



**UNIVERSIDADE DE CRUZ ALTA  
UNIVERSIDADE REGIONAL DO NOROESTE DO  
ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM  
ATENÇÃO INTEGRAL À SAÚDE**

**Efeitos do ácido gálico e ácido clorogênico, isolados  
ou em associação, no perfil lipídico, endotelial e  
oxidativo de ratos Wistar tratados com dieta  
hipercolesterolêmica.**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Fernando Garcez Porto**

**Cruz Alta-RS, Brasil**

**2016**

**Efeitos do ácido gálico e ácido clorogênico, isolados ou em associação, no perfil lipídico, endotelial e oxidativo de ratos Wistar tratados com dieta hipercolesterolêmica.**

**Por**

**Fernando Garcez Porto**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Atenção Integral à Saúde, da Universidade de Cruz Alta (UNICRUZ, RS), em associação ampla à Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul (UNIJUI, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Atenção Integral a Saúde**.

Orientador: Prof. Dr. Jonatas Zeni Klafke.

Co-orientador: Prof. Dr. Paulo Ricardo Nazário Viecili.

**Cruz Alta-RS, Brasil**

**2016**

UNIVERSIDADE DE CRUZ ALTA E UNIVERSIDADE REGIONAL DO NOROESTE  
DO RIO GRANDE DO SUL

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU EM ATENÇÃO INTEGRAL  
À SAÚDE

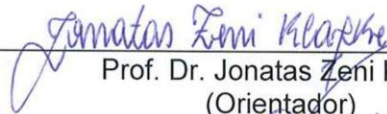
A Comissão Examinadora, abaixo assinada,  
aprova a Dissertação de Mestrado

**EFEITOS DO ÁCIDO GALICO E ÁCIDO CLOROGÊNICO, ISOLADOS  
E EM ASSOCIAÇÃO, NO PERFIL LIPÍDICO, ENDOTELIAL E  
OXIDATIVO DE RATOS WISTAR.**

elaborada por:

**FERNANDO GARCEZ PORTO**

Como requisito parcial para a obtenção do grau de  
**Mestre em Atenção Integral à Saúde**

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Jonatas Zeni Klafke  
(Orientador)

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Paulo Ricardo Nazário Vecili  
(coorientador)

COMISSÃO EXAMINADORA

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Thiago Gomes Heck - (UNIJUÍ)

  
\_\_\_\_\_  
Profª. Drª. Mirna Stela Ludwig - (UNIJUÍ)

  
\_\_\_\_\_  
Profª. Drª. Gabriela Trevisan - (UFSM)

Cruz Alta, 22 de dezembro de 2016

P853e

Porto, Fernando Garcez

Efeitos do ácido gálico e ácido clorogênico, isolados ou em associação, no perfil lipídico, endotelial e oxidativo de ratos Wistar tratados com dieta hipercolesterolêmica / Fernando Garcez Porto. – 2016.

50 f.

Dissertação (mestrado) – Universidade de Cruz Alta - UNICRUZ/RS. Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul - UNIJUI/RS, Programa de pós-graduação stricto sensu em atenção integral à saúde.

Mestrado em atenção integral à saúde.

Orientador: Prof. Dr. Jonatas Zeni Klafke.

Coorientador: Prof. Dr. Paulo Ricardo Nazário Viecili.

1. Arteriosclerose. I. Klafke, Jonatas Zeni. II. Viecili, Paulo Ricardo Nazário. III. Título.

CDU 616.13-004.6

Catálogo na fonte: Bibliotecária Eliane C. Reck da Rosa CRB-10/2404.

*DEDICO ESTE TRABALHO A TODOS QUE DE ALGUMA FORMA CONTRIBUÍRAM E ME DERAM FORÇAS PARA CHEGAR ATÉ AQUI, EM ESPECIAL AOS MEUS PAIS PEDRO E VIVIANE E A MINHA COMPANHEIRA BRENDA DA SILVA POR SEMPRE ME DAREM TODO APOIO QUE PRECISEI.*

## AGRADECIMENTOS

AGRADEÇO AO MEU ORIENTADOR DR. JONATAS ZENI KLAFKE, PRIMEIRAMENTE PELA PACIÊNCIA, PELAS MUITAS TARDES DE REUNIÕES PRODUTIVAS, POR TODOS OS ENSINAMENTOS E EXPERIÊNCIA TRANSMITIDA, QUE COM TODA CERTEZA LEVAREI COMIGO A ONDE FOR.

AGRADEÇO AO MEU COORIENTADOR DR. PAULO RICARDO NAZÁRIO VIECILI, POR TODAS AS OPORTUNIDADES A MIM OFERECIDAS, FAZENDO COM QUE ME APRIMORASSE A CADA NOVA TAREFA, AMADURECENDO ASSIM MEU LADO PESQUISADOR.

AGRADEÇO AOS MEUS PAIS PEDRO E VIVIANE QUE ME APOIARAM DURANTE TODA A MINHA VIDA, ASSIM COMO PRESENCIARAM CADA PASSO NA CONSTRUÇÃO DA MINHA CARREIRA ACADÊMICA, INVESTINDO E ACREDITANDO NO MEU POTENCIAL. OBRIGADO PAI E MÃE, VOCÊS SÃO A MINHA BASE. AMO VOCÊS.

AGRADEÇO A MINHA COMPANHEIRA BRENDA, QUE SEMPRE ME AJUDOU A “SEGURAR A BARRA”, QUANDO A SITUAÇÃO NÃO ESTAVA FÁCIL, NOITES E MAIS NOITES NA FRENTE DO COMPUTADOR ESTRESSADO COM PRAZOS, E ELA SEMPRE ALI PRESENTE ACOLHENDO E DIVIDINDO COMIGO AS PREOCUPAÇÕES DO DIA A DIA, ASSIM COMO COMEMORANDO CADA UMA DAS CONQUISTAS. AMO VOCÊ.

AGRADEÇO A TODOS QUE DE ALGUMA FORMA CONTRIBUÍRAM PARA A CONSTRUÇÃO DESSE TRABALHO, EM ESPECIAL AOS GRUPOS DE PESQUISA DO QUAL FAÇO PARTE GRUPO MULTIDISCIPLINAR DE SAÚDE (GMS) E GRUPO INTERDISCIPLINAR DE SAÚDE (GIS).

AGRADEÇO A PROF. DR. PATRÍCIA WOLKMER POR SUA CONTRIBUIÇÃO NESTE TRABALHO, ASSIM COMO PELA ATENÇÃO E PACIÊNCIA EM PASSAR SEUS CONHECIMENTOS QUE FORAM DE GRANDE IMPORTÂNCIA.

AGRADEÇO AO BIOTERISTA HENRIQUE BEUTLER, POR TODO O AUXÍLIO PARA MANUTENÇÃO DOS EXPERIMENTOS ENVOLVENDO ANIMAIS E SUAS DEMAIS CONTRIBUIÇÕES NO ESTUDO.

AGRADEÇO A TODOS OS DISCENTES E DOCENTES DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ATENÇÃO INTEGRAL A SAÚDE.

AGRADEÇO AOS PROFESSORES QUE COMPÕE A BANCA DESTA TRABALHO, POR TODAS AS CONTRIBUIÇÕES SIGNIFICATIVAS QUE COM CERTEZA FARÃO.

E POR ÚLTIMO, MAS NÃO MENOS IMPORTANTE, AGRADO A CADA PESSOA QUE DE ALGUMA FORMA CONTRIBUIU PARA QUE EU CHEGASSE ATÉ AQUI, AGRADO A MINHA FAMÍLIA, AMIGOS E COLEGAS.

## LISTA DE ABREVIATURAS

LDL: Lipoproteína de baixa densidade.

HDL: Lipoproteína de alta densidade.

CT: Colesterol Total

ON: Óxido Nítrico

AG: Ácido gálico

AC: Ácido clorogênico

AFs: Ácidos fenólicos

HDL: Lipoproteína de alta densidade.

HMG-CoAr: 3-hidroxi-3-metil glutaril CoA redutase.

VLDL: Lipoproteína de muito baixa densidade.

IDL: Lipoproteína de densidade intermediária.

CLAE: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.

CEUA/UNICRUZ: Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade de Cruz Alta.

CTA: Capacidade total antioxidante.

LCAT: Lecitina-colesterol aciltransferase.

## LISTA DE FIGURAS

### Dissertação

Figura 1 - Mecanismos de transferência de ésteres de colesterol.....pg.13

Figura 2 - Estrutura química dos ácidos fenólicos presentes em *C. xanthocarpa*, ácido gálico e ácido clorogênico.....pg.17

### Manuscrito

Figura 1- (A) Níveis de CT, (B) níveis de HDL e (C) níveis de CTA nos diferentes grupos experimentais após cinco dias de tratamento com AFs e veículo.....pg.27

## LISTA DE TABELAS

### Manuscrito

Tabela I - Níveis de LDL e triglicerídeos nos diferentes grupos experimentais após cinco dias de tratamento com AFs..... pg.27



## SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS .....	
LISTA DE FIGURAS.....	
LISTA DE TABELAS.....	
1. INTRODUÇÃO .....	9
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	10
2.1 Biomarcadores lipídicos, oxidativo e endotelial da aterosclerose.....	10
2.2 Metabolismo das lipoproteínas plasmáticas.....	12
2.3 Terapia medicamentosa convencional para hipercolesterolemia.....	13
2.4 Medicina alternativa e complementar para dislipidemias.....	15
2.5 Uso de Ácidos fenólicos como estratégia alternativa para dislipidemias.....	16
3. OBJETIVOS.....	18
3.1 Objetivo Geral.....	18
3.2 Objetivos Específicos.....	18
4. MANUSCRITO.....	19

## 1. INTRODUÇÃO

Os ácidos fenólicos possuem um vasto potencial terapêutico, sendo muitas vezes considerados como princípio ativo de plantas medicinais. Dentre estes compostos, o ácido gálico e o ácido clorogênico vêm sendo amplamente estudados de maneira isolada ou em extratos de plantas, sendo capazes promover melhora do perfil lipídico com mecanismo semelhante às estatinas, por inibirem a 3-hidroxi-3-metil-glutaril CoA redutase (HMGCoAr), enzima passo limitante na síntese do colesterol endógeno (1, 2).

O ácido gálico, por exemplo, está presente em uma gama de compostos naturais, os quais possuem efeito de redução de colesterol associado à elevação dos níveis de lipoproteína de alta densidade (HDL) (3, 4). Além disso, possui efeito antioxidante inibindo a peroxidação lipídica e é capaz de inibir a agregação plaquetária *in vitro* (5, 6). O ácido clorogênico, por sua vez, possui efeito antidiabético, reduzindo a glicemia, atua ainda reduzindo a liberação de P-selectinas e interleucina 1 $\beta$  o que confere seu caráter anti-inflamatório (7, 8).

Isoladamente, tanto AG quanto AC são potentes antioxidantes envolvidos na absorção e neutralização de radicais livres, além de atuarem como anti-inflamatórios anti-hipertensivos e reduzirem os níveis de óxido nítrico (ON) *in vitro* (9-12). Ainda são capazes de melhorar o perfil lipídico reduzindo o colesterol total (CT), triglicerídeos e elevando os níveis de HDL (13, 14). Todavia, são escassos os estudos a respeito da associação entre estes compostos e seu potencial efeito no perfil lipídico.

Desse modo, visto o potencial terapêutico do ácido gálico e ácido clorogênico no perfil lipídico, em conjunto a escassez de dados acerca dos efeitos da associação desses compostos fenólicos, o objetivo do presente estudo é verificar os efeitos dos AFs nos níveis de biomarcadores séricos lipídicos, oxidativo e endotelial em ratos Wistar tratados com dieta hipercolesterolêmica.

E a partir dessa busca, tornar apto este profissional Biomédico a interligar o conhecimento adquirido até então, de modo interdisciplinar, aspirando à clarificação de tratamentos alternativos para as doenças cardiovasculares, e assim relacionar a prática científica com aplicações na clínica, caminhando para uma abordagem voltada a atenção integral a saúde.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Biomarcadores lipídicos, oxidativo e endotelial da aterosclerose.

A aterosclerose é definida como uma doença inflamatória crônica multifatorial, originada em resposta à agressão endotelial (15). Com o estímulo agressor, que pode ser mecânico ou ainda ocasionado pelo estresse oxidativo, inicia-se a formação da placa aterosclerótica, tendo como principal facilitador a elevação das lipoproteínas aterogênicas (LDL e seus remanescentes) (16). O acúmulo do CT sérico, com valores que ultrapassam 240 mg/dL, geralmente acompanhado pelo aumento dos níveis de LDL acima de 160 mg/dL, é um dos principais fatores de risco cardiovascular, o qual contribui fortemente com a aterosclerose (17, 18).

