

**UNIVERSIDADE REGIONAL DE BLUMENAU – FURB  
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E NATURAIS – CCEN  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA – PPGQ  
ALICE BUSS CRUZ**

**CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA E EFEITO HIPOLIPIDÊMICO DO EXTRATO  
DE REPOLHO ROXO (*Brassica oleracea* L. var. capitata f. rubra DC.) EM  
ANIMAIS SUBMETIDOS À HIPERLIPIDEMIA AGUDA**

Blumenau – SC

2014

**ALICE BUSS CRUZ**

**CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA E EFEITO HIPOLIPIDÊMICO DO EXTRATO  
DE REPOLHO ROXO (*Brassica oleracea* L. var. capitata f. rubra DC.) EM  
ANIMAIS SUBMETIDOS À HIPERLIPIDEMIA AGUDA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química do Centro de Ciências Exatas e Naturais da Universidade Regional de Blumenau, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Química.

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Lúcia Bertarello Zeni – Orientadora

Blumenau – SC

2014

**CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA E EFEITO HIPOLIPIDÊMICO DO EXTRATO  
DE REPOLHO ROXO (*Brassica oleracea* L. var. capitata f. rubra DC.) EM  
ANIMAIS SUBMETIDOS À HIPERLIPIDEMIA AGUDA**

**ALICE BUSS CRUZ**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química do Centro de Ciências Exatas e Naturais da Universidade Regional de Blumenau, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Química.

Banca Examinadora formada por:



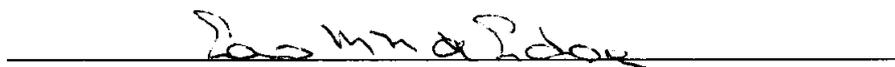
Presidente: Profa. Ana Lúcia Bertarello Zeni, Dra.

Universidade Regional de Blumenau (FURB)



Prof. Marcelo Maraschin, Dr.

Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)



Prof. Caio Mauricio Mendes de Cordova, Dr.

Universidade Regional de Blumenau (FURB)

## AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha Orientadora, Profa. Dra. Ana Lúcia Bertarello Zeni, pela excelente orientação, competência e profissionalismo que foram imprescindíveis na minha formação acadêmica, acima de tudo, pela confiança.

Agradeço aos departamentos de Química e Ciências Naturais da Universidade Regional de Blumenau pela infraestrutura de trabalho, principalmente à secretária do curso, Kátia Regina Maba, pela sua preocupação e dedicação aos alunos do Mestrado em Química.

Agradeço ao Prof. Dr. Marcelo Maraschin pelo apoio e suporte na realização dos ensaios cromatográficos no Laboratório de Morfogênese e Bioquímica Vegetal do Departamento de Fitotecnia da UFSC.

Agradeço a todos os meus colegas de turma, em especial, a Tiago Tizziani e Evandro José Zonta, pelo companheirismo, apoio e amizade.

Agradeço à Profa. Msc Heloisa da Silva Pitz, pelo auxílio prestado em todas as etapas deste trabalho, pelas dicas, apoio, amizade adquirida e principalmente pelos nós desatados.

Agradeço aos acadêmicos e bolsistas de pesquisa, Bruno Veber, Larissa Alida Bini e Deizi Naiara Sais por todo o tempo disponibilizado, incentivo e amizade. Sem vocês, não seria possível.

Agradeço a toda equipe do Laboratório de Bioquímica da FURB professores, bolsistas e monitores, em especial, ao Técnico de Laboratório, Gustavo Henrique, e à Coordenadora do Laboratório de Bioquímica, Profa. Dra. Zelinda Braga, pelo apoio e cooperação na pesquisa realizada no Laboratório de Bioquímica.

Agradeço a meus pais, Clóvis e Neide, pelo apoio e compreensão e principalmente por sempre terem depositado confiança nas minhas escolhas e decisões. Sobretudo por dedicarem a vida à educação e formação de seus filhos.

Agradeço a minha querida Tia Iva, pelos conselhos, conversas e pelo incentivo constante e fundamental em minha vida.

Agradeço a meus irmãos (Beatriz e Fabiano) e a meu cunhado (Eduardo), pelo carinho, pela parceria incondicional e o apoio que vêm de vocês.

E, por fim, agradeço a toda a equipe de farmacêuticas do Hospital Santa Catarina de Blumenau (Andi, Paula, Dio, Gi e Cris), pelo apoio e incentivo nesses

dois anos de formação, por cobrir a minha ausência em alguns períodos e pela amizade de vocês, meninas!

Muito obrigada!

## RESUMO

O repolho roxo (*Brassica oleracea* L. var. capitata f. rubra) é bem conhecido por sua riqueza nutricional e é considerado a hortaliça mais importante da família *Brassicaceae*. Destaca-se pela sua alta taxa de crescimento e valor nutritivo diretamente relacionado ao número de substâncias bioativas presentes em sua composição, em particular, compostos fenólicos, tais como antocianinas, flavonóis e polifenóis. Compostos fenólicos com atividade antioxidante são capazes de reduzir o dano oxidativo e contribuir na prevenção de doenças cardiovasculares. Este estudo teve como objetivo realizar uma investigação fitoquímica e estudar um possível efeito hipolipidêmico em animais tratados com extratos de repolho roxo submetidos à indução de hiperlipidemia aguda. A análise fitoquímica quantitativa realizada com o extrato de repolho roxo comprovou principalmente a presença de compostos fenólicos (116,2 mg/g), flavonoides (161,3 mg/g) e carotenoides (0,89 mg/g). Em relação à capacidade antioxidante (DPPH), o potencial antioxidante apresentado pelo extrato aquoso foi superior ao obtido com o controle positivo, ácido ferúlico. A análise por CLAE indicou um melhor potencial do extrato aquoso em relação ao metanólico, considerando o número superior de ácidos fenólicos identificados e quantificados. Após receberem o extrato aquoso de repolho roxo, os animais apresentaram diminuição significativa ( $p < 0,01$ ) do colesterol total (CT) e dos triglicerídeos (TG) quando comparados ao grupo hiperlipidêmico e redução do índice aterogênico ( $p < 0,05$ ), importantes indicadores de risco para doenças cardiovasculares. Neste estudo, portanto, foi possível observar os benefícios do repolho roxo através da redução de parâmetros lipídicos séricos que demonstraram potencial terapêutico no que se refere à hipercolesterolemia e a hipertrigliceridemia.

**Palavras-chave:** *Brassica*. Produtos Naturais. Compostos Fenólicos. Efeito Antioxidante. Triton WR. Agentes Hipercolesterêmicos.

## ABSTRACT

The red cabbage (*Brassica oleracea* L. var. capitata f. rubra) is well known for its nutritional value, is considered the most important vegetable of the Brassicaceae family. It stands out for its high growth rate and nutritional value, directly related to the number of bioactive substances in its composition, especially phenolic compounds such as anthocyanins, flavonols, and polyphenols. Phenolic compounds with antioxidant activity are effective in reducing oxidative damage, thus contributing to the prevention of cardiovascular disorders. This study aim to perform a phytochemical analyse and to identifying potential hypolipidemic effects in animals treated with extracts of red cabbage, undergoing induction of acute hyperlipidemia. The quantitative phytochemical analysis carried out with the extract of red cabbage, has demonstrated the presence of phenolic compounds (116.2 mg/g), flavonoids (161.3 mg/g) and carotenoids (0.89 mg/g). Regarding the antioxidant activity (DPPH), the antioxidant potential presented by the aqueous extract was higher than the obtained with the positive control, ferulic acid. Also, HPLC analysis has pointed to a better potential of aqueous extract in relation to the methanolic, one considering the greater number of phenolic acids identified and quantified. After receiving the aqueous extract of red cabbage, animals have showed a significant decrease ( $p < 0.01$ ) of total cholesterol (TC) and triglycerides (TG) contents compared to the hyperlipidemic group, and also have the atherogenic index ( $p < 0.05$ ) reduced, both important risk factors for cardiovascular disorders. Summing up, this study could demonstrated the benefits of red cabbage by reducing the serum lipid parameters, this way demonstrating its therapeutic potential in relation to hypercholesterolemia and hypertriglyceridemia.

**Key-words:** Brassica; Natural products; Phenolic compounds, Antioxidant activity; Triton WR; hypercholesterolemic agents.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - <i>Brassica oleracea</i> L. var. capitata f. rubra DC.....	16
Figura 2 - Repolho roxo <i>in natura</i> (esq.) e material vegetal obtido após secagem (dir.).....	19
Figura 3 - Extração de antocianinas.....	22
Figura 4 - Reação química para quantificação de vitamina C.....	24
Figura 5 - Etapas do processo de extração lipídica de órgãos.....	27
Figura 6 - Estrutura química das antocianinas.....	31
Figura 7 - Estrutura química dos derivados hidroxibenzoicos.....	34
Figura 8 - Estrutura química dos derivados hidroxicinâmicos.....	34
Figura 9 - Estrutura química do derivado tanino hidrolisável.....	34
Figura 10 - Comparação do potencial antioxidante dos extratos de repolho roxo.....	36
Figura 11 - Efeito do extrato aquoso de repolho roxo em ratos hiperlipidêmicos induzidos com Tyloxapol sobre os níveis de colesterol e triglicerídeos sérico.....	37
Figura 12 - Estrutura química do fenofibrato.....	41
Figura 13 - Marcadores de doença cardíaca: Índice Aterogênico e Risco Cardiovascular.....	42
Figura 14 - Marcadores de função hepática: ALT e AST.....	44

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Espécies e grupos de <i>Brassica oleraceae</i> .....	15
Quadro 2 - Quantificação de compostos fenólicos nos extratos de repolho roxo.....	28
Quadro 3 - Quantificação de flavonoides totais dos extratos de repolho roxo.....	29
Quadro 4 - Quantificação de antocianinas totais e comparação com outros resultados disponíveis na literatura.....	32
Quadro 5 - Compostos fenólicos do repolho roxo em extrato aquoso (mg/100g).....	33
Quadro 6 - Compostos fenólicos do repolho roxo em extrato metanólico (mg/100g).....	33
Quadro 7 - Efeito do extrato aquoso de repolho roxo sobre as lipoproteínas.....	

plasmáticas, HDL, VLDL e LDL.....	40
Quadro 8 - Marcadores de função renal: ureia e creatinina. ....	43
Quadro 9 - Marcadores de função hepática: relação das aminotransferases AST/ALT.....	45
Quadro 10 - Quantificação de lipídios (fígado e rim). ....	46

## LISTA DE SIGLAS

RR	Repolho roxo
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
ALT	Alanina aminotransferase
AST	Aspartato transaminase
LDL	Low-density lipoprotein
HDL	High-density lipoprotein
VLDL	Very-low density lipoprotein
LPL	Lipase lipoproteica
CT	Colesterol total
TG	Triglicerídeos
PPAR	Receptores nucleares ativados pelos proliferadores de peroxissomos
TY	Tyloxapol

## SUMARIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>12</b>
<b>2</b>	<b>FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....</b>	<b>14</b>
2.1	DESCRIÇÃO BOTÂNICA DA FAMÍLIA <i>BRASSICACEAE</i> .....	14
2.2	REPOLHO ROXO ( <i>BRASSICA OLERACEA</i> L. VAR. <i>CAPITATA</i> F. <i>RUBRA</i> DC.) .....	15
2.3	ESTUDO FITOQUÍMICO E ATIVIDADE BIOLÓGICA DO REPOLHO ROXO .	16
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>18</b>
3.1	OBJETIVO GERAL .....	18
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	18
<b>4</b>	<b>MATERIAS E MÉTODOS.....</b>	<b>19</b>
4.1	MATERIAIS UTILIZADOS.....	19
4.1.1	<b>Material Vegetal .....</b>	<b>19</b>
4.1.2	<b>Animais.....</b>	<b>19</b>
4.1.3	<b>Solventes e reagentes.....</b>	<b>20</b>
4.1.4	<b>Equipamentos.....</b>	<b>20</b>
4.2	MÉTODOS.....	20
4.2.1	<b>Obtenção do extrato aquoso de repolho roxo .....</b>	<b>20</b>
4.2.2	<b>Obtenção do extrato metanólico de repolho roxo.....</b>	<b>21</b>
4.2.3	<b>Determinação de compostos fenólicos totais .....</b>	<b>21</b>
4.2.4	<b>Quantificação de flavonoides totais .....</b>	<b>21</b>

4.2.5	Quantificação de Antocianinas Totais (AT).....	22
4.2.6	Quantificação de carotenoides totais .....	23
4.2.7	Quantificação de ácido ascórbico (vitamina C) .....	23
4.2.8	Caracterização de compostos fenólicos por Cromatografia Líquida Alta Eficiência (CLAE).....	24
4.2.9	Capacidade antioxidante .....	24
4.2.10	Indução da hiperlipidemia e tratamento .....	25
4.2.11	Quantificação dos parâmetros lipídicos séricos .....	25
4.2.12	Índice aterogênico e risco cardiovascular .....	26
4.2.13	Quantificação de parâmetros bioquímicos (creatinina, ureia, alanina aminotransferase - ALT) e aspartato transaminase (AST).....	26
4.2.14	Quantificação de lipídios em fígado e rim.....	26
4.2.15	Análise estatística .....	27
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>28</b>
5.1	RENDIMENTO DOS EXTRATOS .....	28
5.2	ENSAIOS QUÍMICOS.....	28
5.2.1	Compostos Fenólicos .....	28
5.2.2	Flavonoides totais .....	29
5.2.3	Carotenoides totais .....	30
5.2.4	Vitamina C.....	30
5.2.5	Quantificação de Antocianinas totais.....	31
5.2.6	Identificação de Compostos Fenólicos .....	32
5.2.7	Capacidade antioxidante .....	35
5.3	ENSAIOS BIOLÓGICOS.....	36
5.3.1	Colesterol total, triglicerídeos, lipoproteínas.....	36

5.3.2	Índice Aterogênico e Risco cardiovascular .....	41
5.3.3	Parâmetros bioquímicos: marcadores de função renal e hepática .....	42
5.3.4	Quantificação de lipídios em órgãos (fígados e rins) .....	45
6	CONCLUSÃO.....	47
	REFERÊNCIAS.....	49
	ANEXO A - RESUMO CIFARP .....	55

## 1 INTRODUÇÃO

As dislipidemias são fatores de risco que aceleram o desenvolvimento de doença coronária e a progressão da aterosclerose, que se trata de uma doença inflamatória crônica que ocorre em resposta à injúria endotelial. Inicia-se com a agressão ao endotélio vascular devida à elevação de lipoproteínas aterogênicas, dessa maneira, ocorrendo aumento da permeabilidade da camada íntima às lipoproteínas plasmáticas, assim as partículas de LDL retidas sofrem oxidação e produzem um acúmulo maciço de colesterol responsável pela lesão endotelial e comprometimento da estrutura anatômica (YU et al., 2000; LUSIS, 2000).

