



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE FARMÁCIA, ODONTOLOGIA E ENFERMAGEM
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

MARIANA BRITO DANTAS CASTELO BRANCO

**POTENCIAL TERAPÊUTICO DO ÁCIDO CAFEICO NO TRATAMENTO DA
OBESIDADE E EM CULTIVO CELULAR DE PRÉ-ADIPÓCITOS 3T3-L1**

FORTALEZA

2019

MARIANA BRITO DANTAS CASTELO BRANCO

**POTENCIAL TERAPÊUTICO DO ÁCIDO CAFEICO NO TRATAMENTO DA
OBESIDADE E EM CULTIVO CELULAR DE PRÉ-ADIPÓCITOS 3T3-L1**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: Biologia para a Saúde

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Goretti Rodrigues de Queiroz

**FORTALEZA
2019**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- D214p Dantas Castelo Branco, Mariana Brito.
Potencial terapêutico do ácido cafeico no tratamento da obesidade e em cultivo celular de pré-adipócitos 3T3-L1 / Mariana Brito Dantas Castelo Branco. – 2019.
84 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, , Fortaleza, 2019.
Orientação: Profa. Dra. Maria Goretti Rodrigues de Queiroz.
1. Ácido cafeico. 2. Obesidade. 3. Adipócitos. I. Título.

CDD

MARIANA BRITO DANTAS CASTELO BRANCO

POTENCIAL TERAPÊUTICO DO ÁCIDO CAFEICO NO TRATAMENTO DA
OBESIDADE E EM CULTIVO CELULAR DE PRÉ-ADIPÓCITOS 3T3-L1

Tese submetida ao Programa de Pós-
Graduação em Ciências Farmacêuticas
como requisito parcial para a obtenção do
título de Doutor em Ciências
Farmacêuticas.

Área de concentração: biologia para saúde

Aprovada em: ___/___/___

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a Maria Goretti Rodriguez de Queiroz (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof^a. Dr^a Alice Maria Costa Martins
Universidade Federal do Ceará(UFC)

Prof^a. Dr^a Jamile Magalhães Ferreira
Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira (Unilab)

Prof^a. Dr Ramon Roseo Paula Pessoa Bezerra de Menezes
Universidade Federal do Ceará(UFC)

Prof. Dr. Tiago Sousa de Melo
Centro Universitário Inta - UNINTA

Dedico à Deus e aos meus pais essa
realização.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, acima de tudo, a Deus por saber que Ele me guia, abençoa e dá a força e a paz necessária para alcançar meus objetivos

Em especial, aos meus pais José Othon Dantas Lopes e Maria de Brito Dantas pela educação, apoio, incentivo, confiança e amor que me encorajam a seguir estudando.

Aos meus irmãos Tereza, Paula e Othon Júnior pelo apoio e incentivo em todas as etapas da minha vida.

Ao meu marido Thiago Colares pela paciência, amor, incentivo e compreensão nos momentos em que precisei estar ausente.

A minha orientadora, Professora Maria Goretti Rodrigues de Queiroz, pela confiança, pelos ensinamentos e pela forma carinhosa que nos orienta.

Aos membros da banca por aceitarem meu convite.

Aos queridos alunos de iniciação científica do Laboratório de Bioquímica Clínica.

Agradeço aos amigos que fiz no Laboratório de Bioquímica Clínica, Jamile Magalhães, Daniel Freire, Thamires Fontenele, Richard Harison, Hector Galdino, Viviane Araújo, Aline Parente e Tiago Melo, pela contribuição em todos os momentos dessa trajetória, pelo maravilhoso convívio no laboratório, pelo apoio e pela amizade ao longo desses anos.

Ao Professor Said Fonseca pela amizade e auxílio na elaboração da dieta hipercalórica.

Agradeço, imensamente, à Professora Alice Martins pelo enorme apoio ao meu trabalho e por ter me acolhido sempre que precisei do Laboratório de Pesquisa Renal e Doenças Tropicais. Aos professores Ramon Róseo e Tiago Sampaio pela dedicação e disponibilidade, além da amizade e consolo nos momentos difíceis.

Enfim, agradeço profundamente a todos que participaram de alguma forma dessa conquista.

“Trabalha como se tudo dependesse de ti e
confia como se tudo dependesse de Deus”
(Santo Inácio de Loyola)

RESUMO

A obesidade é uma doença crônica de causa multifatorial, cuja incidência e persistência em adultos esta associada ao desenvolvimento de doenças crônicas e aumento do risco de mortalidade precoce. Nesse contexto, a biodiversidade brasileira apresenta um grande potencial para a descoberta de moléculas que possuam potencial terapêutico. Dentre as substâncias obtidas a partir de vegetais, destaca-se o ácido cafeico (AC) que pode ser útil no tratamento de diversas patologias, como a obesidade. O objetivo deste trabalho é avaliar o efeito do AC em protocolos experimentais de obesidade induzida por dieta hipercalórica, bem como verificar sua atividade em adipócitos. Foram usados camundongos *swiss* machos que foram divididos nos grupos (n=8): dieta padrão (DP), dieta hipercalórica (DH), sibutramina 10mg/kg (SIB), ácido cafeico 12,5mg/Kg (AC 12,5), ácido cafeico 25mg/Kg (AC 25) e ácido cafeico 50 mg/Kg (AC 50). A obesidade foi induzida pela ingestão de dieta hipercalórica preparada no Laboratório de Farmacotécnica do Curso de Farmácia/UFC. Foram realizados protocolos de tratamento concomitante à indução da obesidade e pós tratamento com o AC. Os animais receberam dieta padrão (DP) ou dieta hipercalórica (DH, SIB, AC12,5; AC25 e AC50) e foram tratados de acordo com o grupo e com o protocolo. Durante os protocolos experimentais foram aferidos o peso e consumo de água e ração dos animais, bem como realizado a determinação de glicose, colesterol total, triglicerídeos, AST, ALT, insulina e adiponectina. Foi realizado ainda um modelo de diferenciação de pré-adipócitos em adipócitos com tratamento simultâneo ao processo de diferenciação e pós-tratamento com o AC. Os resultados foram expressos em média \pm E.P.M. e os grupos foram comparados por ANOVA (pós-teste de Turkey), adotando-se como critério de significância $p < 0,05$. O protocolo descrito foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da UFC com nº61/2013. Nos modelos experimentais de obesidade induzida por dieta hipercalórica observou-se um aumento maior que 20% do peso do grupo DH em relação ao DP. Os animais tratados com ácido cafeico de forma simultânea a indução da obesidade apresentaram uma redução significativa do seu peso ($p < 0,05$) nas doses de 25 (AC 25) ($40,89 \pm 0,99$ g) e 50 mg/Kg (AC 50) ($40,08 \pm 0,74$ g), em 10,13% e 11,91%, respectivamente, quando comparados ao grupo DH ($45,50 \pm 1,40$ g). O tratamento simultâneo com o ácido cafeico também reduziu a glicemia e o colesterol total dos animais dos grupos AC 25 e AC 50. Enquanto que o pós-tratamento, apenas a maior dose (50 mg/Kg) foi capaz de reduzir significativamente o peso dos animais em 11,4%. Nos ensaios *in vitro*, foi verificada a capacidade do ácido cafeico de reduzir o acúmulo de lipídios relacionados à diferenciação dos pré-adipócitos 3T3-L1 em adipócitos. Após ensaio com DCF-DA, observou-se que o ácido cafeico reduziu a produção de espécies reativas de oxigênio e demonstrou-se ainda um aumento significativo da rodamina ligada a mitocôndria celular nos dois modelos usados e nas duas concentrações analisadas durante a diferenciação das células. Os resultados deste estudo sugerem que o ácido cafeico tem potencial antiobesidade.

Palavras-chave: Ácido cafeico; Obesidade; Adipócitos.

ABSTRACT

Obesity is a chronic disease of multifactorial cause, whose incidence and persistence in adults is associated with the development of chronic diseases and increased risk of early mortality. In this context, Brazilian biodiversity has great potential for the discovery of molecules that have therapeutic potential. Among the substances obtained from vegetables, there is caffeic acid (CA) that can be useful in the treatment of various pathologies, such as obesity. The objective of this work is to evaluate the effect of CA in experimental protocols of hypercaloric diet-induced obesity, as well as to verify its activity in adipocytes. Male swiss mice were divided into groups (n = 8): standard diet (SD), hypercaloric diet (DH), sibutramine 10mg/kg (SIB), caffeic acid 12.5mg/kg (AC 12.5), caffeic acid 25mg/kg (AC 25) and caffeic acid 50mg/kg (AC 50). Obesity was induced by eating a high calorie diet prepared at the Pharmacotechnique Laboratory of the Pharmacy Course/UFC. Concomitant treatment protocols to obesity induction and posttreatment with AC were performed. The animals received standard diet (SD) or hypercaloric diet (DH, SIB, AC12.5; AC25 and AC50) and were treated according to group and protocol. During the experimental protocols, the weight and water and feed intake of the animals were measured, as well as the determination of glucose, total cholesterol, triglycerides, AST, ALT, insulin and adiponectin. A model of pre-adipocyte differentiation into adipocytes with simultaneous treatment to the process of differentiation and post-treatment with CA was also performed. Results were expressed as mean \pm S.E.M. and the groups were compared by ANOVA (Turkeyi post-test), adopting as significance criterion $p < 0.05$. The protocol described was approved by the UFC Animal Research Ethics Committee under No. 61/2013. In experimental models of obesity-induced obesity by hypercaloric diet there was a greater than 20% increase in the weight of the DH group in relation to PD. Animals treated with caffeic acid simultaneously with obesity induction showed a significant reduction of their weight ($p < 0.05$) at 25 (AC 25) (40.89 ± 0.99 g) and 50 mg/kg doses. (AC 50) (40.08 ± 0.74 g), by 10.13% and 11.91%, respectively, when compared to the DH group (45.50 ± 1.40 g). Simultaneous treatment with caffeic acid also reduced the glycemia and total cholesterol of animals in groups AC 25 and AC 50. While post-treatment only the highest dose (50 mg/kg) was able to significantly reduce animal weight. by 11.4%. In in vitro assays, caffeic acid's ability to reduce lipid accumulation related to differentiation of 3T3-L1 pre-adipocytes into adipocytes was verified. After DCF-DA assay, caffeic acid was found to reduce the production of reactive oxygen species in the model and a significant increase in cell mitochondria-bound rhodamine was also shown in both models used and at the two concentrations analyzed during differentiation. of the cells. The results of this study suggest that caffeic acid has potential anti-obesity.

Keywords: Caffeic acid; Obesity; Adipocytes.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	- Estrutura química do ácido cafeico	30
Figura 2	- Delineamento experimental do protocolo de indução da obesidade com dieta hipercalórico e pós tratamento com o ácido cafeico..	35
Figura 3	- Delineamento experimental do protocolo de indução da obesidade com dieta hipercalórica e tratamento simultâneo com o ácido cafeico	37
Figura 4	- Delineamento experimental do protocolo de Teste Oral de Tolerância a Glicose	40
Figura 5	- Efeito do Ácido Cafeico sobre a glicemia em modelo de indução da obesidade e tratamento por 15 semanas	48
Figura 6	- Efeito do ácido cafeico sobre as concentrações plasmáticas de insulina em modelo de indução da obesidade e tratamento por 15 semanas	49
Figura 7	- Efeito do ácido cafeico sobre as concentrações plasmáticas de adiponectina em modelo de indução da obesidade e tratamento por 15 semanas	49
Figura 8	- Efeito do Ácido Cafeico sobre as concentrações plasmáticas de colesterol total em modelo de indução da obesidade e tratamento por 15 semanas	50
Figura 9	- Efeito do Ácido Cafeico sobre as concentrações plasmáticas de triglicerídeos em modelo de indução da obesidade e tratamento por 15 semanas	51
Figura 10	- Efeito do ácido cafeico sobre a glicemia em modelo de indução da obesidade por 12 semanas e pós-tratamento por 21 dias.....	54
Figura 11	- Efeito do ácido cafeico sobre o colesterol total em modelo de indução da obesidade por 12 semanas e pós-tratamento por 21 dias.....	55
Figura 12	- Efeito do ácido cafeico sobre os triglicerídeos em modelo de indução da obesidade por 12 semanas e pós-tratamento por 21 dias.....	55

Figura 13 - Efeito do ácido cafeico sobre a glicemia em protocolo de Teste Oral de Tolerância a Glicose	56
Figura 14 - Citotoxicidade do ácido cafeico no ensaio de redução do MTT	57
Figura 15 - Avaliação do acúmulo de lipídios após diferenciação de adipócitos usando Oil Red O	59
Figura 16 - Análise da produção de espécies reativas de oxigênio citoplasmática por citometria de fluxo	61
Figura 17 - Análise do potencial transmembrânico mitocondrial por citometria de fluxo	62

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Efeito do AC nos pesos corporais iniciais e finais, na ingestão de água e alimentos, relação pesos e gordura abdominal e fígado, e os níveis plasmáticos de ALT e AST em animais alimentados com dieta hipercalórica por 15 dias.....47
- Tabela 2 - Efeito do AC nos pesos corporais iniciais e finais, na ingestão de água e alimentos, relação pesos e gordura abdominal e fígado, e os níveis plasmáticos de ALT e AST em animais alimentados com dieta hipercalórica por 12 semanas e posterior tratamento com o AC por 21 dias.....53

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AC	Ácido Cafeico
AC12,5	Ácido Cafeico 12,5 mg/Kg
AC25	Ácido Cafeico 25mg/Kg
AC50	Ácido Cafeico 25mg/Kg
ALT	Alanina Aminotransferase
AST	Aspartato Aminotransferase
CAPE.	Ácido cafeico fenil éster
CAT	Catalase
CEPA.	Comitê de Ética em Pesquisa Animal
CT	Colesterol Total
DCV	Doenças Cardiovasculares
DCFH-DA.	Diacetato de diclorofluoresceína
DH	Dieta Hipercalórica
DM	Diabetes mellitus
DM1	Diabetes mellitus Tipo 1
DM2	Diabetes mellitus Tipo 2
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Ácido Desoxibonucleico
DP	Dieta Padrão
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
EROS	Espécies Reativas de Oxigênio
FDA	Food and Drug Administration
GLP 1	Glucagon-Like-Peptide 1
GLUT	Glucose Transporter
GPX	Glutathione Peroxidase
GR	Glutathione reductase
HDL	Lipoproteína de Alta Densidade
IBMX.	Isobutylmetilxantina
IL-6	Interleucina -6
IMC	Índice de Massa Corporal
LDL	Lipoproteína de Baixa Densidade
LPL	Lipoproteína Lipase

LPS	Lipopolissacarídeo
MCP-1	Monocyte Chemotactic Protein-1
MTT	Brometo de 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
NF-Kb	Nuclear Factor-Kb
PPAR	Receptores Ativados da Proliferação de Peroxissomos
RNAm	Ácido Ribonucleico Mensageiro
Rho123	Rodamina 123
SDS.	Dodecil-sulfato de sódio
SIB	Sibutramina
SOD	Superóxido Dismutase
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral Alfa
TOTG	Teste oral de tolerância a glicose
WHO	Organização Mundial da Saúde (do Inglês: World Health Organization)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
1.1. Obesidade e Síndrome metabólica	17
1.2. Tecido Adiposo	20
1.3. Estresse Oxidativo	22
1.4. Tratamento da obesidade	23
1.5. Modelos experimentais de obesidade	25
1.6. Compostos fenólicos	27
1.7. Ácido Cafeico	29
2. JUSTIFICATIVA	31
3. OBJETIVOS	32
3.1. Objetivo Geral	32
3.2. Objetivos Específicos	32
4. METODOLOGIA	33
4.1. Ácido Cafeico	33
4.2. Animais	33
4.3. Dietas	33
4.3.1. <i>Dieta Padrão (DP)</i>	33
4.3.2. <i>Dieta Hipercalórica</i>	34
4.4. Protocolos Experimentais	34
4.4.1. <i>Grupos experimentais</i>	34
4.4.2. <i>Indução da obesidade por consumo de dieta hipercalórica durante 12 semanas com pós tratamento de 21 dias</i>	35
4.4.3. <i>Indução da obesidade por consumo de dieta hipercalórica durante 15 semanas com tratamento simultâneo</i>	36
4.4.4. <i>Avaliação bioquímica plasmática</i>	38
4.4.5. <i>Determinação dos níveis de Adiponectina e Insulina</i>	38
4.4.6. <i>Protocolo de Teste Oral de Tolerância a Glicose (TOTG)</i>	39
4.4.7. <i>Cultivo celular de adipócitos</i>	40
4.4.7.1. <i>Obtenção das células e condições de cultivo</i>	39
4.4.7.2. <i>Citotoxicidade do ácido cafeico sobre células 3T3-L1</i>	41

4.4.7.2.1. Protocolo de diferenciação das células.....	41
4.4.7.2.2. Ensaio por citometria de fluxo	42
4.4.7.2.3. Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio citoplasmáticas.....	43
4.4.7.2.4. Análise do potencial transmembrânico mitocondrial	43
4.4.8. Análise estatística.....	44
5. RESULTADOS	45
5.1. Efeito do ácido cafeico em protocolo de indução e tratamento de obesidade por 15 semanas	45
5.2. Efeito do ácido cafeico após indução da obesidade por dieta hipercalórica durante 12 dias e pós tratamento de 21 dias	51
5.3. Efeito do ácido cafeico em protocolo de Teste Oral de Tolerância a Glicose (TOTG).....	56
5.4. Efeito do ácido cafeico em ensaios <i>in vitro</i> de citotoxicidade.....	57
5.5. Efeito do ácido cafeico em modelos experimentais <i>in vitro</i> de diferenciação de pré adipócitos	58
6. DISCUSSÃO	63
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	72
8. CONCLUSÃO.....	73
REFERÊNCIAS	74

1 INTRODUÇÃO

1.1 Obesidade e Síndrome Metabólica

A obesidade é uma doença crônica de causa multifatorial, resultante de um balanço energético positivo. Segundo a Organização Mundial de Saúde, caracteriza-se como uma epidemia de caráter mundial, apresentando um crescimento significativo da sua incidência na população infantil, o que pode gerar problemas para estes indivíduos a curto e longo prazo, aumentando a probabilidade da obesidade na vida adulta (ALBUQUERQUE *et al.*, 2016).

Em 2014, mais de 2,1 bilhões de pessoas estavam com excesso de peso ou obesas, o que representa cerca de 30% da população mundial. Acredita-se que se esta incidência permanecer, quase metade da população adulta do mundo estará com sobrepeso ou obesidade até 2030. (TREMMELE *et al.*, 2017).

A Organização Mundial de Saúde (WHO, 2018), demonstrou que em 2016 mais de 650 milhões de adultos estavam obesos dentre os mais de 1,9 bilhões com excesso de peso. O excesso de peso e obesidade matam mais pessoas que o baixo peso nos países que concentram a maior parte da população mundial. Assim, a obesidade representa um importante problema de saúde pública devido à sua prevalência, incidência, bem como em decorrência dos custos econômicos (TREMMELE *et al.*, 2017).

A obesidade geralmente surge devido à associação de fatores genéticos e ambientais. Dentre os fatores ambientais, a inatividade física e o comportamento alimentar são importantes, pois o alto consumo de alimentos industrializados, associado ao reduzido consumo de frutas e legumes podem favorecer o desenvolvimento da obesidade (ALBUQUERQUE *et al.*, 2016). Nos últimos 100 anos, nos Estados Unidos, o consumo de verduras e legumes reduziu 26% e de fibras 18% enquanto que o consumo de açúcar aumentou 64% e lipídios 67%. Mudança nutricional semelhante também foi observada no Brasil, pois de 2002 à 2009 o consumo de alimentos preparados e misturas industriais cresceu 37% indicando um aumento de hábitos alimentares que favorecem o desenvolvimento da obesidade (FRANCISQUETI; NASCIMENTO; CORREA, 2015)

O período entre a adolescência e a vida adulta é a fase com maior incidência de obesidade e a persistência dela na vida adulta está relacionada ao desenvolvimento de doenças crônicas. Os adultos jovens que têm o hábito de fumar ou os níveis séricos de colesterol-LDL elevados, apresentam maior risco de serem obesos (CONDE; BORGES, 2011).

A obesidade está frequentemente associada com outras patologias como diabetes *mellitus* DM 2 e dislipidemias, duas condições intimamente relacionadas com doenças cardiovasculares. Essas comorbidades favorecem o desenvolvimento de alterações na função e estrutura vascular. Isso ocorre por meio de vários mecanismos, incluindo a hiperglicemia e o desenvolvimento de um estado pró-coagulante, influenciado por citocinas inflamatórias produzidas pelo tecido adiposo, referidas como as adipocitocinas, as quais contribuem para o desenvolvimento de doenças metabólicas e cardiovasculares (BURGOS *et al.*, 2014; OMECH *et al.*, 2016).