Como se trata de uma doença inflamatória, com o acúmulo de LDL e com a lesão endotelial, os monócitos englobam o LDL, o qual é oxidado por radicais livres circulantes, originando as células espumosas (19). Este LDL sérico é endocitado para o meio intracelular do endotélio, situação que induz a um maior consumo de ON, levando a uma acentuada produção de espécies reativas do oxigênio (19).

As espécies reativas tem ação direta na peroxidação dos ácidos graxos presentes no LDL, levando a ruptura dos receptores de membrana responsáveis por auxiliar na atuação de agonistas da via de produção do ON, maximizando o comprometimento funcional da célula endotelial (20, 21). Conseqüentemente, com a progressão da doença, pode ocorrer ainda adesão e agregação plaquetária, gerando altos riscos de formação trombótica devido à redução de ON (22, 23).

O ON é uma molécula de sinalização multifuncional derivada do endotélio, envolvida na manutenção da homeostase cardiovascular, além de seu papel crucial como vaso relaxante, ele é capaz de suprimir processos chave do desenvolvimento de lesão vascular, se opondo a aterogênese, atuando na inibição da adesão e agregação plaquetária por exemplo. Essa gama de ações envolvidas na homeostase endotelial, sustentam o ON como biomarcador bem estabelecido para a função normal endotelial (24).

Além do LDL, existe outra lipoproteína envolvida direta e indiretamente com a doença aterosclerótica. O HDL vem sendo relacionado inversamente com o risco de

doença aterosclerótica (25). Seu efeito protetor tem sido atribuído à capacidade de retirar o LDL presente nas células espumosas, e levá-lo a circulação para ser esterificado (26). Porém essa teoria, tem se tornado simplista, já que, por exemplo, o HDL pode desempenhar papel aterogênico em quadros de inflamação grave, e ainda é dependente de diversas interações com proteínas específicas para desempenhar seu papel no transporte reverso do colesterol (27).

Os triglicerídeos, moléculas de envolvimento direto com as lipoproteínas plasmáticas, estão atreladas ao processo aterosclerótico. Estas moléculas segundo Klafke *et al.* (2015) relacionam-se de maneira forte e independente à oxidação proteica que, por conseguinte, como já descrito por Al-Aubaidy e Jelinek (2014), estão envolvidas com o desenvolvimento do quadro de estresse oxidativo, um forte indicativo de doença aterosclerótica inicial (subclínica) (28, 29).

Visto essa forte relação entre estresse oxidativo e doença aterosclerótica, um dos biomarcadores oxidativos, denominado capacidade total antioxidante (CTA), vem sendo amplamente utilizado como um potencial marcador de atividade antioxidante. CTA baseia-se em um ensaio colorimétrico onde se utiliza o radical hidroxila oxidando moléculas de O-dianisidina em radicais dianisidyl o que conduz a uma coloração amarelada em segundos, sendo assim, os antioxidantes presentes na amostra suprimem a formação de cor, demonstrando sua capacidade antioxidante (30).

A importância destas moléculas é complementada pela ideia de Forrester *et al.* (2005), onde o desenvolvimento da aterosclerose depende de fatores clássicos, como elevação nas taxas de CT, LDL, LDL-oxidado e triglicerídeos, associado a baixos níveis de lipoproteína de alta densidade (HDL). Para a busca de novos tratamentos da doença aterosclerótica, faz-se necessário o entendimento acerca do metabolismo das lipoproteínas plasmáticas (31).

## 2.2 Metabolismo das lipoproteínas plasmáticas

A principal molécula responsável pelo TRC é o HDL, esta lipoproteína é responsável por retirar o excesso de colesterol extra-hepático, para então levá-lo de volta ao fígado ou transferi-lo para outras lipoproteínas (LDL e VLDL). Para isso, o HDL é sintetizado principalmente no fígado, primeiramente como HDL nascente, o qual é uma partícula discoide formada pelas apo lipoproteínas ApoAI e ApoAII, colesterol não esterificado, triglicerídeos e outras proteínas. Esses HDLs ligam-se a tecidos extra-hepáticos e capturam o colesterol em excesso, o qual será esterificado por intermédio da lecitina-colesterol aciltransferase (LCAT), levando a formação do HDL maduro (esférico), destinando-se de volta ao fígado para formação de sais biliares a partir desse colesterol (32).

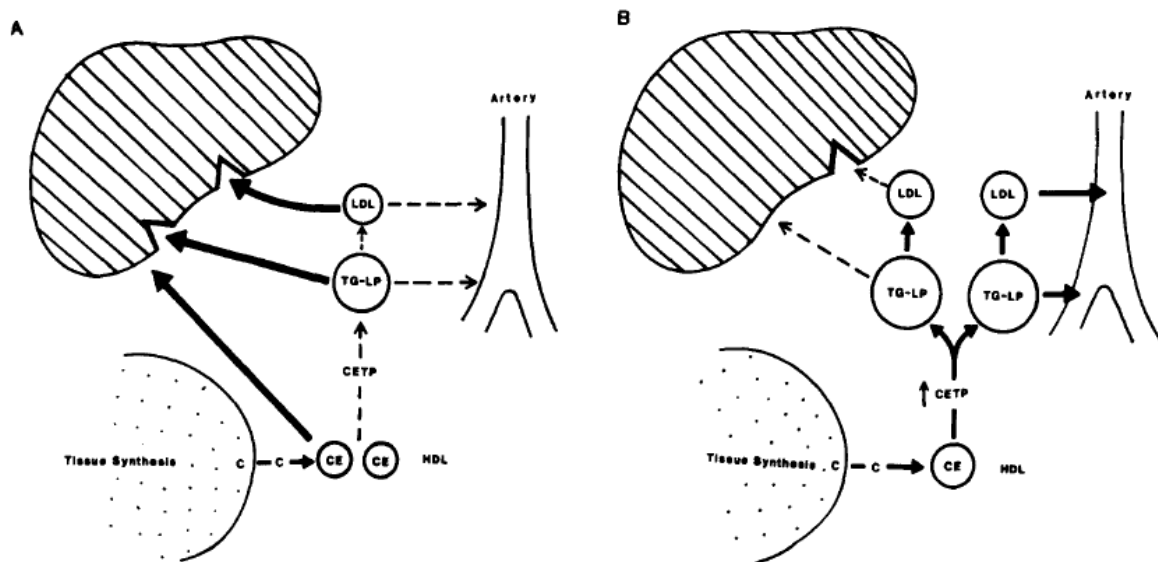
A relação metabólica entre o HDL e a aterosclerose, pode ser entendida devido a sua participação no TRC, a onde se acredita que o HDL retire o colesterol presente nas células espumosas formadoras da placa aterosclerótica (macrófagos), para posterior esterificação na circulação, sendo esta a entidade mais reconhecida para sugerir o papel cardioprotetor dessas partículas (26).

Os níveis de HDL plasmático não dependem apenas de sua síntese, mas também de seu processo de remodelamento, este ocorre por intermédio de várias enzimas. A LCAT, por exemplo, promove a esterificação do colesterol na partícula de HDL, passando-a de pré-HDL para partículas de HDL funcionais ricas em ésteres de colesterol. Outra molécula importante nesse processo é a proteína transferidora de ésteres de colesterol (CETP), que atua facilitando a transferência de ésteres de colesterol do HDL para moléculas que contenham ApoB, tornando o HDL pobre em lipídios e reduzindo sua disponibilidade plasmática (33).

O processo de transporte reverso do colesterol tem algumas diferenças quando comparamos humanos e ratos. Desse modo, cabe salientar que mesmo com um nível normal de LDL, os seres humanos são hipercolesterolêmicos quando comparados com ratos e outras espécies de mamíferos, visto que, enquanto os seres humanos transportam 75% do CT plasmático na forma de LDL, os ratos transportam 80% do CT plasmático na forma de HDL. Esta diferença pode ser atribuída principalmente a menor expressão da CETP nos ratos (26). Tão importante

quanto entender o metabolismo lipídico, é compreender quais os principais tratamentos utilizados no combate as dislipidemias.

Figura 1: Mecanismos de transferência de ésteres de colesterol



Legenda: A: Mecanismos de transferência de ésteres de colesterol em modelo com níveis elevados de HDL e baixos níveis de lipoproteínas contendo apoB. Colesterol difunde dos tecidos em HDL e é esterificado por LCAT. Ocorre transferência de éster de colesterol de HDL de forma lenta. B: Mecanismos de transferência de ésteres de colesterol em modelo com baixo HDL e níveis elevados de lipoproteínas contendo apoB. A transferência de éster de colesterol do HDL é acelerada.

### 2.3 Terapia medicamentosa convencional para hipercolesterolemia

As principais terapias utilizadas na clínica médica são: as estatinas, as resinas de troca, os fibratos, o ácido nicotínico, o ácido graxo ômega-3, o probucol e o orlistat. As estatinas agem competindo com a HMG-CoAr pelo seu sítio catalítico e assim reduzem a síntese de colesterol (34). Essa enzima foi identificada em 1960 como uma enzima importante na regulação da síntese do colesterol, pois é capaz de transformar HMG CoA em mevalonato, o qual é convertido a isopentil pirofosfato, levando a formação dos 27 carbonos do colesterol (35). Segundo Oliveira *et al.*

(2016), a HMG CoAr é a enzima limitadora da velocidade da via biossintética do colesterol, podendo ser considerada a enzima passo limitante da síntese do colesterol hepático (36).

Devido ao seu papel central já evidenciado, os principais mecanismos de controle da homeostase do colesterol estão relacionados a essa enzima (37). Desse modo, com a inibição da HMG-CoAr exercida pelas estatinas, há uma redução do colesterol intracelular, ocorrendo assim um aumento no número de receptores de LDL nos hepatócitos, levando a remoção de mais lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL) e LDL da circulação, na tentativa de repor os níveis de colesterol intracelular (34). Entretanto, as estatinas não só impedem a síntese de colesterol endógeno, como também atuam inibindo a síntese de intermediários isoprenóides essenciais á vários mecanismos de sinalização intracelular, com a redução desses intermediários, algumas proteínas sinalizadoras não são ativadas, gerando os efeitos pleiotrópicos das estatinas, a citar o efeito anti-inflamatório, antioxidante, antiproliferativo, de estabilidade da placa e prevenção da agregação plaquetária (38).

Apesar dessa gama terapêutica, existem alguns problemas com relação ao uso de estatinas, pois Okuyama *et al.* (2015) apresenta a perspectiva de que estes medicamentos podem causar a calcificação da artéria coronária, atuar como toxinas mitocondriais, prejudicando a função muscular cardíaca e dos vasos sanguíneos por meio da redução da produção de ATP, e ainda inibir a biossíntese de proteínas que contém selênio, como por exemplo, a glutathione peroxidase, importante enzima antioxidante envolvida na supressão do estresse oxidativo (39).

Já as resinas de troca, como a colestiramina, reduzem a absorção intestinal dos sais biliares e em consequência disso, diminuem a absorção de colesterol. Isso resultará em diminuição no colesterol intracelular, aumentando a expressão dos receptores de LDL (40).

Outras terapias, principalmente para hipertrigliceridemia, incluem o uso de fibratos, e também do ácido nicotínico ou ainda a associação de ambos (41). Também, não menos importante, nas dislipidemias, o uso do ácido graxo ômega-3, auxiliando na redução de LDL, podendo ainda favorecer o aumento do HDL (42). Tem-se, ainda, o probucol, o qual reduz o LDL e o HDL em cerca de 10%, e o orlistat, o qual é um efetivo inibidor das lipases, fazendo com que a lipólise dos

triglicerídeos da dieta seja reduzida, e assim cerca de 30% dos triglicerídeos absorvidos na dieta são excretados inalterados nas fezes (43).

No entanto, devido à resistência a dieta, ao elevado custo dos medicamentos e ao potencial para possíveis efeitos adversos das terapias farmacológicas convencionais, os indivíduos portadores de dislipidemias tem procurado tratamentos alternativos para o controle do colesterol, sendo que muitos destes tratamentos vêm sendo usados empiricamente, necessitando de estudos científicos para o esclarecimento e utilização dos mesmos (2).