Recentemente, tem-se verificado que substâncias antioxidantes são capazes de reduzir a oxidação do colesterol LDL (SALÁN, 2000; DUCHNOWICZ, 2012) e de reverter a disfunção endotelial provocada pela hipercolesterolemia, bem como reduzir o número de eventos coronários (TSELEPIS, 2002). Medicamentos ou substâncias hipolipidêmicas, como os fibratos e as estatinas, reduzem o número de eventos e de mortalidade ou doença coronária. Porém, por causa do valor comercial elevado, efeitos adversos e uma perspectiva de uso contínuo, os pacientes têm recorrido a tratamentos alternativos para o controle da hipercolesterolemia (JAIN et al., 2010).

Alguns estudos epidemiológicos têm relacionado o consumo de uma dieta rica em frutas e legumes com um risco reduzido de incidência de doenças crônicas como o câncer e a doença cardiovascular (HEIMLER, 2006). Fontes alimentícias podem auxiliar no combate de radicais livres através do fornecimento de substâncias antioxidantes que evitam a oxidação do colesterol LDL e da peroxidação lipídica (THURNHAM, 1994).

O repolho roxo (*Brassica oleracea* L. var. capitata f. rubra) é valorizado pelos consumidores pela sua versatilidade culinária, principalmente, devido às suas características como sabor agradável e cor avermelhada, a qual acentua o valor estético do vegetal, além de ser um alimento de fácil conservação (WICZKOWSKI et al., 2013). É bem conhecido por sua riqueza nutricional, diretamente relacionada ao número de substâncias bioativas presentes em sua composição, em particular, compostos fenólicos, tais como antocianinas, flavonóis e polifenóis (SINGH et al.,

2006). Recentemente, um estudo indicou que o repolho roxo é uma fonte rica de antocianinas aciladas, o que provê ao vegetal uma atividade antioxidante em potencial, fato este muito importante no que se refere à prevenção de doenças associadas ao estresse oxidativo (WICZKOWSKI et., 2013), como as cardiovasculares e também neurodegenerativas (HEO et al., 2006; TAROZZI et al., 2013). Em um estudo realizado *in vitro*, os polifenóis presentes no repolho roxo reduziram a concentração do colesterol em eritrócitos de indivíduos hipercolesterolêmicos (DUCHNOWICZ et al., 2012).

Os flavonoides e outros compostos fenólicos apresentam atividades antioxidantes potentes, *in vitro*, sendo essas substâncias capazes de sequestrar uma vasta gama de espécies de oxigênio reativas e espécies de cloro, tais como o superóxido, radicais hidroxila, radicais peroxila, ácido hipocloroso e ácido peroxinitroso. Também, podem quelar íons metálicos, geralmente, diminuindo a atividade pró-oxidantes desses íons. Há evidências consideráveis que indicam que o aumento do dano oxidativo está associado e pode contribuir para o desenvolvimento de todas as principais doenças relacionadas com a idade (HALLIWELL; RAFTER; JENNER, 2005).

Diante desses fatos, atribui-se o interesse na pesquisa por agentes antioxidantes, em benefício da saúde humana, com ênfase no que se refere às pesquisas relacionadas à horticultura e ciências dos alimentos. Esse estudo teve como objetivo investigar características químicas e a atividade hipolipidêmica de extratos de repolho roxo.

## 2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 2.1 DESCRIÇÃO BOTÂNICA DA FAMÍLIA *BRASSICACEAE*

*Brassicaceae* constitui uma família botânica composta por 338 gêneros e 3.709 espécies. São plantas de grande importância para a alimentação humana, cultivadas praticamente em todo o mundo, entre elas, destaca-se o gênero *Brassica* (FRANZKE et al., 2011), caracterizado por desenvolver um ciclo curto e ampla adaptabilidade, por essas razões, adequado para o cultivo em diferentes épocas e ambientes (HAMLER et al., 2006).

Os efeitos benéficos das Brassicaceas sobre a saúde têm sido, em parte, atribuídos à sua complexa mistura de compostos fitoquímicos que possuem atividade antioxidante. Nos últimos anos, grande atenção tem sido direcionada para a identificação de antioxidantes naturais que podem ser utilizados para consumo humano. Entre os fitoquímicos que possuem capacidade antioxidante, os compostos fenólicos são um dos grupos mais importantes. Estes compostos são amplamente dispersos por todo o reino vegetal e caracterizados por ter, pelo menos, um anel aromático com um ou mais grupo hidroxilo ligado. Compostos fenólicos são produzidos em plantas como metabolitos secundários por meio da via do ácido chiquímico (CARTEA, 2011).

Essas moléculas podem ser classificadas com base no número e arranjo de seus átomos de carbono em flavonoides (flavonóis, flavonas, flavan-3-ols, antocianidinas, flavanonas, isoflavonas e outros) e não flavonoides (ácidos fenólicos, hidroxinâmico e outros) e são comumente encontrados conjugados com açúcares e ácidos orgânicos. O grupo mais amplo e diversificado de polifenóis em espécies de *Brassica* são os flavonoides, principalmente flavonóis e antocianinas e os ácidos hidroxicinâmicos (CROZIER, 2006; CARTEA, 2011).

O repolho (*Brassica oleracea* L. var. capitata) é considerada a hortaliça mais importante da família *Brassicaceae*, destacando-se pela sua alta taxa de crescimento e valor nutritivo (LÉDO et al., 2000).

Quadro 1 - Espécies e grupos de *Brassica oleraceae*

Espécie	Grupo	Nome comum
<b><i>Brassica oleracea</i></b>	<i>Acephala</i>	Couve
	<i>capitata capitata</i>	<b>Repolho</b>
	<i>capitata sabauda</i>	Couve-lombarda
	<i>Costata</i>	Couve-tronchuda
	<i>Gemmifera</i>	Couve de bruxelas
	<i>botrytis botrytis</i>	Couve-flor
	<i>botrytis itálica</i>	Brocolis
	<i>Gongylodes</i>	Nabo
	<i>Albogabra</i>	Couve chinesa

Fonte: Adaptado de CARTEA et al. (2011).

## 2.2 REPOLHO ROXO (*BRASSICA OLERACEA* L. VAR. *CAPITATA* F. *RUBRA* DC.)

A planta de repolho é herbácea, formada por inúmeras folhas arredondadas, dispostas em imbricação, dando origem a uma cabeça compacta (parte comestível do vegetal) (LÉDO et al., 2000).

O repolho é uma hortaliça folhosa, com grande versatilidade, não somente pelo seu valor nutritivo (LÉDO et al., 2000). Existem duas espécies de repolho, o repolho liso (*B. oleracea* L. var. *capitata* L.), de maior expressão comercial no Brasil, e o repolho crespo (*B. oleracea* L var. *sabauda* Martens). Podem ser classificados segundo a forma (achatada e pontuda) e a cor da cabeça verde, branca ou roxa (*Brassica oleracea* L. var. *capitata* f. *rubra* DC.) (Figura 1) (SILVA, 2009).

O repolho roxo (*Brassica oleraceae* L. var *capitata*) tem como região de origem a costa mediterrânica e a costa ocidental europeia (ARAPITSAS, 2008). Entre as variedades da espécie *Brassica oleracea*, o repolho é a hortaliça de maior expressão econômica em âmbito mundial, tanto pela sua ampla distribuição e cultivo como também pelo seu vasto consumo (NUNES, 2004). No Brasil, a produção está localizada predominantemente em pequenas áreas do sul e sudeste (STOFFELLA, 1990).

Atribui-se aos celtas a introdução do repolho na Europa, no século IX, e, na América, pelos conquistadores europeus por volta do século XV (LÉDO et al., 2000).

**Figura 1 - *Brassica oleracea* L. var. capitata f. rubra DC.**



Fonte: A autora.

### 2.3 ESTUDO FITOQUÍMICO E ATIVIDADE BIOLÓGICA DO REPOLHO ROXO

Antes de ser utilizado como um alimento, o repolho foi avaliado para fins medicinais no tratamento de dores de cabeça, gota, diarreia e úlceras pépticas (CHENEY, 1950).

Estudos epidemiológicos e com animais revelaram que o consumo desse vegetal está relacionado a um impacto positivo na saúde humana (DUCHNOWICZ, 2012) e na prevenção de doenças cardiovasculares, bem como de alguns tipos de câncer (ARAPITSAS, 2008). Recentemente, um estudo indicou que o repolho roxo é uma fonte rica de antocianinas aciladas, o que provê ao vegetal uma atividade antioxidante em potencial, fato este muito importante no que se refere à prevenção de doenças associadas ao estresse oxidativo (WICZOWSKI, 2013), como as cardiovasculares e também neurodegenerativas (HEO; LEE, 2006; TAROZZI et al., 2013).

Em um estudo realizado *in vitro*, os polifenóis presentes no repolho roxo reduziram a concentração do colesterol em membrana de eritrócitos de pacientes diagnosticados com hipercolesterolemia. Estes compostos foram responsáveis também pela inibição da atividade da ATP-ase, o que pode causar um distúrbio no transporte de íons através das membranas, atividade que provavelmente está relacionada aos flavonoides (DUCHNOWICZ, 2012).

A capacidade antioxidante dos compostos fenólicos do repolho roxo é superior em comparação a do repolho branco, essa diferença pode ser em razão do conteúdo de compostos fenólicos, incluindo antocianinas. Segundo Heo e Lee (2006), o repolho roxo possui efeito quimioprotetor, que pode ser responsável por benefícios em doenças neurodegenerativas, como a doença de Alzheimer.

Mais de 30 compostos de antocianinas já foram identificados no repolho roxo. Aproximadamente, 322mg de antocianinas por 100 g de peso fresco de repolho roxo pode ser obtida (WU et al., 2006). A principal dificuldade, descrita em literatura, em determinar o benefício para a saúde humana que o consumo de alimentos ricos em antocianinas pode ofertar, é devido as antocianinas formarem misturas heterogêneas, ao invés de compostos isolados. Diante disso, alguns autores sugerem que devem ser levados em consideração o potencial de ação pró-oxidante destes compostos e seus extratos (CAO et al., 1997; KOLODZIEJCZYK et al., 2011).

Outro aspecto evidenciado nos últimos anos é o crescente interesse por corantes naturais em substituição aos sintéticos, e o repolho roxo é uma fonte rica para esse tipo de pesquisa (LOPES et al., 2007), porém é escassa a literatura quando se deseja conhecer mais quanto à composição fenólica.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar a composição fitoquímica do repolho roxo e a atividade hipolipidêmica do tratamento com o extrato aquoso do repolho roxo em animais submetidos à hiperlipidemia experimental.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliação do extrato aquoso e metanólico da amostra de repolho roxo.
- Quantificação de compostos fenólicos totais, flavanoides totais, vitamina C, carotenoides e antocianinas totais.
- Identificação química e quantificação dos compostos fenólicos presentes nos extratos de repolho roxo.
- Avaliar a capacidade antioxidante dos extratos de repolho roxo.
- Determinar a atividade hipolipidêmica, empregando protocolo experimental *in vivo*, através de ensaios bioquímicos e análise de conteúdo lipídico em órgãos.

## 4 MATERIAS E MÉTODOS

### 4.1 MATERIAIS UTILIZADOS

#### 4.1.1 Material Vegetal

A amostra de repolho roxo (*Brassica oleraceae* L. var capitata f. rubra DC.) utilizada neste estudo foi adquirida no comércio local (Blumenau/SC), em janeiro de 2013. O repolho roxo utilizado foi produzido no município de Urubici/SC, localizado no Planalto Serrano Catarinense (Latitude 28° 0'5"S Longitude: 49° 35' 30" W), em uma área de 1.071km<sup>2</sup>, principal produtor no estado, de hortaliças diversificadas, produzindo-as nos meses do verão (ALBUQUERQUE, 2012).

O material vegetal foi submetido à secagem em estufa a 45°C, com ventilação forçada e, em seguida, macerado com nitrogênio líquido para preservação dos antioxidantes da amostra (armazenamento: -10°C) - figura 2 (DUCHNOWICZ, 2012).

