

**Universidade Federal da Paraíba
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais
e Sintéticos Bioativos**

Elba dos Santos Ferreira

**Suplementação alimentar com *Spirulina platensis* promove efeito
antiobesidade e restaura a reatividade contrátil de íleo em ratos Wistar**

**João Pessoa-PB
2017**

Elba dos Santos Ferreira

Suplementação alimentar com *Spirulina platensis* promove efeito antiobesidade e restaura a reatividade contrátil de íleo em ratos Wistar

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Paraíba, como parte dos requisitos para obtenção do título de **Mestre em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos**. Área de concentração: **Farmacologia**.

Orientadora: Profa. Dra. Bagnólia Araújo da Silva

**João Pessoa-PB
2017**

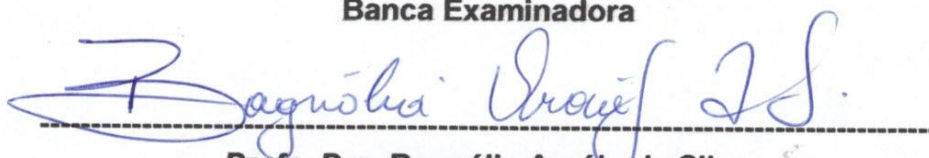
Elba dos Santos Ferreira

Suplementação alimentar com *Spirulina platensis* promove efeito antiobesidade e restaura a reatividade contrátil de íleo em ratos Wistar

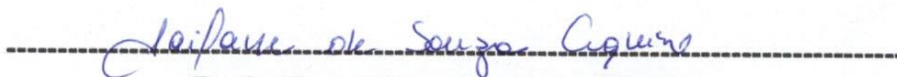
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Paraíba, como parte dos requisitos para obtenção do título de **Mestre em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos**. Área de concentração: **Farmacologia**.

Aprovada em 06 / 03 / 2017

Banca Examinadora



Profa. Dra. Bagnólia Araújo da Silva
(Universidade Federal da Paraíba)
Orientadora



Profa. Dra. Jailane de Souza Aquino
(Universidade Federal de Paraíba)
Examinadora externa



Profa. Dra. Leônia Maria Batista
(Universidade Federal da Paraíba)
Examinadora interna

**Sê forte e corajoso; não temas, nem
te espantes, por que o Senhor teu
Deus é contigo por onde quer que
andares.
Js 1, 9**

Dedicatória

Dedico esse trabalho a meus pais, Maria da Conceição Ferreira e Antônio Ferreira, meus exemplos de vida, de luta e de perseverança. A vocês, sou grata pela vida, pela educação e por todos os ensinamentos morais e cristãos que me fizeram ser quem sou hoje. Vocês são o motivo da minha luta diária.

A meus irmãos, Elder Ferreira e Everton Ferreira, meus companheiros, por todo o amor, cumplicidade e carinho. Eu amo vocês com todo o meu coração e sempre estarei aqui para o que for preciso.

A meus avós maternos, Mozeni Santos e Massilon Ferreira, e avós paternos, Hilda Costa e Francisco Ferreira, por todo o amor, e aquele cuidado de avós que nunca me faltou. A vocês, todo o meu amor.

Agradecimientos

Agradeço a Deus, meu Senhor e meu Deus, razão e prioridade da minha vida. Obrigada Senhor pela coragem, pela serenidade, pela força e pela inteligência que Tu me destes durante essa caminhada, pois se não fosse a Tua providência na minha vida, nada disso seria possível. Obrigada pelo Teu olhar de Pai, por todas as vezes que Tu me buscastes quando eu estava longe, e por abrir todos os caminhos que Tu abristes pra mim. O Teu amor me sustentará e me permitirá seguir em frente acreditando em mim. Contigo ao meu lado Senhor, nada e nem ninguém me derruba, pois eu sei em quem eu depositei minha confiança.

À minha mãezinha do Céu, Maria Santíssima, pelo colo de mãe, pelo olhar de mãe, e por nunca me desamparar. Pelas tuas mãos oh Mãe, eu me consagrei a Jesus Cristo, e é por estas mãos que eu sempre permanecer ao lado dele. Já dizia um amigo meu: Quem tem Maria como mãe, não está só nesse mundo.

À minha orientadora Profa. Dra. Bagnólia Araújo da Silva, por me receber no seu laboratório e encarar esse desafio comigo. Obrigada pelos conselhos, pelas orientações, pelos puxões de orelha, e por me mostrar que essa vida que eu escolhi, vale a pena. Muito obrigado de todo coração.

À Profa. Dra. Fabiana de Andrade Cavalcante, por toda a ajuda que me foi dada, e por me fazer acreditar que vai dar certo, cada vez que eu sentava pra tirar uma dúvida, ou esclarecer algum assunto. Obrigada pela serenidade no seu olhar professora, e por passar essa serenidade para mim.

À Profa. Dra. Patrícia Mirella da Silva Scardua, do Departamento de Biologia Molecular do Centro de Ciências Exatas da Natureza da Universidade Federal da Paraíba (DBM/CCEN/UFPB), por todo apoio na execução dos experimentos histológicos, por toda a preocupação em saber como iam as análises e se tudo estava correndo bem. Agradeço imensamente todo o apoio.

Ao Prof. Dr. Luiz Fernando Marques, do DBM/CCEN/UFPB, por toda disponibilidade em me ajudar, cedendo sua sala todos os dias para que eu pudesse analisar as lâminas histológicas. Obrigada, inclusive pelos desejos de bom trabalho professor.

Ao Prof. Alexandre Sérgio, do Departamento de Educação Física do Centro de Ciências da Saúde (CCS)/UFPB, pelo suporte nos experimentos de estr oxidativo.

As Profas. Dras. Jailaine de Souza Aquino e Leônia Maria Batista por aceitarem participar da banca examinadora, bem como aos membros suplentes

Profs. Drs. Joelmir Lucena Veiga da Silva e Sandra Rodrigues Mascarenhas. Agradeço por todas as contribuições e pela participação nesta importante etapa em minha formação.

À doutoranda Iara Leão Luna de Souza, minha parceira de experimento, parceira de bancada, muito obrigada por tudo o que você me ensinou, pelas vezes que você me encorajou, por tudo. Em cada detalhe da minha dissertação tem o seu dedo, por que você encarou esse desafio comigo até o fim. Nunca esquecerei daquele dia que eu estava muito preocupada com o andamento das coisas e você olhou pra mim e me disse: Elba, tenha fé, que Deus ajuda! Saiba que você fortaleceu tudo em mim, inclusive minha fé. Muito obrigada por tudo minha querida amiga.

Aos doutorandos Maria da Conceição Correia, Luiz Henrique Vasconcelos, Paula Benvindo e Renata Sampaio, pelos ensinamentos, paciência e por todo apoio dado no decorrer dos experimentos e na confecção da dissertação.

À Bárbara Cavalcante, aluna de iniciação científica na época, por toda a ajuda na bancada, por todas as dúvidas esclarecidas, e por sempre estar disponível pra me cobrir nos experimentos, quando precisei.

Ao Dr. Fernando Queiroga, na época doutorando, por todo o suporte em todas as etapas dos experimentos histológicos.

À doutoranda Glêbia Alexa pela ajuda na realização dos experimentos de estresse oxidativo.

A todos os que estão ou passaram no Laboratório de Farmacologia Funcional Prof. George Thomas, entre eles: Alana Cristina Costa, Antônio Raphael Cavalcanti, Filipe Rodolfo Borges, Giuliana Amanda, Giulyane Targino, Indyra Figueiredo, Italo Rossi, Joedna Cavalcante, Luan Diniz Pessoa, Paula Benvindo, Rafael Lima, Rayanne Fernandes, Sarah Rebeca Ferreira, Thaynan Carvalho e Thiago Melo, por toda ajuda e pela boa convivência durante esses dois anos.

Aos professores deste programa de Pós-graduação por toda a dedicação e por todas as contribuições na minha vida acadêmica.

À coordenação do Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos (PPgPNSB), na pessoa do Prof. Dr. Josean Fachine Tavares e do Prof. Dr. Damião Pergentino pela competência em coordenar esse programa.

Às secretárias da coordenação do PPgPNSB, Caroline Mangueira, Dayana Brandão e Nilmar Neves, por todo o suporte, dedicação e eficiência.

Aos funcionários Jose Crispin Duarte, Luís Silva, Adriano Cordeiro, Mônica Silva, pela solicitude de sempre e o bom trabalho executado nos seus respectivos setores.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES) pelo apoio financeiro e técnico-científico.

À Direção do Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos (IPeFarM), na pessoa do Prof. Dr. Rui Macêdo, pelo apoio Institucional.

À Universidade Federal da Paraíba, instituição que contribuiu com toda a minha formação acadêmica até hoje.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a produção desta dissertação de mestrado.

Muito obrigada,

Elba dos Santos Ferreira

Resumo

RESUMO

A obesidade é uma doença crônica caracterizada pelo acúmulo de tecido adiposo. A *Spirulina platensis* é uma alga verde-azulada e tem se apresentado como droga promissora na potencialização da reatividade de aorta de rato. Assim, objetivou-se avaliar os efeitos da obesidade, da suplementação com *S. platensis* e da mudança de dieta sobre os parâmetros nutricionais e morfométricos, reatividade muscular em íleo e estresse oxidativo em ratos. Os animais foram divididos em seis grupos: controle salina (GCS), obeso salina (GOS), obeso suplementado com *S. platensis* nas doses de 25, 50 e 100 mg/kg (GO + SP25, GO + SP50 e GO + SP100, respectivamente) e obeso alimentado com dieta Presence® (GO + DP). Os animais receberam as dietas DP e hipercalórica por 16 semanas e a suplementação a partir da 8ª semana. O GO + DP recebeu a dieta hipercalórica por oito semanas e a DP por oito semanas. Durante as 16 semanas avaliou-se a ingestão alimentar e a massa corpórea e, após a eutanásia, os tecidos adiposos epididimal, retroperitoneal e inguinal foram utilizados para o cálculo do índice de adiposidade. O íleo foi suspenso em cubas para órgãos isolados e as contrações isotônicas e isométricas monitoradas. Os protocolos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais/UFPB (017/2016). A ingestão alimentar foi reduzida no GOS, e aumentada nos animais suplementados com *S. platensis* e no GO + DP em relação ao GOS. O GOS não diferenciou em relação ao GCS quanto à massa corpórea inicial, média, final e ganho de massa corporal. Nos grupos suplementados com *S. platensis*, apenas o GO + SP25 diferenciou quanto à massa corporal média, final e ganho de massa corporal em relação ao GOS. O GOS apresentou o CEA superior e o CCA inferior ao GCS. Os grupos suplementados com *S. platensis* não apresentaram diferença em nenhum destes coeficientes em relação ao GOS. O GO + DP apresentou um aumento no CEA e CGPCC e uma diminuição no CAA em relação ao GOS. O GOS apresentou aumento nas massas dos três tecidos adiposos, índice de adiposidade e diâmetro dos adipócitos, em relação ao GCS. Nos grupos tratados com *S. platensis*, apenas a dose de 25 mg/kg não alterou a massa dos tecidos adiposos e o diâmetro dos adipócitos em relação ao GOS, entretanto, todas as doses de *S. platensis* e o GO + DP diminuíram o índice de adiposidade em relação ao GOS. O GOS apresentou eficácia contrátil do KCl ($62,1 \pm 6,1\%$) e do CCh ($60 \pm 6,4\%$), em relação ao GCS (100%) e a potência relaxante do verapamil ($11,6 \pm 0,6$) em relação ao GCS ($13,7 \pm 0,2$). A *S. platensis* (50 mg/kg) reverteu a eficácia do KCl ($88,3 \pm 3,3\%$) e do CCh ($86,8 \pm 5,4\%$) em relação ao GCS. Entretanto, a *S. platensis* (100 mg/kg), atenuou a potência relaxante ao verapamil em relação ao GOS ($11,6 \pm 0,6$ vs $9,0 \pm 0,2$). A espessura das camadas musculares circular e longitudinal do íleo de rato não foi alterada no GOS, assim como a concentração de malondialdeído (MDA) no plasma e no íleo. Nos tecidos adiposos epididimal e retroperitoneal, o GOS apresentou um aumento de MDA, e apenas *S. platensis* (50 mg/kg) reverteu este efeito. Não houve alteração na atividade antioxidante no plasma, em íleo e nos tecidos adiposos estudados no GOS, entretanto a dose de 50 mg/kg de *S. platensis* aumentou a CAT no tecido adiposo. Conclui-se que, a obesidade diminui a ingestão alimentar, a reatividade contrátil e relaxante de íleo e aumenta a peroxidação lipídica no tecido adiposo. A suplementação com *S. platensis* (50 mg/kg) aumenta a ingestão alimentar, restaura a reatividade contrátil de íleo e reverte o estresse oxidativo em tecido adiposo. A mudança de dieta induz efeito antiobesidade, mas não reverte a reatividade contrátil do íleo e o estresse oxidativo em tecido adiposo.

Palavras-chave: Obesidade. *Spirulina platensis*. Reatividade contrátil e relaxante. Estresse oxidativo. Íleo de rato.

Abstract

ABSTRACT

Obesity is a chronic disease characterized by the accumulation of adipose tissue. *Spirulina platensis* is a blue-green algae and has been shown to be a promising drug in potentiating rat aortic reactivity. The objective of this study was to evaluate the effects of obesity, supplementation with *S. platensis* and dietary changes on nutritional and morphometric parameters, muscle reactivity in ileus and oxidative stress in rats. The animals were divided in six groups: saline control (GCS), obese saline (GOS), obese supplemented with *S. platensis* at doses of 25, 50 and 100 mg / kg (GO + SP25, GO + SP50 and GO + SP100, Respectively) and obese fed with Presence® diet (GO + DP). The animals received the DP and hypercaloric diets for 16 weeks and the supplementation from the 8th week. GO + DP received the hypercaloric diet for eight weeks and PD for eight weeks. During the 16 weeks, food intake and body mass were evaluated and, after euthanasia, the adipose epididymal, retroperitoneal and inguinal tissues were used to calculate the adiposity index. The ileum was suspended in vats for isolated organs and the isotonic and isometric contractions monitored. The protocols were approved by the Committee on Ethics in the Use of Animals / UFPB (017/2016). Food intake was reduced in GOS, and increased in animals supplemented with *S. platensis* and in GO + DP in relation to GOS. GOS did not differentiate in relation to GCS regarding initial, mean, final body mass and body mass gain. In the groups supplemented with *S. platensis*, only the GO + SP25 differentiated as regards mean, final body mass and body mass gain in relation to GOS. The GOS presented the upper CEA and the lower CCA to the GCS. The groups supplemented with *S. platensis* showed no difference in any of these coefficients in relation to GOS. The GO + DP presented an increase in the CEA and CGPCC and a decrease in the CAA in relation to the GOS. GOS showed an increase in the masses of the three adipose tissues, adiposity index and adipocyte diameter, in relation to GCS. In the *S. platensis* treated groups, only the 25 mg / kg dose did not alter the adipose tissue mass and the adipocyte diameter in relation to the GOS, however, all doses of *S. platensis* and GO + DP decreased the index ($62.1 \pm 6.1\%$) and CCh ($60 \pm 6.4\%$), compared to GCS (100%) and the relaxing potency of verapamil (11.6 ± 0.6) compared to GCS (13.7 ± 0.2). *S. platensis* (50 mg / kg) reversed the efficacy of KCl ($88.3 \pm 3.3\%$) and CCh ($86.8 \pm 5.4\%$) relative to GCS. However, *S. platensis* (100 mg / kg) attenuated the relaxing potency of verapamil over GOS (11.6 ± 0.6 vs 9.0 ± 0.2). The thickness of the circular and longitudinal muscle layers of rat ileum was not altered in GOS, as was the concentration of malondialdehyde (MDA) in plasma and ileum. In the epididymal and retroperitoneal adipose tissues, GOS showed an increase in MDA, and only *S. platensis* (50 mg / kg) reversed this effect. There was no change in antioxidant activity in plasma, ileus and adipose tissues studied in GOS, however the dose of 50 mg / kg of *S. platensis* increased CAT in adipose tissue. It is concluded that obesity decreases food intake, contractile and relaxing reactivity of ileum and increases lipid peroxidation in adipose tissue. Supplementation with *S. platensis* (50 mg / kg) increases food intake, restores the contractile reactivity of ileus, and reverses oxidative stress in adipose tissue. Dietary change induces antiobesity effect, but does not reverse the contractile reactivity of the ileum and oxidative stress in adipose tissue.

Key words: Obesity. *Spirulina platensis*. Contraction and relaxing reactivity. Oxidative stress. Rat ileus..

