

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JULIO DE MESQUITA FILHO
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
CÂMPUS DE BOTUCATU

FABIANA MASAGO

**Avaliação preliminar do efeito da *Physalis angulata* L. sobre
a obesidade induzida por dieta hipercalórica.**

MONOGRAFIA

BOTUCATU

2011

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JULIO DE MESQUITA FILHO
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
CÂMPUS DE BOTUCATU**

Fabiana Masago

**Avaliação preliminar do efeito da *Physalis angulata* L. sobre a
obesidade induzida por dieta hipercalórica.**

**Monografia apresentada ao Instituto
de Biociências, *Campus* de Botucatu, UNESP,
para obtenção do título de Bacharel em
Ciências Biológicas.**

Orientador: Prof. Dr. Luiz Claudio Di Stasi

BOTUCATU – SP

2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.

DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE

Masago, Fabiana

Avaliação preliminar do efeito da *Physalis angulata* L. sobre a obesidade induzida por dieta hipercalórica. Fabiana Masago. – Botucatu : [s.n.], 2011

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Luiz Claudio Di Stasi

Capes: 21001006

1. Farmacologia. 2. Obesidade. 3. Plantas medicinais – Uso terapêutico – Efeitos colaterais.

Palavras-chave: Estresse; Obesidade; *Physalis angulata* L.

Dedicatória

Dedico este trabalho aos meus pais Luiza e Mituru e ao meu irmão Fabio pela paciência e compreensão dos finais de semanas e feriados nos quais não voltei para casa devido ao processo experimental. Afinal sem o apoio constante deles não teria chegado onde estou hoje. Vocês me ensinaram a dar o melhor de mim todos os dias.

Ainda, não posso deixar de dedicar essa monografia às minhas amigas que sempre me apoiaram nas piores situações e também por compartilharem os melhores momentos da minha vida. Tão importante quanto à família são os amigos verdadeiros. Por isso Zi, Gels, Xei, Paulet, Muh, Tia Dri e Mah muito obrigada por sempre me ajudarem. Após esses quatro anos de convivências eu só posso dizer a vocês que: “Um Amigo se faz rapidamente; já a amizade é um fruto que amadurece lentamente.” *Aristóteles*.

“Pode ser que um dia nos afastemos...

Mas, se formos amigos de verdade,
A amizade nos reaproximará.”

Albert Einstein

Agradecimentos

À Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho.

À Chemyunion Química LTDA pela parceria oferecida para a realização desse trabalho.

À FAPESP.

Aos professores e funcionários do Departamento de Farmacologia – Instituto de Biociências. Principalmente ao meu orientador Prof. Dr. Luiz Claudio Di Stasi pela atenção e dedicação ao ensinar-me a fazer ciência.

A todos do Laboratório de Fitomedicamentos, LAFIT-Botucatu, pelos conselhos, ensinamentos e pela ajuda; em especial a Juliana R., Laura, Aline C. e Adriana pelo esforço conjunto para concluir o projeto; Aline W., Ana, Leonardo, Luís, Juliana T., Juliana C., Alexandre T. e Alexandre C. por tudo.

Uma ação gera muitas reações em cascata...

“Seja a mudança que você quer ver no mundo.” *Dalai Lama.*

Sumário

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Lista de Abreviações

Prólogo

Resumo

Abstract

1. Introdução	18
1.1. Obesidade e Estresse.....	18
1.2. <i>Physalis angulata</i> L.	20
2. Objetivo	22
3. Material e Métodos	23
3.1. Planta de estudo	23
3.1.1. Veículo de administração e dose ministrada durante o tratamento	25
3.2. Animais experimentais	25
3.3. Delineamento do experimento	26
3.4. Grupos experimentais	27
3.4.1. Período de indução da obesidade.....	27
3.4.2. Período de tratamento	28

3.5.	Padronização do modelo de obesidade em camundongos Swiss.....	28
3.6.	Padronização do modelo de estresse.....	34
3.7.	Coleta e armazenamento das amostras	35
4.	Resultados e Discussão	36
5.	Conclusão	43
6.	Considerações Finais	44
7.	Referências Bibliográficas	45

Lista de Figuras

- Figure 1-** Delineamento experimental utilizado no presente estudo27
- Figure 2-** Média de consumo de ração normocalórica e hipercalórica pelos animais durante oito semanas de tratamento. Valores expressos em média \pm EPM. Análise estatística entre o consumo dos dois grupos: teste t de student entre amostras paramétricas independentes. Análise estatística comparando o consumo dos grupos antes e após as oito semanas: teste t de student entre dados paramétricos dependentes, diferença significativa quando $p < 0,05$ (*)37
- Figure 3-** Média de peso corporal dos animais que receberam dieta normocalórica e hipercalórica durante oito semanas. Valores expressos em média \pm EPM. Análise estatística entre as médias de pesos dos grupos antes e após as oito semanas: teste t de student entre dados paramétricos dependentes $p < 0,05$ (*).....37
- Figure 4-** Média de consumo dos diferentes grupos experimentais durante 21 dias após a indução da obesidade. Valores expressos em média \pm EPM. Análise estatística entre o consumo nos 21 dias: ANOVA seguida pelo teste de múltiplas comparações, teste de Dunnett, diferença significativa quando $p < 0,05$ (*).....40
- Figure 5-** Efeito do tratamento com extrato supercrítico da *Physalis angulata* L. no peso dos animais (Δ peso). Valores expressos em \pm EPM. Análise estatística entre o peso dos grupos nos 21 dias: ANOVA seguida pelo teste de múltiplas comparações, teste de Dunnett, diferença significativa quando $p < 0,05$ (*)41

Lista de Tabelas

Tabela 1- Macronutrientes e micronutrientes das rações (%)	31
Tabela 2- Perfil de aminoácido das rações (%)	32
Tabela 3- Perfil de carboidratos das rações (%)	33
Tabela 4- Perfil de ácidos graxos saturados e insaturados das rações(%)	34
Tabela 5- Composição química padronizada do extrato supercrítico de <i>Physalis angulata</i> L.	23
Tabela 6- Variação do peso corpóreo dos animais do Grupo da DH e do Grupo da DN. Valores expressos em \pm EPM. Diferença significativa em relação ao grupo da DN, $p < 0,05$ (*).....	39
Tabela 7- Variação do peso dos animais após 8 semanas de dieta a pós tratamento. ¹ variação do peso após 8 semanas de fornecimento de dieta, ² variação do peso após tratamento calculado em comparação ao último dia de fornecimento de DH. Valores expressos em \pm EPM. , Diferença significativa quando $p < 0,05$ (*) ou $p < 0,01$ (**).....	42
Tabela 8- Peso médio dos órgãos dos animais dos diferentes grupos experimentais.....	42

Lista de Abreviações

BMI: Índice de Massa Corpórea (Kg/m²)

ELISA: Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay

DCNT: Doença Crônica Não-Transmissível

DH: Dieta Hiperlipídica

DN: Dieta Normocalórica

CRH: Hormônio liberador de Corticotropina

Prólogo

O desenvolvimento desta monografia é parte integrante do projeto de Auxílio à Pesquisa (Projeto regular) aprovado pela Fapesp (Processo 09/52471-1). Este projeto envolve uma pesquisa conjunta entre a universidade e o setor empresarial, cujo objetivo principal é a obtenção, padronização e avaliação de novos produtos eficazes, na forma de extratos padronizados ou alimentos funcionais, para o controle do metabolismo energético, diminuição do ganho de peso e aparência geral da pele.

Na proposta inicial do projeto não havia a necessidade de padronizar um novo modelo de indução de obesidade devido à utilização de animais obesos nocautes para leptina (C57BL/6J Lep^{ob}) que seriam provenientes da CEMIB (Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência em Animais de Laboratório) da UNICAMP. Porém, a CEMIB assim como em outros locais - Unifesp, Biotério do Instituto Butantan, Centro de Bioterismo da Faculdade de Medicina da USP de Ribeirão Preto, Biotério da Universidade de Marília (UNIMAR), Biotério Central do ICB da USP e na Fundação Oswaldo Cruz - não poderiam fornecer a quantidade necessária de animais.

