



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
BIOQUÍMICA TOXICOLÓGICA**

**EFEITOS DA *Campomanesia xanthocarpa* EM PARÂMETROS
BIOQUÍMICOS, HEMATOLÓGICOS E DE ESTRESSE OXITATIVO EM
PACIENTES HIPERCOLESTEROLÊMICOS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Jonatas Zeni Klafke

Santa Maria, RS, Brasil

2009

**EFEITOS DA *Campomanesia xanthocarpa* EM PARÂMETROS
BIOQUÍMICOS, HEMATOLÓGICOS E DE ESTRESSE OXITATIVO EM
PACIENTES HIPERCOLESTEROLÊMICOS**

Por

Jonatas Zeni Klafke

Dissertação apresentada ao curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica**

Orientador: Prof. Dr. Juliano Ferreira

Santa Maria, RS, Brasil

2009

Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Naturais e Exatas
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas:
Bioquímica Toxicológica

A comissão examinadora, abaixo assinada,
Aprova a Dissertação de Mestrado

**EFEITOS DA *Campomanesia xanthocarpa* EM PARÂMETROS
BIOQUÍMICOS, HEMATOLÓGICOS E DE ESTRESSE OXITATIVO EM
PACIENTES HIPERCOLESTEROLÊMICOS**

elaborada por

Jonatas Zeni Klafke

Como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica

COMISSÃO EXAMINADORA

Juliano Ferreira, Dr. (Orientador)

Michel Fleith Otuki, Dr. (UEPG)

Margareth Linde Athayde, Dra. (UFSM)

Santa Maria, 16 de novembro de 2009

Dedico este trabalho a todos aqueles que estão contidos numa energia cósmica fraterna de amor, a qual justifica o fato de muitos estarem longe e continuarem presentes em minha existência, alimentando a minha alma e dando sentido a minha caminhada.

AGRADECIMENTOS

Para expressar minha gratidão tem que ser a palavra que ainda não há. Tem que ser o gesto que ainda não feito, e as frases que eu nunca escrevi. Talvez por isso mesmo eu não consiga dizer o que preciso. O que todos merecem. Mas ainda assim, tentarei, e minha gratidão é eterna e sincera.

A Tua presença é qualquer coisa como a luz e a vida, e eu sinto que em meu gesto existe o Teu gesto, e em minha voz a Tua voz. Agradeço a Deus por sempre me guiar com a sua luz divina.

A minha família, em especial, meus pais Jonas e Ieda, e minha avó Odete, gostaria de agradecer o incentivo constante e a oportunidade dada por vocês, que me acompanharam durante meus momentos difíceis, dando-me forças para prosseguir, ou nos momentos felizes, compartilhando minha alegria.

Ao meu orientador, Juliano Ferreira, por esta etapa cumprida, pela oportunidade de crescimento e pela orientação com sabedoria. Um orientador ímpar e exemplar, cuja compreensão, generosamente compartilhada junto com o seu apoio resolutivo, guiou minhas palavras confusas em sua transformação em idéias coerentes. Simplesmente, meu muito obrigado.

Ao meu amigo Paulo Ricardo Nazário Viecili que também orientou parte deste estudo. Se sou vencedor é porque recebi sua compreensão e apoio. A você que sempre me incentivou durante estes anos todos, obrigado!

Aos professores componentes da banca, Michel Fleith Otuki e Margareth Linde Athayde, por aceitarem participar da avaliação deste trabalho.

Aos meus professores e colegas por todos os ensinamentos que contribuíram para o meu crescimento pessoal e profissional.

Aos meus queridos colaboradores, Mateus Fortes Rossato e Flávia Karine Rigo, pela ajuda incondicional, pela dedicação, pela lealdade, pela amizade e por

contribuírem muito para a minha formação profissional. Obrigado por tornarem tão agradável a realização deste trabalho.

A minha colega e amiga Mariane Arnoldi da Silva pela amizade, por um olhar de apoio, um gesto de compreensão e paciência, um ombro amigo, uma palavra de incentivo. Acredito que não existam palavras para expressar minha gratidão a você.

Aos meus colegas do LABNEURO pela ajuda incondicional, companheirismo, desabafos e incentivos, além de vários momentos de descontração. Foi e continuará sendo muito bom trabalhar com vocês.

Agradeço, enfim, à Universidade Federal de Santa Maria e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica Toxicológica); à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudos; à Universidade de Cruz Alta e ao Instituto de Cardiologia de Cruz Alta.

A todos aqueles que, de uma forma e outra, compartilham de meus ideais, a minha gratidão e respeito. Obrigado!

“A boa absorção ou abertura de consciência acontece somente no momento em que não nos prendemos na forma. Aprofundarmo-nos no conteúdo real quer dizer: ‘Quem não quebra a noz, só lhe vê a casca’. Mas para ‘quebrar a noz’ é preciso senso e noção, base e atributos que requerem tempo para se desenvolverem convenientemente.”

Francisco do Espírito Santo Neto
ditado por Hammed

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

EFEITOS DA *Campomanesia xanthocarpa* EM PARÂMETROS BIOQUÍMICOS, HEMATOLÓGICOS E DE ESTRESSE OXIDATIVO EM PACIENTES HIPERCOLESTEROLÊMICOS

Autor: Jonatas Zeni Klafke

Orientador: Juliano Ferreira

Data e Local da defesa: Santa Maria, 16 de novembro de 2009.

No Sul do Brasil, a planta *Campomanesia xanthocarpa* Berg. (Myrtaceae), popularmente conhecida como “guavirova”, tem sido empiricamente usada por seu efeito potencial em reduzir os níveis de colesterol sanguíneo. Uma vez que não há dados científicos confirmando seu uso popular, o alvo do presente estudo foi investigar os efeitos da *C. xanthocarpa* nos parâmetros bioquímicos, hematológicos, antropométricos e de estresse oxidativo em pacientes hipercolesterolêmicos. Trinta e três pacientes foram selecionados de acordo com os níveis de colesterol total (CT): 200-240 mg/dL, níveis indesejáveis (NI), e > 240 mg/dL, níveis hipercolesterolêmicos (NH). Os pacientes NI e NH foram randomicamente divididos em grupo controle (GC), que recebeu cápsulas placebo, e grupo experimental 250 (GE 250) ou 500 (GE 500), que recebeu 250 ou 500 mg de *C. xanthocarpa* encapsulada. Todos os grupos receberam uma dieta com restrição a colesterol e cápsulas diariamente. Os parâmetros bioquímicos (CT, triacilgliceróis, HDL, LDL e VLDL), hematológicos (hematócrito e hemoglobina), antropométricos (peso e circunferência abdominal) e de estresse oxidativo (proteína carbonilada) foram mensurados antes, 45 e 90 dias depois do tratamento. Não houve nenhuma alteração significativa nos parâmetros bioquímico, hematológico, antropométrico e de estresse oxidativo em pacientes NI de todos os grupos. Entretanto, uma redução significativa nos níveis de CT e LDL foi observada em pacientes NH do GE 500 (redução de 28 ± 3 e $45\pm 4\%$ para os níveis antes do tratamento) em relação aos pacientes do GC (redução de 12 ± 2 e $29\pm 4\%$). Além disso, uma redução significativa no estresse oxidativo foi observada em pacientes NH do GE 250 ($51\pm 12\%$) e GE 500 ($34\pm 18\%$) quando comparado com os níveis antes do tratamento. Uma correlação positiva entre os níveis de proteína carbonilada e CT foi observada. Finalmente, foi demonstrado que o extrato de *C. xanthocarpa* possui propriedade antioxidante e atividade inibitória da 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A redutase *in vitro*. Confirmando seu uso popular, o tratamento com *C. xanthocarpa* reduziu os níveis de CT e LDL sanguíneos em pacientes hipercolesterolêmicos. Além dos seus efeitos nos níveis de colesterol, esta planta reduziu o estresse oxidativo no plasma de pacientes hipercolesterolêmicos.

Palavras-chave: *Campomanesia xanthocarpa*, Myrtaceae, 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A redutase, hipercolesterolemia, planta medicinal, proteína carbonilada, estresse oxidativo.

ABSTRACT

Dissertation of Master's Degree
Graduating Program in Biological Sciences (Toxicological Biochemistry)
Federal University of Sants Maria, RS, Brazil

EFFECTS OF *Campomanesia xanthocarpa* ON BIOCHEMICAL, HEMATOLOGICAL AND OXIDATIVE STRESS PARAMETERS IN HYPERCHOLESTEROLEMIC PATIENTS

Author: Jonatas Zeni Klafke

Advisor: Juliano Ferreira

Place and date: Santa Maria, november 16st, 2009.

In Southern Brazil, the plant *Campomanesia xanthocarpa* Berg. (Myrtaceae), popularly known as "guavirova", has been empirically used for its potential effect in reducing blood cholesterol levels. Since there are no scientific data confirming its popular use, the aim of the present study was to investigate the effect of *C. xanthocarpa* on biochemical, hematological, anthropometrical and oxidative stress parameters in hypercholesterolemic patients. Thirty three patients were selected according to total cholesterol (TC) levels: 200-240 mg/dL, undesirable level (UL), and >240 mg/dL, hypercholesterolemic level (HL). UL or HL patients were randomly divided into control group (CG), which received placebo capsules, and experimental group 250 (EG 250) or 500 (EG 500), which received either 250 or 500 mg of encapsulated *C. xanthocarpa*. All groups received a cholesterol restriction diet and capsules once a day. The biochemical (TC, triglycerides, HDL, LDL and VLDL), hematological (hematocrit and hemoglobin), anthropometrical (weight and abdominal circumference) and oxidative stress (protein carbonyl) parameters were measured before, 45 and 90 days after the treatment started. There was no alteration on biochemical, hematological, anthropometric or oxidative stress parameters in UL patients of all groups. However, a significant decrease in TC and LDL levels was observed in HL patients from EG 500 group (reduction of 28±3 and 45±4% to levels before treatment) in relation to CG group patients (reduction of 12±2 and 29±4%). Moreover, a significant reduction in oxidative stress was observed in HL patients of EG 250 (51±12%) and EG 500 groups (34±18%) when compared to levels before treatment. A positive correlation between plasma oxidative stress PC and TC levels was observed. Finally, was demonstrated that *C. xanthocarpa* extract possesses anti-oxidant properties and 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitory activity in vitro. Confirming its popular use, the treatment with *C. xanthocarpa* encapsulated reduced blood TC and LDL levels in hypercholesterolemic patients. Besides its effect on cholesterol levels, this plant reduced the oxidative stress in plasma of hypercholesterolemic patients as well.

Keywords: *Campomanesia xanthocarpa*, Myrtaceae, 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase, hypercholesterolemia, medicinal plant, protein carbonyl, oxidative stress.

LISTA DE ABREVIATURAS

apo	apolipoproteínas
PTCE	proteína de transferência de colesterol esterificado
GC	grupo controle
CML	células musculares lisas
CT	colesterol total
DAC	doença arterial coronariana
GE 250	grupo experimental 250
EROs	espécies reativas de oxigênio
H ₂ O ₂	peróxido de hidrogênio
HDL	lipoproteínas de densidade alta
HMG-CoA	3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A
IDL	lipoproteínas de densidade intermediária
LCAT	lecitina colesterol acil transferase
LDL	lipoproteínas de densidade baixa
Lp(a)	lipoproteína (a)
NO	óxido nítrico
O ₂ ⁻	ânion superóxido
TG	triacilgliceróis
VLDL	lipoproteínas de densidade muito baixa

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

REVISÃO DE LITERATURA

Figura 1. Foto ilustrativa das folhas e do fruto de <i>Campomanesia xanthocarpa</i>	21
--------------------------------------------------------------------------------------------------	----

MANUSCRITO

Figure 1. Trial profile.....	49
-------------------------------------	----

Figure 2. Effects of <i>C. xanthocarpa</i> in total cholesterol in the doses of 250 mg and 500 mg in hypercholesterolemic patients and control subjects before and 45 or 90 days after treatment started.....	49
----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

Figure 3. Effects of <i>C. xanthocarpa</i> in LDL in the doses of 250 mg and 500 mg in hypercholesterolemic patients and control subjects before and 45 or 90 days after treatment started.....	50
--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

Figure 4. Effects of <i>C. xanthocarpa</i> in plasmatic carbonyl protein in the dose of 250 mg in undesirable level patients and control subjects (A), and in the doses of 250 mg and 500 mg in hypercholesterolemic patients and control subjects (B) before and 90 days after treatment started. (C) Pearson correlation analysis between carbonyl protein and TC levels.....	51
----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

Figure 5. Action of <i>C. xanthocarpa</i> on plasmatic protein carbonylation induced by hydrogen peroxide <i>in vitro</i>	52
----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

Table I. Some characteristics of the experimental groups before treatment....	53
--------------------------------------------------------------------------------------	----

Table II. Triglycerides, VLDL and HDL levels of patients before and 90 days after <i>C. xanthocarpa</i> treatment.....	54
-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

APÊNDICE

Figura 1. Efeitos da <i>C. xanthocarpa</i> no colesterol total na dose de 250 mg em pacientes com níveis indesejáveis de colesterol e pacientes do grupo controle, antes e 45 ou 90 dias depois do tratamento iniciado.....	76
------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

Figura 2. Efeitos da <i>C. xanthocarpa</i> na LDL na dose de 250 mg em pacientes com níveis indesejáveis de colesterol e pacientes do grupo controle, antes e 45 ou 90 dias depois do tratamento iniciado.	77
Figura 3. Curva concentração-resposta para o extrato e infusão de <i>C.xanthocarpa</i> e quercetina (1-300 µg/mL) no teste da redução do radical ABTS <i>in vitro</i>	78
Figure 4. Curva de concentração-resposta para <i>C. xanthocarpa</i> na atividade de 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase.....	79

SUMÁRIO

RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	ix
LISTA DE ABREVIATURAS.....	x
LISTA DE FIGURAS E TABELAS.....	xi
1. APRESENTAÇÃO.....	1
2. INTRODUÇÃO.....	3
3. OBJETIVOS.....	6
3.1. Objetivo Geral.....	7
3.2. Objetivos Específicos.....	7
4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	8
4.1. Metabolismo lipídico.....	9
4.1.1. Aspectos gerais.....	9
4.1.2. Hipercolesterolemia.....	12
4.1.3. Aterogênese.....	13
4.2. Mecanismos patofisiológicos do estresse oxidativo e a aterosclerose.....	14
4.3. Terapia não medicamentosa e medicamentosa da hipercolesterolemia.....	15
4.3.1. Terapia não medicamentosa.....	15
4.3.2. Terapia medicamentosa.....	17
4.4. <i>Campomanesia xanthocarpa</i>	18
5. ARTIGO.....	22
6. DISCUSSÃO.....	56
7. CONCLUSÕES.....	62
8. REFERÊNCIAS.....	64
9. APÊNDICE.....	75
Apêndice - Resultados Complementares.....	76

1. APRESENTAÇÃO

Os resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma de artigo, o qual se encontra no item artigo. As seções Materiais e Métodos e Resultados, encontram-se no próprio artigo.

Os itens discussão, conclusões e referências bibliográficas encontram-se no final desta dissertação.

As referências bibliográficas referem-se somente as citações que aparecem nos itens introdução, revisão de literatura e discussão desta dissertação.

O artigo está estruturado de acordo com as normas da revista científica *Journal of Ethnopharmacology* a qual foi submetido.

2. INTRODUÇÃO

A hipercolesterolemia é caracterizada como um aumento nos níveis séricos de colesterol acima de 240 mg/dL (Hamasaki et al., 2000), usualmente acompanhada de um aumento nos níveis da lipoproteína de baixa densidade (LDL) acima de 160 mg/dL (National Cholesterol Education Program, 2001). Muitos estudos têm demonstrado que a hipercolesterolemia é um dos maiores fatores de risco de doença arterial coronariana (DAC) no mundo (Bhatt et al., 2006). A DAC está associada com sinais de inflamação sistêmica e da parede arterial (Libby et al., 2002). Além disso, o processo inflamatório induzido pela hipercolesterolemia está associado com o estresse oxidativo (Libby, 2000). Diversas linhas de evidência indicam que a modificação oxidativa de proteínas e subsequente acumulação de proteínas oxidadas, as quais podem ser prévios indicativos de dano tecidual mediado por espécies reativas de oxigênio (EROs), tem sido encontrada em células durante o estresse oxidativo e aterosclerose (Stadtman, 1992; Stadtman and Levine, 2003).

Muitos agentes terapêuticos estão disponíveis para o tratamento de pacientes hipercolesterolêmicos e muitos estudos têm demonstrado que o uso de drogas hipolipemiantes pode reduzir o número de eventos cardiovasculares e a mortalidade de doenças coronárias (Aronow, 2008). Além disso, uma dieta restrita em alimentos ricos em colesterol e exercícios físicos regulares são propostas que também devem fazer parte do tratamento destes pacientes, contribuindo significativamente para os cuidados primários de saúde (De Lorgeril et al., 1999). Entretanto, devido a certa resistência a restrição dietética e o uso prolongado de drogas hipolipemiantes, muitos indivíduos tem buscado por tratamentos alternativos para o controle de níveis de colesterol. Muitos destes tratamentos têm sido usado empiricamente, carecendo de estudos científicos que permitam conclusões mais confiáveis (Dickel et al., 2007).

No Brasil, a planta *Campomanesia xanthocarpa* Berg. (Myrtaceae), popularmente conhecida como “guavirova”, está presente na região Sul, e é do mesmo modo encontrada na Argentina, Paraguai e Uruguai (Lorenzi, 1992). Os relatos populares acerca do uso tradicional do chá das folhas de guavirova revelam sua utilização para diversas doenças, incluindo doenças inflamatórias e hipercolesterolemia (Alice et al., 1995). De acordo com o estudo realizado com vendedores da planta em Porto Alegre (RS-Brasil), *C. xanthocarpa* é empiricamente usada para redução de peso e tem sido indicado por seu efeito potencial no controle

de um número de condições associadas com obesidade, incluindo hiperlipidemia (Dickel et al., 2007).

Embora esta planta seja usada para diminuir colesterol sanguíneo baseado na crendice popular, nenhum estudo clínico foi realizado para provar sua eficiência. Assim, o maior alvo deste presente trabalho foi investigar os efeitos de *C. xanthocarpa* nos parâmetros bioquímicos, hematológicos, antropométricos e de estresse oxidativo em pacientes hipercolesterolêmicos.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Investigar os efeitos de *C. xanthocarpa* em parâmetros bioquímicos, hematológicos, antropométricos e de estresse oxidativo em pacientes hipercolesterolêmicos.