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Esquema do acoplamento eletromecânico da contração muscular lisa pelo aumento da concentração extracelular de K^+	38
Figura 2 – Esquema do mecanismo farmacomecânico da contração no músculo liso pela ativação da via $G_{q/11}$ -PLC β_1	39
Figura 3 – Esquema do mecanismo de manutenção da contração no músculo liso pela ativação da via $G_{12/13}$ -ROCK	41
Figura 4 – Esquema do mecanismo farmacomecânico do relaxamento no músculo liso pela ativação da via G_s /AC/PKA e NO/sGC/PKG	43
Figura 5 – Ingredientes utilizados no preparo da dieta hipercalórica na sua forma original (A), triturada (B) e homogênea, moldada e cortada antes e após a secagem em estufa (C).....	55
Figura 6 – Tecido adiposo epididimal (na lateral) (A), tecido adiposo retroperitoneal (B) e tecido adiposo inguinal (C)	58
Figura 7 – Microfotografia dos adipócitos epididimal, retroperitoneal e inguinal dos ratos dos grupos GCS (A), GOS (B), GO + SP25 (C), GO + SP50 (D), GO + SP100 (E) e GO + DP (F)	76
Figura 8 – Registros representativos do efeito relaxante do verapamil em íleo isolado de rato pré-contraído por 25 mM de KCl dos GCS (A), GOS (B), GO + SP25 (C), GO + SP50 (D), GO + SP100 (E) e GO + DP (F).....	84
Figura 9 – Microfotografia das camadas musculares dos GCS (A) e GOS (B) em íleo isolado de rato.....	89

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Massa corporal média semanal para os GCS (○), GOS (●), GO + SP25 (■), GO + SP50 (■), GO + SP100 (■) e GO + DP (■).....	68
Gráfico 2 – Massa dos tecidos adiposos epididimal (A), retroperitoneal (B) e inguinal (C) e índice de adiposidade (D) para os GCS, GOS, GO + SP25, GO + SP50, GO + SP100 e GO + DP	74
Gráfico 3 – Diâmetro dos adipócitos dos tecidos adiposos epididimal (A), retroperitoneal (B) e inguinal (C) dos GCS, GOS, GO + SP25, GO + SP50, GO + SP100 e GO + DP	78
Gráfico 4 – Curvas concentrações-resposta cumulativas ao KCl dos GCS (○), GOS (●), GO + SP25 (■), GO + SP50 (■),GO + SP100 (■) e GO + DP (■) em íleo isolado de rato	80
Gráfico 5 – Curvas concentrações-resposta cumulativas ao CCh dos GCS (○), GOS (●), GO + SP25 (■), GO + SP50 (■),GO + SP100 (■) e GO + DP (■) em íleo isolado de rato	82
Gráfico 6 – Curvas concentrações-resposta cumulativas ao verapamil dos GCS (○), GOS (●), GO + SP50 (■), GO + SP100 (■) e GO + DP (■) em íleo isolado de rato...	86
Gráfico 7 – Espessura das camadas musculares circular (A) e longitudinal (B) dos GCS (○), GOS (●), GO + SP50 (■), GO + SP100 (■) e GO + DP (■) em íleo isolado de rato	90
Gráfico 8 – Concentração de MDA em plasma (A), em íleo (B) e em tecidos adiposos inguinal (C), epididimal (D) e retroperitoneal (E) de rato dos GCS, GOS, GO + SP25, GO + SP50, GO + SP100 e GO + DP.....	92
Gráfico 9 – Percentual da inibição da oxidação em plasma (A), em íleo (B) e em tecidos adiposos epididimal (C), retroperitoneal (D) e inguinal (E) de rato dos GCS (○), GOS (●), GO + SP50 (■), GO + SP100 (■) e GO + DP (■)	95

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Macronutrientes e valor calórico das dietas utilizadas no estudo	55
Tabela 2 – Ingestão alimentar estimada (g) dos grupos GCS, GOS, GO + SP25, GO + SP50, GO + SP100 e GO + DP	66
Tabela 3 – Valores de ingestão alimentar calórica (kcal) dos grupos GCS, GOS, GO + SP25, GO + SP50, GO + SP100 e GO + DP	66
Tabela 4 – Valores de massa corporal inicial, final e ganho de massa corporal para os grupos GCS, GOS, GO + SP25, GO + SP50, GO + SP100 e GO + DP	69
Tabela 5 – Valores de CEA, CCA e CGPCC para os grupos GCS, GOS, GO + SP25, GO + SP50, GO + SP100 e GO + DP	70
Tabela 6 – Valores de comprimento naso-anal, índice de Lee e IMC dos grupos GCS, GOS, GO + SP25, GO + SP50, GO + SP100 e GO + DP	72
Tabela 7 – Valores de E_{max} e de pD_2 do KCl nos grupos dos GCS, GOS, GO + SP25, GO + SP50, GO + SP100 e GO + DP em íleo isolado de rato	80
Tabela 8 – Valores de E_{max} e de pD_2 do CCh nos grupos dos grupos GCS, GOS, GO + SP25, GO + SP50 e GO + DP em íleo isolado de rato	82
Tabela 9 – Valores de E_{max} e pD_2 do verapamil dos GCS, GOS, GO + SP25, GO + SP50, GO + SP100 e GO + DP em íleo isolado de rato	87

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Principais doenças associadas à obesidade	30
Quadro 2 – Classificação internacional da obesidade segundo o (IMC) e risco de doença (Organização Mundial da Saúde) que divide a adiposidade em graus ou classes	31

LISTA DE ABREVIATURAS

ABESO	Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade e Síndrome Metabólica
4Ca^{2+}-CaM	complexo cálcio-calmodulina
$[\text{Ca}^{2+}]_c$	concentração citosólica de Ca^{2+}
$[\text{K}^+]_e$	concentração extracelular de potássio
AC	ciclase de adenilil
ACh	acetilcolina
ANOVA	análise de variância
ATP	trifosfato de adenosina
CaM	calmodulina
CAT	catalase
cAMP	monofosfato cíclico de adenosina
Ca_v	canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem
Ca_v1	Ca_v da família 1
CCh	carbacol
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
cGMP	monofosfato cíclico de guanosina
CICR	liberação de Ca^{2+} induzida pelo Ca^{2+}
CMC	camada muscular circular
CML	camada muscular longitudinal
CMT	camada muscular total
CO_2	dióxido de carbono
DAG	diacilglicerol
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
e.p.m.	erro padrão da média

E_{max}	efeito máximo
G_{12/13}	proteína G ₁₂ ou G ₁₃
G_{q/11}	proteína G _q ou G ₁₁
G_s	proteína G _s
G_{αq/11}	subunidade α da proteína G _{q/11}
G_{αs}	subunidade α da proteína G _s
GCS	grupo controle salina
GDP	difosfato de guanosina
GOS	grupo obeso salina
GO + DP	grupo obeso alimentado com dieta padrão
GO + SP25	grupo obeso suplementado com <i>Spirulina platensis</i> na dose de 25 mg/kg
GO + SP50	grupo obeso suplementado com <i>Spirulina platensis</i> na dose de 50 mg/kg
GO + SP100	grupo obeso suplementado com <i>Spirulina platensis</i> na dose de 100 mg/kg
GPCR	receptor acoplado à proteína G
GPx	glutathione peroxidase
GTP	trifosfato de guanosina
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IL-1	interleucina do tipo 1
IL-6	interleucina do tipo 6
IMC	índice de massa corporal
IP₃	1,4,5-trisfosfato de inositol
IP₃R	receptor de IP ₃
M₃	receptor muscarínico da ACh do subtipo 3
MDA	malondialdeído

MLC	cadeia leve da miosina
MLCK	cinase da MLC
MLCP	fosfatase da MLC
MYPT1	subunidade catalítica da MLCP
NCX	trocador sódio/cálcio
O²⁻	ânion superóxido
PAI-1	inibidor do ativador de plasminogênio
pD2	logaritmo negativo, na base 10, da concentração de uma droga que promove 50% de seu efeito máximo
PDGFR-α	receptor do fator de crescimento derivado de plaqueta
PIP₂	4,5-bisfosfato de fosfatidilinositol
PKA	proteína cinase dependente de cAMP
PKC	proteína cinase C
PKG	proteína cinase dependente de cGMP
PLCβ_1	fosfolipase C do tipo beta 1
PMCA	Ca ²⁺ -ATPase da membrana plasmática
RL	radicais livres
ROS	espécies reativas de oxigênio
RhoA	pequena proteína G da família Rho
ROCK	proteína cinase da RhoA
RS	retículo sarcoplasmático
RyR	receptor de rianodina
SERCA	Ca ²⁺ -ATPase do retículo endo-sarcoplasmático
sGC	ciclase de guanilil solúvel
SOD	superóxido dismutase
TAB	tecido adiposo branco

TAM	tecido adiposo marrom
VEGF	fator de crescimento endotelial vascular

OBS: as abreviaturas e os símbolos utilizados neste trabalho e que não constam nesta relação, encontram-se descritas no texto ou são convenções adotadas universalmente.

SUMÁRIO

1 Introdução	25
2 Fundamentação teórica.....	29
2.1 Obesidade	29
2.2 Determinantes fisiológicos do controle do peso e do apetite.....	32
2.3 O tecido adiposo	34
2.4 O estresse oxidativo na obesidade	35
2.5 A reatividade muscular lisa intestinal	37
2.6 Produtos naturais marinhos.....	44
2.7 <i>Spirulina platensis</i>	46
3 Objetivos	49
3.1 Geral	50
4 Material e métodos.....	51
4.1 Material.....	52
4.1.1 Produto-teste	52
4.1.2 Animais	52
4.1.3 Substâncias e reagentes	52
4.1.4 Solução nutritiva	53
4.1.5 Equipamentos.....	53
4.2 Métodos.....	54
4.2.1 Dieta e grupos experimentais	54
4.2.2 Preparo e administração da <i>S. platensis</i>.....	56
4.2.3 Efeito da <i>S. platensis</i> sobre a ingestão alimentar e massa corporal dos animais.....	56
4.2.4 Efeito da obesidade e da suplementação alimentar com <i>S. platensis</i> sobre o coeficiente de eficácia alimentar (CEA), coeficiente de conversão alimentar (CAA) e o coeficiente de ganho de peso por consumo alimentar (CGPCC)	57
4.2.5 Efeito da obesidade e da suplementação com <i>S. platensis</i> sobre os parâmetros da obesidade experimental.....	57
4.2.5.1 Parâmetros murinométricos.....	57
4.2.5.2 Massa dos depósitos de tecido adiposo.....	57
4.2.5.3 Índice de adiposidade	58

4.2.5.4 Efeito da suplementação da <i>S. platensis</i> sobre a morfometria do tecido adiposo.....	58
4.2.5.4.1 Preparações histológicas	58
4.2.5.4.2 Análises dos tecidos adiposos	59
4.2.6 Obtenção e preparação dos segmentos de íleo de rato	59
4.2.7 Efeito da obesidade e da suplementação com <i>Spirulina platensis</i> sobre a reatividade contrátil do íleo de ratos obesos	60
4.2.8 Efeito da obesidade e da suplementação com <i>S. platensis</i> sobre a reatividade relaxante do íleo de ratos obesos.....	60
4.2.9 Efeito da obesidade e da suplementação com <i>Spirulina platensis</i> sobre a morfometria do íleo de ratos obesos	60
4.2.9.1 Preparações histológicas	60
4.2.9.2 Análises da espessura das camadas circular e longitudinal do músculo liso intestinal	61
4.2.10 Efeito da obesidade e da suplementação com <i>Spirulina platensis</i> sobre estresse oxidativo	61
4.2.10.1 Efeito da obesidade e da suplementação com <i>Spirulina platensis</i> sobre a peroxidação lipídica.....	61
4.2.10.2 Efeito da obesidade e da suplementação com <i>S. platensis</i> sobre a inibição da oxidação (atividade antioxidante)	62
4.3 Análise estatística	63
5 Resultados	64
5.1 Efeito da obesidade e da <i>Spirulina platensis</i> sobre a ingestão alimentar e massa corporal dos animais	65
5.1.1 Avaliação das ingestão alimentar estimada e calórica.....	65
5.1.2 Massa corporal	67
5.1.3 Efeito da obesidade e da suplementação alimentar com <i>S. platensis</i> sobre o coeficiente de eficácia alimentar (CEA), coeficiente de conversão alimentar (CAA) e o coeficiente de ganho de peso por consumo alimentar (CGPCC)	70
5.2 Efeito da obesidade e da suplementação com <i>S. platensis</i> sobre os parâmetros da obesidade experimental.....	71
5.2.1 Parâmetros murinométricos.....	71
5.2.2 Massas dos tecidos adiposos e índice de adiposidade.....	73

5.3 Efeito da obesidade e da suplementação alimentar com <i>S. platensis</i> sobre a morfometria do tecido adiposo	75
5.4 Efeito da obesidade e da suplementação com <i>Spirulina platensis</i> sobre a reatividade contrátil de íleo de rato obeso.....	79
5.4.1 Efeito da obesidade e da suplementação com <i>Spirulina platensis</i> sobre as contrações cumulativas induzidas por KCl	79
5.4.2 Efeito da obesidade e da suplementação com <i>Spirulina platensis</i> sobre as contrações cumulativas induzidas por CCh	81
5.4.3 Efeito da obesidade e da suplementação com <i>Spirulina platensis</i> sobre a reatividade relaxante do verapamil.....	83
5.5 Efeito da suplementação com <i>S. platensis</i> sobre a morfologia do íleo isolado de ratos obesos	88
5.6 Efeito da obesidade e da suplementação com <i>S.platensis</i> sobre o estresse oxidativo.....	91
5.6.1 Efeito da obesidade e da suplementação com <i>Spirulina platensis</i> sobre a peroxidação lipídica.....	91
5.6.2 Efeito da obesidade e da suplementação com <i>Spirulina platensis</i> sobre a inibição da oxidação (atividade antioxidante)	94
6 Discussão.....	97
7 Conclusões.....	114
Referências	116
Anexos	134
Anexo 1	135
Anexo 2	137
Anexo 3	139

1-Introdução

A obesidade é uma doença crônica, caracterizada pelo acúmulo excessivo de tecido adiposo em todo o corpo, podendo ser causada por múltiplos fatores, entre eles: ingestão excessiva de alimentos, diminuição progressiva da atividade física, fatores hereditários, metabólicos, sociais, comportamentais e culturais. A classificação da obesidade em adultos é indicada pelo índice de massa corporal (IMC), representado pela razão entre o peso (expresso em kg) e o quadrado da estatura (expresso em m) (SANTOS et al., 2012), quando é igual ou superior a 30 kg/m^2 (SBEM, 2006).

O tecido adiposo era previamente considerado apenas um órgão de armazenamento, entretanto, atualmente já existem diferentes funções atribuídas a esse tecido, destacando-se o seu envolvimento na resposta imune, inflamação e metabolismo (OTTAVIANI et al., 2011).

A obesidade está intimamente relacionada com a inflamação. Quando há um consumo calórico excessivo, ocorre um acúmulo exacerbado de triglicerídeos nos adipócitos, causando hipertrofia e hiperplasia dessas células. Os adipócitos hipertrofiados secretam agentes pró-inflamatórios como $\text{TNF}\alpha$, IL-6 e adipocinas, como leptina e resistina, provocando inflamação local, e posteriormente sistêmica. Além disso, ocorre uma alteração do perfil de células imunológicas no tecido adiposo, sendo caracterizado por células de perfil mais inflamatório como macrófagos M1 e linfócitos T auxiliares Th1 (TEIXEIRA, 2012).

Além das alterações no perfil inflamatório, a obesidade também promove um aumento no estresse oxidativo. As espécies reativas de oxigênio (ROS) estão associadas a diversas doenças, além da obesidade, como câncer, diabetes e doenças neurológicas, e em estudos com o intestino, foi observado que o estresse oxidativo pode ser prejudicial à contração da musculatura lisa, alterando a função de várias proteínas, desde receptores a canais iônicos que são responsáveis pelo desencadeamento dos processos contráteis (VAN DER VLIET, 1992).

A reatividade muscular lisa pode ser modulada pelo desenvolvimento da obesidade. Como a regulação da contração do músculo liso tem um papel importante em diversos processos fisiopatológicos, tais como a hipertensão arterial, disfunção erétil, asma, cólicas uterinas e constipação intestinal (WEBB, 2003; FELIPPI et al., 2014), onde a contração anormal está envolvida, torna-se importante o estudo nesse tipo de músculo, a fim de contribuir com a descoberta e o

desenvolvimento de novos produtos com fins terapêuticos para tratar essas doenças.

Em virtude dos problemas de saúde que prejudicam a população, torna-se cada vez mais importante e necessário, buscar-se novas substâncias que se tornem alternativas terapêuticas para que esses problemas sejam curados ou minimizados. Nesse contexto, os produtos naturais têm se tornado a cada dia, uma fonte de inestimável valor às necessidades medicinais da humanidade, devido à seu rico arsenal terapêutico (KINGSTON, 2011).

Nesse contexto, os organismos marinhos desempenham um papel importante entre os produtos naturais, por que fornecem metabólitos secundários com grande diversidade química. Um organismo marinho que se destaca é a *Spirulina platensis* (Oscillatoriaceae), uma alga azul-esverdeada que vem ganhando mais atenção devido as suas diversas propriedades medicinais e nutricionais, principalmente a propriedade antioxidante (HWANG et al., 2013). Brito (2014) utilizando a *S. platensis* como suplemento alimentar, avaliou a reatividade relaxante da aorta de ratos exercitados e sedentários, e verificou que, em ambas as condições, houve um aumento na reatividade relaxante desse leito vascular, com mecanismo de ação associado a produção de fatores derivados do endotélio vascular, maior biodisponibilidade de óxido nítrico (NO) no plasma e na aorta, redução da peroxidação lipídica no plasma e no coração e aumento da atividade antioxidante na aorta, plasma e coração.

Em um estudo realizado no nosso laboratório por Oliveira et al. (2016) foi visto que ratos saudáveis alimentados com uma dieta hipercalórica pelo período de oito semanas, apresentaram uma diminuição da reatividade contrátil do íleo frente a dois agentes contráteis, cloreto de potássio (KCl) e carbacol (CCh).

Diante do exposto e tendo em vista que, a suplementação alimentar com *Spirulina platensis* melhora a reatividade de órgãos como aorta, nesse trabalho foi avaliado se a suplementação alimentar com *S. platensis* promove efeitos sobre a reatividade intestinal, bem como efeitos antiobesidade em ratos Wistar obesos alimentados com dieta hipercalórica. Ademais, também foi avaliado neste trabalho os efeitos que a mudança de dieta, simulando um processo de reeducação alimentar, promove no desenvolvimento da obesidade, bem como seus efeitos sobre a reatividade intestinal.

2 - Fundamentação Teórica

2.1 Obesidade

Em todo o mundo, a incidência de pessoas obesas vem aumentando de forma considerável, principalmente em países em desenvolvimento como o Brasil, e representa um dos grandes desafios do século XXI, por se tratar de uma condição clínica que está associada de forma direta ou indireta a inúmeras comorbidades (WHO, 2011).

Conceitualmente, a obesidade é uma doença crônica caracterizada pelo acúmulo excessivo de tecido adiposo em todo o corpo, como consequência de um desequilíbrio no consumo, gasto e/ou armazenamento energético. Os sistemas biológicos possuem mecanismos voltados para proteger o organismo contra uma perda excessiva de energia, tendo em vista que o estado de desnutrição representa um dano superior ao ganho excessivo de massa corporal. Consequentemente, a perda de massa corporal é menos favorável que o ganho da mesma (FRANCISCHI et al., 2000; SPEAKMAN, 2004; DIBAISE et al., 2008; BORGES, 2011; GREGOR; HOTAMISLIGIL, 2011; BAHIA et al., 2012).