A combinação de distúrbios metabólicos relacionados a obesidade caracteriza a síndrome metabólica. A presença de obesidade abdominal, resistência a insulina, hipertensão arterial sistêmica, aumento de triglicérides e diminuição do colesterol HDL constitui o diagnóstico dessa síndrome e o estresse oxidativo parece ter um importante papel no desenvolvimento de todas essas condições (CARVALHO *et al.*, 2013; CICERO; COLLETTI, 2016) Para que um indivíduo seja diagnosticado com síndrome metabólica ele precisa apresentar simultaneamente pelo menos 3 das condições citadas (KIM S *et al.*, 2018).

Na população com síndrome metabólica a incidência de infarto agudo do miocárdio e doença coronariana é bastante elevada, por isso é muito importante a identificação de novas opções farmacológicas para sua prevenção e tratamento. Uma vida sedentária e a crescente ingestão de alimentos hipercalóricos são fatores importantes para o surgimento de várias doenças metabólicas como a diabetes e a obesidade (WENG *et al.*, 2012).

A diabetes tipo 2 em decorrência da obesidade é considerada uma doença inflamatória, pois pode ocorrer devido ao aumento na produção de fator de necrose tumoral- α (TNF- α), os ácidos graxos livres e o estresse oxidativo levando a inibição da sinalização de insulina e a indução da resistência (BEZERRA *et al.*, 2012).

Para a manutenção do equilíbrio no metabolismo e o peso corporal existem sistemas reguladores. Como exemplo desses sistemas regulatórios, pode-se citar a grelina e leptina. Esses hormônios, emergiram como importantes agentes no controle

neuroendócrino da homeostase energética comunicando-se com o sistema nervoso central sobre os atuais níveis de reservas de energia e estado nutricional (CUI; LÓPEZ; RAHMOUNI, 2017). A grelina é um hormônio peptídeo derivado do estômago e de ação periférica. Verifica-se o pico nos níveis de grelina antes do início da refeição, que diminuem após o consumo de alimentos, os indivíduos obesos são mais sensíveis aos efeitos da grelina como estimuladores do apetite (NARAYANASWAMI; DWOSKIN, 2018).

A leptina atua diminuindo a ingestão de alimentos e peso corporal e é produzida pelos adipócitos brancos proporcionalmente à massa gorda do indivíduo. (NARAYANASWAMI; DWOSKIN, 2018). A insulina também atua na regulação da ingestão de alimentos, e junto com leptina pode agir no cérebro, para reduzir a ingestão de alimentos e o peso corporal, bem como aumentar o gasto de energia. Esse mecanismo é dependente dos níveis plasmáticos desses hormônios, que ativam receptores em regiões específicas do cérebro. Entretanto, quando ocorre deficiência na produção ou resistência dos receptores de insulina ou leptina tem-se como consequência a hiperfagia e ganho de peso (SPIEGELMAN; FLIERT, 2001).

Assim, a insulina pode suprimir a lipólise e facilitar a lipogênese. O tecido adiposo pode não comportar a demanda de energia em excesso, como consequência disso os triglicerídeos podem ser acumulados em tecidos não-adiposos. Este acúmulo pode levar a resistência à insulina no fígado e músculo esquelético, podendo reduzir a secreção de insulina no pâncreas devido à lipotoxicidade (SUGANAMI; TANAKA; OGAWA, 2012).

Outra proteína sintetizada principalmente pelos adipócitos é a adiponectina que atua aumentando a capacidade da insulina de reduzir a produção de glicose hepática, bem como diminui o perfil lipídico e o peso corporal. A concentração plasmática de adiponectina é inversamente proporcional a resistência a insulina em pacientes obesos, assim o aumento da sinalização da adiponectina pode ser uma estratégia terapêutica para melhorar a obesidade e resistência a insulina (NARAYANASWAMI; DWOSKIN, 2018).

Dessa forma, obesidade é uma doença metabólica crônica e complexa que ocorre devido ao consumo aumentado de nutrientes que causam um desequilíbrio de energia associada a inadequada atividade física. A ingestão de energia em excesso acrescido do baixo gasto, induz o acúmulo de lipídeos, principalmente os

triglicérides, no fígado e tecido adiposo, levando ao aumento gradativo desse tecido (LIAO *et al.*, 2013, KIM S *et al.*, 2018).

1.2 Tecido Adiposo

O tecido adiposo pode ser classificado como tecido adiposo branco e marrom que apresentam origens, células promotoras e mediadores diferentes. O tecido adiposo branco é composto por adipócitos brancos encontrados em todo corpo, sendo dividido entre visceral e subcutâneos, já o tecido adiposo marrom é encontrado em regiões específicas que incluem as regiões cervical, supra-clavicular, paravertebral, mediastinal e perirrenal em humanos. A principal função do tecido adiposo branco é como reservatório de energia e o marrom acreditava-se estar presente apenas no recém-nascido e é caracterizado pela dissipação de energia através da produção de calor (BARGUT *et al.*, 2017).

Durante muito tempo o tecido adiposo branco foi considerado um tecido inerte de armazenamento de energia, no entanto, pesquisas mostraram que ele secreta uma grande quantidade de mediadores conhecidos como adipocinas ou adipocitocinas, fazendo com que o tecido adiposo seja reconhecido como um órgão endócrino essencial (VERSINI *et al.*, 2014). Tanto o tecido adiposo branco quanto o marrom apresentam funções endócrinas. (BARGUT *et al.*, 2017). As adipocinas apresentam atividades metabólicas e atuam na regulação do apetite, além da ação pró-inflamatória colaborando para o quadro inflamatório de baixo grau apresentado por obesos (VERSINI *et al.*, 2014).

O tipo celular mais comum no tecido adiposo é o adipócito, essas células podem ser formadas durante a vida intra-uterina, período pós parto ou após estímulos, sendo formados a partir de pré-adipócitos (KIM S *et al.*, 2018). Existem pelo menos 3 tipos de adipócitos: branco, marrom e bege. No estado basal, os adipócitos beges atuam como adipócitos brancos, mas sob o estímulo adequado eles podem se transformar em adipócitos parecidos com o do tecido adiposo marrom (BARGUT *et al.*, 2017).

Para armazenar energia, o tecido adiposo realiza os processos de hiperplasia e hipertrofia. Quando os lipídios acumulam-se em adipócitos já existentes, a célula aumenta seu tamanho, processo denominado de hipertrofia. A hipertrofia causa inflamação o que altera o equilíbrio entre a lipólise e lipogênese e sua função

endócrina, podendo contribuir para a resistência à insulina. Quando o limite da capacidade do adipócito de armazenar lipídios é ultrapassado, esses lipídios podem acumular-se em outros órgãos como no fígado e no músculo (KIM S *et al.*, 2018). Pode-se dizer que na obesidade, o tecido adiposo desempenha um papel importante na secreção de citocinas pró-inflamatórias após crescimento patológico de adipócitos (ALAM *et al.*, 2016). O padrão de secreção das adipocitocinas está intimamente relacionado a condição do adipócito (GOTO; MORI; NAGAOKA, 2013).

Como mencionado anteriormente, ocorre inflamação crônica de baixa intensidade que desencadeia uma disfunção do adipócito em indivíduos obesos (ALAM *et al.*, 2016). Adipócitos pequenos secretam hormônios sensíveis a insulina como a adiponectina. Já os adipócitos hipertrofiados tem um aumento da liberação de hormônios como o TNF- α e IL-6, relacionados a resistência a insulina observada em pessoas obesas (GOTO; MORI; NAGAOKA, 2013). Portanto, a resistência a insulina observada no paciente obeso tem relação com a hipertrofia dos adipócitos. (KIM S *et al.*, 2018).

Existem evidências de que na obesidade a inflamação pode ser induzida pela presença de macrófagos infiltrados no tecido adiposo. Esse infiltrado, antecede ou está associado ao desenvolvimento da resistência à insulina e acúmulo de lipídeos em animais e humanos (SUGANAMI; TANAKA; OGAWA, 2012). Alguns estudos sugerem que a expressão de proteína de monócitos MCP-1 tem um papel importante nas respostas inflamatórias do tecido adiposo por ativação e indução dos infiltrados dos macrófagos, colaborando com a progressão da obesidade (JUMAN *et al.*, 2012).

A inflamação e o estresse oxidativo podem ocorrer devido à hipertrofia quando a capacidade de armazenamento do adipócito é ultrapassada, além disso, o aumento da quantidade dos lipídios, pode levar à necrose devido à irrigação celular insuficiente. O processo de fagocitose para eliminar essas células mortas resulta em aumento da infiltração inflamatória e também do estresse oxidativo pela liberação de radicais livres, como óxido nítrico e peróxido de hidrogênio. (FRANCISQUETI *et al.*, 2017).

1.3 Estresse oxidativo

A produção de radicais livres é um processo fisiológico que apresenta funções biológicas importantes e sua liberação em quantidades adequadas tem relação com a produção de ATP, mecanismos de defesa, sinalização intercelular e síntese de substâncias importantes (BARBOSA *et al.*, 2010). São caracterizados por serem moléculas orgânicas e inorgânicas instáveis e muito reativas quimicamente devido à presença de um elétron não-pareado na sua órbita mais externa. Os principais alvos celulares dos radicais livres são proteínas, lipídios, carboidratos e o ácido desoxirribonucleico (DNA), são gerados principalmente no citoplasma, mitocôndrias e membrana citoplasmática (COTINGUIBA *et al.*, 2013). O produtos reativos formados a partir do metabolismo celular são mais adequadamente chamados de espécies reativas de oxigênio (EROs) e/ou nitrogênio (ERNs), uma vez que existem produtos reativos que não são radicais livres como por exemplo o peróxido de hidrogênio (TELES *et al.*, 2015).

As espécies reativas de oxigênio e/ou nitrogênio podem ser produzidas em excesso causando um desequilíbrio entre compostos oxidantes e antioxidantes levando ao estresse oxidativo. Tal processo pode gerar danos à macromoléculas como lipídios, proteínas e DNA, promovendo alterações envolvidas no desenvolvimento de doenças como câncer, aterosclerose, diabetes, cirrose, dentre outras (MOSCA; SANCHES; COMUNE, 2017; SPADA *et al.*, 2008)

A maior parte dos radicais livres derivam do oxigênio sendo o radical hidroxila o mais reativo na indução de lesões nas moléculas celulares (COTINGUIBA *et al.*, 2013; REIS *et al.*, 2011). A membrana é um dos componentes celulares mais atingidos pelas espécies reativas de oxigênio (EROs) podendo acarretar alterações na sua estrutura, permeabilidade e no metabolismo celular. Isso ocorre devido à peroxidação lipídica que é uma reação em cadeia entre espécies reativas e os ácidos graxos poliinsaturados presentes na membrana citoplasmática (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006). Os danos celulares causados pela peroxidação lipídica estão aumentados em pacientes obesos, uma vez que o desequilíbrio entre o peso corporal, gordura e perfil lipídico os tornam mais suscetíveis a lesões oxidativas (FRANÇA *et al.*, 2013; TELES *et al.*, 2015)

Os danos causados pelo excesso de EROs e/ou ERNs podem ser reduzidos por mecanismos de defesa antioxidantes. Esses mecanismos podem atuar

de diferentes formas: os sistemas de prevenção reduzem a formação de espécies reativas, os sistemas varredores interferem na interação das espécies reativas com seus alvos e os sistemas de reparo restauram estruturas biológicas afetadas. Esses sistemas podem agir mediados por enzimas (sistemas enzimáticos) como a superóxido dismutase (SOD), glutathiona peroxidase (GPx), glutathiona redutase (GR), catalase (CAT), entre outras e ou por outras substâncias (não enzimáticos) endógenas ou provenientes da dieta (β-caroteno, selênio, α-tocoferol, vitamina C, compostos fenólicos etc.) (BARBOSA *et al.*, 2010).

Os mecanismos de defesa contra as EROs no organismo humano podem ser insuficientes e os danos cada vez mais prejudiciais ao organismo (PEREIRA; VIDAL; CONSTANT; 2009). A produção desequilibrada de EROs apresenta relação com a obesidade e síndrome metabólica, uma vez que o aumento patológico do tecido adiposo contribui para a inflamação crônica de baixo grau e o estresse oxidativo relaciona-se ainda com a resistência à insulina por interromper a liberação de adipocinas pelo tecido adiposo. Assim, estudos demonstram a correlação entre a adipogênese e o estresse oxidativo (FRANCISQUETI *et al.*, 2017; MEHTA; RAYALAM; WANG, 2018). Diante da importância da obesidade e suas comorbidades para a saúde pública, faz-se necessária a pesquisa de compostos que possam contribuir para sua prevenção e/ou tratamento.

1.4 Tratamento da Obesidade

O tratamento da obesidade pode incluir a combinação de algumas medidas, tais como, medicamentos, procedimentos cirúrgicos, atividade física e dietas específicas (ABESO, 2016). A necessidade de diversos tipos de intervenções é devido à sua complexa patogênese, somado ao fato de estudos mostrarem que apenas 5-10% dos indivíduos conseguem manter a redução do peso (HASANI-RANJBAR; JOUYANDEH; ABDOLLAHI, 2013). O tratamento medicamentoso é importante quando a mudança no estilo de vida não produzir resultados satisfatórios ou quando o paciente apresenta outras doenças relacionadas, uma vez que a obesidade é uma doença crônica e a não utilização de um tratamento medicamentoso pode gerar agravos à saúde do paciente (COSTA; DUARTE, 2017). A mudança do estilo de vida como dieta e exercício é essencial no tratamento da obesidade, mesmo quando empregadas medidas farmacológicas ou cirúrgicas (ABESO, 2016).

O tratamento farmacológico é melhor indicado quando o indivíduo possui IMC maior ou igual 30 kg/m², 25 ou 27 kg/m² na presença de comorbidades ou falha do tratamento não farmacológico (ABESO, 2016). O tratamento farmacológico muitas vezes pode ser uma estratégia importante para aumentar a motivação e adesão do paciente ao tratamento.

A Sibutramina foi um dos primeiros fármacos usados no tratamento da obesidade. Ela é um inibidor da recaptação de serotonina e noradrenalina, possui resultados tanto na perda de peso, quanto na melhora no controle metabólico de pacientes obesos e diabéticos, aumento do colesterol HDL, redução do colesterol LDL e diminuição dos triglicerídios plasmáticos (OLIVEIRA *et al.*, 2009). A sibutramina apresenta como efeito colateral mais comum a boca seca mas o paciente pode apresentar, também, insônia, aumento da pressão arterial e frequência cardíaca, diarreia, dor de cabeça, dentre outros (COSTA; DUARTE, 2017).

Outra substância que pode ser usada no tratamento da obesidade é a anfepromona que apresenta estrutura química semelhante à anfetamina, mas apresenta como efeito colateral a redução da fome e por isso é usado como anorexígeno. Tem como mecanismo de ação a inibição da receptação de noradrenalina na fenda sináptica aumentando sua interação com os receptores pós-sinápticos. Os pacientes que fazem uso desse medicamento podem ter como efeitos colaterais nervosismo, insônia e agitação. O uso da anfepromona pode causar tolerância o que compromete sua resposta a longo prazo (RADAELLI; PEDROSO; MEDEIROS, 2016).

O Femproporex é um anorexígeno que atua aumentando a liberação de neurotransmissores e inibindo a recaptação de dopamina, causando uma redução do apetite. Ele auxilia no tratamento da obesidade de moderada a grave e pode promover alterações neurológicas comportamentais e cardiovasculares, tais como hipertensão arterial, náuseas, vômito, ansiedade, taquicardia, insônia, excitação e boca seca (COSTA; DUARTE, 2017). Outra opção terapêutica, é um derivado da imidazolina chamado mazindol, que inibe a recaptação de dopamina e noradrenalina atuando ainda no aumento da captação de glicose pelo músculo esquelético (MOREIRA; ALVES, 2015)

A combinação farmacológica da Bupropiona com a Naltrexona pode ser usada no tratamento de obesidade. A Bupropiona reduz a ingestão alimentar ao agir sobre receptores dopaminérgicos e adrenérgicos no hipotálamo. A Naltrexona é um

antagonista opióide com poucos efeitos na terapêutica da obesidade quando usado isoladamente, mas em associação com Bupropiona pode bloquear receptores opióides ativados por β -endorfinas e possibilitar a ação de hormônios que levam a inibição do consumo alimentar. Essa combinação, porém, pode levar ao aumento da frequência cardíaca e da pressão sanguínea (GREENWAY *et al.*, 2009).

O Orlistat atua inibindo a atividade das lipases gástrica e pancreática, reduzindo a absorção de triglicerídeos provenientes da dieta. Estudos também mostraram seu efeito benéfico na redução da circunferência abdominal, LDL, triglicerídeos e aumento do colesterol HDL, além da perda de peso (RADAELLI; PEDROSO; MEDEIROS, 2016) Os efeitos adversos ocorrem principalmente no começo do tratamento e incluem esteatorréia, dispepsia, incontinência fecal, flatulência e distensão abdominal. Também foram registrados pelo FDA alguns casos de pessoas que desenvolveram lesão hepática e insuficiência hepática devido ao uso de Orlistat (KANG; PARK, 2012).

A liraglutida é um análogo do peptídeo semelhante ao glucagon (GLP-1) inicialmente usado somente para o tratamento da diabetes e que vem sendo usado no tratamento da obesidade. Estudos mostraram que este medicamento em altas doses regula o apetite, diminui a ingestão de alimentos e reduz o peso de pacientes diabéticos e não diabéticos. É considerado um medicamento bem tolerado, apresentando como efeitos adversos mais relatados os gastrointestinais (ONGE; MILLER; MOTYCKA, 2016).

A busca por novos medicamentos deixa evidente a necessidade de novas alternativas terapêuticas para a obesidade, já que atualmente são escassas as opções de tratamento farmacológico, para isso são usados modelos experimentais de indução de obesidade *in vivo* e *in vitro*.

1.5 Modelos Experimentais de Obesidade

O uso de modelos experimentais usando animais é de fundamental importância para o estudo dos mecanismos pelos quais a obesidade induz as disfunções fisiológicas, bem como para o estudo de novos fármacos que possam ser usados no seu tratamento. Existem diferentes modelos de animais, grande parte deles utilizam roedores, que desenvolvem a obesidade a partir de dietas modificadas ou de mutações genéticas (ROSINI; SILVA; MORAIS, 2012).

Os genes participam do controle de várias vias metabólicas auxiliando na manutenção de peso e gordura corporal ao longo do tempo. Assim, o balanço energético, que relaciona a ingestão e o gasto de energia, pode depender em torno de 40% da herança genética, afetando tanto no apetite quanto no gasto de energia (MARQUES-LOPES *et al.*, 2004; ROSINI; SILVA; MORAIS, 2012). Existem ainda estudos que sugerem que os fatores genéticos influenciam em 50%-80% na indução da obesidade, e que o meio ambiente determina apenas a expressão fenotípica (ROSINI; SILVA; MORAIS, 2012).

Assim, os modelos *in vivo* podem ser usados para identificar genes relacionados à obesidade em animais e seus homólogos em humano. Os estudos genéticos utilizando modelos animais de obesidade podem ser desenvolvidos baseado na identificação de loci e produção de animais transgênicos ou *knockot* de genes relacionados a obesidade, bem como podem ser realizadas mutações monogênicas e/ou poligênicas. Nos ratos obesos (ob/ob), a obesidade se deve à ausência de leptina ou a leptina não funcional, o que faz com que os animais apresentem hiperfagia, diabetes e obesidade. Existem ainda outros modelos em que a obesidade ocorre como consequência de mudanças nos receptores de leptina que geram sua resistência (ratos db/db) (MARQUES-LOPES *et al.*, 2004). Entretanto, sabe-se que o fator genético, isoladamente, não é a causa da obesidade (ROSINI; SILVA; MORAIS, 2012).

Os modelos experimentais devem tentar reproduzir o desenvolvimento da obesidade em humanos. Dessa forma, o consumo de alimentos de sabor agradável associado a uma grande quantidade de calorias seria indicado para a indução da obesidade (ROSINI; SILVA; MORAIS, 2012). Existem vários tipos de dieta para induzir a obesidade experimentalmente em animais, por exemplo: dieta hiperlipídica (BARNES *et al.*, 2003), dieta de cafeteria (ESTADELLA *et al.*, 2004) e dieta hipercalórica (NADERALI *et al.*, 2003). Os modelos que usam dieta para induzir a obesidade variam na composição da dieta, no período de ingestão e nos parâmetros alterados a partir do seu consumo.

Na obesidade, observa-se aumento do tecido adiposo que é caracterizado por achados conhecidos como hiperplasia (aumento no número de células de gordura) e hipertrofia (aumento do tamanho celular) para armazenar triglicerídeos de forma eficaz no tecido adiposo. A hiperplasia e a hipertrofia dos adipócitos podem ser reproduzidas em modelos experimentais *in vitro* utilizando a linhagem celular de 3T3-

L1. Esta linhagem celular é usada em modelos de adipogênese bem estabelecido, onde ocorre uma diferenciação programada de pré-adipócitos em adipócitos. Nestas células o processo de adipogênese envolve a parada do crescimento, expansão mitótica clonal e o término da diferenciação (SHIN *et al.*, 2014; SUGANAMI; TANAKA; OGAWA, 2012).

