

Geovana Maria Xavier Ebaid

**COMPONENTES ANTIOXIDANTES DO AZEITE DE
OLIVA: CINÉTICA ENZIMÁTICA E ESTUDO DA
RELAÇÃO ENTRE ESTRESSE OXIDATIVO E
METABOLISMO ENERGÉTICO NO MÚSCULO CARDÍACO
DE RATOS NORMAIS E OBESOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia em Clínica Médica, da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, para obtenção do título de Doutor

Orientadora: Prof^ª Dr^ª. Ethel Lourenzi Barbosa Novelli

Botucatu – SP

2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO DE AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: *ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE*

Ebaid, Geovana Maria Xavier.

Componentes antioxidantes do azeite de oliva : cinética enzimática e estudo da relação entre estresse oxidativo e metabolismo energético no músculo cardíaco de ratos normais e obesos / Geovana Maria Xavier Ebaid. - Botucatu, 2011

Tese (doutorado) - Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2011

Orientador: Ethel Lourenzi Barbosa Novelli

Capes: 40101002

1. Azeite. 2. Calorimetria. 3. Cinética de enzimas.

Palavras-chave: Ácido Cafêico; Azeite de Oliva; Calorimetria; Cinética Enzimática; Oleuropeína.

ORIENTADOR

Prof.^a. Dr.^a. Ethel Lourenzi Barbosa Novelli

Estudo realizado no Departamento de Química e Bioquímica do Instituto de Biociências e no Laboratório Experimental do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista – UNESP.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais ***Samir Ebaid*** e ***Sidi Xavier***, com amor e carinho.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A Deus.

À Prof^a Dr^a **Ethel Lourenzi Barbosa Novelli**,
Orientadora e amiga, pelas oportunidades e apoio. Pelos ensinamentos e
confiança.

Aos meus amados irmãos **Gustavo** e **Leonardo**, por toda amizade e
incentivo.

À *Fapesp* pelo apoio financeiro e incentivo ao desenvolvimento deste
trabalho.

AGRADECIMENTOS

Aos meus amigos de laboratório **Fábio e Katiucha** pela dedicação à realização deste trabalho e pelos momentos compartilhados.

À minha querida amiga **Rosemary Cristina da Silva**, por todo carinho, ajuda, amizade e partilhas.

Ao Prof. Dr. **Carlos Roberto Padovani**, do Departamento de Bioestatística, UNESP, Botucatu, pelos cuidados estatísticos.

À Prof^a. Dr^a. **Léa Silvia Sant'Ana**, do Departamento de Tecnologia de Alimentos da Faculdade de Ciências Agrônômicas, UNESP, Botucatu, pela colaboração no desenvolvimento deste trabalho.

À secretária da Pós-Graduação da Clínica Médica Ana **Maria Mengue**, aos funcionários do Laboratório Experimental da Clínica Médica **Mário Baptista Bruno e José Carlos Georgette** e aos funcionários da sessão de Pós-graduação da UNESP-Botucatu, **Nathanael P. Salles, Janete Herculano Nunes Silva, Regina Célia Spadin, Lílian Cristina Bianchi e Andrea P. L. Devidé**, pela atenção e pelo carinho que sempre demonstraram.

Ao **Fábio Henrique Fava, Maria A. N. de Oliveira e Lurdes Ribeiro de Lemos** do Departamento de Química e Bioquímica – IB, pela dedicação e pelo auxílio técnico

SUMÁRIO

<i>CAPÍTULO 1</i>	1
Ação do azeite de oliva e seus componentes fenólicos oleuropeína e ácido caféico sobre parâmetros nutricionais, morfométricos e calorimétricos em ratos alimentados com dieta padrão e hipercalórica.....	1
Resumo.....	2
Introdução.....	3
Objetivos.....	7
Material e Métodos.....	7
Resultados.....	18
Discussão.....	32
Referências Bibliográficas.....	41

<i>CAPÍTULO 2</i>	57
Perfil lipídico e estresse oxidativo sérico: ação do azeite de oliva e seus fenóis em animais submetidos a ingestão de dieta padrão e hipercalórica.....	57
Resumo.....	58
Introdução.....	59
Objetivos.....	62
Material e Métodos.....	62
Resultados.....	67
Discussão.....	79
Referências Bibliográficas.....	84

CAPÍTULO 1

**AÇÃO DO AZEITE DE OLIVA E SEUS COMPONENTES
FENÓLICOS OLEUROPEÍNA E ÁCIDO CAFÉICO SOBRE
PARÂMETROS MORFOMÉTRICOS, CALORIMÉTRICOS E
ESTRESSE OXIDATIVO NO MÚSCULO CARDÍACO DE
RATOS NORMAIS E OBESOS**

RESUMO

O presente trabalho teve por objetivo determinar os efeitos da suplementação nutricional de azeite de oliva extra-virgem e seus fenóis, oleuropeína e ácido cafêico, sobre os parâmetros morfométricos, calorimétricos e estresse oxidativo no músculo cardíaco de ratos normais e obesos. Para tanto, foram utilizados 48 ratos, Wistar, $180,52 \pm 21,05\text{g}$, divididos inicialmente em 2 grupos. O grupo P (n=24) foi mantido com ração padrão e água *ad libitum* e o grupo H (n=24) foi mantido com ração rica em colesterol e sacarose e água *ad libitum*. Após 21 dias de tratamento os dois grupos foram divididos em 4 subgrupos cada (n=6): (C) considerados controles, mantidos com as respectivas dietas P, ou H e sem suplementação; (AO) receberam respectivamente ração P ou H e suplementação nutricional com azeite de oliva extra-virgem (Colavita, Itália) (3mL/Kg/dia); (O) receberam ração P ou H, respectivamente e suplementação nutricional com oleuropeína (Genay, France) (0,023mg/Kg/dia); (AC) receberam respectivamente ração P ou H e suplementação nutricional com ácido cafêico (Sigma, USA) (2,66mg/Kg/dia). O experimento teve duração de 43 dias. Ingestão de ração hipercalórica induziu obesidade. A análise calorimétrica permitiu sugerir que os efeitos da suplementação nutricional com azeite de oliva foram similares à suplementação com ácido cafeico, tanto o azeite de oliva como o ácido cafeico induziram elevação na oxidação de lipídios, independentemente da dieta utilizada. Administração de azeite de oliva e oleuropeína apresentaram atividade antioxidante evidenciada pela elevação nas substâncias antioxidantes totais e redução nas concentrações de hidroperóxido de lipídio, no tecido cardíaco de animais mantidos com ração padrão. A análise do sistema glutathiona permitiu evidenciar que azeite de oliva e seus fenóis não induziram alterações significantes nos animais mantidos com dieta padrão. Animais que receberam ácido cafêico em dieta hipercalórica apresentaram diminuição na concentração de glutathiona reduzida (GSH). Em condições de dieta hipercalórica, a suplementação com ácido cafeico foi menos efetiva como antioxidante, em relação a suplementação com oleuropeína e azeite de oliva.

Palavras chave: azeite de oliva, oleuropeína, ácido cafêico, dieta hipercalórica, calorimetria.

INTRODUÇÃO

A suplementação nutricional com azeite de oliva tem sido recomendada como intervenção terapêutica de importante papel na medicina preventiva, com o objetivo de elevar a relação entre ácidos graxos monoinsaturados e saturados nas dietas, induzindo efeitos benéficos nas dislipidemias e assim, indiretamente, prevenindo a aterosclerose e as doenças cardiovasculares (Visioli et al., 2000; Kaur & Kapoor, 2001; Weinbrenner et al., 2004; Faine et al., 2004; Fitó et al., 2005; Perez-Jimenez et al., 2007; Bondia-Pons et al., 2007; Covas 2008).

Diferentemente de outros óleos, os quais são extraídos de sementes de vegetais, o azeite de oliva é obtido do fruto da oliveira (*Olea europaea*), através de processamento físico, não havendo tratamento químico e refinamento (Raventós et al., 2004).

A despeito de constituir uma fonte de ácidos graxos monoinsaturados, o ácido oléico (Faine et al., 2004), tem sido sugerido, que as propriedades benéficas do azeite de oliva estão associadas aos seus compostos fenólicos (De La Cruz et al., 2000; Casalino et al., 2002; Marrugat et al., 2004; Polzonetti et al., 2004), cuja concentração no azeite de oliva extra virgem pode variar dependendo do cultivo, clima e amadurecimento do fruto no momento da colheita (Gimeno et al., 2002; Servili et al., 2003).

Compostos fenólicos do azeite de oliva incluem fenóis simples como o hidroxitirosol (3,4-dihidroxifeniletanol), ácidos elenólicos, entre eles o ácido cafeico (ácido 3,4-dihidroxicinnamico) (Montedoro et al., 1992; Manach et al., 2004; Vissers et al., 2004; Trípoli et al., 2005; Aldini et al., 2006) e polifenóis como a oleuropeína (Gómez-Alonso et al., 2002; Fitó et al., 2007).

Estudos recentes realizados por nosso grupo de pesquisa (Faine et al., 2006) demonstraram que administração de hidroxitirosol não induziu efeitos benéficos no metabolismo cardíaco. Também foi evidenciado que outros componentes além do hidroxitirosol e ácido oléico podem ter importante papel nos efeitos biológicos do azeite de oliva extra virgem .

Embora existam inúmeros estudos sobre os compostos fenólicos do azeite de oliva (Covas et al., 2006; Hillestrom et al., 2006; Al-Azzawie et al., 2006; Machowetz et al., 2007; Bondia-Pons et al., 2007; Waterman et al., 2007; Covas, 2008), os efeitos do azeite e

de seus componentes ácido cafeico e oleuropeína, nos parâmetros calorimétricos e no estresse oxidativo no tecido cardíaco em condições de obesidade, ainda não foram estabelecidos.

A associação entre obesidade e doenças cardiovasculares tem estimulado pesquisas sobre o controle do peso corporal (Carmona et al., 2009) e sobre a redução de seus efeitos adversos, notadamente no tecido cardíaco (Kenchiah et al., 2002; Pereira et al., 2003; Novelli et al., 2009). Entretanto, a despeito dos conhecimentos sobre a associação entre incidência de obesidade e a elevada ingestão de lipídios e carboidratos, a dieta ocidental freqüentemente consumida é hipercalórica, contendo quantidades consideráveis de sacarose e colesterol (WHO/FAO, 2003).

É fato conhecido que dietas ricas em lipídios e colesterol induzem obesidade (Hill et al., 2000), desde que o elevado consumo de lipídios aumenta o apetite e induz hiperfagia (Friedman, 1998). Por outro lado, a restrição na ingestão lipídica e a elevação no consumo de carboidratos podem ser contraproducentes para o controle das alterações metabólicas que acompanham a obesidade. Estudos recentes demonstraram que elevada ingestão de sacarose, em ratos, induziu elevação no peso corporal final, aumento significativo no índice de massa corporal e hipertrigliceridemia (Diniz et al., 2005; Ebaid et al., 2006; Novelli et al., 2007).

O conceito que obesidade resulta da elevada ingestão calórica, excedendo o gasto energético tem delineado a maioria das condutas para perda de peso. Nesta visão demasiadamente simples, a redução das alterações metabólicas da obesidade, seria consequência direta da redução na ingestão calórica. Entretanto, outros fatores metabólicos estão associados ao ganho de peso corporal. Tem sido demonstrado que redução na fosforilação oxidativa aumenta o acúmulo de lipídios nos adipócitos, e que na obesidade ocorre redução no consumo de oxigênio, indicando inadequada atividade mitocondrial (Vankoningsloo et al., 2005).

Deste modo, o ganho de peso pode ser visto não apenas como consequência de um balanço energético positivo, mas também como o mecanismo através do qual a energia proveniente dos substratos energéticos é metabolizada e estocada. (Wilson-Fritch et al., 2004).

De fato, embora usualmente atribuída ao dano coronariano obstrutivo, a disfunção miocárdica tem sido observada na obesidade, mesmo na ausência de aterosclerose (Sugizaki et al., 2005; Pinotti et al., 2006; Seiva et al., 2008; Novelli et al., 2009), sugerindo que alterações no metabolismo energético e na oxidação mitocondrial miocárdica podem contribuir para o aparecimento da insuficiência cardíaca (Seiva et al., 2008).

Desde os estudos pioneiros de Hill e colaboradores (1924), a capacidade de utilização do oxigênio pelos organismos tem sido objeto de inúmeras pesquisas, uma vez que o declínio no volume de oxigênio consumido (VO_2) pode constituir a base fisiológica para a redução progressiva na capacidade física, que acompanha a obesidade. A redução na utilização de oxigênio pode ser decorrente da redução do fluxo sanguíneo (Poole et al., 2003), em consequência da diminuição da força contrátil cardíaca, reduzindo de maneira significativa a distribuição corporal sanguínea (Betik & Hepple, 2008).

O metabolismo miocárdico constitui um capítulo singular na bioquímica e um importante alvo farmacológico. O miocárdio pode alterar as vias metabólicas para produção de energia, dependendo do suprimento de oxigênio, da necessidade de energia e do substrato energético disponível na corrente sanguínea (Stanley et al., 2005). Pode ainda utilizar vias alternativas para produção de ATP (adenosina trifosfato) e liberação do cálcio do retículo sarcoplasmático.

No miocárdio, em condições normais de oxigenação, a glicólise produz energia preferencialmente para a manutenção da integridade da membrana sarcolemal (SL) (Kaasik et al., 2001). Glicogenólise é utilizada preferencialmente no retículo sarcoplasmático (SR), onde grandes quantidades de glicogênio são estocadas, sendo o glicogênio utilizado pela ação de enzimas glicogenolíticas pelo ciclo intracelular de Ca^{2+} (Xu & Becker, 1998). As associações SL/glicólise e SR/glicogenólise representam baixa capacidade de produção energética, porém elevada especificidade do metabolismo miocárdico (Novelli et al., 2009). Por outro lado, a oxidação mitocondrial de substratos representa elevada capacidade e baixa especificidade de produção de ATP, desde que pode utilizar carboidratos, ou lipídios como substrato, gerando ATP para os miofilamentos (Kaasik et al., 2001; Stanley et al., 2005).

O músculo cardíaco é caracterizado pela elevada capacidade oxidativa (Stanley & Sabbah, 2005). Em condições aeróbicas normais, as moléculas de acetil Coenzima A, provenientes da β -oxidação de ácidos graxos são metabolizadas no ciclo do ácido cítrico

produzindo equivalentes redutores NADH ou FADH₂. Estes são transferidos através da cadeia de transporte de elétrons, produzindo ATP pela fosforilação oxidativa. Nestas condições, o citrato, formado no ciclo do ácido cítrico e elevadas concentrações intracelulares de ATP inibem a via glicolítica e o complexo enzimático piruvato desidrogenase (Pi-DH) (Lopaschuk et al., 2002).

A principal função da mitocôndria é energética, suprindo as células de ATP. Na matriz mitocondrial, através do ciclo do citrato (ciclo de *Krebs*), os equivalentes redutores NADH (nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida) são gerados nas reações catalisadas pela isocitrato desidrogenase, α -cetoglutarato desidrogenase e malato desidrogenase. O FADH₂ (flavina adenina dinucleotídeo reduzido) é produzido pela succinato desidrogenase. NADH e FADH₂ doam seus elétrons para os complexos respiratórios da cadeia respiratória na membrana mitocondrial interna. Esse transporte de elétrons está associado à respiração mitocondrial e ao consumo de oxigênio, acoplada à síntese de ATP, mediante ADP (adenosina difosfato). Em consequência, prótons (H⁺) são liberados através da membrana mitocondrial interna, gerando gradiente eletroquímico, responsável pela síntese de ATP nos sítios catalíticos da F₁F₀-ATP sintetase. Independente do substrato energético utilizado, o oxigênio é o acceptor terminal de elétrons durante os processos de produção de energia através da fosforilação oxidativa (Nelson & Cox, 2006).

É notório que, no ciclo do citrato é produzida uma molécula de GTP, a partir de uma molécula de acetil coenzima A, pela ação da succinil-Coenzima A sintetase, em um processo de fosforilação no substrato, que não envolve o consumo de oxigênio. Portanto, sem significado na geração de espécies radicalares derivadas do oxigênio (Smith et al., 2007; Baynes & Dominiczak, 2007; Dominiczak, 2007; Devlin, 2007; Campbell & Farrell, 2008; Voet et al., 2008).

Tem sido estimado que no processo de fosforilação oxidativa, acoplado a cadeia respiratória mitocondrial, a redução incompleta do oxigênio resulta na produção de radical superóxido (O₂⁻) (Espósito et al., 1999; Novelli et al., 2002; Novelli, 2005; Souza et al., 2008; Seiva et al., 2008; Seiva et al., 2009; Novelli et al., 2009). A redução posterior do O₂⁻ leva a formação de peróxido de hidrogênio (H₂O₂). Radicais superóxido e peróxido de hidrogênio podem reagir entre si, em presença de ferro, através da reação de Fenton e Haber-Weiss, induzindo o estresse oxidativo (Nishiyama et al., 1998). Estes fatos explicam

a associação entre metabolismo energético, obtenção de energia através da oxidação de substratos, com o estresse oxidativo.

Considerando que o metabolismo energético depende do suprimento de substrato no tecido cardíaco, ingestão de dietas com elevada concentração de sacarose e colesterol pode alterar as vias metabólicas miocárdicas para obtenção de energia, induzindo modificações na oxidação de nutrientes e na liberação de espécies radicalares associadas ao estresse oxidativo. Alterações na composição das membranas celulares e mitocondriais decorrentes de alterações na composição da dieta podem afetar não somente, as propriedades elétricas do tecido cardíaco, como também a produção de energia (Pepe & McLennan, 2002; Diniz et al., 2008). Nestas condições, compostos capazes de modular as atividades de enzimas reguladoras das vias metabólicas podem contribuir para a redução do estresse oxidativo e melhora do metabolismo energético.

OBJETIVOS

O presente trabalho teve por objetivos evidenciar a indução de obesidade nos animais do grupo mantido com ração hipercalórica e determinar o efeito da suplementação nutricional da dieta com azeite de oliva extra-virgem, oleuropeína e ácido caféico sobre os parâmetros morfométricos, calorimétricos e estresse oxidativo no músculo cardíaco de ratos normais e obesos.

MATERIAL E MÉTODOS

1. ANIMAIS

O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Botucatu – SP, adotado pelo Colégio Brasileiro de experimentação Animal (COBEA).

Foram utilizados 48 ratos machos adultos *Wistar*, de peso inicial médio $180,52 \pm 21,05$ gramas. Os animais foram provenientes do Biotério da UNESP - "campus de Botucatu" e foram transferidos para o "Laboratório de Bioquímica na Experimentação Animal" do Departamento de Química e Bioquímica, Instituto de Biociências, UNESP/Botucatu, onde permaneceram durante todo o período experimental, em gaiolas de plástico individual, à temperatura de $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$, período claro/escuro de 12 horas.

Inicialmente os animais foram divididos em dois grupos mantidos com ração padrão (**P**) (Biobase, 9301, SIF nº SC – 25035, Brasil) e com ração hipercalórica (**H**). Os animais receberam água destilada *ad libitum* durante todo o período experimental.

Após 21 dias de tratamentos, os animais do grupo P mantidos com ração padrão, foram divididos em 4 subgrupos (n=6):

- **PC** - considerado controle, recebendo dieta padrão;
- **PAO** - recebendo ração padrão e suplementação nutricional com azeite de oliva (Colavita, Italia) (3mL/Kg/dia) (Faine et al., 2004; Vissers et al., 2004);
- **PO** - recebendo ração padrão e suplementação nutricional com oleuropeína (Genay, France) (0,023mg/Kg/dia) (Gómez-Alonso et al., 2002) e
- **PAC** - recebendo ração padrão e suplementação nutricional com ácido cafêico (Sigma, USA) (2,66mg/Kg/dia) (Montedoro et al., 1992).

Para o estudo dos efeitos da ingestão de azeite de oliva e seus componentes fenólicos em animais obesos, após 21 dias de consumo da dieta rica em colesterol (Costa et al, 1993) e sacarose, os animais do grupo H, mantidos com ração rica em colesterol e sacarose, foram divididos em 4 subgrupos (n=6):

- **HC** – recebendo dieta rica em colesterol e sacarose.
- **HAO** – recebendo dieta rica em colesterol e sacarose, com suplementação nutricional de azeite de oliva, como no grupo PAO.
- **HO** - mantido com dieta rica em colesterol e sacarose, com suplementação nutricional de oleuropeína.
- **HAC** - recebendo dieta rica em colesterol e sacarose, com suplementação nutricional de ácido cafêico.

As concentrações dos fenóis utilizadas corresponderam aos conteúdos dos mesmos, na dose de azeite usada na suplementação dos animais dos grupos PAO (ração padrão + azeite) e HAO (ração hipercalórica + azeite). Estes animais (PAO e HAO) receberam quantidade correspondente a 4% da dieta (Faine et al., 2004), ou seja, 4ml de azeite (ou 4g de azeite de oliva) para 100g de dieta (ração)/dia, ou 1mL de azeite para a ingestão de 25g de ração/dia (Novelli et al., 2007). Tendo como base o peso médio dos animais de 300g, os quais ingerem aproximadamente 25g de ração por dia, a quantidade de azeite de oliva por kg de peso corporal foi 3mL.

De acordo com a literatura, a concentração de oleuropeína em azeite de oliva extra virgem varia do valor mínimo de 3,33, até o máximo de 10,03 mg/L, e o valor médio (Gómez Alonso et al., 2002) administrado aos animais foi 7,78 mg de oleuropeína por litro de azeite. Como os animais receberam a quantidade correspondente a 3 mL de azeite, foi administrado aos animais 0,023mg/kg/dia de oleuropeína.

Calculo semelhante foi feito para o ácido cafeico. Sabendo-se que a concentração deste composto fenólico no azeite extra virgem variou de 594 a 1300mg/L de azeite de oliva, utilizamos o valor médio de 887,5mg por litro de azeite (Montedoro et al., 1992). É evidente que foi feita a conversão para administração nos animais, da quantidade encontrada em 3 mL de azeite de oliva, ou seja 2,66mg de ácido cafeico/Kg/dia.

As concentrações dos polifenóis utilizadas corresponderam, portanto a quantidade presente no azeite de oliva, administrado aos animais dos grupos PAO e HAO, sendo previamente dissolvidos em solução de etanol 10% (Visioli et al., 1998; Dogan, 2002; Carluccio et al., 2003). O azeite de oliva e seus fenóis foram administrados por gavagem, como suplementação da dieta basal, duas vezes por semana, durante o período de 21 dias. Animais dos grupos PC e HC receberam solução 10% de etanol através de gavagem. A ingestão alimentar foi controlada diariamente, no mesmo horário (9:00 as 11:00 horas). Diariamente era oferecida uma quantidade conhecida de ração. Após o período de 24 horas o restante era pesado, permitindo a determinação do consumo alimentar de cada animal, de cada grupo. O peso corporal foi determinado no início e no final do experimento. O período experimental total foi de 43 dias.