A etiologia da obesidade é complexa, apresentando múltiplas causas, entre elas, hábitos alimentares inadequados, sedentarismo, fatores genéticos, sociais, psicológicos e culturais. Entretanto, as causas mais comuns para a ocorrência dessa doença são o aumento do consumo alimentar calórico e o sedentarismo, levando ao aumento de gordura corporal, devido ao balanço calórico positivo (STEIN; COLDITZ, 2004).

O excesso de adiposidade corporal está comumente associado ao aparecimento de algumas doenças crônicas como a doença de Alzheimer, aterosclerose, diabetes mellitus do tipo II, câncer, dislipidemia, doenças articulares e degenerativas, hipertensão arterial, síndrome metabólica, entre outras, diminuindo, dessa forma a qualidade e a expectativa de vida das pessoas (NGUYEN, 2009; BALISTRERI; CARUZO; CANDORE, 2010). As principais doenças associadas à obesidade pode ser observadas no quadro 1 (FRANCISCHI et al., 2000; PAULA, 2016).

Segundo a Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade e Síndrome Metabólica (ABESO) e de acordo com os dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), em 2015 cerca de 60% dos brasileiros estavam acima do peso, ou seja, cerca de 82 milhões de pessoas apresentaram o IMC igual ou superior a 25

(sobrepeso ou obesidade) e a prevalência maior de excesso de peso foi no sexo feminino (58,%) enquanto que no sexo masculino foi registrada uma prevalência de 56%. (ABESO, 2016).

Quadro 1 – Principais doenças associadas à obesidade.

Cardiovasculares	hipertensão, doenças coronárias, acidente vascular cerebral e trombose venosa profunda.
Respiratórias	falta de ar, apneia durante o sono e hipoventilação.
Gastrintestinais	hérnia de hiato, cálculos biliares, cirrose e esteatose hepática, constipação intestinal, hemorroida e câncer colorretal.
Útero	câncer endometrial e cervical.
Trato urinário	câncer de próstata e incontinência urinária.
Ortopédicas	osteoartrites e gota.
Endócrinas	redução do hormônio do crescimento (GH), redução na resposta a prolactina, aumento do cortisol livre na urina e alterações nos hormônios sexuais.
Metabólicas	hiperlipidemia, resistência à insulina, diabetes mellitus, síndrome do ovário policístico, hiperandrogenização e irregularidades menstruais.

Adaptado de FRANCISCHI et al., 2000; PAULA, 2016.

Para classificação de sobrepeso e obesidade, é comum utilizar a tabela proposta pela OMS (Quadro 2), no entanto, mesmo apresentando semelhante correlação com as comorbidades, é constatado na literatura que seu uso apresenta limitações, uma vez que o IMC não distingue os depósitos de massa magra daqueles de massa gorda, portanto, é recomendado também a utilização de outros métodos de determinação de gordura corporal, como a medida de circunferência abdominal, que reflete melhor o conteúdo de gordura visceral, e se associa muito à gordura corporal total (ABESO, 2016).

Quadro 2 – Classificação internacional da obesidade segundo o (IMC) e risco de doença (Organização Mundial da Saúde) que divide a adiposidade em graus ou classes.

IMC (kg/m ²)	Classificação	Risco de doença
< 18,5	Baixo peso	Baixo
18,5–24,9	Peso normal	Médio
≥ 25	Sobrepeso	-
25–29,9	Pré-obeso	Aumentado
30–34,9	Obeso I	Moderado
35–39,9	Obeso II	Grave
≥ 40	Obeso III	Muito grave

Fonte: ABESO, 2016.

Dietas hipercalóricas (3,7 a 5,4 kcal/g) quando acrescidas de lipídios ou carboidratos, podem apresentar-se altamente palatáveis e podem favorecer a indução da obesidade em roedores submetidos à exposição crônica (LEVIN; TRISCARI; SULLIVAN; 1986; DIEMEN; TRINDADE; TRINDADE, 2006).

A obesidade foi induzida por dieta pela primeira vez, em 1949, em que ratos foram alimentados com uma dieta palatável semilíquida (INGLE, 1949). Fenton e Dowling, em 1953, ofertaram a camundongos recém desmamados, uma dieta com 50% de lipídios para induzir obesidade, e esse modelo foi chamado de obesidade nutricional, sendo mais tarde rebatizado de obesidade dietética (FENTON; DOWLIN, 1953; SCLAFANI; SPRINGER, 1976).

Os lipídios constituem os macronutrientes de maior densidade energética (aproximadamente 9 kcal/g), sendo superior aos carboidratos e proteínas (4 kcal/g), e o metabolismo lipídico possui um gasto energético menor para o organismo do que o processamento de outros macronutrientes da dieta, dessa forma, pode-se fazer uma correlação positiva entre o consumo de altos níveis de lipídios e a obesidade (LISSNER; HEITMANN, 1995; SCHRAUWEN; WESTERTERP, 2000).

Barros e Silva (2015) padronizaram um modelo de obesidade em ratos Wistar, utilizando uma dieta hipercalórica. Esses animais foram alimentados durante oito semanas e, ao final desse período, foi verificado no grupo obeso, uma diminuição da ingestão alimentar estimada e aumento da ingestão alimentar calórica, aumento da massa corporal final, aumento dos depósitos de tecido adiposo epididimal, retroperitoneal e visceral, aumento no índice de adiposidade, em relação aos animais que receberam uma dieta normolipídica, fornecendo um modelo para

estudar as alterações promovidas pelo desenvolvimento da obesidade em ratos Wistar.

2.2 Determinantes fisiológicos do controle do peso e do apetite

O controle homeostático da ingestão alimentar é promovido principalmente por centros hipotalâmicos, como núcleo paraventricular, ventromedial, arqueado, dorsomedial e hipotálamo lateral (BUHMANN; LE ROUX; BUETER, 2014).

Dois grupos de neuropeptídios localizados no núcleo arqueado, estão relacionados com o controle central do apetite: os neuropeptídeos orexígenos, que compreendem o neuropeptídeo Y (NPY) e o peptídeo agouti (AgRP), e os neuropeptídeos anorexígenos, como o hormônio alfa-melanócito estimulador (α -MSH) e o transcrito relacionado à cocaína e à anfetamina (CART). Os neurônios que expressam esses neuropeptídios possuem a capacidade de interagir uns com os outros e ainda com sinais periféricos, como os glicocorticoides, insulina, grelina e leptina, para regular a ingestão alimentar e o gasto energético (SAINSBURY et al., 2002).

O tecido adiposo participa do controle do metabolismo energético, sendo responsável pela secreção de leptina, uma proteína de 16 kDa, produzida na proporção da quantidade de tecido adiposo, como também a regulação do equilíbrio energético, regulação do apetite e ingestão alimentar (CULBERT, RACINE et al. 2016). A leptina age no hipotálamo, no núcleo arqueado e inibe a atividade dos neurônios orexígenos e a liberação dos neuropeptídios orexígenos NPY e AgRP, suprimindo o apetite. Em contrapartida, estimula a atividade dos neurônios anorexígenos, e consequentemente, a liberação de α -MSH e CART (BOURET et al., 2004). Altos níveis de leptina reduzem a ingestão alimentar enquanto que baixos níveis induzem hiperfagia.

A leptina atua através dos receptores da classe das citocinas, ativando as enzimas *Jannus* cinase 2 (JAK2), que fosforila resíduos de tirosina e acopla as proteínas transdutores de sinal e ativadores de transcrição (STAT). Ao serem ativadas, são translocadas para o núcleo para estimular a transcrição do gene. A leptina também atua em outras vias intracelulares incluindo a cinase sensível a estímulos externos (ERK) e a cinase de fosfatidilinositol 3 (PI3K). A inibição da PI3K atenua a inibição do apetite induzida pela leptina e a estimulação do sistema

nervoso simpático (que leva a aumento do gasto energético) (LEUNG; KUAN, 2008; TARTAGLIA et al., 1995).

Indivíduos obesos apresentam elevados níveis plasmáticos de leptina. Essa hiperleptinemia é atribuída a alterações no receptor de leptina ou a uma deficiência em seu sistema de transporte na barreira hemato-encefálica, fenômeno denominado resistência à leptina (CONSIDINE et al., 1996).

A insulina é produzida pelas células β pancreáticas, e a sua concentração sérica também é proporcional à adiposidade. Age nos neurônios localizados no núcleo arqueado para reduzir o consumo energético. Os mecanismos responsáveis pelo seu efeito anorexígeno são semelhantes aos mecanismos da leptina (VARELA; HORVATH, 2012).

A grelina é secretada por células da mucosa gástrica e é um dos mais importantes sinalizadores para o início da ingestão alimentar. Sua concentração mantém-se alta nos períodos de jejum e nos períodos que antecedem as refeições, caindo imediatamente após a alimentação, o que também sugere um controle neural. A grelina, além de aumentar o apetite, também estimula as secreções digestivas e a motilidade gástrica (KONTUREK et al., 2004).

Alguns peptídeos intestinais podem atuar promovendo a saciedade. A colecistocinina (CCK) é liberada pelas células L do trato gastrointestinal, em resposta à presença de gordura e proteína. Esse peptídeo inibe a ingestão alimentar e também induz a secreção pancreática, a secreção biliar e a contração vesicular. Outro peptídeo inibidor da ingestão alimentar é o YY ou PYY. É expresso pelas células da mucosa intestinal, possui regulação neural, apresentando níveis plasmáticos elevados imediatamente após a ingestão alimentar. Indivíduos obesos apresentam menor elevação dos níveis de PYY pós-prandial, especialmente em refeições noturnas, levando a uma ingestão calórica maior (KONTUREK et al., 2004).

O peptídeo semelhante ao glucagon (GLP-1) é secretado pelas células L intestinais e promove estimulação da secreção da insulina, diminuição da secreção de glucagon, redução do consumo alimentar, entre outras funções (HAHALE; PAL, 2009). Em obesos, a diminuição da secreção de CCK e GLP-1 promove o retardo do esvaziamento gástrico e isso contribui para o estado de fome (NASLUND; HELLSTROM, 2007).

2.3 O tecido adiposo

O tecido adiposo de mamíferos é dividido em tecido adiposo branco (TAB) e tecido adiposo marrom (TAM). O TAB é composto por adipócitos, células do sistema imune, tecido conjuntivo, nervoso e vascular e se localiza periféricamente nas regiões subcutânea e visceral, armazena energia na forma de triglicerídeos e participa da regulação do balanço energético, influenciando processos de lipogênese e lipólise. Os adipócitos brancos maduros são células grandes, quase sempre maiores que hemáceas, fibroblastos e células do sistema imune, que pode alterar acentuadamente seu tamanho (volume e diâmetro) conforme a quantidade de triglicerídeos acumulada (CANNON; NEDEGAARD, 2004).

Por outro lado, o TAM é mais vascularizado, possui um número elevado de mitocôndrias e diminui com a idade, de forma que os adultos possuem quantidades muito pequenas. Está localizado principalmente no sistema nervoso central, apresenta função termogênica e participa ativamente da regulação da temperatura corporal e geração de calor. O adipócito marrom pode atingir 60 µm de diâmetro, sendo menor que o adipócito branco (90-100 µm) (CANNON; NEDEGAARD, 2004).

Após a descoberta da propriedade de secreção de substâncias pelo TAB, o papel endócrino do tecido adiposo ganhou grande importância (FONSECA-ALANIZ et al., 2006). O TAB secreta diferentes proteínas, chamadas de adipocinas, com estrutura proteica e função fisiológica variadas, compreendendo proteínas relacionadas ao sistema imune, como as citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IL-6, IL-1; proteínas responsáveis pela regulação da pressão sanguínea, como o angiotensinogênio; homeostase vascular, como o inibidor do ativador do plasminogênio (PAI-1); homeostase glicêmica, como a adiponectina; angiogênese, como o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF); regulação e balanço energético, como a leptina, entre outras (FRÜHBECK, et al., 2001; FONSECA-ALANIZ et al., 2006).

Geralmente, considera-se que a inflamação seja um estado consequente à obesidade. Porém, há autores que consideram a obesidade como resultado de uma doença inflamatória. De toda forma, as duas estão associadas, e uma representa uma contribuição no agravamento da outra. Alguns estudos sugerem que, a microbiota intestinal possui um papel chave na obesidade, interagindo com o metabolismo do hospedeiro ou promovendo respostas imunitárias, como a produção de citocinas.

Dessa forma, a inflamação promovida pela microbiota intestinal, pode levar a ativação de vias como a da JNK e PI3K γ e controlar o desenvolvimento da obesidade, a inflamação do tecido adiposo e a resistência à insulina (CAVALCANTE-SILVA et al., 2015).

Outros dados da literatura sugerem que, com o ganho de massa corporal e hipertrofia dos adipócitos, haja uma compressão dos vasos sanguíneos presentes no TAB, o que prejudica o suporte adequado de oxigênio para essa região, ocorrendo hipóxia no local e morte de alguns adipócitos. Com isso, há a ativação da cascata da resposta inflamatória, bem como o processo de angiogênese. Dessa forma, a condição de hipóxia seria suficiente para estimular a quimiotaxia de macrófagos, levar a indução da expressão de genes pró-inflamatórios e desencadear assim, o quadro de inflamação na obesidade (LOLMÈDE et al., 2003; NEELS; OLEFSKY, 2006; WOOD et al., 2009). Sendo assim, a produção elevada dos marcadores inflamatórios seria proveniente dos próprios adipócitos, como também dos macrófagos infiltrados em razão da condição de hipóxia, o que leva, em indivíduos obesos, a uma inflamação crônica de baixo grau (KERSHAW; FLIER, 2004; TRAYHURN; WOOD, 2004;).

O tecido adiposo dos indivíduos obesos torna-se um sítio de células inflamatórias, principalmente macrófagos do tipo M1, que são os maiores produtores de citocinas pró-inflamatórias nesses indivíduos (WEISBERG, et al, 2003), secretando grande quantidade dessas citocinas como também quimiocinas, que por sua vez, atraem um maior número de células, e isso aumenta os níveis dessas moléculas, e contribui ativamente para a inflamação sistêmica nesses indivíduos (LUMENG; BODZIN; SALTIEL, 2007).

2.4 O estresse oxidativo na obesidade

A produção de radicais livres está presentes no desenvolvimento dos organismos, em condições fisiológicas normais. Entretanto, um desequilíbrio entre esses radicais livres, espécies reativas de oxigênio e defesas antioxidantes pode provocar danos celulares cumulativos no DNA, lipídios, proteínas e outros componentes celulares, resultando em vários processos patológicos, como resistência à insulina e diabetes, hipertensão arterial, câncer, entre outros. Esse desequilíbrio caracteriza o estresse oxidativo, e é sabido que a obesidade é

caracterizada como uma condição crônica de estresse oxidativo (DIPLOCK et al., 1998; HIGDON; FREI, 2003; GRATÃO et al., 2005; FERNÁNDEZ-SANCHES, et al., 2011).

Alguns mecanismos podem gerar estresse oxidativo na obesidade, como níveis elevados de lipídios nos tecidos, defesas antioxidantes inadequadas, inflamação crônica, infiltração e ativação excessiva de leucócitos, produção endotelial EROs, hiperleptinemia, entre outros. Nestas condições, é provável que a produção de radicais livres esteja aumentada ou a resposta antioxidante é insuficiente para atenuar o dano causado (VINCENT et al., 2007).

A produção contínua de radicais livres durante os processos metabólicos culminou no desenvolvimento de mecanismos de defesa antioxidante, que têm como objetivo limitar os níveis intracelulares de tais espécies reativas e controlar a ocorrência de danos (BIANCHI; ANTUNES, 1999).

Os sistemas antioxidantes existem sob a forma de compostos enzimáticos e não enzimáticos, e ambos desempenham papel fundamental na prevenção da oxidação resultante da ação dos radicais livres (BROINIZI et al., 2008). O sistema antioxidante enzimático inclui a superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-PX), glutathione reductase (GSH-Rd) e a catalase (CAT). Estas enzimas são responsáveis pela remoção do ânion superóxido (O_2^-), hidroperóxidos orgânicos e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), respectivamente (YU, 1994; PIETTA, 2000). Já o sistema antioxidante não enzimático relaciona-se com um grupo de antioxidantes que podem ser congregados em compostos produzidos *in vivo*, como é o caso da glutathione, da ubiquinona e do ácido úrico, e em compostos obtidos diretamente da dieta tais como o α -tocoferol (vitamina-E), β caroteno, ácido ascórbico (vitamina-C), e compostos fenólicos como os flavonoides (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007; SAMPAIO; MORAES, 2010).

A condição crônica de obesidade leva a diminuição da ativação das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx), e conseqüentemente, a redução da resposta da célula ao estresse oxidativo (VINCENT et al., 2007). Em estudo com ratos alimentados com dieta hiperlipídica por 7 meses, demonstrou-se que, nos rins e tecidos cardiovasculares o estresse oxidativo pode ocorrer devido ao aumento da regulação de NAD(P)H oxidase e redução da atividade das enzimas antioxidantes (ROBERTS et al., 2006).

O peróxido de hidrogênio (H_2O_2), produzido em excesso devido ao estresse oxidativo, reduziu a contração muscular lisa desencadeada por uma estimulação parassimpática em intestino de ratos (VAN DER VLIET; TUINSTRA; BAST, 1989).

O estresse oxidativo interfere na mobilização de cálcio no intestino devido a interação das EROs com os grupamentos tiol e dissulfeto dos canais iônicos ou dos receptores farmacológicos, diminuindo, desta forma, a afinidade agonista-receptor (acetilcolina- M_3) e a mobilização do cálcio, seja por meio da diminuição da produção de IP_3 (1,4,5-trisfosfato de inositol), um importante segundo mensageiro envolvido na via de sinalização para liberação do Ca^{2+} , ou através do influxo de cálcio pelos canais de cálcio dependentes de voltagem (Ca_v). A diminuição da concentração de cálcio intracelular prejudica os eventos contráteis, diminuindo assim a reatividade contrátil intestinal (BELLOMO et al., 1987; PRUNN; VAN GELDEREN, 1989; EBERSOLE; MOLINOFF, 1991).