A partir de modelos experimentais *in vivo* e *in vitro* é possível verificar atividade de moléculas com potencial para o tratamento e prevenção da obesidade e doenças correlacionadas como diabetes, dislipidemias, hipertensão, entre outras. Dentre essas moléculas, destacam-se os compostos fenólicos.

1.6 Compostos Fenólicos

Estudos mostram que a redução do risco de desenvolver doenças crônicas como câncer e doenças cardiovasculares está relacionada com o aumento da ingestão de produtos vegetais, principalmente devido à presença de compostos que possuem atividade antioxidantes como algumas vitaminas, os carotenoides e os compostos fenólicos (SILVA *et al.*, 2010).

Os compostos fenólicos são metabólitos secundários das plantas, podem estar presentes em altas concentrações mesmo geralmente não sendo essencial para seu crescimento e desenvolvimento. Esses compostos possuem um anel aromático com um ou mais substituintes hidroxílicos (DEL RIO *et al.*, 2013).

Os compostos fenólicos mais encontrados na natureza são estruturalmente diversificados, podendo estar conjugados com mono e polissacarídeos, bem como, podem apresentar-se como ésteres ou metil ésteres. Estão presentes, geralmente, em pequena quantidade nas espécies vegetais e são divididos em ácidos fenólicos, flavonóides, estilbenos e taninos baseado nas suas características químicas. Os flavonóides e ácidos fenólicos tem um papel importante pois frequentemente fazem parte da dieta (BALASUNDRAM; SUNDRAM; SAMMAN, 2006; DEL RIO *et al.*, 2013).

Os flavonóides são compostos fenólicos classificados como polifenóis que podem ser identificados em vários alimentos de origem vegetal e por isso são encontrados no mundo inteiro. Estão relacionados a coloração de flores e frutos, sendo identificados principalmente em plantas superiores (ZUANAZZI; MONTANHA, 2003).

Os flavonóides são compostos fenólicos utilizados na medicina popular para o tratamento da obesidade (RONDANELLI *et al.*, 2014). Tais atividades biológicas são reguladas principalmente pela capacidade desses compostos de atuarem eliminando radicais livres formados como consequência da obesidade ou podem regular a homeostase energética e vias inflamatórias (ALAM *et al.*, 2016).

Estudos epidemiológicos demonstraram que o consumo de alimentos e bebidas com elevado teor de compostos fenólicos está associado com a prevenção de doenças coronárias (CHO *et al.*, 2010). A oleuropeína é um composto fenólico que, dentre outras atividades biológicas, é capaz de melhorar a dislipidemia, obesidade, diabetes e hipertensão podendo contribuir no combate a síndrome metabólica (AHAMAD *et al.*, 2019).

Estudos mostram que os compostos fenólicos apresentam atividade antioxidante e isso pode ocorrer devido à sua estrutura química que confere a capacidade de sequestrar ou neutralizar radicais livres atuando nas etapas iniciais da peroxidação lipídica (ACHKAR *et al.*, 2013). O ácido verátrico é um ácido fenólico que demonstrou ter efeito antioxidante que contribuiu para sua ação na hiperlipidemia aterogênica induzida em ratos (RAJA; SARAVANAKUMAR; SATHYA, 2012).

Os ácidos fenólicos são compostos formados por um anel aromático e os substituintes ligados à sua estrutura, podem apresentar-se ligados a outras substâncias ou, menos frequentemente, na forma livre. A estrutura desses compostos varia de acordo com o número e a posição das hidroxilas do anel aromático. São divididos em dois grupos, ácidos hidroxibenzóicos e hidroxicinâmico. O primeiro possui sete átomos de carbono na sua molécula. O grupo dos ácidos hidroxicinâmicos, é formado pelos ácidos caféico, ferúlico, p-cumárico e sinápico. (MARINOVA; YANISHLIEVA, 2003; OLIVEIRA; BASTOS, 2011; TANASE; COSARCA; MUNTEAN, 2019)

Uma classe importante de compostos fenólicos, são os ácidos hidroxicinâmicos que são amplamente disponíveis em sementes, frutas e legumes. Os ácidos hidroxicinâmico como o Q-cumárico, ácido cafeico, ácido ferúlico e os seus derivados são descritos na literatura por seus efeitos na melhora da hipercolesterolemia e diabetes Tipo 2 (resistência à insulina) (CHO *et al.*, 2010).

Os derivados dos ácidos hidroxicinâmicos são sintetizados nas plantas seguindo as vias mavalonato e chiquimato onde a fenilalanina e a tirosina são duas moléculas precursoras. Esses derivados também podem servir como moléculas

precursoras para os estilbenos, chalconas, flavonóides e antocianinas (ALAM *et al.*, 2016). Além de apresentarem propriedades antioxidantes e anti-inflamatória muitos ácidos hidroxinâmicos podem prevenir a hipertensão e doenças cardiovasculares (RONDANELLI *et al.*, 2014).

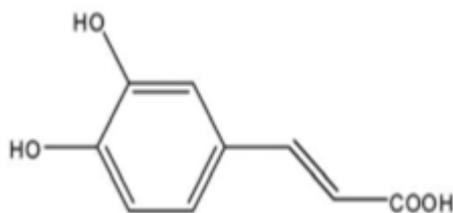
Os ácidos hidroxicinâmicos também são eficazes para evitar ganho de peso corporal, a deposição de gordura e disfunção dos adipócitos em modelos animais com dietas de alta ingestão e rica em gorduras. Podem atuar ainda diminuindo a proliferação e diferenciação de adipócitos e na deposição e disfunção do tecido adiposo (ALAM *et al.*, 2016). O ácido cafeico é um dos ácidos hidroxicinâmicos mais presentes na dieta humana e podendo ser encontrado na forma esterificada (CHO *et al.*, 2010).

1.7 Ácido Cafeico

O ácido cafeico, assim como outros ácidos hidroxinâmicos de origem natural, apresenta uma estrutura de fenilpropanoide (C6-C3) com um anel aromático 3,4-dihidroxilado ligado a um ácido carboxílico. (SILVA; OLIVEIRA; BORGES, 2014)

O ácido cafeico (ácido 3,4-di-hidroxicinâmico) (Figura 01) pode ser encontrado em plantas e frutas. Apresenta várias atividades farmacológicas descritas na literatura, tais como efeito anti-aterosclerótico pela redução da oxidação da lipoproteína de baixa densidade (LDL) e da diminuição da atividade do fator nuclear- κ B (NF- κ B), além da ação anti-inflamatória, anti-câncer, antiobesidade e antiviral (CREVAR-SAKAC *et al.*, 2016; LIAO *et al.*, 2013).

Figura 1 - Estrutura química do ácido cafeico.



Fonte: LEE *et al.*, 2012.

Os derivados do ácido cafeico também possuem várias atividades biológicas tais como: antioxidante, antitumoral, hepatoprotetora e outras. A maior parte destes derivados estão na forma de ésteres como o ácido cafeico feniléster e o ácido clorogênico (ZHANG *et al.*, 2014)

O ácido cafeico e alguns de seus derivados tais como o ácido cafeico fenil éster (CAPE) demonstraram, *in vivo* e *in vitro*, atividade anti-inflamatória. Seus derivados suprimiram a expressão da óxido nítrico-sintetase induzida e impediram a produção de óxido nítrico em macrófago. Além disso, inibiram tanto o aumento nos níveis de IL-1 quanto o edema de pata induzido por carragenina (ALAM *et al.*, 2016). Os ésteres do ácido cafeico, têm atividade antioxidante e diminuem a obesidade em modelos *in vivo* e *in vitro* (FARMER, 2006; JUMAN *et al.*, 2012). Assim, o ácido cafeico desponta como uma substância com potencial farmacológico no que diz respeito ao tratamento da obesidade.

2 JUSTIFICATIVA

A obesidade é um problema de saúde pública e está diretamente relacionada com o desenvolvimento de doenças cardiovasculares apresentando um número considerável de mortes em todo o mundo. Há, ainda, limitações na terapia farmacológica, pois os fármacos disponíveis e empregados em tratamentos de obesidade possuem muitos efeitos adversos e não propiciam a resultados clínicos satisfatórios. O desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para o tratamento da obesidade é primordial e pode contribuir sobremaneira para a melhora de protocolos terapêuticos, aumento da qualidade e expectativa de vida bem como redução de custos.

Despontam como moléculas promissoras os compostos que pertencem à classe dos ácidos hidroxinâmicos e que apresentam várias atividades biológicas descritas na literatura como atividade antioxidante, anti-inflamatória e hipoglicemiante, intimamente relacionadas com a fisiopatologia da obesidade. O ácido cafeico, que também é um ácido hidroxinâmico, possui efeito hipoglicêmico em alguns protocolos de dislipidemia, podendo ser estudado também em protocolos de obesidade, assim como seus ésteres.

Mesmo que na literatura existam relatos de alguns efeitos biológicos do ácido cafeico, estudos com modelos experimentais de tratamento concomitante e pós tratamento da obesidade *in vivo* e *in vitro* e na diferenciação de adipócitos, não são descritos, embora sejam relevantes. Tal abordagem permite a compreensão de efeitos, bem como pode permitir a elucidação de possíveis mecanismos envolvidos em atividades biológicas descritas, assim como foi realizado no presente trabalho.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar o potencial terapêutico do ácido cafeico em protocolos experimentais de indução da obesidade com dieta hipercalórica, bem como sua atividade antiobesidade sobre a diferenciação de adipócitos *in vitro*.

3.2 Objetivos Específicos

- Verificar o efeito do ácido cafeico *in vivo* sobre o metabolismo lipídico, glicêmico e função hepática em modelo de indução e tratamento simultâneo de obesidade por 15 semanas.
- Comparar a atividade *in vivo* do ácido cafeico em modelos de indução da obesidade por dieta usando o tratamento simultâneo e o pós tratamento com o ácido cafeico.
- Avaliar o efeito *in vivo* do ácido cafeico sobre o metabolismo lipídico, glicêmico e função hepática após a indução de obesidade por dieta hipercalórica durante 12 semanas com posterior tratamento no período de 21 dias.
- Avaliar a atividade hipoglicêmica *in vivo* do ácido cafeico em protocolo de Teste Oral de Tolerância a Glicose (TOTG);
- Analisar a citotoxicidade do ácido cafeico em modelo de redução do MTT.
- Determinar o efeito *in vitro* do ácido cafeico sobre a diferenciação de adipócitos e sobre adipócitos maduros.
- Avaliar a atividade antioxidante *in vitro* do ácido cafeico durante a diferenciação de adipócitos e sobre adipócitos maduros.

4 METODOLOGIA

4.1 Ácido Cafeico

O ácido cafeico foi adquirido comercialmente através da Sigma-Aldrich®. Para administração nos camundongos, o mesmo foi solubilizado em 2% de Tween 80.

4.2 Animais

Para a execução dos protocolos experimentais de indução da obesidade por dieta hipercalórica foram utilizados camundongos *swiss* (20-25g), albinos e machos oriundos do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará. Os animais permaneceram acondicionados em gaiolas apropriadas e foram mantidos sob temperatura média de $22^{\circ}\text{C}\pm 3^{\circ}\text{C}$, em ciclo claro/escuro de 12/12 horas, recebendo ração padrão e água à vontade. Antes do início dos protocolos experimentais os animais foram aclimatizados no laboratório de Bioquímica Clínica do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da UFC durante 7 dias.

Todos os protocolos experimentais adotados atenderam os preceitos éticos nacionais e internacionais referente à pesquisa com animais, bem como o referido projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal (CEPA) da Universidade Federal do Ceará com número de protocolo 61/13.

4.3. Dietas

4.3.1 Dieta Padrão (DP)

A dieta padrão utilizada foi a ração comercial Nuvilab (Colombo, PR, Brasil) que possuía de 19,0% de proteína, 56,0% de carboidratos, 3,50% de lipídios, 4,50% de celulose, 5,0% de vitaminas e minerais e 12,0% de umidade com um valor energético de 17,03 kJ/g.

4.3.2 Dieta Hipercalórica (DH)

A ração hipercalórica foi produzida a partir da padronização proposta por Estadella et al. 2004 modificada pelo Prof. Said Gonçalves da Cruz Fonseca, no Laboratório de Farmacotécnica do Departamento de Farmácia da Universidade Federal do Ceará. Os constituintes e quantidades serão apresentados a seguir: 15 g de ração padrão, 10 g de amendoim torrado, 10 g de chocolate ao leite e 5 g de biscoito de maizena, triturados e misturados e armazenados na forma de *pellets*. A composição final da ração foi 20% proteína, 48% de hidratos de carbono, 20% de lípidos, 4% de celulose, e 5% de vitaminas e minerais, em peso, apresentando um teor energético líquido de 21,40 kJ / g.

4.4 Protocolos Experimentais

4.4.1 Grupos experimentais

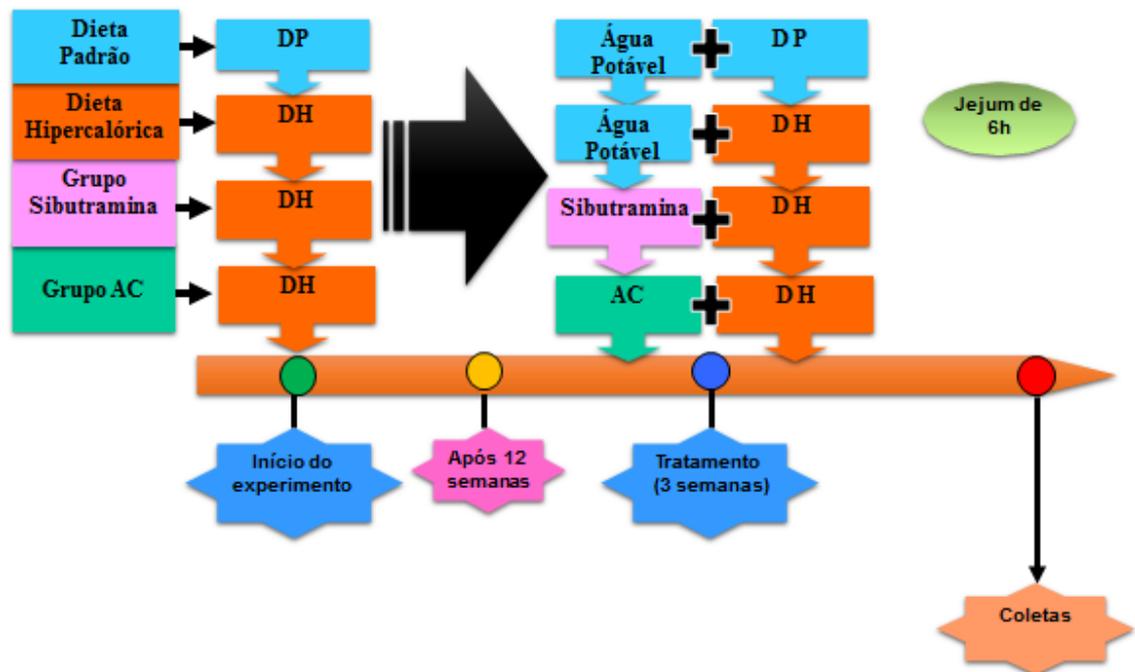
Nos protocolos experimentais de obesidade induzida por dieta hipercalórica, os animais foram divididos em seis grupos:

- Dieta Padrão (DP): animais que ingeriram apenas dieta padrão.
- Dieta Hipercalórica (DH): animais que ingeriram apenas dieta hipercalórica.
- Sibutramina (SIB): animais que ingeriram dieta hipercalórica + sibutramina (10 mg/Kg) por gavagem.
- Ácido Caféico 12,5 (AC12,5): animais que ingeriram dieta hipercalórica + ácido caféico 12,5mg/Kg por gavagem.
- Ácido Caféico (AC 25): animais que ingeriram dieta hipercalórica + ácido caféico 25 mg/Kg por gavagem.
- Ácido Caféico (AC 50): animais que ingeriram dieta hipercalórica + ácido caféico 50mg/Kg por gavagem.

4.4.2 Indução da obesidade por consumo de dieta hipercalórica durante 12 semanas com pós tratamento de 21 dias.

Após o período de aclimatização os animais, pesando entre 20-25g, passaram a receber dieta padrão ou hipercalórica por 15 semanas (Figura 02). Os animais submetidos à ingestão de dieta hipercalórica, após o período de indução de obesidade, foram divididos em 5 grupos compostos por 08 camundongos cada (conforme a média de peso). Os grupos ácido caféico 12,5mg/Kg (AC 12,5), ácido caféico 25mg/Kg (AC 25), ácido caféico 50mg/Kg (AC 50) e SIB(10mg/Kg) receberam tratamento, por gavagem, durante 21 dias (MELO *et al.*,2010).

Figura 02- Delineamento experimental do protocolo de indução da obesidade com dieta hipercalórica e pós tratamento com ácido cafeico



Fonte: modificado de FERREIRA, 2010

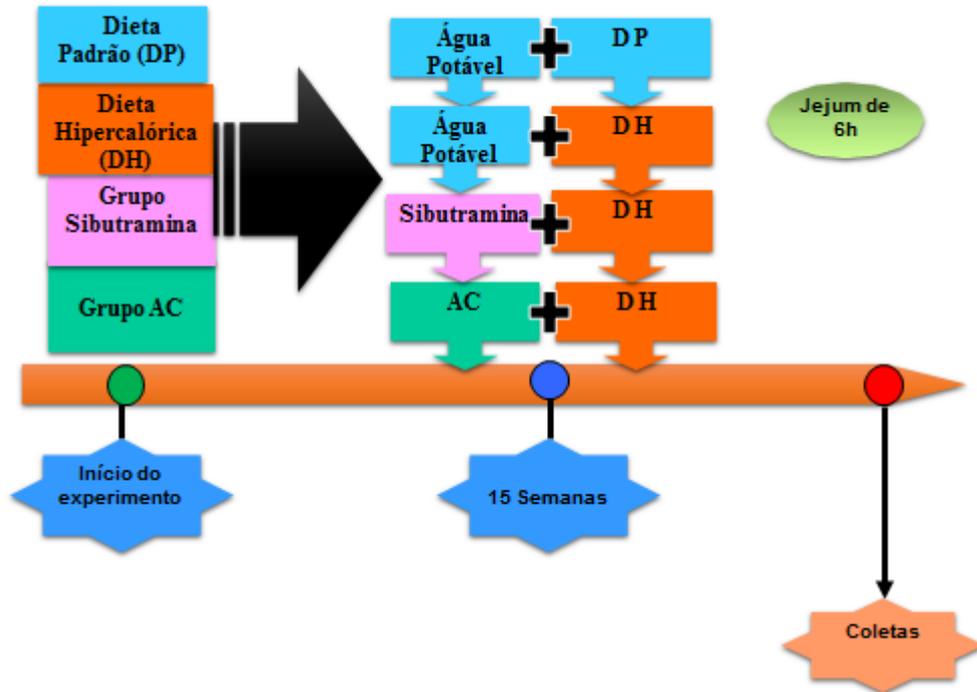
Uma vez por semana, cada grupo de animais foi pesado e o consumo de ração e água medido. Ao final do protocolo, os animais foram submetidos a um jejum de 6h para coleta sanguínea e posterior avaliação dos parâmetros bioquímicos glicose, colesterol total, triglicerídeos, aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT).

4.4.3 Indução da obesidade por consumo de dieta hipercalórica durante 15 semanas com tratamento simultâneo.

Os camundongos *swiss* machos, foram divididos em 6 grupos experimentais (n= 8), dieta padrão (DP), dieta hipercalórica (DH), sibutramina + dieta hipercalórica (SIB), ácido caféico 12,5mg/Kg + dieta hipercalórica (AC 12,5), ácido caféico 25mg/Kg + dieta hipercalórica (AC 25) e ácido caféico 50mg/Kg + dieta hipercalórica (AC 50). Os animais foram distribuídos de acordo com a massa corpórea objetivando uniformidade inicial de peso entre os grupos e foram tratados por gavagem.

A indução da obesidade ocorreu através da submissão de todos os animais a ração hipercalórica descrita durante 15 semanas (Figura 03), exceto os animais do grupo dieta padrão que receberam ração padrão. Simultaneamente à indução da obesidade, os animais foram tratados de acordo com o grupo por um período de 15 semanas. As substâncias nas respectivas doses foram administradas via oral por gavagem. Foi realizado ainda, o acompanhamento semanal do ganho de massa corpórea bem como do consumo de água e ração de todos os grupos em experimentação.

Figura 03- Delineamento experimental do protocolo de Indução da obesidade com dieta hipercalórica e tratamento simultâneo com o ácido cafeico



Fonte: modificado de FERREIRA, 2010

Ao final da 15ª semana, os animais foram submetidos a um jejum de 6h para coleta sanguínea pelo plexo orbital e posterior avaliação dos parâmetros bioquímicos glicose, colesterol total, triglicerídeos, aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT), bem como a determinação dos hormônios insulina e adiponectina. Em seguida, os animais foram eutanasiados e procedeu-se a retirada e pesagem do fígado e gordura abdominal utilizando-se técnicas cirúrgicas adequadas.