Frente a esta nova problemática, tivemos que modificar no projeto a metodologia de estudo de obesidade e padronizamos outra metodologia de obesidade induzida por dieta hipercalórica em camundongos albinos Swiss machos, fornecidos pelo Biotério Central da UNESP, localizado no *campus* de Botucatu. Associado a esta padronização, foi necessário ainda buscar uma ração hipercalórica padronizada para a realização dos experimentos.

Após as oito semanas da aplicação do novo modelo para a indução da obesidade em camundongos Swiss machos, tivemos que padronizar outro modelo para a indução de estresse por agente estressor físico e psicogênico, pois não constavam na literatura modelos específicos para os animais estudados.

Considerando todos os fatores envolvidos até o presente momento do desenvolvimento da monografia não conseguimos concluir totalmente o projeto. Assim os resultados apresentados são parciais devido ao maior tempo utilizado para a execução do projeto.

Resumo

A obesidade tem sido considerada um dos mais graves problemas de saúde pública do mundo, especialmente por ser um dos principais fatores de risco para inúmeras doenças crônicas que caracterizam a Síndrome Metabólica. Além dessas doenças a obesidade também acarreta dermatoses que afetam não só a parte emocional do indivíduo como também causam inúmeras infecções cutâneas. Assim, o excesso de peso pode ser um agente que ocasiona inúmeros tipos de estresses: psicológico, físico e social. Visando a melhoria da qualidade de vida dessas pessoas, vários estudos etnofarmacológicos indicam espécies vegetais para o tratamento de distúrbios relacionados a obesidade com o principal atrativo de oferecer um esquema terapêutico supostamente mais seguro e eficaz para a saúde quando comparado ao tratamento realizado com anorexígenos tradicionais. Considerando que tanto a ingestão de alimentos como o tratamento por via oral com diferentes compostos podem promover alterações na expressão gênica e que uma dieta alimentar adequada tem sido valiosa como mecanismo de manutenção das funções vitais do organismo, o objetivo deste trabalho é desenvolver um novo método de padronização do modelo de obesidade e estresse por agentes estressores físicos e psicogênicos em camundongos Swiss machos. E, avaliar o efeito do extrato supercrítico da *Physalis angulata* L. sobre a ingestão alimentar e a redução da variação de peso corpóreo.

Palavras-chave: obesidade, estresse e *Physalis angulata* L.

Abstract

The obesity has been considered one of the most serious public health problem in the worldwide scale, especially for being one of the main risk factors for many chronic diseases that characterize the metabolic syndrome. In addition to these diseases, obesity also causes dermatoses that affect not only the individual emotions but also cause various cutaneous infections. Thus, overweighting can be an agent that causes many types of stress: psychological, physical and social. In order to improve people's life quality, several ethnopharmacological studies indicate plant species for the treatment of disorders associated with obesity due to the attraction of this regimen is perceived as safer and more health effective when compared to the treatment performed by traditional anorectic substances. If considered both food intake and also oral treatment with different compounds can promote change in the gene expression, besides an appropriate diet has been maintenance mechanism of body's vital functions. The aim of this work was to develop new standard methods for induced obesity and stress, which stress is induced through physical and psychogenic stressors in Swiss male mice. Also to evaluate the effect of supercritical extract of *Physalis angulata* L. on the food intake and corporeal weight loss.

Keywords: obesity, stress and *Physalis angulata* L.

1. Introdução

1.1. Obesidade e Estresse

A obesidade é classificada como uma Doença Crônica Não-Transmissível (DCNT) caracterizada por um distúrbio nutricional consequente do acúmulo excessivo de gordura corporal no indivíduo. Atualmente, há um consenso na literatura a respeito da sua etiologia multifatorial, ou seja, suas causas abrangem tanto aspectos biológicos (genéticos e fisiológicos) quanto sociais e históricos (fatores culturais). Sendo a ingestão alimentar inadequada e a redução dos gastos calóricos diários, os principais fatores envolvidos no desenvolvimento da obesidade [1].

O número de pessoas com sobrepeso e obesas no ocidente tem aumentado rapidamente nos últimos 20 anos devido à alimentação inadequada com dietas de cafeteria e ao sedentarismo [2]. Aproximadamente metade dessas pessoas possui um índice de massa corpórea (Kg/m²) (BMI) maior do que 25 [2], o que torna essa doença um alvo constante de estudos, principalmente, porque a obesidade está relacionada a um maior risco de morte do indivíduo [3].

As doenças metabólicas são denominadas “Síndrome Metabólica” ou “Síndrome X” [4], cujos sintomas são: dificuldade respiratória, distúrbios do aparelho locomotor e dislipidemias [5]. As síndromes metabólicas também abrangem: doenças cardiovasculares, diabetes não-insulino-dependente (Diabetes Tipo II) e câncer [5].

Além disso, a obesidade apresenta outro fator preocupante, 50% da população obesa apresenta infecções na pele. As dobras corpóreas ocasionadas pelo excesso de gordura corporal são locais onde freqüentemente ocorrem inflamações, irritação cutânea e infecções por *Candida folliculitis*, *Tinea cruris*, *Candida albicans*, entre outros. Este excesso de gordura também pode causar estrias, celulites e marcas na pele [6]. Apesar desses últimos problemas não apresentarem riscos a saúde, eles proporcionam um estresse psicológico e social à pessoa.

Assim, os distúrbios metabólicos adicionados às dermatoses quando não tratados estão interligados a diferentes estímulos estressores que podem ocasionar infecções (estresse físico), tristeza e ansiedade (estresse psicológico), dor (estresse fisiológico) e até bullying (estresse social).

Finalmente, após considerar todos esses dados e verificar o aumento da incidência da obesidade na população mundial, a obesidade é vista hoje como um dos maiores problemas de saúde pública do planeta [7]. Conseqüentemente, junto com o aumento desta problemática há uma constante busca por melhorias na qualidade de vida das pessoas através do uso de alimentos funcionais e de dietas adequadas como mecanismo de prevenção, controle e tratamento desta DCNT.

Obesidade e dieta hiperlipídica (DH):

Dentre todos os outros macronutrientes, os lipídios apresentam a maior capacidade energética e de estoque no organismo. Aproximadamente 96% do total de lipídios ingeridos são armazenados na forma de gordura corpórea [8], havendo desta maneira uma relação positiva entre a quantidade energética das dietas hiperlipídicas e o aumento de peso na população. Em geral, dietas contendo mais que 30% da energia total em gordura causam o desenvolvimento da obesidade [9].

Esse fato foi comprovado por meio de experimentos realizados com modelos animais. Em ratos, por exemplo, utilizaram-se dietas com 20 a 60% da energia provenientes da gordura animal (gordura bovina, banha) ou vegetal (óleo de girassol e de milho) [10]. Porém nem todas as dietas tiveram a composição definida [10]. Assim, não há uma conclusão correta da relação entre o ganho de peso e os componentes da dieta dos animais [10]. Portanto, salienta-se a importância de se estudar modelos de indução de obesidade com dietas de composição conhecida.

Além disso, nem todos os animais submetidos à DH tornam-se obesos, pois os animais susceptíveis à obesidade são hiperfágicos. Isso possivelmente se deve à resistência da ação anorexigênica da insulina e ao decréscimo da expressão de alguns peptídeos anorexigênicos no hipotálamo [10].

Portanto, para o estudo da hiperfagia na indução da obesidade em ratos e camundongos utiliza-se o critério da dieta hiperlipídica de acordo com a maior ingestão energética e não necessariamente a quantidade de alimento ingerido [11] [12] [13] [14].

1.2. *Physalis angulata* L.

No planeta, mais ou menos 70% dos medicamentos são desenvolvidos a partir de plantas. O Brasil, país com a maior biodiversidade do mundo, possui aproximadamente 55 mil espécies vegetais pouco exploradas cientificamente para a elaboração de produtos manufaturados [15].

Considerando-se a relevância das plantas medicinais não apenas como recurso terapêutico, mas também como recurso econômico, salienta-se a necessidade do desenvolvimento de técnicas de manejo sustentado e de preservação dos ecossistemas do mundo. Além disso, ressalta-se a preservação dos conhecimentos populares sobre as plantas, fontes de descobertas valiosas que podem melhorar a qualidade de vida da população. Tal conhecimento provém dos quilombolas, dos indígenas ou da população em geral. Portanto, o papel das empresas e universidades nesse meio é de extrema importância para o uso consciente desses recursos naturais tão preciosos.