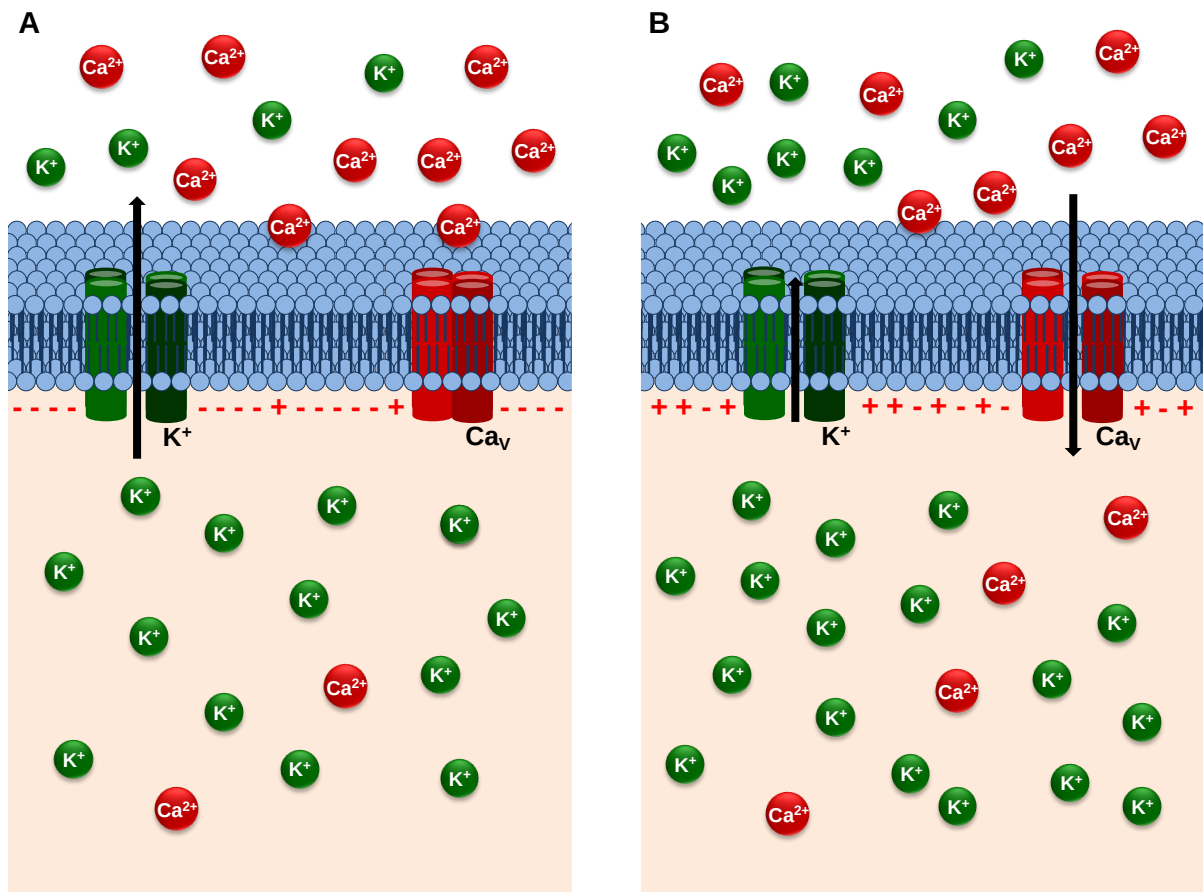
2.5 A reatividade muscular lisa intestinal

O músculo liso é o principal músculo responsável pelo revestimento da maior parte dos órgãos ocos dos sistemas do corpo. Suas células estão presentes em órgãos como útero, vasos sanguíneos, bexiga, nas vias aéreas, estômago e intestinos (WEBB, 2003). Sendo assim, a regulação e a desregulação da contração e/ou do relaxamento desse músculo, desempenha um importante papel em muitos processos fisiopatológicos, como cólicas uterinas, asma, hipertensão arterial e distúrbios gastrintestinais.

A contração da musculatura lisa intestinal é regulada por nervos do sistema nervoso entérico e células intersticiais especializadas, como células intersticiais de Cajal (ICC) e células similares a fibroblastos, e o principal neurotransmissor excitatório responsável por essa regulação é a acetilcolina (ACh), via receptor M_3 (MURTHY, 2006; SANDERS et al., 2010). O aumento da concentração citosólica de Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_c$) é o principal sinal para que a contração ocorra no músculo liso, e a regulação funcional da $[Ca^{2+}]_c$, depende de dois tipos de acoplamentos, para dar início à uma resposta contrátil: um acoplamento eletromecânico, onde ocorre uma mudança no potencial de membrana, e um acoplamento fármaco-mecânico, onde a contração ocorre pela ligação de um agonista ao receptor (REMBOLD, 1992; 1996).

No acoplamento eletromecânico, ocorre uma despolarização da membrana, culminando num aumento da $[Ca^{2+}]_c$, que provêm do meio extracelular através dos (Ca_v), promovendo a contração (Figura 1).

Figura 1 – Esquema do acoplamento eletromecânico da contração muscular lisa pelo aumento da concentração extracelular de K^+ .



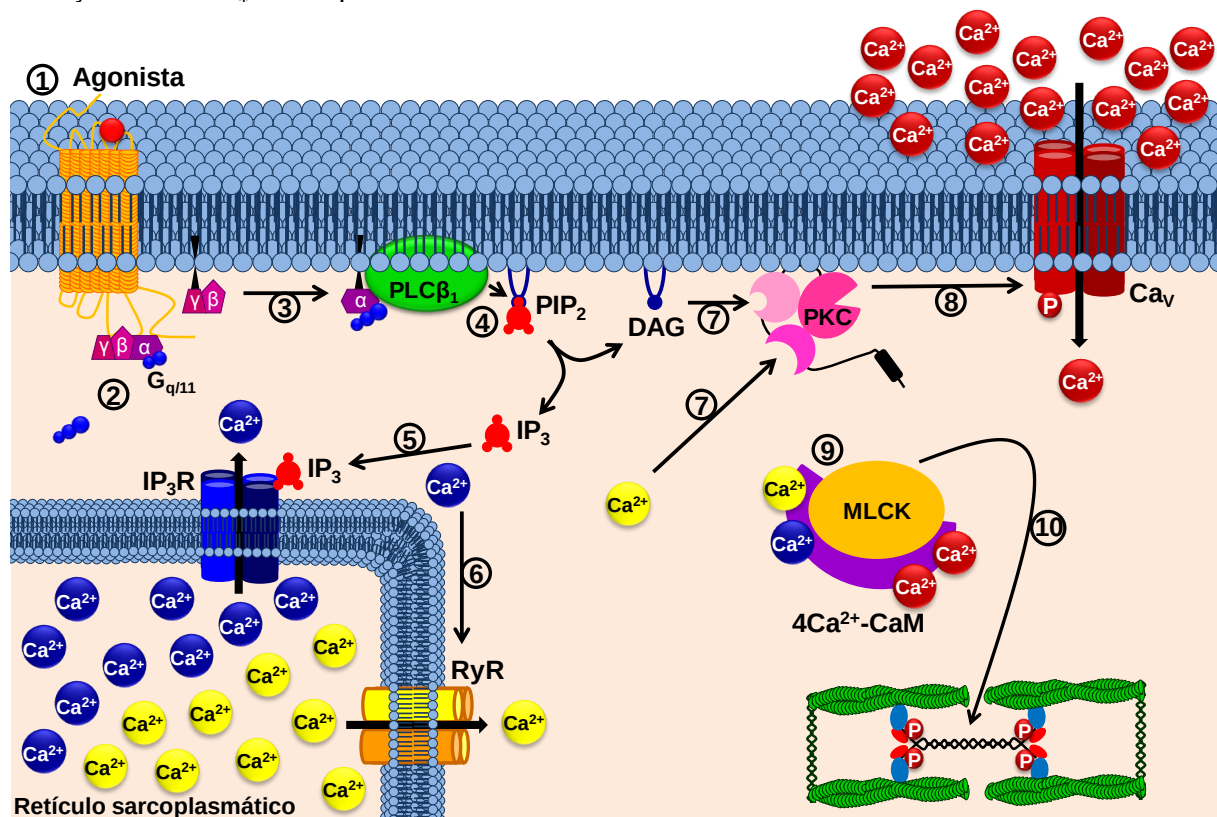
A) Durante o repouso, o gradiente químico favorece o efluxo de íons K^+ através de seus canais de vazamento, deixando a região perimembranar interna da membrana plasmática polarizada negativamente; **B)** Um aumento na $[K^+]_e$ diminui o efluxo desses íons, ocasionando o acúmulo de cargas positivas na região perimembranar interna; a célula despolariza, o que ativa os Ca_v promovendo o influxo de Ca^{2+} , com consequente contração do músculo liso.

Fonte: SILVA, 2015.

No acoplamento farmacomecânico, agonistas como CCh, (análogo da ACh), ligam-se a receptores acoplados à proteína G (GPCRs) e ativam as proteínas $G_q/11$, que promovem a ativação da cascata do inositol mediando a produção de 1,4,5-trisfosfato de inositol (IP_3), que estimula a liberação de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático, e diacilglicerol (DAG), responsável pela ativação da proteína cinase C (PKC), que, por sua vez, leva a um aumento $[Ca^{2+}]_c$ através da modulação

direta dos Ca_v ou indiretamente por inibição de canais de K^+ presentes na membrana plasmática (FUKATA et al., 2001). O aumento na $[\text{Ca}^{2+}]_c$ favorece a ligação do Ca^{2+} com a proteína calmodulina (CaM), formando o complexo $[\text{4Ca}^{2+}\text{-CaM}]$. Este complexo é responsável pela ativação da cinase da cadeia leve da miosina (MLCK), que por sua vez fosforila a cadeia leve da miosina (MLC), e promove a interação desta com os filamentos de actina, desencadeando o processo de contração do músculo liso (WEBB, 2003) (Figura 2).

Figura 2 – Esquema do mecanismo farmacomecânico da contração no músculo liso pela ativação da via $\text{G}_{q/11}$ - $\text{PLC}\beta_1$.



1) O agonista se liga ao seu receptor do tipo GPCR na membrana plasmática; 2) As proteínas $\text{G}_{q/11}$ trocam GDP por GTP na sua subunidade α , tornando-se ativas; 3) A subunidade $\text{G}_{q/11}$ -GTP ativa a enzima $\text{PLC}\beta_1$; 4) A $\text{PLC}\beta_1$ cliva o fosfolípido de membrana PIP_2 em IP_3 e DAG; 5) O IP_3 migra pelo citosol e ativa o IP_3R presente na membrana do RS, liberando Ca^{2+} dos estoques; 6) O Ca^{2+} liberado ativa o RyR , liberando mais Ca^{2+} para o citoplasma; 7) O Ca^{2+} liberado, juntamente com o DAG ativam a PKC; 8) A PKC ativada fosforila ativando os Ca_v1 e promovendo o influxo de Ca^{2+} ; 9) O aumento da $[\text{Ca}^{2+}]_c$ aumenta a afinidade do Ca^{2+} pela CaM formando o complexo $4\text{Ca}^{2+}\text{-CaM}$ e ativa a MLCK; 10) A MLCK ativada fosforila a MLC que interage com os filamentos de actina, desencadeando a contração do músculo liso. As definições das abreviaturas estão presentes na lista de abreviaturas e no texto.

Fonte: SILVA, 2015.

Alguns estudos têm relatado uma via alternativa que contribui para a contração no músculo liso, conhecida como via de sensibilização ao cálcio, uma vez que não depende da manutenção de níveis elevados da $[Ca^{2+}]_c$. Envolve a modulação da fosfatase da cadeia leve da miosina (MLCP), principalmente pela pequena proteína ligante de GTP (RhoA) e a sua cinase associada (ROK), uma proteína serina/treonina cinase (KARAKI et al., 1997; HORI; KARAKI, 1998). Alguns agonistas contráteis, como a endotelina-I e a acetilcolina, que fisiologicamente aumentam a $[Ca^{2+}]_c$ via GPCRs (principalmente aqueles acoplados às proteínas $G_{q/11}$ -ETA, ETB e M_3 , respectivamente) podem levar à ativação direta do fator trocador de nucleotídeo de guanina da RhoA (RhoGEF) pelas proteínas $G_{12/13}$ - α -GTP ativados pela ligação de agonistas a receptores, tais como ETA e M_3 , que ativa a RhoA pela troca do difosfato de guanosina (GDP) pelo trifosfato de guanosina (GTP) nessa proteína (SOMLYO; SOMLYO, 2003). A RhoA-GTP, por sua vez, ativa sua cinase associada, a ROK, e esta, fosforila a subunidade MYPT1 da MLCP, tornando-a inativa, promovendo dessa forma, a manutenção do estado fosforilado da cadeia leve regulatória da miosina (rMLC) e, conseqüentemente, a força de contração (KIMURA et al., 1996).

Alguns outros mecanismos foram propostos para a sensibilidade ao Ca^{2+} . A CPI-17 (proteína inibitória de 17 kDa ativada por PKC) é uma proteína que serve como substrato para a ROK e para a PKC. Quando fosforilada, a CPI-17 liga-se à subunidade PP1c da MLCP para inibir a sua atividade enzimática. Sendo assim, a sensibilização ao Ca^{2+} pode envolver a fosforilação e conseqüente ativação da CPI-17, mediada tanto pela ROK como pela PKC, para aumentar a fosforilação da rMLC e prolongar a contração do músculo liso (KITAZAWA et al., 2000).

A RhoA-GTP também estimula a fosfolipase D (PLD), uma enzima que está associada a membranas intracelulares, no entanto, pode ser encontrada na membrana plasmática, sendo específica para fosfatidilcolina (PC), liberando ácido fosfatídico (PA) que, através da ação da enzima fosfo-hidrolase, é desfosforilado a DAG levando a ativação sustentada da PKC (BERRIDGE, 2009). A ativação da PKC também pode ser dependente de $G_{q/11}$, da PLC que forma DAG a partir da hidrólise do PIP_2 . A PKC pode fosforilar o resíduo de Thr³⁸ da CPI-17, aumentando dessa forma, sua potência inibitória sobre a PP1c por mais de 1000 vezes, inibindo a ação da MLCP (SOMLYO; SOMLYO, 2003; MURTHY, 2006;) (Figura 3).

The diagram illustrates the signaling pathway for myofibril relaxation initiated by agonist stimulation. The process involves the following steps:

- Agonist stimulation activates Gq/11 and G12/13 pathways.
- Gq/11 activates PLC β 1, leading to PIP₂ hydrolysis into DAG and IP₃.
- IP₃ releases Ca²⁺ from the sarcoplasmic reticulum.
- G12/13 activates RhoGEF, leading to RhoA activation.
- RhoA activates ROCK, which phosphorylates MYPT1 and MLCP.
- MLCP dephosphorylates and activates ZIPK, which in turn phosphorylates CPI-17.
- CPI-17 inhibits RhoA.

The diagram is numbered 1 through 16, indicating the sequence of events in the signaling pathway.

Fonte: CORREIA, 2013.

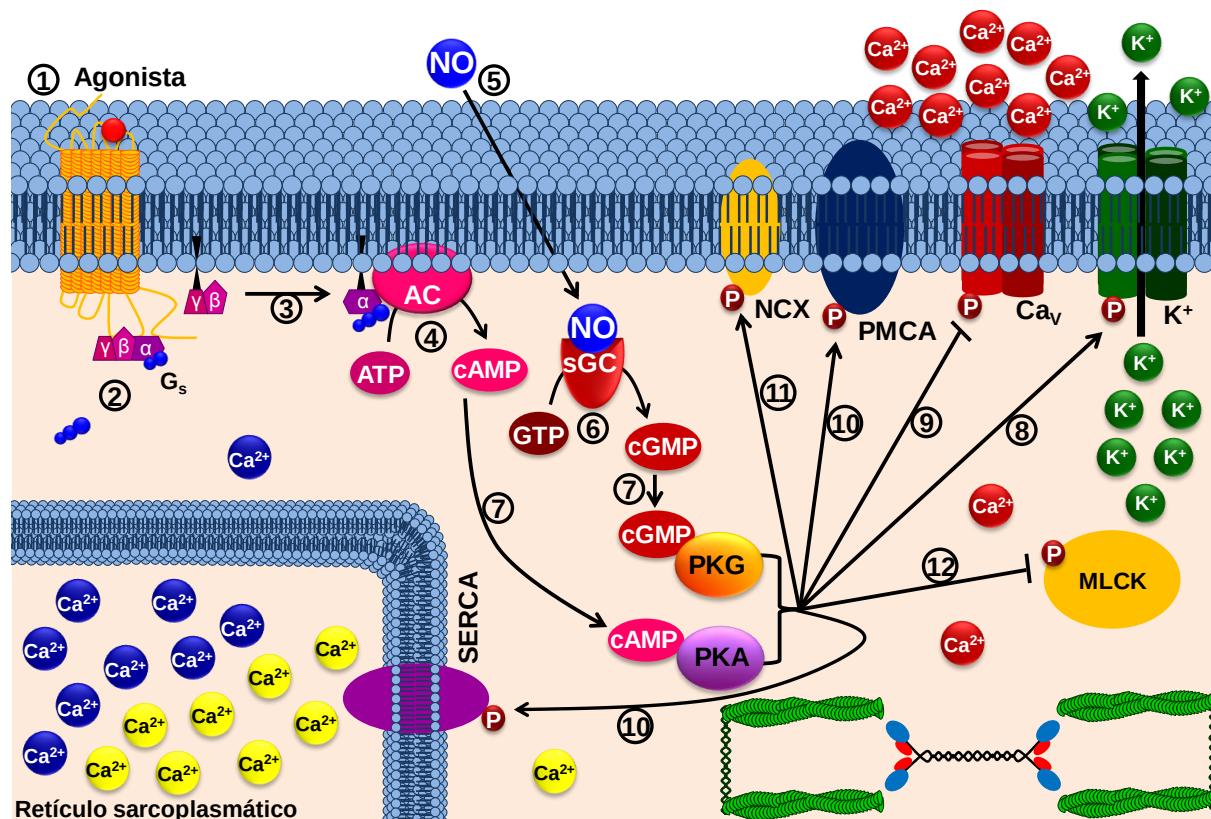
O mecanismo eletromecânico para o relaxamento muscular se dá pela hiperpolarização da membrana nas células musculares lisas pode ser produzida por

substâncias que abrem diretamente os canais de K^+ , como, por exemplo, a cromacalina, e o nicorandil e, aumentam o efluxo de K^+ da célula (GURNEY, 1994). Dessa maneira, a hiperpolarização gerada pelo efluxo de íons K^+ reduz o influxo de Ca^{2+} através dos Ca_v1 , diminuindo, portanto, a $[Ca^{2+}]_c$, a fosforilação da miosina e, como consequência, levando ao relaxamento do músculo liso (REMBOLD, 1996).