4.4.4 Avaliação bioquímica plasmática

Para a determinação das variáveis bioquímicas (glicose, colesterol total, triglicerídeos, alanina aminotransferase e aspartato aminotransferase) a coleta foi realizada pelo plexo orbital e o sangue foi armazenado em microbutos do tipo Ependorff® contendo 20 µL de heparina sódica (5000 UI/mL) diluída de 1:10 em soro fisiológico. As amostras foram centrifugadas a 3500 rpm durante 15 minutos. Em seguida, retirou-se o plasma (sobrenadante) e congelou-o a -20°C para posteriores dosagens, respeitando-se a estabilidade para cada um dos analitos avaliados.

As concentrações de glicose, triglicerídeos e colesterol total foram quantificados por métodos enzimáticos-colorimétricos como descrito nas instruções de uso do fabricante Labtest®.

Os parâmetros alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) foram quantificados por métodos cinéticos-colorimétricos como descrito nas instruções de uso do fabricante Labtest®.

4.4.5 Determinação dos níveis de Adiponectina e Insulina

Para a determinação dos hormônios adiponectina e insulina, a coleta foi realizada em microbutos do tipo Ependorff® contendo 20 µL de heparina sódica (5000 UI/mL) diluída de 1:10 em soro fisiológico. Decorrida meia hora da coleta, as amostras foram centrifugadas a 3500 rpm durante 15 minutos. Em seguida, retirou-se o plasma (sobrenadante) e congelou-o a -80°C para posteriores dosagens, respeitando-se a estabilidade para cada um dos analitos avaliados.

A quantificação desses parâmetros foi realizada através de Kit's imunoenzimáticos (ELISA) da empresa Millipore®.

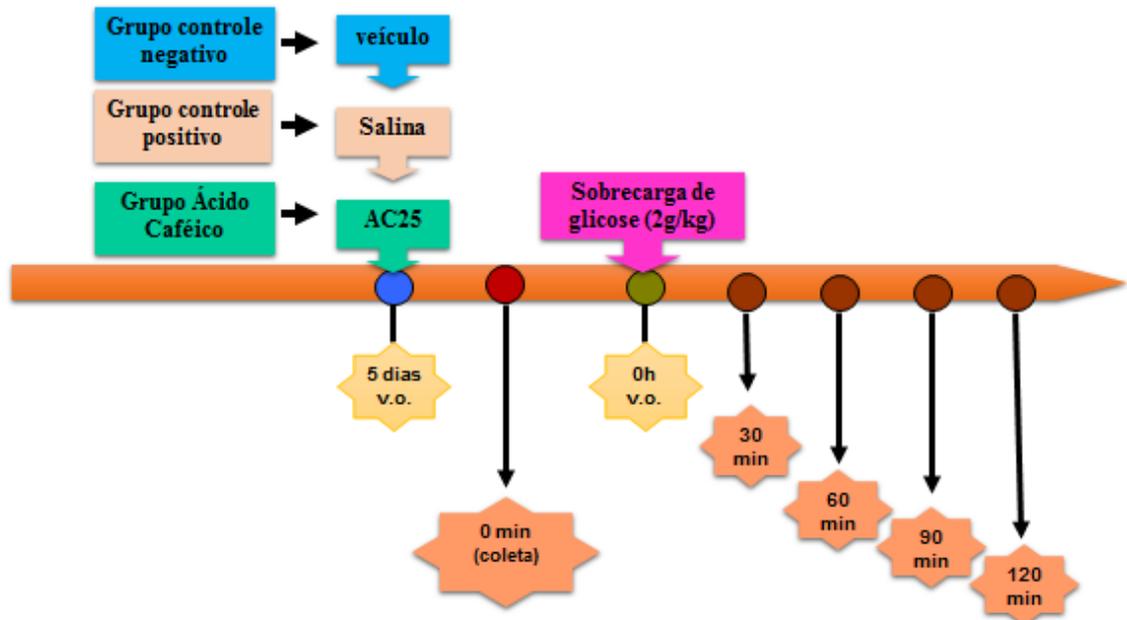
Todos os ELISAS e as análises bioquímicas foram realizadas no Laboratório de Bioquímica Clínica do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem da Universidade Federal do Ceará.

4.4.6 Protocolo de Teste Oral de Tolerância a Glicose (TOTG)

Para realização deste protocolo, os camundongos foram divididos em três grupos (n=8): o primeiro grupo foi formado pelos animais pré-tratados com o veículo (2% Tween 80 em água), mas que não receberam a sobrecarga de glicose (controle negativo), o segundo grupo foi o dos animais que receberam a sobrecarga de glicose e foram pré-tratados com salina (controle positivo) e o terceiro grupo foi dos animais que receberam a sobrecarga de glicose e foram pré-tratados com ácido caféico na concentração de 25 mg/kg (AC25). A dose de 25 mg/kg foi escolhida para o TOTG pois foi a menor dose com efeito hipoglicemiante no modelo de indução da obesidade com dieta hipercalórica e tratamento simultâneo por 15 semanas.

Os camundongos foram pré-tratados durante cinco dias consecutivos, sendo que no quinto dia, após 2 horas do último pré-tratamento e 6 horas de jejum foi realizada a primeira coleta para determinação da glicemia (tempo zero). Em seguida os grupos AC25 e controle positivo receberam uma sobrecarga de glicose via oral (2g/kg). Após 30, 60, 90 e 120 minutos, foram realizadas novas coletas para avaliar a variação dos níveis plasmáticos de glicose (Figura 04) (MELO *et.al.*, 2010).

Figura 04- Delineamento experimental do protocolo de Teste Oral de Tolerância a Glicose



Fonte: modificado de FERREIRA, 2010.

4.4.7 Cultivo Celular de Adipócitos

4.4.7.1 Obtenção das células e condições de cultivo

A linhagem celular de pré-adipócitos 3T3-L1, obtida no banco de células do Rio de Janeiro, foi mantida em meio de cultura DMEM suplementado com 2,5 mM de L-glutamina, 4,5 g/L de glicose, 1,5 g/L de NaHCO_3 e 10% de soro bovino fetal, 100 unidades/mL de penicilina, 100 $\mu\text{g/mL}$ de estreptomicina e 0,25 $\mu\text{g/mL}$ de anfotericina, numa atmosfera modificada com 5% CO_2 , em placas de cultura de poliestireno até atingirem 80% de confluência. Em seguida, o meio de cultura foi removido e as células foram incubadas com 500 μL de solução de tripsina-EDTA durante 5 minutos a 37°C (LIN; DELLA-FERA; BAILE, 2005).

4.4.7.2 Citotoxicidade do ácido cafeico sobre células 3T3-L1

Inicialmente foi realizado o teste de redução do MTT (brometo de 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio) que é amplamente usado na determinação da viabilidade de células em cultivo. O MTT é um sal de tetrazólio de cor amarelada, que é internalizado nas células viáveis por endocitose e reduzido no microambiente intracelular por desidrogenases citoplasmáticas e mitocondriais em um sal de formazan, de cor azul violácea, insolúvel em meio aquoso. Em seguida, deve ser adicionado um agente surfactante para solubilização dos cristais formados. Os produtos finais são lidos por espectrofotometria a 570 nm. Dessa forma, o teste é utilizado como um marcador da capacidade metabólica e viabilidade celular (LIU et al., 1997; MOSMANN, 1983).

Visando avaliar a citotoxicidade do ácido cafeico sobre a linhagem 3T3-L1, as células foram tratadas com diferentes concentrações da substância (1000; 500; 250; 125; 62,5; 31,25 μM) e foram incubadas por 24 horas a 37°C e 5% de CO_2 . Como controle negativo, foi utilizado PBS estéril, pH 7.4. As placas foram centrifugadas a 4000 RPM por 5 min e 100 μL dos sobrenadantes foram removidos. Foi adicionado 10 μL da solução de MTT (Sigma®) a 2,5 mg/mL em PBS e a placa foi incubada por 4 horas a 37°C no escuro e, em seguida, 90 μL de dodecil-sulfato de sódio (SDS) (10% em HCl 0,01N). Após 17 horas de incubação, as placas foram lidas em leitor de placas a 570 nm. As menores concentrações consideradas não tóxicas para as células 3T3-L1 foram utilizadas nos modelos de diferenciação celular.

4.4.7.2.1 Protocolos de diferenciação celular

Após a manutenção e confluência das células, foi iniciado o processo de diferenciação de pré-adipócitos em adipócitos. Para tal, as células foram semeadas em placas de 24 poços (2×10^4 células por poço) até atingirem confluência. Em seguida, foram dissolvidos ao meio de cultura (DMEN) isobutilmetilxantina (IBMX, 0,5 mM), dexametasona (0,25 μM) e insulina (10 $\mu\text{g/mL}$), este dia foi considerado dia 0 do processo de diferenciação. Dois dias após o início da diferenciação, as células voltaram a ser cultivadas em meio de cultura convencional (DMEN). Ao fim de 8 dias de cultura, cerca de 80% das células encontraram-se diferenciadas (LIN; DELLA-FERA; BAILE, 2005).

Para verificar a ação do ácido cafeico no processo de diferenciação dos adipócitos e nos adipócitos já formados, o tratamento com ácido cafeico foi realizado em diferentes períodos da diferenciação celular. Foi realizado o pós-tratamento, que ocorreu durante dois dias a partir do último dia de diferenciação (dia 08) e o co-tratamento que foi realizado com o ácido cafeico a partir do dia 0 da diferenciação. As concentrações utilizadas nos dois protocolos foram de 31,25 e 62,5 μM , selecionadas após ensaio de citotoxicidade com o MTT.

A diferenciação dos pré-adipócitos em adipócitos e a atividade do ácido cafeico sobre esse processo, foi determinada através da quantificação dos lipídios acumulados no interior das células maduras com o corante *oil red O* (SIMONS *et al.*, 2005). Oito dias após o início da diferenciação, o meio de cultura foi removido, as células lavadas com PBS e fixadas com p-formaldeído (4% em PBS) durante 1 h à temperatura ambiente. As células foram então coradas com solução de *oil red O* a 0,3% (m/v) em isopropanol:água destilada (3:2). Após 4 lavagens com água destilada e secagem da placa, as células foram visualizadas e fotografadas ao microscópio (Nikon 50i, Nikon, Japão) com uma ampliação de 200 \times ou 400 \times . Depois disso, o corante foi extraído da célula em 150 μL de isopropanol e mediu-se a absorbância a 492 nm com referência a 650 nm.

4.4.7.2.2 Ensaios por citometria de fluxo

Com o intuito de investigar o potencial do ácido cafeico sobre o desequilíbrio redox causado pela adipogênese, foram avaliadas a produção de espécies reativas de oxigênio e a alteração no potencial transmembrânico mitocondrial. Esses ensaios foram realizados após a diferenciação dos adipócitos com co-tratamento e pós-tratamento com o ácido cafeico e as fluorescências foram comparadas com as encontradas no controle de adipócitos diferenciados sem tratamento.

A intensidade de fluorescência foi medida através de citômetro de fluxo (FACScalibur – Becton Dickinson, São Paulo, SP) equipado com laser de argônio de 15 mW resfriado a ar e operando em 488 nm. Parâmetros como complexidade (Detector lateral de dispersão da luz - SSC) e tamanho (Detector frontal de dispersão da luz - FSC) celular também foram avaliados.

4.4.7.2.3 Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio citoplasmáticas

O princípio do ensaio baseia-se na introdução da sonda não-fluorescente 2',7'-diacetato de diclorofluoresceína (DCFH-DA) no interior das células, provendo um substrato oxidável (DCFH). O DCFH-DA é um composto estável não-fluorescente lipofílico que facilmente atravessa a membrana das células. Dentro da célula, enzimas citosólicas (esterases) desacetilam o DCFH-DA para formar a 2',7'-diclorofluoresceína (DCFH) a qual, devido a sua polaridade, fica confinada no citoplasma. Espécies reativas de oxigênio geradas oxidam o DCFH formando a 2',7'-diclorofluoresceína oxidada (DCFoxi), que possui fluorescência verde, com emissão em 510-530 nm. A fluorescência verde produzida pela formação de DCFoxi é proporcional à concentração citoplasmática de espécies reativas de oxigênio. Desta forma a intensidade da fluorescência intracelular se torna uma medida dos metabólitos oxidativos produzidos pelas células (BASS *et al.*, 1983).

Após a diferenciação e os tratamentos com o ácido cafeico, foi adicionado 5µL (concentração final 100 µM) da solução estoque aos poços da placa de 24 poços contendo as células em cultivo 24 horas antes da leitura no citômetro (BASS *et al.*, 1986). Ao término das 24 horas, as amostras foram lavadas com PBS, tripsinizadas e o pellet de células processado em citômetro de fluxo. Assim, a média de intensidade de fluorescência relativa produzida durante a explosão respiratória pela oxidação do DCFH foi coletada através do filtro de fluorescência verde (FL1).

4.4.7.2.4 Análise do Potencial Transmembrânico Mitocondrial

Para a análise do potencial de membrana mitocondrial foi utilizado o corante Rodamina 123 (Rho123) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) o qual é um corante específico para a marcação mitocondrial em células vivas. O fato de ser um fluorocromo catiônico (carregado positivamente) permite que seja atraído pelo elevado potencial elétrico negativo presente na membrana mitocondrial, incorporando-se no interior das organelas, emitindo fluorescência vermelha. Alterações ao nível da integridade mitocondrial (potencial transmembrânico) podem ser detectados em ensaios de citometria de fluxo por aumento da fluorescência verde citosólica em detrimento da vermelha mitocondrial, indicando uma difusão da Rho123 da

mitocôndria para o citosol em células danificadas (JOHNSON *et al.*, 1980). Sendo assim, o fluorocromo Rodamina 123 liga-se às membranas mitocondriais e inibe o transporte de elétrons, retardando a respiração celular. A intensidade de fluorescência relativa produzida pela marcação de mitocôndrias ativas foi coletada através do filtro de fluorescência vermelha (FL2).

Após o processo de diferenciação dos adipócitos com co e pós-tratamento, as amostras foram lavadas com PBS, tripsinizadas e o *pellet* de células marcado com Rodamina 123 (concentração final de 10 µg/ mL) 30 minutos antes da leitura no citômetro de fluxo.

4.4.8 Análise estatística

Os resultados foram expressos como média ± erro padrão médio (EPM). As diferenças entre os grupos foram analisadas utilizando a Análise de Variância (ANOVA) seguida do teste de Tukey considerando-se significativo um $p < 0,05$. Utilizou-se o programa estatístico software GraphPad Prism 6.0.

5 RESULTADOS

Foram realizados dois modelos de obesidade *in vivo* induzidos por dieta hipercalórica. Em um deles, o tratamento com o ácido cafeico e sibutramina foi concomitante a indução da obesidade e, no outro, a administração das substâncias descritas foi realizada apenas após a constatação que os animais encontravam-se obesos.

Assim como, foram realizados, dois protocolos *in vitro* de diferenciação de pré-adipócitos (3T3-L1) em adipócitos. No primeiro, o tratamento das células com o ácido cafeico foi feito de forma concomitante ao processo de diferenciação e, no segundo, foi feito somente após o período de diferenciação.

5.1 Efeito do ácido cafeico em protocolo de indução e tratamento de obesidade por 15 semanas

A obesidade foi induzida pela ingestão de dieta hipercalórica, uma vez que observou-se, após 15 semanas, um aumento de 23,73% no peso corporal dos animais do grupo dieta hipercalórica (DH) ($45,50 \pm 1,40$ g) e em relação ao grupo dieta padrão (DP) ($36,88 \pm 0,35$ g) (Tabela 01). Os animais tratados com ácido cafeico de forma simultânea a indução tiveram redução significativa do seu peso ($p < 0,05$) nas doses de 25 (AC 25) ($40,89 \pm 0,99$ g) e 50 mg/Kg (AC 50) ($40,08 \pm 0,74$ g), em 10,13% e 11,91%, respectivamente, quando comparados ao grupo DH ($45,50 \pm 1,40$ g).

A relação da gordura abdominal com o peso corporal dos animais do grupo DH ($484,40 \pm 71,15$ mg/10 g de peso corporal) teve um aumento significativo em relação ao grupo DP ($236,29 \pm 19,73$ mg/10 g de peso corporal) e o ácido cafeico nas 3 doses estudadas foi capaz de diminuir esta relação em até 59,82% no grupo AC25 ($195,60 \pm 27,96$ g/10 g de peso corporal) quando comparado ao grupo DP, redução maior que a observada nos animais tratados com sibutramina ($269,40 \pm 40,19$ mg/10 g de peso corporal) que reduziu 44,38% essa relação (Tabela 01).

Foram avaliados parâmetros da função hepática AST e ALT, entretanto não houve diferença estatística entre os controles que ingeriram dieta padrão e dieta hipercalórica na atividade plasmática de ALT, mas o ácido cafeico nas doses de 25 ($10,78 \pm 0,96$ U/L) e 50mg/Kg ($11,7 \pm 0,97$ U/L) apresentou valores significativamente menores deste marcador quando comparado aos grupos controle. A ingestão de

alimentos está reduzida significativamente no grupo DP ($38,91 \pm 0,23$ g/semana) quando comparado ao DH ($35,84 \pm 0,24$ g/semana). A relação do peso do fígado com o peso corporal do animal, a atividade da AST plasmáticas e o consumo de água não apresentaram diferença ($p < 0,05$) entre os grupos (Tabela 01).

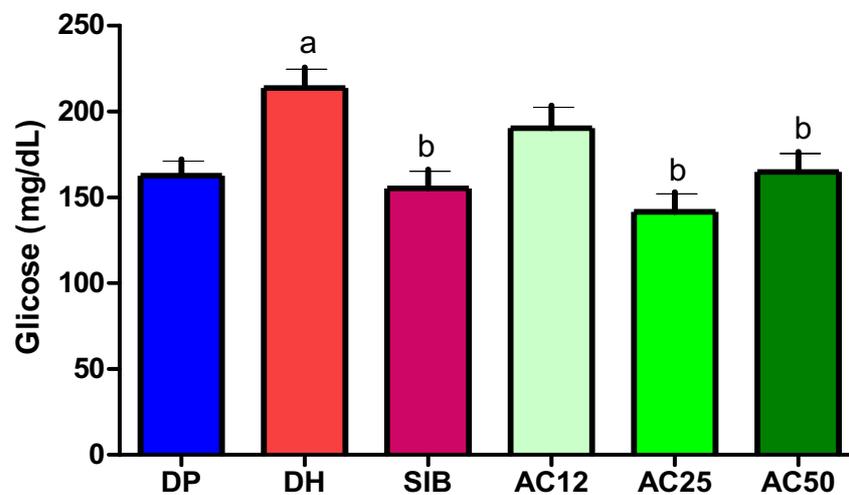
Tabela 01. Efeitos do tratamento com ácido cafeico nos pesos corporais iniciais e finais, na ingestão de água e alimentos, relação peso e gordura abdominal e fígado, e níveis plasmáticos de ALT e AST em camundongos alimentados com dietas normal ou hipercalórica por 15 semanas

Grupos Experimentais	DP	DH	SIB	AC12,5	AC25	AC50
Pesos iniciais (g)	25,29 ± 0,63	25,53 ± 0,50	25,60 ± 0,59	25,67 ± 0,46	25,20 ± 0,31	25,33 ± 0,50
Pesos finais (g)	36,88 ± 0,35	45,50 ± 1,40 ^a	41,33 ± 0,61 ^{a,b}	43,91 ± 1,20 ^a	40,89 ± 0,99 ^b	40,08 ± 0,74 ^b
Ingestão de alimentos (g/semana)	38,91 ± 0,23	35,84 ± 0,24 ^a	37,67 ± 0,84	35,44 ± 0,42 ^a	37,62 ± 0,48	36,73 ± 0,78
Ingestão de água (mL/semana)	40,35 ± 2,45	37,97 ± 0,93	42,31 ± 1,34	34,06 ± 1,43	41,57 ± 0,68	35,21 ± 0,94
Gordura abdominal (mg/10 g de peso corporal)	236,29 ± 19,73	484,40 ± 71,15 ^a	269,40 ± 40,19 ^b	235,30 ± 44,07 ^b	195,60 ± 27,96 ^b	254,10 ± 55,77 ^b
Peso do fígado (mg/10 g de peso corporal)	396,50 ± 16,69	398,40 ± 12,78	387,80 ± 33,57	337,70 ± 25,40	382,00 ± 15,68	395,6 ± 19,72
ALT (U/L)	16,82 ± 1,05	17,67 ± 1,58	10,88 ± 1,45	12,63 ± 1,37	10,78 ± 0,96 ^{a,b}	11,7 ± 0,97 ^{a,b}
AST (U/L)	55,18 ± 3,30	62,27 ± 3,71	60,50 ± 3,55	56,33 ± 4,30	58,7 ± 3,98	51,8 ± 3,72

Efeito do Ácido Cafeico (AC 12,5, AC25 e AC50) sobre a obesidade induzida por dieta hipercalórica e após tratamento por 15 semanas. DP: dieta padrão; DH: dieta hipercalórica; SIB: dieta hipercalórica e Sibutramina 10mg/kg; AC 12,5: dieta hipercalórica e ácido cafeico 12,5mg/kg; AC 25: dieta hipercalórica e ácido cafeico 25mg/kg; AC 50: dieta hipercalórica e ácido cafeico 50mg/kg. ^a: p<0,05 em relação ao grupo DP; ^b: p<0,05 em relação ao grupo DH. Os resultados estão expressos como média ± E.P.M. (ANOVA- Turkey).