Figura 2 - Repolho roxo *in natura* (esq.) e material vegetal obtido após secagem (dir.)



Fonte: A autora.

#### 4.1.2 Animais

Todos os ensaios biológicos foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de

Animais da Fundação Universidade Regional de Blumenau (FURB), Protocolo de nº009/2013. Foram utilizados ratos Wistar da espécie *Rattus norvegicus*, adultos (8 – 10 semanas de idade), de ambos os sexos, fornecidos pelo Biotério Central da FURB. Os animais foram mantidos em condições de temperatura ( $25\pm 3^{\circ}\text{C}$ ), ciclo claro-escuro de 12/12h, fornecendo-lhes água e ração *ad libitum*.

#### **4.1.3 Solventes e reagentes**

Os solventes e reagentes utilizados eram de grau analítico procedentes das marcas: Vetec, Laborclin e Synth, e a água utilizada nos experimentos foi previamente destilada.

Para avaliação bioquímica foram utilizados kits reagentes, Labtest e Bioclin.

#### **4.1.4 Equipamentos**

Os cromatogramas foram obtidos em cromatógrafo líquido (Shimadzu LC-10A), equipado com uma coluna C18 de fase reversa (Shim-pack C18, 250min x 4,6 milímetros  $\varnothing$  partícula de 5  $\mu\text{m}$ ,  $30^{\circ}\text{C}$ ), protegido por uma pré-coluna, e um detector de UV-visível (280nm), sendo as condições de análise descritas no item métodos.

As determinações bioquímicas foram realizadas através de fotolorímetro da marca BIOPLUS, modelo BIO 2000.

Para as análises fitoquímicas, foi utilizado espectrofotômetro de Ultravioleta UV-VIS Spectrum meter (SP-2000 UV).

## **4.2 MÉTODOS**

### **4.2.1 Obtenção do extrato aquoso de repolho roxo**

O material vegetal foi submetido à extração em meio aquoso com 15 minutos de decocção em ausência de luz, na proporção de 2 g de material vegetal para 100mL de água destilada (DUCHNOWICZ, 2012).

Para obtenção do rendimento, foi realizada a evaporação do extrato e, para cálculo do rendimento (%) a partir de extrações em triplicata, foi utilizado o peso total da amostra e o peso seco obtido após evaporação.

#### **4.2.2 Obtenção do extrato metanólico de repolho roxo**

O material vegetal foi submetido à extração em metanol 70% (v/v) por 15 minutos, sobre agitação, em ausência de luz incidente, na proporção de 2g de material vegetal para 100mL (DUCHNOWICZ, 2012).

Para obtenção do rendimento, o extrato foi realizado por evaporação, para cálculo do rendimento (%) a partir de extrações em triplicata, foi utilizado o peso total da amostra e o peso seco obtido após a evaporação.

O extrato metanólico foi submetido à rota-evaporação por 02 horas, em diferentes temperaturas (50° e 90°), para posterior análise.

#### **4.2.3 Determinação de compostos fenólicos totais**

Os compostos fenólicos totais dos extratos (item 4.2.2) foram determinados por espectrofotometria utilizando o reagente Folin Ciocalteau, pelo método descrito por Singleton e Rossi (1965). Os extratos permaneceram em repouso por 60 minutos (em temperatura ambiente na ausência de luz), a absorbância foi medida a 725nm. A concentração final foi estabelecida pela curva padrão do ácido gálico e os resultados expressos em equivalente de ácido gálico (EAG) em mg/g de peso seco.

#### **4.2.4 Quantificação de flavonoides totais**

Para quantificação de flavonoides do extrato aquoso 2 g da amostra, foi extraída com 10mL de etanol (em temperatura ambiente na ausência de luz). As análises foram realizadas pela mistura de  $AlCl_3$  (2%) e 2,5 ml de etanol e a leitura foi realizada a 420 nm. Foi utilizada para quantificação uma curva padrão de quercetina; e o resultado foi expresso em equivalente de quercetina (EQ) em mg/g

do material seco (WOISKY; SALATINO, 1998).

#### **4.2.5 Quantificação de Antocianinas Totais (AT)**

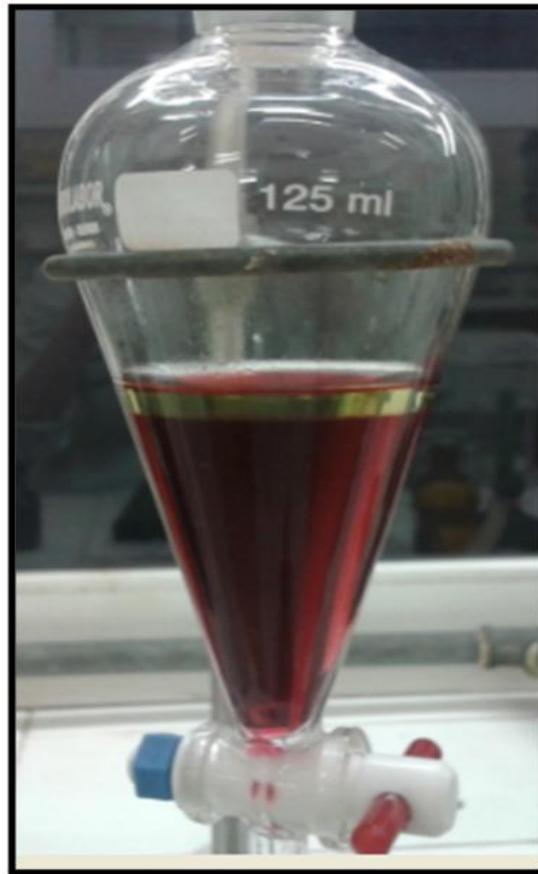
Os dois métodos utilizados (pH único e pH diferencial) para a quantificação de antocianinas foram adaptados a partir dos trabalhos de Fuleki & Francis (1968).

Para quantificação das antocianinas, foram utilizados 15 g do material vegetal e adicionados 80 mL de Etanol:Água (70:30) e HCl (0,2 N) suficiente para ajustar o pH do meio para 2,0. O material permaneceu em repouso por 24 horas, a 5°C, ao abrigo da luz. Ao final do período, foi realizada filtração para reter o resíduo, e o extrato foi transferido para balão volumétrico de 100mL, com o volume completado com Etanol:Água (70:30). A solução do balão foi então centrifugado a 2000rpm, por 10 minutos, e o sobrenadante foi filtrado. O sobrenadante foi purificado, com a realização de extrações do conteúdo de clorofila (Figura 3).

Para a determinação do pH único foi transferida uma alíquota do extrato concentrado (descrito acima) e o volume completado com solução Etanol 95%:HCl 1,5N (85:15). Para o método de pH diferencial, foram utilizadas soluções tampão pH 1,0 e 4,5. As alíquotas do extrato concentrado foram transferidas para balões volumétricos e os volumes completados com as soluções tampões pH 1,0 e pH 4,5, respectivamente.

As absorbâncias nos dois métodos foram avaliadas em espectrofotômetro UV/VIS (535nm). O conteúdo total de antocianinas foi expresso em mg de antocianinas/100g da fração da amostra analisada (TEIXEIRA et al., 2008).

**Figura 3 - Extração de antocianinas (purificação do conteúdo de clorofila).**



Fonte: A autora.

#### 4.2.6 Quantificação de carotenoides totais

Para análise de carotenoides, foi utilizado 300 mg do material vegetal e a extração foi realizada com hexano/acetona (1:1), com a adição de 100mg de butil hidroxitolueno (BHT). A leitura foi realizada em 450 nm. O cálculo para quantificação teve como base o coeficiente de absorção, previamente descrito. O resultado foi expresso em equivalente de  $\beta$ -caroteno ( $E\beta$ -caroteno) em mg/g do peso seco (BRITTON, 1982).

#### 4.2.7 Quantificação de ácido ascórbico (vitamina C)

A extração da vitamina C foi realizada a partir de 20mL do extrato aquoso do repolho roxo, a qual foi titulado com solução de iodato de potássio ( $KIO_3$  0,01N). A titulação da quantidade de vitamina C (ácido ascórbico) nas amostras foi feita



#### 4.2.10 Indução da hiperlipidemia e tratamento

Os animais foram divididos em um total de 07 grupos experimentais em número de 6 a 11 animais por grupo:

- Grupo 01- controle positivo (Tyloxapol);
- Grupo 02- controle negativo (salina);
- Grupo 03- (Tyloxapol+ repolho roxo 125 mg/Kg);
- Grupo 04- (Tyloxapol+ repolho roxo 250 mg/Kg);
- Grupo 05- (Tyloxapol+ repolho roxo 500 mg/Kg);
- Grupo 06- (Tyloxapol + Fenofibrato 65 mg/Kg);
- Grupo 07- controle (repolho roxo 500 mg/Kg).

Para indução da hiperlipidemia experimental, foi injetado, via intraperitoneal, (i.p) Tyloxapol (ICN Biomedicals Inc.) na dose de 400mg/Kg (OLIVEIRA et al., 2002; CASTRO et al., 2012). Apenas os Grupos 2 e 7 não receberam tratamento com o Tyloxapol. Em seguida à administração do Tyloxapol, os animais receberam tratamento por via oral, com salina (Grupo1) ou extrato aquoso de repolho roxo (Grupos 3,4 e 5). Os animais do Grupo 6 receberam tratamento com Fenofibrato (65mg/Kg) (HARNAFI et al., 2007; KUMAR *et al.*, 2011). E os Grupos 2 e 7 receberam apenas tratamento por via oral com salina e extrato de repolho roxo, respectivamente. Em todos os grupos, o tratamento por via oral se manteve por 72 horas, em um total de seis doses (duas vezes ao dia por três dias). Ao final do terceiro dia (72h), os animais foram sacrificados e, imediatamente após, foram coletadas amostras de sangue e órgãos para determinação dos parâmetros lipídicos.

#### 4.2.11 Quantificação dos parâmetros lipídicos séricos

Para obtenção do perfil lipídico plasmático, as amostras de sangue coletadas foram processadas em centrífuga, durante 05 minutos, e os soros foram separados para determinação das concentrações séricas de colesterol total (CT), triglicerídeos (TG) e colesterol HDL (HDL) (FURTADO et al., 2011). Os resultados foram obtidos

através de métodos colorimétricos, de acordo com as instruções dos kits (Labtest e Bioclin). O resultado de VLDL e LDL foram obtidos através da equação de Friedewald, em que  $VLDL = TG/5$  e  $LDL = CT - (HDL+VLDL)$  (SALÁN et al., 2000).

#### **4.2.12 Índice aterogênico e risco cardiovascular**

Para análise do efeito do perfil lipídico sérico na progressão da aterosclerose e risco de doenças cardiovasculares, foram utilizados para o cálculo o índice aterogênico (CT-HDL/HDL) e o risco cardiovascular (CT/HDL) (WAN et al., 2013).

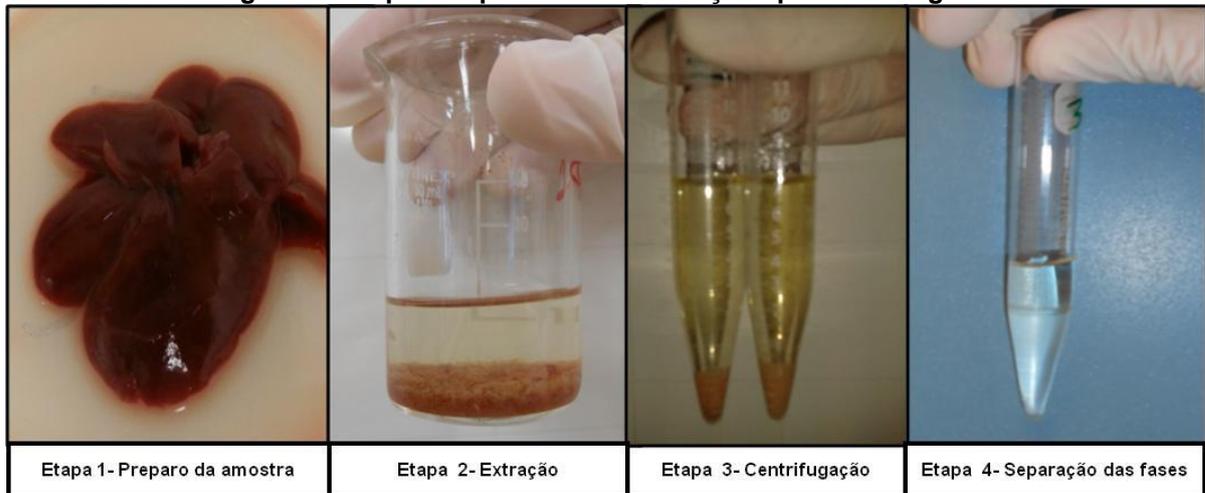
#### **4.2.13 Quantificação de parâmetros bioquímicos: creatinina, ureia, alanina aminotransferase (ALT) e aspartato transaminase (AST)**

Para obtenção dos parâmetros bioquímicos, as amostras de sangue coletadas foram processadas em centrífuga durante 05 minutos, e os soros foram separados (FURTADO et al., 2011) para determinação das concentrações séricas de creatinina, ureia, ALT e AST. Os resultados foram obtidos através de métodos colorimétricos de acordo com as instruções dos kits comerciais (Labtest e Bioclin).