3.2. Objetivos específicos

- Avaliar os efeitos do macerado das folhas de *C. xanthocarpa* encapsuladas e administradas oralmente durante 90 dias em parâmetros bioquímicos, hematológicos, antropométricos e de estresse oxidativo de pacientes hipercolesterolêmicos.

- Relacionar os níveis de colesterol sanguíneo com os níveis plasmáticos de proteína carbonilada.

- Verificar o possível efeito antioxidante da *C. xanthocarpa in vitro*, comparado com o efeito de um antioxidante de referência (quercetina).

- Verificar os efeitos da *C. xanthocarpa* na atividade da enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A redutase.

4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1. Metabolismo lipídico

4.1.1. Aspectos gerais

Dos pontos de vista fisiológico e clínico, os lípides biologicamente mais relevantes são os fosfolípidos, o colesterol, os triacilgliceróis (TG) e os ácidos graxos. Os fosfolípidos formam a estrutura básica das membranas celulares (Lenoir et al., 2007). O colesterol é precursor dos hormônios esteróides, dos ácidos biliares e da vitamina D. Além disso, como constituinte das membranas celulares, o colesterol atua na fluidez destas e na ativação de enzimas aí situadas (Qui et al., 2006). Os triacilgliceróis são formados a partir de três ácidos graxos ligados a uma molécula de glicerol e constituem uma das formas de armazenamento energético mais importante no organismo, depositados nos tecidos adiposo e muscular (Hokanson & Austin, 1996).

De uma perspectiva histórica, a biossíntese do colesterol foi o primeiro caminho anabólico capaz de submeter-se a supressão pela formação de um produto final (mecanismo de realimentação). Schoenheimer e Breusch (1933) demonstraram que camundongos sintetizam menos colesterol depois de o terem ingerido na dieta. Em seguida, Gould et al. (1953) incubou fatias de fígado de cachorros e coelhos com [¹⁴C]acetato e observou que sua incorporação no colesterol foi reduzida para menos do que 2% dos valores controles quando o colesterol tinha sido fornecido na dieta. Na década de 1960, um importante alvo enzimático para a regulação do colesterol foi identificado: a enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A (HMG-CoA) redutase, que converte HMG-CoA a um intermediário de 6 carbonos, o mevalonato. O mevalonato é por sua vez convertido a isopentenil pirofosfato, que é polimerizado e modificado para formar os 27 carbonos do colesterol (Burcher et al., 1960; Siperstein e Fagan, 1966).

O acúmulo de colesterol diminui a atividade da HMG-CoA redutase e de diversas outras enzimas da biossíntese do colesterol, conseqüentemente limitando a produção de colesterol, que é sintetizado por praticamente todos os tecidos humanos, embora o fígado, o intestino, o córtex adrenal e os tecidos reprodutivos, sejam os maiores contribuintes da síntese de colesterol (para revisão ver: Goldstein e Brown, 1990). No fígado, o conteúdo de colesterol é regulado por três mecanismos principais: a) síntese intracelular do colesterol; b) armazenamento após

esterificação; c) excreção pela bile. Na luz intestinal, o colesterol é excretado na forma de metabólitos ou como ácidos biliares. Metade do colesterol biliar e aproximadamente 95% dos ácidos biliares são reabsorvidos e retornam ao fígado pelo sistema porta (ciclo êntero-hepático) (Cooper, 1997; Kamoun et al., 2006).

Os ácidos graxos possuem como fórmula química básica RCOOH . Aqueles que são relevantes a nutrição humana apresentam cadeia longa (C12-C20). Eles são definidos como saturados e poliinsaturados. Numa dieta comum, os ácidos graxos saturados estão presentes em alimentos de origem animal, enquanto que os poliinsaturados estão presentes em alimentos de origem vegetal. Contudo, existem exceções como o ácido palmítico que é saturado e está presente em óleo de palmito. Os ácidos graxos de cadeia longa são oxidados para produzir energia por um processo denominado β -oxidação, o qual resulta no encurtamento seqüencial da cadeia carbonada em 2 átomos de carbono e a produção de acetil-CoA (Marenah, 1995).

O fígado é também capaz de sintetizar ácidos graxos, triacilgliceróis, colesterol, fosfolípides e lipoproteínas. Distúrbios no metabolismo dos ácidos graxos incluem diminuição da taxa de oxidação (causada por consumo excessivo de álcool), aumento da síntese hepática de ácidos graxos e diminuição na conversão dos triacilgliceróis, e todos estes fatores podem estar envolvidos no desenvolvimento de esteatose hepática, um problema comum em diversas desordens hepáticas (Johnson, 1995).

Depois da refeição, a digestão dos lípides começa no estômago, catalisada por uma lipase estável em meio ácido, que se origina de glândulas localizadas na base da língua (lipase lingual). Moléculas de triacilgliceróis, particularmente aquelas que contêm ácidos graxos de cadeia curta ou média, são os principais alvos dessa enzima. Esses mesmos triacilgliceróis são também degradados pela lipase gástrica, secretada pela mucosa gástrica. Estes dois mecanismos ocorrem principalmente em neonatos e na fase adulta são menos importantes para a digestão dos lípides. Em seguida, os triacilgliceróis da dieta são solubilizados no suco pancreáticos pela ação de sais biliares no intestino e são hidrolisados a ácidos graxos livres e monoglicérides por lipase pancreática. Os ésteres de colesterol são hidrolisados pela hidrolase dos ésteres de colesterol, a qual produz colesterol mais ácidos graxos livres. Posteriormente, os produtos finais da degradação dos lípides, juntamente com os sais biliares, formam as micelas mistas, que são solúveis no meio aquoso do

lúmen intestinal, facilitando o transporte dos lípidos hidrofóbicos através da camada aquosa dos enterócitos, onde eles são absorvidos (Johnson, 1995).

A mistura de lipídeos, absorvida pelos enterócitos, migra para o retículo endoplasmático e estes passam por uma reesterificação e subsequente incorporação aos quilomicra, que são liberados dos enterócitos por exocitose para os vasos linfáticos, os quais se originam nas vilosidades do intestino, e seguem pelo sistema linfático até o ducto torácico e são então transportados pela veia subclávia esquerda, onde entram na circulação sanguínea. Os triacilgliceróis presentes nos quilomicra são hidrolisados principalmente nos capilares do músculo esqueléticos e do tecido adiposo, mas também nos capilares de outros tecidos. Os triacilgliceróis dos quilomicra são degradados pela lipase lipoprotéica, resultando em ácidos graxos livres e glicerol (Marenah, 1995).

As lipoproteínas são responsáveis pelo transporte dos lípidos no plasma e são compostas por lípidos, que são substâncias geralmente hidrofóbicas no meio aquoso plasmático, e proteínas, formando as chamadas apolipoproteínas (apos). Existem quatro grandes classes de lipoproteínas separadas em dois grupos: (1) as ricas em TG, maiores e menos densas, representadas pelos quilomicra, de origem intestinal, e pelas lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL), de origem hepática; (2) e as ricas em colesterol de densidade baixa (LDL) e de densidade alta (HDL). Existe ainda uma classe de lipoproteínas de densidade intermediária (IDL) e a lipoproteína (a) [Lp(a)], que resulta da ligação covalente de uma partícula de LDL à apo (a) (Cooper, 1997; Kamoun et al., 2006).

Os quilomicra são os responsáveis pelo transporte dos lípidos da dieta e da circulação entero-hepática. O transporte de lípidos de origem hepática ocorre por meio da VLDL e LDL, que caracteristicamente contém apolipoproteína B-100 (via endógena). Os triacilgliceróis das VLDL, assim como os dos quilomicra, são hidrolizados pela lipase lipoprotéica (Goldberg, 1996). Os ácidos graxos são liberados para os tecidos e metabolizados. Os quilomicra se transformam em remanescentes que são removidos pelo fígado por receptores específicos, sendo que o mais aparente é o receptor da LDL (Cooper, 1997).

Em seguida, determinada parte das VLDL dá origem às IDL, que são removidas rapidamente do plasma. O processo de catabolismo continua, envolvendo a ação da lipase hepática e resultando nas LDL, que permanecem por longo tempo no plasma. As VLDL trocam triacilgliceróis por ésteres de colesterol com as HDL e

LDL por intermédio da proteína de transferência de colesterol esterificado (PTCE) (Tall, 1993). Tanto as VLDL como as LDL serão removidas no fígado por intermédio de ligação com receptores específicos (Brown e Goldstein, 1986). Dentre eles, o receptor da LDL também denominado receptor B/E é o mais importante. A expressão desses receptores é a principal responsável pelo nível de colesterol no sangue e depende da atividade da enzima HMG-CoA redutase (3-hidróxi-3-metilglutaril CoA redutase), que é a enzima limitante da síntese do colesterol hepático (Pease e Leiper, 1996).

As partículas de HDL são formadas no fígado, no intestino e na circulação e seu principal conteúdo protéico é representado pelas apolipoproteínas A-I e A-II (Fielding e Fielding, 1995). O colesterol livre da HDL é esterificado pela ação da lecitina colesterol acil transferase (LCAT). A HDL carrega o colesterol até o fígado onde este será eliminado no chamado transporte reverso do colesterol.

O maior sítio de síntese endógena de triacilgliceróis é o fígado e o tecido adiposo, sendo que os triacilgliceróis armazenados neste tecido representam o maior estoque energético do organismo. Os ácidos graxos são mobilizados a partir deste tecido pela ação da lipase sensível a hormônio que é ativada pelo glucagon e adrenalina e inibida pela insulina (Marenah, 1995).

4.1.2. Hipercolesterolemia

Muitos estudos têm mostrado que a hipercolesterolemia é um dos maiores fatores de risco para doenças arteriais coronarianas no mundo (Bhatt et al., 2006). A hipercolesterolemia é caracterizada pelo acúmulo de colesterol total (CT) sérico acima de 240 mg/dL (Hamasaki et al., 2000), usualmente acompanhado por um aumento nos níveis de LDL acima de 160 mg/dL (National Cholesterol Education Program, 2001). Este acúmulo pode ocorrer por doenças monogênicas, em particular, por defeito no gene do receptor de LDL ou no gene da apo B100. Centenas de mutações do receptor de LDL foram detectadas em portadores de hipercolesterolemia familiar, algumas causando redução de sua expressão na membrana, outras, deformações na sua estrutura e função (Goldstein et al., 1995). Mutação no gene que codifica a apo B100 pode também causar hipercolesterolemia através da deficiência no acoplamento da LDL ao receptor celular (Defesche et al., 1993).

Mais comumente, a hipercolesterolemia resulta de mutações em múltiplos genes envolvidos no metabolismo lipídico, as hipercolesterolemias poligênicas. Nestes casos, a interação entre fatores genéticos e ambientais determina o fenótipo do perfil lipídico. O alelo apoE4 pode contribuir para o aumento da colesterolemia (Davignon et al., 1988).

4.1.3. Aterogênese

A aterosclerose é uma doença inflamatória crônica de origem multifatorial que ocorre em resposta à agressão endotelial, acometendo principalmente a camada íntima de artérias de médio e grande calibre (Boren et al., 2000; Skalen et al., 2002). A formação da placa aterosclerótica inicia-se com a agressão ao endotélio vascular devida a diversos fatores de risco como elevação de lipoproteínas aterogênicas (LDL, IDL, VLDL, remanescentes de quilomicra), hipertensão arterial ou tabagismo (Ross, 1999; Montecucco e Mach, 2009).

A partir do dano vascular, ocorre a expressão de moléculas de adesão que mediarão a entrada de monócitos em direção ao espaço intimal, que por sua vez englobarão lipoproteínas modificadas (predominantemente LDL oxidadas), originando as células espumosas. Diferentes mediadores inflamatórios são liberados no espaço intimal, perpetuando e ampliando o processo, levando finalmente à formação da placa aterosclerótica (Ross, 1999). O depósito de lipoproteínas na parede arterial, processo-chave no início da aterogênese, ocorre de maneira proporcional à concentração dessas lipoproteínas no plasma. Os fatores clássicos no desenvolvimento da arterosclerose são elevação nas taxas de CT, LDL, LDL-oxidado, triglicerídes, baixos níveis da HDL (Forrester et al., 2005), aumento dos níveis dos marcadores inflamatórios, homocisteína (Libby, 2002) e agregação plaquetária (Furman et al., 1998).

A placa aterosclerótica plenamente desenvolvida é constituída por elementos celulares, componentes da matriz extracelular e núcleo lipídico. Estes elementos formam na placa aterosclerótica, o núcleo lipídico, rico em colesterol e a capa fibrosa, rica em colágeno (Falk et al., 1995). Mais recentemente, a partir de observações histopatológicas, estudos demonstram que a inflamação crônica na parede vascular é representada por monócitos, macrófagos e linfócitos T ativados

(Libby e Hansson, 1991; Ross, 1993), confirmando o envolvimento da inflamação com doença arterial coronariana (DAC).

4.2. Mecanismos patofisiológicos do estresse oxidativo e a aterosclerose

Durante as últimas décadas, diversos estudos têm examinado o papel potencial do estresse oxidativo na aterosclerose (Stephens et al., 1996). A vida em aerobiose é caracterizada pela produção contínua de espécies reativas de oxigênio (EROs), tais como o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o óxido nítrico (NO°) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que é contrabalançada pelo sistema de defesa antioxidante. Em condições fisiológicas, o balanço entre agentes pró-oxidantes e as defesas antioxidantes se mantém equilibrado. Quando ocorre aumento na produção de EROs, diminuição das defesas antioxidantes ou ambas as situações, o equilíbrio entre pró-oxidantes e antioxidantes é rompido em favor dos agentes pró-oxidantes. Nesta situação, diz-se que a célula ou organismo se encontra sob estresse oxidativo com potenciais danos (Madamanchi e Runge, 2007).

As evidências sugerem que fatores de risco para a aterosclerose, especialmente a hipercolesterolemia, aumentam o risco da produção de EROs, facilitando o dano oxidativo, e esta produção ocorre por macrófagos, células endoteliais e/ou células musculares lisas (CML) (Armstrong et al., 2006). Uma vez acumulada sericamente, a LDL associa-se com os materiais da matriz extracelular e sofre oxidação, formando o LDL oxidado por peroxidação lipídica (Holvoet et al., 1998). Além deste, outros processos são provocados por diferentes fatores de risco, incluindo a expressão de moléculas de adesão, a proliferação e migração de CML, a apoptose de células endoteliais, a oxidação de lípidos, a ativação de metaloproteinases e a alteração da atividade vasomotora (Madamanchi et al., 2005).

A função endotelial está prejudicada nos estágios iniciais da aterosclerose e está fortemente relacionada com diversos fatores de risco. A disfunção endotelial predispõe para lesão aterosclerótica em longo prazo e é proposta como um importante fator para o diagnóstico e prognóstico de síndromes coronarianas (Stocker e Keaney, 2005).

A produção de radicais livres está relacionada com a disfunção endotelial e esse passo é inicial para a aterogênese. A hipercolesterolemia estimula a produção

de radicais do ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) em células musculares lisas de vasos sanguíneos, levando a um aumento do estresse oxidativo. Além disso, a produção aumentada de EROs reduz a produção e conseqüentemente a biodisponibilidade de óxido nítrico (NO°), conduzindo para uma vasoconstrição, agregação plaquetária e adesão de neutrófilos para o endotélio (Vepa et al., 1999).

O estresse oxidativo induzido por peróxido de hidrogênio (H_2O_2) aumenta a fosforilação de tirosinas quinases, as quais conduzem para uma ligação mais forte de neutrófilos no endotélio e alteração da permeabilidade vascular (Bourcier et al., 1997). Outro mecanismo através do qual o estresse oxidativo induzido pelo H_2O_2 afeta a aterogênese é a produção de fatores transcricionais, tal como a proteína ativadora 1, que participam da expressão de moléculas de adesão. Ainda, está bem estabelecido que estes fatores atuam em células musculares lisas de vasos ateroscleróticos e são inativados por agentes antioxidantes e antiinflamatórios (Tousoulis et al., 2007). Assim, a aterosclerose é um processo inflamatório fortemente afetado por estresse oxidativo (Libby, 2000).

Os aminoácidos livres e resíduos de aminoácidos em proteínas são altamente susceptíveis a oxidação por uma ou mais EROs. A reação direta da proteína com EROs pode conduzir a formação de derivados de proteína ou fragmentos de peptídeos possuindo grupos carbonil altamente reativos (Stadtman e Levine, 2003). A carbonilação é uma modificação irreversível e não enzimática de proteínas (Stadtman e Levine, 2006). Diversas linhas de evidência indicam que a modificação oxidativa de proteínas e subsequente acumulação de proteínas oxidadas, que podem ser prévios indicativos de dano tecidual mediado por EROs, foi encontrada em células durante o estresse oxidativo e aterosclerose (Stadtman, 1992).

4.3. Terapia não medicamentosa e medicamentosa da hipercolesterolemia

4.3.1. Terapia não medicamentosa

Há muito tem sido demonstrado que o aumento do consumo de gordura associa-se à elevação da concentração plasmática de colesterol e à maior incidência de aterosclerose coronária e aórtica (Beynen e Katan, 1985). A terapia nutricional deve, portanto, ser adotada na prevenção e no tratamento das dislipidemias.

Os ácidos graxos saturados elevam a colesterolemia por reduzirem receptores celulares B-E, inibindo a remoção plasmática das partículas de LDL. Além disso, a gordura saturada, em função da sua estrutura retilínea, permite maior entrada de colesterol nas partículas de LDL. A ingestão de gordura saturada é a principal causa alimentar de elevação do colesterol do plasma (Krauss et al., 2000).

A substituição isocalórica dos ácidos graxos saturados por ácidos graxos insaturados reduz o CT e a LDL plasmáticos. Os ácidos graxos polinsaturados possuem o inconveniente de induzir maior oxidação lipídica e diminuir a HDL quando utilizados em grande quantidade. Os ácidos graxos monoinsaturados exercem o mesmo efeito sobre a colesterolemia, sem, no entanto, diminuir a HDL e provocar oxidação lipídica (Von Schacky et al., 1999). Além disso, os ácidos graxos trans são sintetizados durante o processo de hidrogenação dos óleos vegetais na produção de margarinas. Pela semelhança estrutural com a gordura saturada, a gordura trans também provoca elevação da colesterolemia, com uma desvantagem maior de elevar a LDL e reduzir a HDL (Lichtenstein et al., 1999).