2. CARACTERIZAÇÃO DA MATÉRIA PRIMA: EXTRAÇÃO E ANÁLISE CROMATOGRÁFICA DE ÁCIDOS GRAXOS E ANÁLISE DOS COMPOSTOS FENÓLICOS DO AZEITE DE OLIVA UTILIZADO

A caracterização da matéria prima, azeite de oliva, foi realizada utilizando-se 10 amostras de azeite de oliva extra-virgem Colavita, adquiridas de diferentes estabelecimentos comerciais (Faine et al., 2006). O azeite extra-virgem Colavita foi selecionado por ser acessível à população e apresentar teor médio de fenóis (Montedoro et al., 1992).

A análise dos ácidos graxos do azeite de oliva utilizado foi realizada através de cromatografia. Cerca de 4mL de cada azeite foi homogeneizada (durante 3 a 5 minutos) com 40 mL de metanol e 80 mL de clorofórmio. As misturas foram filtradas e o procedimento acima foi repetido utilizando-se mais 40 mL de metanol e 80 mL de clorofórmio. O filtrado foi colocado em uma proveta de 500mL, com boca e tampa esmerilhadas, sendo o volume registrado. A seguir foram adicionados $\frac{1}{4}$ do volume total de KCL 0,88% e após 1 minuto de repouso, o sobrenadante foi retirado com auxílio de bomba a vácuo e desprezado. O precipitado foi tratado com sulfato de sódio anidro e filtrado em papel de filtro, sendo recolhido em balão de fundo redondo, próprio para a evaporação. O balão contendo o filtrado foi colocado em evaporador rotativo a 45⁰ C (MA 120- Marconi) e o lipídio restante foi lavado e transferido para um balão volumétrico de 10 mL, completando-se o volume com clorofórmio. Aliquotas de 0,1 mL das misturas lipídio – clorofórmio foram transferidas para cromatógrafo (GC 17-A Shimatzu).

A análise da composição de ácidos graxos, realizada no Departamento de Bromatologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP – Botucatu está apresentada na (Tabela 1).

Tabela 1. Composição e concentração de ácidos graxos no azeite de oliva utilizado.

Ácidos graxos	Concentração (%)
C ₁₆	40.5
C _{16:1}	0.7
C ₁₈	1.5
C _{18:1}	46
C _{18:2}	10.3
C _{18:3}	0.7
C _{20:1}	0.3

As análises dos conteúdos de oleuropeína e ácido caféico do azeite selecionado foram determinadas segundo McCue et al (2000) e Horii et al (2006), sendo realizadas no Laboratório de Bioquímica Vegetal do Departamento de Química e Bioquímica do Instituto de Biociências – Unesp, Botucatu – SP, obtendo-se as concentrações de oleuropeína: 3,33 a 12,03 mg/L de azeite de oliva, e de ácido caféico: 594,00 a 1300,0 mg/L azeite de oliva.

3. PREPARO DA RAÇÃO HIPERCALÓRICA

As análises das rações padrão e hipercalórica foram realizadas no Departamento de Tecnologia de Produtos Agropecuários da Faculdade de Ciências Agronômicas e Departamento de Bromatologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP, Botucatu.

A ração contendo elevada concentração de colesterol e sacarose foi preparada a partir do farelo da ração padrão Biobase, ou controle, obtido pela trituração desta ração até formação de farelo homogêneo. Para cada 1000g do farelo da ração foram adicionados 12,33g de colesterol cristalino, 1,23g de ácido cólico (Costa, et. al., 1993), 131,01g de sacarose e 84,77mL de óleo de soja (Reeves, 1997; Quiles et al., 2003). A mistura foi homogeneizada com 230mL de água quente (inferior a 60°C), e colocada em máquina específica para formação de "pellets", que foram secos em estufa com ar circulante, em temperatura inferior a 70°C. A validade da ração preparada foi de 3 meses. A dieta rica em colesterol e sacarose utilizada apresentou 3,41 kcal/g de energia metabolizável (Tabela 1).

A diferença calórica entre a ração padrão e a ração com colesterol e sacarose foi de 65 kcal/100g, ou 0,65kcal/g. O conteúdo de lipídios totais na ração padrão era de 4,41g/100g (4,41%) e na ração com colesterol e sacarose era de 11,86g/100g (11,86%). A ração para ratos, contendo colesterol e sacarose foi considerada hipercalórica. Segundo Quiles e colaboradores (2004), dietas hipercalóricas apresentam mais de 8% de lipídios. Para Gutman e colaboradores (1987), dietas hipercalóricas apresentam elevação no conteúdo calórico de 4,5kcal/g em relação à dieta padrão. Segundo Matsuo e colaboradores (1995), dieta hipercalórica apresenta elevação calórica superior a 0,32kcal/g em relação à dieta padrão.

Foi possível evidenciar que a ração padrão apresentava 19,80g de proteínas, 4,41g de lipídios (lipídios saturados), 39,25g de carboidratos totais (amido), 13,25g de fibras, 23,29g de umidade, vitaminas e minerais, em 100g de ração. A ração hipercalórica utilizada apresentava 15,25g de proteínas totais; 11,86g de lipídios totais (sendo 8,47g de óleo de soja e 3,39g lipídios saturados); 43,34g de carboidratos totais (sendo 30,24g amido e 13,10g de sacarose); 10,20g de fibras; 1,23g de colesterol; 0,123g de ácido cólico e 17,94g de umidade, vitaminas e minerais, em 100g de ração (Tabela 2).

Tabela 2. Composição das rações padrão e hipercalórica

Componentes	Padrão		Hipercalórica	
	g/100g	Kcal/100g	g/100g	Kcal/100g
Proteína	19,80	79,20	15,25	61,00
Lipídio total	4,41	39,69	11,86	106,74
Óleo de soja	-	-	8,47	76,23
Lipídios saturados	4,41	39,69	3,39	30,51
Carboidrato total	39,25	157	43,34	173,36
Amido	39,25	157	30,24	120,96
Sacarose	-	-	13,10	52,40
Fibra	13,25	-	10,20	-
Colesterol	-	-	1,23	-
Ácido cólico	-	-	0,123	-
Outros *	23,29		17,94	-
Total	100	275,89	100	341,10

(*) *Umidade, Vitaminas:* (mg/Kg de ração) (A) 25,000 UI; (B₁) 8,0 mg; (B₂) 30,00 mg; (B₆) 14,0 mg; (B₁₂) 40,0 mcg; (D₃) 5,000 UI; (E) 60,0 mg; (K) 6,0 mg; Biotina 80,0 mg; Niacina 80,0 mg; Ácido fólico 3,0 mg; Ácido pantotênico 50,0 mg, Colina 1200 mg, *Sais Minerais:* Zinco 70,0 mg; Cobre 10,0 mg; Iodo 2,0 mg; Manganês 70,0 mg; Cobalto 1,5 mg; Ferro 50,0 mg; Selênio 0,1 mg e L-Lisina 1,2% e Metionina 0,45%. Composição básica do produto: milho moído, farelo de soja, farelo de trigo, calcário calcítico, fosfato bicálcico, cloreto de sódio (sal comum). Composição das dietas determinada no Departamento de Tecnologia de Produtos Agropecuários da Faculdade de Ciências Agrônômicas e Departamento de Bromatologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Unesp, Botucatu.

4. CALORIMETRIA INDIRETA

Após 42 dias do período experimental, foi determinado o metabolismo basal, o consumo de O₂ (VO₂), ou seja, quantidade de oxigênio consumido e a produção de CO₂ (VCO₂), ou seja, a quantidade de gás carbônico excretado.

As determinações foram realizadas com uso de câmara metabólica para sistema respiratório animal (CWE, Inc, St. Paul, USA), com medidas obtidas em computador através de programa específico (software MMX, CWE, Inc., USA).

Neste equipamento, as medidas do consumo de O_2 e a produção de CO_2 foram monitoradas através do software e calculadas através da média de 3 determinações; 3 inspirações e 3 exalações registradas no programa, fornecendo diretamente os valores de VO_2 , VCO_2 , quociente respiratório ($QR = VCO_2/VO_2$) e a taxa metabólica basal (TMB) quando os animais estão em jejum (Figura 1).



Figura 1. Câmaras metabólicas utilizadas nas determinações calorimétricas nos animais dos grupos experimentais.

A calorimetria indireta foi realizada nos animais após jejum de 12h (Strohl et al., 1997; Commerford et al., 2000). A oxidação de carboidratos e de lipídios foi calculada tendo

como base o QR e os volumes de oxigênio consumido (Labayen et al., 1999): Oxidação de carboidrato = $VO_2 \times (QR - 0.707)/0.293 \times 0.746$; Oxidação de lipídio = $VO_2 \times (1 - QR)/0.293 \times 0.746$. Onde VO_2 é medido em l/min, 1,00 é o QR para a oxidação total de carboidrato, 0,707 é o QR para a oxidação total de lipídios, 0.293 é a diferença entre 1,000 e 0,707, 0.746 é o número de litros de oxigênio consumido por g de glicose oxidada.

Como parâmetros morfométricos, foram calculados a superfície corporal e o índice de massa corporal (IMC) dos animais.

- Superfície corporal ($g^{0,7}$) = (peso corporal final) 0,7 (Bray, 1969).
- IMC (g/cm^2) = peso final/comprimento corporal 2 (exceto cauda).

Também foi calculado:

- Balanço energético diário (kcal/dia) = energia ingerida (kcal/dia) – TMB (kcal/dia) (Labayen et al., 1999).

5. DETERMINAÇÕES BIOQUÍMICAS

Após 43 dias de experimento os animais foram anestesiados (pentobarbital sódico 1%, 0,1mL/100g, i.p.). A determinação do comprimento corporal (exceto cauda) foi feita com os animais sob anestesia, sendo obtidos os valores médios de $24,76 \pm 0,17$ cm para animais mantidos com ração padrão e $24,67 \pm 0,27$ cm para os grupos com dieta hipercalórica, não havendo diferenças significantes entre os grupos, em cada dieta. Os animais foram a seguir sacrificados por decapitação. Após o sacrifício o coração foi removido, dissecado e pesado. O ventrículo esquerdo (VE) foi então separado, pesado e as amostras foram lavadas em solução salina gelada (NaCl 0,9%), pesadas e armazenadas em freezer a -86°C . Amostras de 200mg do VE foram homogeneizadas em Potter Elvehjem, com pistilo de teflon, com 5 mL de tampão fosfato de sódio 0,1M. pH 7.0. Os homogeneizados foram centrifugados a 10.000 rpm por 15 minutos, em centrífuga refrigerada a -4°C . Os sobrenadantes foram utilizados para análise de proteínas totais (Lowry et al., 1951) e do estresse oxidativo.

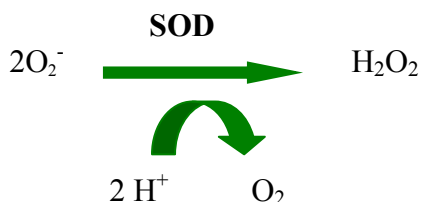
5.1 ANÁLISE DO ESTRESSE OXIDATIVO

A análise do estresse oxidativo foi realizada através das atividades das enzimas superóxido dismutase, catalase, sistema glutational, bem como das concentrações de hidroperóxido de lipídio (HP) e substâncias antioxidantes totais (SAT) no músculo cardíaco. O hidroperóxido de lipídio foi determinado através da oxidação do Fe^{2+} (sulfato ferroso amoniacal). O Fe^{3+} formado reage com alaranjado de xilenol formando composto colorido (Jiang et al., 1991). As substâncias antioxidantes totais foram calculadas através da porcentagem de inibição da formação de HP (Mehmetcik et al., 1997).

As atividades da catalase (**E.C.1.11.1.6.**) foram determinadas em tampão fosfato pH 7,0, utilizando-se 0,5mL de amostra e peróxido de hidrogênio (30%). As leituras espectrofotométricas foram realizadas a 240nm (Aebi, 1974).



As atividades da superóxido dismutase (**SOD, E.C.1.15.1.1.**) foram determinadas através da alteração na redução do nitroblue-tetrazólio (NBT) por radicais superóxido gerados pela mistura NADH e fenazina metassulfato em pH fisiológico. Leituras espectrofotométricas foram realizadas em leitor de microplaca a 560nm. (Ewing & Janero, 1995).



A atividade da glutational peroxidase (**GSH-Px, E.C.1.11.1.9.**) foi determinada através da oxidação em presença de peróxido (Nakamura et al., 1974). A mistura de reação foi formada por tampão fosfato de sódio pH 7,0, NADPH, NaN_3 , EDTA e glutational reduzida.



A concentração de glutathiona total foi determinada através de método cinético, monitorando a redução do DTNB pela glutathiona reduzida (GSH) na presença de NADPH (Tietze, 1969). A concentração de glutathiona reduzida foi determinada em tampão tris-HCl pH 8,9 e DTNB, após prévia precipitação com TCA 50%. Como padrão foi utilizada GSH 1mM (Sedlak & Lindsay, 1968). A concentração de glutathiona oxidada (GSSG) foi estimada segundo a proporção estequiométrica (2GSH: GSSG) (Okamoto et al., 2001).

A atividade da glutathiona redutase (GSH-Rd, E.C.1.6.4.2.) foi determinada através da oxidação do NADPH a 340 nm (Miller & Blakely, 1992).



6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos foram expressos em média $\pm$ desvio padrão. A comparação entre os grupos C e H foi realizada pelo test t de Student. A comparação entre os demais grupos foi realizada pela técnica da análise de variância (ANOVA) complementada com o teste de comparações múltiplas de Tukey (Zar, 1999). O nível de significância foi de 5% para a discussão dos resultados (Norman & Streiner, 1994). A análise estatística foi realizada no Departamento de Bioestatística, Instituto de Biociências, UNESP, Botucatu.

RESULTADOS

A Tabela 2 mostra a composição da ração padrão e hipercalórica. Desde que no preparo da ração foram adicionados óleo de soja e sacarose, nota-se que houve elevação no conteúdo de lipídios e de carboidratos totais na ração hipercalórica. Com o acréscimo de ácidos graxos insaturados e sacarose, a dieta hipercalórica apresentou conteúdo calórico de 341,10 Kcal/100g, comparada à dieta padrão com 275,89 Kcal/100g.

Ingestão de ração hipercalórica induziu elevação no peso corporal, na superfície corporal, no IMC. Não foram observadas alterações no consumo de ração. Houve elevação na energia total ingerida nos animais do grupo HC, comparados aos do grupo PC (Tabela 3).

Nos animais do grupo HC, houve significativa redução no consumo de oxigênio, na oxidação de lipídios, nas relações VO_2 /superfície corporal e VO_2 /peso corporal final, bem como elevação no QR (Tabela 4).

Animais do grupo HC apresentaram diminuição na TMB, na relação TMB/peso corporal final, bem como elevação no VCO_2 , na oxidação de carboidratos, na relação QR/superfície corporal, em comparação com os animais do grupo PC. O balanço energético foi elevado nos animais do grupo HC, comparados aos do grupo PC (Tabela 4).

Administração de azeite de oliva, oleuropeína e de ácido cafeico não induziu alteração no peso final, na superfície corporal, IMC, consumo de ração e energia total ingerida dos animais mantidos com ração padrão (Tabela 5), bem como nos animais mantidos com ração hipercalórica (Tabela 6).

Na Tabela 7, pode-se observar que azeite de oliva elevou VO_2 , VCO_2 , TMB, VO_2 /superfície corporal, oxidação de lipídios, bem como reduziu o QR, QR/peso final e QR/superfície corporal, comparado ao grupo PC. Animais dos grupos PAO e PAC comparados aos do grupo PC apresentaram elevação no VO_2 , no VCO_2 e na TMB. Animais que receberam oleuropeína (PO) diferiram significativamente do grupo que recebeu azeite de oliva (PAO) pela redução no VO_2 , na TMB, na oxidação de lipídios e na relação VO_2 /peso final, bem como pela elevação no VCO_2 , QR, oxidação de carboidratos, QR/superfície corporal e QR/peso final. PAC diferiu do PAO pela elevação no VCO_2 e pela redução no VO_2 /superfície corporal e na oxidação de lipídios. PAC diferiu do grupo PO

pela elevação no VO_2 , no VCO_2 , TMB, oxidação de lipídios, bem como pela redução no QR, na oxidação de carboidratos, nas relações QR/peso final e QR/superfície corporal. Não foram observadas diferenças significantes no balanço energético entre os animais dos grupos experimentais apresentados na Tabela 7.

Na Tabela 8, verifica-se que animais mantidos com ração hipercalórica dos grupos HAO, HO e HAC, comparados ao HC, apresentaram redução no QR, na oxidação de carboidratos, nas relações QR/peso final e QR/superfície corporal, bem como elevação na oxidação lipídica. Animais do grupo HAC diferiram significativamente dos do grupo HAO, pela elevação no VO_2 , bem como pela redução na TMB e na relação TMB/peso corporal final. O balanço energético foi elevado no grupo HAC em relação aos grupos HC, HAO e HO.

As determinações miocárdicas nos animais dos grupos mantidos com ração padrão estão apresentadas na Tabela 9. Não foram evidenciadas alterações significantes no peso do coração, na relação peso do coração/peso corporal, bem como nas concentrações de proteínas totais, nas atividades da catalase e glutathione peroxidase. Houve significativa redução na concentração de HP e na relação HP/SAT, bem como tendência a elevação no conteúdo de SAT no tecido cardíaco de animais dos grupos PAO e PO comparado ao PC, não havendo diferença significativa entre estes grupos. As atividades da SOD foram reduzidas no grupo PAC comparado ao PC e PO, não havendo diferença significativa entre os grupos PAC e PAO.

Não foram observadas alterações significantes no peso do coração, na relação peso do coração/peso corporal e conteúdo de proteínas totais, bem como nos parâmetros de estresse oxidativo, analisados no tecido cardíaco dos animais dos grupos mantidos com ração hipercalórica, na presença das suplementações estudadas (Tabela 10).

Nas Tabelas 11 e 12 estão apresentados os valores das concentrações de GSH, GSSG, relação GSH/GSSG e as atividades da enzima glutathione reductase dos animais tratados com dieta padrão e hipercalórica.

Não houve diferença significativa nas concentrações de GSSG, no poder redutor, representado pela relação GSH/GSSG e na atividade da enzima GSH-Rd nos animais tratados com azeite de oliva e seus fenóis e que receberam dieta padrão (Tabela 11). A concentração de GSH apresentou-se diminuída nos animais que receberam ácido caféico e

tratados com dieta hipercalórica quando comparados aos grupos HC, HAO e HO (Tabela 12).

As Figuras 2 e 3 mostram as variações na concentração de hidroperóxido de lipídio e as concentrações de GSH no miocárdio dos animais experimentais tratados com dieta padrão e hipercalórica. Na Figura 2 nota-se que tanto administração de azeite de oliva, como de oleuropeína diminuiu a concentração de hidroperóxido de lipídio comparado aos animais controles, embora não tenha havido variação nas concentrações de glutathione reduzida. Na Figura 3, pode-se observar que ácido caféico diminuiu as concentrações de glutathione reduzida comparado aos animais HC, HAO e HO. Não houve variação nas concentrações de hidroperóxido de lipídio nos animais.

Tabela 3. Peso corporal final, superfície corporal, índice de massa corporal (IMC), consumo de ração e energia ingerida pelos animais mantidos com ração padrão (PC) e com ração hipercalórica (HC)

Determinações	GRUPOS	
	PC	HC
Peso final (g)	335,75±54,32	397,66±36,54 ^a
Superfície corporal (g ^{0,7})	58,51±6,60	65,96±4,29 ^a
IMC (g/cm ²)	0,54±0,03	0,65±0,05 ^a
Consumo de ração (g/dia)	25,4±4,6	25,3±1,4
Energia ingerida (Kcal/dia)	70,07±4,30	86,27±4,09 ^a

Valores expressos como média ± desvio-padrão (p<0,05). ^a Diferença significativa em relação ao grupo PC. Análise estatística: test t de Student.

Tabela 4. Consumo de oxigênio (VO₂), produção de gás carbônico (VCO₂), quociente respiratório (QR), taxa metabólica basal (TMB), VO₂/superfície corporal, balanço energético, oxidação de lipídios, oxidação de carboidratos, QR/peso final, QR/superfície corporal, TMB/peso final e VO₂/peso final, em jejum, de animais mantidos com ração padrão e sem suplementação (PC) e animais mantidos com ração hipercalórica, sem suplementação (HC)

Parâmetros calorimétricos	GRUPOS	
	PC	HC
VO ₂ (ml/min)	3,80±0,06	3,46±0,11 ^a
VCO ₂ (ml/min)	2,35±0,001	2,49±0,002 ^a
Quociente Respiratório	0,63±0,04	0,84±0,03 ^a
TMB (kcal/h)	1,07±0,02	0,97±0,01 ^a
VO ₂ /superfície corporal (mL/h.g ^{0,7})	3,94±0,42	3,15±0,12 ^a
Balanço energético (kcal/dia)	49,65±5,51	62,93±4,27 ^a
Oxidação de lipídios (mg/min)	3,50±0,39	1,38±0,28 ^a
Oxidação de carboidratos (mg/min)	-	1,19±0,25 ^a
QR/Peso final	0,19±0,03	0,21±0,02
QR/superfície corporal	1,10±0,02	1,28±0,10 ^a
TMB/peso final (kcal/h.kg)	3,25±0,04	2,46±0,23 ^a
VO ₂ /peso final (ml/h.kg)	11,58±1,78	8,75±0,53 ^a

Valores expressos como média ± desvio-padrão (p<0,05). ^a Diferença significativa em relação ao grupo PC. (-) valor não detectado. Análise estatística: test t de Student.

Tabela 5. Peso final, superfície corporal, índice de massa corporal (IMC), consumo de ração, energia ingerida pelos animais alimentados com ração padrão sem suplementação (PC), que receberam azeite de oliva (PAO), oleuropeína (PO) e ácido cafêico (PAC)

Variável	Suplementação			
	PC	PAO	PO	PAC
Peso final (g)	335,75±54,32	357,84±45,09	344,08±36,31	372,28±29,40
Superfície corporal (g ^{0,7})	58,51±6,60	61,23±5,38	59,60±4,39	63,00±3,5
IMC (g/cm ²)	0,54±0,03	0,58±0,05	0,56±0,06	0,60±0,08
Consumo de ração (g/dia)	25,4±4,6	25,6±3,7	25,6±4,1	25,2±2,6
Energia ingerida (kcal/dia)	70,07±4,30	70,63±5,11	75,90±5,66	69,52±6,87

Valores expressos como média ± desvio-padrão (p<0,05).