#### **4.2.14 Quantificação de lipídios em fígado e rim**

Para quantificação de lipídios nos órgãos dos animais, foi utilizado o método descrito por Wan et al. (2013). Imediatamente após o sacrifício e a coleta de sangue, os órgãos dos animais foram removidos (rins e fígado) e conservados refrigerados. Para análise dos lipídios, foram utilizadas amostras de 2 g de fígado e 1 g de rim. Foi realizado uma extração com clorofórmio:metanol (2:1), em uma concentração de 01 grama de órgão para 20ml do solvente. Após extração, a solução foi filtrada e submetida à centrifugação. Em seguida, a uma alíquota de 10 ml do extrato foram adicionada 2ml de água destilada submetendo-se novamente à centrifugação. Ao final, a fase superior foi seca em estufa e pesada (Figura 5). Os valores foram expressos em peso de lipídio por grama de órgão.

**Figura 5 - Etapas do processo de extração lipídica de órgãos.**



Fonte: A autora.

#### 4.2.15 Análise estatística

Os resultados obtidos foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão (DP) ou erro padrão da média (EPM) e avaliados através da análise de variância de uma via (ANOVA; Graph Pad versão 3.09), com nível de significância para  $p \leq 0,05$ , seguido de teste *post hoc* (Tukey) quando necessário.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 RENDIMENTO DOS EXTRATOS

Em relação ao rendimento dos extratos de repolho roxo, foi possível obter  $50,40 \pm 6,57\%$  para o extrato aquoso e  $44,44 \pm 0,56\%$  para o extrato metanólico. Observou-se, então, variação significativa no rendimento do extrato aquoso, o qual pode estar relacionado às diferenças nos potenciais antioxidantes e à polaridade dos compostos presentes nos extratos (ANDREO; JORGE, 2006).

### 5.2 ENSAIOS QUÍMICOS

#### 5.2.1 Compostos fenólicos

O resultado das análises dos compostos fenólicos totais, de acordo com o método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu, encontram-se dispostas no quadro 2.

**Quadro 2 - Quantificação de compostos fenólicos totais nos extratos aquoso e metanólico de repolho roxo.**

<b>Amostra</b>	<b>Fenólicos Totais (mg/g)</b>
Extrato aquoso	$116,02 \pm 0,03$
Extrato metanólico a 50°C	$22,05 \pm 0,002$
Extrato metanólico a 90°C	$19,64 \pm 0,002^*$

Fonte: Dados da pesquisa

Valores médios  $\pm$  DP de determinações em triplicata (resultados expressos em peso seco) \*P<0,01.

Em relação aos extratos metanólicos (50° e 90°) e aquoso, foi possível observar uma concentração significativamente maior de compostos fenólicos no extrato aquoso, o que pode ser atribuído à capacidade da água em extrair com eficiência os compostos fenólicos com atividade antioxidante. Tal fato é atribuído devido à sua polaridade.

Em relação à diferença de temperatura entre os extratos metanólicos, este

parâmetro pode afetar a determinação dos compostos bioativos, desse modo, o aumento da temperatura pode diminuir o conteúdo total de compostos fenólicos (CONDE et al., 1998).

A análise fitoquímica quantitativa realizada com o extrato aquoso de repolho roxo comprovou a presença de compostos fenólicos em quantidade superiores (2320 mg/L) à identificada na literatura (1453 mg/L), pelo mesmo método de análise (DUCHNOWIVZ, 2012).

### 5.2.2 Quantificação de flavonoides totais

Segundo Dovichi e Lajolo (2009), o valor nutracêutico atribuído aos flavonoides, além da capacidade antioxidante, tem sido altamente considerado nas pesquisas em nutricionais, pois os seus alimentos ricos em flavonoides são de baixo custo e comumente consumidos.

Em relação à atividade biológica, esses compostos mostram uma variedade de efeitos farmacológicos, entre seus efeitos, incluem-se: inibição da oxidação do LDL (redução de placas ateroscleróticas), inibição da agregação plaquetária (efeito antitrombótico), promoção da vasodilatação (efeito anti-hipertensivo e antiarritmia) e também modificação da síntese de eicosanoides, portanto, propriedades anti-inflamatórias (COSTA; MARTINEZ, 1997)

Foi possível observar também uma quantidade importante de flavonoides na amostra do vegetal, representando 16% do peso seco de material vegetal ( $161,32 \pm 0,01$ mg/g) (Quadro 3). Devido às diferentes metodologias utilizadas para a quantificação de flavonoides, não foi possível estabelecer uma comparação com valores da literatura.

**Quadro 3 - Quantificação de flavonoides totais dos extratos de repolho roxo.**

<b>Amostra</b>	<b>Flavonoides Totais (mg/g)</b>
Extrato aquoso	161,32±0,014
Extrato metanólico a 50°C	117,54±0,001
Extrato metanólico a 90°C	123,33±0,004

Fonte: Dados da pesquisa.

Valores médios  $\pm$  DP de determinações em triplicata (resultados expressos em peso seco) \*P<0,01.

### 5.2.3 Carotenoides totais

O  $\beta$ -caroteno é outro importante antioxidante encontrado nas frações lipídicas solúveis dos sistemas biológicos, o qual atua protegendo as membranas celulares contra radicais livres. Singh e colaboradores (2006) relatam a presença significativa de  $\beta$ -caroteno na composição do repolho roxo. Em relação à quantificação de carotenoides, foi possível identificar um valor duas vezes maior quando comparado com os dados da literatura supracitada (0,44 mg/g para 0,89 mg/g, neste estudo).

Os carotenoides constituem uma família de mais de 600 membros já identificados na natureza, desses, cerca de 50 podem funcionar como precursores de vitamina A. O  $\beta$ -caroteno é o mais abundante na natureza, algumas das fontes conhecidas são: cenouras e abóboras, tomates e goiaba vermelha. O efeito protetor do  $\beta$ -caroteno, demonstrado em diferentes modelos experimentais *in vitro* e *in vivo*, tem sido atribuído mais a uma ação do próprio pigmento, produzido a partir do seu metabolismo endógeno (SILVA; NAVES, 2001).

### 5.2.4 Vitamina C

A vitamina C (ácido ascórbico) possui numerosas atividades biológicas, inclusive, a de reduzir os níveis de proteína C-reativa (PCR), um marcador da inflamação e um preditor de doença cardíaca. Mais de 85% da vitamina C na dieta é proveniente de frutas e hortaliças (SESSO, 2008; KONTUSH et al., 1996). O ácido ascórbico atua como um cofator enzimático, com efeito protetor contra radicais superóxido e radicais hidroxilo, e também como um dador de elétrons através da membrana plasmática (SINGH et al., 2006).

O resultado obtido na quantificação de vitamina C ( $4,45 \pm 0,74$  mg/g) foi superior quando comparado com dados da literatura (0,24 mg/g) (SINGH et al., 2006).

O teor de vitamina C entre as *Brassicas* pode variar significativamente entre suas subespécies e de acordo com variações de cultivo (PODSEK, 2007).

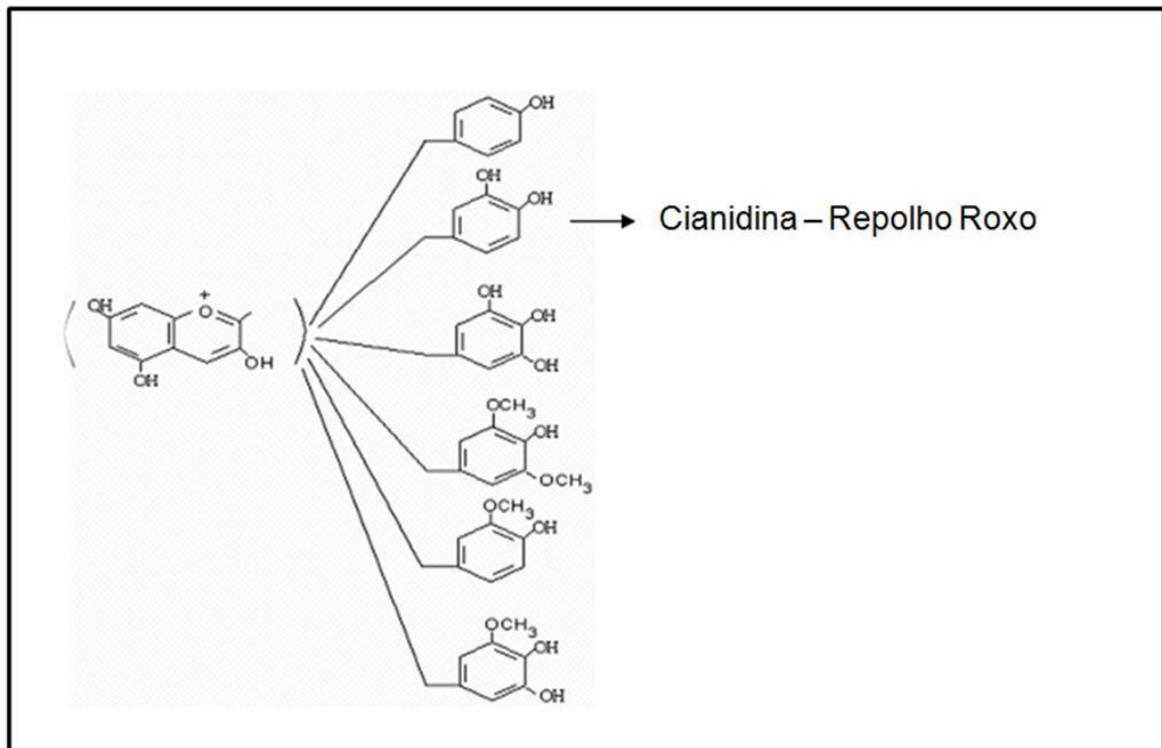
### 5.2.5 Quantificação de antocianinas totais

As antocianinas são responsáveis pela coloração avermelhada do repolho roxo (CARTEA, 2011). Elas compõem o maior grupo de pigmentos solúveis em água do reino vegetal e são fontes de pesquisa em todo o mundo como corantes naturais em alimentos (LOPES, 2012).

Extratos ricos em antocianina têm revelado possuir uma variedade de funções terapêuticas, incluindo antioxidantes, cardioprotetores e propriedades hepatoprotetoras (SANKHARI et al., 2011).

A estrutura química básica das antocianinas é baseada em uma estrutura policíclica de quinze carbonos, conforme figura 6.

**Figura 6 - Estrutura química das antocianinas.**



Fonte: Adaptado de Lopes et al. (2012).

Foi possível observar que, segundo os resultados obtidos com este trabalho (Quadro 4), o método pH único apresentou uma concentração superior para antocianinas quando comparado ao método pH diferencial, porém alguns autores sugerem que ambos os métodos possam ser empregados com sucesso desde que

não existam interferentes no meio (presença de taninos e compostos sulfurosos) (TEIXEIRA et al., 2008).

O repolho roxo apresenta um teor relativamente baixo de antocianinas (contém em média de 175 mg/100g) (LOPES et al., 2006) quando comparado com outros alimentos, como a uva - que pode alcançar 750mg/100g, porém o repolho é uma fonte de baixo valor comercial quando comparado à uva (TEIXEIRA et al., 2008).

**Quadro 4 - Quantificação de antocianinas totais e comparação com outros resultados disponíveis na literatura.**

<b>Referência</b>	<b>pH único</b>	<b>pH diferencial</b>
Este estudo	59,94 ± 0,075	47,21 ± 0,42
SANKHARI et al., 2012	50,21 ± 3.45	---
TEIXEIRA et al., 2008	24,36 ± 1,53	61,44 ± 3,71
LOPES et al., 2006	175	---

Fonte: Dados da pesquisa.

O resultado foi expresso em mg/100g do material seco (média ± D.P).

### 5.2.6 Identificação de compostos fenólicos

Os compostos fenólicos são distribuídos em diversas categorias, como fenóis simples, ácidos fenólicos (derivados de ácidos benzoico e cinâmico), cumarinas, flavonoides, estilbenos, taninos condensados e hidrolisáveis, lignanas e ligninas. Esses compostos têm recebido muita atenção nos últimos anos, sobretudo por inibirem a peroxidação lipídica e a lipooxigenase.

A atividade antioxidante de compostos fenólicos deve-se principalmente às suas propriedades redutoras. As características químicas (Figuras 7, 8 e 9) desempenham uma função importante na neutralização e sequestro de radicais livres, agindo na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo (SOUSA et al., 2007).

Os compostos fenólicos identificados e quantificados no extrato aquoso e no extrato metanólico estão descritos nos quadros 5 e 6, respectivamente. No total, foram identificados e quantificados sete compostos, no extrato aquoso e três

compostos fenólicos no extrato metanólico. Não houve diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre os compostos identificados em ambos os extratos, exceto para epicatequina ( $p < 0,01$ ) que foi superior para o extrato metanólico. Foram identificadas quatro moléculas no extrato aquoso, as quais não foram identificadas no extrato metanólico (ácido gálico, ácido tânico, epigalocatequina e 4,5-dicafeoilquínico).

O maior número de fenólicos identificados para o extrato aquoso comparado ao metanólico pode ter ocorrido pelo fato dos compostos fenólicos do repolho roxo serem mais solúveis em meio aquoso.