Na figura 05, observa-se a glicemia dos grupos e verificou-se que houve uma elevação deste parâmetro no grupo DH ($213,8 \pm 11,81 \text{ mg/dL}$) em relação ao DP ($162,7 \pm 9,52 \text{ mg/dL}$) e que os grupos tratados com sibutramina ($155,3 \pm 11,01 \text{ mg/dL}$), com o ácido cafeico nas doses de 25 ($141,5 \pm 11,50 \text{ mg/dL}$) e 50 mg/Kg ($164,7 \pm 11,85 \text{ mg/dL}$) demonstraram redução significativa dos níveis glicêmicos quando comparados à DH.

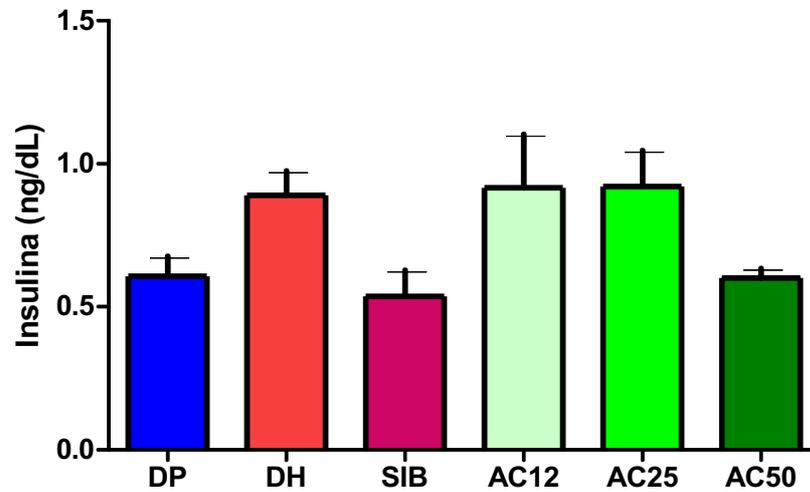
Figura 05. Efeito do Ácido Cafeico sobre a glicemia em modelo de indução da obesidade e tratamento por 15 semanas.



DP: dieta padrão; DH: dieta hipercalórica; SIB: dieta hipercalórica e Sibutramina 10mg/kg; AC 12,5: dieta hipercalórica e ácido cafeico 12,5mg/kg; AC 25: dieta hipercalórica e ácido cafeico 25mg/kg; AC 50: dieta hipercalórica e ácido cafeico 50mg/kg. **a**: $p < 0,05$ em relação ao grupo DP; **b**: $p < 0,05$ em relação ao grupo DH. Os resultados estão expressos como média \pm E.P.M. (ANOVA- Turkey).

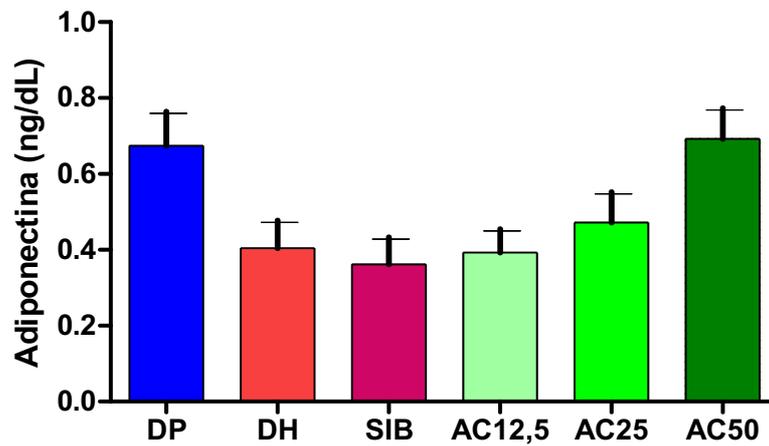
Realizou-se a determinação das concentrações de insulina (Figura 06) e de adiponectina (Figura 07). Os resultados encontrados para estes parâmetros não apresentaram diferença significativa entre os grupos.

Figura 06. Efeito do Ácido Cafeico sobre as concentrações plasmáticas de insulina em modelo de indução da obesidade e tratamento por 15 semanas.



DP: dieta padrão; DH: dieta hipercalórica; SIB: dieta hipercalórica e Sibutramina 10mg/kg; AC 12,5: dieta hipercalórica e ácido cafeico 12,5mg/kg; AC 25: dieta hipercalórica e ácido cafeico 25mg/kg; AC 50: dieta hipercalórica e ácido cafeico 50mg/kg. Os resultados estão expressos como média \pm E.P.M. (ANOVA- Turkey).

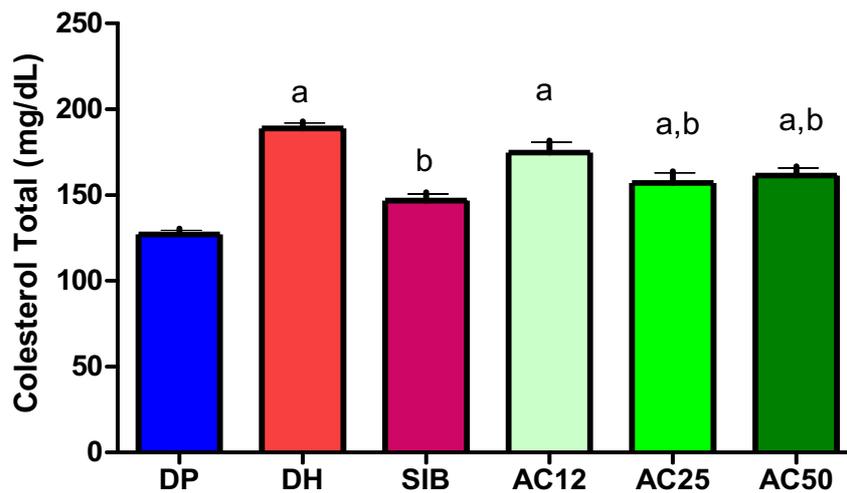
Figura 07. Efeito do Ácido Cafeico sobre as concentrações plasmáticas de adiponectina em modelo de indução da obesidade e tratamento por 15 semanas.



DP: dieta padrão; DH: dieta hipercalórica; SIB: dieta hipercalórica e Sibutramina 10mg/kg; AC 12,5: dieta hipercalórica e ácido cafeico 12,5mg/kg; AC 25: dieta hipercalórica e ácido cafeico 25mg/kg; AC 50: dieta hipercalórica e ácido cafeico 50mg/kg. Os resultados estão expressos como média \pm E.P.M. (ANOVA- Turkey).

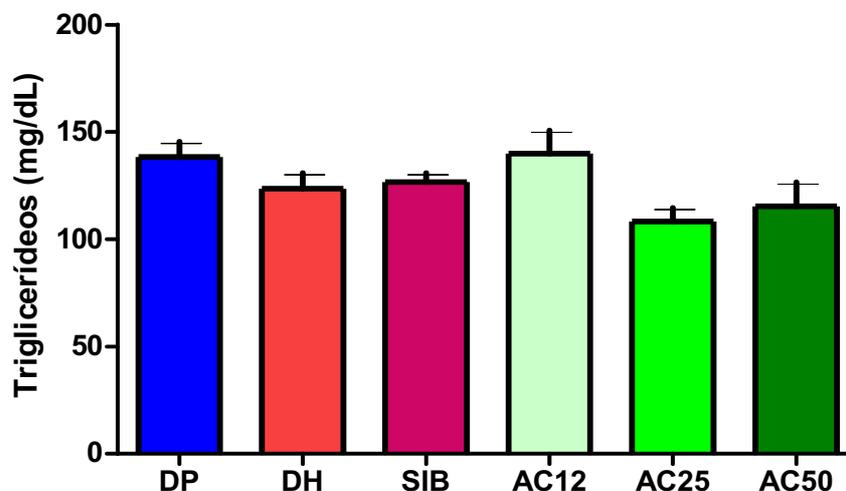
Verificaram-se níveis elevados de colesterol total após a indução da obesidade por dieta hipercalórica, uma vez que os grupos DP ($127,0 \pm 3,34$ mg/dL) e DH ($188,8 \pm 4,21$ mg/dL) apresentaram uma diferença significativa ($p < 0,05$), correspondendo a uma elevação de 48,66% no grupo DH. O tratamento concomitante com o ácido cafeico nas doses de 25 ($156,9 \pm 6,97$ mg/dL) e 50 mg/Kg ($161,3 \pm 5,44$ mg/dL), assim como a sibutramina ($146,6 \pm 4,86$ mg/dL) reduziram significativamente esse parâmetro comparado com o grupo DH (Figura 08). Foram determinados ainda os níveis plasmáticos de triglicerídeos, entretanto não foi observada diferença significativa entre os grupos (Figura 09)

Figura 08. Efeito do Ácido Cafeico sobre as concentrações plasmáticas de colesterol total em modelo de indução da obesidade e tratamento por 15 semanas.



DP: dieta padrão; DH: dieta hipercalórica; SIB: dieta hipercalórica e Sibutramina 10mg/kg; AC 12,5: dieta hipercalórica e ácido cafeico 12,5mg/kg; AC 25: dieta hipercalórica e ácido cafeico 25mg/kg; AC 50: dieta hipercalórica e ácido cafeico 50mg/kg. **a**: $p < 0,05$ em relação ao grupo DP; **b**: $p < 0,05$ em relação ao grupo DH. Os resultados estão expressos como média \pm E.P.M. (ANOVA- Turkey).

Figura 09. Efeito do Ácido Cafeico sobre as concentrações plasmáticas de triglicerídeos em modelo de indução da obesidade e tratamento por 15 semanas.



DP: dieta padrão; DH: dieta hipercalórica; SIB: dieta hipercalórica e Sibutramina 10mg/kg; AC 12,5: dieta hipercalórica e ácido cafeico 12,5mg/kg; AC 25: dieta hipercalórica e ácido cafeico 25mg/kg; AC 50: dieta hipercalórica e ácido cafeico 50mg/kg. Os resultados estão expressos como média \pm E.P.M. (ANOVA- Turkey).

5.2 Efeito do ácido cafeico após de indução da obesidade por dieta hipercalórica durante 12 semanas e pós tratamento de 21 dias

No protocolo de obesidade induzida por dieta hipercalórica em que foi realizado o pós tratamento, também foi induzida a obesidade demonstrada pelo aumento de 22,36% no peso dos animais do grupo DH em relação ao DP após as 12 semanas de indução. Neste protocolo apenas a maior dose de ácido cafeico (50 mg/Kg) foi capaz de reduzir de forma significativa o peso dos animais (11,37%) (Tabela 02).

Realizou-se também a relação da gordura abdominal com o peso corporal, onde no grupo DH ($484,40 \pm 71,15$ mg/10 g de peso corporal) observou-se uma elevação significativa quando comparado ao DP ($236,29 \pm 19,73$ mg/10 g de peso corporal) (Tabela 02). Assim como no tratamento concomitante, os tratamentos com ácido cafeico e sibutramina após a indução da obesidade reduziram significativamente essa relação nas três doses de AC apresentando uma redução de 59,33% no grupo AC50 ($197,00 \pm 26,23$ mg/10 g de peso corporal), maior que a diminuição 39,57% encontrada no grupo sibutramina ($292,7 \pm 32,17$ mg/10 g de peso corporal).

Em relação a função hepática, foram verificadas as atividades das enzimas AST e ALT, bem como a relação entre o peso do fígado e o peso corporal dos animais.

Entretanto não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos experimentais nos parâmetros descritos.

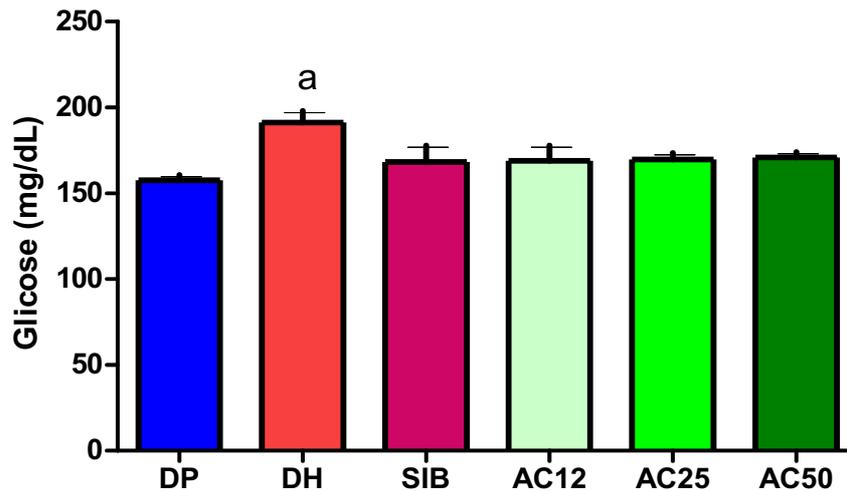
Tabela 02. Efeitos do tratamento com ácido cafeico nos pesos corporais iniciais e finais, na ingestão de água e alimentos, relação pesos e gordura abdominal e fígado, e níveis séricos de ALT e AST em camundongos alimentados com dietas experimentais por 12 semanas e posteriormente tratado com o ácido cafeico por 21 dias.

Grupos Experimentais	DP	DH	SIB	AC12,5	AC25	AC50
Pesos iniciais (g)(antes do tratamento)	40,86± 0,98	50,00 ± 1,45 ^a	50,00 ± 2,20 ^a	49,13 ± 1,83 ^a	49,88 ± 2,02 ^a	49,50 ± 2,10 ^a
Pesos finais (g) (depois do tratamento)	41,57 ± 0,97	50,13 ± 1,64 ^a	45,14 ± 1,81	46,00 ± 0,81	46,00± 0,44	44,43 ± 1,08 ^b
Ingestão de alimentos (g/semana)	304,90± 1,56	295,50± 4,15	275,20± 15,39	286,70± 0,81	324,80± 8,47	297,60± 0,27
Ingestão de água (mL/semana)	478,10± 3,51	401,50± 13,80 ^a	391,50± 6,02 ^a	373,30± 13,32 ^a	436,10± 3,92 ^a	408,00± 5,84 ^a
Gordura abdominal (mg/10 g de peso corporal)	236,29 ± 19,73	484,40± 71,15 ^a	292,7± 32,17 ^b	264,3± 45,34 ^b	290,20± 35,00 ^b	197,00± 26,23 ^b
Peso do fígado (mg/10 g de peso corporal)	396,50± 16,69	398,30± 10,43	388,70± 21,60	370,00± 8,76	402,30± 11,78	384,50± 14,10
ALT (U/L)	37,33 ± 2,60	38,17 ± 5,02	35,33 ± 2,91	26,00 ± 2,42	33,17 ± 3,10	35,17 ± 4,15
AST(U/L)	94,86 ± 8,55	95,29 ± 4,57	97,14 ± 13,05	87,43 ± 1,98	95,14 ± 4,55	95,57 ± 7,82

Efeito do Ácido Cafeico (AC 12,5, AC25 e AC50) sobre a obesidade induzida por dieta hipercalórica por 12 semanas, com pós tratamento de 21 dias . DP: dieta padrão; DH: dieta hipercalórica; SIB: dieta hipercalórica e Sibutramina 10mg/kg; AC 12,5: dieta hipercalórica e ácido cafeico 12,5mg/kg; AC 25: dieta hipercalórica e ácido cafeico 25mg/kg ; AC 50: dieta hipercalórica e ácido cafeico 50mg/kg. **a:** p<0,05 em relação ao grupo DP; **b:** p<0,05 em relação ao grupo DH. Os resultados estão expressos como média ± E.P.M. (ANOVA- Turkey).

Quanto a glicemia, assim como no protocolo de tratamento simultâneo, no modelo de pós tratamento foi observado um aumento da glicemia no grupo DH se comparado ao DP (Figura 10). No entanto, o pós tratamento com a sibutramina e com o ácido cafeico nas diferentes doses não reduziu este parâmetro significativamente.

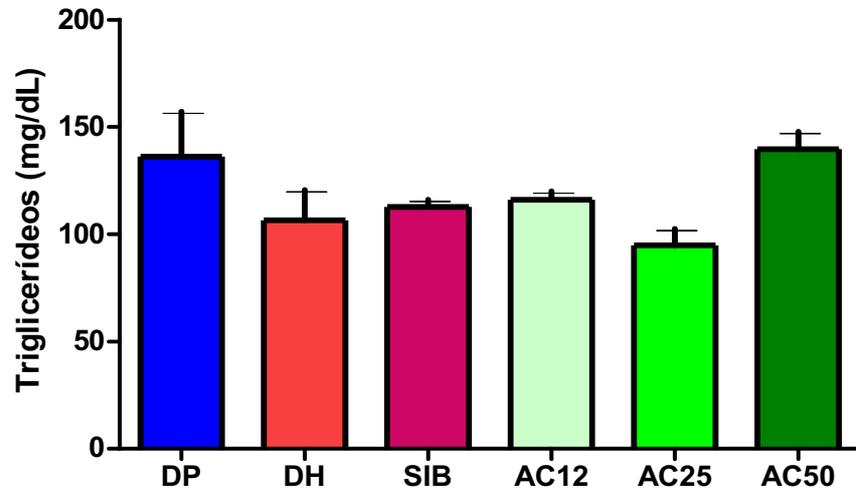
Figura 10. Efeito do Ácido Cafeico sobre a glicemia em modelo de indução da obesidade por 12 semanas e pós tratamento de 21 dias.



DP: dieta padrão; DH: dieta hipercalórica; SIB: dieta hipercalórica e Sibutramina 10mg/kg; AC 12,5: dieta hipercalórica e ácido cafeico 12,5mg/kg; AC 25: dieta hipercalórica e ácido cafeico 25mg/kg; AC 50: dieta hipercalórica e ácido cafeico 50mg/kg. **a**: $p < 0,05$ em relação ao grupo DP; **b**: $p < 0,05$ em relação ao grupo DH. Os resultados estão expressos como média \pm E.P.M. (ANOVA- Turkey).

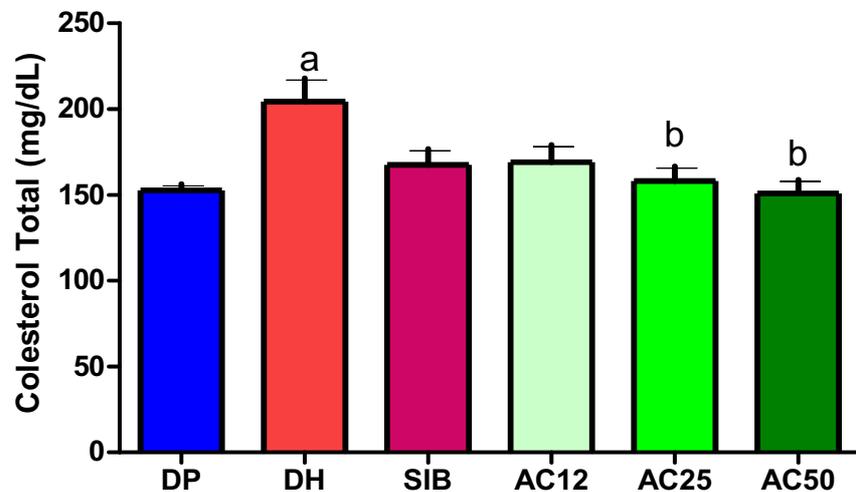
Em relação ao perfil lipídico, não foi observada diferença significativa das concentrações plasmáticas de triglicerídeos entre os grupos (Figura 11). Já o colesterol total foi aumentado ($p < 0,05$) no grupo DH quando comparado ao DP, e os grupos AC 25 e AC 50 demonstraram redução significativa deste parâmetro (Figura 12).

Figura 11. Efeito do Ácido Cafeico sobre os triglicerídeos em modelo de indução da obesidade por 12 semanas e pós tratamento por 21 dias.



DP: dieta padrão; DH: dieta hipercalórica; SIB: dieta hipercalórica e Sibutramina 10mg/kg; AC 12,5: dieta hipercalórica e ácido cafeico 12,5mg/kg; AC 25: dieta hipercalórica e ácido cafeico 25mg/kg; AC 50: dieta hipercalórica e ácido cafeico 50mg/kg. **a**: $p < 0,05$ em relação ao grupo DP; **b**: $p < 0,05$ em relação ao grupo DH. Os resultados estão expressos como média \pm E.P.M. (ANOVA- Turkey).

Figura 12. Efeito do Ácido Cafeico sobre o colesterol total em modelo de indução da obesidade por 12 semanas e pós tratamento por 21 dias.