## **2.4 Medicina Alternativa e Complementar para dislipidemias**

Além da terapia medicamentosa e não medicamentosa convencional surge uma nova proposta terapêutica em substituição ou auxílio às ferramentas preexistentes, tendo em vista a maior adesão ao tratamento, com menor custo e menos resistência ao uso, sendo que para esta classe, dá-se o nome de medicina alternativa e complementar. Dentro dessa classe, existem dois subgrupos, onde um é voltado à práticas mente/corpo e o outro ao natural. Como exemplos dessa terapia, podemos citar o yoga, quiropraxia, meditação, respiração profunda, homeopatia e, principalmente, os produtos naturais (44).

Em se tratando de produtos naturais, têm-se os fitosteróis, os quais são produtos encontrados nos vegetais com funções estruturais análogas ao colesterol, e por isso são capazes de reduzir o nível de LDL (45). A dieta rica em soja também se mostrou eficaz na redução do colesterol, através da ingestão de proteína de soja, em substituição a proteína animal (46). Já as fibras, como carboidratos complexos, não são absorvidos pelo intestino, e por isso reduzem o tempo de trânsito intestinal e auxiliam na eliminação do colesterol (42).

Além disso, existem diversos produtos naturais com propriedades terapêuticas, utilizados de maneira empírica por falta de estudos relacionados à sua ação e efeitos adversos. Segundo a NCCIH (2015) os produtos naturais estão no topo da lista de intervenções utilizadas na medicina alternativa e complementar, tendo grande relevância na prevenção de várias doenças (44). Com relação à aterosclerose, por exemplo, as plantas medicinais desempenham papel importante



no seu tratamento e prevenção (47). Uma dessas plantas, a *C. xanthocarpa*, desponta como um notável produto natural com potencial terapêutico eficaz na doença aterosclerótica, a qual possui em sua composição a presença de ácidos fenólicos.

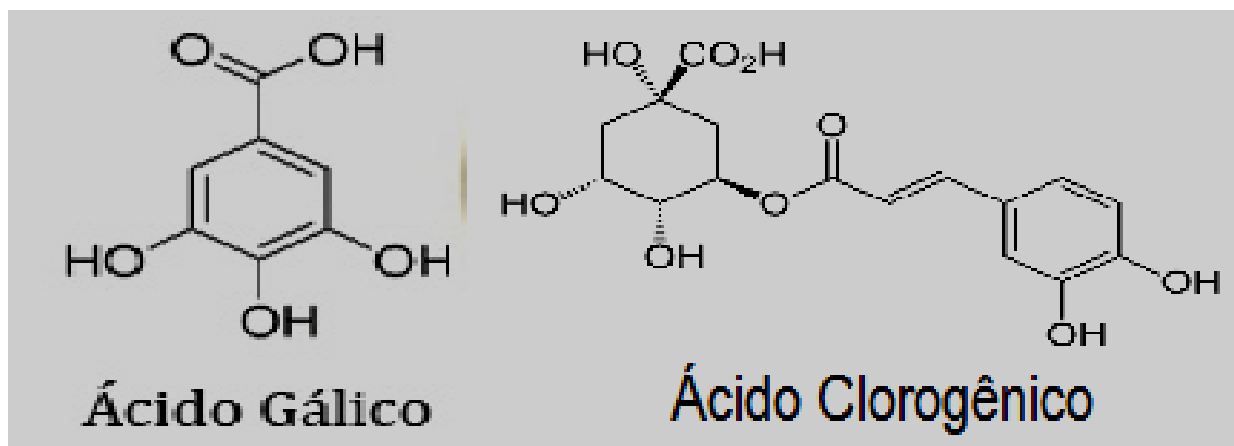
## **2.5 Uso de Ácidos fenólicos como estratégia alternativa para dislipidemias**

Juntamente com a vasta gama de produtos naturais com efeitos benéficos, existem inúmeros estudos determinando uma variedade de compostos capazes de contribuir em nível terapêutico para a aterosclerose. A busca por esses compostos revelou metabólitos secundários envolvidos no crescimento, desenvolvimento, reprodução e resistência a doenças nas plantas. Evidências apontam o potencial antioxidante dessas moléculas, sendo capazes de elevar tanto os níveis, quanto a atividade de duas das principais enzimas antioxidantes, a superóxido dismutase e a catalase (48, 49).

Uma dessas classes de compostos bioativos compreende os AFs, a citar, por exemplo, o AG e o AC (50). O consumo de AG, um AF presente em diversas plantas, inclusive na *C. xanthocarpa*, inibe a iniciação e propagação da peroxidação lipídica renal em ratos (5). Este mesmo composto parece desempenhar papel cardioprotetor, sendo capaz de inibir a ativação plaquetária *in vitro* de modo concentração dependente (50).

O AC, por sua vez, também presente nas folhas de *C. xanthocarpa*, possui efeito anti-diabetes, através do aumento da expressão de GLUT4, elevando a captação de glicose, reduzindo assim a glicemia (7). Além disso, atua no processo inflamatório reduzindo a liberação de mediadores envolvidos no processo aterosclerótico como as P-selectinas e a Interleucina 1 $\beta$  (8). Este compilado de descobertas aponta para gama de possibilidades terapêuticas dos AFs, mais especificamente do AG e AC, ambos presentes nas folhas de *C. xanthocarpa*, estando envolvidos em diversas patologias, sendo associados até mesmo com propriedades anti-alzheimer (51).

Figura 2: Estrutura química dos ácidos fenólicos presentes em *C. xanthocarpa*, ácido gálico e ácido clorogênico.



### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Verificar os efeitos dos AFs nos níveis de biomarcadores séricos lipídicos, endoteliais e oxidativo em ratos Wistar.

#### **3.2 Objetivos específicos**

-Determinar o efeito dos AFs nos níveis de biomarcadores séricos lipídicos no presente modelo experimental;

-Investigar o efeito dos AFs nos níveis de ON, um biomarcador da função endotelial, neste modelo de estudo.

-Verificar o efeito dos AFs na capacidade total antioxidante no presente modelo experimental.

#### **4 MANUSCRITO**

**Título:** Efeitos do ácido gálico e ácido clorogênico, isolados ou em associação, no perfil lipídico, endotelial e oxidativo de ratos Wistar tratados com dieta hipercolesterolêmica.

**Title:** Effects of gallic acid and chlorogenic acid, isolated or in association, on the profile lipidic, endothelial and oxidative in Wistar rats.

**Autores:** Fernando Garcez Porto; Paulo Ricardo Nazário Viecili; Gabriela Elisa Hirsch; Brenda da Silva; Amanda Spring de Almeida; Aline Schimidt; Luana Nogueira; Patrícia Wolkmer; Rafael Moresco; Jonatas Zeni Klafke.

**Título reduzido:** Ação de ácido gálico e clorogênico no perfil lipídico, endotelial e oxidativo.

**Revista para submissão:** Arquivos Brasileiros de Cardiologia.

**Palavras-chave:** Compostos fenólicos; HDL-Colesterol; Produtos biológicos.

**Keywords:** Phenolic compounds; Cholesterol, HDL; Biological products.

## RESUMO

Fundamento: Os ácidos fenólicos, ácido gálico (AG) e ácido clorogênico (AC) isoladamente desempenham efeito semelhante às estatinas inibindo a HMG CoA redutase *in vitro*, melhorando o perfil lipídico, tendo como um de seus efeitos biológicos, a elevação do HDL. Porém, são escassos os estudos acerca da associação desses compostos no perfil lipídico, oxidativo e endotelial. Objetivo: O objetivo do estudo foi avaliar o efeito da associação de AG e AC em ratos Wistar tratados com dieta hipercolesterolêmica. Métodos: Trinta e cinco animais foram divididos aleatoriamente em cinco grupos, sendo que um grupo recebeu dieta normal e os demais receberam dieta hipercolesterolêmica por dez dias consecutivos e os seguintes tratamentos por cinco dias via gavagem, antes do fim da dieta: (1) DHC – dieta hipercolesterolêmica + água purificada; (2) DHC+AG (15 mg/Kg); (3) DHC+AC (10 mg/Kg), (4) DHC+AG+AC - AG (7,5 mg/Kg) + AC (5 mg/Kg). Os animais foram anestesiados via inalatória com isoflurano para coleta intracardíaca e posteriormente eutanasiados através de deslocamento cervical ainda sobre anestesia. Do soro coletado foram avaliados o perfil lipídico, a capacidade total antioxidante (CTA) e o óxido nítrico (ON). Resultados: O grupo DHC+AG+AC ( $29,07 \pm 7,2$ ) apresentou uma elevação do HDL quando comparado ao grupo DHC ( $18,53 \pm 6,6$ ). Esse efeito não aconteceu quando os compostos foram testados separadamente. Ainda, a dieta elevou a capacidade antioxidante, ao passo que estes ácidos fenólicos, isolados ou associados, preveniram o aumento da CTA. Conclusão: AG e AC em associação elevaram os níveis de HDL e preservaram as defesas antioxidantes, contribuindo como perspectiva de terapias alternativas no combate da aterosclerose.

## ABSTRACT

**Background:** Phenolic acids, gallic acid (GA) and chlorogenic acid (CA) alone have a similar effect to statins inhibiting HMG CoA reductase in vitro, improving the lipid profile, having as one of its biological effects the elevation of HDL. However, there are few studies about the association of these compounds in the lipid, oxidative and endothelial profile. **Objective:** The objective of this study was to evaluate the effect of the association of AG and CA in Wistar rats treated with hypercholesterolemic diet. **Methods:** Thirty-five animals were randomly divided into five groups, one group receiving a normal diet and the other receiving a hypercholesterolemic diet for ten consecutive days by gavage beyond the following treatments for five days before the end of the diet: (1) HDC- hypercholesterolemic diet + purified water; (2) HCD+GA (15 mg / kg); (3) HCD+CA (10 mg / kg), (4) HCD+GA+CA - GA (7.5 mg / kg) + CA (5 mg / kg). The animals were anesthetized via inhalation with isoflurane for intracardiac collection and subsequently euthanized by cervical dislocation still under anesthesia. The lipid profile, total antioxidant capacity (ATC) and nitric oxide (ON) were evaluated. **Results:** The HCD+GA+CA group ( $29.07 \pm 7.2$ ) presented an elevation of HDL when compared to the HCD group ( $18.53 \pm 6.6$ ). This effect did not occur when the compounds were tested separately. Furthermore, diet increased antioxidant capacity, whereas these phenolic acids, isolated or associated, prevented the increase of TAC. **Conclusion:** Association of GA and CA elevated HDL levels and preserved antioxidant defenses, contributing as a perspective of alternative therapies in the fight against atherosclerosis.

## 1.1 INTRODUÇÃO

Semelhante às estatinas, a *Campomanesia xanthocarpa* Berg. (Myrtaceae), é uma planta que demonstrou efeito inibitório da HMG-CoAr *in vitro* (2), provavelmente devido a presença dos ácidos fenólicos (AFs), principalmente pelo ácido gálico (AG) e ácido clorogênico (AC) em sua composição, os quais também inibem a HMG-CoAr *in vitro* (1). De modo similar, *Panicum repens* L., outra planta que contém os mesmos AFs em sua composição, demonstrou reduzir CT e triglicérides, ao passo que elevou os níveis de HDL em um modelo de ratos hiperlipidêmicos, demonstrando a importância desses compostos no perfil lipídico (3).

A inibição da enzima passo limitante na síntese do colesterol endógeno, 3-hidroxi-3-metil-glutaril CoA redutase (HMG-CoAr), confere o caráter hipolipemiante das estatinas, caracterizando sua capacidade de redução do LDL sérico, restringindo o desenvolvimento da placa aterosclerótica. Este medicamento também é capaz de gerar efeitos pleiotrópicos importantes como o efeito anti-inflamatório, antioxidante, de estabilidade da placa e prevenção da agregação plaquetária, podendo ainda desencadear uma redução tênue dos níveis de lipoproteína de alta densidade (HDL) ( $\cong$  5%) (52).

Esta última partícula, o HDL, vem demonstrando nos últimos anos grande importância no processo aterosclerótico, visto que é o principal responsável pelo transporte reverso do colesterol, além de inibir a oxidação do LDL, estimular a produção de ON, inibir a expressão de moléculas de adesão e remover o colesterol LDL das células que compõe a placa aterosclerótica, dentre outros efeitos (33, 53).

Sendo assim, as estatinas são medicamentos utilizados na clínica médica para o tratamento da doença aterosclerótica. Esta consiste em um processo inflamatório crônico multifatorial que culmina na formação de uma placa aterosclerótica rica em lipoproteína de baixa densidade (LDL) entre a túnica íntima e média vascular (15, 54).