**Quadro 5 - Compostos fenólicos do extrato aquoso de repolho roxo em (mg/100g).**

Compostos Fenólicos	Tempo de retenção (min)	Extrato Aquoso do RR
NI	4,17	668,79 ± 59,46
NI	4,39	685,36 ± 78,55
Ácido gálico	5,23	729,59 ± 22,58
Epicatequina	4,93	541,88 ± 16,93
Ácido tânico	5,95	320,04 ± 56,22
Galocatequina	6,80	1081,89 ± 177,55
Epigalocatequina	8,15	351,17 ± 1,67
Ácido cafeico	15,34	38,98 ± 10,84
NI	30,52	1038,89 ± 151,82
4,5-dicafeoilquínico	39,48	5742,07 ± 3811,46

Fontes: Dados da pesquisa

Valores médios ± DP de determinações em triplicata (resultados expressos em peso seco). NI: Não identificado.

**Quadro 6 - Compostos fenólicos do repolho roxo em extrato metanólico (mg/100g).**

Compostos Fenólicos	Tempo de retenção (min)	Extrato Metanólico do RR
Epicatequina	4,68	728,92 ± 9,51
NI	5,08	464,50 ± 18,50
Galocatequina	6,62	713,51 ± 32,03*
Ácido cafeico	15,76	40,78 ± 3,97
NI	27,58	863,74 ± 26,55

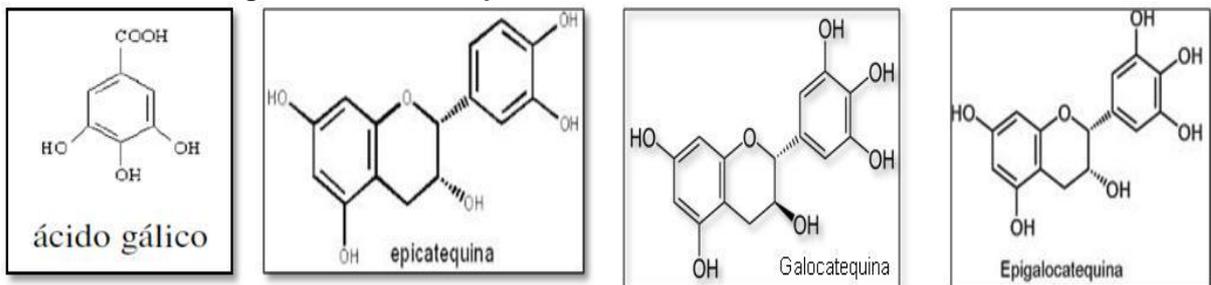
Fonte: Dados da pesquisa.

Valores médios  $\pm$  DP de determinações em triplicata (resultados expressos em peso seco). NI: Não identificados \*P < 0,01.

O ácido gálico tem importância considerável na dieta por inibir o processo de peroxidação lipídica. A galocatequina, a epicatequina e a epigalocatequina são conhecidas por suas propriedades antioxidantes e por inibir o processo de carcinogênese (PIRES, 1999).

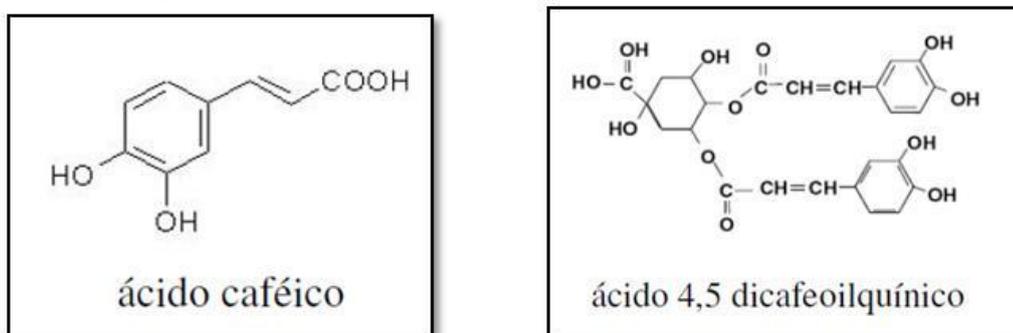
O ácido cafeico é o principal representante dos ácidos hidroxicinâmicos, conhecido por sua atividade antioxidante e também por inibição da peroxidação lipídica, através da redução de radicais lipoperóxil (por meio da doação de um hidrogênio). O ácido tânico é um tanino hidrolisável que pode ser encontrado em diversos alimentos tais como, uva, vinho, cerveja e lentilhas. Dentre as atividades biológicas atribuídas ao ácido tânico, inclui-se a capacidade em diminuir o perfil lipídico sérico e níveis de lipoperóxidos em ratos hipertensos (MATTOS, 2009).

**Figura 7 - Estrutura química dos derivados hidroxibenzoicos.**



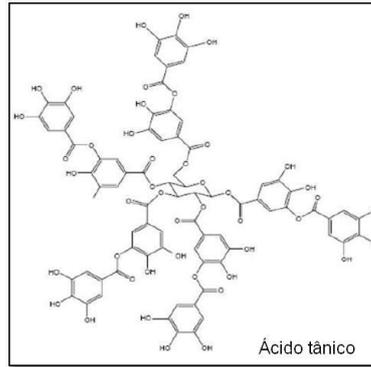
Fonte: Adaptado de Souza et al. (2006); Lamarão et al. (2009)

**Figura 8 - Estrutura química dos derivados hidroxicinâmicos.**



Fonte: Adaptado de Oliveira e Bastos (2011)

**Figura 9 - Estrutura química do derivado tanino hidrolisável**



Fonte: Adaptado de Manetti et al. (2009)

### 5.2.7 Capacidade antioxidante

Entre os principais constituintes químicos do repolho roxo, encontram-se os compostos fenólicos (flavonoides, derivados do ácido hidroxibenzoico e hidroxicinâmico e antocianinas), aos quais os estudos prévios têm atribuído ações antioxidante e hipolipidêmicas (DUCHNOWICZ et al., 2012). Estudos epidemiológicos têm apontado que o consumo de alimentos ricos em compostos fenólicos podem reduzir o risco de doenças cardiovasculares e a progressão da aterosclerose. A atividade antioxidante desses compostos está relacionada à capacidade redox em razão da sua habilidade de sequestrar radicais livres, desse modo, atuando como doador de hidrogênio, e capacidade de quelar metais, assim, reduzindo o estresse oxidativo celular (HALLIWELL et al., 2005).

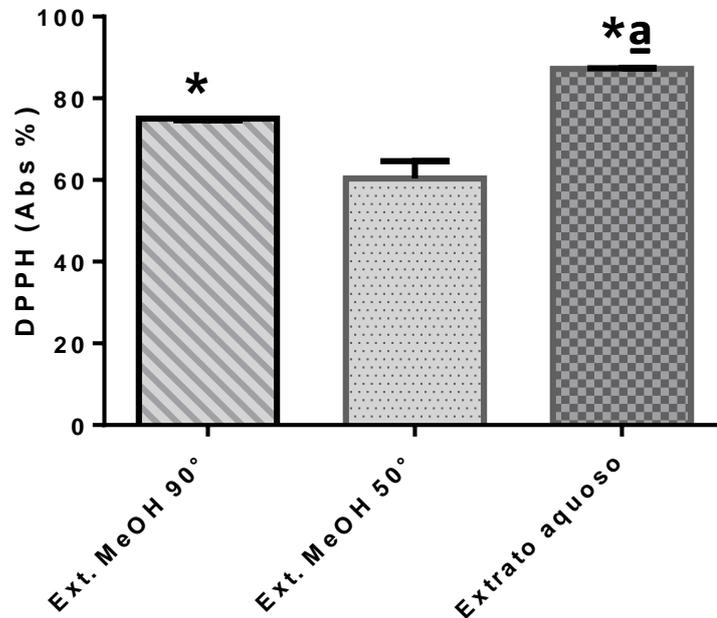
Relativamente à capacidade antioxidante analisada pelo ensaio com o radical DPPH (Figura 7), observou-se um potencial antioxidante apresentado pelo extrato aquoso (72,82  $\mu\text{mol/g}$ ) superior ao resultado obtido com o ácido ferúlico (2,14  $\mu\text{mol/g}$ ). Porém semelhante ao potencial de inibição (87,45%) de outro estudo que utilizou a mesma metodologia para amostra de repolho roxo (BOO et al., 2012).

Alguns autores sugerem que a atividade antioxidante superior do repolho roxo em comparação com as outras cultivares verde e branca pode ser em virtude da presença de diferentes componentes antioxidantes, tais como compostos fenólicos (CARTEA, 2011).

Neste estudo, o extrato aquoso de RR quando comparado aos extratos metanólicos assinalou uma capacidade antioxidante significativamente superior ( $p < 0,01$ ). Esse alto valor de inibição pode ser atribuído à quantidade alta de

compostos fenólicos identificados no extrato aquoso por CLAE.

Figura 10 - Comparação do potencial antioxidantes dos extratos de repolho roxo.



Fonte: Dados da pesquisa.

Resultados expressos de acordo com a média  $\pm$ DP. \* $p < 0.01$  quando comparados com o Ext. MeOH 50° e <sup>a</sup> $p < 0.01$ , quando comparado com o Ext. MeOH 90°.

### 5.3 ENSAIOS BIOLÓGICOS

Diante da análise fitoquímica realizada, foi possível selecionar o extrato aquoso do repolho roxo para os ensaios *in vivo* por apresentar-se como o mais promissor para a investigação biológica quando comparado com as amostras do extrato metanólico. Além disso, descartou-se o uso de um solvente tóxico somado à semelhança do extrato com a preparação de alimentos para humanos.

#### 5.3.1 Colesterol total, triglicerídeos e lipoproteínas

O Tyloxapol (Triton WR 1339) é um detergente não aniônico de estrutura polimérica, com capacidade de inibir a lipoproteína lipase (LPL) e induzir o aumento

do colesterol e triacilgliceróis séricos. Tem sido amplamente utilizado como modelo hiperlipidêmico experimental com diversos objetivos, incluindo avaliação do efeito hipolipidêmico de substâncias naturais (FURTADO et al., 2001; OLIVEIRA et al., 2002; CASTRO et al., 2006; SUN et al., 2006; VIJAYARA et al., 2013).

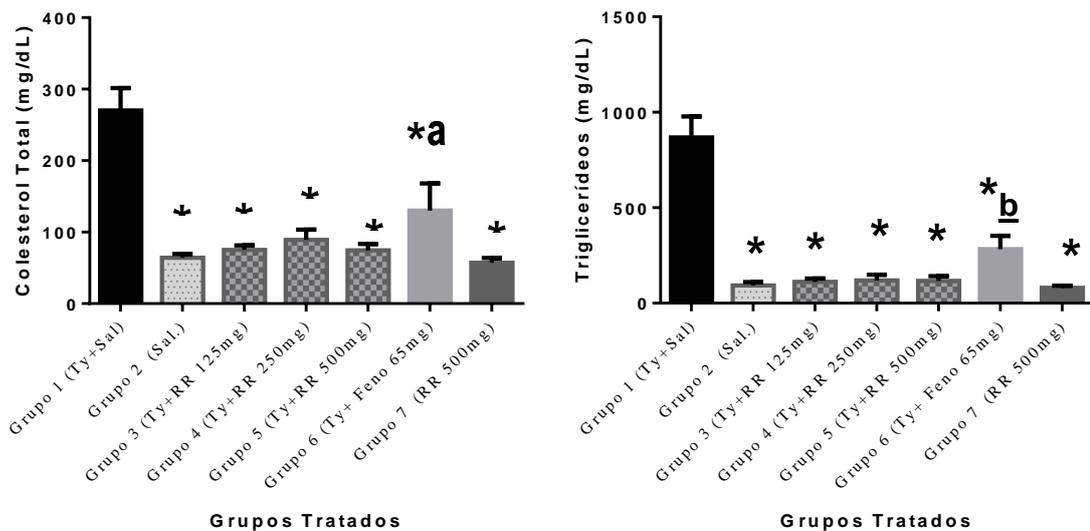
A administração de Tyloxapol (400mg/Kg, i.p.) causou hipercolesterolemia e hipertrigliceridemia dentro das 72 horas em que os animais permaneceram em tratamento. O Tyloxapol aumentou em aproximadamente nove vezes a concentração dos triglicerídeos e em quatro vezes os níveis de colesterol sérico em relação ao grupo tratado apenas com salina (Grupo 2).

Portanto, para o estudo, a dose de 400 mg/Kg foi considerada eficiente para elevar o perfil lipídico dos animais tratados, resultado que reflete estudos anteriores cujas doses de Tyloxapol descritas variaram de 100 a 600m/Kg de peso corporal naturais (FURTADO et al., 2001; OLIVEIRA et al., 2002; CASTRO et al., 2006; SUN et al., 2006; VIJAYARA et al., 2013).

Após as 72 horas, foi possível constatar que os tratamentos com os extratos aquosos do repolho roxo de 125 mg/kg, 250 mg/Kg e 500 mg/Kg (Grupos 3, 4 e 5) reduziram os níveis do colesterol total em 73%, 67% e 72% ( $p < 0,01$ ), respectivamente, em relação ao grupo tratado apenas com o Tyloxapol + salina (Grupo 1) (Figura 8). Os animais tratados com terapia padrão com Fenofibrato (Grupo 6) reduziram o CT em 41%.

Em relação aos níveis séricos de triglicerídeos, os animais tratados com repolho roxo reduziram em média 87% ( $p < 0,01$ ) quando comparados com os animais do Grupo 1. Os animais tratados com Fenofibrato reduziram os TG em 65% em relação ao Grupo 1. Os animais tratados apenas com extrato de repolho roxo (Grupo 7) não apresentaram diferença estatística quando comparados com os animais controle tratados com salina (Figura 8), o que demonstra que o extrato de repolho roxo na maior dose não alterou *per se* os parâmetros testados.