Tabela 6. Peso final, superfície corporal, índice de massa corporal (IMC), consumo de ração, energia ingerida pelos animais alimentados com ração hipercalórica sem suplementação (HC), que receberam azeite de oliva (HAO), oleuropeína (HO) e ácido cafêico (HAC)

Variável	Suplementação			
	HC	HAO	HO	HAC
Peso final (g)	397,66±36,54	388,74±43,46	400,44±24,24	397,83±38,42
Superfície corporal (g ^{0,7})	65,96±4,29	64,90±5,10	66,31±2,82	65,98±4,49
IMC (g/cm ²)	0,65±0,05	0,64±0,06	0,65±0,06	0,65±0,08
Consumo de ração (g/dia)	25,3±1,4	24,8±1,7	25,9±1,2	25,4±1,5
Energia ingerida (kcal/dia)	86,27±4,09	84,59±5,65	88,34±3,73	86,64±5,02

Valores expressos como média ± desvio-padrão (p<0,05).

Tabela 7. Consumo de oxigênio (VO₂), produção de gás carbônico (VCO₂), quociente respiratório (QR), taxa metabólica basal (TMB), VO₂/superfície corporal, balanço energético, oxidação de lipídios, oxidação de carboidratos, QR/peso final, QR/superfície corporal, TMB/peso final e VO₂/peso final após jejum, dos animais mantidos com ração padrão sem suplementação (PC), que receberam azeite de oliva (PAO), oleuropeína (PO) e ácido caféico (PAC)

Parâmetros calorimétricos	Suplementação			
	PC	PAO	PO	PAC
VO ₂ (ml/min)	3,80±0,06	4,77±0,37 ^a	3,44±0,09 ^b	4,45±0,26 ^{ac}
VCO ₂ (ml/min)	2,35±0,001	2,36±0,002 ^a	2,37±0,002 ^{ab}	2,38±0,002 ^{abc}
Quociente Respiratório	0,63±0,04	0,54±0,04 ^a	0,78±0,03 ^b	0,60±0,03 ^c
TMB (kcal/h)	1,07±0,02	1,21±0,09 ^a	0,97±0,04 ^{ab}	1,18±0,06 ^{ac}
VO ₂ /superfície corporal(ml/h.g ^{0,7})	3,94±0,42	4,69±0,38 ^a	3,49±0,31 ^a	4,25±0,33 ^b
Balanço energético (Kcal/dia)	49,65±5,51	50,90±8,86	52,49±7,37	54,66±9,92
Oxidação de lipídios (mg/min)	3,50±0,39	5,55±0,49 ^a	1,92±0,35 ^{ab}	4,55±0,64 ^{abc}
Oxidação de carboidratos(mg/min)	-	-	0,64±0,33	-
QR/Peso final	0,19±0,03	0,15±0,02 ^a	0,23±0,02 ^b	0,16±0,01 ^c
QR/superfície corporal	1,10±0,02	0,88±0,08 ^a	1,31±0,1 ^{ab}	0,95±0,07 ^c
TMB/peso final (kcal/h.kg)	3,25±0,04	3,44±0,55	2,85±0,36	3,19±0,30
VO ₂ /peso final (ml/h.kg)	11,58±1,78	13,46±1,45	10,13±1,21 ^b	12,02±1,17

Valores expressos como média ± desvio-padrão (p<0,05). ^aDiferença significativa em relação ao grupo PC; ^bDiferença significativa em relação ao grupo PAO; ^c Diferença significativa em relação ao grupo PO; (-) valor não detectado.

Tabela 8. Consumo de oxigênio (VO₂), produção de gás carbônico (VCO₂), quociente respiratório (QR), taxa metabólica basal (TMB), VO₂/superfície corporal, balanço energético, oxidação de lipídios, oxidação de carboidratos, QR/peso final, QR/superfície corporal, TMB/peso final e VO₂/peso final, após jejum, dos animais mantidos com ração hipercalórica sem suplementação (HC), que receberam azeite de oliva (HAO), oleuropeína (HO) e ácido cafêico (HAC)

Parâmetros calorimétricos	Suplementação			
	HC	HAO	HO	HAC
VO ₂ (ml/min)	3,46±0,11	3,60±0,27	3,78±0,23	4,00±0,14 ^{ab}
VCO ₂ (ml/min)	2,49±0,002	2,47±0,002 ^a	2,47±0,014 ^a	2,48±0,005 ^c
Quociente Respiratório	0,84±0,03	0,64±0,03 ^a	0,70±0,11 ^a	0,66±0,03 ^a
TMB (kcal/h)	0,97±0,01	0,97±0,04	1,05±0,06	0,42±0,07 ^{abc}
VO ₂ /superfície corporal(ml/h.g ^{0,7})	3,15±0,12	3,35±0,42	3,43±0,29	3,64±0,27
Balanço energético (Kcal/dia)	62,93±4,27	62,42±4,60	63,11±4,57	76,55±5,05 ^{abc}
Oxidação de lipídios (mg/min)	1,38±0,28	3,31±0,57 ^a	2,85±1,26 ^a	3,42±0,42 ^a
Oxidação de carboidratos(mg/min)	1,19±0,25	-	-	-
QR/Peso final	0,21±0,02	0,16±0,01 ^a	0,17±0,02 ^a	0,17±0,01 ^a
QR/superfície corporal	1,28±0,10	0,99±0,08 ^a	1,06±0,16 ^a	1,00±0,07 ^a
TMB/peso final (kcal/h.kg)	2,46±0,23	2,54±0,34	2,63±0,27	1,06±0,23 ^{abc}
VO ₂ /peso final (ml/h.kg)	8,75±0,53	9,39±1,35	9,49±0,88	10,12±0,93

Valores expressos como média ± desvio-padrão (p<0,05). ^aDiferença significativa em relação ao grupo HC; ^bDiferença significativa em relação ao grupo HAO; ^c Diferença significativa em relação ao grupo HO; (-) valor não detectado.

Tabela 9. Peso do coração, relação peso coração/peso final, concentrações de proteína total, hidroperóxido de lipídio (HP), substâncias antioxidantes totais (SAT), relação HP/SAT e atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase e glutathione peroxidase (GSH-Px) no miocárdio de animais mantidos com ração padrão sem suplementação (PC), que receberam azeite de oliva (PAO), oleuropeína (PO) e ácido cafêico (PAC)

Determinações no tecido cardíaco	Suplementação			
	PC	PAO	PO	PAC
Peso do coração (g)	0,95±0,140	1,03±0,104	1,00±0,111	1,05±0,054
Peso do coração/peso corporal (g/Kg)	2,85±0,17	2,88±0,08	2,90±0,05	2,84±0,21
Proteína (g/g tecido)	0,18±0,03	0,17±0,01	0,17±0,02	0,19±0,01
HP (nmol/ g tecido)	150,07±9,96	135,03±3,18 ^a	129,93±6,66 ^a	144,20±14,75
SAT (%)	26,78±2,39	31,40±2,04 ^a	33,51±3,39 ^a	27,96±6,48
HP/SAT	5,81±1,56	4,40±1,04	3,92±0,55 ^a	5,60±2,38
SOD (μmol/ g proteína)	9,90±0,73	8,77±0,82	9,32±0,97	7,6±0,63 ^{ac}
Catalase (nmol/ g proteína)	985,09±80,79	967,47±49,74	956,52±101,66	887,07±90,33
GSH-Px (nmol/mg proteína)	6,65±4,95	6,31±3,14	6,93±1,31	5,58±1,93

Valores expressos como média ± desvio-padrão (p<0,05). ^aDiferença significativa em relação ao grupo PC; ^c Diferença significativa em relação ao grupo PO.

Tabela 10. Peso do coração, relação peso coração/peso corporal final, concentrações de proteína total, hidroperóxido de lipídio (HP), substâncias antioxidantes totais (SAT), relação HP/SAT e atividade das enzimas antioxidantes superóxido desmutase (SOD), catalase e glutathione peroxidase (GSH-Px) no miocárdio de animais alimentados com ração hipercalórica sem suplementação (HC), que receberam azeite de oliva (HAO), oleuropeína (HO) e ácido cafêico (HAC)

Determinações no tecido cardíaco	Suplementação			
	HC	HAO	HO	HAC
Peso do coração (g)	1,05±0,088	1,01±0,085	1,04±0,088	1,04±0,095
Peso do coração/peso corporal (g/Kg)	2,67±0,23	2,62±0,24	2,61±0,08	2,62±0,09
Proteína (g/g tecido)	0,16±0,02	0,17±0,01	0,17±0,01	0,18±0,03
HP (nmol/ g tecido)	127,89±7,57	135,00±2,28	127,95±9,32	126,83±8,69
SAT (%)	30,89±3,55	30,12±1,44	30,24±3,54	31,02±3,54
HP/SAT	4,19±0,63	4,49±0,26	4,30±0,75	4,15±0,68
SOD (μmol/ g de proteína)	9,56±0,92	8,95±1,14	9,78±0,31	9,06±1,36
Catalase (nmol/ g de proteína)	973,16±126,19	1084,37±99,50	1039,03±75,14	1064,38±235,38
GSH-Px (nmol/mg de proteína)	5,90±2,44	5,37±1,50	6,55±1,26	5,80±0,54

Valores expressos como média ± desvio-padrão (p<0,05).

Tabela 11. Concentrações de glutathiona reduzida (GSH), glutathiona oxidada (GSSG), relação GSH/GSSG e atividade da enzima glutathiona redutase (GSH-Rd) no miocárdio de animais alimentados com ração padrão sem suplementação (PC), que receberam azeite de oliva (PAO), oleuropeína (PO) e ácido cafêico (PAC)

Variável	Suplementação			
	PC	PAO	PO	PAC
GSH (nmol/mg prot)	18,41±2,43	17,36±2,18	18,41±1,89	15,92±0,47
GSSG (nmol/mg prot)	0,48±0,06	0,44±0,04	0,49±0,06	0,42±0,10
GSH/GSSG (nmol/mg prot)	38,62±2,01	39,03±3,43	37,47±2,76	40,48±8,24
GSH-Rd (nmol/mg prot)	0,176±0,091	0,251±0,038	0,268±0,161	0,182±0,048

Valores expressos como média ± desvio-padrão (p<0,05).

Tabela 12. Concentrações de glutathiona reduzida (GSH), glutathiona oxidada (GSSG), relação GSH/GSSG e atividade da enzima glutathiona redutase (GSH-Rd) no miocárdio de animais alimentados com ração hipercalórica sem suplementação (HC), que receberam azeite de oliva (HAO), oleuropeína (HO) e ácido cafêico (HAC)

Variável	Suplementação			
	HC	HAO	HO	HAC
GSH (nmol/mg prot)	17,89±0,52	17,31±0,53	16,78±1,62	5,11±2,27 ^{abc}
GSSG (nmol/mg prot)	0,42±0,11	0,39±0,08	0,37±0,04	0,38±0,13
GSH/GSSG (nmol/mg prot)	44,28±4,89	44,99±8,65	45,69±2,20	39,76±5,72
GSH-Rd (nmol/mg prot)	0,353±0,145	0,311±0,043	0,324±0,075	0,277±0,084

Valores expressos como média ± desvio-padrão (p<0,05). ^aDiferença significativa em relação ao grupo HC;

^bDiferença significativa em relação ao grupo HAO; ^c Diferença significativa em relação ao grupo HO.

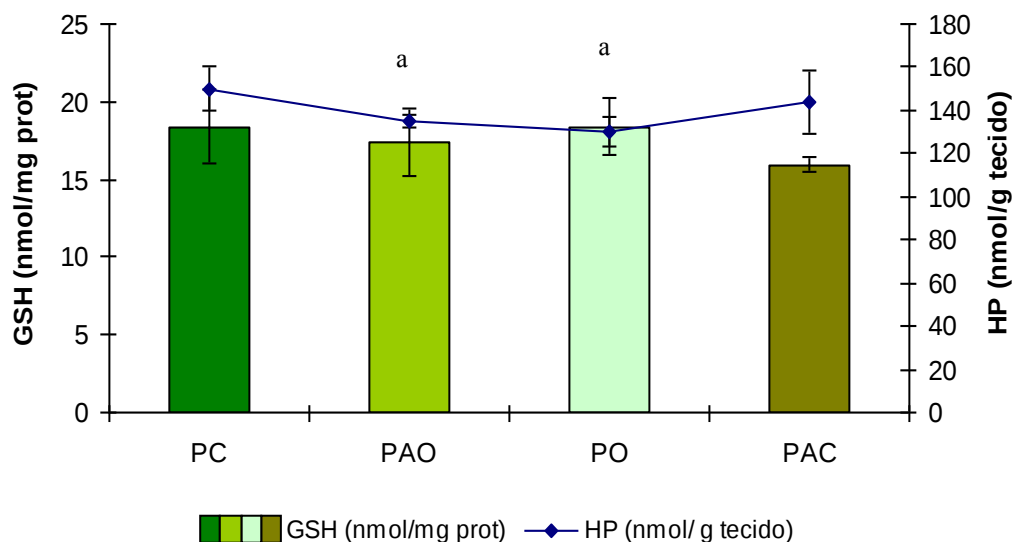


Figura 2. Concentração de glutathiona reduzida (GSH) e de hidroperóxido de lipídio (HP) no miocárdio de animais mantidos com ração padrão sem suplementação (PC), que receberam azeite de oliva (PAO), oleuropeína (PO) e ácido cafêico (PAC). ^aDiferença significativa em relação ao grupo PC.

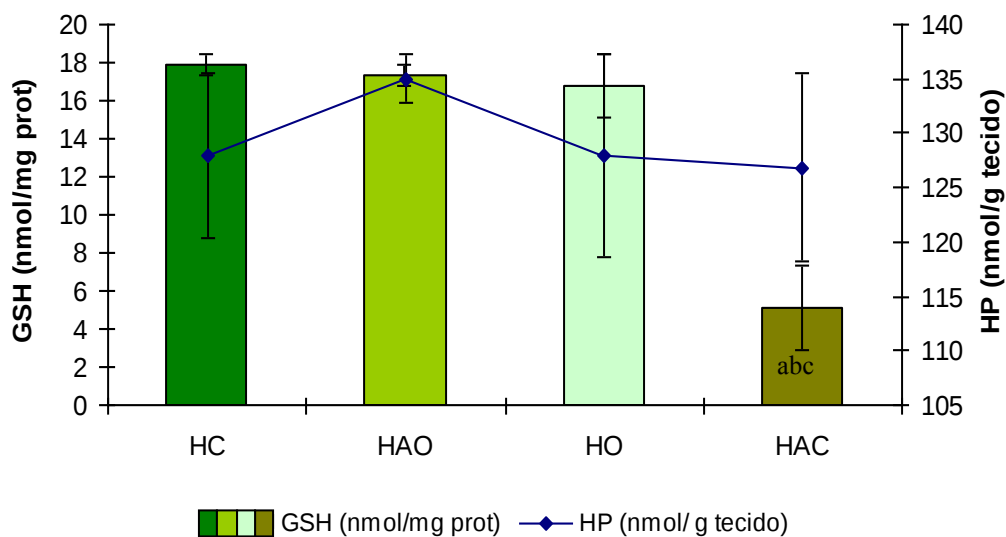


Figura 3. Concentração de glutathiona reduzida (GSH) e de hidroperóxido de lipídio (HP) no miocárdio de animais alimentados com ração hipercalórica sem suplementação (HC), que receberam azeite de oliva (HAO), oleuropeína (HO) e ácido cafêico (HAC). ^aDiferença significativa em relação ao grupo HC; ^bDiferença significativa em relação ao grupo HAO; ^c Diferença significativa em relação ao grupo HO.

DISCUSSÃO

Vários modelos de obesidade experimental têm sido propostos para investigar aspectos metabólicos envolvendo suas causas e conseqüências (Novelli et al., 2002; Faine et al., 2002; Diniz et al., 2005; Nascimento et al., 2008; Jurdak & Kanarek, 2009), podendo também apresentar importante participação no desenvolvimento de procedimentos efetivos para sua prevenção e tratamento.

Como esperado, animais do grupo HC apresentaram obesidade, evidenciada pela elevação no peso final, superfície corporal e IMC, em relação aos animais mantidos com ração padrão (Tabela 3). Desde que o consumo alimentar não diferiu significativamente nos grupos analisados, as alterações morfométricas observadas nos animais do grupo HC foram associadas à elevada caloria da dieta hipercalórica (341,10 kcal/100g), comparada à dieta padrão (275,89 kcal/100g) (Tabela 2). Resultados concordantes foram obtidos por Kim e colaboradores (2005), que observaram elevação no peso corporal em ratos, após oito semanas de tratamento, com dieta rica em lipídios. A indução de obesidade foi evidenciada em animais mantidos com dieta rica em sacarose (Souza et al., 2008).

De maneira geral, quando a energia ingerida excede o gasto energético, o excesso de energia é depositado como lipídios nos adipócitos, caracterizando a obesidade (Warhlich & Dos Anjos, 2001; Iossa et al., 2002; Lopes et al., 2004). Entretanto, tem sido demonstrado que a variação nos componentes da dieta, além do conteúdo calórico, influencia consideravelmente o ganho de peso (Acheson, 2004) e os parâmetros metabólicos a ela associados (Faine et al., 2002; Diniz et al., 2008a).

De fato, a conversão de carboidratos em lipídios é um processo anabólico que só ocorre após reposição dos estoques teciduais de glicogênio, indicando que mais energia é necessária para o ganho de peso a partir de carboidratos que a partir de lipídios (Astrup & Raben, 2000). Portanto, diferenças nos componentes da dieta desempenham importante papel na regulação do peso corporal e na patogênese da obesidade, desde que utilizam diferentes vias metabólicas para liberação de energia (Weyer, 2000; Diniz et al., 2008).

Calorimetria indireta é uma maneira não invasiva de determinar a taxa de utilização de substratos energéticos na presença de O₂ e liberação de CO₂, pela análise do ar inspirado e expirado pelos pulmões (Diener, 1997; Mourão et al., 2005). Constitui um método prático para identificar a natureza e quantidade de substratos energéticos que estão sendo

metabolizados pelo organismo. O VO_2 corresponde a quantidade de oxigênio consumido, o VCO_2 a quantidade de dióxido de carbono produzido por grama de substrato oxidado e o quociente respiratório ($\text{QR} = \text{VCO}_2/\text{VO}_2$) é empregado para determinar o tipo de substrato que está sendo oxidado pelo organismo (Labayen et al., 1999).

Embora a calorimetria indireta possa ser utilizada na determinação das alterações na oxidação de componentes da dieta que acompanham a obesidade (Novelli et al., 2010), existem inúmeras controvérsias sobre a associação entre taxa metabólica basal (TMB) e obesidade. Considerando que além da tiroxina sérica, um importante fator determinante da TMB é a gordura corporal, a TMB pode ser um fator de risco para o desenvolvimento de obesidade (Johnstone et al., 2005). Indivíduos obesos apresentaram redução de 3 a 5% na TMB (Astrup et al., 1999). Por outro lado, tem sido relatado que o gasto energético total tende a aumentar com o peso corporal (Hill et al., 2006). Contudo, sabe-se que a relação entre massa adiposa/ massa magra está aumentada em obesos e que o tecido adiposo é metabolicamente menos ativo (Mela & Rogers, 1998).

Estudos envolvendo perda de peso demonstraram que a TMB é menor após a retirada de uma dieta hipercalórica, indicando que a redução na TMB pode contribuir com a diminuição na perda de peso, após períodos de restrição calórica (Weinsier et al., 2000). Deste modo, parece existir uma resposta adaptativa na TMB, que predispõe indivíduos ao ganho de peso após períodos de intensa restrição calórica (Francischi et al., 2000; Hill et al., 2006). A redução na ingestão alimentar reduziu a TMB em humanos (Masoro, 2005).

O mecanismo pelo qual dieta rica em lipídios induz obesidade não está claro, porém exposição prolongada a este tipo de dieta pode aumentar o ganho de peso e a adiposidade, tanto em animais quanto em humanos (Portillo et al., 1999). O efeito da dieta rica em lipídios parece estar associado com a redução do gasto energético, que acarreta a deposição de lipídios (Rosado et al., 2001). Outra característica da indução de obesidade em animais, por dieta rica em lipídios é diminuição da atividade simpática, que resulta em diminuição na TMB. Porém não está claro como a redução da atividade simpática atua no sistema nervoso central durante o desenvolvimento da obesidade (Kim et al., 2005).

Estudos prospectivos (Buscemi et al., 1998) demonstraram que uma taxa metabólica basal relativamente baixa e um quociente respiratório alto, isto é, uma baixa taxa de

oxidação de lipídios em relação aos carboidratos (Weyer et al, 2000), como observado nos animais do grupo HC (Tabela 4) são preditores do ganho de peso.

O elevado balanço energético nos animais com dieta hipercalórica (Tabela 4) indicou que a energia ingerida excedeu o gasto energético para as funções vitais (TMB), disponibilizando maior quantidade de energia que os animais mantidos com dieta padrão, para ser convertida em estoque de lipídios. Deste modo, o aumento de peso em HC ocorreu devido à redução na TMB e elevação no balanço energético, ou seja, o organismo utilizou menor quantidade de energia ingerida para suas atividades basais, disponibilizando-a para o estoque no tecido adiposo.

De fato houve redução no consumo de oxigênio e no consumo de oxigênio ajustado ao peso final e superfície corporal (Strohl et al., 1997; Seiva et al., 2009), corroborando com a redução na oxidação lipídica nos animais do grupo HC (Tabela 4). As diminuições na TMB (Kunz et al 2000), na oxidação de lipídios (Cooling & Blundell, 1998) e na relação VO_2 /superfície corporal (Bray, 1969) foram associadas à obesidade no grupo HC.

A evidência de oxidação de carboidratos nos animais do grupo HC, no estado de jejum, foi associada ao estoque de glicogênio hepático nestes animais (Tabela 4). Desde que a influencia da alimentação é vista no estado pos absortivo, ou alimentado, o valor de QR no jejum reflete o estoque tecidual de glicogênio (Labayen et al., 1999).

A despeito da ausência de alterações significantes pela administração de azeite de oliva e seus componentes, nos parâmetros morfométricos estudados, (peso corporal final, superfície corporal e IMC) (Tabelas 5 e 6), interessantes efeitos foram observados nos parâmetros calorimétricos. Este fato corrobora o conceito que independente do peso corporal e da energia ingerida, alteração nos componentes da dieta pode induzir modificações no metabolismo oxidativo. Faine e colaboradores (2004; 2006) demonstraram que administração de azeite de oliva não alterou o peso final de animais mantidos com dieta padrão.

Não houve alteração significativa no balanço energético, demonstrando que a elevação na TMB, nos animais dos grupos PAO e PAC, bem como a redução na TMB no grupo PO foi insuficiente para alterar a quantidade de energia disponível para estoque lipídico (Tabela 7).