Os fitosteróis são encontrados apenas nos vegetais e desempenham funções estruturais análogas ao colesterol em tecidos animais. A ingestão de 3 g – 4 g/dia de fitosteróis promove a redução de nível da LDL ao redor de 10%-15% em média. Os fitosteróis não influenciam os níveis plasmáticos da HDL e de triacilgliceróis (Miettinen e Gylling et al., 1999). A dieta rica em soja é também importante na redução da colesterolemia. Uma metanálise mostrou os efeitos da ingestão da proteína da soja sobre os lípides séricos. O consumo de proteína de soja em substituição à proteína animal provocou uma redução de 9,3% no nível de CT, 12,9% na LDL e 10,5% nos triacilgliceróis (Anderson et al., 1995). Já as fibras, são carboidratos complexos, não absorvidos pelo intestino, com ação reguladora na função gastrointestinal. Reduzem o tempo de trânsito gastrointestinal e ajudam na eliminação do colesterol. As fibras insolúveis não atuam sobre a colesterolemia, mas aumentam a saciedade, auxiliando na redução da ingestão calórica (Krauss et al., 2000).

Os antioxidantes, dentre eles os flavonóides, presentes na dieta podem potencialmente estar envolvidos na prevenção da aterosclerose por inibirem a oxidação das LDL, diminuindo sua aterogenicidade e, conseqüentemente, o risco de doença arterial coronária (Steinberg, 2000). A utilização de substâncias antioxidantes, como flavonóides, vitaminas C e E, e os carotenóides, com o objetivo

de prevenir ou reduzir o desenvolvimento da doença aterosclerótica, vem sendo amplamente pesquisada e estudada (Hertog et al., 1993).

Além do cuidado nutricional, os exercícios físicos regulares são medidas que devem ser propostas também no tratamento destes pacientes, contribuindo significativamente com cuidados primários de saúde (De Lorgeril et al., 1999).

4.3.2. Terapia medicamentosa

Um número de estudos tem demonstrado que o uso de drogas hipolipemiantes reduz o número de eventos cardiovasculares e a mortalidade de doença coronária (Aronow, 2008). Os hipolipemiantes devem ser empregados sempre que não houver efeito satisfatório da mudança do estilo de vida ou impossibilidade de aguardar os efeitos da desta mudança por prioridade clínica. As principais terapias utilizadas na clínica para as dislipidemias são: as estatinas, as resinas de troca, os fibratos, o ácido nicotínico, o ácido graxo ômega-3, o probucol e o orlistat.

As estatinas são inibidores da 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A (HMG-CoA) redutase, uma das enzimas chave na síntese intracelular do colesterol e são fármacos estratégicos para a redução da LDL (NCEP, 2001). As estatinas foram originalmente designadas e desenvolvidas para competir com 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A pela ligação com o sítio catalítico da HMG-CoA redutase e então reduzir a síntese de colesterol (Kleemann e Kooistra, 2005). Essa inibição reduz o conteúdo intracelular de colesterol e, como consequência, há aumento do número de receptores de LDL nos hepatócitos que então removem mais VLDL, IDL e LDL da circulação para repor o colesterol intracelular (Vaughan et al., 1996). Como para os demais hipolipemiantes, seu uso deve ser prolongado, pois, uma vez interrompido, restabelece-se o ciclo entero-hepático, retornando a colesterolemia a valores anteriores ao tratamento, e está relacionado com efeitos adversos (Golomb e Evans, 2008).

As resinas de troca, como a colestiramina, são fármacos que reduzem a absorção intestinal de sais biliares e, consequentemente, de colesterol. Com a redução da absorção, reduz-se o colesterol intracelular no hepatócito e, por este motivo, aumenta-se o número de receptores de LDL e a síntese de colesterol. O catabolismo assim acelerado estimula a atividade enzimática na célula hepática,

incluindo a da HMG-CoA redutase, e o conteúdo diminuído do colesterol intracelular aumenta a expressão de receptores B/E, que apresentam elevada afinidade para as LDL circulantes (Gianini et al., 1999).

No tratamento da hipertrigliceridemia isolada são prioritariamente indicados os fibratos (Tikkanen, 1992) e, em segundo lugar, o ácido nicotínico (Jin et al., 1999) ou a associação de ambos. Pode-se ainda utilizar nesta dislipidemia, o ácido graxo ômega-3 (Krauss et al., 2000) isoladamente ou em associação com os fármacos. Além disso, o probucol é um potente agente antioxidante que reduz o LDL e o HDL em cerca de 10% e 15-20% (Higuchi et al. 2000) e o orlistat é um derivado hidrogenado da lipstantina, um efetivo inibidor das lipases, naturalmente produzido pelo *Streptomyces toxytricini*. Com uma absorção gastrointestinal desprezível, o orlistat atua exclusivamente na luz intestinal ligando-se covalentemente aos sítios catalíticos das lipases gástrica e pancreática, o que é confirmado com a observação clínica de seu efeito residual prolongado. Com a inibição da lipase, a lipólise dos triacilgliceróis dietéticos é substancialmente reduzida e, como consequência, cerca de 30% dos triglicérides ingeridos são excretados inalterados nas fezes. (Ros, 2000).

Entretanto, devido a certa resistência a restrição dietética e limitações financeiras para o uso prolongado de drogas hipolipemiantes, muitos indivíduos tem buscado tratamentos alternativos para o controle de níveis de colesterol. Muitos destes tratamentos têm sido usados empiricamente, carecendo de estudos científicos que permitam conclusões mais confiáveis (Dickel et al., 2007).

4.4. *Campomanesia xanthocarpa*

A *Campomanesia xanthocarpa* Berg pertence à família *Myrtaceae*, que compreende cerca de 3500 espécies, subordinadas a mais ou menos 100 gêneros e apresenta dois centros principais de desenvolvimento: a América tropical e a Austrália (Barroso, 1991). Dentre seus nomes vulgares destacam-se “guabirobeira”, “guabiroba”, “guabirova”, “guabirobeira-do-mato”, “guaribagabirobeira”. Tem como sinonímia botânica *Eugenia xanthocarpa* Mart. Non nud *Psidium punctulatum* DC; *Psidium Eugenoides* Camb. (Lorenzi, 1992). O nome Guabirobeira é do tupi “gua-bir-oba” e do sufixo português “eira” (Corrêa, 1984).

A planta é decídua (não perde as folhas facilmente), mesófito até heliófito (desenvolve-se na presença de luz), e seletiva higrófito, sendo abundante nas partes úmidas das matas de altitude. Ocorre em Minas Gerais, São Paulo, Mato Grosso do Sul até o Rio Grande do Sul, em quase todas as formas florestais. Floresce abundantemente durante os meses de setembro-novembro e os frutos amadurecem em novembro-dezembro. A planta frutifica a partir de um a dois anos após o plantio. Os frutos da guabirobeira (figura 1), de acordo com os estudiosos, além de saborosos, são também ricos em vitamina C. O fruto pode ser consumido *in natura* ou na forma de sucos, doces, geléias e ainda serve como matéria-prima para licores, picolés e sorvetes (Lorenzi, 1992; Biavatti, 2004).

A árvore é silvestre e se multiplica por sementes, possuindo de 15 a 25 metros de altura e 30 a 50 centímetros de diâmetro. Suas folhas são opostas, ovaladas ou oblongas, miúdas, verde-claras, inicialmente transparentes e mais tarde opacas (Alzugaray, 1984). As flores são brancas solitárias ou reunidas nas axilas das folhas. O fruto é uma baga globosa achatada, amarelada, comestível, com 5 a 6 sementes coriáceas miúdas (Cravo, 1994). A árvore fornece madeira branca bastante resistente e a lenha goza de preferência para a sapecagem e torrefação da erva-mate. É classificada como árvore produtora de alimentos para pássaros e suas flores são freqüentemente visitadas pelas abelhas. Os frutos suculentos são apreciados tanto pelos homens quanto pelos animais (Alzugaray, 1984). Segundo Barroso (1991), o embrião das sementes das *Myrtaceae* oferece amplo campo de investigação e tem servido de base para sua classificação em tribos, sendo que a *Campomanesia* apresenta uma forma mais especializada do “embrião pimentóide”.

Tal como enfatizou Cravo (1994), a “guabiroba” possui tanino, ferro, glicose, sais minerais, vitaminas A e C. As folhas encerram matéria amarela amarga, clorofila e ácido tânico (Corrêa, 1984). No trabalho realizado por Limberger (2001), sobre a composição química do óleo volátil das folhas de *C. xanthocarpa* coletadas no Rio Grande do Sul, os autores obtiveram um rendimento de 0,2% em óleo essencial, rico em sesquiterpenos, destacando-se dentre eles o espatulenol (9,9%), o globulol (6,2%) e o epi-globulol (2,0%); e entre os monoterpenos, destaca-se o linalol (17,2%). Segundo Schmeda-Hirschmann (1995), as folhas desta planta possuem flavonóides, entre os quais pode-se citar quercetina e rutina. Markman et al. (2004) analisou os componentes fitoquímicos desta espécie e encontrou flavonóides,

saponinas e taninos. Apesar de seu uso medicinal, há poucos relatos das propriedades farmacológicas desta planta.

As folhas, conforme Corrêa (1984), são usadas como adstringentes e úteis contra a diarreia e o catarro da bexiga e uretra. Cruz (1995) afirma que as cascas e as folhas em cozimento também podem ser utilizadas contra leucorréias. Notoriamente, existem relatos da utilização tradicional do chá das folhas para a disenteria, problemas do estômago, febre, como agente antiinflamatório, anti-reumático e para diminuir o colesterol sanguíneo (Alice et al., 1995). A crendice popular, pelo menos no sul do Brasil, vem utilizando este chá para reduzir a pressão arterial e o colesterol, mas não existem estudos em humanos que comprovem sua eficiência. Segundo Dickel et al. (2007), um estudo realizado com os vendedores de erva de uma cidade do Sul do Brasil apresentou que a planta seria usada para efeito potencial no controle de certas condições, associadas à obesidade, tal como hiperlipidemia, sendo utilizada empiricamente para a redução de peso.

Biavatti (2004) investigou o efeito do extrato aquoso sobre o peso e os parâmetros bioquímicos de ratos alimentados com uma dieta hipercalórica. O tratamento crônico reduziu o peso dos ratos tratados com o extrato, além de reduzir os níveis de glicemia, porém nenhum efeito nos níveis lipídicos foi observado no modelo experimental usado no trabalho.

A administração oral do extrato hidroalcoólico das folhas da “guabiroba” mostrou-se efetivo na prevenção de ulceração gástrica em ratos, não produzindo sintomas tóxicos em camundongos (Markman et al., 2004).

Apesar de terem sido realizados alguns estudos pré-clínicos na área, diversos aspectos importantes referentes ao uso etnofarmacológico da *Campomanesia xanthocarpa* necessitam ser mais bem investigados especialmente seu amplo uso como hipercolesterolêmico, justificando assim nosso estudo, que é a primeira pesquisa clínica realizada com esta planta para confirmar seu uso popular.



Figura 1. Foto ilustrativa das folhas e do fruto de *Campomanesia xanthocarpa*

Effects of *Campomanesia xanthocarpa* on Biochemical, Hematological and Oxidative Stress Parameters in Hypercholesterolemic Patients

Jonatas Zeni Klafke^{a,b,c}, Mariane Arnoldi da Silva^{a,b,c}, Tiago Facchini Panigas^a, Karlyse Claudino Belli^a, Marileides Facco de Oliveira^b, Márcia Meister Barichello^b, Flavia Karine Rigo^c, Mateus Fortes Rossato^c, Adair Roberto Soares dos Santos^d, Moacir Geraldo Pizzolatti^e, Juliano Ferreira^{c+}, Paulo Ricardo Nazário Viecili^{a,b+}.

^aInstituto de Cardiologia de Cruz Alta, ^bUniversidade de Cruz Alta, Cruz Alta, RS, Brazil; ^cPrograma de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil; ^dDepartment of Physiological Sciences and ^eDepartment of Chemistry, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil.

⁺*Corresponding authors:*

Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Maria, Avenida Roraima 1000, Camobi, CEP 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil.

Tel.: +55 55 3220 8053; fax: +55 55 3220 8031

E-mails: ferreira99@gmail.com or vieciliprn@uol.com.br

ABSTRACT

Ethnopharmacological relevance: In Southern Brazil, the plant *Campomanesia xanthocarpa* Berg. (Myrtaceae), popularly known as “guavirova”, has been empirically used for its potential effect in reducing blood cholesterol levels. *Aim of the study:* Since there are no scientific data confirming its popular use, the aim of the present study was to investigate the effect of *C. xanthocarpa* on biochemical, hematological, anthropometrical and oxidative stress parameters in hypercholesterolemic patients. *Materials and methods:* Thirty three patients were selected according to total cholesterol (TC) levels: 200-240 mg/dL, undesirable level (UL), and >240 mg/dL, hypercholesterolemic level (HL). UL or HL patients were randomly divided into control group (CG), which received placebo capsules, and experimental group 250 (EG 250) or 500 (EG 500), which received either 250 or 500 mg of encapsulated *C. xanthocarpa*. All groups received a cholesterol restriction diet and capsules once a day. The biochemical (TC, triglycerides, HDL, LDL and VLDL), hematological (hematocrit and hemoglobin), anthropometrical (weight and abdominal circumference) and oxidative stress (protein carbonyl) parameters were measured before, 45 and 90 days after the treatment started. *Results:* There was no alteration on biochemical, hematological, anthropometric or oxidative stress parameters in UL patients of all groups. However, a significant decrease in TC and LDL levels was observed in HL patients from EG 500 group (reduction of 28 ± 3 and $45\pm 4\%$ to levels before treatment) in relation to CG group patients (reduction of 12 ± 2 and $29\pm 4\%$). Moreover, a significant reduction in oxidative stress was observed in HL patients of EG 250 ($51\pm 12\%$) and EG 500 groups ($34\pm 18\%$) when compared to levels before treatment. A positive correlation between plasma oxidative stress PC and TC levels was observed. Finally, we found that *C. xanthocarpa* extract possesses anti-oxidant

properties and 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitory activity *in vitro*. *Conclusion:* Confirming its popular use, the treatment with *C. xanthocarpa* encapsulated reduced blood TC and LDL levels in hypercholesterolemic patients.

Keywords: 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase; *Campomanesia xanthocarpa*; hypercholesterolemia; medicinal plant; Myrtaceae; protein carbonyl.

1. Introduction

Hypercholesterolemia is recognized as a high serum total cholesterol (TC) concentration above 240 mg/dL (Hamasaki et al., 2000), usually accompanied of an increase in the low density lipoprotein (LDL) levels above 160 mg/dL (National Cholesterol Education Program, 2001). Many studies have shown that hypercholesterolemia is one of the greatest risk factors for coronary arterial disease in the world (Bhatt et al., 2006). Coronary arterial disease is associated with signs of systemic and arterial wall inflammation (Libby et al., 2002). Moreover, the inflammatory process induced by hypercholesterolemia is associated with oxidative stress (Libby, 2000). Several lines of evidence indicate that oxidative modification of protein and subsequent accumulation of oxidized proteins, which could be an early indication of oxygen radical-mediated tissue damage, have been found in cells during oxidative stress and atherosclerosis (Stadtman, 1992; Stadtman and Levine, 2003).

Many therapeutic agents are available for the management of hypercholesterolemic patients and are employed to promote successful treatment. A

number of studies have demonstrated that the use of lipid-lowering drugs can reduce the number of cardiovascular events and mortality from coronary disease (Aronow, 2008). Moreover, a diet restricted in foods high in cholesterol and regular physical exercise should be proposed also in the treatment of these patients, contributing significantly to primary health care (De Lorgeril et al., 1999). However, due to certain resistances to dietary restriction and financial limitations to use lipid-lowering drugs, many individuals have turned to alternative treatments to control cholesterol levels. Many of these alternative treatments have been used empirically, lacking scientific studies that would allow for more reliable conclusions (Dickel et al., 2007).

In Brazil, the edible plant *Campomanesia xanthocarpa* Berg. (Myrtaceae), popularly known as “guavirova”, is present in the Southern region, and is likewise found in Argentina, Paraguay and Uruguay (Lorenzi, 1992). Popular reports assert the traditional use of guavirova leaf tea for a number of ailments, including inflammatory diseases and hypercholesterolemia (Alice et al., 1995). According to a study carried out with herb sellers in a Southern Brazil city, *C. xanthocarpa* is empirically used for weight loss and has been indicated for its potential effect in the control of a number of conditions associated with obesity, including hyperlipidemia (Dickel et al., 2007). Moreover, a previous report has shown the effect of other Myrtaceae (*Eugenia uniflora*) in lipid metabolism (Ferro et al., 1988).

Although *Campomanesia xanthocarpa* plant has been used to decrease blood cholesterol based on popular belief, no clinical studies have been carried out to prove its efficiency. Thus, the major aim of this present work was to investigate the effects of *C. xanthocarpa* on biochemical, hematological, anthropometric and oxidative stress parameters in hypercholesterolemic individuals.

2. Materials and Methods

2.1. Trial Organization

This study included hypercholesterolemic volunteers from the southern Brazil city of Cruz Alta, Rio Grande do Sul State, who were found through announcements in the local media to participate in the study on guavirova as a possible new phytotherapeutic.

The inclusion criteria used for selection were individuals between 18 and 90 years of age, known to be hypercholesterolemic, who presented TC levels above 200 mg/dL and LDL levels above 160 mg/dL, with or without the presence of other cardiovascular risk factors. Patients were excluded based on the following criteria: pregnancy, breastfeeding or the potential to become pregnant (not using adequate contraceptive methods); alcohol dependence (two or more doses per day); myocardial infarction or vascular cerebral accident occurrence in the last three months before the onset of treatment; presence of hepatopathies, nephropathy, chronic pancreatitis, thyroid diseases or other diseases that could put the individual at risk or interfere in the results of the study; and the concomitant use of hormones, bile salts, immunosuppressors or lipid-lowering drugs.