Neste universo ainda pouco explorado das plantas medicinais encontra-se o gênero *Physalis*, cujo nome vem do grego *physis* = bexiga, bolha” [16]. Esse gênero, pertencente à família Solanaceae, é constituído por 120 espécies herbáceas com hábitos perenes que estão localizadas nas zonas tropicais e temperadas [17].

Entre as 120 espécies encontra-se a *Physalis angulata* L., conhecida popularmente como “Camapu” na Amazônia ou como “Balãozinho”, “Bucho-de-rã”, “Joá”, “Juá-de-capote”, “Mata-fome”, “Mulaca”, “Tomate silvestre” ou “Cereja-de-inverno” em outras regiões do Brasil [16] [18]. Na medicina popular brasileira, ela é empregada no tratamento de uma variedade de doenças como a malária, asma, hepatite, dermatite e reumatismo [19]. E, na medicina tradicional chinesa a mesma é utilizada como antiinflamatória e desintoxicante [20]. No Peru, essa espécie vegetal é utilizada contra diabetes [16].

Estudos *in vitro* demonstraram seus efeitos antitumorais nos hepatomas, câncer do colo do útero, adenocarcinoma do pulmão e carcinoma epidérmico. Mas, Santos e cols (2003) [18] verificaram a atividade genotóxica do extrato em linfócitos. Mostrando a necessidade e a importância de mais pesquisas para comprovar suas atividades farmacológicas e possíveis efeitos tóxicos em estudos *in vitro* e *in vivo*.

Outras atividades tóxicas foram relatadas, tais como atividade moluscicida [17], citotóxicas contra cânceres de mama, fígado e boca [21], além de atividades imunomoduladoras [22] e tripanossomicidas [23].

Considerando os efeitos imunomoduladores e anti-inflamatórios da *Physalis angulata* L. e levando em consideração também que a obesidade e a sua associação com estímulos estressores como infecções cutâneas e respostas inflamatórias do indivíduo obeso, verifica-se a possibilidade do extrato do “camapu” atuar sobre o controle da ingestão alimentar a fim de se encontrar novas formas de prevenção e tratamento da obesidade e das doenças associadas a ela.

2. Objetivo

Desenvolver um novo método de padronização do modelo de obesidade e de estresse por agentes estressores físicos e psicogênicos em camundongos Swiss machos. Avaliar o efeito do extrato supercrítico da *Physalis angulata* L. sobre a ingestão alimentar e a redução da variação de peso corpóreo.

3. Material e Métodos

3.1. Planta de estudo

O produto testado nesta monografia trata-se de um extrato obtido por fluido com CO₂ supercrítico das partes aéreas da *Physalis angulata* L. obtido através da extração por dióxido de carbono supercrítico. O produto foi padronizado, preliminarmente, em fisalinas pelos participantes do projeto (PIPE-Fapesp 06/51824-0) e denominado comercialmente como *Physavie* pela empresa Chemyunion Química Ltda. Após isso, ele foi novamente padronizado em fitosteróis e esfingolipídeos totais conforme **Tabela 5**.

Tabela 1- Composição química do extrato supercrítico de *Physalis angulata* L.

Composição	Unidade	Resultado
Fitoesteróis totais	% p/p	26,65
Esfingolipídeos totais	% p/p	1,30

Primeiramente, os parâmetros de extração dos extratos apolar e polar da *Physalis angulata* L. foram determinados em escala laboratorial. Para tal, os extratos foram obtidos utilizando o sistema de extração supercrítico da marca Autoclave Engineers, composto de coluna de extração aquecida de 300 mL de volume interno; bomba de CO₂ M111L Maximator e bomba de co-solvente LC-6AD Liquid Chromatography, Shimadzu; banho termostatizado MQBTC99-20 Microquímica Ind. Com. Ltda e medidor de pressão 901A Heise Digital Pressure Indicator.

Para a realização dos experimentos, foi formado, no fundo da coluna de extração, um leito fino de algodão pré-tratado (lavagem com Etanol P.A. a 35-45°C, 30 minutos

seguido de secagem em estufa). No topo do leito de algodão foi formado o leito da *Physalis angulata* L. triturada e comprimida. Sobre o leito da *Physalis angulata* L. triturada foi formado novamente um leito de algodão para evitar o arraste de partículas pequenas do extrator. Na saída da coluna de extração, a pressão do sistema soluto/solvente foi diminuída utilizando uma válvula micrométrica aquecida (AUTIC Automação e Instrumentação Analítica) e o extrato precipitado foi coletado em kitsatos de 250 mL. A vazão do CO₂ gasoso foi medida em um rotâmetro (Oxicamp). Após o término das extrações, as tubulações da coluna de extração foram lavadas com etanol absoluto para a recuperação do extrato acumulado nas mesmas. O resíduo (extrato + etanol) foi coletado em frascos apropriados e separado do extrato através de evaporação com nitrogênio ou em sistemas de evaporação a vácuo.

A massa da planta utilizada nas extrações foi de aproximadamente 67,00 g. O extrato apolar da *Physalis angulata* L. foi extraído a 300 bar, 40 °C e vazão de CO₂ de 9 g/min. A mesma amostra de planta utilizada para a obtenção do extrato apolar foi utilizada na obtenção do extrato polar da *Physalis angulata* L., o qual foi extraído a 300 bar, 70°C, vazão de CO₂ de 9 g/minuto (valores médios), utilizando etanol como co-solvente, em uma concentração de 10 % (p/p) sobre a massa de CO₂, o tempo de extração foi determinado através de curvas de extração. Os EBP-CO₂ obtidos foram avaliados por CLAE ou por Cromatografia Gasosa (CG).

Após a definição dos parâmetros de extração dos extratos apolar e polar da *Physalis angulata* L. em escala laboratorial, iniciou-se a etapa de transferência dos parâmetros para a escala piloto. Para tal, o extrato foi obtido utilizando o sistema semi-automatizado de extração supercrítica desenvolvido exclusivamente para Chemyunion, em projeto conjunto com a FAPESP, composto de bombas de CO₂ e co-solvente, duas colunas de extração de 10 L de volume interno e dois ciclones de coleta de 1L de volume interno.

Para a realização dos experimentos, a coluna de extração foi preenchida com *Physalis angulata* L. triturada comprimida. Após o término das extrações, o extrato etanólico obtido foi submetido à evaporação a vácuo para retirada do etanol.

Foram utilizados 2, 397 kg de planta na extração. O extrato apolar da *Physalis angulata* L. foi extraído a 300 bar, 40°C e vazão de CO₂ de 187 g/minuto (valores médios). A

mesma amostra de planta utilizada para a obtenção do extrato apolar foi utilizada na obtenção do extrato polar da *Physalis angulata* L., o qual foi extraído a 300 bar, 70°C, vazão estimada de CO₂ de 197 g/min., utilizando etanol como co-solvente, em uma concentração estimada de 16 % (p/p) sobre a massa de CO₂. Os EBP-CO₂ obtidos foram avaliados por CLAE ou por Cromatografia Gasosa (CG).

3.1.1. Veículo de administração e dose ministrada durante o tratamento

O extrato supercrítico da *Physalis angulata* L. foi diluído no veículo Tween 80 junto com Metilcelulose. A concentração das soluções do veículo utilizado equivale a 8% de Tween e 92% de Metilcelulose. E, a dose da diluição foi de 100 mg do extrato por 1 Kg de animal.

Durante as três semanas do tratamento, cada animal obeso recebeu uma dose diária por gavagem do extrato diluído equivalente ao seu peso, ou seja, a dose administrada foi de 10 ml/Kg. Os grupos controles receberam diariamente uma dose de 0,5 mL do veículo durante o mesmo período.

3.2. Animais experimentais

Utilizou-se 197 camundongos Swiss machos (N = 197) provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP), *campus* de Botucatu.

Os camundongos passaram por um tempo de aclimação de uma semana antes do período de qualquer procedimento experimental. Durante esse período os animais receberam a

ração padrão. Passada a semana de aclimação, os camundongos do grupo da DH passaram a receber a ração hiperlipídica e os camundongos do grupo da DN continuaram a receber ração normocalórica.