A redução no QR indica maior utilização de lipídios como substrato energético (Wahrlich & Anjos, 2001; Schneider & Meyer, 2005). A quantidade de oxigênio consumida, em relação ao dióxido de carbono produzido pela oxidação de substratos, varia de acordo com o teor de oxigênio do nutriente. Ácidos graxos ($\text{CH}_3\text{-(CH}_2\text{)}_n\text{-COOH}$), apresentam baixa concentração de oxigênio por molécula, em comparação com carboidratos ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$). Deste modo, os tecidos necessitam mais oxigênio, quando utilizam lipídios, e não carboidrato como fonte energética (Nelson & Cox, 2006). Administração de azeite de oliva aumentou significativamente a oxidação lipídica nos animais mantidos com dieta padrão em condições de jejum, fato associado à elevação no VO_2 e a redução no QR. Embora em menores proporções, estes efeitos também foram observados nos animais que receberam suplementação com ácido cafeico.

A relação VO_2 com a massa corporal e VCO_2 com a massa corporal permite comparar consumo de oxigênio e produção de dióxido de carbônico em diferentes espécies e tecidos animais, desde que estas relações refletem especificamente as trocas gasosas associadas à oxidação de nutrientes por unidade de massa (Brito, 2004).

A elevação na oxidação de carboidratos foi acompanhada pela redução na oxidação lipídica nos animais do grupo PO em relação aos dos grupos PC e PAO, desde que houve redução no VO_2 , no $\text{VO}_2/\text{peso final}$ e elevação no QR e no QR ajustado tanto ao peso final, como à superfície corporal (Tabela 7). De fato, a modificação na seleção de nutrientes para oxidação é controlada pelo consumo de carboidratos, desde que quando a oxidação de carboidratos é elevada, ocorre redução na oxidação lipídica, pois a atividade da enzima triacilglicerol lipase do tecido adiposo é inibida pela ação da insulina (DeLany & West, 2000; Voet et al., 2008).

Vários mecanismos podem estar associados à elevação na oxidação de carboidratos pela suplementação com oleuropeína no estado de jejum. Oleuropeína, sendo um polifenol pode apresentar efeitos ativadores na neoglicogenese e glicogeniogenese, decorrentes da melhora na resposta insulínica, induzindo maior captação de glicose da dieta e seu melhor aproveitamento como estoque de glicogênio (Rocha et al., 2009). Oleuropeína aumentou a resposta insulínica, a captação de glicose sanguínea, reduzindo a glicemia em coelhos diabéticos (Al-Azzawie et al., 2006). O valor do quociente respiratório depende da mistura de combustíveis que está sendo metabolizada. Para carboidratos o QR é próximo a 1,

porque o número de moléculas de CO₂ produzidas é proporcional ao número de moléculas de O₂ consumidas (Rosado & Monteiro, 2001).

Nos grupos com dieta hipercalórica, as alterações calorimétricas induzidas pelas suplementações com azeite e seus compostos fenólicos foram mais evidentes em condições de jejum (Tabela 8), desde que nestas condições, não existe a interferência dos processos de digestão e absorção (Commerford et al., 2000). Após alimentação ocorre rápida elevação no QR, indicando a mudança do metabolismo de lipídios e proteínas para o de carboidratos (Keenan et al., 1996; Faine et al., 2002; Faine et al., 2003). A redução na oxidação de carboidratos nos animais dos grupos HAO, HO e HAC foi acompanhada pela elevação na oxidação de lipídios. Desde que a oxidação de ácidos graxos requer maior quantidade de oxigênio, houve significativa redução no QR, no QR ajustado ao peso final e superfície corporal (Tabela 8).

Vários mecanismos podem estar associados à elevação na oxidação lipídica pelo azeite de oliva e seus componentes fenólicos. A absorção e a liberação de componentes da dieta na corrente sanguínea, realizada pelos enterócitos intestinais, envolvem um processo complexo que é influenciado pelo estado fisiológico destas células. Situação de persistente desequilíbrio redox, como ocorre com a elevada ingestão de sacarose tem sido associada a inúmeras alterações gastrointestinais. Nestas condições ocorre comprometimento entre a absorção e a liberação sanguínea de compostos dietéticos pelos enterócitos, havendo um desequilíbrio no ajuste metabólico na utilização da glicose, incorporada pelo sistema de co-transporte Na⁺-glicose (Rivabene et al., 2001). Azeite de oliva e seus compostos fenólicos modulando sinalizadores celulares (De la Lastra et al., 2002; Benkhalti et al., 2002; Wahle et al., 2004) e a atividade de peptidases (Polzonetti et al., 2004), permitiriam a manutenção do equilíbrio entre a digestão e captação de carboidratos da dieta.

Os efeitos benéficos do azeite e notadamente do composto fenólico ácido caféico na calorimetria e oxidação de lipídios foram refletidos no tecido cardíaco. Independente do tipo de dieta é evidente que a suplementação nutricional com azeite de oliva induziu modificação no substrato usado para obtenção de energia, elevando consideravelmente a oxidação de lipídios.

A manutenção no peso do coração, nas relações entre peso do coração e peso corporal, bem como no conteúdo protéico no miocárdio indicou, além do adequado suprimento de

proteínas nas duas rações utilizadas, a ausência de hipertrofia cardíaca (Burneiko et al., 2004).

Evidências recentes sobre lipotoxicidade indicam que o acúmulo de lipídios no tecido cardíaco pode constituir importante alvo para a ação de radicais livres e formação de hidroperóxidos (Schaffer, 2003). Células de tecido não adiposo têm capacidade limitada para estocar lipídios e, quando esta capacidade é excedida, resulta em disfunção celular (Lopaschuk et al., 2007). Tem sido observada estreita relação entre o acúmulo de lipídios e o aparecimento de cardiopatias (Lewin & Coleman, 2003), decorrente da elevação na captação de lipídios pelo tecido cardíaco em detrimento de sua oxidação (Finck et al., 2003). Lipídios acumulados no tecido cardíaco são passíveis de sofrerem a ação de espécies radicalares de oxigênio, induzindo estresse oxidativo (Stanley et al., 2005). O estresse oxidativo e lipotoxicidade com elevação no HP pode afetar a função miocárdica de maneira similar ao dano induzido pela isquemia e subsequente reperfusão, incluindo perda celular de K^+ , depleção de ATP e da função contrátil (Mallet et al., 2005).

A elevada oxidação de lipídios nos animais que receberam azeite de oliva e seus compostos fenólicos foi associada à menor deposição de lipídio e menor estresse oxidativo miocárdico. De fato, houve redução significativa na concentração de hidroperóxido de lipídio em animais que receberam azeite de oliva e oleuropeína (Tabela 9).

Embora tanto o azeite como oleuropeína tenham reduzido HP, as respostas antioxidantes nos dois grupos experimentais pode ter ocorrido através de diferentes mecanismos.

O sistema antioxidante compreende a superóxido dismutase, capaz de dismutar o radical superóxido a peróxido de hidrogênio, que é posteriormente convertido a água pela glutathione peroxidase, ou pela catalase. As substâncias antioxidantes totais (SAT) incluem os antioxidantes não enzimáticos, lipofílicos e aquosos (Novelli, 2005).

A elevação na SAT foi associada a atividade antioxidante do azeite de oliva e da oleuropeína, devido a capacidade de sequestrarem radicais livres (Pannala et al., 1997; Pari & Velmurigan, 2009), atividade esta dependente do número de radicais hidroxila da molécula fenólica (Hu et al., 1995). Oleuropeína e hidroxitirosol, sequestradores de radicais livres, possuem atividade antioxidante igual ou superior a de outros antioxidantes

conhecidos, como a vitamina E, C, e hidroxitolueno butilado (BHT) (Visioli & Galli, 1998, Mateos et al., 2003).

Tem sido demonstrado que o azeite de oliva pode interferir na absorção de ferro, reduzindo sua concentração sérica (Reznick & Packer, 1994). Considerando a importância do ferro na indução de espécies radiculares e indução do estresse oxidativo, a redução na captação deste metal e na sua concentração sérica pode constituir um mecanismo alternativo para a redução da concentração do HP, nos animais que receberam azeite de oliva (Chetty et al., 1999; Faine et al., 2006).

Outro possível mecanismo seria a atuação direta do composto fenólico oleuropeína nos radicais hidroxilas, neutralizando e estabilizando desta forma esse radical (Cai et al., 2006).

Embora a suplementação nutricional com ácido cafeico tenha reduzido significativamente a atividade da enzima antioxidante SOD, não foram observadas alterações nas concentrações de HP no miocárdio dos animais mantidos com ração padrão, indicando atividade antioxidante direta do ácido cafeico sobre os radicais superóxido (Tabela 9).

Vários tipos de antioxidantes têm sido descritos (Novelli, 2005), aqueles que inibem as reações de geração de radicais livres, considerados antioxidantes de prevenção; os que impedem ou interrompem a cadeia de propagação da lipoperoxidação; os que atuam especificamente sobre o oxigênio “singlet” $^1\text{O}_2$ forma excitada do oxigênio molecular; os que elevam a atividade de antioxidantes endógenos, aqui incluindo os ativadores de enzimas antioxidantes; os agentes redutores que convertem hidroperóxido em produtos estáveis; os quelantes metálicos que convertem metais pro-oxidantes em derivados estáveis e finalmente os inibidores de enzimas pro-oxidantes, como as lipoxigenases (Pokorny, 2007).

Atualmente, há grande número de métodos laboratoriais para determinar o estado oxidante/antioxidante. Entre os propostos como biomarcadores do estresse oxidativo estão a determinação de equivalentes de malondialdeído, a concentração de hidroperóxido de lipídio, a quantificação de compostos antioxidantes, relação entre glutatona reduzida e oxidada (GSH/GSSG), atividade das enzimas antioxidantes, marcadores da oxidação protéica e de ácido desoxirribonucléico (DNA) (Novelli, 2005). Estudo in vitro realizado com tirosol e hidroxitirol, compostos fenólicos do azeite de oliva, comparando efeitos

protetores na defesa antioxidante intracelular, evidenciou efeitos benéficos através da inibição da oxidação de lipoproteína de baixa densidade, porém insuficiente defesa celular antioxidante da GSH (Di Benedetto et al., 2007). Visioli e colaboradores (2009) observaram aumento significativo dos níveis de glutathione total em 98 voluntários após a ingestão de 2 mL de resíduo comercial de azeitona, porém sem evidências de melhora na capacidade antioxidante do plasma e na relação GSH/GSSG. De fato, na Tabela 11 pode-se evidenciar que azeite de oliva e seus fenóis não apresentaram atividades antioxidantes através do sistema glutathione no miocárdio de animais alimentados com dieta padrão.

A elevada oxidação de lipídios foi associada à menor deposição de lipídio e menor estresse oxidativo miocárdico, sendo fator determinante na redução da concentração de hidroperóxido de lipídio nos animais mantidos com dieta padrão, suplementados com azeite de oliva e oleuropeína (Tabela 9). Estes fatos podem explicar a manutenção nas concentrações de GSH, GSSG, poder redutor e atividade da glutathione redutase no miocárdio desses animais (Figura 2).

Não há dúvidas que azeite de oliva e seus fenóis apresentaram atividades antioxidantes em animais mantidos com dieta padrão. Entretanto, tanto o azeite como os compostos fenólicos utilizados não indeferiram no sistema glutathione miocárdico em animais mantidos com dieta padrão.

GSH é substrato ou cofator de diversas enzimas protetoras, como a glutathione peroxidase (GSH-Px) e a glutathione redutase (GSH-Rd) (Giustarini et al., 2003; Suh et al., 2004), além de atuar como antioxidante direto neutralizando o radical $\text{OH}^\bullet$, restaurando moléculas alteradas pela doação de hidrogênio, promovendo a redução de peróxidos e mantendo grupos tióis das proteínas no estado reduzido. A redução do GSSG a GSH é catalisada pela enzima GSH-Rd, que é dependente de NADPH, como fonte de elétrons (Novelli, 2005). A relação entre GSH e GSSG é um marcador representativo da capacidade antioxidante das células. Há várias situações clínicas associadas com a redução dos níveis de GSH, como diabetes, doença coronariana, hipertensão, processo inflamatório, câncer e imunodeficiência, que podem resultar em uma redução do potencial redox da célula e um efeito sobre os fatores de transcrição que regulam a síntese de citocinas (Exner et al., 2000).

Evidências recentes têm demonstrado que o estresse oxidativo pode causar mudanças no estado redox de diferentes tecidos, aumentando a concentração de GSSG. Elevação nas

concentrações de GSSG no interior das células, ou no fluxo de GSSG a partir de células teciduais para o sangue, são indicadores de estresse oxidativo.

Nota-se na Tabela 12, que nos animais que receberam dieta hipercalórica e suplementação com ácido cafeico (HAC), a concentração de GSH foi reduzida, a despeito da manutenção da relação GSH/GSSG, impedindo deste modo a alteração na concentração de HP no miocárdio destes animais (Figura 3). Parece, portanto provável que, a suplementação com ácido cafeico foi menos efetiva como antioxidante, em relação aos animais que receberam dieta hipercalórica suplementados com oleuropeína e azeite de oliva, nos quais não foram necessárias alterações significantes no sistema glutathiona (Figura 3). A peroxidação lipídica é subproduto da oxidação de ácidos graxos e a depleção protetora de GSH precede a oxidação de lipídios e aterogênese *in vivo* (Biswas et al., 2005).

Houve, entretanto, redução na concentração de hidroperóxido de lipídio no miocárdio dos animais dos grupos PAO e PO (Figura 2). O estresse oxidativo e lipotoxicidade com elevação no HP pode afetar a função miocárdica de maneira similar ao dano induzido pela isquemia e subsequente reperfusão, incluindo perda celular de K^+ , depleção de ATP e diminuição da função metabólica (Mallet et al., 2005). Estudo realizado com coelhos que receberam dieta normolipídica e acrescida de azeite de oliva mostrou efeito benéfico da administração de azeite de oliva na diminuição na concentração de hidroperóxido de lipídios no miocárdio destes animais (De La Cruz et al., 2000).

Em conclusão, os resultados obtidos demonstraram que dieta hipercalórica induziu obesidade nos animais, através da elevação QR e diminuição na TMB, na oxidação de lipídios e na relação VO_2 /superfície corporal. A análise calorimétrica demonstrou que suplementação nutricional com azeite de oliva induziu modificação no substrato usado para obtenção de energia e seu efeito benéfico foi associado a seu composto fenólico ácido cafeico.

A análise do sistema glutathiona permitiu evidenciar que azeite de oliva e seus fenóis não induziram alterações significantes nos animais mantidos com dieta padrão. Em condições de dieta hipercalórica, a suplementação com ácido cafeico foi menos efetiva como antioxidante, em relação a suplementação com oleuropeína e azeite de oliva, nos quais não foram evidenciadas alterações significantes no sistema glutathiona.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS *

- Acheson KJ. Carbohydrate and weight control: where do we stand? *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2004;7:485-92.
- Aebi H. Catalase. In: Bergmeyer HU, editor. *Methods of enzymatic analysis* Academic. New York: Academic Press; 1974. p.673-7.
- Al-Azzaweie HF, Saiel M, Alhamdani S. Hypoglycemic and antioxidant effect of oleuropein in alloxan-diabetic rabbits. *Life Sci*. 2006;78:1371-7.
- Aldini G, Piccoli A, Beretta G, Morazzoni P, Riva A, Marinello C, et al. Antioxidant activity of polyphenols from solid olive residues of c.v. coratina. *Fitoterapia*. 2006;77:121-8.
- Astrup A, Gotzche PC, Van de Werken K. Meta-analysis of resting metabolic rate in formerly obese subjects. *Am J Clin Nutr*. 1999;69:1117-22.
- Astrup A, Raben A. Sugar as a slimming agent ? *Br J Nutr*. 2000;84:585-7.
- Baynes JW, Dominiczak MH. *Bioquímica Médica*. 2a ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2007.
- Benkhalti F, Prost J, Paz E, Perez Jimenez F, El modafar C, Boustani E. Effects of feeding olive oil or their polyphenols on lipid of rat liver. *Nutr Res*. 2002;22:1067-75.
- Betik AC, Hepple RT. Determinations of VO_{2max} decline with aging: an integrated perspective. *Appl Physiol Nutr Metab*. 2008;33:130-40.

* International Committee of Medical Journal Editors. Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journal: sample references.[homepage on the Internet]. Bethesda: U.S. National Library of Medicine; 2003[last updated 2009 May 14]. Available from:http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

National Library of Medicine. List of journals indexed in Index Medicus. Washington: NLM; 2007. 325p.

Biswas SK, Newby DE, Rahman I, Megson IL. Depressed glutathione synthesis preceds oxidative stress and atherogenesis in Apo-E(-/-) mice. *Biochem Biophys Res Comm.* 2005;338:1368-73.

Bondia-Pons I, Schoroder H, Covas MI, Castellore AL, Kaikkonen J, Poulsen HE, et al. Moderate consumption of olive oil by healthy europa men reduces systolic blood pressure in non-Mediterranean participants. *J Nutr.* 2007;137:84-7.

Bray GA. Oxygen consumption of genetically obese rats. *Experientia.* 1969;23:1100-1.

Brito HFV. Determinação da taxa metabólica basal em *Dasyprocta azarae* por calorimetria indireta [dissertação]. Curitiba (PR): Universidade Federal do Paraná; 2004.

Burneiko RC, Diniz YS, Faine LA, Gaklhardi CM, Padovani CR, Novelli ELB, et al. Impact of the Training Program on Lipid Profile and Cardiac Health. *Biol Res.* 37;2004:53-9.

Buscemi S, Di Magio O, Blunda G, Maneri R, Verga S, Bompiani GD. A low resting metabolic rate is associated to body weight gain in adult Caucasian subjects: preliminary results of a 8-10 year longitudinal study. *Int J Obesity.* 1998;22 Suppl 1:S75.

Cai YZ, Sun M, Xing J, et al. Structure-radical scavenging activity relationships of phenolic compounds from traditional Chinese medicinal plants. *Life Sci.* 2006;78(25):2872-88.

Campbell MK, Farrell SO. *Boiquímica - Bioquímica metabólica*. 5a ed. São Paulo: Thomson Learning; 2008. p.619-77.

Carluccio MA, Siculella L, Ancora MA, Massaro M, Scoditti E, Storelli C, et al. Olive oil and red wine antioxidant polyphenols inhibit endothelial activation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003;23:622-9.

Carmona MC, Lefebvre P, Lefebvre B, Galinier A, Benani A, Jeanson Y, et al. Coadministration of coenzyme Q prevents rosiglitazone-induced adipogenesis in ob/ob mice. *Int J Obesity*. 2009;33:204-11.

Casalino E, Calzaretti G, Sblano C, Landriscina V, Tecce MF, Landriscina C. Antioxidant effect of hidrxytyrosol (DPE) and Mn^{2+} in liver of cadmium-intoxicated rats. *Comp Biochem Physiol Part C*. 2002;133:625-32.

Chetty KN, Conway R, Harris KC, Dorsey WC, Hill D, Chetty S, et al. Dietary supplementation with olive oil influences iron concentrations in rats. *Nutr Res*. 1999;19:1665-70.

Commerford SR, Pagliassotti MJ, Melby CL, Wei Y, Gayles EC, Hill JO. Fat oxidation, lipolysis, and free fatty acid cycling in obesity-prone and obesity-resistant rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2000;279:875-85.

Cooling J, Blundell J. Differences in energy expenditure and substrate oxidation between habitual high fat and low fat consumers (phenotypes). *Int J Obes*. 1998;22:612-8.

Costa NMB, Walker AF, Low AG. The effect of graded inclusion of baked beans (*Phaseolus vulgaris*) on plasma and liver lipids in hypercholesterolaemic pigs given a Western - type diet. *Br J Nutr*. 1993;70:515-24.

Covas MI, Nyyssonen K, Poulsen HE, Kaikkonen J, Zunft HJ, Kiesewetter H, et al. EUROLIVE Study Group. The effect of polyphenols in olive oil on heart disease risk factors: a randomized trial. *Ann Intern Med*. 2006;145:333-41.

Covas MI. Bioactive effects of olive oil phenolic compounds in humans: reduction of herat disease factors and oxidative damage. *Inflammopharmacology*. 2008;16:216-8.

De La Cruz JP, Quintero L, Villalobos MA, De La Cuesta FS. Lipid peroxidation and glutathione system in hyperlipidemic rabbits: influence of olive oil administration. *Biochim Biophys Acta*. 2000;1485:36-44.

De la Lastra AC, Barranco MD, Martin MJ, Herrerias J, Motilva V. Extra-virgen olive oil enriched diets reduce indomethacin induced gastric oxidative damage in rats. *Digest Dis Sci*. 2002;47:2783-90.

Delany JP, West DB. Changes in body composition with conjugated linoleic acid. *J Am Coll Nutr*. 2000;19:487S-93S.

Devlin MD. Manual de Bioquímica com correlações clínicas. 6a ed. São Paulo: Edgard Blucher; 2007.

Di Benedetto R, Vari R, Scazzocchio B, Filesi C, Santangelo C, Giovannini C, et al. Tyrosol, the major extra virgin olive oil compound, restored intracellular antioxidant defences in spite of its weak antioxidative effectiveness. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2007;17:535-45.

Diener JRC. Calorimetria indireta. *Rev Assoc Med Bras*. 1997;43:245-53.

Diniz YS, Burneiko RC, Seiva FRF, Almeida FQ, Galhardi CM, Novelli Filho JLVB, et al. Diet compounds, glycemic index and obesity-related cardiac effects. *Int J Cardiol*. 2008;124:592-9.

Diniz YS, Faine LA, Galhardi CM, Rodrigues HG, Ebaid GM, Burneiko RC, et al. Monosodium glutamate in standard and high-fiber diets: metabolic syndrome and oxidative stress in rats. *Nutrition*. 2005;21:749-55.

Diniz YS, Santos PP, Assalin HB, Souza GA, Rocha KKHR, Ebaid GM, et al. Conjugated linoleic acid and cardiac health: oxidative stress and energetic metabolism in standard and sucrose-rich diet. *Eu J Pharmacol*. 2008;579:318-25.