2.2. Participants

Of the 40 individuals who accepted to participate in the study, 33 were selected by double blind fashion and divided randomly into two groups in accordance with the intervals used in the criteria for hypercholesterolemia: patients with total

cholesterol levels between 200 and 240 mg/dL (undesirable level patients) and patients with total cholesterol levels > 240 mg/dL (hypercholesterolemic patients). Both groups were divided into Control Group, which received an encapsulated excipient (lactose) and into 250 Experimental Group (EG 250), which received 250 mg of *C. xanthocarpa*. The group of patients with total cholesterol levels > 240 mg/dL was also divided into 500 Experimental Group (EG 500), which received 500 mg of *C. xanthocarpa*. All individuals received nutritional orientation restricting hypercholesterolemic foods. Eight individuals with normal total cholesterol levels abandoned the study before its beginning (Figure 1).

Since infusions with quantities of water and leaves of *C. xanthocarpa* are prepared empirically by population and no information about the doses used in traditional medicine was found, doses of 250 mg and 500 mg per day were chosen and used for three months.

All participants gave informed consent to participate and agreed to follow nutritional orientations. The study protocol was approved by the Ethics Committee of the Centro Universitário Franciscano (Protocol number: 248.2007.02). Our research followed guidelines of the Declaration of Helsinki and Tokyo for humans and informed consent was obtained for all patients.

Please, insert Figure 1 here.

2.3. Plant Preparation

Leaves were collected in May, 2007 from a *C. xanthocarpa* tree in the city of Cruz Alta, RS, Brazil and properly identified at the Herbarium of the Universidade de Cruz Alta (number 1088).

The material collected underwent a cleaning process involving 1 hour in a diluted solution of 20% hypochlorite made from a 2% stock solution (final concentration of hypochlorite in diluted solution of 0.4%), immediately followed by washing in running potable water for 15 minutes. Then, the material was dried at 40-45°C for 36 hours in an oven. The dried leaves were triturated to a fine powder and enclosed in capsules. The capsules containing *C. xanthocarpa* were produced by the Laboratório de Farmacologia of the Universidade de Cruz Alta and stored in previously numbered recipients, according to the randomization code, in sufficient quantities for the duration of the study.

2.4. *Phytochemical analysis*

The *C. xanthocarpa* sample used in our study was tested for the presence of flavonoids, tannins, saponins and terpenes by thin-layer chromatography using different solvent systems and revealers (Harborne, 1984).

2.5. *Biochemical, Hematological and Anthropometric Determinations*

Blood samples were collected from the individuals before the onset of the study, at 45 days (during) and at 90 days (after), always after 12 hours of fasting.

For the hematological determinations, ethylene diamine tetra-acetic acid was used as anticoagulant. Samples were centrifuged at 10.000 xg for 10 min, separated into serum and plasma, and used for the biochemical (lipidic profile) and hematological assays.

The concentrations of cholesterol and triglycerides were measured using enzymatic methods with commercial kits by Labtest Diagnóstica S.A., through a semi-automatic biochemical analyzer LABQUEST. The high density lipoprotein (HDL) in the supernatant was analyzed after precipitation. The LDL was estimated with the Friedewald equation (Friedewald et al., 1972).

Quantitative determinations of hematocrit (Hct) and hemoglobin (Hb) were obtained with a semi-automatic analyzer ABX MICROS 60-OT that uses electric impedance.

Body weight and abdominal circumference (AC) were verified before and after the study. AC was measured in centimeters with metric tape at the height of the umbilicus.

2.6. Oxidative stress determination

Protein carbonyl levels in plasma were used as an oxidative stress parameter and were assayed using a method previously described (Levine et al., 1990), with minor modifications. In brief, blood samples were collected in tubes with heparin. After collected, samples were centrifuged at 10.000 xg for 10 min, the precipitated was discarded, and plasma was used to carry out the protein carbonyl analysis. Initially, 1 mL of the plasma was precipitated using 0.5 mL of 10% trichloroacetic acid and

centrifuged at 5000 xg for 5 min to discard the supernatant. Afterwards, 0.5 mL of 10 mM 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) was added in the test group tube and 0.5 mL of 2 HCl (2 M) was added in the white tube and incubated at room temperature for 1 hour. After the incubation time, 0.5 mL of 10% TCA was added and centrifuged at 5000 xg for 5 min. After centrifugation, the pellets were washed three times with 1 mL of ethanol-ethyl acetate (1:1, v/v). The precipitated was dissolved in 1.5 mL of protein dissolving solution (10% SDS) and incubated for 15 min. The color intensity of the supernatant was measured using spectrophotometer at 370 nm. Carbonyl content was calculated by using molar extinction coefficient ($22 \times 10^{-3} \text{ M cm}^{-1}$) and results were expressed as nmol/mg protein.

2.7. *In Vitro* Antioxidant Activity

In order to carry out the in vitro antioxidant tests, an extract of *C. xanthocarpa* leaves was prepared. Initially, 500 mg of dry leaves was added to 300 mL of a water solution of HCl (pH 2.0) at 37°C under constant agitation during 30 minutes. After, the solution was filtered and evaporated to determine total dry content. The final powder was diluted in water and then adjusted to the desired concentration to perform the in vitro antioxidant tests. The extract was made this way in order to mimic the gastric condition that the plant is subjected when orally administered. Moreover, an aqueous infusion of *C. xanthocarpa* leaves also was prepared. Here, 500 mg of dry leaves was added to 300 mL of water solution at 100°C during 5 minutes. After, the solution was filtered and evaporated to determine total dry content and the final powder was diluted in water and then adjusted to the desired concentration to

perform the in vitro antioxidant test. Quercetin (Merck, Brazil) was used as reference to comparison purposes.

To determine the direct antioxidant activity of the *C. xanthocarpa* extract and aqueous infusion, we used the ABTS test, performed as described previously (Fernandes et al., 2008). Briefly, a solution of ABTS (7 mM) was incubated with potassium persulphate 140 mM (ratio 1:0.35) during 12-18 hours at dark to allow the formation of ABTS radical. Next, this solution was diluted in potassium phosphate buffer (100 mM, pH 7.0) in a ratio of 1:88. The reaction was performed incubating 1 mL of ABTS with 0.1 mL of *C. xanthocarpa* extract, aqueous solution or quercetin in different concentration (0.1 – 300 µg/ mL) at room temperature in the dark for 30 minutes. A tube containing 1 mL ABTS and 0.1 mL of distilled water was also prepared and its absorbance was considered as 100%. Lower absorbance values indicated the reduction of ABTS radical, meaning antioxidant activity. The final color formed was read spectrophotometrically at 734 nm.

To confirm the in vitro antioxidant effect of *C. xanthocarpa* extract, a procedure based on the carbonylation of plasmatic protein was used (Akagawa et al., 2006). We induced the carbonylation of protein by the incubation of 1 mL plasma with 40 mM hydrogen peroxide (H₂O₂) for 5 min in absence or in presence of 100 µg/mL of *C. xanthocarpa* extract. Control experiments were carried out exposing 1 mL of plasma to *C. xanthocarpa* extract or its vehicle, but not hydrogen peroxide. Protein carbonyl contents were determined as described above.

2.8. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase (HMGR) assay

The assay is based on the spectrophotometer measurement of the decrease in absorbance reduced NADPH at 340 nm, in presence of 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA and human catalytic subunit of the purified enzyme. The reaction was performed with different concentrations of *C. xanthocarpa* extract (0.1-300 µg/mL) at 37 °C, using the HMGR assay kit (Sigma-Aldrich, USA).

2.9. Statistical Analysis

Data were expressed as mean and standard deviation. Data were analyzed statistically by two-way ANOVA (time and treatment as factors), one-way ANOVA followed by the Student Newman-Keuls' test or Student "t" test when appropriated. The level of significance was set at $P < 0.05$ and the demonstrated F values resulted from the interaction treatment versus time. The chi-square test was used for categorical variables. Pearson correlation analysis between variables was also carried out.

3. Results

3.1. Effects of *C. xanthocarpa* on biochemical, hematological and anthropometrical parameters

Some characteristics of the 33 individuals selected are shown in Table I. No statistical differences among the experimental groups before the treatment regarding age, gender, smoking and sedentarism were observed. Biochemical and oxidative stress parameters for each group obtained before the treatment with the *C.*

xanthocarpa were also similar among the experimental groups (Table II and Figures 2, 3 and 4).

Please, insert Table I here.

Interestingly, there was no significant reduction in the TC levels between CG and EG 250 groups 45 or 90 days after treatment started in patients with undesirable TC levels (data not shown). However, a significant reduction in TC was seen in hypercholesterolemic patients between CG and EG 500 groups at 45 and 90 days for TC ($F(2,19)=4.2$, $P = 0.02$) (Figure 2). Thus, *C. xanthocarpa* presented a better reducing effect in individuals with a more serious case of this metabolic dysfunction. TC levels were reduced in the control group 45 and 90 days after treatment when compared with the levels before treatment (Figure 2). Furthermore, analyzing data from the hypercholesterolemic patients 90 days after treatment, *C. xanthocarpa* was able to reduce the proportion of patients with high cholesterol levels since two of the individuals from the CG (2/6) obtained a TC equal to or lower than 240 mg/dL, whereas six patients from the EG 250 group (6/7) and all the nine ones from the EG 500 (9/9) did reach this goal ($P=0.01$, Chi-square test).

Please, insert Figure 2 here.

In LDL levels, there was no significant alteration in undesirable level patients between CG and EG 250 groups 45 or 90 days after treatment started (data not shown). Similar to what was observed for TC levels, the treatment with 500 mg of *C. xanthocarpa* (EG 500 group) for 90 days, but not for 45 days, produced a significant decrease in LDL levels when compared with the control group ($F(2,19)=3.3$, $P=0.02$) (Fig. 3). Levels of LDL were reduced in the control group 90 days after treatment when compared with the levels before treatment (Figure 3). Furthermore, analyzing data from the hypercholesterolemic patients 90 days after treatment, *C. xanthocarpa* was able to reduce the proportion of patients with high LDL levels since zero of the individuals from the CG (0/6) obtained an LDL level equal to or lower than 130 mg/dL (considered a normal LDL level), whereas three patients from the EG 250 group (3/7) and seven from the EG 500 (7/9) did reach this goal ($P=0.01$, Chi-square test).

Please, insert Figure 3 here.

When other lipid profile parameters were analyzed, we detected no alteration on triglyceride, VLDL or HDL levels among control, EG 250 and EG 500 groups in undesirable TC level patients or in hypercholesterolemic patients (Table II). Moreover, no statistical differences among the groups on the weight, abdominal circumference, hematocrit and hemoglobin of the patients were observed.

Please, insert Table II here.

3.2. Effects of *C. xanthocarpa* on oxidative stress parameters

No differences in protein carbonyl levels (an indicative of oxidative stress) among the groups before treatment or in undesirable level patients after 90 days (Figure 4A and B) were observed. However, a significant reduction in oxidative stress was seen in hypercholesterolemic patients who received 250 (EG 250) or 500 mg (EG 500) of *C. xanthocarpa* when compared with the control group (Fig. 4B). We also observed that the protein carbonyl level was lower in undesirable level patients than in hypercholesterolemic patients before treatment (protein carbonyl levels of 0.098 ± 0.008 and 0.317 ± 0.097 nmol/mg protein, $P < 0.01$, Student "t" test). Reinforcing the idea that plasma cholesterol and protein carbonyl levels are associated, we detected a positive correlation between protein carbonyl and TC levels (Pearson $r = 0.48$, $P = 0.002$) (Figure 4C).

Please, insert Figure 4 here.

As our clinical data suggested that *C. xanthocarpa* could have an antioxidant action, we carried out *in vitro* ABTS assays to demonstrate the free radical scavenger activity of *C. xanthocarpa*. We observed that the extract of *C. xanthocarpa* leaves presented high antioxidant potential, with IC_{50} value of 27 ± 2 $\mu\text{g/mL}$. Furthermore, the aqueous infusion of *C. xanthocarpa* leaves or quercetin also produced antioxidant effect, with IC_{50} values of 12 ± 1 $\mu\text{g/mL}$ and 1 ± 0.1 $\mu\text{g/mL}$, respectively. We have also detected that *C. xanthocarpa* extract (100 $\mu\text{g/mL}$) significantly reduced the increase in plasma protein carbonyl induced by hydrogen peroxide *in vitro* (Figure 5).

Please, insert Figure 5 here.

*3.3 Effects of *C. xanthocarpa* on HMGR activity*

To identify the possible target of *C. xanthocarpa* action, *C. xanthocarpa* on HMGR activity was tested. This enzyme is the main target of clinically used lipid lowering drugs. *C. xanthocarpa* extract in different concentrations (0.1-300 µg/ mL) resulted in the concentration-dependent inhibition of HMGR activity, with an IC₅₀ value of 9±3 µg/mL (data not shown).

3.4. Phytochemical analysis

The phytochemical analysis of *C. xanthocarpa* indicated the intense presence of saponins, tannins and terpenes and small presence of flavonoids.

4. Discussion and conclusions

Clinical evidences have shown that hypercholesterolemia (increased plasma levels of TC and/or LDL cholesterol) is an independent risk factor for future cardiovascular events (Bhatt et al., 2006). Many studies have demonstrated that the use of drugs that reduce plasma levels TC and/or LDL cholesterol may decrease the number of cardiovascular events and mortality from coronary disease (Jones et al., 2003). Thus, many individuals have turned to alternative treatments to control hypercholesterolemia, despite some of these treatments have been used empirically,

lacking scientific studies that confirm their efficacy (Dickel et al., 2007). In this context, *C. xanthocarpa plant* has been empirically used for its potential effect in reducing blood cholesterol levels in Brazil (Alice et al., 1995). Here, we confirmed the ethnopharmacological use of *C. xanthocarpa* showing that the treatment with *C. xanthocarpa* capsules reduced TC and LDL levels in hypercholesterolemic patients, an effect that seems to be related with its antioxidant property.

We demonstrated that the administration of *C. xanthocarpa* exerts a significant reduction in TC in hypercholesterolemic patients at 45 (reduction of $24\pm 3\%$) and 90 days (reduction of $28\pm 3\%$) after treatment started. As high TC levels is an important risk factor for the development of coronary disease (Austin et al., 2000), the use of *C. xanthocarpa* could be interesting in the prevention of vascular disease. Similarly to TC, *C. xanthocarpa* treatment produced a significant $45\pm 4\%$ reduction of LDL in the hypercholesterolemic individuals. Interestingly, the effect produced by *C. xanthocarpa* is very close to those seen in patients using oral hypolipemiant, such as rosuvatin (Jones et al., 2003). Thus, *C. xanthocarpa* could be an alternative to treat hypercholesterolemic patients, since there are limitations on the use of oral hypolipemiant related with their adverse effects (Golomb and Evans, 2008). Furthermore, it is important to point out that the reduction in LDL levels produced by *C. xanthocarpa* was very close to the degree of reduction shown to interfere in the size of the atherosclerotic plaque (National Cholesterol Education Program, 2001), suggesting again that *C. xanthocarpa* could be effective in reducing the risk of coronary events.

Our results with hypercholesterolemic patients contrast with a previous preliminary pre-clinical study that was not able to detect any effect of *C. xanthocarpa* on the plasma cholesterol levels in rats fed with a high calorie diet (Biavatti et al.,

2004). In this pre-clinical study, a 28-day high calorie diet was not capable of producing increased cholesterol levels in rats. Thus, this result agrees with our finding where *C. xanthocarpa* reduced plasma cholesterol or LDL levels just in patients with hypercholesterolemia, but not in undesirable level patients. Moreover, the short time of treatment in the pre-clinical study (28 days) could also have limited any effect of *C. xanthocarpa*, since we have found a reducing effect of *C. xanthocarpa* 45 days after the treatment started. Thus, the present study is important in its contribution to the data available on *C. xanthocarpa*, mainly considering the lack of studies focusing on the lipid profile in humans.

Our study also demonstrated that there was a reduction of TC and LDL in the control group after treatment. This finding may be explained by the fact that the individuals in this study were oriented to carry out a dietary restriction of cholesterol. In fact, a great number of studies have demonstrated that adopting a diet restricted in foods rich in cholesterol is an action that should be proposed to treat hypercholesterolemic patients (Cohn, 1987). Besides this TC and LDL reduction by dietary restriction, the concomitant treatment with *C. xanthocarpa* was even more capable of reducing hypercholesterolemia.

Oxidative stress is an important event in the development and maintenance of atherosclerosis (Madamanchi et al., 2005). Protein carbonyl is the most widely used biomarker for oxidative damage to proteins by multiple forms reactive oxygen species (ROS) (Dalle-Donne et al., 2006). Based on the measurement of protein carbonyl, it has been suggested that the accumulation of oxidized proteins is associated with atherosclerosis (Stadtman, 1992; Stadtman and Levine, 2003). However, it is not clear the relationship between plasma lipid levels and protein carbonylation. The present study indicated that TC levels are associated with increased PC levels, since

we observed a positive correlation between TC and PC levels and an increased PC in hypercholesterolemic patients when compared with undesirable level patients before treatment. Thus, our study confirmed the hypothesis that increased levels of cholesterol may be associated with PC levels.

Previous studies have demonstrated a relation between oxidative stress and cholesterol synthesis (Pallottini et al., 2005). Moreover, an increase in ROS has already been demonstrated to influence 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activation state (Pallottini et al., 2007). Our results also suggest that the effect of *C. xanthocarpa* on hypercholesterolemia is related, at least in part, with its anti-oxidant potential. In fact, we demonstrated that the consumption of *C. xanthocarpa* for 90 days reduced PC levels of hypercholesterolemic patients. In line with this observation, *C. xanthocarpa* showed to have a high antioxidant capacity on ABTS test. Moreover, *C. xanthocarpa* reduced the plasma protein carbonylation induced by hydrogen peroxide.

The phytochemical components responsible for *C. xanthocarpa* antioxidant effect are unknown, but preliminary studies demonstrated the presence of tannins and flavonoids (quercetin, myricetin, quercitrin and rutin) in this plant (Schmeda-Hirschmann, 1995; Markman et al., 2004). Moreover, our preliminary phytochemical analysis of *C. xanthocarpa* indicated the intense presence of saponins, tannins and terpenes and small presence of flavonoids. These findings suggest that *C. xanthocarpa* contains bioactive compounds that function as reactive oxygen species scavengers.