O mecanismo farmacomecânico para o relaxamento muscular se dá pela hiperpolarização da membrana, podendo ocorrer em função da liberação do fator relaxante derivado do endotélio, óxido nítrico (NO), que podem ativar diretamente a ciclase de guanilil solúvel (sGC) promovendo o aumento de monofosfato cíclico de guanosina (cGMP). Existem ainda os agonistas que induzem relaxamento, onde a ligação aos seus receptores ativa diretamente uma ciclase de adenilil (AC), resultando na formação de monofosfato cíclico de adenosina (cAMP). O aumento de cGMP ativa a proteína cinase dependente de cGMP (PKG), enquanto que o aumento de cAMP ativa a proteína cinase dependente de cAMP (PKA), que ativam os canais de K^+ , com consequente efluxo desse íon, hiperpolarização de membrana e fechamento dos Ca_v (REMBOLD, 1996).

Além disso, os mecanismos de relaxamento envolvidos no acoplamento farmacomecânico incluem a fosforilação, via PKA ou PKG, de vários substratos, ocasionando: (1) o aumento na atividade da Ca^{2+} -ATPase tanto do RS (SERCA) como da membrana plasmática (PMCA), aumentando, assim, o sequestro e a extrusão de Ca^{2+} , respectivamente, diminuindo a $[Ca^{2+}]_c$; (2) a inativação de IP3R, pela PKG, reduzindo sua capacidade de liberar o Ca^{2+} do RS; (3) a diminuição da formação do IP_3 , levando à diminuição da liberação de Ca^{2+} dos RS; (4) a inibição da MLCK, reduzindo sua afinidade pelo complexo $4Ca^{2+}$ -CaM, causando uma redução nos níveis de rMLC fosforilada e, dessa forma, do processo contrátil; (5) a inibição direta dos Ca_v , causando uma redução da $[Ca^{2+}]_c$ por diminuir o influxo de Ca^{2+} e (6) a ativação de canais de K^+ que, por repolarização ou por hiperpolarização, causam o bloqueio dos Ca_v (WOODRUM; BROPHY, 2001; DUTTA et al., 2002; DANILA; HAMILTON, 2004) (Figura 4).

Figura 4 – Esquema do mecanismo farmacomecânico do relaxamento no músculo liso pela ativação da via G_s /AC/PKA e NO/sGC/PKG.



1) O agonista se liga ao seu receptor do tipo GPCR na membrana plasmática; 2) A proteína G_s troca GDP por GTP na sua subunidade α , tornando-se ativa; 3) A subunidade $G\alpha_s$ -GTP ativa a AC; 4) A AC converte ATP em cAMP; 5) O NO gerado tanto dos nervos nitrérgicos como das células endoteliais, estimula a atividade da sGC; 6) A sGC converte GTP em cGMP; 7) Os nucleotídeos cíclicos, cAMP e cGMP ativam suas respectivas proteínas cinases, PKA e PKG. Ambas as proteínas cinases fosforilam vários substratos: 8) Ativam os canais de K^+ ; 9) Inibem os Ca_v ; 10) Aumentam a atividade da SERCA e da PMCA; 11) Ativam o trocador Na^+/Ca^{2+} ; Todos esses mecanismos diminuem a $[Ca^{2+}]_c$ e 12) Inibem a MLCK, reduzindo sua afinidade pelo $4Ca^{2+}$ -CaM impedindo a ativação da MLC e, conseqüentemente, sua interação com os filamentos da actina, promovendo o relaxamento do músculo liso. As definições das abreviaturas estão presentes na lista de abreviaturas e no texto.

Fonte: SILVA, 2015.

Recentemente, foram registradas alterações na reatividade muscular lisa vascular em decorrência da obesidade, Rocha (2015) demonstrou uma diminuição na reatividade contrátil da aorta de rato ao agonista fenilefrina, sem alteração na resposta vasodilatadora. Esses ratos wistar foram alimentados durante 27 semanas com dietas hiperlipídicas (20% de lipídeos). Ademais, o estudo realizado por Nascimento et al. (2011) evidenciou uma redução da resposta contrátil máxima da

aorta de ratos alimentados com dieta hiperlipídica (20% de lipídeos) frente à noradrenalina.

Diferentes estudos abordam as alterações na reatividade intestinal em decorrência da prática de exercício aeróbico crônico, como demonstrado por Araujo et al. (2015) utilizando a modalidade natação. Nesse estudo, a partir da segunda a sexta semanas de exercício de natação, houve diminuição da reatividade contrátil do íleo de ratos Wistar, entretanto, não foram observadas alterações na morfologia do músculo liso intestinal desses animais. Utilizando outra modalidade de exercício, o de esteira, Lira et al. (2008) verificou um aumento na reatividade contrátil do íleo de camundongos que se exercitaram por 10, 25 e 40 dias, no entanto, com 55 dias de exercício, observou-se uma diminuição nessa reatividade intestinal. Além das alterações na reatividade intestinal ocasionadas pela prática de exercícios físicos, recentemente, Oliveira et al. (2016) demonstraram que a obesidade reduz a reatividade contrátil intestinal de ratos Wistar, frente aos agentes contráteis KCl e CCh em ratos alimentados com uma dieta hipercalórica por 8 semanas. Além disso, Van der Vliet (1992) já havia demonstrado que o estresse oxidativo reduz a contração do músculo liso intestinal de ratos Wistar, mediada por receptores muscarínicos.

2.6 Produtos naturais marinhos

Em todo o mundo, os produtos naturais desempenham um papel essencial nos processos de descoberta e desenvolvimento de medicamentos, seja fornecendo substâncias isoladas, ou como produtos diretos, desempenhando assim um papel fundamental na pesquisa farmacológica e na proteção à saúde (NEWMAN; CRAGG, 2012).

Dentre os produtos naturais, destacam-se os produtos marinhos. Até os anos 50, devido ao difícil acesso às profundidades dos oceanos, os produtos naturais marinhos foram pouco estudados. Na década de 70, com o avanço das técnicas e o advento dos equipamentos seguros de mergulho, os organismos marinhos puderam ser melhor estudados (FENICAL, 2006).

O ambiente marinho vêm despertando o interesse como potencial fonte de descoberta de novos fármacos em todo o mundo, pois possui uma grande biodiversidade e vasta extensão, ainda pouco explorada. Os organismos marinhos

produzem uma infinidade de substâncias com as mais diversas finalidades, entre elas, defesa, comunicação, predação, inibição do desenvolvimento de competidores, reprodução, ou apenas como produto do seu metabolismo (DONIA; HAMANN, 2003).

O ecossistema marinho possui características físico-químicas bastante particulares, pois fatores como luminosidade, profundidade, temperatura, pressão e pH, conferem-lhe condições ambientais inigualáveis. Em consequência, muitos organismos marinhos vivem em habitats complexos, expostos a condições extremas e esta diversidade ambiental faz com que eles produzam grande variedade de metabólitos biologicamente ativos que, possivelmente, não podem ser encontrados em outros organismos. Essas moléculas podem apresentar as mais diversas atividades biológicas, podendo ser úteis como possíveis fármacos contra muitas doenças. Esta situação reforça a busca de novos compostos no ambiente marinho apresenta possibilidades quase ilimitadas (SENTHILKUMAR, 2013).

Grande parte dos produtos naturais marinhos foram isolados a partir de esponjas, celenterados, equinodermos, moluscos e também a partir de microrganismos marinhos (KIJJOI; SAWANGWONG, 2004). Algumas atividades farmacológicas já foram descritas a partir de substâncias isoladas de organismos marinhos, entre elas, atividade hipoglicêmica, relacionada aos éteres pentabromodifenílicos (inibem a tirosina fosfatase 1B), isolados da esponja *Lamellodysidea herbacea* (YAMAZAKI et al., 2013); atividade analgésica e antiviral, atribuída ao peptídeo ω -conotoxina MVIIA (25-aminoácido natural), isolado do molusco marinho *Conus magnus* (SCHROEDER et al., 2004); atividade antioxidante, relacionada a astaxantina (sequestrador de radicais livres), um carotenoide extraído das microalgas *Haematococcus pluvialis* (RICCIONI et al., 2011), entre outras.

Dessa forma, entende-se que os recursos naturais oferecem grandes possibilidades para a descoberta de novos compostos farmacologicamente ativos que podem agir no combate e prevenção de doenças, e os oceanos, por serem ambientes extremamente vastos e ainda pouco explorado, merecem uma atenção especial, visto que alguns organismos marinhos já oferecem, e podem oferecer ainda mais, substâncias biologicamente ativas para combater as doenças humanas, e outros organismos, como as algas marinhas, precisam ser mais estudados.

2.7 *Spirulina platensis*

Um dos organismos marinhos que merece destaque é a *Spirulina platensis*, também conhecida como *Arthrospira platensis*, uma alga verde-azulada, unicelular, microscópica, pertencente à família *Spirulinaceae* do filo das cianobactérias (ZEWEIL et al., 2016). O cultivo dessa alga se tornou interessante por ser facilmente adaptável, mesmo quando sujeita a condições extremas (CHAMORRO et al., 1996). Pode ser encontrada em vários ambientes, no entanto, àqueles com maior concentração de sal, carbonatos e bicarbonatos são mais favoráveis ao seu crescimento (CIFERRE et al., 1983).

Essa microalga é legalmente autorizada como complemento alimentar na Europa, Japão e Estados Unidos pelo Agência Americana de Administração de Fármacos e Alimentos, sem efeitos tóxicos ao organismo (VON DER WEID; DILLON; FALQUET, 2000; BELAY et al., 1993).

O potencial da *S. platensis* como suplemento alimentar foi demonstrado por Alves et al. (2005) mostrando que ratos desnutridos submetidos à alimentação com dietas a base dessa alga, apresentaram uma grande eficiência na recuperação nutricional, demonstrando o potencial da *S. platensis* no combate à desnutrição. No Brasil, segundo a Resolução da Diretoria Colegiada Nº 16/1999 e sob registro de Nº 4042, essa alga foi classificada como alimento funcional ou suplemento alimentar, possuindo propriedades nutraceuticas, apresentando segurança para uso comprovadas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2013).

A variedade de nutrientes que contém a *S. platensis* determina sua importância nutricional, sendo considerada um alimento completo, possuindo um grande número de nutrientes por unidade de peso (PHANG et al., 2000). Em sua composição, apresenta cerca de 60 a 70% de proteínas, sendo esse teor, mais elevado que o encontrado em carne de peixe (15-20%), sementes de soja (35%), ovos (12%), cereais (8-14%) e leite integral (3 %); em relação aos aminoácidos, a cisteína e a metionina são os principais, apresentando-se na *S. platensis*, em quantidade superiores às encontradas em outros alimentos, como verduras, cereais e sementes (HENRIKSON, 1994); quanto ao conteúdo enzimático, estão a superóxido dismutase (SOD), uma potente enzima antioxidante, que atua no sequestro dos radicais livres mais citotóxicos, como o ânion superóxido; a lisozima, que possui ação antimicrobiana e a anidrase carbônica, presente no sangue e tem

como função converter dióxido de carbono (CO₂) em ácido carbônico e íons bicarbonato nas células (DE JESUS RAPOSO et al., 2013).

Quanto ao conteúdo de ácidos graxos, a *S. platensis* fornece quantidades significantes de ômega 3, ômega 6, ácido linoleico, ácido γ-linoleico, ácido eicosapentaenoico e ácido docosahexaenoico (DE JESUS RAPOSO et al, 2013; RADMANN; COSTA, 2009). O ácido linoleico é convertido em ácido linoleico conjugado (CLA), nos mamíferos, pelas dessaturases, que estão presentes na glândula mamária e no tecido adiposo (MENESES; AUGUSTO, 2014). Um dos efeitos do CLA mais evidenciados é a capacidade de reduzir gordura corporal, com aumento da massa magra, atuando na diminuição do número e tamanho dos adipócitos, aumento da taxa de degradação de gordura nos adipócitos e na inibição de certas enzimas, como a lipoproteína lipase, responsável pela entrada de ácidos graxos nos adipócitos (HARO; ARTACHO; VIQUE, 2006).

Em relação aos pigmentos, a ficocianina é o mais abundante, correspondendo a cerca de 20% do seu peso seco. Possui alta capacidade antioxidante, sequestrando radicais livres e inibindo a formação de radicais superóxido (BHAT et al., 2000; ERIKSEN, 2008; KU et al., 2013; KUDDUS et al., 2013; McCART, 2007). Além disso, também possui clorofila e carotenoides, como o β-caroteno, responsável por regulação de enzimas como a SOD, a catalase (CAT) e bloqueio de radicais livres por quelação dos íons metálicos (CUVELIER, 2001).

Além disso, a *S. platensis* possui também vitaminas, como as vitaminas do complexo B e a vitamina E, que atuam como antioxidantes (CUVELIER, 2001), e minerais, entre eles o cálcio, o fósforo, o magnésio, o ferro, o zinco, o cobre, o cromo, o manganês, o sódio e o potássio, sendo que os principais são o cálcio (1,3 a 1,4 g/kg de *S. platensis*), o fósforo (6,7 a 9,0 g/kg de *S. platensis*) e o potássio (6,4 a 15,4 g/kg de *S. platensis*) (HENRIKSON, 1994).

Diversas atividades biológicas da *S. platensis* já foram descritas em estudos pré-clínicos e clínicos destacando: redução do peso corporal em indivíduos obesos (BECKER et al., 1986); diminuição da concentração plasmática de triacilgliceróis e lipoproteínas de baixa densidade (SAMUELS et al., 2002; NAGAOKA et al., 2005; MAZOKOPAKIS et al., 2014), crescimento da microbiota saudável intestinal (KULSHRESHTHA et al., 2008), atividade antifúngica (BIERHALS et al., 2009), atividade antibacteriana (PARISI et al., 2010), diminuição da reatividade contrátil à fenilefrina e aumento na atividade relaxante à acetilcolina (BRITO, 2014), atividade

antioxidante (BASHANDY et al., 2016), atividade anti-inflamatória (KU et al., 2013; PHAM et al., 2016) entre outras.

Todos esses estudos reforçam o potencial promissor da *S. platensis*, entretanto, a literatura se apresenta escassa, quando se relaciona estudos de reatividade contrátil intestinal em decorrência da obesidade e a suplementação com essa alga, sendo necessários estudos para verificar o efeito dessa suplementação na obesidade, como também na reatividade contrátil intestinal.

3- Objetivos

3.1 Geral

Investigar os efeitos que a obesidade, a suplementação alimentar com *Spirulina platensis* e a mudança de dieta promovem nos parâmetros nutricionais, morfométricos, na reatividade contrátil e relaxante e estresse oxidativo em ratos Wistar, avaliando:

- A ingestão alimentar (g), ingestão alimentar calórica (kcal) e massa corporal (g);
- Índice de adiposidade e morfometria dos tecidos adiposos epididimal, retroperitoneal e inguinal;
- Eficácias e potências do agente contrátil do acoplamento eletromecânico KCl e do agonista contrátil do acoplamento farmacomecânico CCh em íleo;
- Eficácia e potência relaxante do bloqueador de canais de cálcio verapamil em íleo;
- A morfometria intestinal;
- Os níveis de malondialdeído (MDA) e a porcentagem de inibição da oxidação no plasma, no íleo e nos tecidos adiposos epididimal, retroperitoneal e inguinal.

4 - Material e Métodos

4.1 Material

4.1.1 Produto-teste

A *S. platensis* foi adquirida do laboratório DONGTAI TOP BIO-ENGINEERING CO.LTD (Nanjing, China) na forma de pó (lote nº 2014007, Anexo 1). O laboratório de Controle de Qualidade Galena Química e Farmacêutica Ltda (lote nº 1504023402, Anexo 2) analisou uma amostra para a certificação de que o material era *S. platensis* e depois o material foi adquirido e comercializado pela Dilecta Farmácia de Manipulação e Homeopatia, João Pessoa-PB, (lote nº 2014007) para a obtenção do pó liofilizado.

4.1.2 Animais

Eram utilizados ratos Wistar (*Rattus norvegicus*), com aproximadamente oito semanas de idade e pesando cerca de 195 g, provenientes do Biotério Prof. Thomas George do Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos (IPeFarM) da Universidade Federal da Paraíba. Esses animais eram alocados em caixas de polipropileno autoclaváveis, com cerca de 3 animais por caixa. Tiveram acesso a água *ad libitum* e eram mantidos sob condições de ventilação e temperatura controladas e constantes (21 ± 1 °C) e submetidos diariamente a um ciclo claro-escuro de 12 h, sendo o período claro das 6 às 18 h, e a eutanásia realizada no período claro. Todos os procedimentos experimentais eram realizados seguindo os princípios de cuidados com animais *Guidelines for the ethical use animals in applied etiology studies* (SHERWIN et al., 2003), submetidos pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFPB (Certidão Nº 017/2016).

4.1.3 Substâncias e reagentes

O cloreto de cálcio di-hidratado ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), o sulfato de magnésio hepta-hidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), a glicose ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$) e o formaldeído foram adquiridos da Vetec (Brasil). O bicarbonato de sódio (NaHCO_3) foi adquirido da Fmaia (Brasil). O cloreto de sódio (NaCl) e o cloreto de potássio (KCl) foram adquiridos da Química Moderna (Brasil). O fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4), o hidróxido de sódio

(NaOH) e o ácido clorídrico (HCl) foram adquiridos da Nuclear (Brasil). Estas substâncias, exceto a glicose, o bicarbonato de sódio e o cloreto de sódio eram dissolvidas e diluídas em água destilada para obtenção de cada solução-estoque que foram mantidas sob refrigeração. O formaldeído era utilizado para conservar as amostras de tecidos utilizadas para cortes histológicos.