- Dogan M. Neohesperidin DC in food products. *Proc ICNP*. 2002;190-5.
- Dominiczak M. *Metabolismo - Série carne e osso*. Rio de Janeiro: Elsevier; 2007.
- Ebaid GMX, Faine LA, Diniz YS, Rodrigues HG, Galhardi CM, Ribas BO, et al. Effects of digitonin on hyperglycaemia and dyslipidemia induced by high-sucrose intake. *Food Chem Toxicol*. 2006;44:293-9.
- Esposito LA, Melov S, Panov A, Cottrell B, Wallace B. Mitochondrial disease in mouse results in increased oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci*. 1999;96:4820-5.
- Ewing JF, Janero Dr. Microplate superoxide dismutase assay employing a nonenzymatic superoxide generation. *Anal Chem*. 1995;232:243-8.
- Exner R, Wessner B, Manhart N, Roth E. Therapeutil potential of Glutathione. *Wien Klin Wochenschr*. 2000;14:610-6.
- Faine LA, Cicogna AC, Diniz YS, Almeida JA, Burneiko RC, Rodrigues HG, et al. Dietary restriction: metabolic shifting for cardiac health. *J Nutr Environ Med*. 2003;13:25-31.
- Faine LA, Diniz YS, Galhardi CM, Rodrigues HG, Burneiko RC, Santana LS, et al. Synergistic action of olive oil supplementation and dietary restriction on serum lipids and cardiac antioxidant defences. *Can J Physiol Pharmacol*. 2004;82:969–75.
- Faine LA, Rodrigues HG, Galhardi CM, Ebaid GMX, Diniz YS, Padovani CR, et al. Effects of olive oil and its minor constituents on serum lipids, oxidative stress, and energy metabolism in cardiac muscle. *Can J Physiol Pharmacol*. 2006;84:239-45.
- Faine LA, Diniz YS, Almeida JA, Novelli ELB, Ribas BO. Toxicity of ad libitum overfeeding: effects on cardiac tissue. *Food Chem Toxicol*. 2002;40:663-8.
- Finck BN, Han X, Vourtois M, Aimond F, Nerbonne JM, Kovacs A, et al. A critical role for PPAR-mediated lipotoxicity in the pathogenesis of diabetic cardiomyopathy: modulation by dietary fat content. *Proc Natl Acad Sci*. 2003;100:1226-31.

Fitó M, Cladellas M, de la Torre R, Mart J, Alcantara M, Pujadas-Bastardes M, et al. Antioxidant effect of virgin olive oil in patients with stable coronary heart disease: a randomized, crossover, controlled clinical trial. *Atherosclerosis*. 2005;181:140-58.

Fitó M, De la Torre R, Albaladejo MF, Khymenetz O, Marrugat J, Covas MI. Bioavailability and antioxidant effects of olive oil phenolic compounds in humans: a review. *Ann Inst Super Sanità*. 2007;43:375-81.

Francischi RMP, Pereira LO, Freitas CS, Klopper M, Santos RC, Vieira P, et al. Obesidade: atualização sobre sua etiologia, morbidade e tratamento. *Rev Nutr*. 2000;13:17-28.

Friedman MI. Fuel partitioning and food intake *Am J Clin Nutr*. 1998;67:513-8.

Gimeno E, Fito M, Raventos RM, Covas MI, Casals I, Lopez-Sanches MC. Effect of ingestion of virgin olive oil on human LDL composition. *Eur J Clin Nutr*. 2002;56:114-20.

Giustarine D, Dalle-Donne I, Colombo R, Milazani A, Rossi R. An improved HPLC measurement for GSH and GSSG in human blood. *Free Radic Biol Med*. 2003;35:1365-72.

Gómez-Alonso S, Salvador MD, Fregapane G. Phenolic compounds profile of cornicabra virgin olive oil. *J Agric Food Chem*. 2002;50:6812-7.

Gutman RA, Basilico MZ, Bernal CA, Chicco A, Lombardo YB. Long-term hypertriglyceridemia and glucose intolerance in rats fed chronically na isocaloric sucrose-rich diet. *Metabolism*. 1987;36:1013-20.

Hill JO, Melanson EL, Wyatt HT. Dietary fat Intake and regulation of energy balance: Implications for obesity. *J Nutr*. 2000;130:284S–8S.

Hill JO. Understanding and addressing the epidemic of obesity: an energy balance perspective. *Endocr Rev*. 2006;27:750-61.

Hill RT, Long CNH. Muscular exercise, lactic acid and the supply and utilization of oxygen. *Proc R Soc Ser B*. 1924;97:155-76.

Hillestrom PR, Covas MI, Poulsen HE. Effect of dietary olive oil on urinary excretion of etheno-DNA adducts. *Free Radic Biol Med*. 2006;41:1133-8.

Horii A, McCue P, Shetty K. Enhancement of seed vigour following insecticide and phenolic elicitor treatment. *Bioresource Technology*. 2006;98:623-32.

Hu JP, Calome M, Lasure A, Bruyne T, Pieters L, Vlietinck A, et al. Structure activity relationship of flavonoids with Superoxide scavenging activity. *Biol Trace Elemen Res*. 1995;47:327-31.

Iossa S, Mollica MP, Lionetti L, Crescenso R, Botta M, Barletta A, et al. Acetyl carnitine supplementaion differently influences nutrient partitioning, serum lipid concentration and skeletal muscle mitochondrial respiration in young and old rats. *J Nutr*. 2002;132:638-42.

Jiang ZY, Woollard AC, Wolf S. Lipid hydroperoxide measurement by oxidation of Fe^{2+} in the presence of xylenol orange. Comparison with TBA assay and on iodometric method. *Lipids*. 1991;26:853-6.

Johnstone AM, Murison SD, Duncan JS, Rance KA, Speakman JR. Factors influencing variation in basal metabolic rate include fat-free mass, fat mass, age, and circulating thyroxine but not sex, circulating leptin, or triiodothyronine. *Am J Clin Nutr*. 2005;82:941-8.

Jurdak N, Kanarek RB. Sucrose-induced obesity impairs novel object recognition learning in young rats. *Physiol Behav*. 2009;96:1-5.

Kaasik A, Veksler V, Boehm E, Novotova M, Minajeva A, Ventura-Clapier R. Energetic crosswalk between organelles: architectural integration of energy production and utilization. *Circ Res*. 2001;89:153–9.

Kaur C, Kapoor HC. Antioxidants in fruits and vegetables – the millennium’s health. *Int J Food Sci Technol*. 2001;36:703-25.

Keenan KP, Laroque P, Ballam G, Soper K, Dixit R, Coleman JB. The effects of diet, ad libitum overfeeding, and moderate dietary restriction on the rodent bioassay: the uncontrolled variable in safety assessment. *Toxicol Pathol.* 1996;24:757-68.

Kenchiah S, Evans JC, Levy D, Wilson PWF, Benjamin EJ, Laron MG. Obesity and the risk of heart failure. *N Engl J Med.* 2002;347:305-13.

Kim JH, Hahm DH, Yang DC, Kim JH, Lee HJ, Shim I. Effect of crude saponin of Korean red ginseng on high – fat diet-induced obesity in the rat. *J Pharmacol Sci.* 2005;97:124-31.

Kunz I, Schorr U, Klaus S, Sharma AM. Resting metabolic rate and substrate use in obesity hypertension. *Hypertension.* 2000;36:26-32.

Labayen I, Forga L, Martinez JA. Nutrient oxidation and metabolic rate as affected by meals containing different proportions of carbohydrate and fat, in healthy young women. *Eur J Nutr.* 1999;38:158-66.

Lewin TM, Coleman RA. Regulation of myocardial triacylglycerol synthesis and metabolism. *Biochim Biophys Acta.* 2003;1634:63-75.

Lopaschuk GD, Folmes CDL, Stanley WC. Cardiac energy metabolism in obesity. *Cir Res.* 2007;101:335-47.

Lopaschuk GD, Rebeyca IM, Allard MF. Metabolic modulation. A means to mend a broken heart. *Circulation.* 2002;105:140-2.

Lopes IM, Marti A, Moreno Aliaga MJ, Martinez A. Aspectos genéticos da obesidade. *Rev Nutr.* 2004;17:327-38.

Lowry OH, Rosebrough NL, Farr AL. Protein measurement with the folin-phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951;193:265-75.

Machowetz A, Poulsen HE, Gruendel S, Weimann A, Fitó M, Marrugat J, et al. Effect of olive oils on biomarkers of oxidative damage DNA stress in Northern and Southern Europeans. *FASEB J*. 2007;21:1-8.

Mallet RT, Sun J, Knott EM, Sharma AB, Yurvat AHO. Metabolic cardioprotection by pyruvate: recent progress. *Exp Biol Med*. 2005;230:435-43.

Manach C, Scalbert A, Morand C, Remesy C, Jimenez L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr*. 2004;79:727-47.

Marrugat J, Covas MI, Fitó M, Schroeder H, Miro-Casas E, Gimeno E, et al. Effects of differing phenolic content in dietary olive oils on lipids and LDL oxidation—a randomized controlled trial. *Eur J Nutr*. 2004;43:140-7.

Masoro EJ. Overview of caloric restriction and ageing. *Mech Ageing Dev*. 2005;126:913-22.

Mateos R, Dominguez MM, Espartero JL, Cert A. Antioxidant effect of phenolic compounds, alpha tocopherol and other minor compounds in virgin olive oil. *J Agric Food Chem*. 2003;51:7170-5.

Matsuo T, Shimomura Y, Saitoh S, Tokuyama K, Takeuchi H, Suzuki M. Sympathetic activity is lower in rats fed a beef tallow diet than in rats fed a safflower oil diet. *Metabolism*. 1995;44:934-9.

McCue P, Zheng Z, Pinkham JL, Shetty K. A model for enhanced pea seedling vigour following low pH and salicylic acid treatments. *Process Biochemistry*. 2000;35:603-13.

Mehmetcik G, Toker G, Uysal M. Endogenous and copper-induced lipid hyperperoxidation and antioxidant activity of serum in hypercholesterolemic subjects. *Horm Metab Res*. 1997;29:63-5.

Mela DJ, Rogers PJ. Food, eating and obesity. London: Chapman & Hall; 1998.

Miller AC, Blakely WF. Inhibition of glutathione reductase activity by a carbamoylating nitrosourea: effect on cellular radiosensitivity. *Free Radic Biol Med.* 1992;12:53-62.

Montedoro GF, Servili M, Baldioli M, Miniati E. Simple and hydrolyzable phenolic compounds in virgin olive oil: 1. Their extraction, separation, and quantitative and semiquantitative evaluation by HPLC. *J Agric Food Chem.* 1992;40:1571-8.

Mourão DM, Monteiro JBR, Hermsdorff HHM, Teixeira MCL. Alimentos modificados e suas implicações no metabolismo energético. *Rev Nutr.* 2005;18:19-28.

Nakamura W, Hojoda S, Hayashi K. Purification and properties of rat liver glutathione peroxidase. *Biochem Biophys Acta.* 1974;358:251-61.

Nascimento A, Sugizaki MM, Leopoldo A, Leopoldo APL, Nogueira CR, Novelli ELB, et al. Misclassification probability as obese or lean in hypercaloric and normocaloric diet. *Biol Res.* 2008;41:253-9.

Nelson DL, Cox MM. *Lehninger Princípios de Bioquímica.* 4aed. São Paulo: Sarvier; 2006.

Nishiyama Y, Ikeda , Haramaki N, Yoshida N, Imaizumi T. Oxidative stress is related to exercise intolerance in patients with heart failure. *Am Heart J.* 1998;135:115-20.

Norman GR, Streiner DL. *Biostatistic – the base essentials.* St. Louis: Mosby Year Book; 1994. 260p.

Novelli ELB, Diniz YS, Galhardi C, Ebaid G, Rodrigues H, Mani F. Anthropometrical parameters and markers of obesity in rats. *Lab Anim.* 2007;41:111-9.

Novelli ELB, Fernandes AAH, Diniz YS, Almeida JA, Faine LA Ribas BO. The adverse effect of a high-energy dense diet on cardiac tissue. *J Nutr Environ Med.* 2002;12:287-94.

Novelli ELB, Santos P, Assalin H, Souza G, Rocha K, Ebaid G, et al. N-acetylcysteine in high sucrose induced obesity: energy expenditure, metabolic shifting for cardiac health. *Pharmacol Res.* 2009;59:74-9.

Novelli ELB, Souza GA, Ebaid GMX, Rocha KKHR, Seiva FRF, Mani F, et al. Energy expenditure and oxygen consumption as novel biomarkers of obesity-induced cardiac disease. *Obesity.* 2010;18:1754-61.

Novelli ELB. *Nutrição e vida saudável – estresse oxidativo e metabolismo energético.* Ribeirão Preto: Tecmed; 2005.

Okamoto OK, Pinto E, Latorre LR, Bechara EJH, Colepicolo P. Antioxidant modulation in response to metal-induced oxidative stress in algal chloroplasts. *Arch Environ Contamin Toxicol.* 2001;40:18-24.

Pannala AS, Rice-Evans CA, Halliwell B, Singh S. Inhibition of peroxynitrite-mediated tyrosine nitration by catechin polyphenols. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997;232:164-8.

Pari L, Velmurugan K. Protective and antioxidant role of caffeic acid against chloramphenicol induced hepatotoxicity in rats. *Ad Phytother Res.* 2009;37:79-89.

Pepe S, McLennan PL. Mitochondrial function. Cardiac membrane fatty acid composition modulates myocardial oxygen consumption and post-ischemic recovery of contractile function. *Circulation.* 2002;105:2303-8.

Pereira LO, Francischi RP, Júnior AHL. Obesidade: hábitos nutricionais, sedentarismo e resistência à insulina. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2003;47:111-27.

Perez-Jimenez F, Ruano J, Martinez PP, Lopez Segura F, Lopez Mirabda J. The influence of olive oil on human health: not a question of fat alone. *Mol Nutr Food Res.* 2007;51:1199-208.

Pinotti MF, Silva MP, Sugizaki MM, Diniz YS, Santana LS, Aragon FF, et al. Effect of unsaturated fatty acids on myocardial performance, metabolism and morphology. *Braz J Med Biol Res.* 2006;39:305-12.

Pokorny J. Are natural antioxidants better-and safer-than synthetic antioxidants? *Eur J Lipd Technol.* 2007;109:629-42.

Polzonetti V, Egidi D, Vita A, Vincenzetti S, Natalini P. Involvement of oleuropein in (some) digestive metabolic pathways. *Food Chem.* 2004;88:11-5.

Poole JG, Lawrenson L, Kim J, Brown C, Richardson RS. Vascular and metabolic response to cycle exercise in sedentary humans: effect of age. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2003;284:1251-9.

Portillo MP, Simon E, Garcia-Calonge MA, Del Barrio AS. Effects of high-fat diet on lipolysis in isolated adipocytes from visceral and subcutaneous WAT. *Eur J Nutr.* 1999;38:177-82.

Quiles JL, Ochoa JJ, Huertas JR, Mataix J. Coenzyme Q supplementation protects from age-related DNA double-strand breaks and increases lifespan in rats fed on a PUFA-rich diet. *Exp Gerontol.* 2004;39:189-94.

Quiles JR, Huertas JR, Ochoa JJ, Battino M, Mataix J, Mañas M. Dietary fat (virgin olive oil or sunflower oil) and physical training interactions on blood lipids in the rat. *Nutrition.* 2003;19:363-8.

Raventoz RML, Gimeno E, Fito M, Castellote AI, Covas M, Borona MCDT, et al. Interaction of olive oil phenol antioxidant components with low-density lipoprotein. *Biol Res.* 2004;37:247-52.

Reeves PG. Components of the AIN-93 diets. *J Nutr.* 1997;127:838S-41S.

Resnick AZ, Packer L. Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. *Methods Enzimol.* 1994;233:357-63.

Rivabene R, Napolitano M, Cantafora A, Bravo E. Redox-dependent modulation of lipid synthesis induced by oleic acid in the human intestinal epithelial cell line caco-2. *Exp Biol Med.* 2001;226:191-8.

Rocha KKHR, Souza GA, Ebaid GMX, Seiva FRF, Cataneo AC, Novelli ELB. Resveratrol toxicity: effects on risk factors for atherosclerosis and hepatic oxidative stress in standard and high-fat diets. *Food Chem Toxicol.* 2009;47:1362-7.

Rosado EL, Monteiro JBR. Obesidade e a substituição de macronutriente da dieta. *Rev Nutr.* 2001;14:145-52.

Schaffer JE. Lipotoxicity: when tissues overeat. *Curr Opin Lipidol.* 2003;14:281-7.

Schneider P, Meyer F. As equações de predição da taxa metabólica basal são apropriadas para adolescentes com sobrepeso e obesidade? *Rev Bras Med Esporte.* 2005;11:193-6.

Sedlak J, Lindsay RH. Estimation of total protein bound and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal Biochem.* 1968;25:192-205.

Seiva FRF, Amauchi JF, Rocha KKHR, Souza GA, Ebaid GM, Burneiko RC, et al. Effects of N-acetylcysteine on alcohol abstinence and alcohol induced adverse effects in rats. *Alcohol.* 2009;43:127-35.

Seiva FRF, Ebaid G, Castro AV, Okoshi K, Nascimento A, Rocha K, et al. Growth hormone and heart failure: oxidative stress and energetic metabolism in rats. *Growth Horm IGF Res.* 2008;18:275-83.

Servili M, Selvaggini R, Taticchi A, Esposito S, Montedoro G. Volatile compounds and phenolic composition of virgin olive oil: optimization of temperature and time of exposure

of olive pastes to air during mechanical extraction process. *J Agric Food Chem.* 2003;51:7980-8.

Smith C, Marks AD, Liebman M. *Bioquímica médica básica de Marks*. 2a ed. São Paulo: Artmed; 2007.

Souza GA, Ebaid GX, Seiva FRF, Rocha KHR, Galhardi CM, Mani F, et al. N-acetylcysteine na Allium plant compound improves high-sucrose diet-induced obesity and related effects. *eCAM Adv Acess.* 2008;11:1-7.

Stanley WC, Recchia FA, Lopaschuk GD. Myocardial substrate metabolism in the normal and failing heart. *Physiol Rev.* 2005;1093-29.

Stanley WC, Sabbah HN. Metabolic therapy for ischemic disease. *Heart Fail Rev.* 2005;10:275-9.

Strohl KP, Thomas AG, Jean PST, Achlenker EH, Koletsky RJ, Schork NJ. Ventilation and metabolism among rats strains. *J Appl Physiol.* 1997;82:317-23.

Sugizaki MM, Carvalho RF, Aragon FF, Ohoski K, Ohoski MP, Zanati SG, et al. Myocardial dysfunction induced by food restriction is related to morphological damage in mormotensive middle-aged rats. *J Biomed Sci.* 2005;12:641-9.

Suh JH, Wang H, Liu RM, Hagen TM. Alpha-Lipoic Acid Reverse the Age Related Loss in GSH redox Status in Post Mitotic Tissue: Evidence for increased cysteine requirement for GSH synthesis. *Arch Biochem Biophys.* 2004;423:126-35.

Tietze F. Enzymatic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione. *Anal Biochem.* 1969;27:502-22.

Tripoli E, Giammanco M, Tabacchi G, Majo DD, Giammanco S, Guardia M. The phenolic compounds of olive oil: structure, biological activity and beneficial effects of human health. *Nutr Res Rev.* 2005;18:98-112.

Vankoningsloo S, Piens M, Lecocq C, Gilson A, De Pauw A, Renard P. Mitochondrial dysfunction induces triglyceride accumulation in 3T3-L1 cells: role of fatty acid beta-oxidation and glucose. *J Lipid Res.* 2005;46:1133-49.

Visioli F, Belomo G, Galli C. Free radical scavenging properties of olive oil polyphenols. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998;247:60-4.

Visioli F, Galli C, Bornet F, Mattei A, Patelli R, Galli G, et al. Olive oil phenolics are dose-dependently absorbed in humans. *FEBS Lett.* 2000;468(2-3):159-60.

Visioli F, Galli C. The effect of minor constituents of olive oil on cardiovascular disease: new findings. *Nutr Rev.* 1998;56:142-7.

Visioli F, Wolfram R, Richard D, Abdullah MICB, Crea R. Olive phenolics increase glutathione levels in healthy volunteers. *J Agric Food Chem.* 2009;57:1793-6.

Vissers MN, Zock PI, Katan MB. Bioavailability and antioxidant effects of olive oil phenols in humans. *Clin Nutr.* 2004;58:955-65.

Voet D, Voet JG, Pratt CW. *Fundamentos de Bioquímica.* Porto Alegre: Artmed; 2008.

Wahle KW, Caruso D, Ochoa JJ, Quiles JL. Olive oil modulation of cell signaling in disease prevention. *Lipids.* 2004;39:1223-31.

Warhlich V, Dos Anjos LA. Aspectos históricos e metodológicos da medição e estimativa da taxa metabólica basal: uma revisão de literatura. *Cad Saúde Pública.* 2001;17:801-17.

Waterman E, Lockwood B. Active components and clinical applications of olive oil. *Altern Med Rev.* 2007;12:331-42.

Weinbrenner T, Fitó M, de la Torre SG, Rijken P, Coolen TC, Farré-Albaladejo, et al. Olive oils high in phenolic compounds modulate oxidative/antioxidant status in men. *J Nutr.* 2004;134:2314-21.

- Weinsier RL, Nagy TR, Hunter GR, Darnell BE, Hensrud DD, Weiss HL. Do adaptive changes in metabolic rate favor weight regain in weight-reduced individuals? An examination of the set-point theory. *Am J Clin Nutr.* 2000;72:1088-94.
- Weyer C, Pratley RE, Salbe AD, Bogardua C, Ravussin E, Tataranni PA. Energy expenditure, fat oxidation, and body weight regulation: A stumetabolic adaptation to long-term weight change. *J Cin Endocrinol Metab.* 2000;85:1087-94.
- Wilson-Fritch L, Nicolero S, Choulnard M, Lazar MA, Chui PC, Reszyk J. Mitochondrial remodeling in adipose tissue associated with obesity and treatment with rosiglitazone. *J Clin Invest.* 2004;114:1281-9.
- World Health Organization. Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases. Report of a joint FAO/WHO expert Consultation. Geneva: WHO/FAO; 2003.
- Xu K, Becker L. Ultrastructural localization of glycolytic enzymes on sarcoplasmic reticulum vesicles. *J Histochem Cytochem.* 1998;46:419-27.
- Zar JH. Biostatistical analysis. 4a ed. New Jersey: Practice-Hall; 1994. 663p.