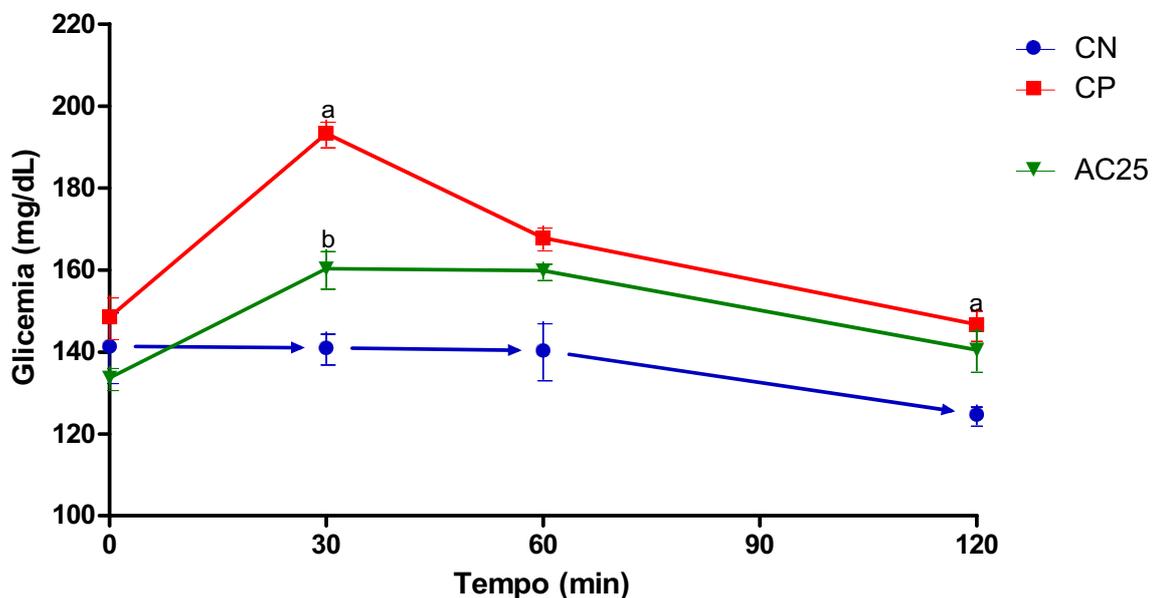
DP: dieta padrão; DH: dieta hipercalórica; SIB: dieta hipercalórica e Sibutramina 10mg/kg; AC 12,5: dieta hipercalórica e ácido cafeico 12,5mg/kg; AC 25: dieta hipercalórica e ácido cafeico 25mg/kg; AC 50: dieta hipercalórica e ácido cafeico 50mg/kg. **a**: $p < 0,05$ em relação ao grupo DP; **b**: $p < 0,05$ em relação ao grupo DH. Os resultados estão expressos como média \pm E.P.M. (ANOVA- Turkey).

5.3 Efeito do ácido cafeico em protocolo de Teste Oral de Tolerância a Glicose (TOTG)

Para verificar a atividade do ácido cafeico sobre a glicemia em protocolo de teste oral de tolerância a glicose, utilizou-se apenas a dose de 25mg/Kg (AC25), pois esta foi a menor dose com efeito hipoglicêmico no protocolo de obesidade com indução e tratamento simultâneo.

Observou-se neste protocolo que no tempo zero não houve diferença estatística entre os grupos. Após 30 minutos da sobrecarga, observou-se que o grupo pré-tratado com ácido cafeico (25mg/kg) impediu de forma significativa o aumento da glicemia comparado ao grupo controle positivo (CP). Nos tempos de 60, 90 e 120 minutos o grupo tratado com o ácido cafeico não apresentou diferença nos seus níveis plasmáticos de glicose quando comprado aos grupos controle (Figura 13).

Figura 13. Efeito do ácido cafeico sobre a glicemia em protocolo de Teste Oral de Tolerância a Glicose.

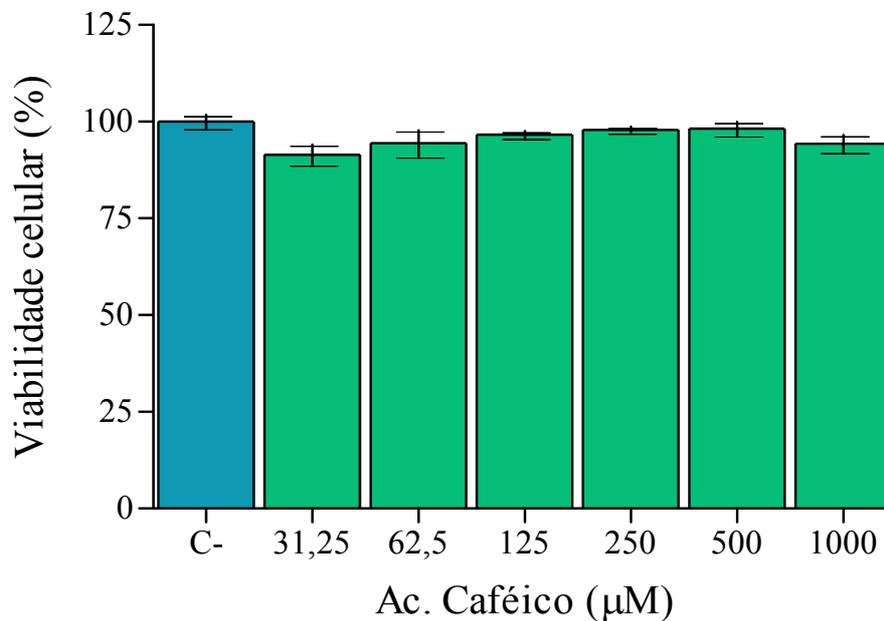


Os resultados dos grupos experimentais (n=8) estão expressos como média \pm E.P.M, sendo que (—) = animais que receberam salina e que não receberam glicose oral (Controle Negativo); (—) = animais que receberam salina e a sobrecarga de glicose oral (Controle Positivo); (—) = animais que foram pré-tratados com AC (25 mg/kg) e que receberam a sobrecarga de glicose oral, **a**: $p < 0,05$ em relação ao grupo DP; **b**: $p < 0,05$ em relação ao grupo DH (ANOVA- Turkey).

5.4 Efeito do ácido cafeico em ensaios *in vitro* de citotoxicidade

Para a realização dos modelos *in vitro*, inicialmente, foi feito um ensaio de viabilidade celular com o MTT, onde não foi observada toxicidade significativa do ácido cafeico na linhagem celular 3T3-L1 nas concentrações estudadas, assim, as duas menores concentrações utilizadas foram escolhidas para os demais estudos *in vitro* (Figura14).

Figura 14: Citotoxicidade do ácido cafeico no ensaio de redução do MTT.



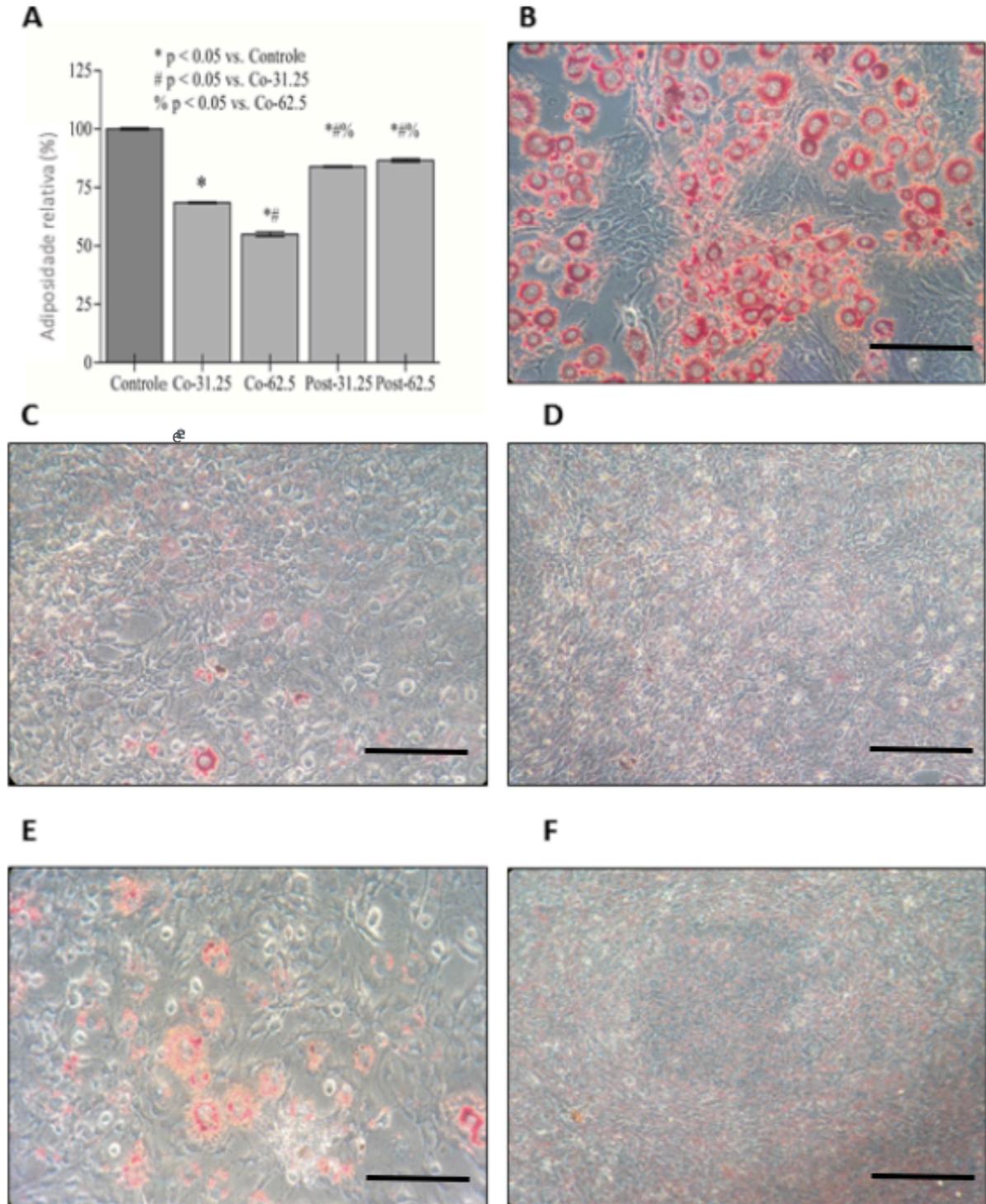
Os resultados são apresentados como média \pm EPM. $P < 0,05$ em comparação com o grupo controle.

5.5 Efeito do ácido cafeico em modelos experimentais *in vitro* de diferenciação de pré-adipócitos em adipócitos

Nos ensaios *in vitro*, foi verificada a capacidade do ácido cafeico de reduzir o acúmulo de lipídios relacionados à diferenciação dos pré-adipócitos 3T3-L1 em adipócitos. Neste protocolo, foram avaliadas também a redução da produção de espécies reativas de oxigênio e a alteração do potencial mitocondrial transmembranar.

Para verificar a influência do ácido cafeico no acúmulo de lipídeos durante a diferenciação de pré-adipócitos 3T3 L1 em adipócitos, foi usada a coloração com Oil Red O e a leitura de suas absorbâncias. Após o protocolo com tratamento concomitante e pós tratamento com o ácido cafeico, foi evidenciada uma redução significativa na quantidade de lipídeos formados nas duas concentrações aplicadas e nos dois protocolos quando comparados a um controle, obtendo-se melhor resultado no tratamento concomitante nas duas concentrações estudadas. (Figura 15).

Figura 15: Avaliação do acúmulo de lipídios após diferenciação de adipócitos usando Oil Red O. Barras de escala correspondem a 50 μ m.

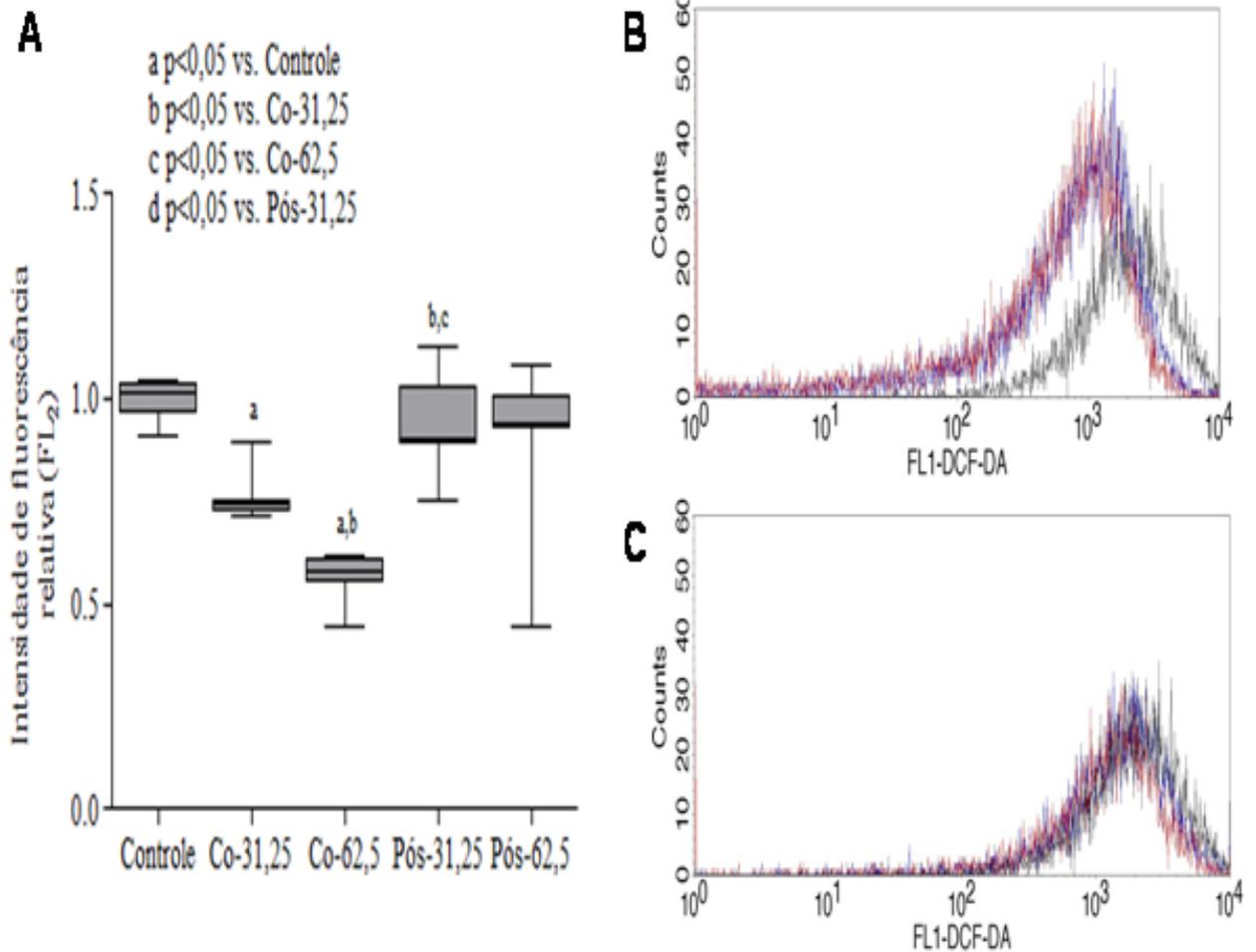


(A) Redução da adiposidade comparada entre os grupos. O resultado é expresso em porcentagem relativa à absorvância, os resultados são apresentados como média \pm E.P.M. $P < 0,05$ em comparação com o grupo controle. (B) Adipócitos diferenciados sem tratamento (C) Co-tratamento com ácido cafeico 31,25 μ M, (D) Co-tratamento com ácido cafeico 62,5 μ M, (E) Pós-tratamento com ácido cafeico 31,25 μ M, (F) Pós-tratamento com ácido cafeico 62,5 μ M. Microscópio Olympus TM, 400 \times de ampliação.

Nos protocolos de respiração celular, como mostrado na Figura 16, observou-se após o ensaio com DCF-DA que o ácido cafeico provoca uma diminuição na formação de espécies reativas de oxigênio citoplasmáticas associadas à adipogênese. De acordo com os resultados demonstrados, verificou-se nas 2 concentrações estudadas uma redução significativa na produção de espécies reativas de oxigênio em relação ao controle no protocolo em que o tratamento com ácido cafeico foi feito de forma concomitante com o processo de diferenciação do pré-adipócito em adipócito.

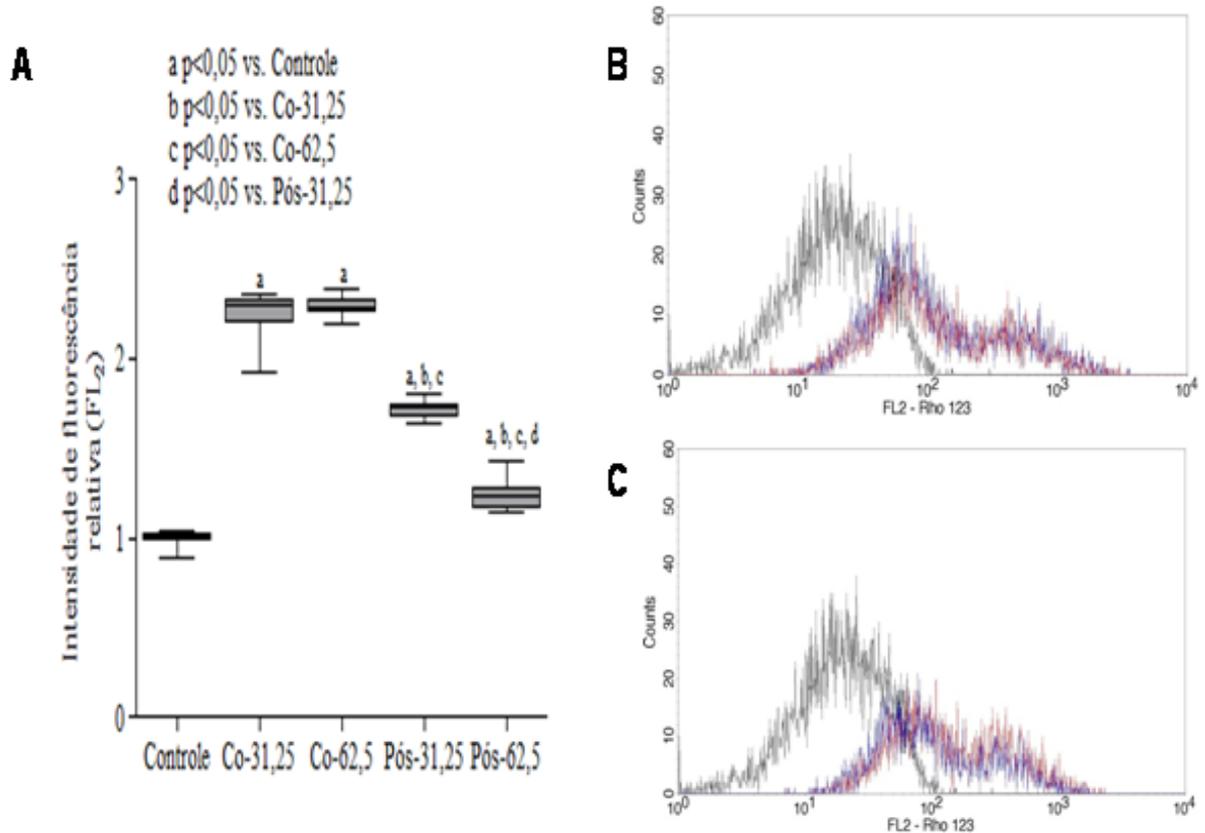
Além disso, foi realizada a análise do potencial transmembrânico mitocondrial em ensaio usando a rodamina (Figura 17). A rodamina é um fluorocromo específico para marcação da membrana mitocondrial de células vivas. Por apresentar uma carga positiva, possui afinidade pelo potencial eletronegativo da membrana mitocondrial, sendo incorporado pela organela. O aumento da fluorescência verde da rodamina ocorre quando existem alterações na membrana mitocondrial que aumentam a passagem da rodamina da mitocondrial para o citoplasma celular. Neste protocolo, observou-se que o tratamento com ácido cafeico melhorou o estresse causado nas mitocôndrias pelo processo de diferenciação dos adipócitos, uma vez que observou-se um aumento significativo da rodamina ligada a mitocôndria celular nos dois modelos usados e nas duas concentrações analisadas.

Figura16. Análise do efeito do ácido cafeico sobre a produção de espécies reativas de oxigênio por citometria de fluxo.



(A) Ácido cafeico reduzindo a produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) por ensaio de DCF-DA. (B) Análise de histograma de EROS representativas em população de células tratadas com ácido cafeico respectivamente 31,25 μM (linha azul) e 62,5 μM (linha vermelha) em co-tratamento. (C) Análise de histograma de EROS representativas na população celular tratada com ácido cafeico respectivamente 31,25 μM e 62,5 μM na análise do potencial transmembrânico mitocondrial pós-tratamento. Os dados expressos como taxa de fluorescência em relação ao controle \pm E.P.M. **a** p <0,05 vs. Controle. **b** p <0,05 vs. Co-31,25. **c** p <0,05 vs. Co-62,5. **d** p <0,05 vs. Pós-31,5.

Figura 17. Análise do efeito do ácido cafeico sobre o potencial transmembrânico mitocondrial por citometria de fluxo.