Apesar da gama de efeitos apresentada pelas estatinas, estas possuem um custo elevado e ainda podem desencadear potenciais efeitos adversos (39), estimulando a busca por produtos naturais obtidos de plantas brasileiras para a prevenção e tratamento da aterosclerose (47). Estes fatos apontam para o

desenvolvimento de terapias alternativas, baseadas em produtos naturais e sua utilização na melhora do quadro aterosclerótico.

Segundo Saibabu *et al.* (2015) o uso farmacológico dos AFs é promissor, visto o potencial antioxidante, anti-inflamatório, antidiabético e cardioprotetor dos mesmos. No entanto, necessita-se de mais pesquisas as quais conduzam essas biomoléculas para utilização no tratamento clínico em larga escala (55).

O AG e o AC, por exemplo, de maneira isolada, são potentes antioxidantes envolvidos na absorção e neutralização de radicais livres, além de possuírem certas implicações biológicas de caráter cardioprotetor, atuando como anti-inflamatórios anti-hipertensivos e reduzindo os níveis de óxido nítrico (ON) *in vitro* (9-12). Além disso, foi descrito na literatura que tanto AG quanto AC são capazes de melhorar o perfil lipídico reduzindo o colesterol total (CT), triglicerídeos e elevando os níveis de HDL isoladamente (13, 14, 56). Entretanto, os dados na literatura, a respeito da associação desses compostos, são escassos.

Sendo assim, visto a capacidade de interferir no perfil lipídico, relativamente semelhante, exercida pelos AFs, AG e AC, o objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito da associação desses AFs no perfil lipídico em ratos Wistar tratados com dieta hipercolesterolêmica, avaliando biomarcadores lipídicos, oxidativo e endotelial.

## **2. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1 Drogas e reagentes**

O isoflurano foi obtido de Cristália Produtos Químicos e Farmacêuticos LTDA, São Paulo, Brasil. A ração hipercolesterolêmica possui a seguinte composição (Caseína, amido de milho, celulose, DL-metionina, Sacarose, Bitartarato de Colina, Óleo de milho, Óleo de coco saturado, Mix mineral RH9504, Mix vitamínico RH9505 e Terc-butil-hidroquinona - TBHQ) e foi obtida de Rhoster Indústria e Comércio LTDA, São Paulo, Brasil. Os padrões de AG e AC foram obtidos de Merck, Darmstadt, Alemanha. Utilizou-se ainda o KIT para ensaio de CT, LDL, HDL e triglicerídeos Labtest Diagnóstica SA, Minas Gerais, Brasil. O reagente de Griess para mensuração dos níveis de ON é uma mistura de sulfanilamida (Reagen LTDA) e naftiletlenodiamina-bicloridrato (Sigma Aldrich) em ácido ortofosfórico a 5%



(Sigma Aldrich). O Sulfato ferroso de amônio, O-dianisidina e peróxido de hidrogênio para análise de Capacidade total antioxidante (CTA) foram obtidos de Merck, Darmstadt, Alemanha.

## **2.2 Modelo experimental roedor e tratamento**

Esse estudo foi aprovado pelo comitê de ética no uso de animais sob o número de protocolo 009/15. Foi realizado estudo básico experimental envolvendo 35 ratos Wistar machos pesando 200-250 g (3,0 - 3,5 meses de idade) que foram obtidos do biotério da Universidade de Cruz Alta (UNICRUZ). Os ratos ficaram alojados em gaiolas de plástico (no máximo cinco animais/gaiola) à temperatura ( $22 \pm 2^\circ \text{C}$ ) e umidade relativa constante ( $55 \pm 10\%$ ), com um ciclo de claro-escuro de doze horas, comida e água disponível *ad libitum*. Os animais foram divididos em cinco grupos de sete animais: um único grupo recebeu dieta normal e tratamento com água destilada – controle da dieta (C) e quatro grupos foram alimentados com uma dieta hipercolesterolêmica rápida (vide tópico 2.4) durante 10 dias para avaliação do transporte reverso do colesterol, o qual é devido ao aumento da concentração sérica dos níveis de HDL para compensar o excesso de colesterol exógeno proveniente da dieta hipercolesterolêmica (26).

Os ratos que receberam dieta hipercolesterolêmica foram divididos, aleatoriamente, em quatro grupos submetidos aos seguintes tratamentos por cinco dias, antes do fim da dieta hipercolesterolêmica: (1) DHC – dieta hipercolesterolêmica - água purificada; (2) DHC+AG (15 mg/Kg); (3) DHC+AC (10 mg/Kg), (4) DHC+AG+AC- AG (7,5 mg/Kg) + AC (5 mg/Kg). As doses utilizadas foram escolhidas com base em estudos prévios (13, 57). E o tempo de tratamento foi determinado visando uma rápida elevação dos níveis de HDL característica do modelo. Os tratamentos farmacológicos foram administrados oralmente, via gavagem, uma vez ao dia durante cinco dias. O último tratamento foi realizado 24h antes da coleta de sangue.

### **2.3 Coleta de sangue**

Após 24 horas à administração da última dose dos tratamentos, os animais foram anestesiados com isoflurano via inalatória, para imediata coleta de sangue através de punção cardíaca, sendo que os mesmos foram mantidos em anestesia inalatória durante todo o procedimento. Após a coleta, os animais foram eutanasiados por descolamento cervical. As amostras de sangue foram coletadas em tubos sem anticoagulante, e em seguida centrifugadas a 3000 rpm por 10 min para obtenção do soro, o qual foi utilizado nas análises.

### **2.4 Biomarcadores lipídicos, endotelial e oxidativo.**

Foram analisados os biomarcadores lipídicos: CT, LDL, HDL, triglicerídeos e efeito dos tratamentos nos mesmos. Estas análises foram realizadas no laboratório de Análises Clínicas do Hospital Veterinário da Universidade de Cruz Alta, utilizando métodos enzimáticos com kits comerciais da Labtest Diagnóstica SA, através de um analisador bioquímico semi-automático LabQuest. O ON também foi avaliado para controle da função endotelial nesses animais, através da dosagem de nitritos e nitratos, seguindo a técnica descrita por Tastch *et al.* (2010) (58). Para avaliação do perfil antioxidante, a CTA foi mensurada como descrito por Erel (2004) (30). Todos os resultados foram expressos em mg/dL, com exceção da CTA que foi expressa em mmol Trolox Equivalente/L.

### **2.5 Análise estatística**

Os dados foram expressos em média e desvio padrão. Foi utilizado o teste de Kolmogorov-Smirnov para verificação da normalidade. A partir desse ponto, quando os dados seguiam uma distribuição normal - paramétricos foi utilizado ANOVA de uma via para verificação da diferença entre os grupos controle e dos diferentes tratamentos, seguida do teste Student Newman-Keuls. Quando os dados não seguiam a distribuição normal foi utilizado Kruskal-Wallis seguido de pós teste de Dunn. O Software utilizado para análises e confecção de graficos foi o GraphPad

5.0.  $p < 0.05$  foi considerado como indicativo de diferença significativa entre os grupos.

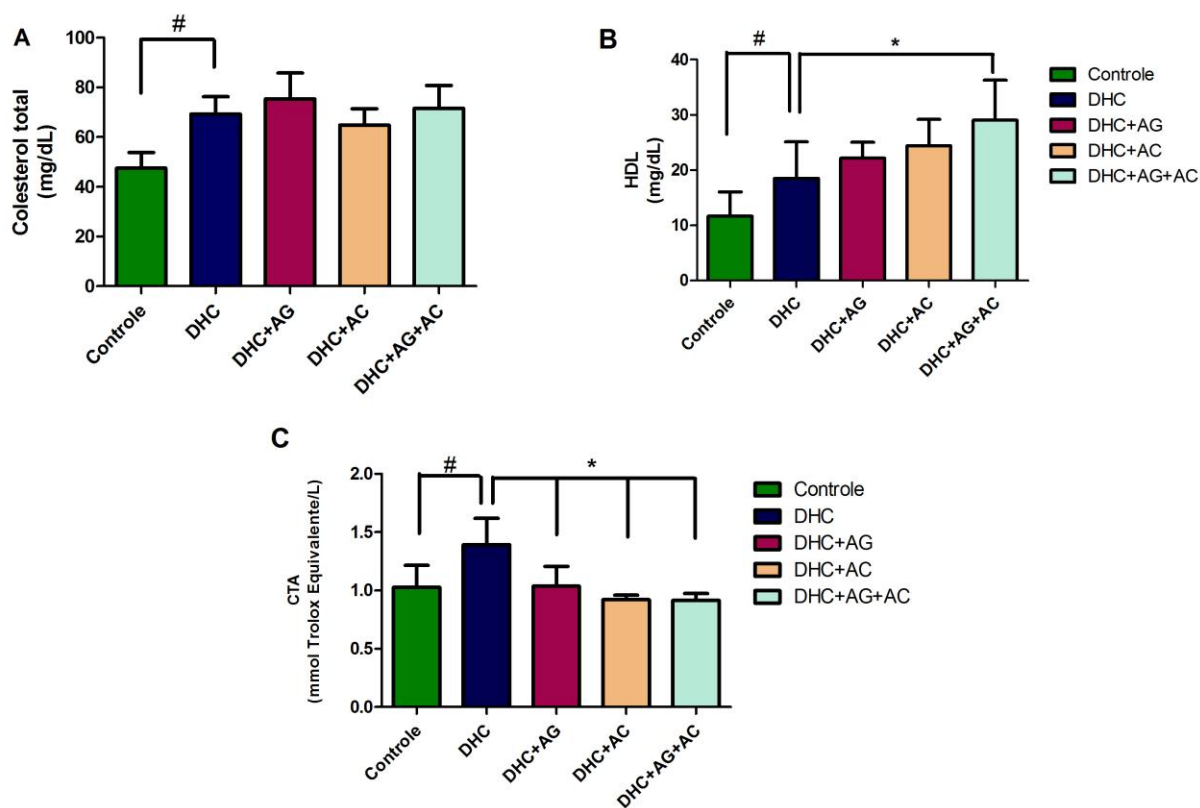
### 3 RESULTADOS

Após dez dias de tratamento, o grupo DHC ( $69,31 \pm 6,951$ ) demonstrou elevação em relação aos níveis de CT quando comparado com o grupo controle ( $47,44 \pm 6,320$ ), demonstrando que a ração hipercolesterolêmica foi capaz de elevar o CT dos animais (fig. 1A). O aumento dos níveis de CT destes animais se deu pelo aumento dos níveis de HDL (fig. 1B), uma vez que os níveis de HDL foram significativamente superiores no grupo DHC quando comparado ao controle.

De modo mais específico, observou-se um aumento nos níveis de HDL no grupo DHC+AG+AC ( $29,07 \pm 7,2$ ) quando comparado ao grupo DHC ( $18,53 \pm 6,6$ ), evidenciando que o tratamento com a associação dos AFs (AG e AC) foi capaz de elevar os níveis de HDL (fig. 1B). Em relação aos tratamentos de cinco dias com AFs concomitantes às dietas, os grupos DHC+AG, DHC+AC e DHC+AG+AC não diferiram do grupo DHC para os níveis de CT, evidenciando que os tratamentos com AFs não alteraram os níveis de CT (fig. 1A) e LDL (tabela I).

Quanto a CTA, observou-se um aumento no grupo DHC ( $1,393 \pm 0,23$ ) quando comparado ao controle ( $1,030 \pm 0,19$ ), mostrando que a dieta hipercolesterolêmica desafiou as defesas antioxidantes. Nos grupos DHC+AG ( $1,038 \pm 0,17$ ), DHC+AC ( $0,92 \pm 0,041$ ) e DHC+AG+AC ( $0,916 \pm 0,059$ ) houve redução em relação ao grupo DHC ( $1,393 \pm 0,23$ ) (fig. 1C).

Fig.1 Níveis de CT, HDL e CTA nos diferentes grupos experimentais.



Quanto aos níveis de ON, não houve diferença entre os grupos experimentais, evidenciando que nesse modelo os AFs não interferiram na função endotelial. De mesmo modo, não houve diferença entre os grupos no parâmetro de triglicerídeos (tabela I). Cabe salientar ainda que não houve diferença entre os grupos no parâmetro triglicerídeos (tabela I).

Tabela I: Níveis de CT, HDL, LDL, triglicerídeos e ON nos diferentes grupos experimentais após cinco dias de tratamento com AFs.