CAPÍTULO 2

**EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DE AZEITE DE OLIVA E
SEUS FENÓIS, OLEUROPEÍNA E ÁCIDO CAFÉICO NO
METABOLISMO ENERGÉTICO CARDÍACO E ENZIMAS
REGULADORAS DAS VIAS METABÓLICAS**

RESUMO

Dietas inadequadas, enriquecidas com carboidratos e lipídios têm sido responsáveis pelo desenvolvimento de diversas patologias relacionadas com estresse oxidativo. Desde que o estresse oxidativo pode estar associado a inúmeras alterações metabólicas, atualmente observa-se um crescente interesse na descoberta de substâncias naturais que possam atuar como agentes antioxidantes, capazes de conter, ou mesmo reverter os danos provocados pelo estresse oxidativo. Deste modo o estudo dos efeitos do azeite de oliva e seus componentes fenólicos, oleuropeína e ácido caféico sobre o metabolismo energético cardíaco e cinética das enzimas reguladoras das vias metabólicas é de grande interesse. Para tanto, 48 ratos, Wistar, $180,52 \pm 21,05$ g, foram divididos inicialmente em 2 grupos. O grupo P (n=24) foi mantido com dieta padrão e água *ad libitum* e o grupo H (n=24) foi mantido com dieta rica em colesterol e sacarose e água *ad libitum*. Após 21 dias de tratamento os dois grupos foram divididos em 4 subgrupos cada (n=6): (C) considerados controles, mantidos com as respectivas dietas P, ou H e sem suplementação; (AO) receberam respectivamente ração P ou H e suplementação nutricional com azeite de oliva extra-virgem (Colavita, Itália) (3mL/Kg/dia); (O) receberam ração P ou H, respectivamente e suplementação nutricional com oleuropeína (Genay, France) (0,023mg/Kg/dia); (AC) receberam respectivamente ração P ou H e suplementação nutricional com ácido caféico (Sigma, USA) (2,66mg/Kg/dia). O experimento teve duração de 43 dias. Oleuropeína reduziu as atividades da citrato sintase, enquanto suplementação com ácido cafeico induziu redução na β -hidroxiacil coenzima A desidrogenase (OHADH) em relação aos animais do grupo PC. Azeite de oliva e seus fenóis induziram elevação na oxidação de ácidos graxos otimizando energia para o metabolismo cardíaco e impedindo acúmulo de triglicerídeos no miocárdio, em condições de obesidade. Desde que os compostos fenólicos isolados não induziram efeitos significantes nas cinéticas das enzimas estudadas concluiu-se que os efeitos biológicos dos compostos fenólicos do azeite de oliva nas enzimas miocárdicas são evidenciados após administração em doses pequenas e por longo tempo de ingestão.

Palavras chave: metabolismo energético, músculo cardíaco, cinética enzimática, constante de Michaelis, velocidade máxima.

INTRODUÇÃO

Obesidade e dieta hipercalórica

A incidência de obesidade vem aumentando nos últimos anos na maioria das populações, como resultado da ingestão de dietas inadequadas, com alta densidade energética, elevados níveis de açúcar (Diniz et al., 2006), gorduras saturadas, bem como estilo de vida sedentário (Pietiläinen et al., 2010).

A obesidade abdominal está diretamente associada com anormalidades metabólicas como intolerância a glicose, resistência à insulina, hiperinsulinemia, dislipidemia e hipertensão, sintomas estes referentes à síndrome metabólica ou síndrome X (Champe et al, 2007).

Dieta hipercalórica induz alterações no metabolismo da glicose, podendo modificar a composição de apolipoproteínas e elevar a concentração de triacilgliceróis (Strobl et al., 1989). Ingestão deste tipo de dieta, que induz dislipidemias, constitui importante fator para o surgimento de alterações cardiovasculares. O acúmulo de lipídios está relacionado com estresse oxidativo sistêmico em humanos e em ratos, constituindo importante mecanismo patogênico da obesidade (Furukawa et al., 2004). A elevação na oxidação de ácidos graxos na cadeia de transporte de elétrons mitocondrial está associada à liberação de radicais livres e indução do estresse oxidativo (Esposito et al., 1999; Lee et al., 1999).

O uso de oxigênio e o metabolismo oxidativo de nutrientes resultam na produção de radicais livres. Elevada ingestão de calorias diminui a fluidez da membrana mitocondrial aumentando a produção de espécies radicalares de oxigênio (ERO) (Novelli et al., 2002; Novelli, 2005; Souza et al., 2008; Seiva et al., 2008; Seiva et al., 2009; Novelli et al., 2009), induzindo o estresse oxidativo (Nishiyama et al., 1998). Em proteínas, as ERO causam a peroxidação protéica, levando a formação de proteína carbonil e alterações funcionais nas células (Yeum et al, 2004). Nos lipídios, a ação dos radicais livres resulta na peroxidação dos lipídios insaturados das membranas celulares, podendo levar à perda de função e lise celular.

Azeite de oliva e compostos fenólicos

O interesse sobre compostos fenólicos tem crescido nos últimos 10 anos. Seu poder antioxidante pode se manifestar através de propriedades quelantes e/ou neutralização de

radicais livres (Metodieva et al., 1997, Bouayed & Bohn, 2010). Diferentes tipos de polifenóis possuem habilidades antioxidantes distintas, dependendo de sua estrutura e capacidade de interagir e penetrar nas bicamadas lipídicas das membranas biológicas inibindo a lipoperoxidação (Brown et al., 1998).

Um número crescente de indícios aponta o papel crucial do azeite de oliva como integrante básico da dieta Mediterrânea, em seus efeitos benéficos a saúde. Estes efeitos podem ser atribuídos a presença de componentes fenólicos (Torre-Carbot et al., 2010).

O consumo de azeite de oliva está relacionado com menor risco de doenças cardiovasculares (Owen et al., 2000, Covas et al., 2006b), assim como um menor risco de desenvolvimento de neoplasias malignas (Waterman et al., 2007). Vários autores atribuem a dieta rica em azeite de oliva extra-virgem um poder atenuante dos efeitos agudos pro-coagulantes de alimentação rica em gorduras, como diminuição da ativação do fator VII e redução da indução de plaquetas *ex vivo* (Larsen et al., 1999; Kelly et al., 2001) e sua possível prevenção de riscos cardiovasculares (Bondia-Pons et al, 2007; Razquin C et al., 2009; Llorente-Cortés V et al., 2010).

Estudos anteriores realizados por nosso grupo de pesquisa (Faine et al., 2006ab) demonstraram que as propriedades benéficas do azeite de oliva não estavam associadas ao ácido graxo mono-insaturado, o ácido oléico, indicando que outros componentes do azeite seriam responsáveis por suas propriedades antioxidantes. Recentes evidências têm mostrado que os componentes secundários do azeite, particularmente os compostos fenólicos, têm importante contribuição para os efeitos benéficos dessa fonte de gordura (Ruano et al., 2005, Fitó et al., 2005, Visioli et al, 2005, Perona et al., 2006).

Evidências epidemiológicas demonstram que a dieta do Mediterrâneo, caracterizada pelo elevado consumo de azeite de oliva, rico em compostos fenólicos, pode contribuir para os efeitos benéficos de seu consumo (Covas et al., 2006a, Hillestrøm, et al., 2006), uma vez que o azeite de oliva é fonte de pelo menos 30 compostos fenólicos (Tuck & Hayball, 2002).

Dentre os compostos fenólicos do azeite de oliva incluem-se fenóis simples como o hidroxitirosol (3,4-dihidroxifeniletanol), ácidos elenólicos, entre eles o ácido cafeico (ácido 3,4-dihidroxicinnamico) (Montedoro et al., 1992; Servili et al., 2003; Manach et al., 2004; Vissers et al., 2004; Aldini et al., 2006) e polifenóis como a oleuropeína (Gómez-Alonso et

al., 2002; Trípoli et al., 2005; Fitó et al., 2007).

Metabolismo cardíaco e terapia metabólica

A associação do estresse oxidativo à aterosclerose e disfunções vasculares, bem como a alterações estruturais no miocárdio (Ferrari et al., 1998; Yue et al., 1999; Droge, 2002; Novelli et al., 2002) tem estimulado o consumo de diferentes variedades de azeite de oliva (Serra-Majem et al., 2003), independente do conhecimento de suas reais propriedades terapêuticas.

O miocárdio contém grande quantidade de mitocôndrias, possui elevada taxa de consumo de oxigênio (Henning et al., 1996), e é caracterizado pela elevada capacidade oxidativa (Bass et al., 1969), indicando maior susceptibilidade do músculo cardíaco ao estresse oxidativo e a importância do metabolismo energético cardíaco na produção de radicais livres.

O coração pode obter energia a partir de vários substratos, como glicose, ácidos graxos, lactato, piruvato e corpos cetônicos (Mallet, 2000), dependendo das condições metabólicas do organismo. Preferencialmente, o miocárdio utiliza ácidos graxos como substrato para a produção de energia (Henning et al., 1996). A maior utilização de oxigênio pelo músculo cardíaco relaciona-se a maior quantidade de ATP (adenosina trifosfato) produzida pela oxidação de ácidos graxos em relação a carboidratos, bem como o fato que ácidos graxos ($\text{CH}_3\text{-(CH}_2\text{)}_n\text{-COOH}$), apresentam baixa concentração de oxigênio por molécula, em comparação com carboidratos ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$). Deste modo, o músculo cardíaco necessita de cerca de 12% mais oxigênio, quando utiliza ácido graxo e não glicose como fonte de energia, para produzir a mesma quantidade de ATP (Nelly & Morgan, 1974).

No metabolismo energético miocárdico, inúmeras anormalidades têm sido observadas em condições de dano cardíaco. Dessa forma, compostos capazes de modular o metabolismo energético nas disfunções miocárdicas, têm exercido efeitos benéficos através da alteração da oxidação de ácidos graxos para a glicose, constituindo a “terapia metabólica” (Lopaschuk et al., 2002). Terapia metabólica envolve a administração de compostos que favorecem, ou inibem algumas vias metabólicas específicas, deste modo compreendem ativadores ou inibidores de enzimas irreversíveis, que regulam uma via metabólica (Hadj et al., 2003).

OBJETIVOS

Considerando que o elevado consumo de azeite de oliva pode estar associado a atividades de seus componentes e suas implicações no metabolismo energético, o presente trabalho teve por objetivos determinar os efeitos da administração de azeite de oliva e de seus compostos fenólicos, oleuropeína e ácido cafeico, sobre o metabolismo energético no tecido cardíaco de ratos, mantidos com ração padrão e hipercalórica, rica em sacarose e colesterol e avaliar os efeitos dos componentes do azeite de oliva extra-virgem e seus fenóis na cinética de enzimas reguladoras das vias metabólicas no tecido cardíaco.

MATERIAL E MÉTODOS

1. ANIMAIS

O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Botucatu – SP, adotado pelo Colégio Brasileiro de experimentação Animal (COBEA).

Foram utilizados 48 ratos machos adultos *Wistar*, de peso inicial médio $180,52 \pm 21,05$ gramas. Os animais foram provenientes do Biotério da UNESP - "campus de Botucatu" e foram transferidos para o "Laboratório de Bioquímica na Experimentação Animal" do Departamento de Química e Bioquímica, Instituto de Biociências, UNESP/Botucatu, onde permaneceram durante todo o período experimental, em gaiolas de plástico individual, à temperatura de $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$, período claro/escuro de 12 horas.

2. GRUPOS EXPERIMENTAIS

Inicialmente os animais foram divididos em dois grupos mantidos com dieta padrão (**P**) (Biobase, 9301, SIF nº SC – 25035, Brasil) e com dieta hipercalórica (**H**). Os animais receberam água destilada *ad libitum* durante todo o período experimental.

Após 21 dias de tratamentos, os animais do grupo P mantidos com dieta padrão, foram divididos em 4 subgrupos (n=6):

- **PC** - considerado controle, recebendo dieta padrão;
- **PAO** - recebendo ração padrão e suplementação nutricional com azeite de oliva (Colavita, Italia) (3mL/Kg/dia) (Faine et al., 2004; Vissers et al., 2004);
- **PO** - recebendo ração padrão e suplementação nutricional com oleuropeína (Genay, France) (0,023mg/Kg/dia) (Gómez-Alonso et al., 2002) e
- **PAC** - recebendo ração padrão e suplementação nutricional com ácido cafêico (Sigma, USA) (2,66mg/Kg/dia) (Montedoro et al., 1992).

Para o estudo dos efeitos da ingestão de azeite de oliva e seus componentes fenólicos em animais obesos, após 21 dias de consumo da dieta rica em colesterol (Costa et al, 1993) e sacarose, os animais do grupo H, mantidos com dieta rica em colesterol e sacarose, foram divididos em 4 subgrupos (n=6):

- **HC** – recebendo dieta rica em colesterol e sacarose.
- **HAO** – recebendo dieta rica em colesterol e sacarose, com suplementação nutricional de azeite de oliva, como no grupo PAO.
- **HO** - mantido com dieta rica em colesterol e sacarose, com suplementação nutricional de oleuropeína, como no grupo PO.
- **HAC** - recebendo dieta rica em colesterol e sacarose, com suplementação nutricional de ácido cafêico, como no grupo PAC.

As concentrações dos fenóis utilizadas corresponderam aos conteúdos dos mesmos, na dose de azeite usada na suplementação dos animais dos grupos PAO (ração padrão+azeite) e HAO (ração hipercalórica+azeite). Estes animais (PAO e HAO) receberam quantidade correspondente a 4% da dieta (Faine et al., 2004), ou seja, 4ml de azeite (ou 4g de azeite de oliva) para 100g de dieta (ração)/dia, ou 1mL de azeite para a ingestão de 25g de ração/dia (Novelli et al., 2007). Tendo como base o peso médio dos animais de 300g, os quais ingerem aproximadamente 25g de ração por dia, a quantidade de azeite de oliva por kg de peso corporal foi 3mL. As concentrações médias dos compostos fenólicos estudados no azeite de oliva extra-virgem, variaram de 3,33 a 12,03mg/L para oleuropeína e de 594,0 a 1300,0mg/L para o ácido cafeico.

As concentrações dos polifenóis utilizadas corresponderam a quantidade presente no azeite de oliva, administrado aos animais dos grupos PAO e HAO, sendo previamente

dissolvidos em solução de etanol 10% (Visioli et al., 1998; Dogan, 2002; Carluccio et al., 2003). O azeite de oliva e seus fenóis foram administrados por gavagem, como suplementação da dieta basal, duas vezes por semana, durante o período de 21 dias. Animais dos grupos PC e HC receberam solução 10% de etanol através de gavagem. A ingestão alimentar foi controlada diariamente, no mesmo horário (9:00 as 11:00 horas). Diariamente era oferecida uma quantidade conhecida de ração. Após o período de 24 horas o restante era pesado, permitindo a determinação do consumo alimentar de cada animal, de cada grupo. O peso corporal foi determinado no início e no final do experimento. O período experimental total foi de 43 dias.

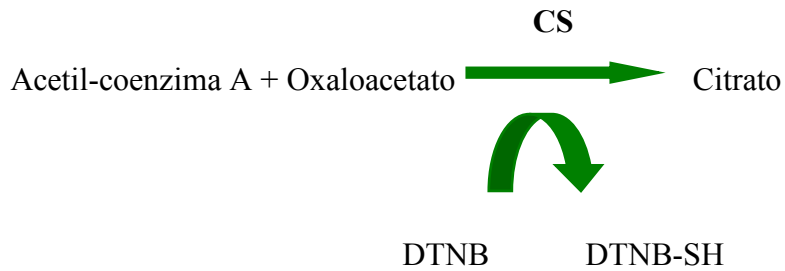
3. DETERMINAÇÕES BIOQUÍMICAS

Após 43 dias de experimento os animais foram anestesiados (pentobarbital sódico 1%, 0,1mL/100g, i.p.). A determinação do comprimento corporal (exceto cauda) foi feita com os animais sob anestesia, sendo obtidos os valores médios de $24,76 \pm 0,17$ cm para animais mantidos com ração padrão e $24,67 \pm 0,27$ cm para os grupos com dieta hipercalórica, não havendo diferenças significantes entre os grupos, em cada dieta.

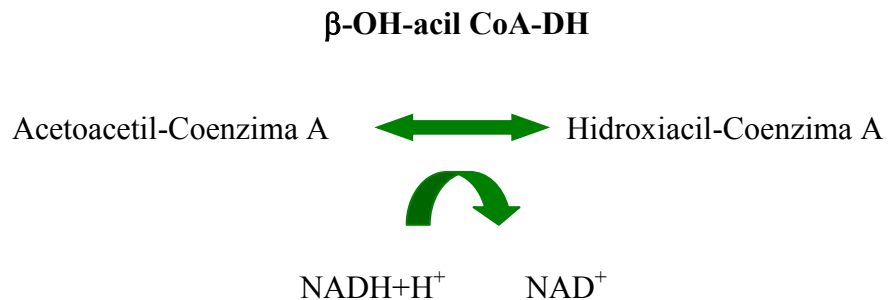
Os animais foram a seguir sacrificados por decapitação. Após o sacrifício o coração foi removido, dissecado e pesado. O ventrículo esquerdo (VE) foi então separado, pesado e as amostras foram lavadas em solução salina gelada (NaCl 0,9%), pesadas e armazenadas em freezer a -86°C . Amostras de 200mg do VE foram homogeneizadas em Potter Elvehjem, com pistilo de teflon, com 5 mL de tampão fosfato de sódio 0,1M. pH 7.0. Os homogeneizados foram centrifugados a 10.000 rpm por 15 minutos, em centrífuga refrigerada a -4°C . Os sobrenadantes foram utilizados para análise das enzimas do metabolismo cardíaco.

3.1. ANÁLISE DO METABOLISMO ENERGÉTICO NO MÚSCULO CARDÍACO

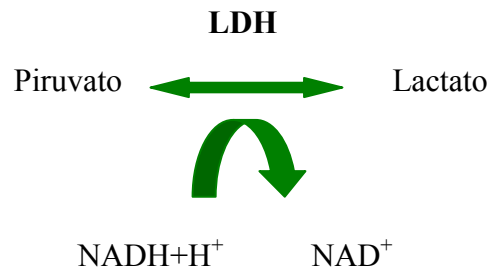
A atividade da citrato sintase (CS, E.C.4.1.3.7.) foi determinada a 412nm em tampão tris-HCl 50mM, pH 8,0, contendo acetil CoA, DTBN (dithiobis-2-nitrobenzoato) e oxaloacetato (Bass et al., 1969).



A β -hidroxiacil Coenzima A desidrogenase (OHADH, E.C.1.1.1.35.) foi determinada em meio contendo acetoacetyl coenzima A e NADH (Bass et al., 1969).



A atividade da lactato desidrogenase (LDH, E.C.1.1.1.27.) foi determinada no coração pela velocidade de oxidação do NADH, medida a 340 nm, tendo como substrato o piruvato (Moura, 1982).



4. CINÉTICA DE ENZIMAS REGULADORAS DAS VIAS METABÓLICAS NO TECIDO

CARDÍACO

Foram realizados estudos visando determinar o mecanismo de ação do ácido cafeico e da oleuropeína sobre a cinética das enzimas lactato desidrogenase, beta-hidroxiacil-CoA desidrogenase e da citrato sintase.

Foram utilizados 6 ratos *Wistar* machos, de mesma idade dos animais do grupo controle. Os animais foram anestesiados e submetidos a eutanásia sendo o coração imediatamente retirado. Amostras de 200mg do ventrículo esquerdo foram homogeneizadas com 5 mL de tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,0 (*Potter Elvehjem*, com pistilo de teflon) sendo posteriormente centrifugadas a 10.000 rpm a -4°C , durante 10 minutos. Os sobrenadantes foram utilizados para estudos da cinética enzimática.

Os efeitos dos compostos fenólicos nas cinéticas enzimáticas foram estudados com amostras do sobrenadante (0,1 mL) na ausência e após pré-incubação por 5 minutos com 0,67 mg/mL e 1,4mg/mL de ácido cafeico e de 0,057mg/ml e 0,1134mg/ml de oleuropeína. As concentrações utilizadas correspondem a dose total administrada nos animais experimentais, sendo 6,59 mg de ácido cafeico para os animais do grupo PAC (cerca de 18,82 mg/Kg de peso) e de 0,044mg de oleuropeína para os animais do grupo PO (cerca de 0,1257 mg/Kg).

Para testar a possibilidade dos compostos fenólicos ativarem ou inibirem as vias metabólicas foram determinadas as atividades das enzimas, através das metodologias previamente descritas, utilizando-se concentrações de substrato de 0,1 a 7 vezes a concentração do K_M para cada enzima, obtendo-se 10 pares de dados (Ritchie e Prvan, 1996). A cinética enzimática da OHADH foi obtida com uso de concentrações de substrato acetoacetil coenzima A de 10^{-3} , $2 \cdot 10^{-3}$, $5 \cdot 10^{-3}$, 10^{-2} , $2 \cdot 10^{-2}$, $5 \cdot 10^{-2}$, 10^{-1} , $2 \cdot 10^{-1}$ e $4 \cdot 10^{-1}$ mM. Para a cinética enzimática da CS foram utilizadas concentrações do substrato acetil-CoA de 10^{-3} , $2 \cdot 10^{-3}$, $5 \cdot 10^{-3}$, 10^{-2} , $2 \cdot 10^{-2}$, $5 \cdot 10^{-2}$, 10^{-1} e $2 \cdot 10^{-1}$ mM. E a cinética enzimática da LDH foi obtida com uso de concentrações do substrato piruvato de $4,76 \cdot 10^{-1}$, $7,14 \cdot 10^{-3}$, $9,5 \cdot 10^{-3}$, $9,5 \cdot 10^{-2}$, $2,4 \cdot 10^{-1}$, $4,76 \cdot 10^{-1}$, 1,07 e 1,428 mM (Chou & Talalay, 1977).

Foram elaborados gráficos da velocidade de atuação de cada enzima com as diferentes concentrações de substrato, permitindo determinar o efeito dos compostos fenólicos nas

constantes de Michaelis-Menten (K_M), desde que a concentração de substrato que corresponde a metade da velocidade máxima ($V_{m\acute{a}x}$) permite comparar enzimas em diferentes tecidos e organismos. Quanto menor o valor do K_M , maior será a afinidade da enzima pelo substrato.

Os parâmetros cinéticos foram determinados pela regressão linear (excel Microsoft Corp. Redmond, WA, USA). O mecanismo de atuação, como inibidor ou estimulador das enzimas analisadas para o ácido caféico e para a oleuropeína foi determinado através da análise gráfica dos duplos recíprocos e alteração nos valores de K_M e $V_{m\acute{a}x}$ (Dowd e Riggs, 1965).

5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos foram expressos em média $\pm$ desvio padrão. A comparação entre os grupos foi realizada pela técnica da análise de variância (ANOVA), complementada com o teste de comparações múltiplas de Tukey (Zar, 1999). O nível de significância foi de 5% para a discussão dos resultados (Norman & Streiner, 1994). A análise estatística foi realizada no Departamento de Bioestatística, Instituto de Biociências, UNESP, Botucatu.

RESULTADOS

Animais que receberam oleuropeína (PO) e ácido caféico (PAC) em dieta padrão apresentaram diminuição na atividade da enzima CS e OHADH, respectivamente, quando comparados ao grupo controle PC (Tabela 1).

A atividade da enzima OHADH mostrou-se elevada nos grupos HAO, HO e HAC quando comparada ao grupo HC, entretanto apresentou-se diminuída nos animais HO e HAC quando comparados ao grupo HAO (Tabela 2).

Não foram observadas diferenças significantes nas atividades da LDH e nas relações LDH/CS e OHADH/CS nos grupos experimentais com as diferentes dietas (Tabelas 1 e 2).