C. xanthocarpa also reduced oxidative stress even in a dose (250 mg) that did not reduce TC or LDL in hypercholesterolemic patients, suggesting that the anti-

oxidative action is not the only target to *C. xanthocarpa* effect in patients. Thus, we also investigated the possible action of *C. xanthocarpa* directly in HMGR activity, the main target of the clinically used lipid-lowering drug (Istvan and Deisenhofer, 2000). HMGR is the key and rate limiting enzyme of cholesterol biosynthetic pathway (Marino et al., 2002). Our results revealed that *C. xanthocarpa* caused concentration-dependent inhibition over HMGR activity, showing that extract constituents inhibit the catalytic subunit of the enzyme. The mechanism of this effect is parallel with the mechanism of HMGR inhibitors, which were originally designed and developed to compete with 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A for binding at the catalytic site HMGR and thereby to reduce the synthesis of cholesterol (Kleemann and Kooistra, 2005). Thus, *C. xanthocarpa* seems to exert its lipid-lowering effects in hypercholesterolemic patients by a combination of its anti-oxidant and anti-HMGR activities. Since high lipid levels and oxidative stress occur at the same time in hypercholesterolemic patients, a plant as *C. xanthocarpa* that shares anti-oxidant and anti-HMGR activities could have a better clinical profile compared with the traditional drugs, as described in literature (Haendeler et al., 2004).

Other interesting findings from this study were the lack of hematological side effects, at least during the experimental period, as no alterations in Hb and Hct were observed, and the lack of weight loss, refuting the popular belief that the use of *C. xanthocarpa* tea is useful in the treatment of obesity (Dickel et al., 2007). It is important to remember that the dietary restriction used in this study was a restriction specifically of those foods known to be high in cholesterol and not a hypocaloric diet for weight-loss.

Coronary arterial disease has been consistently correlated with decreased levels of HDL cholesterol (Austin et al., 2000). It is interesting that, conventionally,

the oral hypolipemiant used to hypercholesterolemia have had either a very small or no contribution in increasing HDL levels (Jones et al., 2003; Tavidou et al., 2006). In our study, a small and similar increase on HDL levels was detected neither in CG nor in 500 EG groups of hypercholesterolemic patients.

In conclusion, confirming its popular use, the treatment with *C. xanthocarpa* encapsulated reduced blood TC and LDL levels in hypercholesterolemic patients. Besides its effect on cholesterol levels, this plant reduced the oxidative stress in plasma of hypercholesterolemic patients as well. Finally, the present research is the first clinical study in humans, as far as we know, with quite optimistic results pointing to the value of further studies in this field.

Acknowledgements

This study was supported by Instituto de Cardiologia de Cruz Alta, by Universidade de Cruz Alta and by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico (CNPq) (Brazil). The fellowships from CNPq and CAPES are also acknowledged.

LEGENDS TO THE FIGURES

Figure 1. Trial profile

Figure 2. Effects of *C. xanthocarpa* in total cholesterol in the doses of 250 mg (EG 250) and 500 mg (EG 500) in hypercholesterolemic patients and control subjects (CG) before (0) and 45 or 90 days after treatment started. * $P < 0.05$ compared to CG. # $P < 0.05$ compared to time 0 (One-way ANOVA, followed by Student Newman-Keuls Test).

Figure 3. Effects of *C. xanthocarpa* in LDL in the doses of 250 mg (EG 250) and 500 mg (EG 500) in hypercholesterolemic patients and control subjects (CG) before (0) and 45 or 90 days after treatment started. * $P < 0.05$ compared to CG. # $P < 0.05$ compared to time 0 (One-way ANOVA, followed by Student Newman-Keuls Test).

Figure 4. Effects of *C. xanthocarpa* in plasmatic carbonyl protein in the dose of 250 mg (EG 250) in undesirable level patients and control subjects (CG) (A), and in the doses of 250 mg (EG 250) and 500 mg (EG 500) in hypercholesterolemic patients and control subjects (CG) (B) before (0) and 90 days after treatment started. * $P < 0.05$ compared to CG (One-way ANOVA, followed by Student Newman-Keuls Test). (C) Pearson correlation analysis between carbonyl protein and TC levels.

Figure 5. Action of *C. xanthocarpa* (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) on plasmatic protein carbonylation induced by hydrogen peroxide (40 mM) *in vitro*. Each point represents the mean of 2-6 experiments carried out in duplicate and the vertical lines indicate the S.E.M. * $P < 0.05$ compared with vehicle to control. # $P < 0.05$ compared with vehicle to hydrogen peroxide. (One-way ANOVA, followed by Student Newman-Keuls Test).

REFERENCES

- Akagawa, M., Sasaki, D., Ishii, Y., Kurota, Y., Yotsu-Yamashita, M., Uchida, K., Suyama, K., 2006. New method for the quantitative determination of major protein carbonyls, alpha-aminoadipic and gamma-glutamic semialdehydes: investigation of the formation mechanism and chemical nature in vitro and in vivo. *Chemical Research in Toxicology*. 19, 1059-1065.
- Alice, C.B., Siqueira, N.C.S., Mentz, L.A., Brasil e Silva, G.A.A., José, K.F.D., 1995. *Plantas medicinais de uso popular: Atlas Farmacognóstico*. Ulbra, Canoas, pp. 59-61.
- Aronow, W.S., 2008. Treatment of high-risk older persons with lipid-lowering drug therapy. *American Journal of Therapeutics*. 15, 102-107.
- Austin, M.A., Rodriguez, B.L., McKnight, B., McNeely, M.J., Edwards, K.L., Curb, J.D., Sharp, D.S., 2000. Low-density lipoprotein particle size, triglycerides, and High-density lipoprotein cholesterol as risk factors for coronary heart disease in older Japanese-american men. *American Journal of Cardiology*. 86, 412-416.
- Bhatt, D.L., Steg, P.G., O'Hman, E.M., Hirsch, A.T., Ikeda, Y., Mas, J.L., Goto, S., Liao, C.S., Richard, A.J., Rother, J., Wilson, P.W., 2006. International prevalence, recognition, and treatment of cardiovascular risk factors in outpatients with atherothrombosis. *Journal of the American Medical Association*. 295, 180-189.
- Biavatti, M.W., Farias, C., Curtius, F., Brasil, L.M., Hort, S., Schuster, L., Leite, S.N., Prado, S.R.T., 2004. Preliminary studies on *Campomanesia xanthocarpa* (Berg.) and *Cuphea carthagenensis* (Jacq.) J.F. Macbr. Aqueous extract: weight

control and biochemical parameters. *Journal of Ethnopharmacology*. 93, 385-289.

Cohn, S.H., 1987. New coNational Cholesterol Education Programs of body composition. In: Ellis, K.J., Yasumura, S., Morgan, W.D. (Eds). In: *Vivo body comosition studies*. The Intitute of Physical Sciences in Medicine, London, pp. 1-14.

Dalle-Donne, I., Rossi, R., Colombo, R., Giustarini, D., Milzani, A., 2006. Biomarkers of oxidative damage in human disease. *Clinical Chemistry*. 52, 601-623.

De Lorgeril, M., Salen, P., Martin, J., Monjaud, I., Delaye, J., Mamelle, N., 1999. Mediterranean diet, traditional risk factors, and the rate of cardiovascular complicatios after myocardial infarction. *Circulation*. 99, 779-785.

Dickel, M.L., Rates, S.M., Ritter, M.R., 2007. Plantas populary used for loosing weight purposes in Porto Alegre, South Brazil. *Journal of Ethnopharmacology*. 109, 60-71.

Fernandes, D.C., Regasini, L.O., Velloso, J.C., Pauletti, P.M., Castro-Gamboa, I., Bolzani, V.S., Oliveira, O.M.M., Silva, D.H.S., 2008. Myeloperoxidase inhibitory and radical scavenging activities of flavones from *Pterogyne nitens*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. 56, 723-726.

Ferro, E., Schinini, A., Maldonado, M., Rosner, J., Hirschmann, G.S., 1988. *Eugenia uniflora* leaf extract and lipid metabolism in *Cebus apella* monkeys. *Journal of Ethnopharmacology*. 24, 321-325.

- Friedwald, W.T., Levy, R.I., Fredrickson, D.S., 1972. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without the use of preparative ultracentrifuge. *Clinical Chemistry*. 18, 100-107.
- Golomb, B.A., Evans, M.A., 2008. Statin adverse effects: a review of the literature and evidence for a mitochondrial mechanism. *American Journal of Cardiovascular Drugs*. 8, 373-418.
- Haendeler, J., Hoffmann, J., Zeiher, A.M., Dimmeler, S., 2004. Antioxidant effects of statins via S-nitrosylation and activation of thioredoxin in endothelial cells: a novel vasculoprotective function of statins. *Circulation*. 110, 656-861.
- Hamasaki, S., Higano, S.T., Suwaidi, J.A., Nishimura, R.A., Miyauchi, K., Holmes, D.R., Lerman, J.A., 2000. Cholesterol-lowering treatment is associated with improvement in coronary vascular remodeling and endothelial function in patients with normal or mildly diseased coronary arteries. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*. 20, 737-743.
- Harborne, J.B. 1984. *Phytochemical Methods: A guide to Modern Techniques of Plant Analysis* (2nd ed.), Chapman and Hall, London, pp. 7-274.
- Istvan, E.S., Deisenhofer, J., 2000. The structure of the catalytic portion of human HMG-CoA reductase. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1529, 9-12.
- Jones, P.H., Davidson, M.H., Stein, E.A., Bays, H.E., McKenney, J.M., Miller, E., Cain, V.A., Blasetto, J.W., 2003. Comparison of the efficacy and safety of rosuvastatin versus atorvastatina, simvastatina and pravastatina across doses. Stellar Study Group. *American Journal of Cardiology*. 92, 152-160.

- Kleemann, R., Kooistra, T., 2005. HMG-CoA reductase inhibitors: effects on chronic subacute inflammation and onset of atherosclerosis induced by dietary cholesterol. *Current Drugs Targets – Cardiovascular and Haematological Disorders*. 5, 441-453.
- Levine, R.L., Garland, D., Oliver, C.N., Amici, A., Climent, I., Lenz, Anke-G., Ahn, B.W., Shaltiel, S., Standtman, E., 1990. Determination of Carbonyl Content in Oxidatively Modified Proteins. *Methods in Enzymology*. 186, 464-478.
- Libby, P., 2000. Changing coNational Cholesterol Education Programs of atherogenesis. *Journal of International Medical Research*. 247, 349–358.
- Libby, P., Rideker, P.M., Maseri, A., 2002. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation*. 105, 1135-1143.
- Lorenzi, H., 1992. *Árvores Brasileiras: Manual de Identificação e Cultivo de Plantas Arbóreas do Brasil*, São Paulo, pp. 256.
- Madamanchi, N.R., Vendrov, A., Runge, M.S., 2005. Oxidative stress and vascular disease. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*. 25, 29-38.
- Marino, M., Pallottini, V., D'Eramo, C., Cavallini, G., Bergamini, E., Treantance, A., 2002. Age-related changes of cholesterol and dolichol biosynthesis in rat. *Mechanisms of Ageing and Development*. 123: 1183-89.
- Markman, B.E.O., Bacchi, E.M., Kato, E.T.M., 2004. Antiulcerogenic effects of *Campomanesia xanthocarpa*. *Journal of Ethnopharmacology*. 94: 55-57.
- National Cholesterol Education Program, 2001. Executive Summary of the Third Report. Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood

Cholesterol in Adults (Adults Treatment Panel III). Journal of the American Medical Association. 285, 2486-2497.

Pallottini, V., Martini, C., Pascolini, A., Cavallini, G., Gori, Z., Bergamini, E., Incerpi, S., Trentalance, A., 2005. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase deregulation and age-related hypercholesterolemia: A new role for ROS. Mechanisms of Ageing and Development. 126, 845-851.

Pallottini, V., Martini, C., Cavallini, G., Bergamini, E., Mustard, K.J., Hardie, D.G., Trentalance, A., 2007. Age-related HMG-CoA reductase deregulation depends on ROS-induced p38 activation. Mechanisms of Ageing and Development. 128, 688-695.

Schmeda-Hirschmann, G., 1995. Flavonoids from *Calycorectes*, *Campomanesia*, *Eugenia* and *Hexachlamys* species. Fitoterapia. 66, 373-674.

Stadtman, E.R., 1992. Protein oxidation and aging. Science 257:1220-24.

Stadtman, E.R., Levine R.L., 2003. Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. Amino Acids. 25, 207-18.

Tavridou, A., Efthimiadis, A., Efthimiadis, I., Paschalidou, H., 2006. Antioxidant effects of simvastatin in primary and secondary prevention of coronary heart disease. European Journal of Clinical Pharmacology. 62, 485-489.