	Controle	DHC	DHC+AG	DHC+AC	DHC+AG+AC
CT (mg/dL)	47,44 ± 6,32	69,31 ± 6,95#	75,36 ± 10,40	64,76 ± 6,60	71,50 ± 9,30
HDL (mg/dL)	11,68 ± 4,39	18,53 ± 6,58#	22,18 ± 2,85	24,42 ± 4,77	29,07 ± 7,21*
LDL (mg/dL)	4,82 ± 0,84	6,27 ± 2,78	4,38 ± 1,92	3,3 ± 2,3	4,1 ± 1,4
Triglicerídeos (mg/dL)	61,67 ± 43,16	72,83 ± 10,40	77,50 ± 28,39	70,50 ± 30,97	46,50 ± 4,59
ON (µmol/L)	64,20 ± 18,24	91,40 ± 22,46	94,33 ± 28,36	75,43 ± 27,73	61,00 ± 18,01

Ao se analisar a interação do tempo e tratamento no ganho de peso dos animais, observou-se que não houve diferenças estatísticas entre os grupos (dados não apresentados). Isso evidencia a ausência de influência da dieta e dos tratamentos no ganho de peso desses animais, no curto tempo do estudo.

#### 4 DISCUSSÃO

AG e AC estão presentes em diversas plantas com potencial medicinal, e vem sendo estudados de maneira individual em diversos parâmetros, dentre eles no perfil lipídico. Porém, de maneira associada, estes compostos são testados apenas em extratos complexos, e pouco se sabe acerca do potencial dessa associação de AFs (2, 3).

Em nosso estudo, de maneira individual, AG e AC não foram capazes de promover alteração dos biomarcadores lipídicos. Por outro lado, a associação de AG com AC, possibilitou a elevação dos níveis de HDL nos ratos Wistar, impedindo também o aumento das defesas antioxidantes.

Compostos poli fenólicos, derivados de plantas, despontam uma vasta gama de propriedades farmacológicas, sendo que o estudo do seu mecanismo de ação tem sido objeto de considerável interesse nos últimos anos. Punithavathi *et al.* (2011) analisaram o homogenato de fígado de ratos diabéticos induzidos com estreptozotocina e evidenciaram que houve uma elevação na atividade da enzima HMG-CoAr (59). Esse fato já havia sido anteriormente verificado por Catanzaro e Suen (1996), sendo que o tratamento com AG (10 mg e 20 mg/kg) foi capaz de reduzir a atividade da HMG-CoAr, concomitantemente com a diminuição dos níveis de CT hepático nos ratos tratados com esse fitoquímico (13).

Neste contexto, o AG tem recebido grande atenção devido a sua potente ação antioxidante centrada na sua capacidade de sequestrar radicais livres. Ele é um AF endógeno presente em plantas, e encontrado naturalmente em abundância em chás, frutas como a uva, e bebidas como o vinho. Apresenta ações farmacológicas importantes, tais como: anti-inflamatória, anticancerígena e um potente efeito antioxidante (55). Ainda, Jang *et al.*, (2008) demonstrou que o AG possui efeito hipolipemiante em ratos alimentados com dieta rica em gordura, reduzindo os níveis de CT, TG, HDL e LDL colesterol destes animais, em tratamento de sete semanas

(56). Os resultados do presente estudo mostraram que não houve alterações nas variáveis lipídicas, fato esse, sugere que o AG isoladamente, assim como a própria dieta, necessitem de um período maior para modificar o metabolismo lipídico. Além do período de tratamento, a dose utilizada por JANG *et al.* (2008) foi superior a do presente estudo, apontando também que a dose pode interferir nas mudanças efetivas do perfil lipídico (56). Embora, quando associado ao AC, pode ser utilizado com doses menores, como evidenciado em nosso estudo.

O AC, por sua vez, além de elevar a capacidade inibitória da HMG-CoAr (60), seu consumo está associado à redução do risco cardiovascular, visto que, Klafke *et al.* (2016) demonstraram que *C. xanthocarpa*, planta que contém AG e AC em sua composição, reduziu os níveis de LDL oxidado (18).

Sustentando o efeito do AC, o estudo de Cho *et al.* (2010) também demonstrou que este AF atua reduzindo a síntese de ácidos graxos e colesterol, através da inibição da HMG-CoAr (14). No entanto, assim como para o AG, o AC não foi capaz de alterar significativamente os níveis dos biomarcadores séricos lipídicos, quando administrado isoladamente na dose de 10 mg/Kg.

Dados do nosso experimento demonstraram que os AFs isoladamente não surtiram efeitos significativos sobre os biomarcadores lipídicos nos ratos Wistar. No entanto, quando foram usados em associação (grupo DHC+AG+AC = 7,5 mg/Kg de AG + 5 mg/Kg de AC), aumentaram significativamente os níveis de HDL, provocado pelo início da dieta hipercolesterolêmica, indicando um provável efeito sinérgico entre esses AFs. O aumento dos níveis de colesterol HDL é de extrema importância como um fator protetor contra a doença aterosclerótica, uma vez que ele atua transportando colesterol e ésteres de colesterol dos tecidos periféricos e células para o fígado, onde será metabolizado gerando ácidos biliares, e consequentemente reduzindo o colesterol total circulante (61, 62).

Em reforço a nossos achados, El-Tantawy *et al.* (2015), demonstraram que o extrato etanólico das raízes de *Panicum repens L.* (escalracho), aumentou os níveis de HDL em ratos (3), sendo que esta planta apresenta em sua composição os mesmos AFs presentes em *C. xanthocarpa*, AG e AC (18). Apesar de ambos os AFs demonstrarem melhora no perfil lipídico em estudos anteriores, eles não foram capazes de reduzir isoladamente os níveis de CT e LDL no modelo de dieta hipercolesterolêmica.

O efeito da associação destes AFs nos níveis séricos de HDL poderia ser explicado por um possível efeito inibitório da proteína transferidora de ésteres de colesterol (CETP), que por sua vez, é uma proteína que modula a troca de ésteres de colesterol e triglicerídeos entre HDL e lipoproteínas que contenham ApoB (VLDL e LDL), gerando HDL pobre em lipídios que será reincorporada na formação de novas partículas ou excretada na urina. Sendo assim, a inibição da CETP culmina na elevação dos níveis de HDL (33). Desse modo, a CETP está relacionada negativamente com o HDL e positivamente com triglicerídeos, ou seja, sua inibição eleva o HDL ao passo que reduz os níveis de triglicerídeos (63).

Nos últimos anos, diversos estudos têm sido elaborados na busca de um inibidor dessa proteína, e alguns candidatos foram testados sem sucesso, a citar dalcetrapib, evacetrapib e torcetrapib, sendo que o último mostrou-se prejudicial aos pacientes devido o aumento de aldosterona, elevando a pressão arterial, enquanto que os outros se mostraram seguros, porém sem o efeito desejado (64).

Além disso, experimentos estão em execução com o candidato mais atual anacetrapib, o qual é capaz de elevar o colesterol HDL, assim como reduzir os triglicerídeos, porém seus efeitos cardiovasculares e perfil de segurança ainda não foram realizados (63). Em nosso estudo, encontramos efeito parcialmente semelhante ao descrito acima, sugerindo o papel da associação de AG e o AC como um inibidor da CETP.

Estes AFs derivados de produtos naturais podem despontar como uma possível terapia inibidora da CETP de baixo custo e de fácil obtenção, auxiliando ainda mais no tratamento da doença aterosclerótica, associado aos demais efeitos destes compostos já descritos na literatura como o efeito antioxidante, anti-inflamatório, antidiabético e cardioprotetor (55), assim como a elucidação do envolvimento do HDL nesse potencial terapêutico.

Entretanto, cabe ressaltar que dois estudos envolvendo a *C. xanthocarpa*, planta que possui AG e AC em sua composição, não alteraram os níveis de HDL em humanos, durante tratamento de 90 dias. Apesar desse contra ponto, é possível que a concentração de AG e AC na planta tenha sido insuficiente para causar o efeito encontrado no presente estudo (2, 65). Por outro lado, o produto final da associação de AG e AC pode apresentar-se como uma opção mais viável na

inibição de CETP, quando comparado ao pó da planta, que possui outros constituintes em sua composição.

No que diz respeito aos aspectos oxidativos, a dieta mostrou-se capaz de forçar o aumento das defesas antioxidantes, representado pelo aumento do CTA no grupo que recebeu dieta hipercolesterolêmica em relação ao grupo da dieta normal. Esse achado vai ao encontro do estudo de Bellassoued *et al.*, (2015), onde mostrou que a dieta hipercolesterolêmica por si só, foi capaz de elevar as defesas antioxidantes em ratos Wistar (66). Cabe ainda salientar, que ambos os AFs, isoladamente e em associação reduziram os níveis de CTA, deixando-o em nível semelhante ao do grupo controle. Sendo assim, essa redução pode ser entendida como um possível efeito de neutralização de radicais livres, o qual já foi demonstrado em estudos prévios, sendo desencadeado por intermédio destes AFs, preservando o organismo do dano oxidativo, evitando a necessidade de forçar o sistema antioxidante dos animais (9-12).

Com relação à função endotelial, AG e AC não alteraram os níveis de ON no presente estudo. Todavia, esses compostos possuem efeito de elevação do ON já descrito anteriormente, mas em concentrações bem menores que as aqui utilizadas e de modo *in vitro*, sem evidências *in vivo* para o efeito dessa associação nos níveis de ON (9-12). Além disso, o estudo de Viecili *et al.*, (2014), demonstrou que a planta *C. xanthocarpa*, a qual possui AG e AC na sua composição, foi capaz de elevar os níveis de ON (65). No entanto, o tratamento utilizado foi de noventa dias, levando a crer que o aumento no tempo de tratamento pode ser a chave para atingir um possível efeito nesse parâmetro ou somente o extrato completo desempenha este efeito.

## **5 CONCLUSÃO**

O presente estudo demonstrou que a associação dos AFs, AG e AC, potencializou a elevação dos níveis de HDL e impediu a elevação das defesas antioxidantes em modelo de ratos Wistar, contribuindo com a perspectiva de futuros estudos que buscam terapias alternativas no combate da aterosclerose.



## 6 LEGENDAS DE FIGURAS

Fig. 1: (A) Níveis de CT, (B) níveis de HDL e (C) níveis de ON nos diferentes grupos experimentais após cinco dias de tratamento com AFs e veículo. Controle: grupo dieta normal tratado com água destilada; DHC: grupo com dieta hipercolesterolêmica tratado com água destilada; HDC+AG: grupo tratado com ácido gálico (15,25 mg/Kg); DHC+AC: grupo tratado com ácido clorogênico (9,6 mg/Kg); DHC+AG+AC: grupo associação tratado com metade da dose de AG e AC associados. ANOVA de uma via seguida pelo teste de comparação múltipla "Student-Newman-Keuls" # quando comparado ao grupo controle; \* quando comparado ao grupo DHC. (n= 7 por grupo) #, \* =  $p < 0,05$ .

## 7 LEGENDAS DE TABELAS

Tabela I. Níveis de CT, HDL, LDL, triglicérides e ON nos diferentes grupos experimentais após cinco dias de tratamento com AFs. Controle: grupo dieta normal tratado com água destilada; DHC: grupo com dieta hipercolesterolêmica tratado com água destilada; DHC+AG: grupo tratado com ácido gálico; DHC+AC: grupo tratado com ácido clorogênico; DHC+AG+AC: grupo associação tratado com AG e AC associados. ANOVA de uma via seguida pelo teste de comparação múltipla "Newman-Keuls" # quando comparado ao grupo controle; \* quando comparado ao grupo DHC