Durante todo o experimento, os camundongos foram mantidos em estantes ventiladas com mini-isoladores de polissulfona (Alesco Ind. e Com. Ltda) e filtração de ar de entrada e de saída de ar constante, que por sua vez foram mantidas em sala climatizada sob a temperatura constante de $21\pm 2^{\circ}\text{C}$, com ciclo claro-escuro de 12 horas.

Todos os experimentos obedeceram aos protocolos experimentais n° 147 - CEEA submetidos e aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal, do Instituto de Biociências da UNESP - Botucatu.

3.3. Delineamento do experimento

O delineamento do experimento proposto foi esquematizado na **Figura 1** e demonstrado a seguir:

- Período de aclimação: uma semana;
- Período de indução da obesidade: oito semanas;
- 9^a semana:
 - Seleção dos animais para a montagem dos grupos experimentais;
 - Retirada dos camundongos do grupo que receberam a ração hipercalórica que não atingiram o padrão de variação de peso para se tornarem obesos (variação de peso < 13 g);
 - Retirada dos camundongos que ultrapassaram o limite da variação de peso no grupo que recebeu ração normocalórica (variação de peso > 11 g).
- Período de tratamento dos camundongos Swiss machos obesos com o extrato supercrítico de *Physalis angulata* L.: três semanas;

➤ 12ª semana: Indução do estresse físico por choques, indução do estresse psicogênico por presenciar/assintir o choque, morte dos animais e coleta de material para análises.

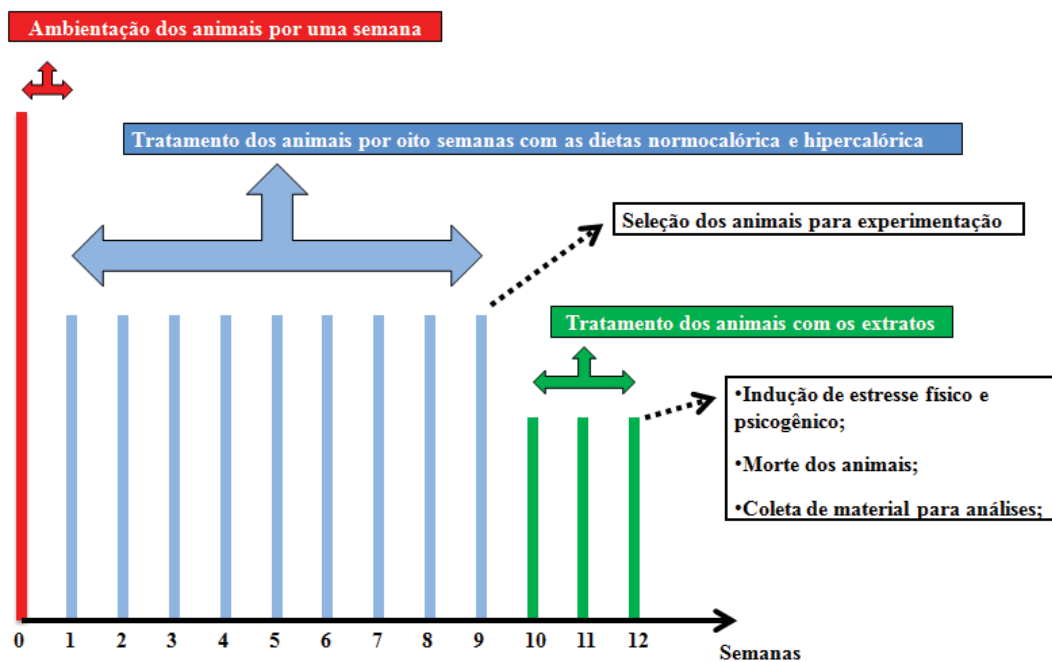


Figura 1-Delineamento experimental utilizado no presente estudo

3.4. Grupos experimentais

3.4.1. Período de indução da obesidade

- Grupo da DN (n = 18 animais): camundongos que receberam a ração normocalórica;

- Grupo da DH (n = 179 animais): camundongos que receberam a ração hipercalórica.

3.4.2. Período de tratamento

Após as oito semanas de indução da obesidade, foram reformulados os seguintes grupos para os 21 dias de tratamento:

- Grupo animais normais (n = 10 animais): animais selecionados do Grupo da DN;
- Grupo animais obesos (n = 20 animais): animais selecionados do Grupo da DH que não receberiam o tratamento com o extrato supercrítico da *Physalis angulata* L. durante as três semanas finais do experimento;
- Grupo Pair-Feeding (n = 24 animais): animais selecionados do Grupo da DH que receberia 30% a menos de ração hipercalórica a partir do início do período de tratamento;
- Grupo Physalis (n = 26 animais): animais selecionados do Grupo da DH que receberiam o tratamento com o extrato supercrítico da *Physalis angulata* L. durante as três semanas finais do experimento;

3.5. Padronização do modelo de obesidade em camundongos Swiss

A padronização do modelo de obesidade foi baseada em estudos realizados por He e cols (2010) [24], Dean e cols (2009) [25], Araújo e cols (2007) [26], Pitombo e cols (2006) [27], Klaus e cols (2005) [28], Harris e cols (2003) [29], Van Heek e cols (1997) [30] e nas recentes revisões de Lijnen (2011) [31] e Harris & Thibault (2010) [9] que demonstraram os procedimentos mais adequados para a padronização do modelo. Dessa maneira o seguinte

projeto conseguiu identificar uma dieta que permitisse a indução da obesidade nos camundongos albinos da linhagem Swiss disponíveis no Biotério Central da UNESP.

Primeiramente, os camundongos (N=197) foram separados em dois grupos: Grupo da DN (n=18) e Grupo da DH (n=179). O número de animais do grupo da DH é alto, pois os mesmos seriam utilizados para o teste de mais três extratos realizados por outras alunas de iniciação científica. Assim, neste trabalho foi apresentada uma amostra maior e, portanto, mais significativa do grupo da DH.

A separação desses dois grupos na padronização do modelo de obesidade apresentou-se conforme o tipo de ração recebida pelos animais nas oito primeiras semanas do experimento:

✓ **Grupo da DN** - ração padrão para roedores (RC Focus 1765, Agrocere[®]) composta por fosfato bicálcico, óleo de soja degomado, cloreto de sódio, milho moído, aditivo antioxidante, farelo de soja, farelo de trigo, farinha de carne e ossos, farinha de peixe, suplemento mineral e vitamínico.

✓ **Grupo da DH** - ração hipercalórica (RC Focus 2413 - chocolate, Agrocere[®]) constituída de cloreto de sódio, caseína, soro de leite em pó, concentrado protéico de soja, milho integral moído, farinha de bolacha, fosfato bicálcico, carbonato de cálcio, óleo de milho, aditivos emulsificante e antioxidante, suplementos mineral e vitamínico.

A composição de macro e micronutrientes das rações padrão e hipercalórica, mensurada pela empresa Agrocere[®], está apresentada na **Tabela 1**. Os perfis de aminoácidos, carboidratos e ácidos graxos foram avaliados no Laboratório de Bioquímica de Microrganismos e Plantas do Departamento de Tecnologia - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, Jaboticabal, SP, Brasil e estão apresentados nas **Tabelas 2, 3 e 4**, respectivamente. Avaliar os macronutrientes e micronutrientes é muito importante, pois vários estudos não fazem essa quantificação. Dessa maneira, são encontradas dificuldades no momento de relacionar a obesidade com os compostos ingeridos pelos animais durante o período de indução da obesidade.

Durante o período de oito semanas, igual ao utilizado por Roma (1997) [32], os animais tiveram o consumo de ração hipercalórica controlada e mensurada diariamente e água *ad libitum* para a indução da obesidade.

Essa ração hipercalórica foi escolhida pelo fato de que dietas com 30% a mais do total da energia proveniente da gordura incentivar o desenvolvimento da obesidade tanto em humanos quanto em animais [9]. As variações de pesos dos animais e o consumo de cada caixa foram mensurados diariamente.