**Figura 11 - Efeito do extrato aquoso de repolho roxo em ratos hiperlipidêmicos induzidos com Tyloxapol sobre os níveis de colesterol e triglicerídeos sérico.**



Fonte: Dados da pesquisa

Grupo 1 - Ratos hiperlipidêmicos induzidos com Tyloxapol e salina (Ty e Sal), Grupo 2 – Controle tratado com salina (Sal), Grupos 3, 4 e 5 – Ratos hiperlipidêmicos (Ty) e tratados com extratos de repolho roxo (RR), Grupo 6 - Ratos hiperlipidêmicos (Ty) e tratados com Fenofibrato (Feno) e Grupo 7 – Controle tratado com extrato de repolho roxo (RR). Resultados expressos de acordo com a média  $\pm$  EPM. \* $p < 0.01$  quando comparados com o Grupo 1, <sup>a</sup>  $p < 0.01$  quando comparado com o Grupo 3 e Grupo 7 e <sup>b</sup>  $p < 0.01$  quando comparado com o Grupo 7.

Esses resultados *in vivo* indicam, pela primeira vez, o efeito benéfico do extrato aquoso de repolho roxo em relação à hiperlipidemia e reforçam os resultados positivos de estudos utilizando extratos metanólicos. *In vitro*, com membranas de eritrócitos de pacientes hipercolesterolêmicos, que apresentaram redução dos níveis de colesterol, esses resultados foram atribuídos aos polifenóis presentes no extrato metanólico e, *in vivo*, com ratos hiperlipidêmicos (DUCHNOWICZ et al., 2012; SANKHARI et al., 2012).

Em relação às lipoproteínas plasmáticas (HDL, VLDL e LDL), observou-se que a concentração sérica de HDL reduziu significativamente para os animais tratados com Fenofibrato quando comparados com o grupo controle tratado com Tyloxapol ( $p < 0,05$ ).

O Fenofibrato é um fármaco de regulação lipídica, que está estruturalmente relacionado com outros derivados do ácido fíbrico, tais como clofibrato, produzindo reduções substanciais nos níveis de triglicerídeos no plasma de pacientes hipertrigliceridêmicos, níveis totais de colesterol e nas concentrações de lipoproteínas ricas em triglicerídeos. É responsável por aumentar a expressão gênica da lipase lipoproteica (LPL) pela hidrólise de triglicerídeos (BALFOUR et al.,

1990).

A LPL é uma enzima localizada no endotélio vascular de tecidos extra-hepáticos, como tecido adiposo, coração e músculo esquelético, a qual é responsável pela depuração das lipoproteínas circulantes. Sua atividade pode sofrer alteração rapidamente em resposta ao estado nutricional (FERREIRA, 2007). É responsável pela hidrólise das lipoproteínas dos TG, a qual fornece os lipídios necessários para formação do colesterol HDL (ALMEIDA et al., 2007). Portanto a captação e a deposição dos TG plasmáticos no tecido adiposo requerem sua conversão inicial para ácidos graxos não esterificados e glicerol, numa reação catalisada pela LPL (FERREIRA, 2007).

Não houve alteração nos resultados de HDL entre os grupos tratados com RR em comparação com o Grupo 1, demonstrando assim que o RR não foi capaz de modificar o índice sérico do HDL. O HDL é responsável pelo transporte do colesterol até o fígado, denominado transporte reverso do colesterol, assim o HDL tem funções que contribuem para a proteção vascular contra a aterosclerose, tais como proteção da oxidação do LDL (TSELEPIS; CHAPMAN, 2002), inibição da fixação de moléculas de adesão e monócitos ao endotélio e estimulação da liberação de óxido nítrico (SPOSITO, 2007).

O resultado para o VLDL foi significativo para todos os grupos ( $p < 0,01$ ) quando comparados com o Grupo 1, evidenciando o RR como um potencial redutor dessa lipoproteína plasmática. A maior parte de VLDL plasmática é de origem hepática e transporta os triglicerídeos do fígado para os tecidos extra-hepáticos. Os triglicerídeos das VLDL são hidrolisados pela LPL (SPOSITO, 2007), o que justifica o aumento do VLDL em animais tratados com Tyloxapol, onde a LPL está inibida. Já nos grupos tratados (3, 4, 5 e 6), houve a redução dos níveis de VLDL devido à redução significativa dos triglicerídeos séricos. Não houve diferença entre os grupos tratados com RR e com o Fenofibrato. Essa redução dos níveis séricos de VLDL pode sugerir uma ativação da LPL pelo RR semelhante ao efeito do Fenofibrato.

Em relação aos valores de LDL, não foi identificada diferença estatisticamente significativa entre os grupos tratados e o Grupo 1.

**Quadro 7 - Efeito do extrato aquoso de repolho roxo sobre as lipoproteínas plasmáticas, HDL, VLDL e LDL.**

<b>Grupos tratados</b>	<b>HDL (mg/dl)</b>	<b>VLDL (mg/dl)</b>	<b>LDL (mg/dl)</b>
<b>Ty+Salina</b>	43,08 ± 8,26	173,63 ± 21,87	53,45 ± 9,82
<b>Salina</b>	30,3 ± 4,79	18,52 ± 3,55**	15,26 ± 2,58
<b>Ty+RR 125mg</b>	27,28 ± 5,38	22,36 ± 3,48**	25,55 ± 5,89
<b>Ty+RR 250mg</b>	23,18 ± 3,95	23,87 ± 5,90**	42,2 ± 10,71
<b>Ty+RR 500mg</b>	24,65 ± 5,21	23,40 ± 5,08**	26,45 ± 7,61
<b>Ty+ Feno 65mg</b>	14,66 ± 3,83*	56,73 ± 13,79**	58,72 ± 25,96
<b>RR 500mg</b>	21,51 ± 3,63	16,1 ± 2,36**	19,6 ± 4,52

Fonte: Dados da pesquisa.

Os valores de HDL VLDL e LDL foram expressos de acordo com a média ±EPM. \*p<0,05 e \*\*p<0,01 quando comparados com o Grupo1.

Muitos estudos relacionam a atividade hipocolesterolêmica de determinados vegetais à atividade antioxidante de seus constituintes, como é o caso dos flavonoides por estarem relacionados com o aumento da atividade das enzimas antioxidantes e reduzir, assim, a oxidação das lipoproteínas de baixa densidade ou através da diminuição da agregação plaquetária (WICZKOWSKI et al., 2013).

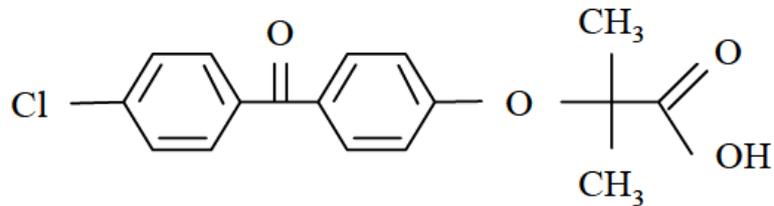
Desta maneira, as alterações induzidas pelo RR, no perfil lipídico dos animais tratados com Tyloxapol, foi benéfica e importante para a redução dos fatores de riscos associados a doenças cardiovasculares. Em vista que disfunções lipídicas como a hipercolesterolemia e a hipertrigliceridemia são fatores de risco conhecidos por acelerarem o desenvolvimento de doença coronária e a progressão da aterosclerose (STEIN et al., 2005)

Em um estudo crônico (08 semanas) que avaliou o potencial hipolipidêmico e hipocolesterolêmico de um extrato de repolho roxo rico em antocianinas foi sugerido que as antocianinas são compostos que têm um papel importante como cardioprotetores e contra o estresse oxidativo induzido por uma dieta calórica (SANKHARI et al., 2012).

A terapia padrão utilizada para comparação nesse estudo, o fenofibrato (Figura 9), atua como agonista dos Receptores nucleares ativados pelos

proliferadores de peroxissomos (PPAR). Os PPARs são fatores de transcrição que regulam a homeostase da glicose, metabolismo de lipídeos e inflamação. São responsáveis por controlar a expressão de enzimas chave do metabolismo de lipídios, incluindo a LPL. Exercem efeitos benéficos no tratamento de dislipidemias, os quais estão relacionados ao aumento do catabolismo das lipoproteínas ricas em triacilgliceróis à redução da secreção de VLDL pelo fígado e ao aumento da produção das apolipoproteínas que compõem a HDL (FERREIRA, 2007).

**Figura 12 - Estrutura química do Fenofibrato.**



Fonte: Ferreira, 2007.

Diante dos resultados obtidos, pode ser realizada uma comparação entre os efeitos biológicos do RR e do Fenofibrato, dessa forma, seriam necessários estudos que avaliassem a possibilidade do RR em promover a ativação transcricional mediada pelos PPARs.

### 5.3.2 Índice Aterogênico e Risco cardiovascular

A indução de hiperlipidemia a partir da utilização de Tyloxapol resultou em elevação no perfil lípidos séricos, porém o Fenofibrato ou RR não foram capazes de melhorar o índice sérico do HDL durante o tempo de estudo (72h). Por isso não foi possível observar alterações significativas no índice aterogêncio e no fator de risco cardiovascular quando comparados animais tratados com Fenofibrato e RR em relação ao Grupo 1 (hiperlipidêmico), porque ambos os marcadores de doença cardiovascular dependem do resultado do HDL (Figura 13).

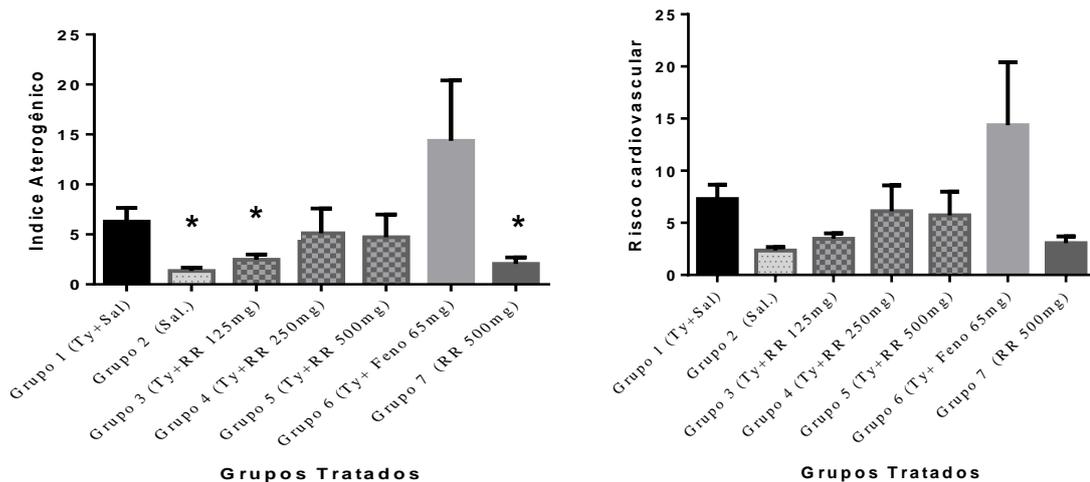
Na avaliação do índice aterogênico, houve uma diferença significativa ( $p < 0,05$ ) dos grupos tratados com Salina, Ty+ RR 125mg/kg e RR 500mg/Kg

respectivamente, em relação ao grupo de animais tratados com Ty+ Fenofibrato. Portanto foi possível observar que o extrato de RR melhorou este índice até mesmo em relação ao tratamento padrão com Fenofibrato, porém foram similares quando comparados com o Grupo 2, o qual recebeu apenas salina.

Em estudo crônico realizado com o extrato de RR rico em antocianinas cujos níveis de HDL foram elevados de forma significativa para os animais induzidos à hiperlipidemia e tratados com RR, quando comparados com o controle positivo (hiperlipidêmico), porém não foi possível observar alteração significativa no Índice Aterogênico (SANKHARI et al., 2012), diferente do resultados obtidos nesse estudo.

Na análise do risco cardiovascular, não foi possível observar nenhuma diferença significativa em relações aos grupos tratados (Figura 13).

**Figura 13 - Marcadores de doença cardíaca: Índice aterogênico e risco cardiovascular.**



Fonte: Dados da pesquisa.

Grupo 1 - Ratos hiperlipidêmicos induzidos com Tyloxapol e salina Grupo 2 – Controle tratado com salina Grupos 3, 4 e 5 – Ratos hiperlipidêmicos (Ty) tratados com extratos de repolho roxo, Grupo 6 - Ratos hiperlipidêmicos (Ty) e tratados com Fenofibrato (Feno) e Grupo 7 – Controle tratado com extrato de repolho roxo (RR). Resultados expressos de acordo com a média ±EPM. \*p < 0.05 quando comparados com o Grupo 6.

### 5.3.3 Parâmetros bioquímicos: marcadores de função renal e hepática

A avaliação da função renal dos grupos tratados no estudo foi realizada através dos marcadores bioquímicos de ureia e creatinina (Quadro 8). Os parâmetros normais de creatinina podem variar de 0,2 a 0,8 mg/dl (ratos), diante desse fato, foi possível verificar que os valores, em todos os grupos, mantiveram-se

dentro da faixa considerada normal (padrão), porém, neste estudo, observou-se uma diminuição significativa ( $p < 0,05$ ) dos valores nos grupos de animais que foram tratados com Tyloxapol. Pelo excessivo aumento de lipídios nestes grupos, pode ter havido uma diminuição de locomoção e menor atividade muscular, o que explicaria a diminuição desses valores. Assim, serão necessárias observações comportamentais para confirmar este efeito do Tyloxapol.