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS MANUSCRITO

1. Porto FG. Isolamento dos componentes fitoquímicos de campomanesia xanthocarpa para análise da atividade da enzima 3-hidroxi-3-metil-glutaril coa redutase [Trabalho de Conclusão de Curso]: Universidade de Cruz Alta; 2014.
2. Klafke JZ, da Silva MA, Panigas TF, Belli KC, de Oliveira MF, Barichello MM, et al. Effects of Campomanesia xanthocarpa on biochemical, hematological and oxidative stress parameters in hypercholesterolemic patients. *Journal of ethnopharmacology*.127(2):299-305.2010.
3. El-Tantawy WH, Temraz A, Hozaien HE, El-Gindi OD, Taha KF. Anti-hyperlipidemic activity of an extract from roots and rhizomes of *Panicum repens* L. on high cholesterol diet-induced hyperlipidemia in rats. *Zeitschrift fur Naturforschung C, Journal of biosciences*.70(5-6):139-44.2015.
4. Kianbakht S, Nabati F, Abasi B. *Salvia officinalis* (Sage) Leaf Extract as Add-on to Statin Therapy in Hypercholesterolemic Type 2 Diabetic Patients: a Randomized Clinical Trial. *International journal of molecular and cellular medicine*.5(3):141-8.2016.
5. Nabavi SM, Habtemariam S, Nabavi SF, Sureda A, Daglia M, Moghaddam AH, et al. Protective effect of gallic acid isolated from *Peltiphyllum peltatum* against sodium fluoride-induced oxidative stress in rat's kidney. *Molecular and cellular biochemistry*.372(1-2):233-9.2013.
6. Chang JJ, Chen TH, Chan P, Chen YJ, Hsu FL, Lo MY, et al. The in vitro inhibitory effect of tannin derivatives on 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme a reductase on vero cells. *Pharmacology*.62(4):224-8.2001.
7. Prabhakar PK, Doble M. Synergistic effect of phytochemicals in combination with hypoglycemic drugs on glucose uptake in myotubes. *Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology*.16(12):1119-26.2009.
8. Hwang SJ, Kim YW, Park Y, Lee HJ, Kim KW. Anti-inflammatory effects of chlorogenic acid in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 cells. *Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society [et al]*.63(1):81-90.2014.
9. Kim YJ. Antimelanogenic and antioxidant properties of gallic acid. *Biological & pharmaceutical bulletin*.30(6):1052-5.2007.
10. Ji BC, Hsu WH, Yang JS, Hsia TC, Lu CC, Chiang JH, et al. Gallic acid induces apoptosis via caspase-3 and mitochondrion-dependent pathways in vitro and suppresses lung xenograft tumor growth in vivo. *Journal of agricultural and food chemistry*.57(16):7596-604.2009.
11. Kang N, Lee JH, Lee W, Ko JY, Kim EA, Kim JS, et al. Gallic acid isolated from *Spirogyra* sp. improves cardiovascular disease through a vasorelaxant and antihypertensive effect. *Environmental toxicology and pharmacology*.39(2):764-72.2015.
12. Jiang R, Hodgson JM, Mas E, Croft KD, Ward NC. Chlorogenic acid improves ex vivo vessel function and protects endothelial cells against HOCl-induced oxidative damage, via increased production of nitric oxide and induction of Hmox-1. *The Journal of nutritional biochemistry*.27:53-60.2016.
13. CATANZARO NDJA, SUEN R. Clinical laboratory indicators of cardiovascular disease risk. . *Alt Med Rev* 1(3):185-94.1996.
14. Cho AS, Jeon SM, Kim MJ, Yeo J, Seo KI, Choi MS, et al. Chlorogenic acid exhibits anti-obesity property and improves lipid metabolism in high-fat diet-induced-obese mice.

Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association.48(3):937-43.2010.

15. Boren J, Gustafsson M, Skalen K, Flood C, Innerarity TL. Role of extracellular retention of low density lipoproteins in atherosclerosis. *Current opinion in lipidology*.11(5):451-6.2000.
16. Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *The New England journal of medicine*.340(2):115-26.1999.
17. Hamasaki S, Higano ST, Suwaidi JA, Nishimura RA, Miyachi K, Holmes DR, Jr., et al. Cholesterol-lowering treatment is associated with improvement in coronary vascular remodeling and endothelial function in patients with normal or mildly diseased coronary arteries. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*.20(3):737-43.2000.
18. Klafke JZ, Pereira RL, Hirsch GE, Parisi MM, Porto FG, de Almeida AS, et al. Study of oxidative and inflammatory parameters in LDLr-KO mice treated with a hypercholesterolemic diet: Comparison between the use of *Campomanesia xanthocarpa* and acetylsalicylic acid. *Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology*.23(11):1227-34.2016.
19. Rafieian-Kopaei M, Setorki M, Douidi M, Baradaran A, Nasri H. Atherosclerosis: process, indicators, risk factors and new hopes. *International journal of preventive medicine*.5(8):927-46.2014.
20. Flavahan NA. Atherosclerosis or lipoprotein-induced endothelial dysfunction. Potential mechanisms underlying reduction in EDRF/nitric oxide activity. *Circulation*.85(5):1927-38.1992.
21. Gradinaru D, Borsa C, Ionescu C, Prada GI. Oxidized LDL and NO synthesis--Biomarkers of endothelial dysfunction and ageing. *Mechanisms of ageing and development*.151:101-13.2015.
22. Furman MI, Benoit SE, Barnard MR, Valeri CR, Borbone ML, Becker RC, et al. Increased platelet reactivity and circulating monocyte-platelet aggregates in patients with stable coronary artery disease. *Journal of the American College of Cardiology*.31(2):352-8.1998.
23. Zhao J, Qi R, Li R, Wu W, Gao X, Bao L, et al. Protective effects of aspirin against oxidized LDL-induced inflammatory protein expression in human endothelial cells. *Journal of cardiovascular pharmacology*.51(1):32-7.2008.
24. Sukhovshin RA, Yepuri G, Ghebremariam YT. Endothelium-Derived Nitric Oxide as an Antiatherogenic Mechanism: Implications for Therapy. *Methodist DeBakey cardiovascular journal*.11(3):166-71.2015.
25. Brunham LR. HDL as a Causal Factor in Atherosclerosis: Insights from Human Genetics. *Current atherosclerosis reports*.18(12):71.2016.
26. Lee-Rueckert M, Escola-Gil JC, Kovanen PT. HDL functionality in reverse cholesterol transport--Challenges in translating data emerging from mouse models to human disease. *Biochimica et biophysica acta*.1861(7):566-83.2016.
27. Papageorgiou N, Zacharia E, Androulakis E, Briasoulis A, Charakida M, Tousoulis D. HDL as a prognostic biomarker for coronary atherosclerosis: the role of inflammation. *Expert opinion on therapeutic targets*.20(8):907-21.2016.
28. Klafke JZ, Porto FG, Batista R, Bochi GV, Moresco RN, da Luz PL, et al. Association between hypertriglyceridemia and protein oxidation and proinflammatory markers in normocholesterolemic and hypercholesterolemic individuals. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*.448:50-7.2015.

29. Al-Aubaidy HA, Jelinek HF. Oxidative stress and triglycerides as predictors of subclinical atherosclerosis in prediabetes. *Redox report : communications in free radical research*.19(2):87-91.2014.
30. Erel O. A novel automated method to measure total antioxidant response against potent free radical reactions. *Clinical biochemistry*.37(2):112-9.2004.
31. Forrester JS, Makkar R, Shah PK. Increasing high-density lipoprotein cholesterol in dyslipidemia by cholesteryl ester transfer protein inhibition: an update for clinicians. *Circulation*.111(14):1847-54.2005.
32. Marzzoco A, Torres B. *Bioquímica Básica*. 3° ed. Rio de Janeiro 2010.
33. LIMA ES, COUTO RD. Estrutura, metabolismo e funções fisiológicas da lipoproteína de alta densidade. *J Bras Patol Med Lab*.42(3):169-78.2006.
34. Kleemann R, Kooistra T. HMG-CoA reductase inhibitors: effects on chronic subacute inflammation and onset of atherosclerosis induced by dietary cholesterol. *Current drug targets Cardiovascular & haematological disorders*.5(6):441-53.2005.
35. Venkateshwaran M, Jayaraman D, Chabaud M, Genre A, Balloon AJ, Maeda J, et al. A role for the mevalonate pathway in early plant symbiotic signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*.112(31):9781-6.2015.
36. Oliveira EF, Santos-Martins D, Ribeiro AM, Bras NF, Cerqueira NS, Sousa SF, et al. HMG-CoA Reductase inhibitors: an updated review of patents of novel compounds and formulations (2011-2015). *Expert opinion on therapeutic patents*.26(11):1257-72.2016.
37. Espenshade PJ, Hughes AL. Regulation of sterol synthesis in eukaryotes. *Annual review of genetics*.41:401-27.2007.
38. Kavalipati N, Shah J, Ramakrishan A, Vasawala H. Pleiotropic effects of statins. *Indian journal of endocrinology and metabolism*.19(5):554-62.2015.
39. Okuyama H, Langsjoen PH, Hamazaki T, Ogushi Y, Hama R, Kobayashi T, et al. Statins stimulate atherosclerosis and heart failure: pharmacological mechanisms. *Expert review of clinical pharmacology*.8(2):189-99.2015.
40. Salen G, Starc T, Sisk CM, Patel SB. Intestinal cholesterol absorption inhibitor ezetimibe added to cholestyramine for sitosterolemia and xanthomatosis. *Gastroenterology*.130(6):1853-7.2006.
41. Rang HP, Dale MM, Ritter JM. *RANG & DALE Farmacologia*. 7ª ed: Elsevier / Medicina Nacionais; 2012.
42. Krauss RM, Eckel RH, Howard B, Appel LJ, Daniels SR, Deckelbaum RJ, et al. *AHA Dietary Guidelines: revision 2000: A statement for healthcare professionals from the Nutrition Committee of the American Heart Association*. *Circulation*.102(18):2284-99.2000.
43. Ross SE, Hemati N, Longo KA, Bennett CN, Lucas PC, Erickson RL, et al. Inhibition of adipogenesis by Wnt signaling. *Science*.289(5481):950-3.2000.
44. Hillman BJ. *Alternative and complementary medicine*. *Journal of the American College of Radiology : JACR*.6(4):221.2009.
45. Patch CS, Tapsell LC, Williams PG, Gordon M. Plant sterols as dietary adjuvants in the reduction of cardiovascular risk: theory and evidence. *Vascular health and risk management*.2(2):157-62.2006.
46. Ferdowsian HR, Barnard ND. Effects of plant-based diets on plasma lipids. *The American journal of cardiology*.104(7):947-56.2009.
47. Belcaro G, Dugall M, Hosoi M, Ippolito E, Cesarone M, Luzzi R, et al. Pycnogenol(R) and Centella Asiatica for asymptomatic atherosclerosis progression. *International angiology : a journal of the International Union of Angiology*.33(1):20-6.2014.

48. Alam MA, Sernia C, Brown L. Ferulic acid improves cardiovascular and kidney structure and function in hypertensive rats. *Journal of cardiovascular pharmacology*.61(3):240-9.2013.
49. Roy S, Metya SK, Sannigrahi S, Rahaman N, Ahmed F. Treatment with ferulic acid to rats with streptozotocin-induced diabetes: effects on oxidative stress, pro-inflammatory cytokines, and apoptosis in the pancreatic beta cell. *Endocrine*.44(2):369-79.2013.
50. Chang SS, Lee VS, Tseng YL, Chang KC, Chen KB, Chen YL, et al. Gallic Acid Attenuates Platelet Activation and Platelet-Leukocyte Aggregation: Involving Pathways of Akt and GSK3beta. *Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM*.2012:683872.2012.
51. Oboh G, Agunloye OM, Akinyemi AJ, Ademiluyi AO, Adefegha SA. Comparative study on the inhibitory effect of caffeic and chlorogenic acids on key enzymes linked to Alzheimer's disease and some pro-oxidant induced oxidative stress in rats' brain-in vitro. *Neurochemical research*.38(2):413-9.2013.
52. Yamashita S, Tsubakio-Yamamoto K, Ohama T, Nakagawa-Toyama Y, Nishida M. Molecular mechanisms of HDL-cholesterol elevation by statins and its effects on HDL functions. *Journal of atherosclerosis and thrombosis*.17(5):436-51.2010.
53. Tran J, Magenau A, Rodriguez M, Rentero C, Royo T, Enrich C, et al. Activation of Endothelial Nitric Oxide (eNOS) Occurs through Different Membrane Domains in Endothelial Cells. *PloS one*.11(3):e0151556.2016.
54. Taleb S. Inflammation in atherosclerosis. *Archives of cardiovascular diseases*.2016.
55. Saibabu V, Fatima Z, Khan LA, Hameed S. Therapeutic Potential of Dietary Phenolic Acids. *Advances in pharmacological sciences*.2015:823539.2015.
56. Jang A, Srinivasan P, Lee NY, Song HP, Lee JW, Lee M, et al. Comparison of hypolipidemic activity of synthetic gallic acid-linoleic acid ester with mixture of gallic acid and linoleic acid, gallic acid, and linoleic acid on high-fat diet induced obesity in C57BL/6 Cr Slc mice. *Chemico-biological interactions*.174(2):109-17.2008.
57. Karthikesan K, Pari L, Menon VP. Antihyperlipidemic effect of chlorogenic acid and tetrahydrocurcumin in rats subjected to diabetogenic agents. *Chemico-biological interactions*.188(3):643-50.2010.
58. Tatsch E, Bochi GV, Pereira Rda S, Kober H, Agertt VA, de Campos MM, et al. A simple and inexpensive automated technique for measurement of serum nitrite/nitrate. *Clinical biochemistry*.44(4):348-50.2011.
59. Punithavathi VR, Prince PS, Kumar R, Selvakumari J. Antihyperglycaemic, antilipid peroxidative and antioxidant effects of gallic acid on streptozotocin induced diabetic Wistar rats. *European journal of pharmacology*.650(1):465-71.2011.
60. CARVALHO AAV. Estudo das atividades biológicas medicinais do extrato aquoso de *Vernonia condensata* "Boldo-Baiano". [Dissertação]. In press 2014.
61. Stein O, Stein Y. Atheroprotective mechanisms of HDL. *Atherosclerosis*.144(2):285-301.1999.
62. Newton RS, Krause BR. HDL therapy for the acute treatment of atherosclerosis. *Atherosclerosis Supplements*.3(4):31-8.2002.
63. Filippatos TD, Klouras E, Barkas F, Elisaf M. Cholesteryl ester transfer protein inhibitors: challenges and perspectives. *Expert review of cardiovascular therapy*.14(8):953-62.2016.
64. Murin J, Pernicky M, Kinova S. [Treatment of dyslipidemia - is here still place for CETP-inhibitors?]. *Vnitřní lékařství*.62(10):789-94.2016.
65. Viecili PR, Borges DO, Kirsten K, Malheiros J, Viecili E, Melo RD, et al. Effects of *Campomanesia xanthocarpa* on inflammatory processes, oxidative stress, endothelial

dysfunction and lipid biomarkers in hypercholesterolemic individuals.  
*Atherosclerosis*.234(1):85-92.2014.