As Figuras 1 e 2 apresentam as comparações entre as atividades da OHADH e a oxidação total de lipídios evidenciada através da calorimetria indireta, apresentada no Capítulo 1. Na Figura 1 nota-se que animais que receberam ácido caféico (PAC) apresentaram diminuição na atividade da enzima OHADH e elevação na oxidação de

lipídios comparado aos animais PC e PO, entretanto a oxidação de lipídios nos animais do grupo PAC, apresentou-se diminuída quando comparado ao PAO. Na Figura 2 nota-se que a atividade da enzima OHADH apresentou-se elevada nos animais HAO, HO e HAC comparada ao grupo HC e diminuída nos animais HO e HAC, comparados aos animais HAO. Houve elevação na oxidação de lipídios nos animais HAO, HO e HAC comparados aos animais HC.

Não foram observadas alterações significativas nos valores de K_M e $V_{m\acute{a}x}$ para a enzima OHADH (Tabela 3, Figura 3), CS (Tabela 4, Figura 4) e LDH (Tabela 5, Figura 5).

Tabela 1. Atividade das enzimas citrato sintase (CS), lactato desidrogenase (LDH), β hidroxil Coenzima A desidrogenase (OHADH) e relações LDH/CS e OHADH/CS no miocárdio de animais alimentados com ração padrão sem suplementação (PC), que receberam azeite de oliva (PAO), oleuropeína (PO) e ácido caféico (PAC)

Variável	Suplementação			
	PC	PAO	PO	PAC
CS (nmol/mg prot)	227,55±53,63	189,46±58,33	152,57±29,25 ^a	158,51±46,90
LDH (nmol/mg prot)	751,55±116,83	781,63±75,79	712,84±235,37	636,63±108,53
OHADH (nmol/mg prot)	46,54±31,52	33,05±12,06	37,52±16,12	4,41±4,10 ^{abc}
LDH/CS (nmol/mg prot)	3,52±0,60	3,77±0,59	3,83±0,46	4,16±0,62
OHADH/CS (nmol/mg prot)	0,19±0,05	0,18±0,02	0,19±0,05	0,16±0,06

Valores expressos como média $\pm$ desvio-padrão ($p < 0,05$). ^aDiferença significativa em relação ao grupo PC;

^bDiferença significativa em relação ao grupo PAO; ^c Diferença significativa em relação ao grupo PO.

Tabela 2. Atividade das enzimas citrato sintase (CS), lactato desidrogenase (LDH), β hidroxiacil Coenzima A desidrogenase (OHADH) e relações LDH/CS e OHADH/CS no miocárdio de animais alimentados com ração hipercalórica sem suplementação (HC), que receberam azeite de oliva (HAO), oleuropeína (HO) e ácido cafêico (HAC)

Variável	Suplementação			
	HC	HAO	HO	HAC
CS (nmol/mg prot)	214,36±56,58	270,60±59,47	221,78±43,70	213,97±27,89
LDH (nmol/mg prot)	780,02±83,48	878,99±137,80	758,69±96,81	792,25±71,87
OHADH (nmol/mg prot)	42,03±19,99	186,38±53,29 ^a	130,29±55,28 ^{ab}	116,35±42,58 ^{ab}
LDH/CS (nmol/mg prot)	3,55±0,34	3,33±0,32	3,39±0,39	3,80±0,41
OHADH/CS (nmol/mg prot)	0,17±0,03	0,27±0,26	0,28±0,22	0,25±0,15

Valores expressos como média $\pm$ desvio-padrão ($p < 0,05$). ^aDiferença significativa em relação ao grupo HC;

^bDiferença significativa em relação ao grupo HAO.

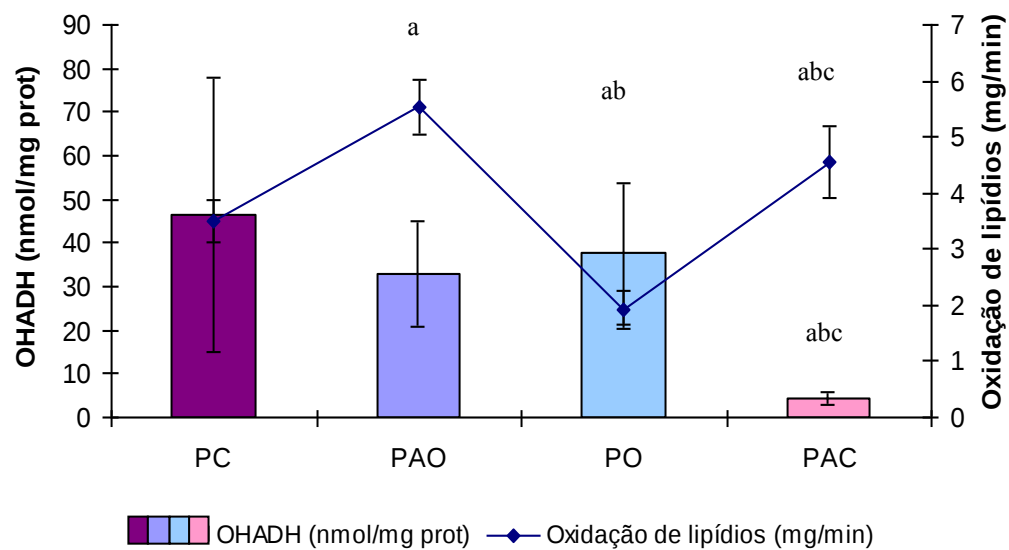


Figura 1. Atividade da enzima beta-hidroxil-CoA desidrogenase (OHADH) e oxidação de lipídios nos animais mantidos com ração padrão sem suplementação (PC), que receberam azeite de oliva (PAO), oleuropeína (PO) e ácido cafêico (PAC). ^aDiferença significativa em relação ao grupo PC; ^bDiferença significativa em relação ao grupo PAO; ^c Diferença significativa em relação ao grupo PO.

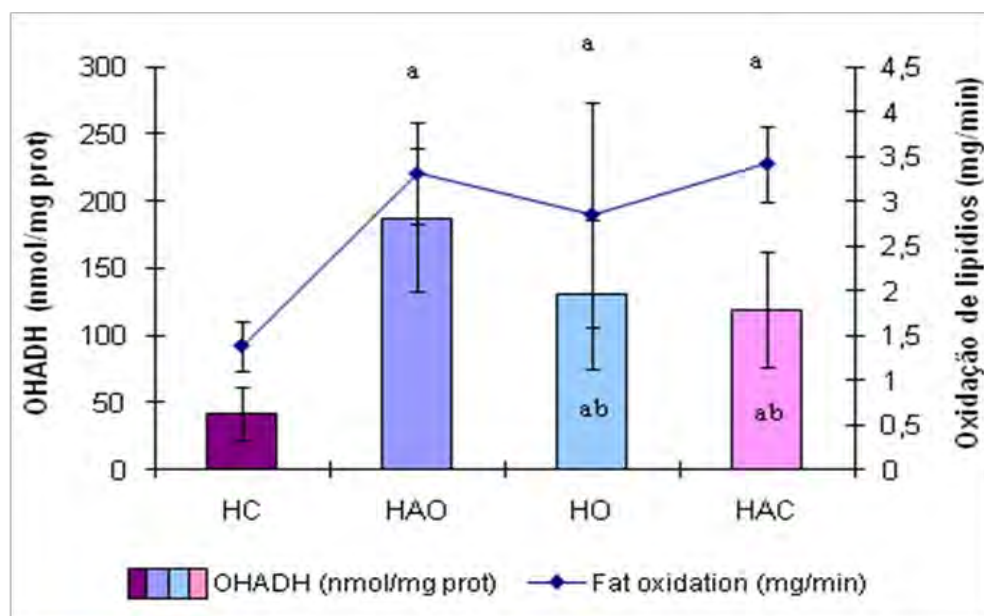


Figura 2. Atividade da enzima beta-hidroxil-CoA desidrogenase (OHADH) e oxidação de lipídios nos animais alimentados com ração hipercalórica sem suplementação (HC), que receberam azeite de oliva (HAO), oleuropeína (HO) e ácido caféico (HAC). ^aDiferença significativa em relação ao grupo HC; ^bDiferença significativa em relação ao grupo HAO.

Tabela 3. Valores de K_M (constante de Michaelis) e $V_{m\acute{a}x}$ (velocidade máxima) para a enzima -hidroxiacil coenzima A desidrogenase (OHADH) sem incubaco e com incubaces prévias do tecido cardíaco, com diferentes concentraes de ácido cafico e oleuropeína

	K_M (mM de aceto acetil-CoA)	$V_{m\acute{a}x}$ (mol/g tecido)
Sem incubaco	0,0193  0,016	70,707  6,468
cido cafico 0,67 mg/mL	0,0134  0,011	67,909  3,018
cido cafico 1,4 mg/mL	0,0125  0,009	66,938  2,446
Oleuropeína 0,057 mg/mL	0,0104  0,007	67,521  2,757
Oleuropeína 0,1134 mg/ml	0,0086  0,005	66,308  2,114

Valores expressos como média  desvio-padrão ($p < 0,05$). $v = V_{m\acute{a}x} [S] / K_M + [S]$. $V_{m\acute{a}x}$

Tabela 4. Valores de K_M (constante de Michaelis) e $V_{m\acute{a}x}$ (velocidade máxima) para a enzima citrato sintase (CS) sem incubaco e com incubaces prévias do tecido cardíaco, com diferentes concentraes de ácido cafico e oleuropeína

	K_M (mM de acetil coenzima A)	$V_{m\acute{a}x}$ (μ mol/g tecido)
Sem incubaco	0,098 $\pm$ 0,066	95,956 $\pm$ 5,500
cido cafico 0,67 mg/mL	0,101 $\pm$ 0,053	92,333 $\pm$ 10,941
cido cafico 1,4 mg/mL	0,094 $\pm$ 0,050	90,085 $\pm$ 4,242
Oleuropeína 0,057 mg/mL	0,099 $\pm$ 0,042	91,329 $\pm$ 3,547
Oleuropeína 0,1134 mg/ml	0,099 $\pm$ 0,049	90,849 $\pm$ 4,342

Valores expressos como média $\pm$ desvio-padrão ($p < 0,05$). $v = V_{m\acute{a}x} [S] / K_M + [S]$. $V_{m\acute{a}x}$

Tabela 5. Valores de K_M (constante de Michaelis) e $V_{m\acute{a}x}$ (velocidade máxima) para a enzima lactato desidrogenase (LDH) sem incubaco e com incubaces prévias do tecido cardíaco, com diferentes concentrações de ácido cafico e oleuropeína

	K_M (mM de piruvato)	$V_{m\acute{a}x}$ (μ mol/g tecido)
Sem incubaco	0,086 $\pm$ 0,071	233,719 $\pm$ 57,257
cido cafico 0,67 mg/mL	0,056 $\pm$ 0,046	223,934 $\pm$ 63,6777
cido cafico 1,4 mg/mL	0,085 $\pm$ 0,058	246,014 $\pm$ 46,086
Oleuropeína 0,057 mg/mL	0,094 $\pm$ 0,070	247,191 $\pm$ 45,678
Oleuropeína 0,1134 mg/ml	0,122 $\pm$ 0,117	254,453 $\pm$ 48,192

Valores expressos como média $\pm$ desvio-padrão ($p < 0,05$). $v = V_{m\acute{a}x} [S] / K_M + [S]$. $V_{m\acute{a}x}$

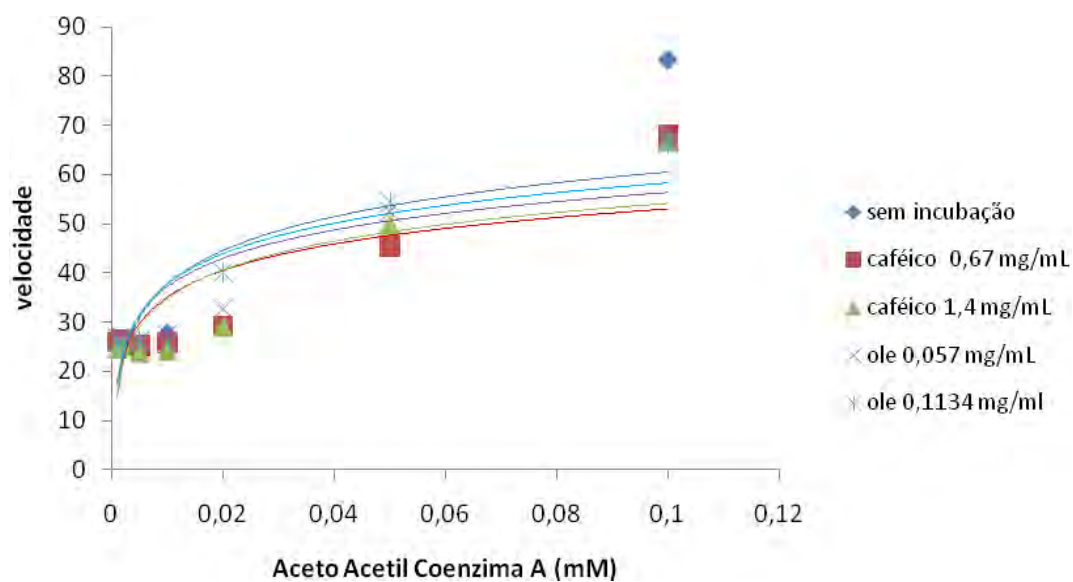


Figura 3. Gráfico de Michaelis-Menten para a atividade da enzima beta-hidroxiacil-CoA desidrogenase (OHADH) (U/mg de proteína) com substrato Aceto Acetil Coenzima A (mM) sem incubação (♦) e com diferentes valores de incubação: 0,67 mg/mL (■) e 1,4 mg/mL (▲) de ácido caféico e 0,057 mg/mL (×) e 0,1134 mg/mL (✕) de oleuropeína.

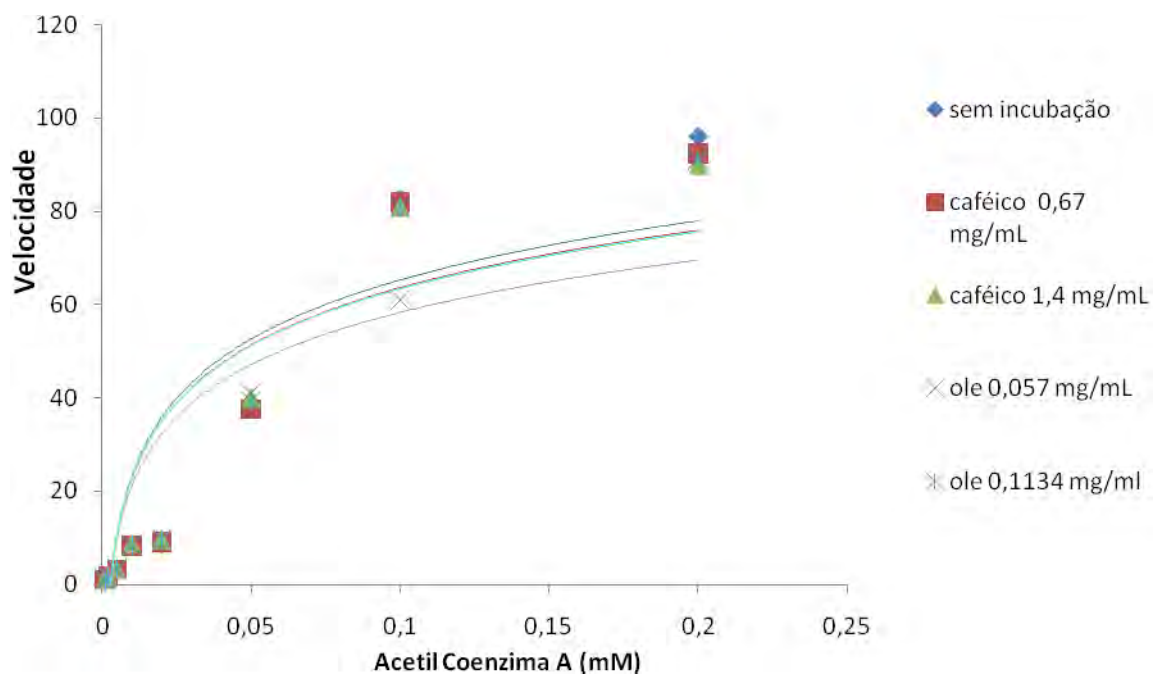


Figura 4. Gráfico de Michaelis-Menten para a atividade da enzima citrato sintase (CS) (U/mg d proteína) com substrato Acetil Coenzima A (mM) sem incubação (♦) e com diferentes valores de incubação: 0,67 mg/mL (▲ e 1,4 mg/mL (■ de ácido caféico e 0,057 mg/mL (×) e 0,1134 mg/mL (✕) de oleuropeína.

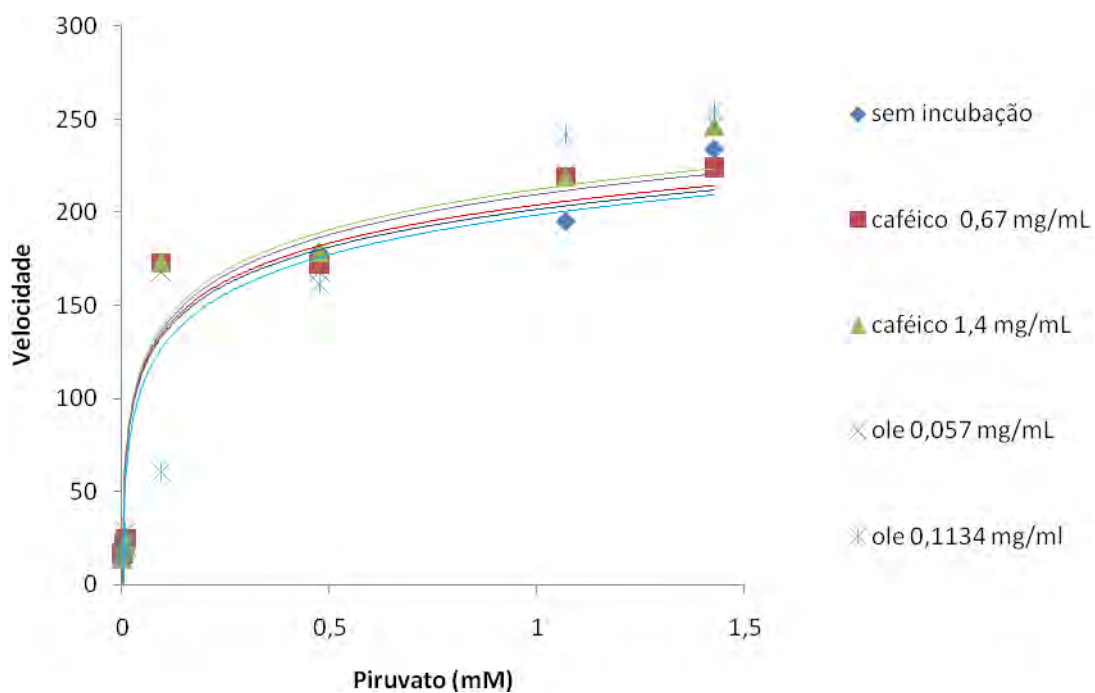


Figura 5. Gráfico de Michaelis-Menten (K_M) para a atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH) (U/mg d proteína) com substrato piruvato (mM) sem incubação (◆) e com diferentes valores de incubação: 0,67 mg/mL (▲) e 1,4 mg/mL (■) de ácido caféico e 0,057 mg/mL (×) e 0,1134 mg/mL (✕) de oleuropeína.

DISCUSSÃO

O azeite de oliva é a principal fonte de gordura da dieta na região do Mediterrâneo. Evidências recentes demonstraram que componentes secundários do azeite, particularmente os compostos fenólicos, têm importante contribuição para seus efeitos benéficos (Ruano et al., 2005, Fitó et al., 2005a, Visioli et al., 2005). Tem sido reportado que compostos fenólicos dietéticos possuem efeito protetor sobre os fatores de risco cardiovascular (Covas et al., 2006b, Covas 2007, Fitó & Covas, 2007).

O presente estudo demonstrou pela primeira vez, os efeitos do azeite de oliva e seus compostos fenólicos, oleuropeína e ácido cafeico sobre as atividades de enzimas reguladoras do metabolismo energético miocárdico e a cinética enzimática das enzimas reguladoras das vias metabólicas.

É notório o fato que o tecido cardíaco utiliza grande quantidade de oxigênio, desde que apresenta grande número de mitocôndrias e preferencialmente oxida ácidos graxos para obtenção de energia (Lopaschuk et al., 2007). Este conceito pode ser considerado um paradoxo, uma vez que a função cardíaca depende estritamente de oxigênio para obtenção de ATP através do metabolismo aeróbico, porém a fosforilação oxidativa, associada ao transporte mitocondrial de elétrons constitui importante fonte geradora de espécies radicalares, as quais podem induzir a lipoperoxidação de membranas mitocondriais, alterando consideravelmente o metabolismo energético miocárdico, diminuindo a disponibilidade de ATP para a contração muscular.

Azeite de oliva e seus fenóis não induziram alteração significativa no metabolismo energético miocárdio.

A redução na atividade da CS, enzima reguladora do fluxo de metabólitos pelo ciclo do citrato e marcadora da integridade da membrana mitocondrial nos animais PO sugere elevação da via glicolítica, em relação ao metabolismo aeróbio, ou redução no fluxo de metabólitos através do ciclo do ácido cítrico no tecido cardíaco de ratos PO. A glicólise é responsável pelo suprimento de energia nas membranas do sarcolema, onde a glicose é substrato para as enzimas glicolíticas associadas aos complexos moleculares sarcolemas (Lopaschuck et al., 2007). A via glicolítica representa, portanto, baixa capacidade, porém elevada especificidade na integração metabólica de miócitos cardíacos (Novelli et al.,

2009). Por outro lado, a redução na atividade da CS, no grupo PO, foi insuficiente para alterar as relações LDH/CS indicando balanço adequado entre os metabolismos anaeróbico e aeróbico no miocárdio destes animais. Também não foram evidenciadas alterações significantes na relação OHADH/CS indicando que moléculas de acetil coenzima A, resultantes da oxidação de ácidos graxos foram adequadamente metabolizadas no ciclo do citrato.

Embora tenha sido observada redução na atividade da OHADH no grupo PAC, a manutenção da atividade da CS e nas relações OHADH/CS e LDH/CS indicaram claramente que a redução na oxidação de ácidos graxos não foi suficiente para alterar as vias metabólicas e o suprimento de energia para o miocárdio destes animais (Tabela 1). A OHADH é enzima marcadora da oxidação de ácidos graxos e a atividade da LDH está associada ao metabolismo anaeróbico celular (Bass et al., 1969)

Os efeitos do azeite e seus fenóis na oxidação corporal de lipídios, como evidenciado pela calorimetria indireta (Capítulo 1) não foram refletidos no tecido cardíaco, nas atividades da OHADH e assim na oxidação de ácidos graxos no miocárdio. Nota-se na Figura 1 que suplementação com ácido cafeico (PAC) reduziu a atividade da OHADH miocárdica. Houve, entretanto, elevação na oxidação de lipídios nestes animais. A calorimetria indireta permite evidenciar o substrato utilizado para obtenção de energia pelo organismo, refletindo notadamente o metabolismo muscular e hepático (Noveli et al., 2010). Deste modo, a elevação na oxidação de lipídios evidenciada através da calorimetria indireta não se refletiu no tecido cardíaco de animais mantidos com dieta padrão.