Portanto, nas condições experimentais deste estudo, não foi possível observar níveis elevados de creatinina, os quais poderiam indicar uma alteração na taxa de filtração glomerular e, conseqüentemente, alteração na função renal.

Na análise da ureia, foi possível detectar alterações dos limites considerados normais (32 a 54 mg/dl), porém não foi observada diferença significativa entre os resultados obtidos. Portanto, no período do estudo, não foi possível detectar indicativos de alteração nos parâmetros da ureia compatíveis com lesão renal.

**Quadro 8 - Marcadores de função renal: ureia e creatinina.**

<b>Grupos</b>	<b>Creatinina mg/dl (Média ± DP)</b>	<b>Ureia mg/dl (Média ± DP)</b>
<b>Ty+Salina</b>	0,38 ± 0,22	75,75 ± 59,3
<b>Salina</b>	0,63 ± 0,1*	50,66 ± 14,4
<b>Ty+RR 125mg</b>	0,47 ± 0,1	44,69 ± 5,53
<b>Ty+RR 250mg</b>	0,5 ± 0,03	47,01 ± 15,27
<b>Ty+RR 500mg</b>	0,53 ± 0,08	44,76 ± 13,47
<b>Ty+ Feno 65mg</b>	0,59 ± 0,2	58,14 ± 10,54
<b>RR 500mg</b>	0,69 ± 0,12*	63,58 ± 11

Fonte: Dados da pesquisa.

Grupo 1 - Ratos hiperlipidêmicos induzidos com Tyloxapol e salina (Ty e Sal), Grupo 2 – Controle tratado com salina (Sal), Grupos 3, 4 e 5 – Ratos hiperlipidêmicos (Ty) e tratados com extratos de repolho roxo (RR), Grupo 6 - Ratos hiperlipidêmicos (Ty) e tratados com Fenofibrato (Feno) e Grupo 7 – Controle tratado com extrato de repolho roxo (RR). Resultados expressos de acordo com a média ±EPM. \* $p < 0.05$  quando comparados com o Grupo 1.

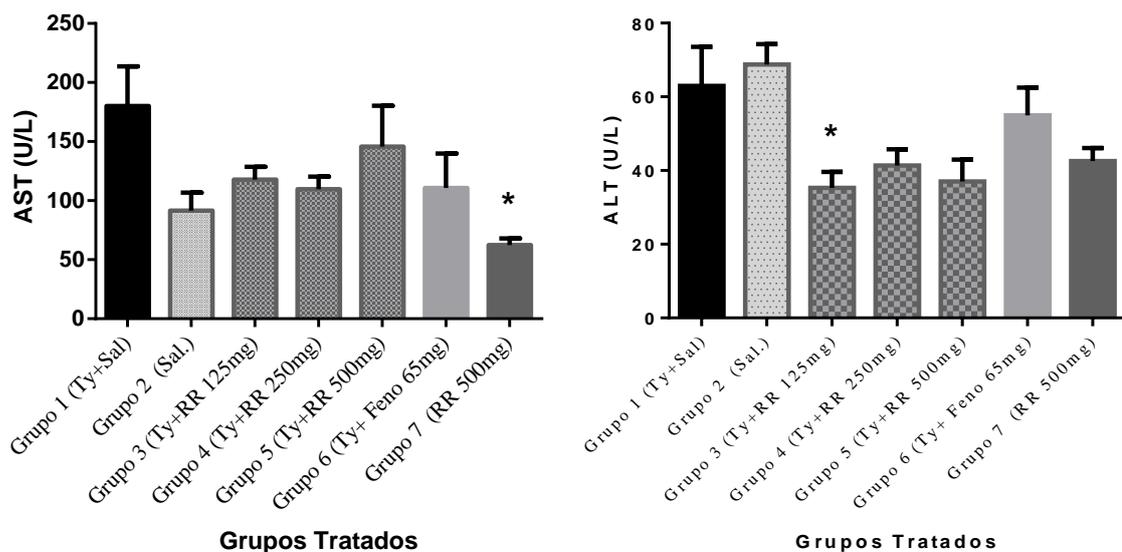
Em relação aos marcadores de função hepática (Figura 11), para AST, foi possível identificar uma redução significativa ( $p < 0,05$ ) para o Grupo 7 (RR 500 mg/Kg) quando comparado com o grupo controle Tyloxapol + salina. Esse resultado sugere que o tratamento apenas com extrato de RR *per se* resultou em uma

melhoria nesse parâmetro. Contudo não houve diferença significativa entre os grupos TY e controle.

Os resultados do presente trabalho comparados com dados da literatura permitiram observar que o tratamento agudo com Tyloxapol proporcionou resultados bastante elevados para AST (180,18 UI/L), superiores ao tratamento crônico com dieta hipercalórica identificado na literatura (70,17 UI/L) (SANKHARI et al., 2012).

Os índices de ALT avaliados foram significativos apenas para o Grupo 2 (Tyloxapol + RR 125mg/Kg), esse grupo apresentou uma redução de quase 44% em relação ao grupo hiperlipidêmico (Grupo 1), assinalando um efeito benéfico neste parâmetro em relação aos controles.

**Figura 14 - Marcadores de função hepática: ALT e AST.**



Fonte: Dados da pesquisa.

Grupo 1 - Ratos hiperlipidêmicos induzidos com Tyloxapol e salina Grupo 2 – Controle tratado com salina Grupos 3, 4 e 5 – Ratos hiperlipidêmicos (Ty) tratados com extratos de repolho roxo, Grupo 6 - Ratos hiperlipidêmicos (Ty) e tratados com Fenofibrato (Feno) e Grupo 7 – Controle tratado com extrato de repolho roxo (RR). Resultados expressos de acordo com a média  $\pm$  EPM. \*p < 0.01 quando comparados com o Grupo 1.

Em casos de lesão hepática (esteatose), podem ser detectados níveis até cinco vezes os limites superiores dos valores de referência, dependendo das condições do progresso da destruição celular. Nestes casos, a atividade da AST é maior que a ALT, e a relação AST/ALT frequentemente é maior que 1 (MOTTA,

2014).

De acordo com a avaliação da função hepática, foi possível identificar que a relação AST/ALT (Quadro 9), apresentada neste trabalho, superior a 1 em todos os grupos e não mostrou significância. Diante desse resultado, não foi possível identificar que, no tempo de tratamento e nas doses utilizadas, o Tyloxapol provocou lesões hepáticas nos animais tratados, porém fica claro que os parâmetros de ALT e AST estavam aumentados no Grupo 1.

**Quadro 9 - Marcadores de função hepática: relação das aminotransferases AST/ALT.**

<b>Grupos</b>	<b>Relação AST/ALT</b>
<b>Ty+Salina</b>	3,11 ± 0,78
<b>Salina</b>	1,32 ± 0,16
<b>Ty+RR 125mg</b>	3,64 ± 0,38
<b>Ty+RR 250mg</b>	2,87 ± 0,40
<b>Ty+RR 500mg</b>	5,66 ± 2,43
<b>Ty+ Feno 65mg</b>	2,12 ± 0,42
<b>RR 500mg</b>	1,45 ± 0,22

Fonte: Dados da pesquisa.  
Resultados expressos de acordo com a média ±EPM

#### **5.3.4 Quantificação de lipídios em órgãos (fígados e rins)**

A doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) é uma condição clínico-patológica caracterizada por acúmulo de lipídeos no interior dos hepatócitos, é causa principal de morbidade e mortalidade ligadas a doenças do fígado. Os portadores podem ser assintomáticos, e apresentar elevações discretas das enzimas hepáticas (SOLER et al., 2008). A prevalência mundial ainda não foi determinada, porém é a doença hepática mais comum no mundo ocidental e está aumentando de maneira considerável principalmente nos indivíduos obesos (CARVALHEIRA et al., 2006).

Em virtude da importância em se avaliar a eficiência do extrato do RR em beneficiar a redução do acúmulo de lipídios nos órgãos (fígado e rim), foram realizados os ensaios para quantificação desses lipídios. A metodologia utilizada foi descrita por Wan et al. (2012).

De acordo com os resultados do quadro 10, não foi possível estabelecer, no período do estudo, um padrão de acúmulo lipídico significativo nos órgãos entre os grupos tratados, pois não houve diferença estatística significativa entre esses grupos.

**Quadro 10 - Quantificação de Lipídios em órgãos (fígado e rim).**

<b>Grupos</b>	<b>Lipídios Fígado (Média ± DP)</b>	<b>Lipídios Rim (Média ± DP)</b>
<b>Ty+Salina</b>	0,02 ± 0,01	0,03 ± 0,01
<b>Salina</b>	0,04 ± 0,03	0,03 ± 0,01
<b>Ty+RR 125mg</b>	0,04 ± 0,02	0,04 ± 0,01
<b>Ty+RR 250mg</b>	0,04 ± 0,01	0,03 ± 0,01
<b>Ty+RR 500mg</b>	0,04 ± 0,01	0,03 ± 0,00
<b>Ty+ Feno 65mg</b>	0,03 ± 0	0,02 ± 0,01
<b>RR 500mg</b>	0,04 ± 0	0,02 ± 0,01

Fonte: Dados da pesquisa.

Resultados expressos em grama de lipídio por grama de órgão, de acordo com a média ±DP.

## 6 CONCLUSÃO

Os resultados experimentais permitiram concluir que o extrato aquoso em relação ao extrato metanólico do repolho roxo é uma fonte superior de compostos fenólicos, flavonoides e carotenoides, também, com um potencial antioxidante mais elevado.

A análise fitoquímica contribuiu para indicar um melhor potencial do extrato aquoso em relação ao metanólico, considerando o número superior de compostos fenólicos identificados e quantificados, o que revelou ser a escolha mais adequada para os ensaios biológicos.

Após 72 horas de experimento, foi possível constatar que o tratamento com extratos aquosos do repolho roxo de 125 mg/kg, 250 mg/Kg e 500 mg/Kg foram responsáveis por uma redução significativa nos níveis de colesterol total em até 73% e, em média 87%, nos níveis de triglicerídeos quando comparados com os animais hiperlipidêmicos.

Na avaliação do índice aterogênico, houve uma diferença significativa ( $p < 0,05$ ) dos grupos tratados com salina, RR 125 mg e RR 500 mg, em relação ao grupo de animais tratados com Fenofibrato. Foi possível observar que o RR dado isoladamente não ofereceu alterações nesse parâmetros quando comparados com o grupo controle.

Em relação aos marcadores de função renal e hepática, não foi possível estabelecer uma relação de lesão entre os níveis de lipídios séricos e deposição em órgãos, na indução pelo Tyloxapol, apesar de alguns parâmetros com tendência à alteração (ALT, AST) e alterados como a creatinina. Entretanto, foi possível observar alguns efeitos benéficos do RR *per se*.

Em virtude dos resultados positivos obtidos com o extrato do repolho roxo, os seus possíveis efeitos e mecanismos de ação podem ser atribuídos à capacidade de estimular a expressão gênica da lipase lipoproteica, a qual pode proporcionar um efeito antagonista à atividade do Tyloxapol, semelhante aos efeitos do fenofibrato utilizado neste estudo.

Neste estudo foi possível observar que, através do modelo agudo hiperlipidêmico, os benefícios do repolho roxo, quando relacionados à redução de

hipercolesterolemia e hipertrigliceridemia, representaram um potencial terapêutico para as doenças cardiovasculares, aliado a uma fonte alimentícia de fácil acesso e vasto consumo.

Estudos complementares se fazem necessários para ampliar a identificação de compostos fenólicos e avaliação do exato mecanismo de ação do extrato aquoso de repolho roxo em relação à hiperlipidemia. Além de uma avaliação prolongada (estudo crônico) a fim de comparar resultados obtidos, com o presente trabalho, principalmente para avaliação de parâmetros aterogênicos.

## REFERÊNCIAS

- ALBUQUERQUE, I. C. O papel do ecoturismo no Município de Urubici-SC. Dissertação de Mestrado em Engenharia Ambiental. Florianópolis, 2004.
- ALEXÉIEV, V. N. *Análise quantitativa*. 3. ed. Mir. Moscou. Lopes da Silva, 1983.
- ALMEIDA, A. P. F. et al. Dislipidemias e diabetes mellitus: fisiopatologia e tratamento. *Revista de Ciências Médicas*, v. 16, n. 4/6, 2007.
- ANDREO, D.; JORGE, N. Antioxidantes naturais: técnicas de extração. Curitiba. B.CEPPA, v.24, n.2, p.319-336, 2006.
- ARAPITSAS, P.; SJÖBERG, P. J. R.; TURNER, C. Characterization of anthocyanins in red cabbage using high resolution liquid chromatography coupled with photodiode array detection and eletrospray ionization-linear ion trap mass spectrometry. *Food Chemistry*, n.109, p.219-226, 2008.
- BALFOUR, J. A.; MCTAVISH, D.; HEEL, R. C. Fenofibrate. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and therapeutic use in dyslipidaemia. *Drugs*, n. 40, v.2, p.260-90, 1990.
- BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. *Rev Nutr.*, v. 12, n. 2, p. 123-30, 1999.
- BOO, H. O. et al. Extraction and characterization of some natural plant pigments. *Industrial Crops and Products*, v. 40, p. 19-135, 2012.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Science and Technology*. v.28, p.25-30, 1995.
- BRITTON, G. UV/visible spectroscopy. In: BRITTON, G.; LIAAEN-JENSEN, S.; PFANDER, H. (eds.). *UV/visible spectroscopy*. Birkhäuser Verlag: Basel, 1982. p. 13-62.
- CAO, G.; SOFIC, E.; PRIOR, R. L. Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure activity relationships, *Free Radic. Biol. Med.*, v. 22, p. 749-760, 1997.