66. Bellassoued K, Ghrab F, Makni-Ayadi F, Van Pelt J, Elfeki A, Ammar E. Protective effect of kombucha on rats fed a hypercholesterolemic diet is mediated by its antioxidant activity. *Pharmaceutical biology*.53(11):1699-709.2015.

# **ANEXOS**

## **ANEXO 1: Normas para publicação.**

### ARQUIVOS BRASILEIROS DE CARDIOLOGIA

#### NORMAS PARA PUBLICAÇÃO

1. Os Arquivos Brasileiros de Cardiologia (Arq Bras Cardiol) são uma publicação mensal da Sociedade Brasileira de Cardiologia, indexada no Cumulated Index Medicus da National Library of Medicine e nos bancos de dados do MEDLINE, EMBASE, LILACS, Scopus e da SciELO com citação no PubMed (United States National Library of Medicine) em inglês e português.

2. Ao submeter o manuscrito, os autores assumem a responsabilidade de o trabalho não ter sido previamente publicado e nem estar sendo analisado por outra revista. Todas as contribuições científicas são revisadas pelo Editor-Chefe, pelo Supervisor Editorial, Editores Associados e pelos Membros do Conselho Editorial. Só são encaminhados aos revisores os artigos que estejam rigorosamente de acordo com as normas especificadas. Os trabalhos também são submetidos à revisão estatística, sempre que necessário. A aceitação será na originalidade, significância e contribuição científica para o conhecimento da área.

#### 3. Seções

3.1. Editorial: todos os editoriais dos Arquivos são feitos através de convite. Não serão aceitos editoriais enviados espontaneamente.

3.2. Carta ao Editor: correspondências de conteúdo científico relacionadas a artigos publicados na revista nos dois meses anteriores serão avaliadas para publicação. Os autores do artigo original citado serão convidados a responder.

3.3. Artigo Original: os Arquivos aceitam todos os tipos de pesquisa original na área cardiovascular, incluindo pesquisas em seres humanos e pesquisa experimental.

3.4. Revisões: os editores formulam convites para a maioria das revisões. No entanto, trabalhos de alto nível, realizados por autores ou grupos com histórico de publicações na área serão bem-vindos. Não serão aceitos, nessa seção, trabalhos cujo autor principal não tenha vasto currículo acadêmico ou de publicações, verificado através do sistema Lattes (CNPQ), Pubmed ou SciELO. Eventualmente, revisões submetidas espontaneamente poderão ser reclassificadas como “Atualização Clínica” e publicadas nas páginas eletrônicas, na internet (ver adiante).



3.5. Comunicação Breve: experiências originais, cuja relevância para o conhecimento do tema justifique a apresentação de dados iniciais de pequenas séries, ou dados parciais de ensaios clínicos, serão aceitos para avaliação.

3.6. Correlação Anátomo-Clínica: apresentação de um caso clínico e discussão de aspectos de interesse relacionados aos conteúdos clínico, laboratorial e anátomo-patológico.

3.7. Correlação Clínico-Radiográfica: apresentação de um caso de cardiopatia congênita, salientando a importância dos elementos radiográficos e/ou clínicos para a consequente correlação com os outros exames, que comprovam o diagnóstico. Última-se daí a conduta adotada.

3.8. Atualização Clínica: essa seção busca focar temas de interesse clínico, porém com potencial de impacto mais restrito. Trabalhos de alto nível, realizados por autores ou grupos com histórico de publicações na área serão aceitos para revisão.

3.9. Relato de Caso: casos que incluam descrições originais de observações clínicas, ou que representem originalidade de um diagnóstico ou tratamento, ou que ilustrem situações pouco frequentes na prática clínica e que mereçam uma maior compreensão e atenção por parte dos cardiologistas serão aceitos para avaliação.

3.10. Imagem Cardiovascular: imagens clínicas ou de pesquisa básica, ou de exames complementares que ilustrem aspectos interessantes de métodos de imagem, que esclareçam mecanismos de doenças cardiovasculares, que ressaltem pontos relevantes da fisiopatologia, diagnóstico ou tratamento serão consideradas para publicação.

3.11. Ponto de Vista: apresenta uma posição ou opinião dos autores a respeito de um tema científico específico. Esta posição ou opinião deve estar adequadamente fundamentada na literatura ou em sua experiência pessoal, aspectos que irão ser a base do parecer a ser emitido.

4. Processo de submissão: os manuscritos deverão ser enviados via internet e sistema, disponível no endereço: <http://www.arquivosonline.com.br/2013/submissao>

5. Todos os artigos devem vir acompanhados por uma carta de submissão ao editor, indicando a seção em que o artigo deva ser incluído (vide lista acima), declaração do autor de que todos os coautores estão de acordo com o conteúdo expresso no trabalho, explicitando ou não conflitos de interesse\* e a inexistência de problemas éticos relacionados.

6. Todos os manuscritos são avaliados para publicação no menor prazo possível, porém, trabalhos que mereçam avaliação especial para publicação acelerada (“fast-track”) devem ser indicados na carta de submissão ao editor.

7. Os textos e as tabelas devem ser editados em word e as figuras e ilustrações devem ser anexados em arquivos separados, na área apropriada do sistema. Figuras devem ter extensão JPEG e resolução mínima de 300 DPI. As Normas para Formatação de Tabelas, Figuras e Gráficos encontram-se em [http://www.arquivosonline.com.br/publicacao/informacoes\\_autores.asp](http://www.arquivosonline.com.br/publicacao/informacoes_autores.asp) / [http://publicacoes.cardiol.br/pub\\_abc/autor/pdf/manual\\_de\\_formatacao\\_abc.pdf](http://publicacoes.cardiol.br/pub_abc/autor/pdf/manual_de_formatacao_abc.pdf)

8. Conflito de interesses: quando existe alguma relação entre os autores e qualquer entidade pública ou privada que pode derivar algum conflito de interesse, essa possibilidade deve ser comunicada e será informada no final do artigo. Enviar a Declaração de Potencial Conflito de Interesses para [revista@cardiol.br](mailto:revista@cardiol.br), colocando no assunto número do artigo. Acesse: [http://www.arquivosonline.com.br/pdf/conflito\\_de\\_interesse\\_abc\\_2013.pdf](http://www.arquivosonline.com.br/pdf/conflito_de_interesse_abc_2013.pdf)

9. Formulário de contribuição do autor: o autor correspondente deverá completar, assinar e enviar por e-mail ([revista@cardiol.br](mailto:revista@cardiol.br) – colocar no assunto número do artigo) os formulários, explicitando as contribuições de todos os participantes, que serão informadas no final do artigo. Acesse: [http://www.arquivosonline.com.br/pdf/formulario\\_contribuicao\\_abc\\_2013.pdf](http://www.arquivosonline.com.br/pdf/formulario_contribuicao_abc_2013.pdf)

10. Direitos Autorais: os autores dos artigos aprovados deverão encaminhar para os Arquivos, previamente à publicação, a declaração de transferência de direitos autorais assinada por todos os coautores (preencher o formulário da página [http://publicacoes.cardiol.br/pub\\_abc/autor/pdf/Transferencia\\_de\\_Direitos\\_Autorais.pdf](http://publicacoes.cardiol.br/pub_abc/autor/pdf/Transferencia_de_Direitos_Autorais.pdf) e enviar para [revista@cardiol.br](mailto:revista@cardiol.br), colocando no assunto número do artigo).

## 11. Ética

11.1. Os autores devem informar, no texto e/ou na ficha do artigo, se a pesquisa foi aprovada pela Comissão de Ética em Pesquisa de sua instituição em consoante à Declaração de Helsinki.

11.2. Nos trabalhos experimentais envolvendo animais, os autores devem indicar se os procedimentos seguidos seguiram os padrões éticos do comitê responsável por experimentação humana (institucional e nacional) e da Declaração de Helsinki de 1975, revisada em 2008. Se houver dúvida quanto à realização da pesquisa em conformidade com a Declaração de Helsinki, os autores devem explicar as razões para sua abordagem e demonstrar que o corpo de revisão institucional explicitamente aprovou os aspectos duvidosos do estudo. Ao relatar experimentos com animais, os autores devem indicar se as diretrizes institucionais e nacionais para o cuidado e uso de animais de laboratório foram seguidas.

11.3. Nos trabalhos experimentais envolvendo seres humanos, os autores devem indicar se os procedimentos seguidos seguiram os padrões éticos do comitê responsável por experimentação humana (institucional e nacional) e da Declaração de Helsinki de 1975, revisada em 2008. Se houver dúvida quanto à realização da pesquisa em conformidade com a Declaração de Helsinki, os autores devem explicar as razões para sua abordagem e demonstrar que o corpo de revisão institucional explicitamente aprovou os aspectos duvidosos do estudo. Estudos realizados em humanos devem estar de acordo com os padrões éticos e com o devido consentimento livre e esclarecido dos participantes conforme Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde do Ministério da Saúde (Brasil), que trata do Código de Ética para Pesquisa em Seres Humanos e, para autores fora do Brasil, devem estar de acordo com Committee on Publication Ethics (COPE).

## 12. Ensaio clínico

12.1. O International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE) e a Organização Mundial da Saúde (OMS) acredita que é importante promover uma base de dados de estudos clínicos abrangente e disponível publicamente. O ICMJE define um estudo clínico como qualquer projeto de pesquisa que prospectivamente designa seres humanos para intervenção ou comparação simultânea ou grupos de controle para estudar a relação de causa e efeito entre uma intervenção médica e um desfecho relacionado à saúde. As intervenções médicas incluem medicamentos, procedimentos cirúrgicos, dispositivos, tratamentos comportamentais, mudanças no processo de atendimento, e outros.

12.2. O número de registro do estudo deve ser publicado ao final do resumo. Serão aceitos qualquer registro que satisfaça o ICMJE, ex. <http://clinicaltrials.gov/>. A lista completa de todos os registros de ensaios clínicos pode ser encontrada no seguinte endereço: <http://www.who.int/ictpr/network/primary/en/index.html>. 12.3. Os ensaios clínicos devem seguir em sua apresentação as regras do CONSORT STATEMENT. Acesse <http://www.consort-statement.org/consortstatement/> 13. Citações bibliográficas: os Arquivos adotam as Normas de Vancouver – Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journal ([www.icmje.org](http://www.icmje.org)).

14. Idioma: os artigos devem ser redigidos em língua portuguesa (com a ortografia vigente) e/ou inglês.

14.1. Para os trabalhos que não possuem versão em inglês ou que essa seja julgada inadequada pelo Conselho Editorial, a revista providenciará a tradução sem ônus para o(s) autor(es).

14.2. Caso já exista a versão em inglês, tal versão deve ser enviada para agilizar a publicação.

14.3. As versões inglês e português serão disponibilizadas na íntegra no endereço eletrônico da SBC (<http://www.arquivosonline.com.br>) e da SciELO ([www.scielo.br](http://www.scielo.br)), permanecendo à disposição da comunidade internacional.

15. Avaliação pelos Pares (peer review): todos os trabalhos enviados aos ABC serão submetidos à avaliação inicial dos editores, que decidirão, ou não, pelo envio a revisão por pares (peer review), todos eles pesquisadores com publicação regular em revistas indexadas e cardiologistas com alta qualificação (Corpo de Revisores dos ABC <http://www.arquivosonline.com.br/conselhoderevisores/>).