Nos animais obesos, azeite de oliva e seus fenóis induziram elevação na oxidação de lipídios, evidenciado pela calorimetria indireta (Tabela 10, Capítulo 1). Estes efeitos foram refletidos no tecido cardíaco pela elevação nas atividades da OHADH (Tabela 2, Figura 2), a despeito da manutenção na atividade da enzima CS nestes animais.

O efeito do azeite de oliva e seus fenóis sobre a oxidação de ácidos graxos miocárdicos poderia estar associado ao gene SIRT 1 (Hou et al., 2008). SIRT 1 é dependente de adenosina monofosfato quinase (AMPQ), conhecida moduladora do estado energético celular, ativada pelo aumento da relação entre AMP/ATP, ou pela elevação na atividade de quinases, como LKB1 (quinase supressora tumoral) e Ca^{2+} /proteína quinase – β -quinase dependente de calmodulina (CaMKK β). Estimulo da AMPQ inibe a expressão do

complexo enzimático ácido graxo sintetase e a síntese de lipídios induzida pela elevada ingestão de carboidratos (Hou et al., 2008). Nestas condições ocorre diminuição na atividade da acetil coenzima-A carboxilase, reduzindo a formação de malonil coenzima A, precursor da síntese de ácidos graxos e modulador da carnitina acil transferase. Deste modo, ocorre diminuição na síntese de ácidos graxos e elevação na sua oxidação (Figura 6).

Tem sido demonstrado que dieta hipercalórica, rica em lipídios e sacarose induz efeitos adversos à função cardíaca através de alterações no metabolismo de ácidos graxos, pela inadequada ativação e expressão de PPAR α (peroxisome-proliferator-activated receptor α) em consequência da glicotoxicidade. PPAR α tem a função de regular a expressão de vários genes essenciais para o metabolismo lipídico e das lipoproteínas (Yoon, 2009). A diminuição na transcrição de PPAR α pode ser um evento regulatório para a redução da utilização de ácidos graxos (Wilson et al., 2007). Deste modo, oleuropeína e ácido caféico, poderiam permitir a adequada ativação do PPAR α e a utilização de ácidos graxos, elevando a atividade da enzima OHADH, em condições de obesidade, reduzindo o acúmulo de triacilgliceróis no músculo cardíaco. Tem sido evidenciado que os ativadores de PPAR α podem regular a obesidade em roedores tanto através da elevação da oxidação de ácidos graxos como diminuição dos níveis circulantes de triacilgliceról responsável pela hipertrofia e hiperplasia de células adiposas (Yoon, 2009).

A melhora no metabolismo energético cardíaco em condições de obesidade pode ser um método para prevenir e tratar a disfunção cardíaca (Lopaschuck et al., 2007; Novelli et al., 2010).

Deste modo, pode-se concluir que azeite de oliva e seus fenóis induziram elevação na oxidação de ácidos graxos otimizando energia para metabolismo cardíaco e impedindo o acúmulo de triacilgliceróis no miocárdio, em condições de obesidade.

A oxidação de ácidos graxos para obtenção de energia requer elevada concentração de oxigênio, podendo constituir fonte endógena para liberação de radicais livres, deste modo a elevação na oxidação da glicose miocárdica que requer proporcionalmente menor quantidade de oxigênio, pode apresentar efeitos benéficos, permitindo adequada obtenção de energia em condições de baixa tensão de oxigênio, constituindo importante alvo da terapia metabólica. Sendo assim, componentes da dieta capazes de modular o metabolismo energético podem apresentar importante papel terapêutico.

Curcelli et al, 2008 realizaram um modelo de pré-incubação para testar a possibilidade de ativação do diclofenaco sobre a enzima superóxido dismutase. Não foram evidenciados efeitos sobre a velocidade máxima da enzima SOD, porém observaram redução significativa da constante de Michaelis-Menten (K_M) indicando que o diclofenaco induziu ativação da SOD elevando sua afinidade pelo sítio catalítico do substrato. Desai e colaboradores (1996) demonstraram que as alterações no músculo gastrocnêmio observadas no envelhecimento estavam associadas à elevação no K_M de componentes do sistema transportador de elétrons no músculo gastrocnêmio. Segundo estes autores, alterações decorrentes do envelhecimento no sistema transportador de elétrons mitocondrial podem contribuir para a diminuição na função do músculo esquelético.

No presente trabalho, além dos estudos *in vivo* realizados nos animais dos grupos experimentais, foram realizados estudos *in vitro* visando determinar o mecanismo de ação do ácido cafeico e da oleuropeína sobre a cinética das enzimas lactato desidrogenase, beta-hidroxiacil-CoA desidrogenase, bem como da citrato sintase.

Os efeitos biológicos *in vivo* da administração de oleuropeína e ácido cafeico não mostraram concordância com a cinética enzimática obtida no estudo *in vitro* (Figuras 3, 4 e 5), desde que a incubação com oleuropeína e ácido cafeico não alterou significativamente o K_M e a $V_{m\acute{a}x}$ das enzimas estudadas. Tanto o ácido cafeico como a oleuropeína não apresentaram efeitos sobre os valores de K_M e/ou velocidade máxima das enzimas estudadas. Parece, portanto provável que os compostos fenólicos estudados não atuaram como inibidores, ou estimuladores das vias metabólicas estudadas.

Desde que os compostos fenólicos isolados não induziram efeitos significantes nas cinéticas das enzimas estudadas, concluiu-se que os efeitos biológicos dos compostos fenólicos do azeite de oliva nas enzimas miocárdicas são evidenciados após administração em doses pequenas e por longo tempo de ingestão.

Compostos Fenólicos

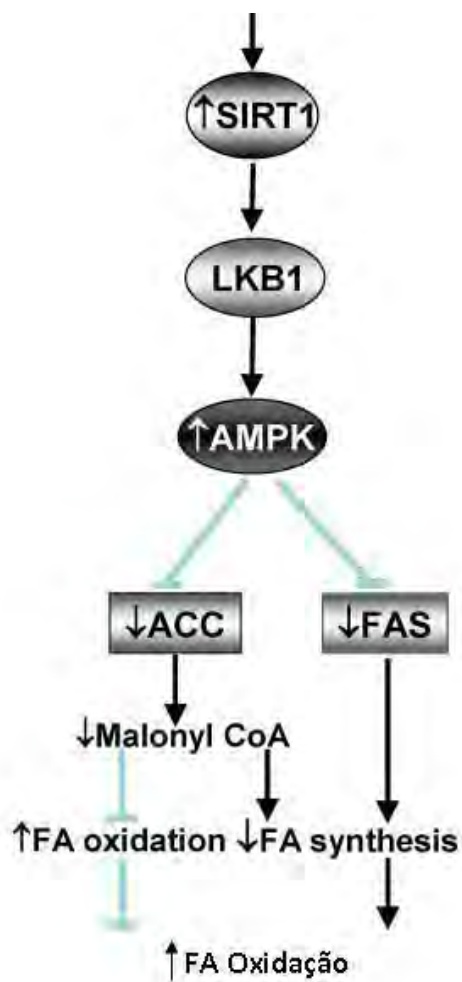


Figura 6. Ativação da oxidação lipídica por compostos fenólicos. LKB1 quinase supressora tumoral; AMPK, proteína quinase dependente de AMP; ACC, acetil coenzima A carboxilase; FAS, síntese de ácidos graxos, FA oxidation, oxidação de ácidos graxos; FA synthesis, síntese de ácidos graxos (Hou et al., 2008).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS *

- Aldini G, Piccoli A, Beretta G, Morazzoni P, Riva A, Marinello C, et al. Antioxidant activity of polyphenols from solid olive residues of c.v. coratina. *Fitoterapia*. 2006;77:121-8.
- Bass A, Brdiczka D, Eyer P, Hofer S, Pette D. Metabolic differentiation of distinct muscle at the level of enzymatic organization. *Eur J Biochem*. 1969;10:198-206.
- Bondia-Pons I, Schröder H, Covas MI, Castellote AI, Kaikkonen J, Poulsen HE, et al. Moderate consumption of olive oil by healthy European men reduces systolic blood pressure in non-mediterranean participants. *J Nutr*. 2007;137:84-7.
- Bouayed J, Bohn T. Exogenous antioxidants-Double-edged swords in cellular redox state. Health beneficial effects at physiologic doses versus deleterious effects at high doses. *Oxid Med Cell Longev*. 2010;3:228-37.
- Carluccio MA, Siculella L, Ancora MA, Massaro M, Scoditti E, Storelli C, et al. Olive oil and red wine antioxidant polyphenols inhibit endothelial activation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003;23:622-9.
- Champe PC, Harvey RA, Ferrier DR. *Bioquímica Ilustrada*. Porto Alegre: Editora Artmed; 2007. p.533.
- Chou TC, Talalay P. A simple generalized equation for the analysis of multiple inhibitions of Michaelis-Menten kinetic systems. *J Biol Chem*. 1977;252:6438-42.

* International Committee of Medical Journal Editors. Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journal: sample references.[homepage on the Internet]. Bethesda: U.S. National Library of Medicine; 2003[last updated 2009 May 14]. Available from:http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

National Library of Medicine. List of journals indexed in Index Medicus. Washington: NLM; 2007. 325p.

Costa NMB, Walker AF, Low AG. The effect of graded inclusion of baked beans (*Phaseolus vulgaris*) on plasma and liver lipids in hypercholesterolaemic pigs given a Western - type diet. *Br J Nutr.* 1993;70:515-24.

Covas MI, de la Torre K, Farré-Albaladejo M, Kaikkonen J, Fitó M, Lopez-Sabater MC, et al. Postprandial LDL phenolic content and LDL oxidation are modulated by phenolic compounds in human. *Free Radic Biol Med.* 2006a;40:608-16.

Covas MI, Nyyssonen K, Poulsen HE, Kaikkonen J, Zunft HJ, Kieseewetter H, et al. EUROLIVE Study Group. The effect of polyphenols in olive oil on heart disease risk factors: a randomized trial. *Ann Intern Med.* 2006b;145:333-41.

Covas MI. Olive oil and the cardiovascular system. *Pharmacol Res.* 2007;5:175-86.

Curcelli EC, Muller SS, Novelli Filho, JLVB. Beneficial effects of diclofenac therapy on serum lipids, oxidized low-densitylipoprotein and antioxidant defenses in rats. *Life Sci.* 2008;82:892-8.

Desai VG, Weindruch R, Hart RW, Feuers RJ. Influences of Age and Dietary Restriction on Gastrocnemius Electron Transport System Activities in Mice. *Arch Biochem Biophys.* 1996;333:145-51.

Diniz YS, Rocha KKHR, Souza GA, Galhardi CM, Ebaid GMX, Rodrigues HG, et al. Effects of N-acetylcysteine on sucrose-rich diet-induced hyperglycaemia, dyslipidemia and oxidative stress in rats. *Eur J Pharmacol.* 2006;543:151-7.

Dogan M. Neohesperidin DC in food products. *Proc ICNP.* 2002;190-5.

Dowd JE, Riggs DS. A comparison of estimates of Michaelis-Menten kinetic constants from various linear transformations. *J Biol Chem.* 1965;240:863-9.

Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev.* 2002;82:47-95.

Esposito LA, Melov VS, Cottrell BA. Mitochondrial disease in mouse resulting increased oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci.*1999;96:4820-5.

Faine LA, Diniz YS, Galhardi CM, Rodrigues HG, Burneiko RC, Santana LS, et al. Synergistic action of olive oil supplementation and dietary restriction on serum lipids and cardiac antioxidant defences. *Can J Physiol Pharmacol.* 2004;82:969-75.

Faine LA, Rodrigues HG, Galhardi CM, Ebaid GMX, Diniz YS, Fernandes AAH, et al. Butyl hydroxytoluene (BHT)-induced oxidative stress: Effects on serum lipids and cardiac energy metabolism in rats. *Exp Toxicol Pathol.* 2006a;57:221-6.

Faine LA, Rodrigues HG, Galhardi CM, Ebaid GMX, Diniz YS, Padovani CR, et al. Effects of olive oil and its minor constituents on serum lipids, oxidative stress, and energy metabolism in cardiac muscle. *Can J Physiol Pharmacol.* 2006b;84:239-45.

Ferrari R, Agnoletti L, Comini L, Gaia G, Bacchetti T, Cargnoni A, et al. Oxidative stress during myocardial ischemia and heart failure. *Eur Heart J.* 1998;19 Suppl B:B2-B11.

Fitó M de la TR, Covas MI. Olive oil and oxidative stress. *Mol Nutr Food Res.* 2007;51:1215-24.

Fitó M, Cladellasc M, De La Torre R, Marti J, Alcantara M, Pujadas-Bastardes M, et al. Antioxidant effect of virgin olive oil in patients with stable coronary heart disease: randomized, crossover, controlled, clinical trial. *Atherosclerosis.* 2005a;181:149-58.

Fitó M, Cladellasc M, De La Torre R, Marti J, Alcantara M, Pujadas-Bastardes M, et al. Antioxidant effect of virgin olive oil in patients with stable coronary heart disease: randomized, crossover, controlled, clinical trial. *Atherosclerosis.* 2005b;181:149-58.

Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M, Iwaki M, Yamada Y, Nakajima Y, et al. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J Clin Invest.* 2004;114:1752-61.

Gómez-Alonso S, Salvador MD, Fregapane G. Phenolic compounds profile of cornicabra virgin olive oil. *J Agric Food Chem*. 2002;50:6812-7.

Hadj A, Pepe S, Marasco S, Rosenfeldt F. The principles of metabolic therapy for heart disease. *Heart Lung Circ*. 2003;12:S55-62.

Henning SI, Wambolt RB, Schonckess BO. Contribution of glycogen to aerobic myocardial glucose utilization. *Circulation*. 1996;93:1549-55.

Hillestrøm PR, Covas MI, Poulsen HE. Effect of dietary virgin olive oil on urinary excretion of etheno–DNA adducts. *Free Radic Biol Med*. 2006;41:1133-8.

Hou X, Xu S, Maitland-Toolan M, Sato K, Jiang B, Ido Y, et al. SIRT 1 regulates hepatocyte lipid metabolism through activating AMP-activated protein kinase. *Am Soc Biochem Mol Biol*. 2008;283:20015-26.

Kelly CM, Smith RD, Williams CM. Dietary monounsaturated fatty acids and homeostasis. *Proc Nutr Soc*. 2001;60:161-70.

Larsen LF, Jespersen J, Marckmann P. Are olive oil antithrombotic? Diets enriched with olive, rapeseed, or sunflower olive affect postprandial factor VII differently. *Am J Clin Nutr*. 1999;70:976-82.

Lee J, Yu BP, Herlihy JT. Modulation of cardiac mitochondrial membrane fluidity by age and calorie intake. *Free Radic Biol Med*. 1999;26:260-5.

Llorente-Cortés V, Estruch R, Mena M P, Ros E, Gonzales MA, Fito M, et al. Effect of a Mediterranean diet on the expression of pro-atherogenic genes in a population at high cardiovascular risk. *Atherosclerosis*. 2010;208:442-50.

Lopaschuk GD, Folmes CDL, Stanley WC. Cardiac energy metabolism in obesity. *Cir Res*. 2007;101:335-47.

Lopaschuk GD, Rebeyca IM, Allard MF. Metabolic modulation. A means to mend a broken heart. *Circulation*. 2002;105:140-2

Mallet RT. Pyruvate: Metabolic protector of cardiac performance. *Proc Soc Exp Biol Med*. 2000;223:136-48.

Manach C, Scalbert A, Morand C, Remesy C, Jimenez L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr*. 2004;79:727-47.

Montedoro GF, Servili M, Baldioli M, Miniati E. Simple and hydrolyzable phenolic compounds in virgin olive oil: 1 . Their extraction, separation, and quantitative and semiquantitative evaluation by HPLC. *J Agric Food Chem*. 1992;40:1571-8.

Moura RA. Técnicas de laboratório. 2a ed. São Paulo: Atheneu; 1982. 822p.

Nelly JR, Morgan HE. Relationship between carbohydrate and lipid metabolism and energy balance of heart muscle. *Ann Rev Physiol*. 1974;36:413-59.

Nishiyama Y, Ikeda , Haramaki N, Yoshida N, Imaizumi T. Oxidative stress is related to exercise intolerance in patients with heart failure. *Am Heart J*. 1998;135:115-20.

Norman GR, Streiner DL. Biostatistic – the base essentials. St. Louis: Mosby Year Book; 1994. 260p.

Novelli ELB, Santos P, Assalin H, Souza G, Rocha K, Ebaid G, et al. N-acetylcysteine in high-sucrosediet-induced obesity: energy expenditure and metabolic shifting for cardiac health. *Pharmacol Res*. 2009;59:74-9.

Novelli ELB, Diniz YS, Galhardi CM, Souza G, Rocha K, Ebaid GX, et al. Anthropometrical parameters and markers of obesity in rats. *Lab Anim*. 2007;41:111-9.

Novelli ELB, Fernandes AAH, Campos KE, Diniz YS, Almeida JA, Faine LA, et al. The adverse effect of a high energy dense diet on cardiac tissue. *J Nutr Environ Med*. 2002;12:287-94.

Novelli ELB, Souza GA, Ebaid GMX, Rocha KKHR, Seiva FRF, Mani F, et al. Energy expenditure and oxygen consumption as novel biomarkers of obesity-induced cardiac disease. *Obesity*. 2010;18:1754-61.

Novelli ELB. *Nutrição e vida saudável – estresse oxidativo e metabolismo energético*. Ribeirão Preto: Tecmed; 2005.

Perona JS, Cabello-Moruno R, Ruiz-Gutierrez V. The role of virgin olive oil components in the modulation of endothelial function. *J Nutr Biochem*. 2006;17:429-45.

Pietiläinen KH, Korkeila M, Bogl LH, Westerterp KR, Yki-Järvinen H, Kaprio J, et al. Inaccuracies in food and physical activity diaries of obese subjects: complementary evidence from doubly labeled water and co-twin assessments. *Int J Obesity*. 2010;34:437-45.

Razquin C, Martínez JA, Martínez-González JA, Salvadó-Salas J, Estruch R, Martí A. A 3-year Mediterranean style dietary intervention may modulate the association between adiponectin gene variants and body weight change. *Eur J Nutr*. 2009;49:311-9.

Ritchie RJ, Prvan T. A simulation study on designing experiments to measure the K_m of Michaelis-Menten kinetics curves. *J Theor Biol*. 1996;178:239-54.

Ruano J, Lopez-Miranda J, Fuente F, Moreno JA, Bellido C, Perez-Martinez P, et al. Phenolic content of virgin olive oil improves ischemic reactive hyperemia hypercholesterolemic patients. *J Am Coll Cardiol*. 2005;46:1864-8.

Seiva FRF, Amauchi JF, Rocha KKHR, Souza GA, Ebaid GM, Burneiko RC, et al. Effects of N-acetylcysteine on alcohol abstinence and alcohol induced adverse effects in rats. *Alcohol*. 2009;43:127-35.

Seiva FRF, Ebaid G, Castro AV, Okoshi K, Nascimento A, Rocha K, et al. Growth hormone and heart failure: oxidative stress and energetic metabolism in rats. *Growth Horm IGF Res.* 2008;18:275-83.

Serra-Majem L, Cruz N, Ribas L, Tur JA. Olive oil and the mediterranean diet: beyond the rhetoric. *Eur J Clin Nutr.* 2003;57:S2-S7.

Servili M, Selvaggini R, Taticchi A, Esposito S, Montedoro G. Volatile compounds and phenolic composition of virgin olive oil: optimization of temperature and time of exposure of olive pastes to air during mechanical extraction process. *J Agric Food Chem.* 2003;51:7980-8.

Souza GA, Ebaid GMX, Seiva FRF, Rocha KHR, Galhardi CM, Mani F, et al. N-Acetylcysteine an Allium plant compound improves high-sucrose diet-induced obesity and related effects. *eCAM Adv Access.* 2008;1-7.

Torre-Carbot K, Chávez-Servín JL, Jaúregui O, Castellote AI, Lamuela-Raventós RM, Nurmi T, Poulsen HE, et al. Elevated circulating LDL phenol levels in men Who consumed virgin rather than refined olive oil are associated with less oxidation of plasma LDL. *J Nutr.* 2010;140:501-8.

Tripoli E, Giammanco M, Tabacchi G, Majo D, Giammanco S, La Guardia M. The phenolic compounds of olive oil: structure, biological activity and beneficial effects on human health. *Nutr Res Rev.* 2005;18:98-112.

Tuck KL, Hayball PJ. Major phenolic compounds in olive oils: metabolism and health effects. *J Nutr Biochem.* 2002;13:636-44.

Visioli F, Bogani P, Grande S, Galli C. Mediterranean food and health: building human evidence. *J Physiol Pharmacol.* 2005;56 Suppl 1:37-49.

- Visioli F, Caruso, D, Grande S, Bosisio F, Villa M, Galli G, et al. Virgin olive oil Study (VOLOS): vasoprotective potential of extra virgin olive oil in mildly dyslipidemic patients. *Eur J Nutr*. 2005;44:121-7.
- Visioli F, Galli C. The effect of minor constituents of olive oil on cardiovascular disease: new findings. *Nutr Rev*. 1998;56:142-7.
- Vissers MN, Zock PI, Katan MB. Bioavailability and antioxidant effects of olive oil phenols in humans. *Clin Nutr*. 2004;58:955-65.
- Waterman E, Lockwood B. Active components and clinical applications of olive oil. *Altern Med Rev*. 2007;12:331-42.
- Wilson CR, Tran MK, Salazar KL, Young ME, Taegtmeyer H. Western diet, but not high fat diet, causes derangements of fatty acid metabolism and contractile dysfunction in the heart of Wistar rats. *Biochem J*. 2007;406:457-67.
- Yeum K-J, Russel RM, Krinsky NI, Aldini G. Biomarkers of antioxidant capacity in the hydrophilic and lipophilic compartments of human plasma. *Arch Biochem Biophys*. 2004;430:97-103.
- Yoon M. The role of PPAR α in lipid metabolism and obesity: Focusing on the effects of estrogen on PPAR α actions. *Pharmacol Res*. 2009;60:151-9.
- Yue TL, Ruffolo RR, Feuerstein G. Antioxidant action of carvedilol: a potential role in treatment of heart failure. *Heart Fail Rev*. 1999;4:39-51.
- Zar JH. Biostatistical analysis. 4a ed. New Jersey: Practice-Hall; 1994. 663p.