Após as oito semanas de ingestão da ração hipercalórica, houve a retirada de alguns animais. Essa retirada se baseou em dados de pesquisas que consideram ratos com obesidade moderada os que obtiveram ganho de peso entre 10% a 25% [13] [33] e ratos com obesidade severa aqueles que obtiveram ganho de peso acima de 40% ambos comparados aos ratos dos grupos controles [34].

Dessa forma, a partir dos dados sobre a obesidade severa e de artigos revisados foram considerados obesos os camundongos com variação de peso corpóreo ($\Delta_{\text{PESO}} = \text{Peso}_{\text{inicial}} - \text{Peso}_{\text{final}}$) acima de 13 gramas, o que equivale a aproximadamente uma variação de peso 30% maior do que nos camundongos dos grupos controles.

O outro grupo (Grupo da DN) foi constituído por camundongos alimentados com 100g da ração padrão (normocalórica) (RC Focus 1765, Agrocere[®]) (**Tabela 1**). A constituição do grupo também se baseou no peso corpóreo. Assim, animais com variação de peso corpóreo acima ou equivalente a 11 gramas foram retirados do grupo da DN.

Tabela 2- Macronutrientes e micronutrientes das rações (%)

Componentes	Ração Padrão	Ração Hipercalórica *
Proteína	22,0	20,0
Carboidrato	42,7	26,4
Gordura	4,0	20,0
Minerais	9,0	10,0
Fibras	8,0	9,0
Umidade	12,0	12,5
Cálcio	1,5	1,4
Fósforo	0,8	0,7
Calorias (Kcal/g)	2,95	3,65
% Calorias da proteína	29,8	21,9
% Calorias do carboidrato	57,9	28,9
% Calorias da gordura	12,3	49,2

*A dieta hipercalórica foi composta por rações hipercalóricas idênticas nutricionalmente, com exceção do aditivo flavorizante adicionado (chocolate).

Tabela 3- Perfil de aminoácido das rações (%)

Aminoácidos	Ração	
	Padrão	Hiperclórica
Ácido Aspártico	10,81	9,92
Ácido Glutâmico	20,12	18,99
Serina	5,23	5,06
Glicina	4,48	4,32
Histidina	2,50	2,43
Arginina	7,47	7,07
Treonina	3,38	4,01
Alanina	4,53	4,69
Prolina	5,39	5,80
Tirosina	3,34	3,48
Valina	5,05	5,33
Metionina	1,89	2,43
Cistina	1,63	1,85
Isoleucina	4,22	4,38
Leucina	7,78	7,96
Fenilalanina	5,01	5,01
Lisina	5,62	6,59
Triptofano	1,01	0,68

Tabela 4- Perfil de carboidratos das rações (%)

Carboidratos	Rações	
	Padrão	Hipercalórica *
Rafinose	1,74	0,81
Maltose	1,07	1,60
Glicose livre	0,82	1,63
Glicose	46,58	42,37
Frutose livre	0,62	0,96
Frutose	20,93	16,46
Sacarose	8,83	11,57
Lactose	0,65	4,48
Fucose	0,17	0,15
Arabinose	5,55	6,78
Galactose	4,55	6,08
Xilose	5,47	4,27
Ramnose	0,22	0,26
Manose	2,80	2,58

Tabela 5- Perfil de ácidos graxos saturados e insaturados das rações(%)

Ácidos Graxos	Rações	
	Padrão	Hiperclórica*
Capróico (c6:0)	0,00	0,02
Caprílico (c8:0)	0,03	0,03
Cáprico (c10:0)	0,02	0,05
Láurico (c12:0)	0,33	0,25
Mirístico (c14:0)	0,30	0,33
Palmítico (c16:0)	16,56	15,09
Heptadecanóico (c17:0)	0,02	0,08
Esteárico (c18:0)	3,90	4,36
Palmitoléico (c16:1)	0,06	0,15
Oléico (c18:1n9c)	27,96	37,94
Linoléico (c18:2n6c)	47,10	40,83
α -Linolênico (c18:3n3)	3,72	0,87
Ácidos Graxos Saturados	21,16	20,21
Ácidos Graxos Insaturados	78,84	79,79

3.6. Padronização do modelo de estresse

Os protocolos de estresse físico e psicogênico foram definidos após análise de uma série de estudos que utilizaram camundongos como animal de experimentação, especialmente os trabalhos de Shanks e cols (1990) [35], Katayama e cols (2007) [36], Dai e cols (2008) [37], Sim e cols (2010) [38] e Golub e cols (2011) [39].

A indução do estado de estresse agudo físico foi através de choques inescapáveis em caixa de esQUIVA apropriada (50 x 25 x 30 cm). Na caixa de esQUIVA foram utilizados dois

camundongos por vez. Ambos passaram por um período de adaptação equivalente a 3 minutos antes do início do procedimento dos choques.

Enquanto um dos camundongos era submetido ao estressor agudo físico, choque inescapável equivalente a 30 choques de 0,5 mA com duração de 2 segundos entre intervalos de 5 a 25 segundos, outro camundongo observava-o do compartimento ao lado, o que caracterizaria a indução do estado de estresse psicogênico.

O tempo total da indução do agente estressor físico na gaiola de choque foi de aproximadamente 12 minutos. Logo após essa indução os dois camundongos foram mortos por decaptação com o uso da guilhotina e suas amostras de sangue foram armazenadas em eppendorfs de 1,5 ml. Depois, o sangue foi deixado em temperatura ambiente por 30 minutos. Após esse período as amostras foram centrifugadas por 15 minutos a 4400 r.p.m. O soro decantado foi armazenado à -80° C para análises posteriores.

3.7. Coleta e armazenamento das amostras

Logo após a indução do estresse por agente estressor físico ou psicogênico, os camundongos foram mortos e suas amostras de sangue foram armazenadas em eppendorfs de 1,5 ml. O sangue foi deixado em temperatura ambiente por 30 minutos. Em seguida, as amostras foram centrifugadas por 15 minutos a 4400 r.p.m. O soro decantado foi armazenado à -80 ° C para análises imunológicas posteriores.

Depois da coleta e armazenamento do soro, os seguintes órgãos foram retirados, limpos em salina, pesados e armazenados em solução fixadora ALFAC (álcool, formaldeído e ácido acético formaldeído e ácido acético - 18: 2: 1 v/v/v: hipotálamo, cérebro, gordura visceral, coração, pulmões, rins, pele, testículos, baço e fígado.

3.8. Análise estatística

Dados foram expressos na forma de média \pm erro padrão da média e submetidos à análise pelo teste t de Student através do software *GraphPad Instat* ou ANOVA seguida pelo teste de Dunnett, ambos com nível de significância mínimo de $p < 0,05$.

4. Resultados e Discussão

Durante o início do período de indução da obesidade, a diferença de consumo entre os animais do Grupo da DN e do Grupo da DH não foi significativa, fato já explicado por Hariri (2010) o qual mostrou que o consumo de alimento denso diminui em quantidade, pois há uma compensação no consumo calórico.

Contudo, na quarta semana da indução, constatou-se o aumento do consumo da DH em relação à DN, sendo que o esperado seria um menor consumo da DH devido ao alto teor de calorias (**Figura 2**). Isso pode ter ocorrido porque a DH utilizada possui um sabor diferenciado de chocolate que induziria a hiperfagia nos animais. Ou, os camundongos não conseguiram se ajustar totalmente a energia extra da dieta enquanto necessitavam da ingestão de uma quantia mínima da dieta rica em gordura para satisfazer seus requisitos (por exemplo, proteína de 5% para manutenção e 15% para o crescimento) junto com o transporte extra de energia [40].