O cloridrato de carbamilcolina (CCh) e o verapamil foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Brasil). Estas substâncias eram dissolvidas e diluídas em água destilada para obtenção da solução estoque (10^{-2} M) e mantida a 0 °C em refrigeração. Essas soluções-estoque eram diluídas em água destilada para obtenção de concentrações apropriadas ao protocolo experimental.

O ácido etilenodiamino tetra – acético (1:250) foi adquirido da Biotécnica – Biotecnologia Avançada (Brasil).

A mistura carbogênica (95% de O₂ e 5% de CO₂) foi adquirida da White Martins (Brasil).

4.1.4 Solução nutritiva

O pH da solução nutritiva, cuja composição está descrita abaixo, era ajustado para 7,4 com HCl ou NaOH 1 N.

Krebs Henseleit (mM) – NaCl (118,0); KCl (1,2); CaCl₂ (2,5); KH₂PO₄ (1,18); MgSO₄ (1,18); C₆H₁₂O₆ (1,1); NaHCO₃ (25,0) (HENRIQUES, 2011).

4.1.5 Equipamentos

A pesagem das substâncias, dos fragmentos de íleo e dos tecidos adiposos epididimal, retroperitoneal e visceral era realizada em balança analítica modelo AY220, enquanto que os animais eram pesados em balança semianalítica modelo BK2000. O pH das soluções era aferido em pHmetro digital PG2000. Todos estes equipamentos foram produzidos por Gehaka (Brasil).

Para registrar as contrações isotônicas, o íleo era suspenso em cubas de banho para órgãos isolados (5 mL) e conectados a uma alavanca isotônica de inscrição frontal em cilindros esfumaçados de um quimógrafo (DTF, Brasil). As cubas

eram acopladas a uma bomba termostática modelo Polystat 1200 Cole-Palmer (Vernon Hills, IL, EUA) para o controle da temperatura.

Para registrar as contrações isométricas, o íleo era suspenso em cubas de banho para órgãos isolados (6 mL) modelo BOI-04 AVS (São Carlos, SP, Brasil), acopladas a uma bomba termostática, modelo BT-60 AVS (São Carlos, SP, Brasil), para o controle de temperatura das cubas. As contrações isométricas eram registradas por meio de transdutores de força isométricos modelo TIM-05 AVS (São Carlos, SP, Brasil) conectados a um amplificador modelo AECAD-04F (São Carlos, SP, Brasil) os quais estavam conectados a um computador. Para a aquisição de dados era utilizado o programam AQCAD e para a análise dos dados era utilizado o programa ANCAD, ambos da AVS (São Carlos, SP, Brasil).

As amostras para a realização dos cortes histológicos eram submetidas ao processador de tecidos modelo PT05 (LUPTEC, Brasil), seccionadas em micrótomo rotativo modelo RM 2125 RT (Leica, Alemanha), fotografadas em microscópio ótico com câmera acoplada modelo BX41 (Olympus, Japão) e posteriormente analisadas por programa analisador de imagem (Leica Qwin 3.1) no Laboratório de Imunologia e Patologia de Invertebrados, do Centro de Ciências Exatas e da Natureza da UFPB.

Para a separação do plasma utilizado nos estudos bioquímicos, foi utilizado a centrífuga modelo 80-2B-15 ml da CENTRIBIO® (Guarulhos - São Paulo, Brasil).

As dosagens de MDA e o teste de inibição da oxidação eram lidas através do espectrofotômetro modelo SP-22 (Biospectro, Brasil) no Laboratório de Estudos do Treinamento Físico aplicado ao Desempenho de Saúde .

4.2 Métodos

4.2.1 Dieta e grupos experimentais

Os animais foram divididos aleatoriamente em 6 grupos experimentais (6 animais por grupo): grupo controle que receberam solução salina (GCS), grupo obeso que recebeu solução salina (GOS), grupo obeso suplementado com *S. platensis* nas doses de 25, 50 e 100 mg/kg (GO + SP25, GO + SP50 e GO + SP100, respectivamente), e grupo obeso alimentado posteriormente com dieta Presence® (GO + DP). O GCS recebeu uma dieta padrão do tipo *pellets* (Presence®). Todos os grupos obesos receberam uma dieta composta por uma mistura de ração padrão

tipo *pellets* (Presence[®]), chocolate ao leite, amendoim *in natura* torrado e biscoito de maizena na proporção de 3:2:2:1. No preparo dessa dieta, a ração padrão, o amendoim e o biscoito eram moídos e misturados, e o chocolate fundido em banho-maria e adicionado à mistura para a formação de material homogêneo, que era moldado e em seguida, aquecido em estufa (70 °C) por 24 h (Figura 5) e armazenada a temperatura ambiente (Adaptado de ESTADELLA et al., 2004). A dieta era preparada semanalmente e ofertada aos animais na forma de *pellets*. Todos os grupos experimentais eram alimentados por um período de 16 semanas, cada qual com seu tipo de dieta, cuja composição está descrita na Tabela 1.

Figura 5 – Ingredientes utilizados no preparo da dieta hipercalorica na sua forma original (A), triturada (B) e homogênea, moldada e cortada antes e após a secagem em estufa (C).



Fonte: SOUZA, I. L. L.[®], 2015.

Tabela 1 – Macronutrientes e valor calórico das dietas utilizadas no estudo.

Dieta	Carboidratos (%)	Proteínas (%)	Lipídios (%)	Valor energético (kcal/100g)
Padrão	63	23	4	3800
Hipercalórica	45,53	22,76	16	4170

Fonte: SOUZA et al., 2016.

4.2.2 Preparo e administração da *Spirulina platensis*

O pó de *S. platensis* era diariamente dissolvido em solução salina para o preparo das doses de 25, 50 e 100 mg/kg (Adaptado de BRITO, 2014), que eram administradas aos animais ao fim da preparação. A suplementação foi realizada por um período de oito semanas (El-DESOKY et al., 2013). A administração foi realizada por via oral no período das 12 às 14 hs com o auxílio de agulhas de aço inoxidável para gavagem (BD-12, Insight, Ribeirão Preto, SP) e seringas descartáveis de 10 mL com precisão de 0,2 mL (BD, Higilab, João Pessoa, PB). Os grupos que receberam as doses de 25, 50 e 100 mg/kg de *S. platensis* iniciaram a suplementação 60 dias após o início da dieta hipercalórica, e continuaram até o dia da eutanásia. O grupo obeso que recebeu a dieta padrão não foi suplementado, apenas trocado de dieta 60 dias após o início da dieta hipercalórica, recebendo a dieta padrão (Presence[®]) até o dia da eutanásia.

4.2.3 Efeito da obesidade e da suplementação alimentar com *Spirulina platensis* sobre a ingestão alimentar e massa corporal dos animais

O consumo alimentar dos animais era calculado diariamente, através da diferença entre o alimento oferecido e o residual utilizando a fórmula: consumo (g) = quota oferecida (g) – rejeito limpo (g). Foi considerado rejeito limpo o alimento que não foi ingerido e permaneceu na área externa do comedouro (VADIVEL; PUGALENTI, 2010). A ingestão alimentar calórica era calculada semanalmente através da fórmula: quantidade de kcal da dieta (4170) x ingestão alimentar média semanal. A massa corporal (g) dos animais era verificada 2 vezes por semana, sendo o ganho de massa calculado pela diferença entre massa corpórea final e a inicial.

4.2.4 Efeito da obesidade e da suplementação alimentar com *Spirulina platensis* sobre o coeficiente de eficácia alimentar (CEA), o coeficiente de conversão alimentar (CCA) e o coeficiente de ganho de peso por consumo calórico (CGPCC)

O cálculo do CEA foi realizado através da razão entre o ganho de massa corporal (g) e o consumo alimentar total (g) dos animais após o período de 16 semanas. O CCA foi calculado pela razão entre o consumo alimentar total (g) e o ganho de massa corporal (g) após o período experimental. O cálculo do CGPCC foi obtido pela razão entre o ganho de massa corporal (g) e o consumo energético total (kcal) dos animais após o período de 16 semanas (CAMPBELL, 1963; GONÇALVES, 2014).

4.2.5 Efeito da obesidade e da suplementação alimentar com *Spirulina platensis* sobre parâmetros da obesidade experimental

4.2.5.1 Parâmetros murinométricos

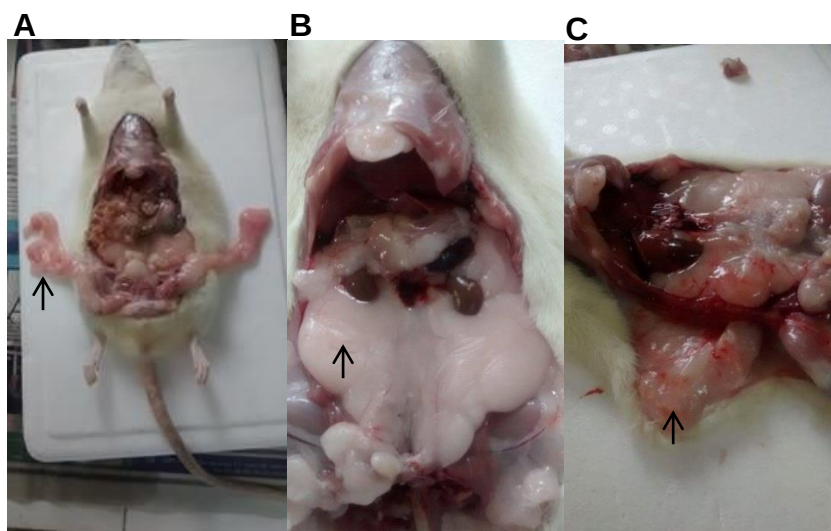
No dia da eutanásia, os animais eram pesados e era medido o comprimento nasoanal (cm), que foi utilizado no cálculo do índice de Lee, a partir da razão entre a raiz cúbica da massa corporal e o comprimento nasoanal do animal (LEE et al., 1929). O cálculo do IMC foi realizado a partir da razão entre a massa corporal (g) e o quadrado do comprimento corporal (cm^2) (NOVELLI et al., 2007).

4.2.5.2 Massa dos depósitos de tecido adiposo

Doze horas após a última exposição da dieta, os ratos eram eutanasiados por decapitação por guilhotina e após cuidadosa dissecação, os tecidos adiposos epididimal, retroperitoneal e inguinal foram pesados. Esses tecidos adiposos representam os principais componentes de adiposidade central em ratos (MAUER; HARRIS; BARTNESS, 2001). A reserva adiposa abdominal localizada na porção inferior do abdome conectada ao epidídimo (Figura 6A) representa o tecido adiposo epididimal. A reserva adiposa conectada a parede abdominal posterior, ao redor dos rins e a parte abdominal do ureter (Figura 6B) representa o tecido adiposo

retroperitoneal. A reserva adiposa subcutânea (Figura 6C) que se localiza entre a porção inferior da caixa torácica e a porção mediana da coxa representa o tecido adiposo inguinal (SURWIT et al., 1995; SANTOS, 2010).

Figura 6 – Tecido adiposo epididimal (na lateral) (A), tecido adiposo retroperitoneal (B) e tecido adiposo inguinal (C).



Fonte: Ferreira, 2017.

4.2.5.3 Índice de adiposidade

O índice de adiposidade era calculado pela soma das massas individuais das camadas adiposas epididimal, retroperitoneal e inguinal, através da fórmula: tecido adiposo epididimal + tecido adiposo retroperitoneal + tecido adiposo visceral x 100/massa corporal final (STUNKARD; WADDEN, 1993; MACRINI, 2014).

4.2.5.4 Efeito da obesidade e da suplementação alimentar com *S. platensis* sobre a morfometria do tecido adiposo

4.2.5.4.1 Preparações histológicas

Após a eutanásia dos animais, as reservas adiposas epididimal, retroperitoneal e inguinal eram cuidadosamente retiradas, pesadas e fixadas em formaldeído a 10% durante um período máximo de 72 h, e submetidas ao

procedimento histológico padrão para inclusão em parafina. Este procedimento incluiu as seguintes etapas: 1) desidratação do tecido em uma série alcoólica crescente (70% por 24 h; 80, 96 e 100% (3 banhos) por 1 h cada; 2) diafanização ou clareamento em que o tecido era banhado em álcool 100% mais xilol (1:1) por 1 h, seguidos de dois banhos em xilol puro por 1 h cada; 3) inclusão em parafina, em que o tecido passou por dois banhos de parafina líquida (aquecida a 50 °C) por 1 h cada. Em seguida, os tecidos foram emblocados em uma nova parafina.

Os blocos obtidos eram cortados a cinco µm de espessura em secção transversal do íleo e das gorduras utilizando um micrótomo rotativo. Os cortes obtidos eram corados com Hematoxilina de Mayer e Eosina (HOWARD et al., 2004).

As lâminas obtidas eram analisadas em microscópio óptico com câmera acoplada, onde foram fotografadas na objetiva de 20x.

4.2.5.4.2 Análise dos tecidos adiposos

Para a análise do tecido adiposo, eram utilizadas as reservas adiposas epididimal, retroperitoneal e inguinal. Para analisar a morfologia dos adipócitos, eram obtidas imagens digitais dos cortes histológicos, e aproximadamente 100 adipócitos por animal tiveram seu diâmetro aferido usando o software Leica Qwin 3.1 (Adaptado de SANTOS, 2010).

4.2.6 Obtenção e preparação dos segmentos de íleo de rato

Os animais eram mantidos em jejum por 12 horas (recebendo somente água *ad libitum*). Após esse período, os animais eram eutanasiados por decapitação por guilhotina. Era realizada uma incisão abdominal e um segmento de íleo de aproximadamente 15 cm de comprimento era retirado e colocado em uma placa de Petri contendo solução nutritiva de Krebs Henseleit à 37 °C sob aeração com carbogênio. Este segmento era seccionado em fragmentos de 2 a 3 cm de comprimento, que eram destinados à reatividade ou fixados em formaldeído (10%) para a preparação de lâminas histológicas. Era realizada a retirada dos tecidos conjuntivo e adiposo adjacentes aos segmentos de íleo, e estes, suspensos individualmente em cubas de banho para órgão isolado (5 mL) contendo solução de Krebs Henseleit aerada com carbogênio a 37 °C, eram mantidos em repouso sob

tensão de 1 g durante 30 min, tempo necessário para a estabilização do órgão. Durante o período de estabilização, a solução nutritiva era trocada a cada 15 minutos para prevenir a interferência de metabólitos (RADENKOVIC et al.,2006).

4.2.7 Efeito da obesidade e da suplementação com *Spirulina platensis* sobre a reatividade contrátil do íleo de ratos obesos

O íleo era montado como descrito no item 4.2.6. Após o período de estabilização, era induzida uma contração isotônica com 30 mM de KCl para verificar sua funcionalidade. A preparação foi lavada e após 15 minutos eram induzidas duas curvas concentrações-resposta cumulativas similares por KCl (10^{-3} - 10^{-1} M) ou por CCh (10^{-9} - 10^{-4} M). Os resultados eram avaliados comparando-se a porcentagem da resposta contrátil do íleo de rato do GCS com aquelas obtidas pela média das amplitudes máximas das curvas-controle dos grupos GOS, GO + SP25, GO + SP50, GO + SP100 e GO + DP.

A reatividade contrátil era analisada com base nos valores de pD_2 (logaritmo negativo, na base 10, da concentração de uma droga que produz 50% do seu efeito máximo) e E_{max} (efeito máximo) dos agentes contráteis, calculados a partir das curvas concentrações-resposta de todos os grupos testados, sendo comparados com o GCS.

4.2.8 Efeito da obesidade e da suplementação com *S. platensis* sobre a reatividade relaxante do íleo de ratos obesos

O íleo era montado conforme o descrito no item 4.2.6. Após o período de estabilização de 30 min, era induzida uma contração com 25 mM de KCl para verificar a funcionalidade do órgão. Em seguida, a preparação era lavada e uma nova contração era induzida com 25 mM de KCl, e sob o componente tônico dessa contração era adicionado de maneira cumulativa à cuba o verapamil (10^{-15} - 3×10^{-7} M) em todas as preparações (BERTONI et al.,2004).

Os resultados eram avaliados comparando-se a porcentagem da resposta relaxante do íleo de rato do GCS com aquelas obtidas pela média das amplitudes máximas das curvas-controle dos grupos GOS, GO + SP25, GO + SP50, GO + SP100 e GO + DP.

A reatividade relaxante do íleo era analisada pela determinação do $E_{\max}$ e do pD_2 dos grupos GOS, GO + SP25, GO + SP50, GO + SP100 e GO + DP, em comparação com o GCS.

4.2.9 Efeito da obesidade e da suplementação com *Spirulina platensis* sobre a morfometria do íleo de ratos obesos

4.2.9.1 Preparações histológicas

As amostras do íleo eram coletadas conforme descrito no item 4.2.6. As amostras, previamente fixadas em formaldeído a 10% por um período máximo de 72 h, eram submetidas ao procedimento histológico padrão conforme o item 4.2.5.4.1.

4.2.9.2 Análises da espessura das camadas circular e longitudinal do músculo liso intestinal

De cada amostra ($n = 5$) de cada grupo experimental) eram selecionados os melhores cortes transversais do íleo (sem dobras do tecido). Eram analisados 2 cortes por animal. De cada corte era feita uma imagem, e desta imagem eram obtidas 4 medidas de espessura das camadas musculares circular e longitudinal (ARAUJO, 2014).

4.2.10 Efeito da obesidade e da suplementação com *Spirulina platensis* sobre estresse oxidativo

4.2.10.1 Efeito da obesidade e da suplementação com *Spirulina platensis* sobre a peroxidação lipídica

A peroxidação lipídica no tecido era determinada através do produto da reação cromogênica do ácido tiobarbitúrico (TBA) com um dos produtos da peroxidação lipídica da membrana, o MDA (WINTERBOURN et al., 1985).