Figure 1

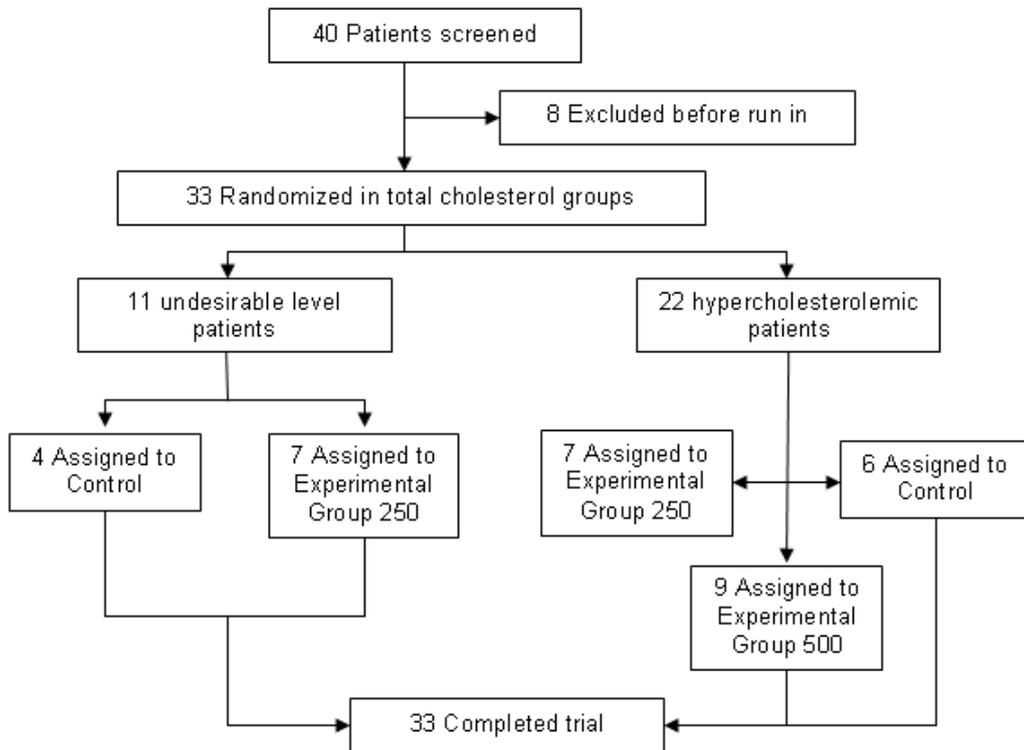


Figure 2

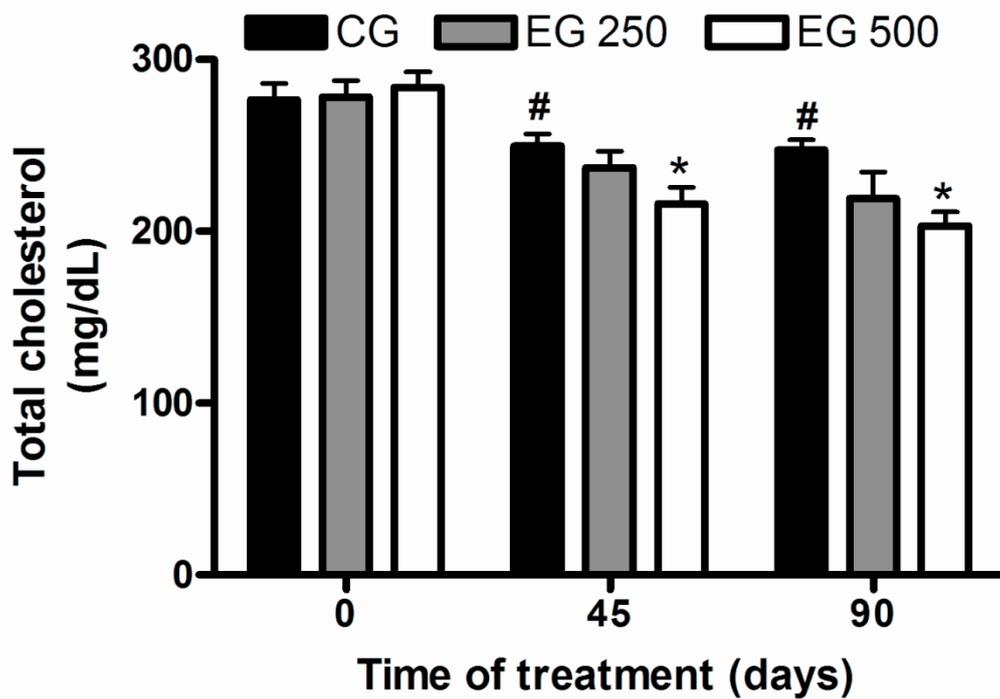


Figure 3

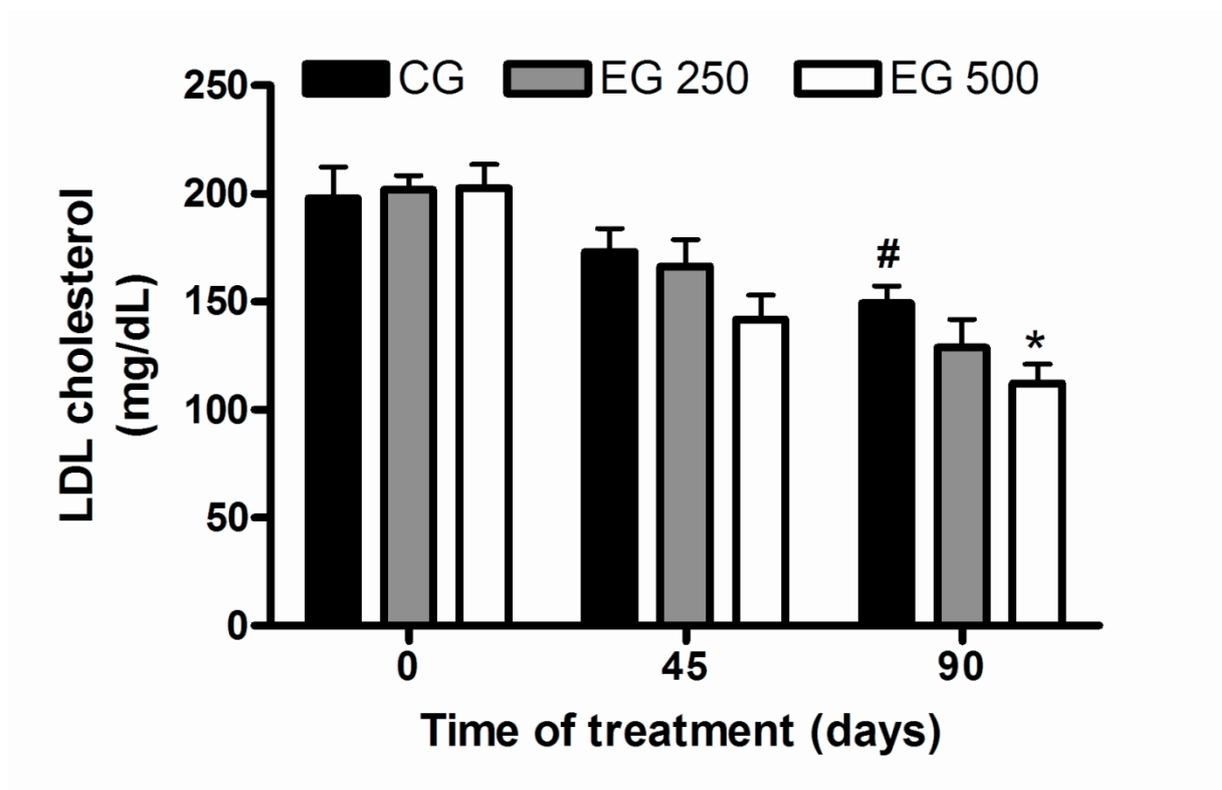


Figure 4

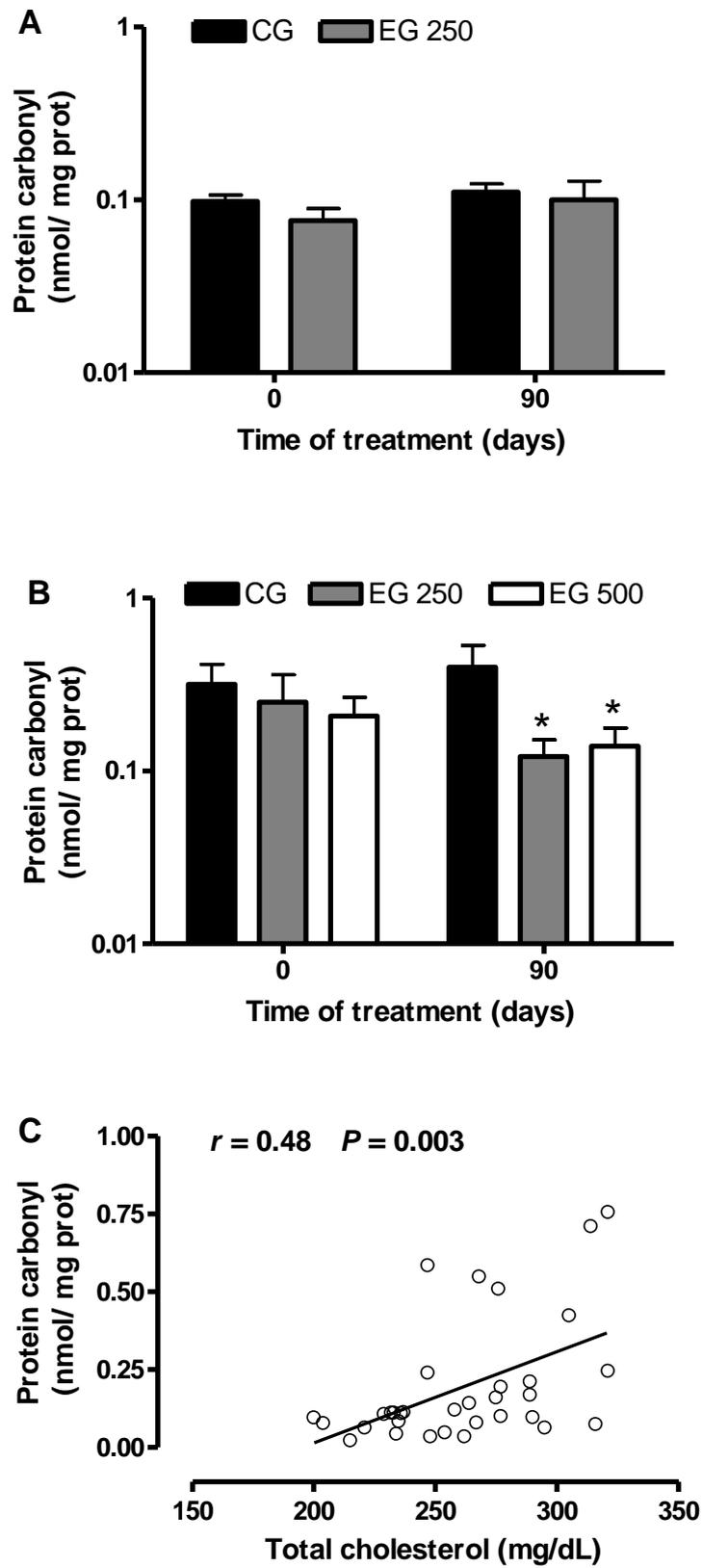


Figure 5

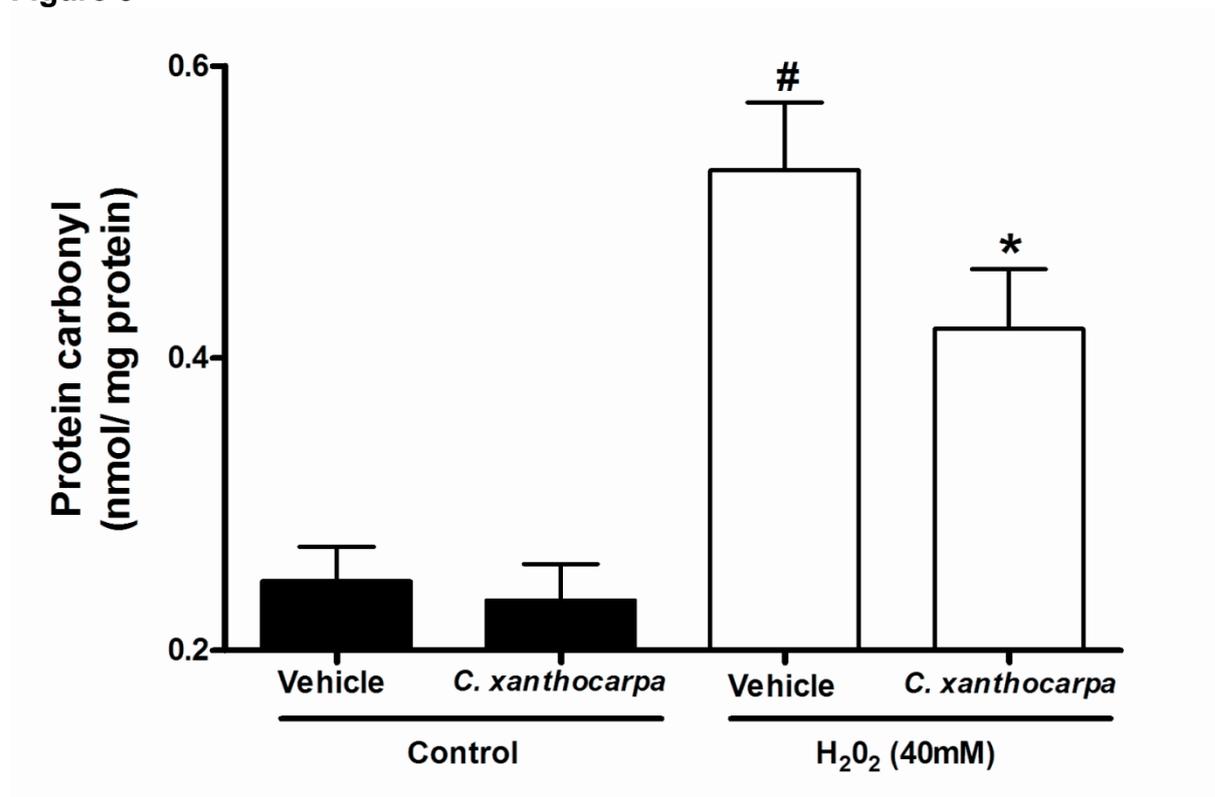


Table I. Some characteristics of the experimental groups before treatment. Age is represented by mean \pm SEM.

Parameters	Hypercholesterolemic				
	Undesirable level patients		patients		
	CG	EG 250	CG	EG 250	EG 500
Age (years) ^a	52 \pm 17	54 \pm 13	61 \pm 13	50 \pm 16	58 \pm 13
Gender (Male/Female) ^a	1/3	2/5	2/4	3/4	3/6
Smoking (n° of smoking/ total n° of patients) ^a	0/4	1/7	1/6	1/7	1/9
Sedentarism (n° of sedentary/ total n° of patients) ^a	3/4	3/7	2/6	4/7	5/9

^aNo significant differences were observed between groups (one-way ANOVA for age and χ^2 test for the other parameters).

Table II. Triglycerides, VLDL and HDL (mg/dL) levels of patients before (pre) and 90 days after *C. xanthocarpa* treatment (post).

Parameters	Groups									
	Undesirable level patients				Hypercholesterolemic patients					
	CG		EG 250		CG		EG 250		EG 500	
	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post
Triglycerides ^a	175±40	180±51	141±42	174±77	149±19	235±54	188±157	200±96	207±122	213±155
VLDL ^a	35±8	36±10	28±8	35±15	29±4	47±11	37±31	40±19	41±24	42±31
HDL ^a	44±8	52±6	44±15	52±16	42±7	49±6	41±9	51±4	39±10	48±8

^a No significant differences were observed between groups, two-way ANOVA. Results are expressed as the mean±SEM.

Carta referente ao artigo revisado pelos autores, depois dos comentários dos revisores, e submetido novamente a revista

Fwd: Submission Confirmation for JEP-D-09-01459R1

De:  **Juliano Ferreira** (ferreiraj99@gmail.com)
 Enviada: quarta-feira, 28 de outubro de 2009 18:19:36
 Para: Jonatas Zeni Klafke (jonzeni@hotmail.com)

----- Forwarded message -----

From: **Journal of Ethnopharmacology** <jethnoph@chem.leidenuniv.nl>
 Date: 2009/10/28
 Subject: Submission Confirmation for JEP-D-09-01459R1
 To: ferreiraj99@gmail.com

Ref.: Ms. No. JEP-D-09-01459R1

Effects of Campomanesia xanthocarpa on Biochemical, Hematological and Oxidative Stress Parameters in Hypercholesterolemic Patients

Dear Dr.Ferreira,

Journal of Ethnopharmacology has received your revised submission.

You may check the status of your manuscript by logging onto Elsevier Editorial at (<http://ees.elsevier.com/jep/>).

Kind regards,

Journal of Ethnopharmacology



**Journal of
ETHNOPHARMACOLOGY**

Contact us 
 Help ?



» EES v6.1 Upgrade ... [more](#)
 » New fraudulent email in circulation ... [more](#)

[home](#) | [main menu](#) | [submit paper](#) | [guide for authors](#) | [register](#) | [change details](#) | [log out](#)

Username: ferreiraj99
 Role: Author

Versi

Revisions Being Processed for Author Juliano Ferreira, Ph.D

Page: 1 of 1 (1 total revisions being processed) Display 10 results per page.

Action	Manuscript Number	Title	Date Submission Began	Status Date	Current Status
Action Links	JEP-D-09-01459R1	Effects of Campomanesia xanthocarpa on Biochemical, Hematological and Oxidative Stress Parameters in Hypercholesterolemic Patients	28/10/2009	28/10/2009	With Editor

Page: 1 of 1 (1 total revisions being processed) Display 10 results per page.

6. DISCUSSÃO

Evidências clínicas têm mostrado que a hipercolesterolemia (aumento dos níveis plasmáticos de CT e/ou LDL) é um fator de risco independente para eventos cardiovasculares futuros (Bhatt et al., 2006). Muitos estudos têm demonstrado que o uso de drogas que reduzem os níveis de CT e/ou LDL plasmáticos podem diminuir o número de eventos cardiovasculares e mortalidade por DAC (Jones et al., 2003). Desta maneira, muitos indivíduos têm buscado tratamentos alternativos para controlar a hipercolesterolemia, mas muitos destes tratamentos são usados empiricamente, carecendo de estudos científicos que confirmem sua eficácia (Dickel et al., 2007). Nesse contexto, a planta *C. xanthocarpa* tem sido usada empiricamente por seu efeito em reduzir os níveis de colesterol sanguíneo no Brasil (Alice et al., 1995). Nesse trabalho, nós confirmamos o uso etnofarmacológico da *C. xanthocarpa* mostrando que o tratamento com cápsulas de *C. xanthocarpa* reduz os níveis de CT e LDL em pacientes hipercolesterolêmicos, e o efeito observado está relacionado com as propriedades antioxidantes.

Nós demonstramos que a administração de *C. xanthocarpa* exerce uma redução significativa no CT em pacientes hipercolesterolêmicos em 45 (redução de $24\pm 3\%$) e 90 dias (redução de $28\pm 3\%$) após o início do tratamento. Os níveis altos de CT são um dos fatores de risco para o desenvolvimento de DAC (Austin et al., 2000), e o uso de *C. xanthocarpa* poderia ser interessante para a prevenção de doenças vasculares. Similar ao CT, o tratamento com *C. xanthocarpa* produziu uma redução significativa de $45\pm 4\%$ da LDL em indivíduos hipercolesterolêmicos. Interessantemente, o efeito produzido pela *C. xanthocarpa* é bastante próximo ao que é observado em pacientes que usam drogas hipolipemiantes, como a rosuvastatina (Jones et al., 2003). Desta maneira, *C. xanthocarpa* poderia ser uma alternativa para o tratamento de pacientes hipercolesterolêmicos, visto que há limitações com o uso oral de hipolipemiantes relacionadas com seus efeitos adversos (Golomb e Evans, 2008). Além disso, a redução nos níveis de LDL produzidos pela *C. xanthocarpa* foi muito próxima ao grau de redução que interfere no tamanho da placa aterosclerótica, sugerindo novamente que a *C. xanthocarpa* pode ser eficaz na redução dos riscos de eventos coronarianos.

Nossos resultados com pacientes hipercolesterolêmicos contrastam com estudos preliminares pré-clínicos que não foram capazes de detectar qualquer efeito da *C. xanthocarpa* nos níveis de colesterol plasmático de ratos alimentados com uma dieta hipercalórica (Biavatti et al., 2004). Nesse estudo pré-clínico uma dieta

hipercalórica de 28 dias não foi capaz de produzir um aumento nos níveis de colesterol em ratos. Desse modo, esses resultados concordam com nossos achados, onde a *C. xanthocarpa* reduziu os níveis plasmáticos de CT ou LDL somente em pacientes com hipercolesterolemia, mas não em pacientes com níveis indesejáveis. Além disso, o curto tempo de tratamento do estudo pré-clínico (28 dias) poderia também ter limitado qualquer efeito da *C. xanthocarpa*, visto que foi encontrado um efeito redutor da *C. xanthocarpa* 45 dias após o início de tratamento iniciado. Portanto, o presente estudo é importante para a avaliação de dados da *C. xanthocarpa*, essencialmente considerando a necessidade de estudos focados no perfil lipídico de humanos.

Nosso estudo também demonstrou uma redução nos níveis de CT e LDL no grupo controle após o tratamento. Esses achados podem ser explicados pelo fato dos indivíduos terem sido orientados a manter uma dieta restrita de colesterol. De fato, alguns pacientes deste estudo demonstraram ter adotado a dieta com restrição a alimentos ricos em colesterol, e esta é uma ação que deve ser proposta para o tratamento de pacientes hipercolesterolêmicos (Cohn, 1987). Além desta redução de CT e LDL pela restrição alimentar, o tratamento concomitante com *C. xanthocarpa* foi ainda mais eficaz em reduzir a hipercolesterolemia.

O estresse oxidativo é um evento importante para o desenvolvimento e manutenção da aterosclerose (Madamanchi, 1995). A proteína carbonilada é o biomarcador mais frequentemente usado para dano oxidativo em proteínas por múltiplas formas de EROs (Dalle-Donne et al., 2006). Baseado no mensuramento da proteína carbonilada, tem-se sugerido que o acúmulo de proteínas oxidadas está associada com aterosclerose (Stadtman, 1992; Stadtman and Levine, 2003). Porém, ainda não está bem clara a relação entre os níveis lipídicos no plasma e carbonilação protéica. O presente estudo indicou que os níveis de CT estão associados com o aumento nos níveis de proteína carbonilada, visto que observamos uma correlação positiva entre os níveis de CT e proteína carbonilada em pacientes hipercolesterolêmicos quando comparados com pacientes com níveis indesejáveis antes do tratamento. Deste modo, nosso trabalho confirma a hipótese que níveis aumentados de colesterol podem ser associados com níveis de proteína carbonilada.

Estudos prévios têm demonstrado uma relação entre estresse oxidativo e síntese de colesterol (Pallottini et al., 2005). Além disso, um aumento nas EROs têm

demonstrado influenciar no estado de ativação da HMG-CoA redutase (Pallottini et al., 2007). Nossos estudos também sugerem que este efeito da *C. xanthocarpa* na hipercolesterolemia está relacionado, pelo menos em parte, com este potencial antioxidante. De fato, demonstramos que a administração de *C. xanthocarpa* por 90 dias reduz os níveis de proteína carbonilada em pacientes hipercolesterolêmicos. De acordo com esta observação, *C. xanthocarpa* mostrou ter uma alta capacidade antioxidante no teste do ABTS. Além disso, *C. xanthocarpa* reduziu a carbonilação de proteína plasmática induzida pelo peróxido de hidrogênio. Os componentes fitoquímicos responsáveis pelo efeito antioxidante da *C. xanthocarpa* são desconhecidos, mas estudos preliminares demonstraram a presença de flavonóides, (quercetina, mircetina, quercetrina e rutina) nesta planta (Schmeda-Hirschmann, 1995; Markman et al., 2004). Esses achados sugerem que a *C. xanthocarpa* contém compostos que funcionam como seqüestradores de EROS.