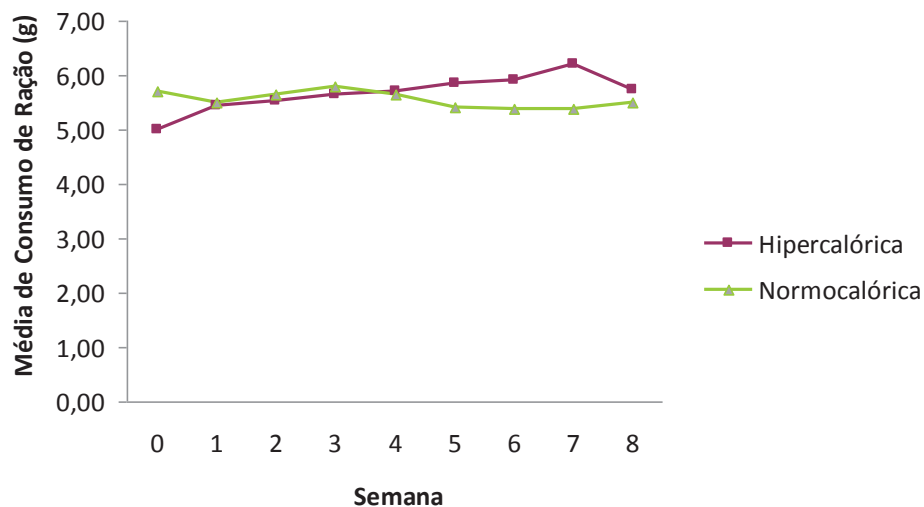


Figura 3- Média de consumo de ração normocalórica e hipercalórica pelos animais durante oito semanas de tratamento. Valores expressos em média \pm EPM. Análise estatística entre o consumo dos dois grupos: teste t de student entre amostras paramétricas independentes. Análise estatística comparando o consumo dos grupos antes e após as oito semanas: teste t de student entre dados paramétricos dependentes, diferença significativa quando $p < 0,05$ (*)

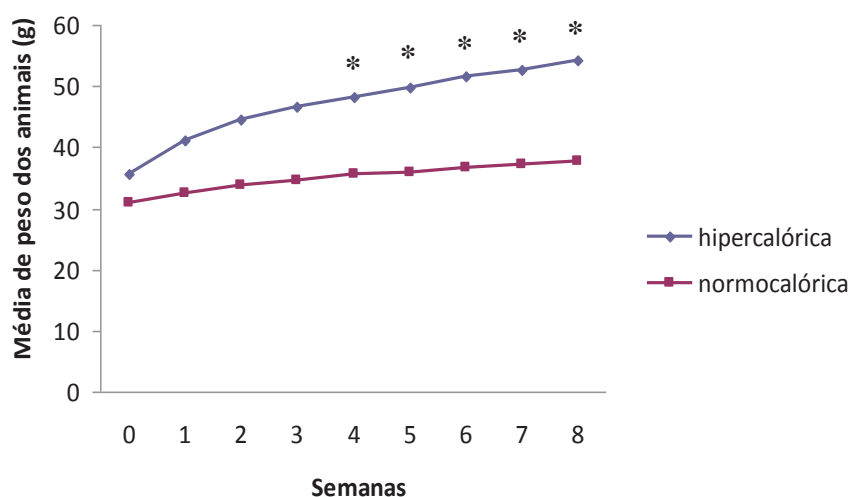


Figura 2- Média de peso corporal dos animais que receberam dieta normocalórica e hipercalórica durante oito semanas. Valores expressos em média \pm EPM. Análise estatística entre as médias de pesos dos grupos antes e após as oito semanas: teste t de student entre dados paramétricos dependentes $p < 0,05$ (*)

Conforme o previsto, a DH induziu um aumento de peso nos animais do grupo obeso maior do que o aumento de peso nos animais do grupo controle que receberam a DN. As diferenças significativas das médias de pesos dos animais podem ser observadas a partir da terceira semana (**Figura 3**).

Na oitava semana, a diferença de peso médio dos animais tratados com DH em relação aos animais tratados com DN foi de 16,79 g, ou seja, os animais estavam 44% acima do peso dos animais do Grupo da DN. Considerando-se que diferenças entre 10 a 25% de peso corpóreo maiores que os animais controles são classificadas como obesidade moderada. E, um ganho de peso maior que 40% é considerado obesidade severa [9], o resultado significativo, não expresso na **Figura 2**, obtido demonstrou que o Grupo da DH estava classificado como tendo obesidade severa.

Baseando-se nas pesquisas, a metodologia deste projeto permitiu a indução de obesidade após o fornecimento da DH pelo período de 8 semanas, menor que o período utilizado nas outras pesquisas, que normalmente necessitam de 10 a 12 semanas para atingir uma diferença de ganho de peso superior a 40%.

Os animais que receberam dieta normocalórica apresentaram uma média de peso corpóreo no primeiro dia de fornecimento da dieta de $30,8 \pm 1,0$ g e após 8 semanas de dieta normocalórica atingiram o peso médio final de $37,6 \pm 1,4$ g, com uma variação total de peso de 6,8 (Δ peso). No grupo dos animais que receberam dieta hipercalórica, o peso médio inicial foi de $34,2 \pm 1,0$ g, enquanto que o peso médio final foi de $52,3 \pm 1,4$ g, com um Δ peso de 18,1 (**Tabela 6**), confirmando a indução de obesidade com o uso da dieta padronizada e utilizada no presente projeto.

Tabela 6- Variação do peso corpóreo dos animais do Grupo da DH e do Grupo da DN. Valores expressos em \pm EPM. Diferença significativa em relação ao grupo da DN, $p < 0,05$ (*)

Grupos experimentais	Peso inicial	Após 8 semanas	Δ peso
Grupo da DN	30,8 \pm 1,0	37,6 \pm 1,4	6,8
Grupo da DH	34,2 \pm 1,0	52,3 \pm 1,4 *	18,1

Após as oito semanas de tratamento dos animais com as duas diferentes dietas (DN e DH), os animais foram divididos em dois grupos (normais e obesos) e foram tratados durante 21 dias com o extrato supercrítico da *Physalis angulata* L.. Neste período, todos os animais de todos os grupos receberam a mesma DN. Foi verificado que o consumo da ração não diferiu significativamente ao longo dos 21 dias, apenas observou-se que o consumo de ração pelos animais dos grupos normais e *pair feeding* sempre é inferior ao consumo dos animais obesos sem tratamento e com o tratamento (**Figura 3**).

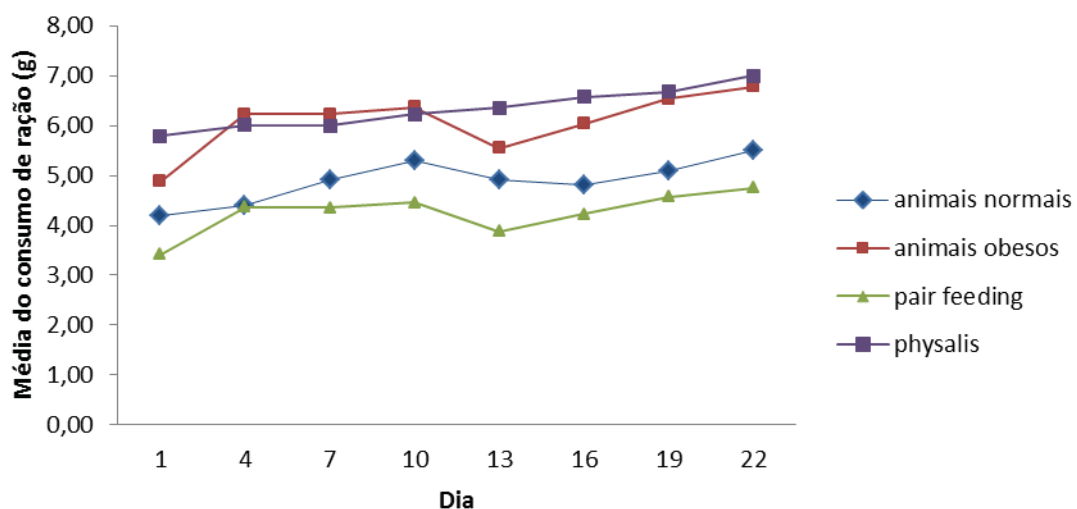


Figura 4- Média de consumo dos diferentes grupos experimentais durante 21 dias após a indução da obesidade. Valores expressos em média \pm EPM. Análise estatística entre o consumo nos 21 dias: ANOVA seguida pelo teste de múltiplas comparações, teste de Dunnett, diferença significativa quando $p < 0,05$ (*)

Na **Figura 4** pode ser verificada a variação do peso corpóreo dos animais do grupo tratado. Nesta figura, verifica-se que o tratamento com o extrato supercrítico da *Physalis angulata* L. não foi significativo para a diminuição de peso nos animais. Na figura pode-se ainda observar que o grupo *pair feeding* apresenta um peso corporal inferior a todos os grupos devido à restrição de dieta, conforme descrito.