Para essa análise eram utilizados o íleo, os depósitos de tecido adiposo e o plasma dos animais. Os segmentos de íleo, e as reservas adiposas epididimal,

retroperitoneal e inguinal eram homogeneizados com KCl a 10% na proporção de 1:1. Dos homogenatos e do sangue foram retirados 250 µL e incubados em banho maria a 37 °C por 60 min. Logo após, a mistura era precipitada com ácido perclórico a 35% e centrifugada 1207 g por 20 min a 4 °C. O sobrenadante era transferido para 45 novos *Eppendorffs*® e a este, era adicionado 400 µL de TBA a 0,6% e incubado na temperatura de 95-100 °C durante 1 h. Após esse período, as amostras eram resfriadas e o material era lido em um espectrofotômetro a um comprimento de onda de 532 nm.

A determinação da concentração de MDA em cada amostra era realizada por substituição dos valores de absorbância na curva-padrão de MDA obtida a partir de diferentes concentrações de uma solução padrão (DRAPER et al., 1993). Os resultados eram expressos em µMol/L.

4.2.10.2 Efeito da obesidade e da suplementação com *S. platensis* sobre a inibição da oxidação (atividade antioxidante)

O protocolo era realizado segundo Brand-Williams, Cuvelier e Berset (1995). Para o preparo do reagente, uma alíquota de 1,25 mg de DPPH era diluída em 100 mL de etanol, mantida sob refrigeração e protegida da luz (papel alumínio ou vidro âmbar). Em seguida, em *Eppendorffs*®, adicionou-se 50 µL da amostra (plasma, homogenatos de tecido adiposo e do íleo) e 2 mL da solução de DPPH. Os *Eppendorffs*® eram agitados no vórtex por 10 s e deixados em repouso por 30 min. Logo, eram centrifugados a 616 g à temperatura de 20 °C por 15 min e o sobrenadante foi usado para a realização da leitura em espectrofotômetro a um comprimento de onda de 515 nm. Os resultados eram expressos como percentual de inibição da oxidação, onde:

$$AOA = 100 - ([DPPH \bullet R]_T / [DPPH \bullet R]_B \cdot 100)$$

Sendo $[DPPH \bullet R]_T$ e $[DPPH \bullet R]_B$ correspondentes à concentração de DPPH• remanescentes após 30 minutos, avaliadas na amostra (T) e no branco (B) preparado com água destilada.

4.3 Análise estatística

Todos os resultados obtidos eram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (e.p.m.) e analisados estatisticamente empregando-se análise de variância (ANOVA) “one-way” seguido do pós-teste de Tukey para a comparação de mais de dois grupos. A hipótese nula foi rejeitada quando $p < 0,05$.

Como parâmetro de potência foi utilizado o pD_2 , calculado por regressão não linear para todos os experimentos realizados, e como parâmetro de eficácia foi utilizado o E_{max} , obtido pela média das percentagens máximas de contração (NEUBIG et al.,2003).

Todos os dados foram analisados pelo programa GraphPad Prism® versão 5.01 (GraphPad Software Inc., San Diego CA, U.S.A.).

5 Resultados

5.1 Efeito da obesidade e da *Spirulina platensis* sobre a ingestão alimentar e massa corporal dos animais

5.1.1 Avaliação das ingestão alimentar estimada e calórica

A ingestão alimentar média estimada (g) do grupo GOS ($110,6 \pm 1,7$ g) foi inferior ao grupo GCS ($171,4 \pm 2,0$ g). Os grupos GO + SP25 ($153,3 \pm 3,2$ g), GO + SP50 ($142,4 \pm 1,6$ g), GO + SP100 ($156,1 \pm 1,9$ g) e GO + DP ($171,6 \pm 2,6$ g) apresentaram a ingestão alimentar média estimada superior ao grupo GOS, porém os grupos suplementados com *S. platensis*, apresentaram essa ingestão inferior ao GCS (Tabela 2).

Quanto à ingestão alimentar total (g), o GOS ($2050,0 \pm 8,0$ g) apresentou ingestão inferior ao grupo GCS ($2984,0 \pm 0,6$ g). Os grupos GO + SP25 ($2794,0 \pm 9,5$ g), GO + SP50 ($2200,0 \pm 14,1$ g), GO + SP100 ($2435,0 \pm 15,6$ g) e GO + DP ($2599,0 \pm 18,3$ g) apresentaram a ingestão alimentar total superior ao GOS, entretanto, inferior ao GCS (Tabela 2).

A ingestão alimentar calórica média (kcal) do GOS ($495,6 \pm 7,6$ kcal) foi inferior ao grupo GCS ($677,7 \pm 10,9$ kcal). Os grupos suplementados com *S. platensis* GO + SP25 ($696,4 \pm 12,0$ kcal), GO + SP50 ($586,3 \pm 6,5$ kcal), GO + SP100 ($642,5 \pm 8,3$ kcal) e o grupo que recebeu a dieta padrão GO + DP ($686,2 \pm 13,2$ kcal) apresentaram ingestões superiores ao grupo GOS, sem diferenciar do grupo GCS (Tabela 3).

Quanto à ingestão alimentar calórica total (kcal), o grupo GOS ($8263,0 \pm 304,3$ kcal) apresentou ingestão inferior ao grupo GCS ($10960,0 \pm 170,8$ kcal). Os grupos GO + SP25 ($11027,0 \pm 471,1$ kcal), GO + SP100 ($10217,0 \pm 52,0$ kcal) e o GO + DP ($11491,0 \pm 371,4$ kcal) apresentaram ingestão alimentar calórica total superior ao grupo GOS, diferentemente do grupo GO + SP50 ($9381,0 \pm 161,3$ kcal), que não apresentou diferença em relação ao grupo GOS (Tabela 3).

Tabela 2 – Ingestão alimentar estimada (g) dos grupos GCS, GOS, GO + SP25, GO + SP50, GO + SP100 e GO + DP.

Grupos	Ingestão alimentar média (g)	Ingestão alimentar total (g)
GCS	171,4 ± 2,0	2984,0 ± 0,6
GOS	110,6 ± 1,7*	2050,0 ± 8,0*
GO + SP25	153,3 ± 3,2* [#]	2794,0 ± 9,5* [#]
GO + SP50	142,4 ± 1,6* ^{#@}	2200,0 ± 14,1* ^{#@}
GO + SP100	156,1 ± 1,9* [#] \$	2435,0 ± 15,6* [#] @\$
GO + DP	171,6 ± 2,6* ^{#@\$&}	2599,0 ± 18,3* ^{#@\$&}

ANOVA *one-way* seguido do pós-teste de Tukey. * $p < 0,05$ (GCS vs. GOS, GO + SP25, GO + SP50, GO + SP100 e GO + DP); [#] $p < 0,05$ (GOS vs. GO + SP25, GO + SP50, GO + SP100 e GO + DP); [@] $p < 0,05$ (GO + SP25 vs. GO + SP50, GO + SP100 e GO + DP); ^{\$} $p < 0,05$ (GO + SP50 vs. GO + SP100 e GO + DP) e [&] $p < 0,05$ (GO + SP100 vs. GO + DP), (n = 6). GCS = grupo controle salina; GOS = grupo obeso salina; GO + SP25, GO + SP50 e GO + SP100 = grupos obesos suplementados com *S. platensis* 25, 50 e 100 mg/kg, respectivamente; GO + DP = grupo obeso alimentado com dieta padrão.

Fonte: Ferreira, 2017.

Tabela 3 – Valores de ingestão alimentar calórica (kcal) dos grupos GCS, GOS, GO + SP25, GO + SP50, GO + SP100 e GO + DP.

Grupos	Ingestão alimentar calórica média (kcal)	Ingestão alimentar calórica total (kcal)
GCS	677,7 ± 10,9	10960 ± 170,8
GOS	495,6 ± 7,6*	8263,0 ± 304,3*
GO + SP25	696,4 ± 12,0 [#]	11027,0 ± 471,1 [#]
GO + SP50	586,3 ± 6,5* ^{#@}	9381,0 ± 161,3* [@]
GO + SP100	642,5 ± 8,3* ^{#@\$}	10217,0 ± 52,0 [#]
GO + DP	686,2 ± 13,2* ^{#@\$&}	11491,0 ± 371,4* ^{#@\$&}

ANOVA *one-way* seguido do pós-teste de Tukey. * $p < 0,05$ (GCS vs. GOS e GO + SP50); [#] $p < 0,05$ (GOS vs. GO + SP25, GO + SP50, GO + SP100 e GO + DP); [@] $p < 0,05$ (GO + SP25 vs. GO + SP50 e GO + SP100); ^{\$} $p < 0,05$ (GO + SP50 vs. GO + SP100 e GO + DP) e [&] $p < 0,05$ (GO + SP100 vs. GO + DP), (n = 6). GCS = grupo controle salina; GOS = grupo obeso salina; GO + SP25, GO + SP50 e GO + SP100 = grupos obesos suplementados com *S. platensis* 25, 50 e 100 mg/kg, respectivamente; GO + DP = grupo obeso alimentado com dieta padrão.

Fonte: Ferreira, 2017.

5.1.2 Massa corporal

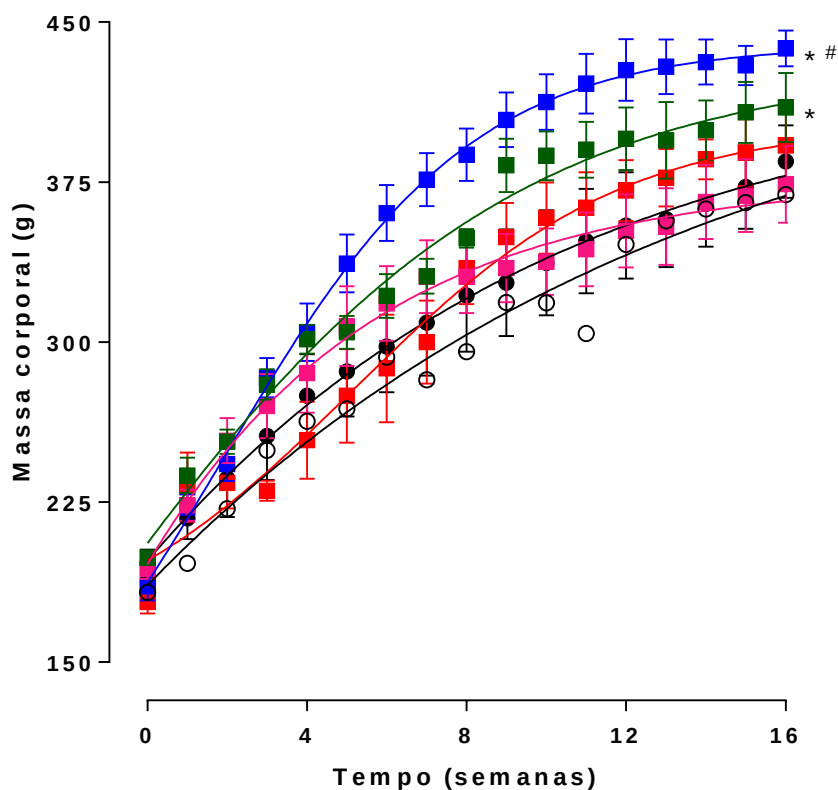
Em relação à massa corporal inicial (g), nenhum dos grupos experimentais apresentou diferença (Tabela 4).

Não houve diferença quando à massa corporal média semanal entre os GCS ($271 \pm 5,1\text{g}$) e o GOS ($312,8 \pm 6,8\text{g}$). Quanto aos grupos suplementados com *S.platensis* e o GO + DP, apenas o grupo GO + SP25 ($388,1 \pm 37,7\text{g}$) apresentou aumento da massa corporal semanal em relação ao GCS e ao GOS, conforme mostrado no gráfico (Gráfico 1).

Na massa corporal final, o grupo GO + SP25 apresentou um aumento em relação ao GOS ($437,7 \pm 8,4$), enquanto os outros grupos suplementados com *S. platensis* e o GO + DP não apresentaram diferença (Tabela 4).

Quanto ao ganho de massa corporal, não houve diferença entre o GCS ($186,5 \pm 11,9\text{ g}$) e o GOS ($188,3 \pm 15,1\text{g}$). Dentre os grupos suplementados com *S. platensis*, apenas o GO + SP25 ($252,2 \pm 12,7\text{ g}$) apresentou maior ganho de massa corporal em relação ao GCS, GOS e GO + DP ($180,0 \pm 16,5\text{ g}$) (Tabela 4).

Gráfico 1 – Massa corporal média semanal para os GCS (○), GOS (●), GO + SP25 (■), GO + SP50 (■), GO + SP100 (■) e GO + DP (■).



Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente ($n = 6$). ANOVA *one-way* seguido do pós-teste de Tukey. * $p < 0,05$ (GCS vs. GO + SP25 e GO + SP100); # $p < 0,05$ (GOS vs. GO + SP25). GCS = grupo controle salina; GOS = grupo obeso salina; GO + SP25, GO + SP50 e GO + SP100 = grupos obesos suplementados com *S. platensis* 25, 50 e 100 mg/kg, respectivamente; GO + DP = grupo obeso alimentado com dieta padrão.

Fonte: Ferreira, 2017.

Tabela 4 – Valores de massa corporal inicial, final e ganho de massa corporal para os grupos GCS, GOS, GO + SP25, GO + SP50, GO + SP100 e GO + DP.

Grupos	Massa corporal inicial (g)	Massa corporal final (g)	Ganho de massa corporal (g)
GCS	182,7 ± 1,6	369,2 ± 12,7	186,5 ± 11,9
GOS	196,3 ± 6,4	384,7 ± 17,0	188,3 ± 15,1
GO + SP25	185,5 ± 6,5	437,7 ± 8,4*	252,2 ± 12,7* [#]
GO + SP50	178,2 ± 5,5	392,2 ± 16,3	214,0 ± 12,3
GO + SP100	199,0 ± 1,7	410,0 ± 16,2	211,0 ± 16,4
GO + DP	194,4 ± 4,7	374,0 ± 18,0	180,0 ± 16,5 [@]

ANOVA *one-way* seguido do pós-teste de Tukey. * $p < 0,05$ (GCS vs. GO + SP25); [#] $p < 0,05$ (GOS vs. GO + SP25); [@] $p < 0,05$ (GO + SP25 vs. GO + DP), (n = 6). GCS = grupo controle salina; GOS = grupo obeso salina; GO + SP25, GO + SP50 e GO + SP100 = grupos obesos suplementados com *S. platensis* 25, 50 e 100 mg/kg, respectivamente; GO + DP = grupo obeso alimentado com dieta padrão.

Fonte: Ferreira, 2017.

5.2. Efeito da obesidade e da suplementação alimentar com *Spirulina platensis* sobre o coeficiente de eficácia alimentar (CEA), o coeficiente de conversão alimentar (CCA) e o coeficiente de ganho de peso por consumo calórico (CGPCC)

Os grupos GOS ($0,09 \pm 0,008$ g) apresentou um aumento no CEA em relação ao GCS ($0,06 \pm 0,004$ g). Quanto aos grupos suplementados com *S. platensis* e o GO + DP, apenas o grupo GO + DP ($0,07 \pm 0,005$ g) apresentou uma diminuição nesse coeficiente em relação ao GOS (Tabela 5).

Em relação ao CCA, o grupo GOS ($11,2 \pm 0,9$ g) apresentou valor inferior ao GCS ($16,3 \pm 1,1$ g), e entre os grupos suplementados com *S. platensis* e o GO + DP, apenas o GO + DP ($15,2 \pm 1,5$ g) apresentou um aumento nesse coeficiente em relação ao GOS (Tabela 5).

O grupo GOS ($0,02 \pm 0,002$ g/kcal) não apresentou diferença em relação ao GCS ($0,02 \pm 0,001$ g/kcal) em relação ao CGPCC. Entre os grupos suplementados com *S. platensis* e o GO + DP, apenas o GO + DP ($0,01 \pm 0,001$ g/kcal) apresentou uma diminuição neste coeficiente em relação ao GOS ($0,02 \pm 0,002$ g/kcal) (Tabela 5).

Tabela 5 - Valores de CEA, CCA e CGPCC para os grupos GCS, GOS, GO + SP25, GO + SP50, GO + SP100 e GO + DP.

Grupos	CEA (g)	CCA (g)	CGPCC (g/kcal)
GCS	$0,06 \pm 0,004$	$16,3 \pm 1,1$	$0,02 \pm 0,001$
GOS	$0,09 \pm 0,008^*$	$11,2 \pm 0,9^*$	$0,02 \pm 0,002$
GO + SP25	$0,09 \pm 0,004^*$	$11,2 \pm 0,5^*$	$0,02 \pm 0,001$
GO + SP50	$0,09 \pm 0,004^*$	$10,4 \pm 0,6^*$	$0,02 \pm 0,001$
GO + SP100	$0,08 \pm 0,005$	$11,8 \pm 0,8^*$	$0,02 \pm 0,001$
GO + DP	$0,07 \pm 0,005^{#\$}$	$15,2 \pm 1,5^{#\$}$	$0,01 \pm 0,001^{#@\$}$

ANOVA one way seguido do pós teste de Tukey. $^*p < 0,05$ (GCS vs GOS); $^{\#}p < 0,05$ (GOS vs GO + DP); $^@p < 0,05$ (GO + SP25 vs GO + DP); $^{\$}p < 0,05$ (GO + SP50 vs GO + DP), (n = 6). GCS = grupo controle salina; GOS = grupo obeso salina; GO + SP25, GO + SP50 e GO + SP100 = grupos obesos suplementados com *S. platensis* 25, 50 e 100 mg/kg, respectivamente; GO + DP = grupo obeso alimentado com dieta padrão.

Fonte: Ferreira, 2017.

5.3. Efeito da obesidade e da suplementação com *S. platensis* sobre os parâmetros da obesidade experimental

5.3.1 Parâmetros murinométricos

O GOS apresentou o comprimento naso-anal superior ao grupo GCS. Em relação aos grupos suplementados com *S. platensis* e o GO + DP, o GO + SP25 apresentou seus valores superiores ao GOS e ao GO + DP (Tabela 6).

Não foi observado diferenças quanto ao índice de Lee e o IMC em nenhum dos grupos experimentais (Tabela 6).