A *C. xanthocarpa* também reduziu o estresse oxidativo igualmente na dose de 250 mg que não reduziu os níveis de CT e LDL em pacientes hipercolesterolêmicos, sugerindo que a ação antioxidante não é somente o alvo do efeito da *C. xanthocarpa* nos pacientes. Deste modo, investigamos também a possível ação da *C. xanthocarpa* diretamente na atividade da HMG-CoA redutase, que é o maior alvo clínico das drogas redutoras de colesterol (Istvan and Deisenhofer, 2000). A HMG-CoA redutase é a enzima passo limitante da via da síntese do colesterol (Marino et al., 2008). Nossos resultados revelaram que a *C. xanthocarpa* causa a inibição da atividade da HMG-CoA redutase de forma dependente de sua concentração, mostrando que os constituintes do extrato inibem a subunidade catalítica da enzima. Os nossos resultados vão de encontro com estudos realizados com outros extratos de produtos naturais como os do alho, por exemplo, que inibem a atividade da HMG-CoA redutase (Send et al., 1992; Gebhardt, 1993). O mecanismo desse efeito é semelhante com o mecanismo dos inibidores da HMG-CoA redutase, os quais foram originalmente designados e desenvolvidos para competir com a HMG-CoA para ligar no sítio catalítico da HMG-CoA redutase e, por meio disso, reduzir a síntese de colesterol (Kleemann e Kooistra, 2005). Dessa maneira, a *C. xanthocarpa* mostrou exercer um efeito hipolipemiante em pacientes hipercolesterolêmicos pela combinação das atividades antioxidantes e anti-HMG-CoA redutase. Uma vez que os altos níveis de lipídeos e de estresse oxidativo ocorrem ao mesmo tempo em pacientes hipercolesterolêmicos, a planta *C. xanthocarpa* que tem ação antioxidante

e anti-HMG-CoA redutase poderia ter um melhor perfil clínico comparado com as drogas tradicionais, como as descritas na literatura (Haendeler et al., 2004).

Um interessante achado na amostra de *C. xanthocarpa* estudada foi a intensa presença de saponinas. Recentemente, tem-se encontrado algumas atividades biológicas e farmacológicas interessante em saponinas, incluindo atividades antifúngica, antibacteriana, antiinflamatória e influências hipocolesterolêmicas (Francis et al., 2002). As saponinas são formas detergentes naturais de um grupo heterogêneo de triterpenos ou esteróides glicosilados que ocorrem em muitas espécies de plantas (Sidhu and Oakenfull et al., 1986). Diversos estudos têm mostrado que diferentes tipos de saponinas diminuem os níveis de colesterol séricos em animais e humanos (Southon et al., 1988; Potter et al., 1993; Matsuura, 2001). Afrose e colaboradores (2009) mostraram que as saponinas são efetivas em reduzir os níveis de CT e LDL em ratos alimentados com uma dieta rica em colesterol. Aqui, demonstramos uma intensa presença de saponinas, taninos e terpenos e uma sutil presença de flavonóides no extrato das folhas de *C. xanthocarpa* para diferentes solventes e reveladores em cromatografia de camada delgada. A ação hipocolesterolêmica das saponinas parece ser, em parte, pela sua ligação ao colesterol e ácido biliares no lúmen do intestino, aumentando assim a excreção destes esteróides nas fezes (Sidhu and Oakenfull, 1986). Como resultado, o metabolismo do colesterol é acelerado e os níveis circulantes são diminuídos.

Outros achados interessantes deste estudo foram a ausência de efeitos colaterais hematológicos, uma vez que nenhuma alteração no hematócrito e na hemoglobina dos pacientes foi observada durante o período experimental avaliado, e a ausência de perda de peso, refutando a crendice popular que o chá de *C. xanthocarpa* é usado com sucesso no tratamento da obesidade (Dickel et al., 2007). É também importante lembrar que a restrição alimentar usada neste trabalho é uma restrição específica de alimentos com alto nível de colesterol, e não uma dieta hipocalórica para a perda de peso.

As doenças artérias coronarianas têm sido constantemente correlacionadas com a diminuição dos níveis de colesterol HDL (Austin et al., 2000). Interessantemente, os hipolipemiantes orais usados para a hipercolesterolemia têm uma pequena ou quase nenhuma contribuição em aumentar os níveis da HDL (Jones et al., 2003; Tavridou et al., 2006). No nosso estudo, nenhum pequeno ou

similar aumento nos níveis de HDL foi detectado no grupo controle ou no grupo tratado com 500 mg de *C. xanthocarpa*.

Em conclusão, confirmando o uso popular, o tratamento com *C. xanthocarpa* encapsulada reduziu os níveis sanguíneos de colesterol total e LDL em pacientes hipercolesterolêmicos. Além deste efeito nos níveis de colesterol, esta planta reduziu o estresse oxidativo plasmático de pacientes hipercolesterolêmicos. Finalmente, a presente pesquisa é o primeiro estudo clínico em humanos, pelo menos que nós conhecemos, com resultados otimistas para o incentivo de posteriores estudos neste campo. Para tanto, pretende-se realizar um estudo com um número maior de pacientes para que então se possa avaliar outros parâmetros, como o inflamatório por exemplo, contribuindo para a formação de um conhecimento mais aprofundado das situações em que podem ser utilizados tais tratamentos alternativos.

7. CONCLUSÕES

Tendo em vista os resultados obtidos no presente estudo, pode-se concluir que:

7.1. O tratamento com as folhas de *C. xanthocarpa* encapsuladas reduziu os níveis séricos de colesterol total e LDL em pacientes hipercolesterolêmicos.

7.2. O tratamento com as folhas de *C. xanthocarpa* encapsuladas reduziu também o estresse oxidativo plasmático em pacientes hipercolesterolêmicos.

7.3. O tratamento com as folhas de *C. xanthocarpa* encapsuladas não alterou os parâmetros hematológicos e antropométricos em nenhum dos grupos estudados.

7.4. Há uma correlação positiva entre os níveis de colesterol total sérico e o estresse oxidativo plasmático, uma vez que níveis de proteína carbonilada estão mais elevados em pacientes com maiores níveis de colesterol total.

7.5. A *C. xanthocarpa* apresentou uma atividade antioxidante e anti-HMG-CoA redutase.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AFROSE, S., HOSSAIN, MD.S., MAKI, T., TSUJJI, H. **Karaya root saponin exerts a hypocholesterolemic response in rats fed a high-cholesterol diet.** Nutr Res. 29: 350-354, 2009.
- ALICE, C.B., SIQUEIRA, N.C.S., MENTZ, L.A., BRASIL E SILVA, G.A.A., JOSÉ, K.F.D. **Plantas Medicinais de uso Popular (Atlas Farmacognóstico).** Editora da Ulbra, Canoas, p.59-61, 1995.
- ALZUGARAY, D; ALZUGARAY, C. **Primeira enciclopédia de plantas do Brasil.** Três livros e fascículos LTDA, São Paulo, p.233-234, 1984.
- ANDERSON, J.W., et al. **Meta-analysis of the effects of soy protein intake on serum lipids.** N Engl J Med. 333: 276-282, 1995.
- ARMSTRONG, E. J., MORROW, D. A., SABATINE, M. S. **Inflammatory biomarkers in acute coronary syndromes: part II: acute-phase reactants and biomarkers of endothelial cell activation.** Circulation 113: 152 –155, 2006.
- ARONOW, W.S. **Treatment of high-risk older persons with lipid-lowering drug therapy.** Am J Ther. 15: 102-107, 2008.
- AUSTIN, M.A., RODRIGUEZ, B.L., MCKNIGHT, B., MCNEELY, M.J., EDWARDS, K.L., CURB, J.D., SHARP, D.S. **Low-density lipoprotein particle size, triglycerides, and High-density lipoprotein cholesterol as risk factors for coronary heart disease in older Japanese-american men.** Am J Cardiol. 86: 412-416, 2000.
- BARROSO, G.M. **Sistemática de Angiospermas do Brasil.** Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2, p.114-121, 1991.
- BEYNEN, A.C., KATAN, M.B. **Reproducibility of the variations between humans in response of serum cholesterol to cessation of egg consumption.** Atherosclerosis 57: 19-31, 1985.
- BHATT, D.L., STEG, P.G., OHHMAN, E.M., HIRSCH, A.T., IKEDA, Y., MAS, J.L., GOTO, S., LIAU, C.S., RICHARD, A.J., ROTHER, J., WILSON, P.W. **International prevalence, recognition, and treatment of cardiovascular risk**

- factors in outpatients with atherothrombosis.** J Am Med Assoc. 295, 180-189, 2006.
- BIAVATTI, M.W., FARIAS, C., CURTIUS, F., BRASIL, L.M., HORT, S., SCHUSTER, L., LEITE, S.N., PRADO, S.R.T. **Preliminary studies on *Campomanesia xanthocarpa* (Berg.) and *Cuphea carthagenensis* (Jacq.) J.F. Macbr. Aqueous extract: weight control and biochemical parameters.** J Ethnopharmacol. 93: 385-289, 2004.
- BOREN, J., GUSTAFSSON, M., SKALEN, K., FLOOD, C. INNERARITY, T. L. **Role of extracellular retention of low density lipoproteins in atherosclerosis.** Curr Opin Lipidol. 11: 451– 456, 2000.
- BOURCIER, T., SUKHOVA, G., LIBBY, P. **The nuclear factor kappa-B signalling pathway participates in dysregulation of vascular smooth muscle cells in vitro and in human atherosclerosis.** J Biol Chem. 272: 15817-15824, 1997.
- BROWN, M.S., GOLDSTEIN, J. **A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis.** Science 232: 34-37,1986.
- BUCHER, N.L.R., OVERATH, P., LYNEN, F. **β -Hydroxy- β methylglutaryl coenzyme A reductase, cleavage and condensing enzymes in relation to cholesterol formation in rat liver.** Biochim Biophys Acta 40: 491–501,1960.
- COHN, S.H. **New coNational Cholesterol Education Programs of body composition.** In: Ellis, K.J., YASUMURA, S., MORGAN, W.D. (EDS). In: **Vivo body composition studies.** The Institute of Physical Sciences in Medicine, London, p.1-14, 1987.
- COOPER, A.D. **Hepatic uptake of chylomicron remnants.** J Lipid Res; 38: 2173-2192, 1997.
- CORRÊA, M. P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas.** Imprensa Nacional, Rio de Janeiro, p.509-510, 1984.
- CRAVO, A. B. **Frutas e ervas que curam.** São Paulo, 5 ed, p.108-109, 1994.

- CRUZ, G.L. **Dicionário das plantas úteis do Brasil**. Bertrand, Rio de Janeiro, Brasil, 5 ed, p.374-375, 1995..
- DALLE-DONNE, I., ROSSI, R., COLOMBO, R., GIUSTARINI, D., MILZANI, A. **Biomarkers of oxidative damage in human disease**. Clin Chem. 52: 601-623, 2006.
- DAVIGNON, J., GREGG, R.E., SING, C.F. **Apolipoprotein E polymorphism and atherosclerosis**. Arteriosclerosis 8: 1-21, 1988.
- DE LORGERIL, M., SALEN, P., MARTIN, J., MONJAUD, I., DELAYE, J., MAMELLE, N. **Mediterranean diet, traditional risk factors, and the rate of cardiovascular complications after myocardial infarction**. Circulation 99: 779-785, 1999.
- DEFESCHE, J.C., PRICKER, K.L., HAYDEN, M.R., VAN DEN ENDE, A.E., KASTELEIN, J.J.P. **Familial defective apolipoprotein B100 is clinically indistinguishable from familial hypercholesterolemia**. Arch Intern Med. 153: 2349-2356, 1993.
- DICKEL, M.L; RATES, S.M; RITTER, M.R. **Plantas populares used for losing weight purposes in Porto Alegre, South Brazil**. J Ethnopharmacol. 109: 60-71, 2007.
- FALK, E., SHAH, P.K., FUSTER, V. **Coronary plaque disruption**. Circulation 92: 657-671, 1995.
- FIELDING, C.J., FIELDING, P.E. **Molecular physiology of reverse cholesterol transport**. J Lipid Res. 36: 211-28, 1995.
- FORRESTER, J. S., MAKKAR, R., SHAH, P. K. **Increasing high-density lipoprotein cholesterol in dyslipidemia by cholesteryl ester transfer protein inhibition**. Circulation 111: 1847–1854, 2005.
- FRANCIS, G., KEREM, Z., MAKKAR, H.P.S., BECKER, K. **The biological action of saponins in animal systems: a review**. Br J Nutr. 88: 587-605, 2002.

- FURMAN, M. I., BENOIT, S. E., BERNARD, M. R., VALERI, C. R., BORBONE, M. I., BECKER, R. C., HECHTMAN, H. B., MICHELSON, A. D. **Increased platelet reactivity and circulating monocyte-platelet aggregates in patients with stable coronary artery disease.** J Am Coll Cardiol. 31: 352–358, 1998.
- GEBHARDT, R. **Multiple inhibitory effects of garlic extracts on cholesterol biosynthesis in hepatocytes.** Lipids 28: 613-619, 1993.
- GIANINI, S.D., FORTI, N., DIAMENT, J. **Hipolipemiantes I. Ação Predominante na Hipercolesterolemia.** In: BATLOUNI, M., RAMIRES, J.A.F. (ED). **Farmacologia e Terapêutica Cardiovascular.** São Paulo: Atheneu, 513-34, 1999.
- GOLDBERG, I.J. **Lipoprotein lipase and lipolysis: central roles in lipoprotein metabolism and atherogenesis.** J Lipid Res. 37: 693-707, 1996.
- GOLDSTEIN, J.L., HOBBS, H.H., BROWN, M.S. **Familial hypercholesterolemia.** In: SCRIVER, C.R., BEAUDET, A.L., SLY, W.S., VALLE D. (EDS). **The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease.** New York: McGraw-Hill, Inc., p. 1981–2030, 1995.
- GOLOMB, B.A., EVANS, M.A. **Statin adverse effects a review of the literature and evidence for a mitochondrial mechanism.** Am J Cardiovasc Drugs. 8: 373-418, 2008.
- GOULD, R.G., TAYLOR, C.B., HAGERMAN, J.S., WARNER, I., CAMPBELL, D.J. **Cholesterol metabolism: effect of dietary cholesterol on the synthesis of cholesterol in dog tissue in vitro.** J. Biol. Chem. 201: 519–523, 1953.
- HAENDELER, J., HOFFMANN, J., ZEIHNER, A.M., DIMMELER, S. **Antioxidant effects of statins via S-nitrosylation and activation of thioredoxin in endothelial cells: a novel vasculoprotective function of statins.** Circulation 110: 656-861, 2004.
- HAMASAKI, S., HIGANO, S.T., SUWAIDI, J.A., NISHIMURA, R.A., MIYAUCHI, K., HOLMES, D.R., LERMAN, J.A. **Cholesterol-lowering treatment is associated with improvement in coronary vascular remodeling and endothelial**

- function in patients with normal or mildly diseased coronary arteries. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 20: 737–743, 2000.
- HERTOG, M.G., et al. **Dietary antioxidants flavonoids and risk of coronary heart disease.** *Lancet* 342: 1007-11, 1993.
- HIGUCHI, M.L., SAMBIASE, N., PALOMINO, S., et al. **Detection of Mycoplasma pneumoniae and Chlamydia pneumoniae in ruptured atherosclerotic plaques.** *Braz J Med Biol Res.* 9: 1023-1026, 2000.
- HOKANSON, J. E., AUSTIN, M. A. **Plasma triglyceride level is a risk factor for cardiovascular disease independent of high-density lipoprotein cholesterol level: a meta-analysis of population based prospective studies.** *J Cardiovasc Risk.* 3: 213–219, 1996.
- HOLVOET, P., VANHAECKE, J., JANSSENS, S., VAN DE WERF, F., COLLEN, D. **Oxidized LDL and malondialdehyde-modified LDL in patients with acute coronary syndromes and stable coronary artery disease.** *Circulation* 98, 1487–1494, 1998.
- ISTVAN, E.S., DEISENHOFER, J. **The structure of the catalytic portion of human HMG-CoA reductase.** *Biochim Biophys Acta.* 1529: 9-12, 2000.
- JIN, F.Y., KAMANNA, V.S., KASHYAP, M.L. **Niacin accelerates intracellular apo B degradation by inhibiting triacylglycerol synthesis in human hepatoblastoma (HepG2) cells.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 19: 1051-1059, 1999.
- JOHNSON, P.J. **The assessment of hepatic function any investigation of jaundice.** In: MARSHALL, W.J. AND BANGERT, S.K (EDS). **Clinical Biochemistry.** Metabolic and Clinical Aspects. Churchill Livingstone. 1ª Ed, p.217-236, 1995.
- JONES, P.H., DAVIDSON, M.H., STEIN, E.A., BAYS, H.E., MCKENNEY, J.M., MILLER, E., CAIN, V.A., BLASETTO, J.W. **Comparison of the efficacy and safety of rosuvastatin versus atorvastatin, simvastatin and pravastatin across doses.** Stellar Study Group. *Am J Cardiol.* 92: 152-160, 2003.

- KAMOUN, P.L., ALAIN - VERNEUIL, H.D. **Bioquímica e Biologia Molecular**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.
- KLEEMANN, R., KOOISTRA, T. **HMG-CoA reductase inhibitors: effects on chronic subacute inflammation and onset of atherosclerosis induced by dietary cholesterol**. *Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord*. 5: 441-453, 2005.
- KRAUSS, R.M., ECKEL, R.H., HOWARD, B. **AHA Dietary Guidelines: revision 2000: A statement for healthcare professionals from the Nutrition Committee of the American Heart Association**. *Circulation* 102: 2284-2299, 2000.
- LENOIR, G., WILLIAMSON, P., HOLTHUIS, J.C.M. **On the origin of lipid asymmetry: the flip side of ion transport**. *Curr Opin Chem Biol*. 11: 654–661, 2007.
- LIBBY, P., HANSSON, G. K. **Involvement of the immune system in human atherogenesis: current knowledge and unanswered questions**. *Labo Invest*, 64: 5–15, 1991.
- LIBBY, P. **Changing coNational Cholesterol Education Programs of atherogenesis**. *J Int Med Res*. 247: 349–358, 2000.
- LIBBY, P. **Inflamation in atherosclerosis**. *Nature* 420: 868–874, 2002.
- LIBBY, P., RIDEKER, P.M., MASERI, A. **Inflammation and atherosclerosis**. *Circulation*. 105, 1135-1143, 2002.
- LICHTENSTEIN, A.H., AUSMAN, L.M., JALBERT, S.M., et al. **Effects of different forms of dietary hydrogenated fats on serum cholesterol levels**. *N Engl J Med*. 340: 1933-40, 1999.
- LIMBERGER, R.P. et al. **Chemical composition of essential oils from some *Campomanesia xanthocarpa* Species (Myrtaceae)**. *J Oilseeds Res*. 13: 113-115, 2001.