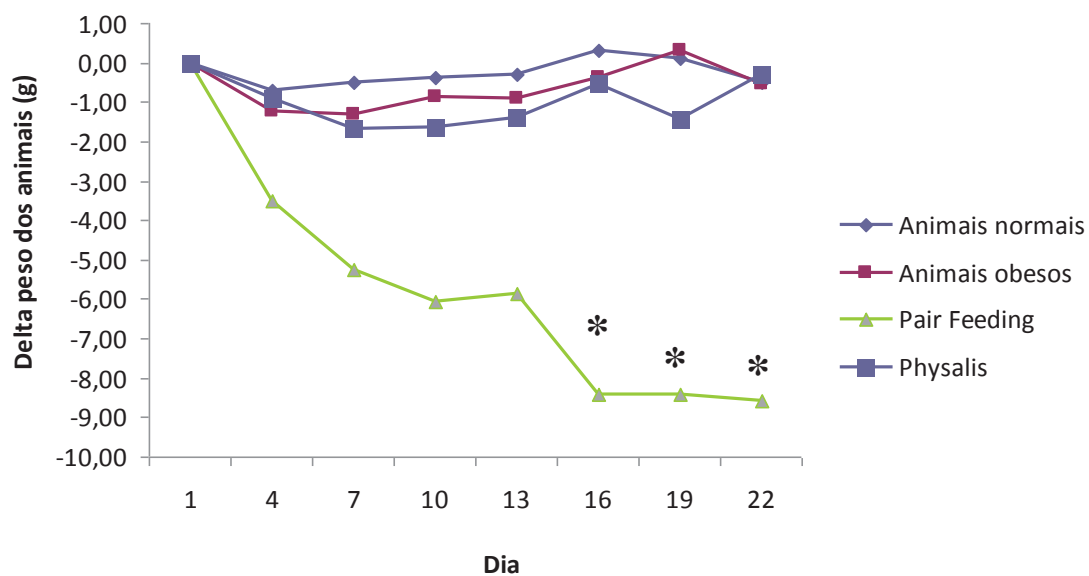


Figura 5- Efeito do tratamento com extrato supercrítico da *Physalis angulata* L. no peso dos animais (Δ peso). Valores expressos em \pm EPM. Análise estatística entre o peso dos grupos nos 21 dias: ANOVA seguida pelo teste de múltiplas comparações, teste de Dunnett, diferença significativa quando $p < 0,05$ (*)

Na **Tabela 7** verifica-se a variação do peso dos animais durante todo o procedimento experimental. Nesta tabela verifica-se claramente que a DH utilizada garantiu a indução de obesidade promovendo um ganho de peso médio de 18,1 g comparando-se com o ganho médio de peso de 6,8 g dos animais tratados com a DN. Todos os grupos de animais obesos apresentaram ganho de peso similar aos animais do grupo obeso não tratado. O tratamento com o extrato supercrítico de *Physalis angulata* não diminuiu o ganho de peso dos animais tratados.

Tabela 7- Variação do peso dos animais após 8 semanas de dieta e após tratamento. ¹ variação do peso após 8 semanas de fornecimento de dieta, ² variação do peso após tratamento calculado em comparação ao último dia de fornecimento de DH. Valores expressos em \pm EPM. , Diferença significativa quando $p < 0,05$ (*) ou $p < 0,01$ (**)

Grupos experimentais	Peso inicial	Após 8 semanas	Δ peso ¹	Após tratamento	Δ peso ²
Animais normais	30,8 \pm 1,0	37,6 \pm 1,4	6,8	36,8 \pm 1,6	0,8
Animais obesos	34,2 \pm 1,0	52,3 \pm 1,4 **	18,1	51,5 \pm 1,4	0,8
Pair-feeding	35,1 \pm 1,3	54,0 \pm 1,3 **	18,9	43,0 \pm 1,5 *	11,0
Animais obesos					
+ Physalis	35,6 \pm 0,9	53,6 \pm 1,5 **	18,0	55,0 \pm 1,4	1,4

Estes resultados indicam que o extrato na dose de 100 mg/Kg não foi capaz de promover efeito redutor no ganho do peso de animais obesos.

Após os 21 dias de tratamento, todos os animais foram submetidos às sessões de estresse físico ou psicogênico, com o objetivo de se verificar os efeitos do produto-teste sob os mais importantes mediadores da obesidade e do estresse, cujas análises estão em andamento. Após a sessão de estresse, os animais foram mortos e seus principais órgãos retirados e pesados, conforme apresentado na **Tabela 8**, onde se verifica que o extrato supercrítico da *Physalis angulata* L. não interferiu com o peso de órgãos.

Tabela 8- Peso médio dos órgãos dos animais dos diferentes grupos experimentais. Valores expressos em \pm EPM

Grupos	Fígado	Baço	Rins	Coração	Pulmão	Testículo	Cérebro	Hipotálamo
Animais normais	12,92 \pm 0,09	3,48 \pm 0,13	7,11 \pm 0,46	3,87 \pm 0,19	4,95 \pm 0,38	4,35 \pm 0,11	6,00 \pm 0,11	1,10 \pm 0,04
Animais obesos	12,36 \pm 0,12	3,12 \pm 0,12	6,00 \pm 0,08	3,60 \pm 0,07	4,83 \pm 0,28	4,20 \pm 0,08	5,21 \pm 0,11	0,93 \pm 0,03
Pair-feeding	11,60 \pm 0,09	2,80 \pm 0,11	5,97 \pm 0,06	3,85 \pm 0,08	5,28 \pm 0,18	4,44 \pm 0,09	5,67 \pm 0,09	0,94 \pm 0,04

5. Conclusão

A metodologia proposta no seguinte projeto para induzir a obesidade nos animais, foi eficaz devido a um menor período necessário para o término desse processo, portanto conseguimos, além de padronizar a técnica, diminuir o período necessário para induzir a obesidade severa.

A padronização do modelo de estresse físico e psicogênico também foi realizada com sucesso.

E a partir dos resultados, podemos concluir que o extrato supercrítico de *Physalis angulata* L. não possui efeito redutor de peso e nem diminuiu o consumo de ração. O extrato também não mostrou efeitos tóxicos após tratamento sub-crônico.

6. Considerações Finais

Apesar das dificuldades encontradas para a execução do projeto, como visto no prólogo, conseguimos cumprir uma parte significativa do projeto. Pessoalmente, o trabalho realizado foi muito satisfatório, pois as experiências e os conhecimentos adquiridos para a padronização de novos métodos de indução da obesidade e do estresse são únicos e satisfatórios.

Este projeto representou o início de uma nova linha de pesquisa no Laboratório de Fitomedicamentos e, futuramente serão feitas análises moleculares, histológicas e imunológicas das amostras biológicas obtidas nesta etapa. Tais análises avaliarão genes causadores de obesidade, estrutura histológica da pele saudável e doente, além de processos inflamatórios locais e sistêmicos.