- CARTEA, M. E. et al. Phenolic compounds in *Brassica* vegetables. *Molecules*, v. 16, p. 251-280, 2011.
- CARVALHEIRA, J. B. C.; SAAD, M. J. A. Doenças associadas à resistência à insulina/hiperinsulinemia, não incluídas na síndrome metabólica. *Arq. Bras. Endocrinol. Metab.*, v. 50, p. 360-367, 2006.
- CASTRO, K. F.; ARTONI, S. M. B.; PACHECO, M. R. Perfil lipídico sérico de ratos tratados com surfactante. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.*, São Paulo, v. 49, n. 3, p. 193-201, 2012.
- CHANDRASEKHAR, J.; NADHUSUDHAN, M. C.; RAGHAVARAO, K. S. M. S. Extraction of anthocyanins from red cabbage and purification using absorption. *Food and Bioproducts Processing*, v. 90, p. 625-523, 2012.
- CHENEY, G. Anti-peptic ulcer dietary factor. *J. Am. Diet Assoc.*, v. 26, p. 668-672, 1950.
- CONDE, E. et al. Polyphenolic composition of *Quercus suber* cork from different spanish provenances. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Easton, v. 46, n. 8, p. 3166-3171, 1998.
- COSTA, R. P.; MARTINEZ, T. L. R. Terapia Nutricional na Hipercolesterolemia. *Rev. Soc. Cardiol*, Estado de São Paulo, v. 7, n. 4, 1997.
- CROZIER, A.; JAGANATH, I. B.; CLIFFORD, M. N. Phenols, polyphenols and tannins: An overview. In: CROZIER, A.; CLIFFORD, M.; ASHIHARA, H. (eds.). *Plant Secondary Metabolites: Occurrence, Structure and Role in the Human Diet*. Blackwell: Oxford, UK, 2006. p. 1-24.
- DOVICH, S. S.; LAJOLO, F. M. Flavonoides e sua relação com doenças do Sistema Nervoso Central. *Nutrire*, v. 36, n. 2, p. 123-135, 2011.
- DUCHNOWICZ, P. et al. Effect of polyphenols extracts from *Brassica* vegetables on erythrocyte membranes (*in vitro* study). *Environmental Toxicology and Pharmacology*, v.34, p.783-790, 2012.

FERREIRA, A. V. M. *Efeito do fenofibrato sobre o metabolismo de ratos com ou sem indução de esteatose hepática*. Tese de Doutorado. Belo Horizonte, 2007.

Disponível em:

<[http://www.bibliotecadigital.ufmg.br/dspace/bitstream/handle/1843/MCSC-78GSJN/tese\\_adaliene\\_1\\_.pdf?sequence=1](http://www.bibliotecadigital.ufmg.br/dspace/bitstream/handle/1843/MCSC-78GSJN/tese_adaliene_1_.pdf?sequence=1)>. Acesso em: 10 dez. 2013.

FURTADO, D. R. L. et al. Efeito de *Cymbopogon citratus* Stapf em ratos hiperlipidêmicos. *Rev. Ciênc. Saúde*, São Luís, v. 13, n. 1, p. 11-19, 2011.

HALLIWELL, B.; RAFTER, J.; JENNER, A. Health promotion by flavonoids, tocopherols, tocotrienols, and other phenols: direct or indirect effects? Antioxidant or not? *Am J Clin Nutr*, v.81, 268S-76S, 2005.

HARNAFI, H. et al. The hypolipidaemic activity of aqueous *Erica multiflora* flowers extract in Triton WR-1339 induced hyperlipidaemic rats: A comparison with fenofibrate. *Journal of ethnopharmacology*, v. 109, n. 1, p. 156-160, 2007.

HEIMLER, D. et al. Antiradical activity and polyphenol composition of local Brassicaceae edible varieties. *Food Chemistry*, v. 99, n. 3, p. 464-469, 2006.

HEO, J. H.; LEE, C. Y. Phenolic phytochemicals in cabbage inhibit amyloid  $\beta$  protein-induced neurotoxicity. *LWT*, v. 39, p.330-336, 2006.

JAIN, K.S.; KULKARNI, R. R.; JAIN, D. P. Current drug targets for antihyperlipidemic therapy. *Mini Rev Med Chem*, v.10, p.232-62, 2010.

KONTUSH, A. et al. Antioxidant and prooxidant activity of  $\alpha$ -tocopherol in human plasma and low density lipoprotein. *The Journal of Lipid Research*, v. 37, p.1436-1448, 1996.

LAMARÃO, R.C.; FIALHOLL, E. Aspectos Funcionais das Catequinas do Chá Verde no Metabolismo Celular e Sua Relação Com a Redução da Gordura Corporal. *Revista de Nutrição* v.22, 2009.

LÉDO, F. J. S.; SOUSA, J. A.; SILVA, M. R. Avaliação de cultivares e híbridos de repolho no Estado do Acre. *Horticultura Brasileira*, Brasília, v. 18, n. 2, p. 138-140, jul. 2000.

LOPES, T. J. et al. Antocianinas: uma breve revisão das características estruturais e da estabilidade. *Rev. Bras. Agrociência*, Pelotas, v.13, n.3, p. 291-297, jul.-set. 2007.

LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* v. 193, p. 265-275, 1951.

LUSIS, A. J. Review article. Atherosclerosis. *Nature*, v. 407, p.233-41, 2000.

MATTOS, T.C.G. Mecanismos da ação antioxidante dos ácidos caféico e tânico em sistemas contendo íons ferro. Dissertação de mestrado. Brasília, 2009.

MOTTA, V.T. Bioquímica Clínica: Princípios e Interpretações. *Enzimas*, v.9. Disponível em: <<http://www.labclinisul.com.br/artigos/Bioq.Clinica%20%20Enzimas.pdf>>. Acesso em: 28 jan. 2014.

OLIVEIRA, D.M.; BASTOS, D. H. M.. Biodisponibilidade de ácidos fenólicos. *Quím. Nova*. v.34, n.6, p. 1051-1056, 2011.

OLIVEIRA, T. T. et al. Efeito de diferentes doses de flavonoids em ratos hiperlipidêmicos. *Revista de Nutrição*. v. 15, p.1-9, 2002.

PODSEDEK, A. Natural antioxidants and antioxidant capacity of Brassica vegetables: A review. *LWT-Food Science and Technology*, v. 40, n. 1, p. 1-11, 2007.

REBOLLO, C. et al. Vitamina c: una estrategia didáctica polifuncional. *Enseñanza de las ciencias*, v. 23, n. 1, p. 133-140, 2005.

SALÁN, M. E. et al. Analytical and Clinical Evaluation of Two Homogeneous Assays for LDL-Cholesterol in Hyperlipidemic Patients. *Clinical Chemistry*, v.46, n. 8, 2000.

SESSO, H. D. et al. Vitamins E and C in the prevention of cardiovascular disease in men: the Physicians' Health Study II randomized controlled trial. *JAMA*, v. 300, p.2123-33, 2008.

SILVA, C. R. M.; NAVES, M. M. V. Vitamin supplementation in cancer chemoprevention. *Revista de Nutrição*, v. 14, n. 2, p. 135-143, 2001.

SILVA, G. S. Crescimento e produtividade de repolho roxo em função de espaçamentos entre linhas e entre plantas. Dissertação de mestrado. Jaboticabal, 2009.

SINGH, J. et al. Antioxidant phytochemicals in cabbage (*Brassica oleraceae* L. var. capitata). *Scientia Horticulturae*, v. 108, p. 233-237, 2006.

SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Viticult*, v.16, n.144, 1965.

SOLER, G. L. N. et al. Doença hepática gordurosa não alcoólica: associação com síndrome metabólica e fatores de risco cardiovascular. *Rev. Socerj*, v. 2, n. 2, p. 94-100, 2008.

SOUSA, C. M. M. et al. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. *Química Nova*, v. 30, n. 2, p. 351-355, 2007.

SOUZA FILHO, A.P.S. Potencial alelopático de *Myrcia guianensis*. *Planta daninha*. v.24, n.4, p. 649-656, 2006.

SPOSITO, A. C. et al. IV Diretriz Brasileira sobre Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose: Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia. *Arq. Bras. Cardiol.*, São Paulo, v. 88, n.1, 2007.

STEIN, F. L. P. et al. Vascular responses to extractable fractions of *Ilex paraguariensis* in rats fed standard and high-cholesterol diets. *Biol Res Nursing*, v. 7 n. 2, p. 146-156, 2005.

STOFFELLA, P. J.; FLEMING, M. F. Plant population influences yield variability of cabbage. *Journal of the American Society of Horticultural Science*, v. 115, p. 708-711, 1990.

SUN, P.; LEE, S. J.; LIM, K. T. Hypolipidemic and Antioxidative Effects of the Plant Glycoprotein (36 kDa) from *Rhus verniciflua* Stokes Fruit in Triton WR-1339-Induced Hyperlipidemic Mice. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, v. 70, n. 2, p. 447-456, 2006.

TAROZZI, A. et al. Sulforaphane as a Potential Protective Phytochemical against Neurodegenerative Diseases. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, v. 2013, 2013.

TEIXEIRA, L. N.; STRINGHETA, P. C.; OLIVEIRA, F. A. Comparação de métodos para quantificação de antocianinas. *Ceres*, Viçosa, v. 55, n. 4, p. 297-304, 2008.

THURNHAM, D. I. Carotenoids: Functions and fallacies. *Proceedings of the Nutrition Society.*, v. 53, p.77-87, 1994.

TSELEPIS, A. D.; CHAPMAN, M. J. Inflammation, bioactive lipids and atherosclerosis: potential roles of a lipoprotein-associated phospholipase A2, platelet activating factoracetylhydrolase. *Atherosclerosis Supplements*, n. 3, p. 57-68, 2002.

VIJAYARAJ, P. et al. Antihyperlipidemic activity of *Cassia auriculata* flowers in triton WR 1339 induced hyperlipidemic rats. *Experimental and Toxicological Pathology*, v.65, p.135-141, 2013.

WICZKOWSKI, W.; NOWAK, D. S.; TOPOLSKA, J. Red cabbage anthocyanins: Profile, isolation, identification, and antioxidant activity. *Food Research International*, v. 51, p. 303-309, 2013.

WOISKY, R. G.; SALATINO, A. J. *Apicult. Res*, v. 37, n. 99, 1998.

WAN, C. W.; WONG, C. N. Y.; PIN, W. K.; WONG, M. H. Y.; KWOK, C. Y.; CHAN, R. Y. K. Chlorogenic Acid Exhibits Cholesterol Lowering and Fatty Liver Attenuating Properties by Up-regulating the Gene Expression of PPAR- $\alpha$  in Hypercholesterolemic Rats Induced with a High-Cholesterol Diet. *Phytotherapy Research*, v.27, n., p.545-551, 2013.

WU, X. et al. Concentrations of anthocyanins in common foods in the United States and estimation of normal consumption, *J. Agric. Food Chem.*, v. 54, p. 4069-4075, 2006.

YU, J. N. et al. Hyperlipidemia. *Primary Care: Clinics in Office Practice*, v. 27, n. 3, p. 541-587, 2000.

**ANEXO A – RESUMO PUBLICADO NO IX- INTERNATIONAL CONGRESS OF  
PHARMACEUTICAL SCIENCES – CIFARP, RIBEIRÃO PRETO (2013).**

## **HYPOLIPIDEMIC EFFECT OF RED CABBAGE (BRASSICA OLERACEA) IN HYPERLIPIDEMIC RATS**

CRUZ, A.B.; VEBER, B.; PITZ, H.S.; ZENI, A.L.B.  
Regional University of Blumenau  
anazeni@furb.br

**Keywords:** Hypolipidemic effect; Brassica; cholesterol; hyperlipidemia; Triton WR-1339.

It is now established that hyperlipidemia represents a major risk factor for the premature development of atherosclerosis and its cardiovascular complications. It has been found that the antioxidants are capable of reversing the endothelial dysfunction caused by hypercholesterolemia and also reduce the number of coronary events. The red cabbage is known for its nutritional value, which is directly related to the number of bioactive substances present in its composition particularly phenolic compounds such as anthocyanins, flavonols and polyphenols. Epidemiologic and animal studies have shown that the consumption of this vegetable is related to a positive impact on human health in the prevention of cardiovascular disease and some types of cancers. This study aimed to observe a possible hypolipidemic effect in rats treated with red cabbage aqueous extract subjected to hypercholesterolemia conditions induced by Triton WR1339. The animals were divided (n=6-7) into control, hyperlipidemic, hyperlipidemic and red cabbage extract treated groups (125mg/kg, 250mg/kg or 500mg/kg). The hyperlipidemic group showed increase of plasma cholesterol (TC), triacylglycerol (TAG) and very low-density lipoprotein (VLDL). Intra-gastric administration of red cabbage extract (two times a day for three days) caused a significant decrease ( $p < 0,01$ ), in their plasma lipid levels (TC, TAG and VLDL) whereas the HDL-cholesterol level was not significant. There are no significant differences in TC, TAG and VLDL assays between red cabbage treated groups and the control group. The results suggest that red cabbage would be effective in preventing an increase plasma lipid levels, which might be useful as a therapeutic agent in hyperlipidemias.