(A) Avaliação do potencial transmembrânico mitocondrial por ensaio com rodamina 123. (B) Análise histograma do potencial transmembrânico mitocondrial representativo em população celular tratada com ácido cafeico respectivamente 31,25 μM (linha azul) e 62,5 μM (linha vermelha) em co-tratamento. (C) Análise histogramática do potencial transmembrânico mitocondrial representativo na população celular tratada com ácido cafeico respectivamente 31,25 μM e 62,5 μM no pós-tratamento. Os dados expressos como taxa de fluorescência em relação ao controle. **a** $P < 0,05$ vs. Controle. **b** $P < 0,05$ vs. Co-31,25. **c** $P < 0,05$ vs. Co-62,5. **d** $P < 0,05$ vs. Pós-31,5.

6 DISCUSSÃO

A obesidade é uma doença metabólica crônica que é caracterizada pelo aumento da gordura corporal e acúmulo de lipídios no sangue (LIAO *et al.*, 2013). Existem várias causas para a obesidade, uma vez que observa-se uma interação entre fatores genéticos e ambientais, como o aumento da ingestão de gordura e calorias na dieta associada à reduzida prática de atividades físicas (ROSINI; SILVA; MORAIS, 2012).

A origem da obesidade é complexa, diversos fatores são responsabilizados pelo seu surgimento, especialmente a ingestão hipercalórica. Neste contexto, existem diversos protocolos experimentais, sendo a obesidade induzida por dieta hipercalórica o modelo mais relevante em relação à obesidade humana, pois os camundongos obesos desenvolvem distúrbios metabólicos tais como intolerância à glicose, hiperinsulinemia e hiperleptinemia, achados comumente relacionadas à obesidade humana (NASCIMENTO *et al.*, 2011).

Para induzir a obesidade *in vivo*, podem ser utilizados vários modelos experimentais, dentre os mais realizados estão os modelos de indução de obesidade por dietas modificadas, uma vez que a alimentação rica em gordura apresenta uma patogênese semelhante à obesidade em humanos (LIAO *et al.*, 2013; NASCIMENTO *et al.*, 2011).

Neste trabalho, foram realizados dois protocolos de obesidade induzidos por dieta hipercalórica. No primeiro, o tratamento com o ácido cafeico ocorre simultaneamente a indução da obesidade com a dieta e no segundo, o tratamento iniciou-se apenas após os animais estarem obesos. As doses de ácido cafeico utilizadas no presente trabalho, foram definidas de acordo com a literatura (NASRY *et al.*, 2015) e resultados de protocolos feitos anteriormente pelo grupo de pesquisa.

Segundo Estadella e colaboradores (2004), a exposição de roedores a longos períodos de ingestão de dietas rica em gordura induz a um ganho energético o que leva ao ganho de peso. Associada à obesidade, muitas vezes, encontram-se alterações no metabolismo dos carboidratos e lipídios, bem como na ação e secreção de insulina e leptina.

Assim, a dieta hipercalórica usada nos dois modelos para a indução foi capaz de aumentar de forma significativa o peso dos animais, a glicose e o colesterol total plasmáticos. Este resultado foi semelhante ao encontrado no trabalho de Melo e

colaboradores (2009), no qual observou-se que animais alimentados com dieta hipercalórica, apresentaram hiperglicemia, dislipidemia e resistência a insulina que foram evidenciadas pelo aumento dos níveis plasmáticos de glicose, insulina, colesterol total e triglicerídeos.

No protocolo de tratamento simultâneo a indução, o ácido cafeico inibiu significativamente o aumento do peso dos animais nos grupos AC 25 e AC 50, já no protocolo de pós tratamento verificou-se redução apenas na maior dose (50 mg/Kg). Pode-se sugerir que 21 dias foi um período de tempo curto para que a dose intermediária reduzisse uma obesidade já estabelecida. Observou-se ainda a redução do peso relativo do tecido adiposo abdominal com o tratamento com o ácido cafeico nas 3 doses e em ambos os modelos experimentais.

O aumento da gordura visceral tem relação com o surgimento de adipócitos aumentados e disfuncionais, bem como com o desenvolvimento da resistência a insulina que parece ser uma das alterações mais importantes para o surgimento da síndrome metabólica. O tecido adiposo disfuncional, libera substâncias pró-inflamatórias contribuindo para uma inflamação sistêmica (PALEY; JOHNSON, 2018).

No trabalho de Cho (2010), o ácido cafeico suplementado na dieta (0,2 g de ácido cafeico/Kg de dieta) em dose única foi capaz de reduzir o peso dos animais em aproximadamente 8% e 22% o tecido adiposo epididimal, resultados que corroboram com os achados deste trabalho.

Kim S e colaboradores (2018), que estudaram a ação de um derivado do ácido cafeico, o ácido cafeico fenil éster (CAPE), demonstraram que após 8 semanas de indução de obesidade com dieta, o tratamento com o CAPE (30mg/Kg) por 4 semanas melhorou a resistência a insulina sem diminuir o peso dos animais. Entretanto, os animais que foram tratados com CAPE desde o início da indução da obesidade tiveram redução significativa de peso. O presente trabalho também demonstrou melhores resultados com o tratamento concomitante.

No estudo de Bezerra e colaboradores (2012), não foi observada redução do peso dos animais após 12 semanas de dieta hiperlipídica e tratamento com o CAPE, embora tenha obtido melhora no metabolismo lipídico e esteatose hepática. Segundo Kim H M e colaboradores (2018), o ácido cafeico apresentou efeito protetor contra a esteatose hepática induzida por dieta hipercalórica devido à regulação do processo de autofagia do fígado. A autofagia reduzida está relacionada a síndrome metabólica, obesidade e diabetes.

A dieta modificada aumentou significativamente a glicemia em ambos os protocolos de obesidade do presente estudo. Tal elevação pode ocorrer, pois o aumento da adiposidade visceral na obesidade está relacionada a resistência à insulina, hiperglicemia, dislipidemia e hipertensão que caracterizam a síndrome metabólica. A obesidade eleva o risco de Diabetes mellitus tipo 2 que surge como consequência da resistência periférica à insulina e problemas na sua secreção (ESSER *et al.*, 2014).

A resistência a insulina pode ser agravada pela obesidade induzida por dieta e pela elevação do estresse oxidativo, uma vez que o aumento das espécies reativas de oxigênio pode diminuir a captação de glicose nos tecidos, levando a uma sobrecarga das células β pancreáticas, o que pode causar falha e disfunção na produção de insulina pelo pâncreas (MEHTA; RAYALAM; WANG, 2018).

Dessa forma, a elevação da glicemia nestes modelos pode ocorrer uma vez que a obesidade causa um acúmulo de gordura em vários órgãos sensíveis a insulina não apenas no tecido adiposo branco, mas o músculo esquelético e fígado podem ser acometidos, predispondo o indivíduo ao desenvolvimento de resistência à insulina. Pode-se dizer ainda que a regulação do processo de diferenciação de adipócitos está intimamente relacionada a resistência à insulina (GOTO; MORI; NAGAOKA, 2013).

Neste trabalho, o ácido cafeico impediu o aumento da glicemia no protocolo com tratamento concomitante nas doses de 25 e 50 mg/Kg e no teste oral de tolerância a glicose o grupo AC25 promoveu um menor pico hiperglicêmico causado pela sobrecarga de glicose. Semelhante aos resultados obtidos neste trabalho, um estudo realizado com o ácido cafeico feniletil amida (CAPA), derivado amida do ácido cafeico, também demonstrou que ele promoveu redução do pico de glicemia em ratos submetidos a administração intraperitoneal de glicose em modelo de teste de tolerância a glicose (WENG *et al.*, 2012). Assim como, em modelos de indução de diabetes por estreptozotocina e aloxano, no primeiro modelo verificou-se que o ácido cafeico fenil éster, foi capaz de reduzir significativamente a glicemia, triglicerídeos, colesterol total além de aumentar os níveis de insulina reduzidos após a indução por estreptozotocina (CELIK; ERDOGAN; TUZCU, 2009) e no segundo, Ahmadvand, Davoodi e Babaeenezhad (2017) observaram que o ácido cafeico reduziu 43% da glicemia de jejum de ratos diabéticos.

Jung e colaboradores (2006) observaram que o ácido cafeico incorporado a dieta dos animais reduziu de forma significativa glicemia de ratos db/db quando

comparado ao controle, bem como verificou-se redução da hemoglobina glicada. A ação hipoglicêmica do ácido cafeico pode ocorrer devido ao aumento do transporte de glicose do sangue para o tecido adiposo, uma vez que estudos mostraram que o ácido cafeico aumenta a expressão da GLUT 4 no tecido adiposo, sendo relacionado a diminuição da resistência à insulina (LIAO *et al.*, 2013). Outro estudo que avaliou o efeito dos ésteres metílico (CAME) e etílico (CAEE) do ácido cafeico, observou que esses ésteres estimulavam a captação de glicose em células musculares esqueléticas após 18 horas de tratamento, tal efeito também foi atribuído ao aumento da transcrição e expressão dos transportadores GLUT4 (EID *et al.*, 2017).

No presente trabalho, embora não tenha apresentado diferença estatística, a dieta promoveu um aumento dos níveis de insulina e o ácido cafeico na maior dose (AC50) apresentou uma tendência à reduzir esse aumento. Os resultados encontrados por Cho (2010), demonstraram que os níveis de leptina e insulina no plasma foram significativamente maiores no grupo que ingeriu dieta rica em lipídeos quando comparado ao grupo que consumiu dieta normal e a suplementação com o ácido cafeico e com o ácido clorogênico na dieta reduziu significativamente os níveis destes hormônios.

Observou-se ainda neste estudo, que o tratamento concomitante e pós-tratamento com o ácido cafeico reduziu a hipercolesterolemia causada pela dieta hipercalórica. Bocco e colaboradores (2016), demonstraram que o tratamento combinado do ácido cafeico e ácido ferúlico foi capaz de reverter a hiperglicemia, dislipidemia e esteatose hepática em animais com síndrome metabólica induzida por dieta. O trabalho de Alves e colaboradores (2008) verificou que o tratamento com derivados do ácido cafeico diminuiu significativamente o colesterol total em modelo de indução de dislipidemia por dieta.

Os resultados de Ahmadvand, Davoodi e Babaeenezhad (2017) também corroboraram com o presente trabalho pois observaram que o ácido cafeico reduziu a concentração sérica do colesterol total (21,7%), colesterol LDL (26,65%) e do índice aterogênico, associado ainda ao aumento do colesterol HDL em ratos com diabetes tipo 1 induzida por aloxano.

Segundo Liao e colaboradores (2013), o ácido cafeico diminuiu a atividade da HMG-CoA redutase, enzima importante para a síntese de colesterol endógeno, reduzindo também os níveis plasmáticos de colesterol total em modelos de

hiperlipidemia induzida por dieta. Esse mecanismo de ação pode ter contribuído para o efeito hipolipemiante do ácido cafeico neste trabalho.

No presente trabalho, em relação aos triglicerídeos plasmáticos não se observou diferença significativa entre os grupos. Resultado diferente do encontrado por Shokouh e colaboradores (2018) que observaram que o café foi capaz de reduzir os triglicerídios sanguíneos e a esteatose hepática em ratos em modelo de síndrome metabólica induzida por dieta.

Já o trabalho de Kim S e colaboradores (2018) verificou o efeito do CAPE, um derivado do ácido cafeico, durante e após a indução da obesidade e concluíram que em relação aos lipídios séricos apenas o tratamento desde o início da indução da obesidade foi capaz de reduzir os triglicerídeos e o colesterol total dos animais.

O ácido cafeico e a sibutramina, neste estudo, reduziram a glicemia e o colesterol total no modelo de tratamento concomitante e diminuíram a gordura abdominal relativa nos 2 modelos. A sibutramina é um medicamento usado para o controle da obesidade que foi incluído nestes protocolos como um controle. Melo e colaboradores (2009) demonstraram que a sibutramina reduziu o acúmulo de gordura abdominal e apresentou reduções significativas de triglicerídeos e colesterol total em modelo de obesidade induzida por dieta.

Diante dos resultados observados *in vivo*, realizou-se de forma semelhante modelos *in vitro*, uma vez que avaliou-se o efeito do ácido cafeico na formação de lipídios durante o processo de diferenciação de pré adipócitos 3T3 L1 em adipócitos. Tais modelos *in vitro* foram realizados para verificar se o efeito observado *in vivo* em modelos de co- e pós-tratamento, poderia ter correlação com a ação do AC nestas células também tratadas simultaneamente a indução da diferenciação ou após este processo.

Como mencionado anteriormente, o tecido adiposo branco não é um tecido de armazenamento de energia inerte e sim um órgão endócrino capaz de secretar grande quantidade de adipocinas ou adipocitocinas. Esses mediadores apresentam atividades metabólicas e atuam na regulação de apetite, além da ação pró-inflamatória colaborando para o quadro inflamatório de baixo grau apresentado por obesos (VERSINI *et al.*, 2014).

Sabe-se que o tecido adiposo é um órgão endócrino complexo com um papel regulador no metabolismo energético (LIN *et al.*, 2005). Durante o desenvolvimento da obesidade, o tecido adiposo branco sofre uma expansão que

pode envolver o aumento do número e do tamanho dos adipócitos. O aumento do número de adipócitos se dá devido à proliferação de pré-adipócitos e posterior diferenciação em adipócitos maduros. Esse processo de diferenciação envolve alterações bioquímicas e morfológicas destas células (GOTO; MORI; NAGAOKA, 2013).

O aumento do tamanho do adipócito pode alterar a função do tecido adiposo, uma vez que é caracterizado pela infiltração de macrófagos que podem prejudicar a sinalização de insulina no adipócito devido à produção de citocinas pró-inflamatórias como TNF/ α e IL-6, relacionado a inflamação, a resistência à insulina e ao desenvolvimento da diabetes (VANELLA *et al.*, 2016). Obesos com poucos adipócitos grandes apresentam níveis de insulina mais aumentados que aqueles com o mesmo grau de obesidade devido ao maior número de adipócitos pequenos (ARNER *et al.*, 2010).

O modelo *in vitro* melhor descrito para o estudo da adipogênese é o uso de pré-adipócito 3T3-L1, derivado de embriões de camundongos suíços. No processo de diferenciação são utilizadas várias substâncias para ativar o PPAR γ (receptor ativado pelo proliferador de peroxissoma). O processo de diferenciação ocorre devido à ativação dos receptores de glicocorticóides pela dexametasona, receptor de IGF-1 pela insulina e inibição da fosfodiesterase por IBMX, modulando a via de sinalização de cAMP (LIN *et al.*, 2005). Dentre as fases do processo de diferenciação, a etapa de expansão mitótica clonal é determinante para a ativação da transcrição e diferenciação terminal dos adipócitos. Dessa forma, a supressão dessa etapa pode ser uma boa estratégia para a prevenção da adipogênese (SHIN *et al.*, 2014).

No presente trabalho, o AC mostrou inibir a diferenciação de pré-adipócitos 3T3-L1 em adipócitos, uma vez que, observou-se uma redução da deposição de lipídios após seu tratamento. Estudos usando os ésteres relacionados ao ácido cafeico mostraram que eles inibiram significativamente a diferenciação dessa linhagem celular em adipócitos (SHIN *et al.*, 2014; YASUI *et al.*, 2013). Shin e colaboradores (2014), descreveram que o ácido cafeico fenetil éster (CAPE), reduziu significativamente a concentração de lipídios nas células 3T3-L1 avaliada usando oil red, esse resultado foi constatado por técnica de microscopia. Duangjai e colaboradores (2018) também verificaram uma redução do acúmulo de lipídios em células 3T3-L1 usando Oil red após tratamento com extrato do fruto do café.

Juman e colaboradores (2012) observaram que o CAPE suprimiu a diferenciação de células 3T3-L1 em adipócitos, apresentou potencial anti-inflamatório em adipócitos hipertróficos, bem como bloqueou a expressão gênica de citocinas pró-inflamatórias em macrófagos. Resultado semelhante foi encontrado por Kim S e colaboradores (2018), verificaram que o CAPE restaurou a secreção alterada de adipocinas com redução da penetração de células imunes e da inflamação no adipócito. Tal remodelamento do tecido adiposo pode ter sido induzido pela ativação do PPAR- γ . A ativação do PPAR- γ parece reduzir a lipotoxicidade, melhorar a inflamação, a dislipidemia e a resistência à insulina *in vivo*. No modelo *in vitro*, o CAPE inibiu a diferenciação dos adipócitos, entretanto ele pode exercer efeitos opostos sobre a regulação da expressão do PPAR- γ dependendo do estado dos adipócitos. Assim a atividade do CAPE sobre o PPAR- γ pode variar de acordo com o modelo experimental.

Na obesidade, ocorre ainda um aumento do metabolismo celular devido à elevada quantidade de lipídios e carboidratos que por sua vez gera um aumento na cadeia de transporte de elétrons na mitocôndria levando a uma maior oxidação de nutrientes. Esse processo promove uma grande produção de espécies reativas de oxigênio e conseqüentemente um estado de estresse oxidativo e maior produção de citocinas (FRANCISQUETI; NASCIMENTO; CORRÊA, 2015).

Acredita-se que a produção de EROs intracelular a partir da cadeia respiratória mitocondrial, durante o metabolismo energético, pode ter relação com o aumento da fluidez da membrana mitocondrial e o bloqueio do sistema de fosforilação oxidativa que aumenta o acúmulo de lipídios no adipócito, gerando assim prejuízo da atividade mitocondrial e diminuição do consumo de oxigênio na obesidade (EBAID *et al.*, 2010).

Segundo Lin e colaboradores (2005), o estresse oxidativo interrompe as cadeias transportadoras de elétrons e causa a despolarização mitocondrial, que desencadeia a via apoptótica, a inflamação crônica e o aumento do risco cardiovascular. O aumento das espécies reativas de oxigênio e nitrogênio tem relação com o desenvolvimento da resistência à insulina. Estudos mostram, ainda, que a disfunção mitocondrial e o estresse oxidativo levam ao aumento de metabólitos de ácidos graxos de cadeia longa e diacilglicerol, resultando em resistência à insulina não somente no músculo esquelético, mas também em tecidos adiposos, fígado e sistema

vascular devido à maior ativação da proteína PKC e fosforilação de substratos específicos (TELES *et al.*, 2015).

Dessa forma, neste trabalho observou-se a redução na formação de espécies reativas de oxigênio intracelular e alterações no potencial transmembrana mitocondrial em adipócitos tratados com ácido cafeico. O co-tratamento com ácido cafeico foi mais eficaz do que o pós-tratamento nos parâmetros descritos. Os dados da respiração celular obtidos neste estudo são confirmados na literatura que demonstrou que o ácido cafeico é um antioxidante e inibe a apoptose em adipócitos (LIN *et al.*, 2005).

A influência das mitocôndrias na diferenciação de adipócitos e no desenvolvimento da obesidade é descrita na literatura. A autofagia mediada pelas mitocôndrias está associada ao acúmulo de triglicerídeos e à formação de gotículas lipídicas, bem como o peróxido de hidrogênio produzido pelas mitocôndrias influencia no processo de adipogênese (KIM H M *et al.*, 2018; TORMOS *et al.*, 2011; ZENG *et al.*, 2018).

Estudos mostraram que o ácido cafeico protegeu macrófagos e células da microglia da morte celular em condição de estresse oxidativo, aumentando os níveis de expressão de mRNA e enzimas antioxidantes (BAJPAI *et al.*, 2018)

Outro estudo mostrou que os ésteres de ácido cafeico suprimiram o estresse oxidativo associado à diferenciação de adipócitos, atuando em sistemas antioxidantes enzimáticos intracelulares (YASUI *et al.*, 2013; ZHOU *et al.*, 2017). O CAPE foi capaz de reduzir o estresse oxidativo em adipócitos 3T3-L1 (MEHTA; RAYALAM; WANG, 2018).

Segundo Bufalo e colaboradores (2013), o ácido cafeico apresentou melhor ação que o extrato de própolis, usando modelo *in vitro* de determinação da atividade antioxidante a partir do sequestro de radicais livres (DPPH- 2,2-difenil-1-picrilhidrazila). O autor afirmou que o ácido cafeico e seus derivados encontrados na amostra de própolis são importantes para a atividade antioxidante do extrato.

Damasceno e colaboradores (2017), demonstraram que o efeito antioxidante de compostos fenólicos, como o ácido cafeico e o ácido ferúlico, está relacionado a sua estrutura química, as reações com radicais livres formando produtos estáveis e ao seu efeito quelante.