7. Referências Bibliográficas

1. Wanderley NE, Ferreira VA. Obesidade: uma perspectiva plural. *Ciência & Saúde Coletiva*. 2010; 15: 185-194.
2. Kaczmariski RJ, Flegal KM, Campbell SM. & Johnson CL. Increasing prevalence of overweight among US adults: The National Health and Nutritional Examination Surveys 1960 to 1991. *Journ of Amer Med Assoc*. 1994; 272: 205–11.
3. Van Itallie T, Lew E. Overweight and underweight. In Lew E & Gajewski J, Eds. *Medical risks 1987: mortality trends by age and time elapsed*. New York: Praeger. 1990; 13: 1-22.
4. Ivkovic-Lazar T, Lepsanovic L, Babic L, Stokic E, Tesic D, Medic-Stojanoska M. The metabolic X syndrome: 4 case reports. *Med Pregl*. 1992;45: 210-214.
5. Pinheiro ARO, Freitas SFT, Corso ACT. Uma abordagem epidemiológica da obesidade. *Rev. Nutr. Campinas*. Oct./Dec. 2004; 17:4.
6. Scheinfeld NS. Obesity and dermatology. *Clin Dermatol*. 2004; 22: 303–9.
7. Guzik TJ, Mangalat D, Korbut R. Adipocytokines- Novel link between inflammation and vascular function? *Journal of Physiology and Pharmacology*. 2006; 57:505-528.
8. WHO - World Health Organization. Obesity – preventing and managing the global epidemic. Geneva: Report of a WHO Consultation on Obesity. 1998.
9. Hariri N, Thibault L. High-fat diet-induced obesity in animal models. *Nut Res Reviews*. 2010; 23: 270– 299.
10. Buettner R, Scholmerich J, Bollheimer L C. High-fat diets: modeling the metabolic disorders of human obesity in rodents. *Obesity*. 2007; 15: 798–808.
11. Ghibaudi L, Cook J, Farley C. Fat intake affects adiposity, comorbidity factors, and energy metabolism of Sprague–Dawley rats. *Obes Res*. 2002; 10: 956–963.
12. Ainslie DA, Proietto J, Fam BC. Short-term, high-fat diets lower circulating leptin concentrations in rats. *Am J Clin Nutr*. 2000; 71: 438–442.
13. Woods SC, Seeley RJ, Rushing PA. A controlled high-fat diet induces an obese syndrome in rats. *J Nutr*. 2003; 133: 1081–1087.
14. Huang XF, Xin X, McLennan P. Role of fat amount and type in ameliorating diet-induced obesity: insights at the level of hypothalamic arcuate nucleus leptin receptor,

neuropeptide Y and pro-opiomelanocortin mRNA expression. *Diabetes Obes Metab.* 2004; 6: 35–44.

15. Organizadores: Haraguchi LMM, Carvalho OB. *Plantas Mediciniais*. Secretaria Municipal do Verde e do Meio Ambiente. Divisão Técnica Escola Municipal de Jardinagem. 2010; 1: 20-21.

16. Di Stasi LC, Hiruma-Lima CA. *Plantas Mediciniais na Amazônia e na Mata Atlântica*. Edit UNESP; 2° ed. 2002; 5: 399-400.

17. Santos JAA, Tomassini TCB, Xavier DCD, Ribeiro IM, Silva MTG, Morais-Filho ZB. Molluscicidal activity of *Physalis angulata* L. extracts and fractions on *Biomphalaria tenagophila* (d'Orbigny, 1835) under laboratory conditions. *Mem I Oswaldo Cruz.* 2003; 98: 425-428.

18. Santos RA, Cabral TR, Cabral IR, Antunes LMG, Andrade CP, Santos PCC, Bahia MO, Pessoa C, Nascimento JLM, Burbano RR, Takahashi CS. Genotoxic effect of *Physalis angulata* L. (solanaceae) extract on human lymphocytes treated *in vitro*. *Biocell.* 2008; 32: 195-200.

19. Soares MB, Bellintani MC, Ribeiro IM, Tomassini TC, Ribeiro dos Santos R. Inhibition of macrophage activation and lipopolysaccharide-induced death by seco-steroids purified from *Physalis angulata* L. *Eur. J. Pharmacol.* 2003; 459: 107–112.

20. Lee HZ, Liu WZ, Hsieh WT, Tang FY, Chung JG, Leung HWC. Oxidative stress involvement in *Physalis angulata*-induced apoptosis in human oral cancer cells. *Food and Chem Toxic.* 2009; 47: 561–570.

21. Hsieh WT, Huang KY, Lin HY, Chung JG. *Physalis angulata* induced G2/M phase arrest in human breast cancer cells. *Food Chem. Toxicol.* 2006; 44: 974–983.

22. Soares MB, Brustolim D, Santos LA, Bellintani MC, Paiva FP, Ribeiro YM, Tomassini, TC, Ribeiro dos Santos R. Physalins B, F and G, seco-steroids purified from *Physalis angulata*L., inhibit lymphocyte function and allogeneic transplant rejection. *Intern Immunopharm.* 2006; 6: 408– 414.

23. Nagafuji S, Okabe H, Akahane H, Abe F. Trypanocidal Constituents in Plants. Withanolides from the Aerial Parts of *Physalis angulata*. *Biol. Pharm. Bull.* 2004; 27: 193-197.

24. He M, Su H, Gao W, Johansson SM, Liu Q, Wu X, Liao J, Young AA, Bartfai T, Wang MW. Reversal of obesity and insulin resistance by a non-peptidic glucagon-like peptide-1 receptor agonist in diet-induced obese mice. *PLoS One*. 2010; 5: 14205.
25. Araújo EP, Souza CT, Ueno M, Cintra DE, Bertolo MB, Carvalheira JB, Saad MJ, Velloso LA. Infliximab restores glucose homeostasis in an animal model of diet-induced obesity and diabetes. *Endocrinol*. 2007; 148, 5991-5997.
26. Dean JT, Tran L, Beaven S, Tontonoz P, Reue K, Dipple KM, Liao JC. Resistance to diet-induced obesity in mice with synthetic glyoxylate shunt. *Cell Metabol*. 2009; 9: 525-536.
27. Pitombo C, Araújo EP, Souza CT, Pareja JC, Geloneze B, Velloso LA. Amelioration of diet-induced diabetes mellitus by removal of visceral fat. *J. Endocrinol*. 2006; 191: 699-706.
28. Klaus S, Pültz C, Thöne-Reineke C, Wolfram S. Epigallocatechin gallate attenuates diet-induced obesity in mice by decreasing energy absorption and increasing fat oxidation. *Int. J. Obesity*. 2005; 29: 615-623.
29. Harris RBS, Bowen HM, Mitchell TD. Leptin resistance in mice is determined by gender and duration of exposure to high-fat diet. *Physiol. Behav*. 2003; 78: 543-555.
30. Van Heek M, Comptom DS, France CF, Tedesco RP, Fawzi AB, Graziano MP, Sybertz EJ, Stradeer CD, Davis Jr HR. Diet-induced obese mice develop peripheral, but not central, resistance to leptin. *J. Clin. Invest*. 1997; 99: 385-390.
31. Lijnen HR. Murine models of obesity and hormonal therapy. *Tromb. Res*. 2011; 127: 17-20.
32. Roma RB, Michelle JS and Jillian LS. Voluntary Exercise and Monounsaturated Canola Oil Reduce Fat Gain in Mice Fed Diets High in Fat. *Amer Soc for Nut Scien*. 1997.
33. Harrold JA, Williams G, Widdowson PS. Early leptin response to a palatable diet predicts dietary obesity in rats: key role of melanocortin-4 receptors in the ventromedial hypothalamic nucleus. *J Neurochem*. 2000; 74: 1224–1228.
34. Levin BE, Dunn-Meynell AA. Defense of body weight depends on dietary composition and palatability in rats with diet-induced obesity. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2002; 282: R46–R54.
35. Shanks N, Griffiths J, Zalcman S, Zacharko RM. Mouse Strain Differences in Plasma Corticosterone Following Uncontrollable Footshock. *Pharmacol. Biochem. Behav*. 1990; 36: 515–519.

36. Katayama M, Aoki E, Suzuki H, Kawana S. Foot shock stress prolongs the telogen stage of the spontaneous hair cycle in a nondepilated mouse model. *Exp Dermatol.* 2007; 16:553–560.
37. Dai JX, Han HL, Tian M, Cao J, Xiu JB, Song NN, Huang Y, Xu TL, Ding YQ, Xu L. Enhanced contextual fear memory in central serotonin-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2008; 105: 11981–11986.
38. Sim YB, Park SH, Kang YJ, Kim SM, Lee JK, Jung JS, Suh HW. The regulation of blood glucose level in physical and emotional stress models: possible involvement of adrenergic and glucocorticoid systems. *Arch. Pharm. Res.* 2010; 33: 1679–1683.
39. Golub Y, Kaltwasser SF, Mauch C. Reduced hippocampus volume in the mouse model of posttraumatic stress disorder. *J. Psychiatr. Res.* 2011; 45: 650–659.
40. Institute for Laboratory Animal Research. *The Nutritional Requirements of Rats*, 4th revised ed. Washington, DC: National Academies Press. 1995.