15.1. Os autores podem indicar até cinco membros do Conselho de Revisores para análise do manuscrito submetido, assim como podem indicar até cinco revisores para não participar do processo.

15.2. Os revisores tecerão comentários gerais sobre o manuscrito e decidirão se esse trabalho deve ser publicado, corrigido segundo as recomendações, ou rejeitado.

15.3. Os editores, de posse dos comentários dos revisores, tomarão a decisão final. Em caso de discrepâncias entre os revisores, poderá ser solicitada uma nova opinião para melhor julgamento.

15.4. As sugestões de modificação dos revisores serão encaminhadas ao autor principal. O manuscrito adaptado às novas exigências será reencaminhado aos revisores para verificação.

15.5. Em casos excepcionais, quando o assunto do manuscrito assim o exigir, o Editor poderá solicitar a colaboração de um profissional que não conste do Corpo de Revisores. 15.6. Os autores têm o prazo de trinta dias para proceder às modificações solicitadas pelos revisores e submeter novamente o artigo. A inobservância desse prazo implicará na retirada do artigo do processo de revisão.

15.7. Sendo aceitos para revisão, os pareceres dos revisores deverão ser produzidos no prazo de 30 dias.

15.8. As decisões serão comunicadas por mensagem do Sistema de Envio de Artigos e e-mail.

15.9. As decisões dos editores não serão discutidas pessoalmente, nem por telefone. As réplicas deverão ser submetidas por escrito à revista.

## 15.10. Limites de texto:

	Artigo Original	Editorial	Artigo de Revisão Atualização Clínica	Relato de Caso	Comunicação Breve	Ponto de Vista	Carta ao Editor	Imagem	Correlações
Nº máx. de autores	10	2	4	6	8	8	3	5	4
Título (caracteres incluindo espaços)	150	120	150	120	120	120	120	120	120
Título reduzido (caracteres incluindo espaços)	50	50	50	50	50	50	50	50	50
Resumo (nº máx. de palavras)	250	--	250	--	250	--	--	--	--
Nº máx. de palavras (incluindo referências)	5000	1500	6500	1500	1500	2500	500	250	800
Nº máx. de referências	40	15	80	10	10	20	5	--	10
Nº máx. de tabelas + figs + vídeo	8	2	8	2	2	2	1	1	1

## 1 15.11. Orientações Estatísticas

15.11.1. O uso adequado dos métodos estatísticos bem como sua correta descrição é de suma importância para a publicação nos Arquivos Brasileiros de Cardiologia. Desta forma, a seguir, são apresentadas orientações gerais aos autores sobre as informações que devem ser fornecidas no artigo referente à análise estatística (para maiores detalhes, sugerimos a leitura das orientações estatísticas do European Heart Journal).

### 1) Sobre a amostra:

- Detalhamento tanto da população de interesse quanto dos procedimentos utilizados para definição da amostra do estudo.

2) Dentro do tópico Métodos, criação de um subtópico direcionado exclusivamente à descrição da análise estatística efetuada no estudo, contendo:

- Forma de apresentação das variáveis contínuas e/ou categóricas: para variáveis contínuas com distribuição normal, apresentação da média e desviopadrão e, para as com distribuição não normal, apresentar através de mediana e intervalos interquartis. Já para as variáveis categóricas, as mesmas devem ser apresentadas através de números absolutos e percentagens, com os respectivos intervalos de confiança;

- Descrição dos métodos estatísticos utilizados. Na utilização de métodos estatísticos mais complexos, deve ser fornecida uma literatura de referência para os mesmos;

- Como regra, os testes estatísticos devem sempre ser bilaterais ao invés de unilaterais;

- Nível de significância estatística adotado;

- Especificação do software empregado nas análises estatísticas e sua respectiva versão.

3) Em relação à apresentação dos resultados obtidos após as análises estatísticas:

- Os principais resultados devem sempre ser descritos com seus respectivos intervalos de confiança;
- Não repetir no texto do artigo dados já existentes em tabelas e figuras;
- Ao invés de apresentar tabelas muito extensas, utilizar gráficos como alternativa de modo a facilitar a leitura e entendimento do conteúdo;
- Nas tabelas, mesmo que o p-valor não seja significativo, apresentar o respectivo valor em vez de "NS" (por exemplo,  $p = 0,29$  em vez de NS).

16. Os artigos deverão seguir a seguinte ordem:

16.1. Página de título

16.2. Texto

16.3. Agradecimentos

16.4. Legendas de figuras

16.5. Tabelas (com legendas para as siglas)

16.6. Referências

16.7. Primeira Página:

16.7.1. Deve conter o título completo do trabalho de maneira concisa e descritiva, em português e inglês, assim como um título resumido (com até 50 caracteres, incluindo espaços) para ser utilizado no cabeçalho das demais páginas do artigo;

16.7.2. Devem ser incluídos de três a cinco descritores (palavras-chave), assim como a respectiva tradução para as keywords (descriptors). Os descritores devem ser consultados nos sites: <http://decs.bvs.br/>, que contém termos em português, espanhol e inglês ou [www.nlm.nih.gov/mesh](http://www.nlm.nih.gov/mesh), para termos somente em inglês;

16.8. Segunda Página:

16.8.1. Resumo (até 250 palavras): o resumo deve ser estruturado em cinco seções quando se tratar Artigo Original, evitando abreviações e observando o número máximo de palavras. No caso de Artigo de Revisão e Comunicação Breve, o resumo não é estruturado, respeitando o limite máximo de palavras. Não cite referências no resumo:

- Fundamento (racional para o estudo);
- Objetivos;
- Métodos (breve descrição da metodologia empregada);
- Resultados (apenas os principais e mais significativos);
- Conclusões (frase(s) sucinta(s) com a interpretação dos dados). Obs.: Os Relatos de Caso não devem apresentar resumo.

16.9. Texto para Artigo Original: deve ser dividido em introdução, métodos, resultados, discussão e conclusões.

16.9.1. Introdução:

16.9.1.1. Não ultrapasse 350 palavras.

16.9.1.2. Faça uma descrição dos fundamentos e do racional do estudo, justificando com base na literatura.

16.9.2. Métodos: descreva detalhadamente como foram selecionados os sujeitos da pesquisa observacional ou experimental (pacientes ou animais de experimentação, incluindo o grupo controle, quando houver), incluindo idade e sexo.

16.9.2.1. A definição de raças deve ser utilizada quando for possível e deve ser feita com clareza e quando for relevante para o tema explorado.

16.9.2.2. Identifique os equipamentos e reagentes utilizados (incluindo nome do fabricante, modelo e país de fabricação, quando apropriado) e dê detalhes dos procedimentos e técnicas utilizadas de modo a permitir que outros investigadores possam reproduzir os seus dados.

16.9.2.3. Justifique os métodos empregados e avalie possíveis limitações.

16.9.2.4. Descreva todas as drogas e fármacos utilizados, doses e vias de administração.

16.9.2.5. Descreva o protocolo utilizado (intervenções, desfechos, métodos de alocação, mascaramento e análise estatística).

16.9.2.6. Em caso de estudos em seres humanos, indique se o trabalho foi aprovado por um Comitê de Ética em Pesquisa e se os pacientes assinaram termo de consentimento livre e esclarecido.

16.9.3. Resultados: exibidos com clareza, subdivididos em itens, quando possível, e apoiados em número moderado de gráficos, tabelas, quadros e figuras. Evitar a redundância ao apresentar os dados, como no corpo do texto e em tabelas.

16.9.4. Discussão: relaciona-se diretamente ao tema proposto quando analisado à luz da literatura, salientando aspectos novos e importantes do estudo, suas implicações e limitações. O último período deve expressar conclusões ou, se pertinentes, recomendações e implicações clínicas.

16.9.5. Conclusões

16.9.5.1. Ao final da sessão “Conclusões”, indique as fontes de financiamento do estudo.

17. Agradecimentos: devem vir após o texto. Nesta seção, é possível agradecer a todas as fontes de apoio ao projeto de pesquisa, assim como contribuições individuais.

17.1. Cada pessoa citada na seção de agradecimentos deve enviar uma carta autorizando a inclusão do seu nome, uma vez que pode implicar em endosso dos dados e conclusões.

17.2. Não é necessário consentimento por escrito de membros da equipe de trabalho, ou colaboradores externos, desde que o papel de cada um esteja descrito nos agradecimentos.

18. Referências: os Arquivos seguem as Normas de Vancouver.

18.1. As referências devem ser citadas numericamente, por ordem de aparecimento no texto e apresentadas em sobrescrito.

18.2. Se forem citadas mais de duas referências em sequência, apenas a primeira e a última devem ser digitadas, separadas por um traço (Exemplo: 5-8).

18.3. Em caso de citação alternada, todas as referências devem ser digitadas, separadas por vírgula (Exemplo: 12, 19, 23). As abreviações devem ser definidas na primeira aparição no texto.

18.4. As referências devem ser alinhadas à esquerda.

18.5. Comunicações pessoais e dados não publicados não devem ser incluídos na lista de referências, mas apenas mencionados no texto e em nota de rodapé na página em que é mencionado.

18.6. Citar todos os autores da obra se houver seis autores ou menos, ou apenas os seis primeiros seguidos de et al, se houver mais de seis autores.

18.7. As abreviações da revista devem estar em conformidade com o Index Medicus/Medline – na publicação List of Journals Indexed in Index Medicus ou por meio do site <http://locatorplus.gov/>.

18.8. Só serão aceitas citações de revistas indexadas. Os livros citados deverão possuir registro ISBN (International Standard Book Number).

18.9. Resumos apresentados em congressos (abstracts) só serão aceitos até dois anos após a apresentação e devem conter na referência o termo “resumo de congresso” ou “abstract”.

19. Política de valorização: os editores estimulam a citação de artigos publicados nos Arquivos.

20. Tabelas: numeradas por ordem de aparecimento e adotadas quando necessário à compreensão do trabalho. As tabelas não deverão conter dados previamente informados no texto. Indique os marcadores de rodapé na seguinte ordem: \*, †, ‡, §, //, ¶, #, \*\*, ††, etc. O Manual de Formatação de Tabelas, Figuras e Gráficos para Envio de Artigos à Revista ABC está no endereço:

[http://publicacoes.cardiol.br/pub\\_abc/autor/pdf/manual\\_de\\_formatacao\\_abc.pdf](http://publicacoes.cardiol.br/pub_abc/autor/pdf/manual_de_formatacao_abc.pdf) 21. Figuras:



as figuras submetidas devem apresentar boa resolução para serem avaliadas pelos revisores. As legendas das figuras devem ser formatadas em espaço duplo e estar numeradas e ordenadas antes das Referências. As abreviações usadas nas ilustrações devem ser explicitadas nas legendas. O Manual de Formatação de Tabelas, Figuras e Gráficos para Envio de Artigos à Revista ABC está no endereço: [http://publicacoes.cardiol.br/pub\\_abc/autor/pdf/manual\\_de\\_formatacao\\_abc.pdf](http://publicacoes.cardiol.br/pub_abc/autor/pdf/manual_de_formatacao_abc.pdf) 22. Imagens e vídeos: os artigos aprovados que contenham exames (exemplo: ecocardiograma e filmes de cinecoronariografia) devem ser enviados através do sistema de submissão de artigos como imagens em movimento no formato MP4 com codec h:264, com peso de até 20 megas, para serem disponibilizados no site <http://www.arquivosonline.com.br> e nas revistas eletrônicas para versão tablet.

23. Os autores não são submetidos à taxa de submissão de artigos e de avaliação.

## Anexo 2: Carta de Aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais



COMITE DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



### CARTA DE APROVAÇÃO

O Comitê de Ética no Uso de Animais – UNICRUZ analisou o protocolo de pesquisa:


Título: **Identificação dos componentes fitoquímicos hipolipemiantes da *Campomanesia xanthocarpa*: testes in vitro e in vivo.**

Protocolo nº: **009/15**

Pesquisador Responsável: **Jonatas Zeni Klafke**

Este projeto foi APROVADO em seus aspectos éticos e metodológicos, por não haver qualquer tipo de injúria aos animais da pesquisa. Toda e qualquer alteração do Projeto, assim como os eventos adversos graves, deverão ser comunicados imediatamente a este Comitê.

Cruz Alta, 14 de Junho de 2016.

  
\_\_\_\_\_  
Jorge Damián Stumpfs Diaz  
Coordenador do CEUA-UNICRUZ