, Maciel RMB, Amioka PHC, et al. Distribution of HOMA-IR in Brazilian subjects with different body mass indexes. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*. 2006;50(3):573-4.
63. Kaur J. A comprehensive review on metabolic syndrome. *Cardiol Res Pract*. 2014;2014:943162.
64. Cui H, López M, Rahmouni K. The cellular and molecular bases of leptin and ghrelin resistance in obesity. *Nat Rev Endocrinol*. 2017.
65. Bellentani S. The epidemiology of non-alcoholic fatty liver disease. *Liver Int*. 2017;37 Suppl 1:81-4.

I. Carta de aprovação do CEUA



UFRGS
UNIVERSIDADE FEDERAL
DO RIO GRANDE DO SUL

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA
Comissão De Ética Na Utilização De Animais



CARTA DE APROVAÇÃO

Comissão De Ética Na Utilização De Animais analisou o projeto:

Número: 19446

Título: AVALIAÇÃO FITOQUÍMICA E FARMACOLÓGICA DE *Capsicum baccatum* var. *pendulum* L.
(Solanaceae)

Pesquisadores:

Equipe UFRGS:

GRACE GOSMANN - coordenador desde 01/03/2008
ALINE RIGON ZIMMER - Aluno de Doutorado desde 01/03/2008
BIANCA FRANCO LEONARDI - Aluno de Graduação de 01/05/2010 até 31/10/2010
LUIZ VALMOR CRUZ PORTELA - Colaborador desde 01/06/2010
Eduardo Rigon Zimmer - Aluno de Mestrado desde 01/06/2010

Equipe Externa:

Jarbas Rodrigues de Oliveira - Colaborador desde 01/03/2008

Comissão De Ética Na Utilização De Animais aprovou o mesmo em seus aspectos éticos e metodológicos de acordo com as Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08 de novembro de 2008 que disciplina a criação e utilização de animais em atividades de ensino e pesquisa.

Porto Alegre, Sexta-Feira, 17 de Dezembro de 2010

Flávio Antonio Pacheco de Araujo
FLAVIO ANTONIO PACHECO DE ARAUJO
Coordenador da comissão de ética