- LORENZI, H. **Árvores Brasileiras: Manual de Identificação e Cultivo de Plantas Arbóreas do Brasil**. São Paulo, 256, 1992.
- MADAMANCHI, N.R., VENDROV, A., RUNGE, M.S. **Oxidative stress and vascular disease**. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 25: 29-38, 2005.
- MARENAH, C.B. **Lipid metabolism, hyper- and hypolipidaemias and atherosclerosis**. In: Marshall, W.J. AND BANGERT, S.K. (EDS). **Clinical Biochemistry. Metabolic and Clinical Aspects**. Churchill Livingstone. 1^a Ed. p.621-641, 1995
- MARINO, M., PALLOTTINI, V., D'ERAMO, C., CAVALLINI, G., BERGAMINI, E., TRENTALANCE, A. **Age-related changes of cholesterol and dolichol biosynthesis in rat**. *Mech Ageing Dev.* 123: 1183-89, 2002.
- MARKMAN, B. E. O; BACCHI, E. M; KATO, E. T. M. **Antiulcerogenic Effects of *Campomanesia xanthocarpa***. *J Ethnopharmacol.* 94: 55-57, 2004.
- MATSUURA, M. **Saponins in garlic as modifiers of the risk of cardiovascular disease**. *J Nutr.* 131: 1000-1005, 2001.
- MIETTINEN, T.A., GYLLING, H. **Regulation of cholesterol metabolism by dietary plant sterols**. *Curr Opin Lipidol.* 10: 9-14, 1999.
- MONTECUCCO, F., MACH, F. **Atherosclerosis is an inflammatory disease**. *Semin Immunopathol.* 31: 1-3, 2009.
- NATIONAL CHOLESTEROL EDUCATION PROGRAM, **Executive Summary of the Third Report. Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adults Treatment Panel III)**. *J Am Med Assoc.* 285: 2486-2497, 2001.
- PALLOTTINI, V., MARTINI, C., CAVALLINI, G., BERGAMINI, E., MUSTARD, K.J., HARDIE, D.G., TRENTALANCE, A. **Age-related HMG-CoA reductase deregulation depends on ROS-induced p38 activation**. *Mech Ageing Dev.* 128: 688-695, 2007.

- PALLOTTINI, V., MARTINI, C., PASCOLINI, A., CAVALLINI, G., GORI, Z., BERGAMINI, E., INCERPI, S., TRENTALANCE, A. **3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase deregulation and age-related hypercholesterolemia: A new role for ROS.** Mech Ageing Dev. 126, 845-851, 2005.
- PEASE, R.J., LEIPER, J.M. **Regulation of hepatic apolipoprotein-B-containing lipoprotein secretion.** Curr Opin Lipidol. 7: 132-138, 1996.
- POTTER, S.M., JIMENEZ-FLORES, R., POLLACK, J., LONE, T.A., BERBER-JIMENEZ, M.D. **Protein saponin interaction and its influence on blood lipids.** J Agric Food Chem. 41, 1287-1291, 1993.
- QIN, C.; NAGAO, T.; GROSHEVA, I.; MAXFIELD, F. R.; PIERINI, L. M. **Elevated plasma membrane cholesterol content alters macrophage signaling and function.** Arterioscler Thromb Vasc Biol. 26: 372–378, 2006.
- ROS, E. **Intestinal absorption of triglyceride and cholesterol: dietary and pharmacological inhibition to reduce cardiovascular risk.** Atherosclerosis 151: 357-79, 2000.
- ROSS, R. **The patogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s.** Nature 362: 801– 809, 1993.
- ROSS R. **Atherosclerosis: an inflammatory disease.** N Engl J Med. 340: 115, 1999.
- SCHMEDA-HIRSCHMANN, G. **Flavonoids from *Calycorectes*, *Campomanesia*, *Eugenia* and *Hexachlamys* species.** Fitoterapia 66: 373-674, 1995.
- SCHOENHEIMER, R., BREUSCH, F. **Synthesis and destruction of cholesterol in the organism.** J Biol Chem. 103, 439–448, 1933.
- SENDL, A., SCHLIACK, M., LÖSER, R., STANISLAUS, F., WAGNER, H. **Inhibition of cholesterol synthesis in vitro by extracts and isolated compounds prepared from garlic and wild garlic.** Atherosclerosis 94: 79-85, 1992.

- SIDHU, G.S., OAKENFULL, D.G. **A mechanism for the hypocholesterolaemic activity of saponins.** Br J Nutr. 55: 643-649, 1986.
- SIPERSTEIN, M.D., FAGAN, V.M. **Feedback control of mevalglutaryl ionate synthesis by dietary cholesterol.** J Biol Chem. 241, 602–609, 1966.
- SKALEN, K., GUSTAFSSON, M., RYDBERG, E. K., HULTEN, L. M., WIKLUND, O., INNERARITY, T. L., BOREN, J. **Subendothelial retention of atherogenic lipoproteins in early atherosclerosis.** Nature 417: 750-754, 2002.
- SOUTHON, S., JOHNSON, I.T., GEE, J.M., PRICE, K.R. **The effect of Gypsophylla saponins in the diet on mineral status and plasma cholesterol concentration in the rat.** Br J Nutr. 59: 49-55, 1988.
- STADTMAN, E.R. **Protein oxidation and aging.** Science 257: 1220-1224, 1992.
- STADTMAN, E.R., LEVINE R.L., **Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins.** Amino Acids 25: 207-18, 2003.
- STADTMAN, E.R., LEVINE, R.L. **Chemical modification of proteins by reactive oxygen species.** In: DALLE-DONNE I, SCALONI A, BUTTERFIELD DA, (EDS). **Redox Proteomics: From Protein Modifications to Cellular Dysfunction and Disease.** Hoboken: John Wiley & Sons, Inc. p.3–23, 2006.
- STEINBERG, D. **Is there a potential therapeutic role for vitamin E and other antioxidants in atherosclerosis?** Curr Op Lipidol. 11; 603-607, 2000.
- STEPHENS, N.G., PARSONS, A., SCHOFIELD, P.M., et al. **Randomised controlled trial of vitamin E in patients with coronary disease: Cambridge Heart Antioxidant Study (CHAOS).** Lancet 347: 781-786, 1996.
- STOCKER, R., KEANEY, J.F.JR. **New insights on oxidative stress in the artery wall.** J Thromb and Haemost. 3: 1825-1834, 2005.
- TALL, A.R. **Plasma cholesteryl ester transfer protein.** J Lipid Res. 34: 1255-1274, 1993.

- TAVRIDOU, A., EFTHIMIADIS, A., EFTHIMIADIS, I., PASCHALIDOU, H. **Antioxidant effects of simvastatin in primary and secondary prevention of coronary heart disease.** Eur J Clin Pharmacol. 62: 485-489, 2006.
- TIKKANEN, M.J. **Fibric acid derivatives.** Curr Opin Lipidol. 3: 29-33, 1992.
- TOUSOULIS, D., ANTONIADES, C., STEFANADIS, C. **Assessing inflammatory status in cardiovascular diseases.** Heart 93: 1001- 1007, 2007.
- VAUGHAN, C.J., MURPHY, M.B., BUCKLEY, B.M. **Statins do more than just lower cholesterol.** Lancet 348: 1079-82, 1996.
- VEPA, S., SCRIBNER, W.M., PARINANDI, N.L., et al. **Hydrogen peroxide stimulates tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase in vascular endothelial cells.** Am J Physiol. 277: 150-158, 1999.

9. APÊNDICE

APÊNDICE - RESULTADOS COMPLEMENTARES

Figura 1

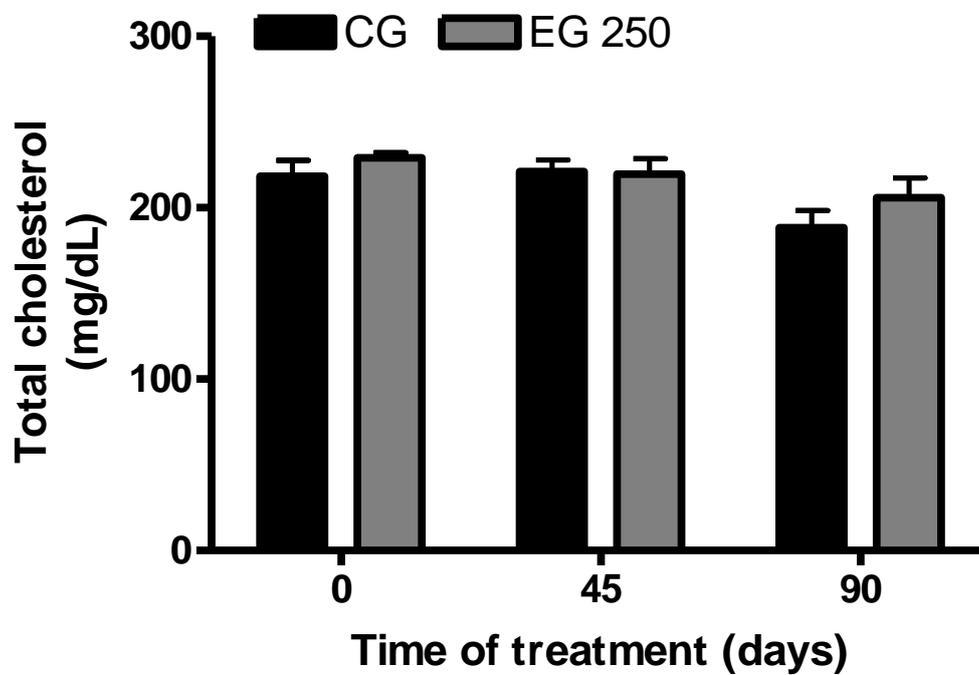


Figura 1. Efeitos da *C. xanthocarpa* no colesterol total na dose de 250 mg (GE 250) em pacientes com níveis indesejáveis de colesterol e pacientes do grupo controle (GC), antes (0) e 45 ou 90 dias depois do tratamento iniciado. Nenhuma diferença estatística foi observada (ANOVA de uma via, seguida pelo Student Newman-Keuls Test).

Figura 2

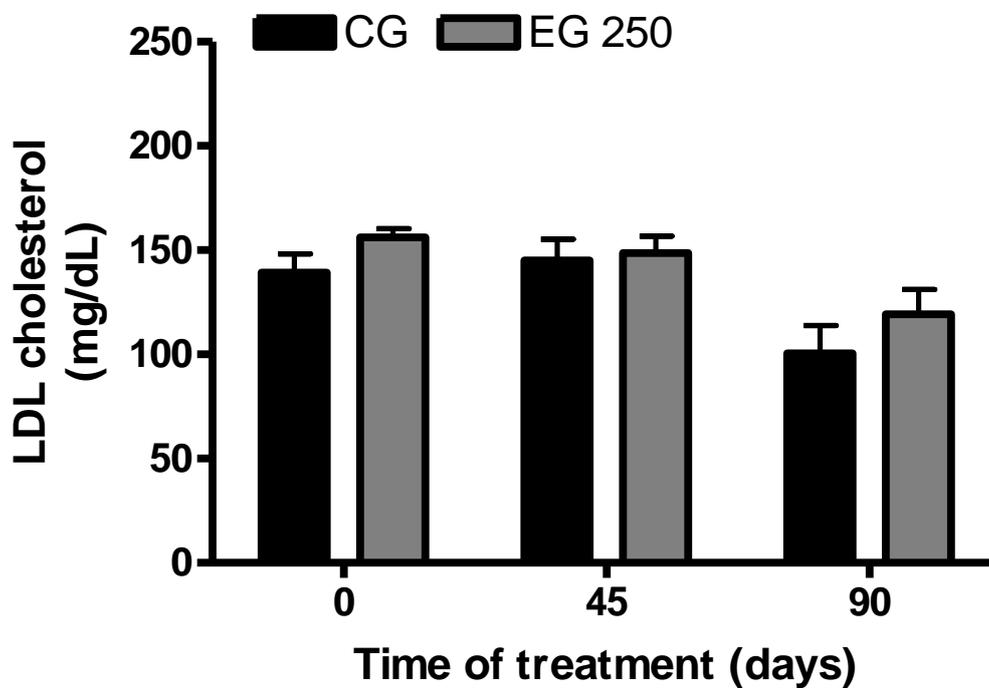


Figura 2. Efeitos da *C. xanthocarpa* na LDL na dose de 250 mg (GE 250) em pacientes com níveis indesejáveis de colesterol e pacientes do grupo controle (GC), antes (0) e 45 ou 90 dias depois do tratamento iniciado. Nenhuma diferença estatística foi observada (ANOVA de uma via, seguida pelo Student Newman-Keuls Test).

Figura 3

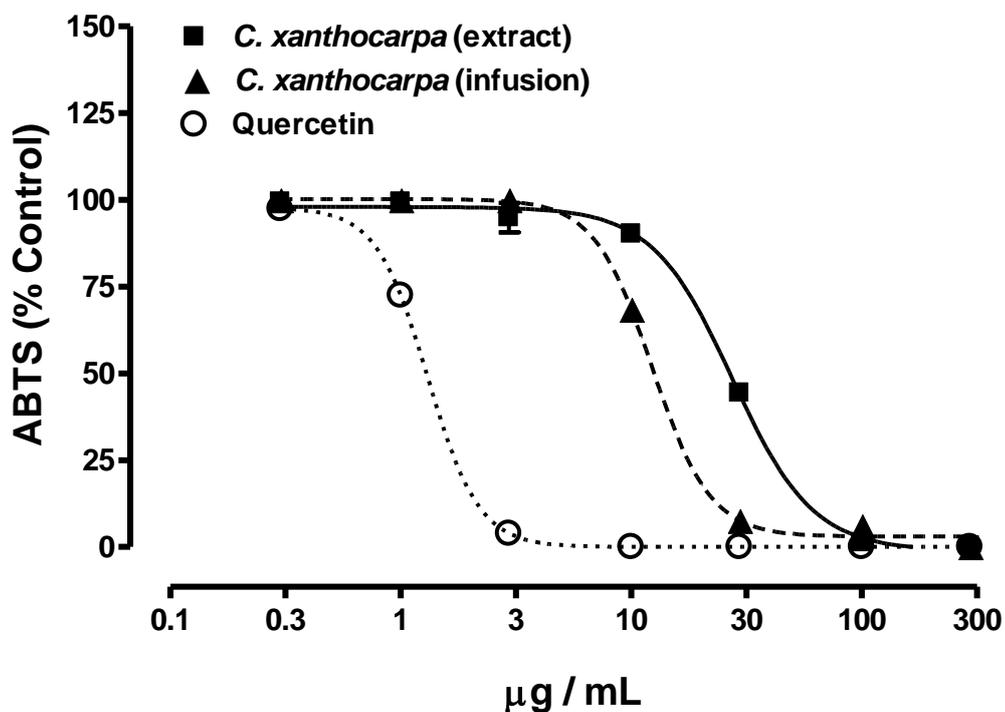


Figura 3. Curva concentração-resposta para o extrato e infusão de *C.xanthocarpa* e quercetina (1-300 µg/mL) no teste da redução do radical ABTS *in vitro*. Cada ponto representa a média de 2 experimentos realizados em duplicata e as linhas verticais indicam E.P.M.

Figura 4

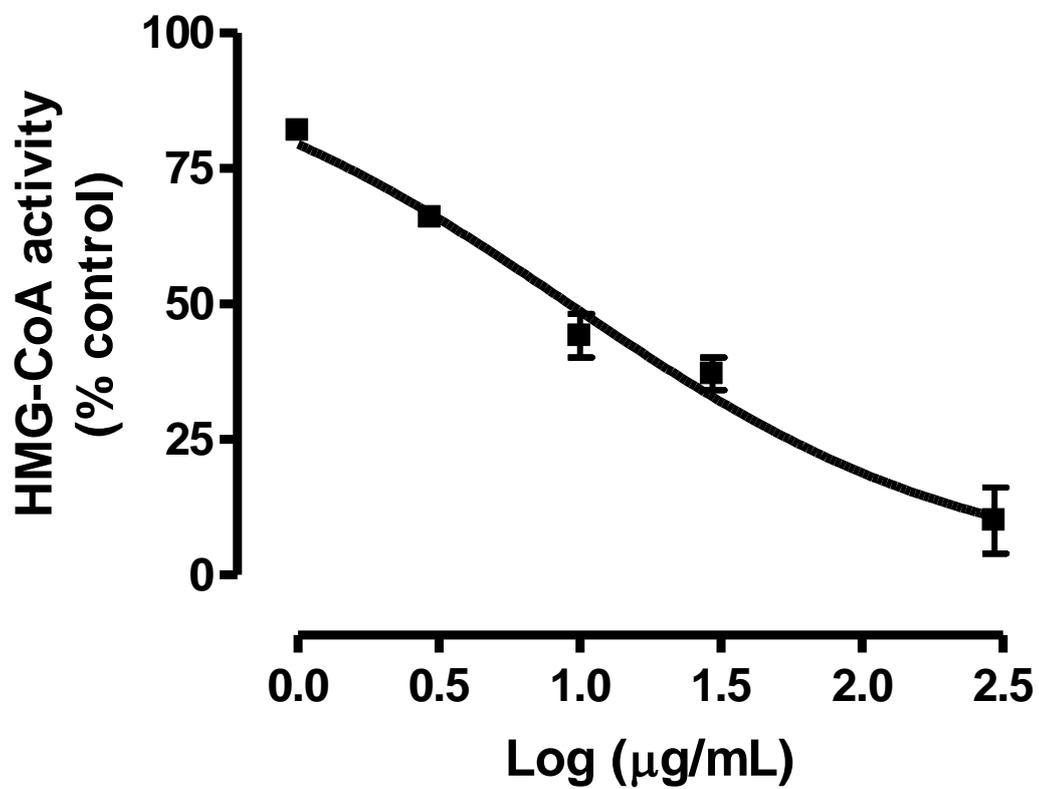


Figure 4. Curva de concentração-resposta para *C. xanthocarpa* na atividade de 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase. Cada ponto representa a média de 2 experimentos realizados em duplicata e as linhas verticais indicam E.P.M.