Diante dos resultados descritos, verifica-se que ácido cafeico desponta como uma substância com elevado potencial terapêutico no âmbito das doenças relacionadas aos metabolismos glicêmico, lipídico e obesidade. No entanto, uma investigação mais aprofundada é necessária no que diz respeito ao seu mecanismo molecular de ação antiobesidade.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Observou-se que o ácido cafeico reduziu o peso dos animais nos protocolos de obesidade nas doses de 25 e 50mg/Kg no protocolo de tratamento simultâneo e na dose de 50mg/Kg no modelo de pós tratamento.
- Os parâmetros bioquímicos glicemia e colesterol total o AC foi capaz de impedir o aumento nas doses de 25 e 50mg/Kg apenas após o protocolo de tratamento simultâneo.
- O acúmulo de lipídios verificados no processo de diferenciação de pré-adipócitos 3T3-L1 em adipócitos, foi reduzido pelo tratamento das células com ácido cafeico nos 2 modelos e concentrações estudadas.
- Após ensaio com DCF-DA, observou-se que o ácido cafeico reduziu a produção de espécies reativas de oxigênio no modelo em que o ácido cafeico foi usado durante a diferenciação das células nas concentrações estudadas.
- Após o tratamento dos adipócitos com ácido cafeico, observou-se um aumento significativo da rodamina ligada a mitocôndria celular nos dois modelos usados e nas duas concentrações analisadas. Esse resultado demonstra a melhora do estresse mitocondrial causado pela formação dos adipócitos.

8 CONCLUSÃO

Conclui-se com os resultados obtidos, que o tratamento com ácido cafeico de forma concomitante ou após o desenvolvimento da obesidade, demonstra ser eficaz em reduzir o peso e a deposição de gordura abdominal, bem como apresentou efeito hipoglicêmico em camundongos alimentados com dieta hipercalórica. O ácido cafeico promoveu ainda redução do acúmulo de lipídios e apresentou atividade antioxidante em cultivo celular de adipócitos 3T3-L1.

Tanto nos modelos *in vivo* quanto *in vitro*, o ácido cafeico parece ser mais efetivo no que diz respeito a minimizar alterações metabólicas presentes na obesidade que a reversão delas. O efeito antiobesidade apresentado pelo ácido cafeico necessita de uma investigação mais aprofundada no que diz respeito ao seu mecanismo molecular para ser usado como coadjuvante no tratamento da obesidade e nos distúrbios metabólicos a ela associados.

REFERÊNCIAS

- ACHKAR, M. T et al. Propriedade antioxidante de compostos fenólicos: Importância na dieta e na conservação de alimentos. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, v. 11, n. 2, p. 398-406, ago./dez. 2013
- AHAMAD, J.; . et al. Oleuropein: A natural antioxidant molecule in the treatment of metabolic syndrome. **Phytotherapy Research**, 2019.
- AHMADVAND, H.; DAVOODI, T.; BABAEENEZHAD, E. Effects of Caffeic Acid on Serum Lipid Profile and Atherogenic Index in Alloxan-Induced Diabetic Rats. **Herbal Medicines Journal**, 2017.
- ALAM, M. A. et al. Hydroxycinnamic acid derivatives: a potential class of natural compounds for the management of lipid metabolism and obesity. **Nutrition & metabolism**, v. 13, n. 1, p. 27, 2016.
- ALBUQUERQUE, L. P. et al. Relação da obesidade com o comportamento alimentar e o estilo de vida de escolares brasileiros. **Nutrición clínica y dietética hospitalaria**, v. 36, n. 1, p. 17-23, 2016.
- ALVES, M. J. Q. F. et al. Efeito hipocolesterolêmico dos ácidos caféicos da própolis. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, p. 100-105, 2008.
- ARNER, E. et al. Adipocyte turnover: relevance to human adipose tissue morphology. **Diabetes**, v. 59, n. 1, p. 105-109, 2010.
- Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade e da Síndrome Metabólica - ABESO. **Diretrizes brasileiras de obesidade** [online]. ABESO; 2016.
- BAJPAI, V. K. et al. Antioxidant mechanism of polyphenol-rich *Nymphaea nouchali* leaf extract protecting DNA damage and attenuating oxidative stress-induced cell death via Nrf2-mediated heme- oxygenase-1 induction coupled with ERK/p38 signaling pathway. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, 103:1397-1407, 2018.

BALASUNDRAM, N.; SUNDRAM, K. AND SAMMAN, S. Phenolic compounds in plant and agri-industrial byproducts: antioxidant activity, occurrence, and potential uses. **Food Chem**, 2006.

BARBOSA, K. B. F. et al. Oxidative stress: concept, implications and modulating factors. **Rev. Nutr., Campinas**, 2010.

BARGUT, T. C. L. et al. Browning of white adipose tissue: lessons from experimental models. **Hormone molecular biology and clinical investigation**, v. 31, n. 1, 2017.

BARNES, M. J. et al. High fat feeding is associated with increased blood pressure, sympathetic nerve activity and hypothalamic mu opioid receptors. **Brain research bulletin**, v. 61, n. 5, p. 511-519, 2003.

BASS, D. A. et al. Subpopulations of neutrophils with increased oxidative product formation in blood of patients with infection. **The Journal of Immunology**, v. 136, n. 3, p. 860-866, 1986.

BASS, D. A. et al. Flow cytometric studies of oxidative product formation by neutrophils: a graded response to membrane stimulation. **The Journal of Immunology**, v. 130, n. 4, p. 1910-1917, 1983.

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

BEZERRA, R. M. N. et al. Caffeic acid phenethyl ester reduces the activation of the nuclear factor κ B pathway by high-fat diet-induced obesity in mice. **Metabolism**, v. 61, n. 11, p. 1606-1614, 2012.

BOCCO, B. M. et al. Combined treatment with caffeic and ferulic acid from *Baccharis uncinella* C. DC.(Asteraceae) protects against metabolic syndrome in mice. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 49, n. 3, 2016.

BÚFALO, M. C. et al. Propolis and its constituent caffeic acid suppress LPS-stimulated pro-inflammatory response by blocking NF- κ B and MAPK activation in macrophages. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 149, n. 1, p. 84-92, 2013.

BURGOS, P. F. M. et al. A obesidade como fator de risco para a hipertensão. **Rev. bras. hipertens**, v. 21, n. 2, p. 68-74, 2014.

CARVALHO, E. A. A. et al. Obesidade: aspectos epidemiológicos e prevenção. **Rev Med Minas Gerais**, v. 23, n. 1, p. 74-82, 2013.

CELIK, S.; ERDOGAN, S.; TUZCU, M. Caffeic acid phenethyl ester (CAPE) exhibits significant potential as an antidiabetic and liver-protective agent in streptozotocin-induced diabetic rats. **Pharmacological Research**, v. 60, n. 4, p. 270-276, 2009.

CHO, A. et al. Chlorogenic acid exhibits anti-obesity property and improves lipid metabolism in high-fat diet-induced-obese mice. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, n. 3, p. 937-943, 2010.

CICERO A. F; COLLETTI A. Role of phytochemicals in the management of metabolic syndrome. **Phytomedicine**. 2016.

CONDE, W. L.; BORGES, C. The risk of incidence and persistence of obesity among Brazilian adults according to their nutritional status at the end of adolescence. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 14, p. 71-79, 2011.

COSTA, A.M.J.; DUARTE, S.F.P. Principais Medicamentos Utilizados no tratamento da Obesidade e Vias de Ação: Uma Revisão Sistemática. **Id on Line Rev. Psic.** V.11, N. 35. 2017.

COTINGUIBA, G.G. et al. A.F.Methods of the Antioxidant Defense: A Literature Review.**Cient Ciênc Biol Saúde**, 2013.

CREVAR-SAKAC, M. et al. Effects of atorvastatin and artichoke leaf tincture on oxidative stress in hypercholesterolemic rats. **Vojnosanitetski pregled**. 2016.

CUI, H.; LÓPEZ, M.; RAHMOUNI, K. The cellular and molecular bases of leptin and ghrelin resistance in obesity. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 13, n. 6, p. 338, 2017.

DAMASCENO, S. S. et al. Chemical Properties of Caffeic and Ferulic Acids in Biological System: Implications in Cancer Therapy. A Review. **Curr Pharm Des.**,2017.

DEL RIO, D. et al. Dietary (poly) phenolics in human health: structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases. **Antioxidants & redox signaling**, v. 18, n. 14, p. 1818-1892, 2013.

DUANGJAI, A et al. Potential of Coffee Fruit Extract and Quinic Acid on Adipogenesis and Lipolysis in 3T3-L1 Adipocytes. **Kobe J. Med. Sci.**, Vol. 64, No. 3, 2018.

EBAID, G. M. X et al. Effects of olive oil and its minor phenolic constituents on obesity-induced cardiac metabolic changes. **Nutrition journal**, v. 9, n. 1, p. 46, 2010.

EID, H. M. et al. Caffeic acid methyl and ethyl esters exert potential antidiabetic effects on glucose and lipid metabolism in cultured murine insulin-sensitive cells through mechanisms implicating activation of AMPK. **Pharmaceutical biology**, v. 55, n. 1, p. 2026-2034, 2017.

ESSER, N. et al. Inflammation as a link between obesity, metabolic syndrome and type 2 diabetes. **Diabetes research and clinical practice**, v. 105, n. 2, p. 141-150, 2014.

ESTADELLA, D. et al. Effect of palatable hyperlipidic diet on lipid metabolism of sedentary and exercised rats. **Nutrition**, v. 20, n. 2, p. 218-224, 2004.

FARMER, S. R. Transcriptional control of adipocyte formation. **Cell metabolism**, v. 4, n. 4, p. 263-273, 2006.

FERREIRA, J. M. **Avaliação do potencial terapêutico e da toxicidade das sementes de *Bixa orellana* L. no tratamento de dislipidemias**. 179 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia)- Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2010.

FRANÇA, B.K. et al. Peroxidacão lipídica e obesidade: Métodos para aferição do estresse oxidativo em obesos. **J Port Gastroenterol**, 2013.

FRANCISQUETI, F. V.; NASCIMENTO, A. F.; CORREA, C. R. Obesidade, inflamação e complicações metabólicas. **Nutrire**, v. 40, n. 1, p.81-89, 2015.

FRANCISQUETI, F. V. et al. The role of oxidative stress on the pathophysiology of metabolic syndrome. **Rev Assoc Med Bras**, 2017 .

GREENWAY, F. L. et al. Rational design of a combination medication for the treatment of obesity. **Obesity**, v. 17, n. 1, p. 30-39, 2009.

GOTO, T.; MORI, A. ; NAGAOKA, S. Soluble soy protein peptic hydrolysate stimulates adipocyte differentiation in 3T3-L1 cells. **Molecular nutrition & food research**, v. 57, n. 8, p. 1435-1445, 2013.

HASANI-RANJBAR, S.; JOUYANDEH, Z.; ABDOLLAHI, M. A systematic review of anti-obesity medicinal plants - an update. **Journal of Diabetes & Metabolic Disorders** 2013.

JOHNSON, L. V.; WALSH, M. L.; CHEN, L. B. Localization of mitochondria in living cells with rhodamine 123. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 77, n. 2, p. 990-994, 1980.

JUMAN, S. et al. Caffeic acid phenethyl ester suppresses the production of pro-inflammatory cytokines in hypertrophic adipocytes through lipopolysaccharide-stimulated macrophages. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 35, n. 11, p. 1941-1946, 2012.

JUNG, U. J. et al. Antihyperglycemic and antioxidant properties of caffeic acid in db/db mice. **Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 318, n. 2, p. 476-483, 2006.

KANG, J. G.; PARK, C. Y. Anti-Obesity Drugs: A Review about Their Effects and Safety. **Diabetes Metab J.** 36(1):13-25, 2012.

KIM, H. M. et al. Caffeic acid ameliorates hepatic steatosis and reduces ER stress in high fat diet-induced obese mice by regulating autophagy. **Nutrition**, v. 55, p. 63, 2018.

KIM, S. et al. Caffeic Acid Phenethyl Ester Improves Metabolic Syndrome by Activating PPAR- γ and Inducing Adipose Tissue Remodeling in Diet-Induced Obese Mice. **Molecular nutrition & food research**, v. 62, n. 10, p. 1700701, 2018.

LEE, E. S. et al. Caffeic acid disturbs monocyte adhesion onto cultured endothelial cells stimulated by adipokine resistin. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 60, n. 10, p. 2730-2739, 2012.

LIAO, C. C. et al. Prevention of diet-induced hyperlipidemia and obesity by caffeic acid in C57BL/6 mice through regulation of hepatic lipogenesis gene expression. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 61, n. 46, p. 11082-11088, 2013.

LIN, J.; DELLA-FERA, M. A.; BAILE, C. A. Green tea polyphenol epigallocatechin gallate inhibits adipogenesis and induces apoptosis in 3T3-L1 adipocytes. **Obesity research**, v. 13, n. 6, p. 982-990, 2005.

LIU, Y. et al. Mechanism of cellular 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction. **Journal of neurochemistry**, v. 69, n. 2, p. 581-593, 1997.

MARINOVA, E.M. AND YANISHLIEVA, N.V. Antioxidant Activity and Mechanism of Action of Some Phenolic Acids at Ambient and High Temperatures. **Food Chemistry**, 2003.

MARQUES-LOPES, I. et al. A.Genetics of obesity. **Rev. Nutr.** vol.17 no.3. 2004.

MEHTA, J.; RAYALAM, S.; WANG, X. Cytoprotective effects of natural compounds against oxidative stress. **Antioxidants**, v. 7, n. 10, p. 147, 2018.

MELO, C. L. et al. Betulinic acid, a natural pentacyclic triterpenoid, prevents abdominal fat accumulation in mice fed a high-fat diet. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 57, n. 19, p. 8776-8781, 2009.

MELO, C. L. et al. Oleanolic acid, a natural triterpenoid improves blood glucose tolerance in normal mice and ameliorates visceral obesity in mice fed a high-fat diet. **Chemico-biological interactions**, v. 185, n. 1, p. 59-65, 2010.

MOREIRA, F; ALVES, A. A. Amphetamines use as anorectic related to obesity. **Revista Científica da FHO|UNIARARAS** v. 3, n. 1, 2015 .

MOSCA, S. S.; SANCHES, R. A.; COMUNE, A. C. The importance of antioxidants in the neutralization of free radicals: a Review. **Revista Saúde em Foco**, 2017.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of immunological methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

NADERALI, E. K.; FATINI, S.; WILLIAMS, G. Chronic withdrawal of a high-palatable obesity-inducing diet completely reverses metabolic and vascular abnormalities associated with dietary-obesity in the rat. **Atherosclerosis**, Limerick, v. 172, n. 1, p. 63-69, 2003.

NARAYANASWAMI, V.; DWOSKIN, L.P. Obesity: Current and Potential Pharmacotherapeutics and Targets. **Pharmacol Ther**, 2018.

NASRY, M.R. et al. Effect of caffeic acid and pioglitazone in an experimental model of metabolic syndrome. **International Journal of Scientific and Research Publications**, 2015.

NASCIMENTO, T. B. et al. Vascular alterations in high-fat diet-obese rats: role of endothelial L-arginine/NO pathway. **Arquivos brasileiros de cardiologia**, v. 97, n. 1, p. 40-45, 2011.

OLIVEIRA, D. M.; BASTOS, D. H. M. Phenolic acids bioavailability. **Quim. Nova**, Vol. 34, No. 6, 1051-1056, 2011.

OLIVEIRA, R.C. et al. FARMACOTERAPIA NO TRATAMENTO DA OBESIDADE. **Revista Brasileira de Obesidade, Nutrição e Emagrecimento**, São Paulo v.3, n.17, p.375-388, 2009.

ONGE, E. S.; MILLER, S. A.; MOTYCKA, C. Liraglutide (Saxenda[®]) as a Treatment for Obesity. **Food and Nutrition Sciences**, 2016.

OMECH, B., et al. Prevalence and determinants of metabolic syndrome: a cross-sectional survey of general medical outpatient clinics using National Cholesterol Expanded Program -Adult treatment panell III criteria in Botswana. **Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy** , 2016.

PALEY, C. A.; JOHNSON, M. I. Abdominal obesity and metabolic syndrome: exercise as medicine? **BMC Sports Science, Medicine and Rehabilitation**, 2018.

PEREIRA, A. L. F.; VIDAL, T. F.; CONSTANT, P. B. L. Antioxidantes alimentares: importância química e biológica. **Nutrire: Rev. Soc. Bras. Alim. Nut.**, São Paulo, v. 34, n. 3, p. 231-247, dez. 2009.

RADAELLI, M.; PEDROSO, R.C.; MEDEIROS, L. F. Obesity Pharmacotherapy: Benefits and Risks. **Revista Saúde e Desenvolvimento Humano**, 2016.

RAJA,B.; SARAVANAKUMAR, M.; SATHYA, G. Veratric acid ameliorates hyperlipidemia and oxidative stress in Wistar rats fed an atherogenic diet. **Molecular and Cellular Biochemistry**, 2012.

REIS NUNES, C. et al. Inibição da Produção de Óxido Nítrico e Efeito Citotóxico de Extrato Aquoso de *Annona muricata* L. **Perspectivas Online Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 1, n. 2, p. 1- 8, 2011.

RONDANELLI, M.et al. Metabolic management in overweight subjects with naive impaired fasting glycaemia by means of a highly standardized extract from *Cynara scolymus*: a double- blind, placebo-controlled, randomized clinical trial. **Phytotherapy Research** 28(1):33-41,2014.

ROSINI, T. C. ; DA SILVA, A. S. R.; DE MORAES, C. Obesidade induzida por consumo de dieta: modelo em roedores para o estudo dos distúrbios relacionados com a obesidade. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 58, n. 3, p. 383-387, 2012.

SILVA, M. L. C. et al. Phenolic compounds, carotenoids and antioxidant activity in plant products. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 31, n. 3, p. 669-682, 2010.

SILVA, T.; OLIVEIRA, C.; BORGES, F.. Caffeic acid derivatives, analogs and applications: A patent review (2009–2013). **Expert opinion on therapeutic patents**, v. 24, n. 11, p. 1257-1270, 2014.

SHIN, S. H. et al. Caffeic acid phenethyl ester, a major component of propolis, suppresses high fat diet-induced obesity through inhibiting adipogenesis at the mitotic clonal expansion stage. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 62, n. 19, p. 4306-4312, 2014.

SHOKOUH, P. et al. Effects of Unfiltered Coffee and Bioactive Coffee Compounds on the Development of Metabolic Syndrome Components in a High-Fat-/High-Fructose-Fed Rat Model. **Nutrients**, 2018.

SIMONS, P. J. et al. Cytokine-mediated modulation of leptin and adiponectin secretion during in vitro adipogenesis: evidence that tumor necrosis factor- α -and interleukin-1 β -treated human preadipocytes are potent leptin producers. **Cytokine**, v. 32, n. 2, p. 94-103, 2005.

SUGANAMI, T.; TANAKA, M. ; OGAWA, Y. Adipose tissue inflammation and ectopic lipid accumulation. **Endocrine journal**, p. EJ12-0271, 2012.

SPADA, P.D.S.; DE SOUZA, G. G.; BORTOLINI, G. V.; HENRIQUES, J. A.; SALVADOR, M. Antioxidant, mutagenic and antimutagenic activity of frozen fruits. **J. Med. Food**, v.11, p.144-151, 2008.

SPIEGELMAN, B. M.; FLIER, J. S. Obesity and the regulation of energy balance. **cell**, v. 104, n. 4, p. 531-543, 2001.

TANASE, C.; COSARCA, S.; MUNTEAN, D. L. A Critical Review of Phenolic Compounds Extracted from the Bark of Woody Vascular Plants and Their Potential Biological Activity . **Molecules**, 2019,

TELES, Y.C.F. et al. The role of oxidative stress in metabolic syndrome. **J Health Sci Inst.**33(1):89-93, 2015.

TORMOS, K. V. et al. Mitochondrial complex III ROS regulate adipocyte differentiation. **Cell Metabolism**, 2018.

TREMMELE, M. et al. Economic burden of obesity: a systematic literature review. **International journal of environmental research and public health**, v. 14, n. 4, p. 435, 2017.

VANELLA, L. et al. Caffeic acid phenethyl ester regulates PPAR's levels in stem cells-derived adipocytes. **PPAR research**, v. 2016, 2016.

VERSINI, M. et al. Obesity in autoimmune diseases: not a passive bystander. **Autoimmunity Rev**, p. 343-372, 2014.

WENG, Y. C. et al. Caffeic acid phenylethyl amide protects against the metabolic consequences in diabetes mellitus induced by diet and streptozocin. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2012, 2012.

WHO - World Health Organization. **Obesity and overweight**.2018. Disponível em:<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>. Acesso em 22 mai 2019.

YASUI, N. et al. Caffeic acid phenethyl ester suppresses oxidative stress in 3T3-L1 adipocytes. **Journal of Asian natural products research**, v. 15, n. 11, p. 1189-1196, 2013.

ZENG, R. et al. P62 is linked to mitophagy in oleic acid-induced adipogenesis in human adipose-derived stromal cells. **Lipids in Health and Disease** 17(1):133, 2018.

ZHANG, J. et al. Synthesis and effects of new caffeic acid derivatives on nitric oxide production in lipopolysaccharide-induced RAW 264.7 macrophages. **International journal of clinical and experimental medicine**, v. 7, n. 4, p. 1022, 2014.

ZHOU, Y. et al. Detection of glutathione in oral squamous cell carcinoma cells With a fluorescent probe during the course of oxidative stress and apoptosis. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 75, n. 1, p. 223. e1-223. e10, 2017.

ZUANAZZI, J. A. C, MONTANHA, J.A. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5.ed. Porto Alegre: UFRGS, p.577- 614, 2003.