Tabela 6 – Valores de índice de Lee dos grupos GCS, GOS, GO + SP25, GO + SP50, GO + SP100 e GO + DP.

Grupos	Comprimento naso-anal (cm)	Índice de Lee (g/cm)	IMC (g/cm ²)
GCS	23 ± 0,2	0,3 ± 0,003	0,65 ± 0,02
GOS	24,5 ± 0,5*	0,3 ± 0,003	0,67 ± 0,02
GO + SP25	26,2 ± 0,3 [#]	0,2 ± 0,004	0,65 ± 0,02
GO + SP50	25,7 ± 0,2	0,2 ± 0,04	0,59 ± 0,02
GO + SP100	24,7 ± 0,2 [@]	0,3 ± 0,005	0,68 ± 0,04
GO + DP	25 ± 0,2	0,2 ± 0,003	0,60 ± 0,03

ANOVA *one way* seguido do pós teste de Tukey. * $p < 0,05$ (GCS vs GOS); [#] $p < 0,05$ (GOS vs GO + SP25); [@] $p < 0,05$ (GO + SP25 vs GO + SP100), (n = 6). GCS = grupo controle salina; GOS = grupo obeso salina; GO + SP25, GO + SP50 e GO + SP100 = grupos obesos suplementados com *S. platensis* 25, 50 e 100 mg/kg, respectivamente; GO + DP = grupo obeso alimentado com dieta padrão.

Fonte: Ferreira, 2017.

5.2.2 Massas dos tecidos adiposos e índice de adiposidade

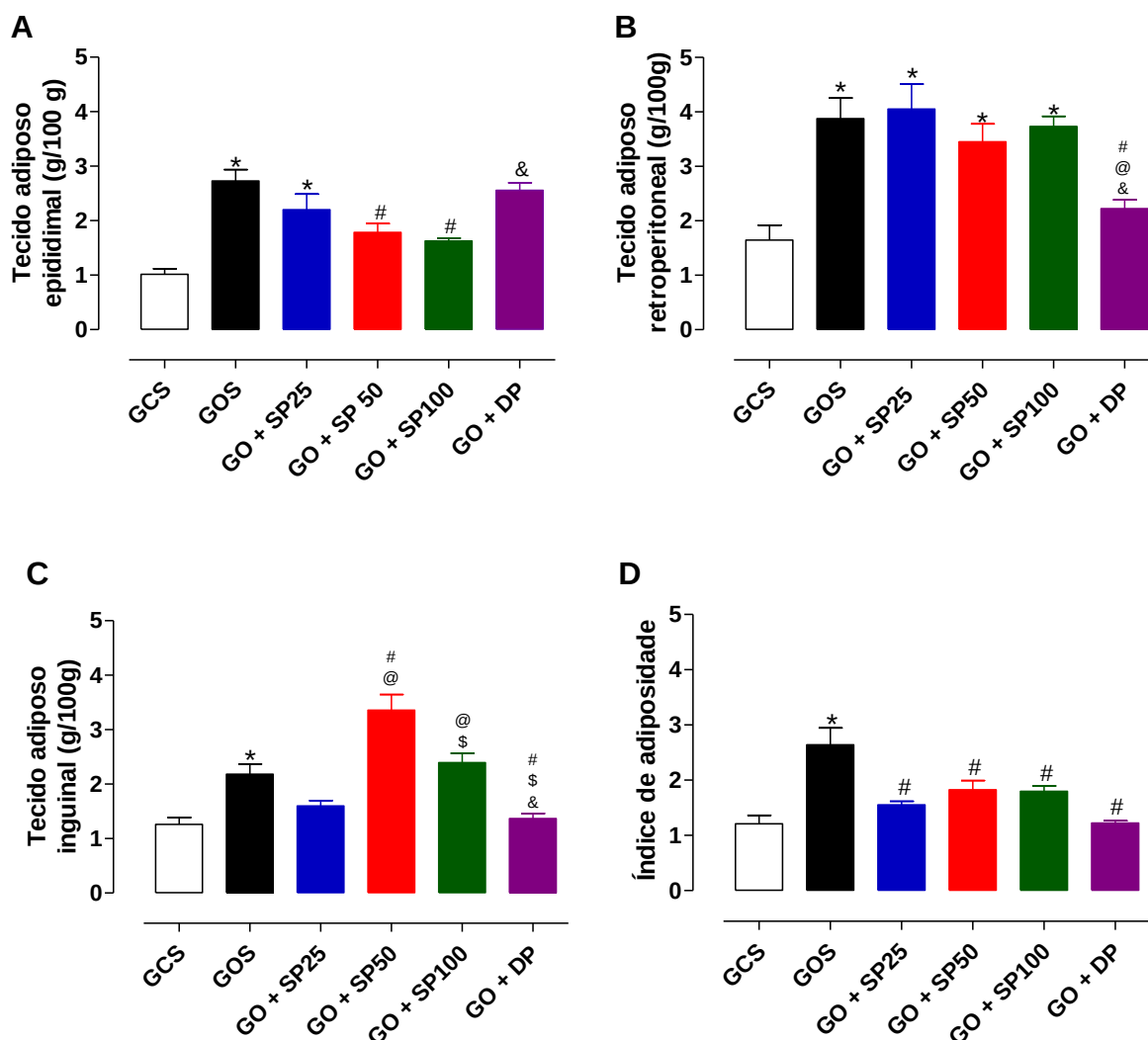
A massa do tecido adiposo epididimal do grupo GOS ($2,7 \pm 0,2$ g/100 g) foi superior ao grupo GCS ($1,0 \pm 0,1$ g/100 g). Entre os grupos que receberam a suplementação com *S. platensis* e a dieta padrão, apenas os grupos GO + SP50 ($1,8 \pm 0,1$ g/100 g) e o GO + SP100 ($2,6 \pm 0,1$ g/100 g) apresentaram reserva adiposa epididimal inferior ao GOS, enquanto que, os grupos GO + SP25 ($2,2 \pm 0,2$ g/100 g) e GO + DP ($1,6 \pm 0,1$ g/100 g) não diferiram do grupo GOS. Em relação ao GCS, apenas os grupos GO + SP50 e GO + SP100 não apresentaram diferença (Gráfico 2A).

Em relação ao tecido adiposo retroperitoneal, o grupo GOS ($3,9 \pm 0,4$ g/100 g) apresentou massa superior ao grupo GCS ($1,6 \pm 0,3$ g/100 g), sem diferir dos grupos GO + SP 25 ($4,0 \pm 0,4$ g/100 g), GO + SP50 ($3,4 \pm 0,3$ g/100 g) e GO + SP100 ($3,7 \pm 0,2$ g/100 g). Entretanto, o grupo GO + DP ($2,2 \pm 0,1$ g/100 g) apresentou a reserva adiposa inferior ao grupo GOS (Gráfico 2B).

O grupo GOS ($2,2 \pm 0,2$ g/100 g) apresentou tecido adiposo inguinal superior ao grupo GCS ($1,3 \pm 0,1$ g/100 g). O tecido adiposo inguinal se apresentou superior no grupo GO + SP50 ($3,4 \pm 0,3$ g/100 g) e inferior no grupo GO + DP ($1,4 \pm 0,1$ g/100 g) em relação ao grupo GOS, enquanto os grupos GO + SP25 ($1,6 \pm 0,1$ g/100 g) e ao GO + SP100 ($2,4 \pm 0,2$ g/100 g) não diferiram do grupo GOS (Gráfico 2C).

O grupo GOS ($2,6 \pm 0,3$) apresentou um índice de adiposidade superior aos grupos GCS ($1,2 \pm 0,2$), GO + SP25 ($1,6 \pm 0,1$), GO + SP50 ($1,8 \pm 0,2$), GO + SP100 ($1,8 \pm 0,1$) e GO + DP ($1,2 \pm 0,1$), e estes grupos, por sua vez, não apresentaram diferença em relação ao grupo GCS (Gráfico 2D).

Gráfico 2 – Massa dos tecidos adiposos epididimal (A), retroperitoneal (B) e inguinal (C) e índice de adiposidade (D) para os GCS, GOS, GO + SP25, GO + SP50, GO + SP100 e GO + DP.



As colunas e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente, (n = 5). ANOVA *one-way* seguido do pós-teste de Tukey. * $p < 0,05$ (GCS vs. GOS); # $p < 0,05$ (GOS vs. GO + SP25, GO + SP50, GO + SP100 e GO + DP); @ $p < 0,05$ (GO + SP25 vs. GO + SP50, GO + SP100 e GO + DP); \$ $p < 0,05$ (GO + SP50 vs. GO + SP100 e GO + DP) e & $p < 0,05$ (GO + SP100 vs. GO + DP). GCS = grupo controle salina; GOS = grupo obeso salina; GO + SP25, GO + SP50 e GO + SP100 = grupos obesos suplementados com *S. platensis* 25, 50 e 100 mg/kg, respectivamente; GO + DP = grupo obeso alimentado com dieta padrão.

Fonte: Ferreira, 2017.

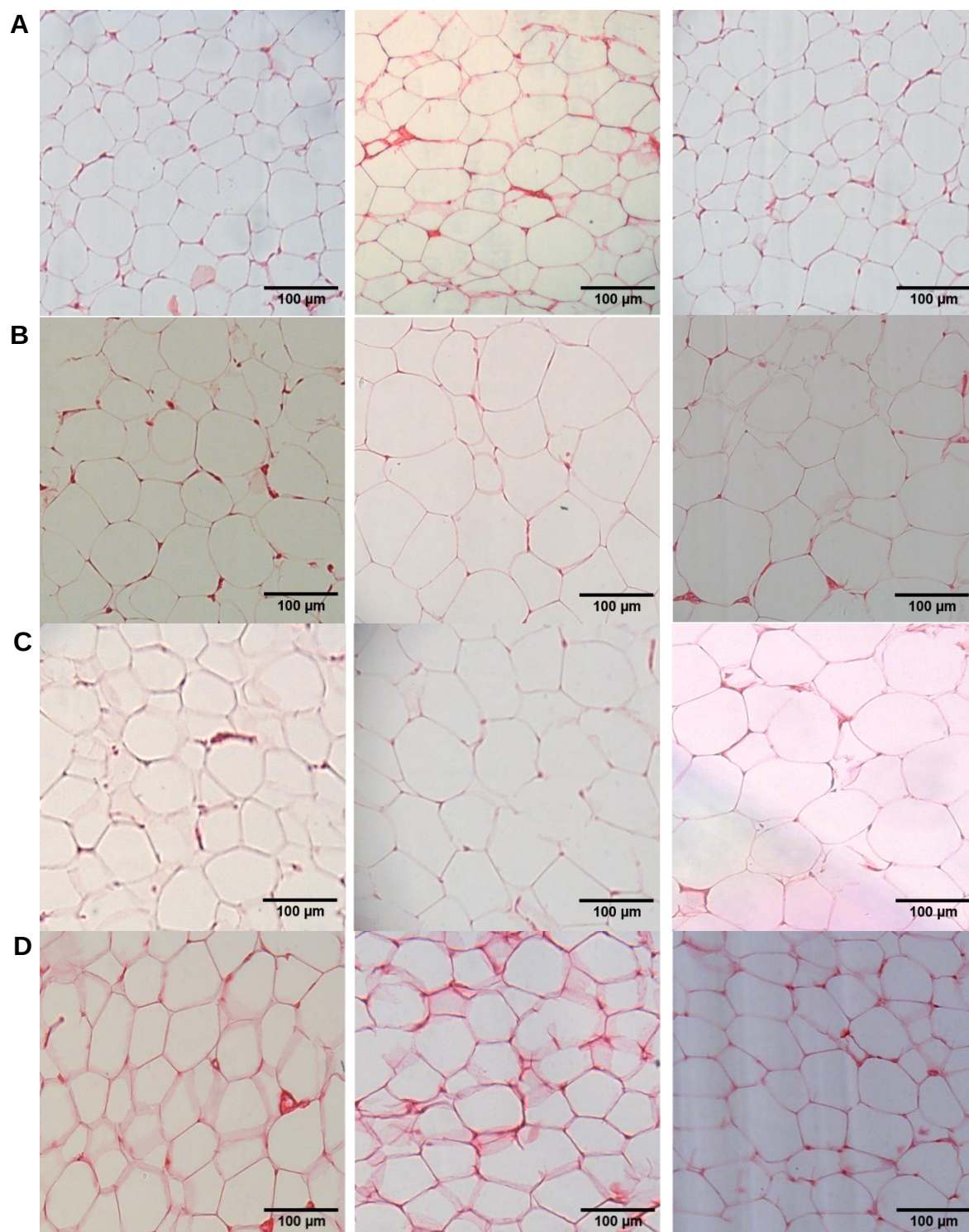
5.3 Efeito da obesidade e da suplementação alimentar com *S. platensis* sobre a morfometria do tecido adiposo

No tecido adiposo epididimal, o diâmetro dos adipócitos do grupo GOS ($91,3 \pm 4,1 \mu\text{m}$) foi superior ao grupo GCS ($66,5 \pm 1,3 \mu\text{m}$). Os grupos GO + SP100 ($71,4 \pm 4,1 \mu\text{m}$) e GO + DP ($55,6 \pm 4,1 \mu\text{m}$) apresentaram seus respectivos diâmetros, inferiores ao grupo GOS, não diferindo do grupo GCS, enquanto os grupos GO + SP25 e GO + SP50 ($91,3 \pm 4,1$, $89,5 \pm 1,1$ e $87,9 \pm 2,2 \mu\text{m}$, respectivamente) apresentaram diâmetros superiores ao grupo GCS, sem diferenciar do grupo GOS (Figura 7 e Gráfico 3A).

No tecido adiposo retroperitoneal, o grupo GOS ($95,8 \pm 1,0 \mu\text{m}$) apresentou o diâmetro dos adipócitos superior ao grupo GCS ($72,02 \pm 4,6 \mu\text{m}$), sem diferenciar do grupo GO + SP25 ($98,4 \pm 2,6 \mu\text{m}$). Já os grupos GO + SP50 ($75,1 \pm 4,1 \mu\text{m}$), GO + SP100 ($62,6 \pm 1,4 \mu\text{m}$) e GO + DP ($46,1 \pm 1,0 \mu\text{m}$), apresentaram adipócitos com diâmetro inferior aos adipócitos do grupo GOS, sem apresentar diferença em relação ao grupo GCS, exceto o grupo GO + DP, que apresentou suas células adiposas com diâmetro inferior ao GCS (Figura 7 e Gráfico 3B).

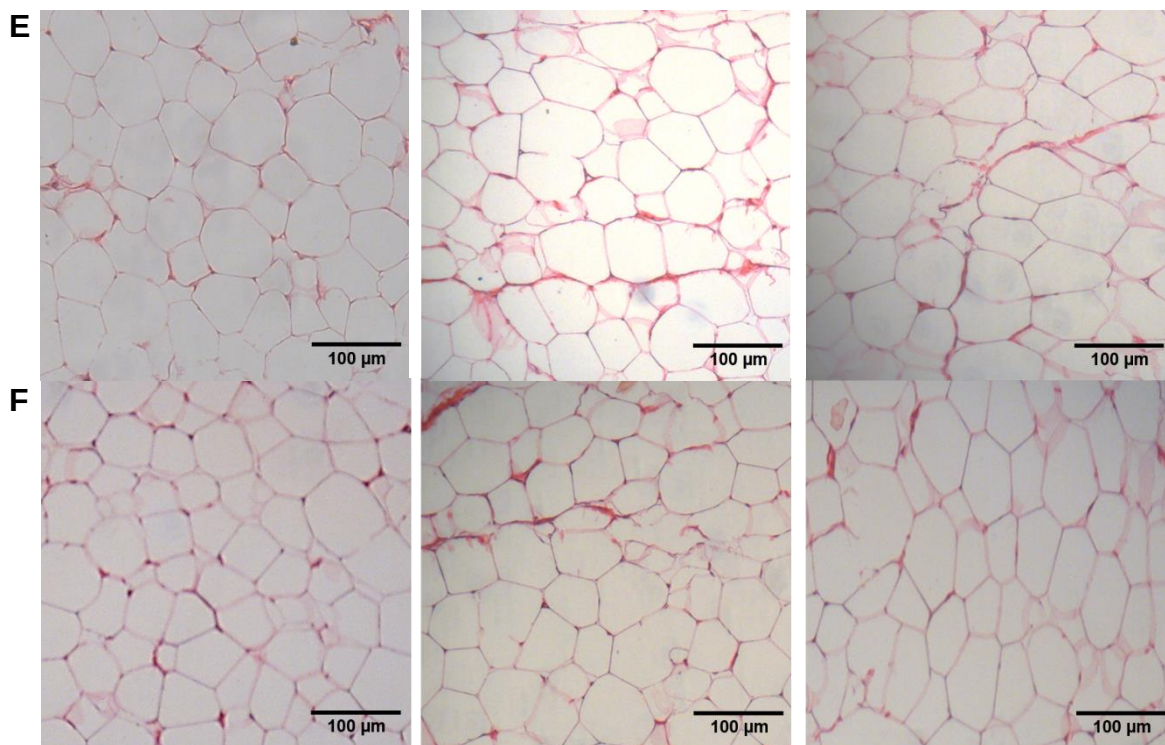
As células adiposas do grupo GOS ($94 \pm 2,2 \mu\text{m}$) apresentaram-se com diâmetro superior ao grupo GCS ($72,0 \pm 4,7 \mu\text{m}$), no tecido adiposo inguinal. Os grupos GO + SP50, GO + SP100 e GO + DP ($69,1 \pm 4,2$, $62,6 \pm 1,4$ e $55,1 \pm 2,7 \mu\text{m}$, respectivamente), apresentaram diâmetro dos adipócitos inferior ao grupo GOS, enquanto os adipócitos do grupo GO + SP25 ($85,5 \pm 4,1 \mu\text{m}$) não apresentaram diferença em relação ao grupo GOS (Figura 7 e Gráfico 3C).

Figura 7 – Microfotografia dos adipócitos epididimal, retroperitoneal e inguinal dos ratos dos grupos GCS (A), GOS (B), GO + SP25 (C), GO + SP50 (D), GO + SP100 (E) e GO + DP (F).



(Continua)

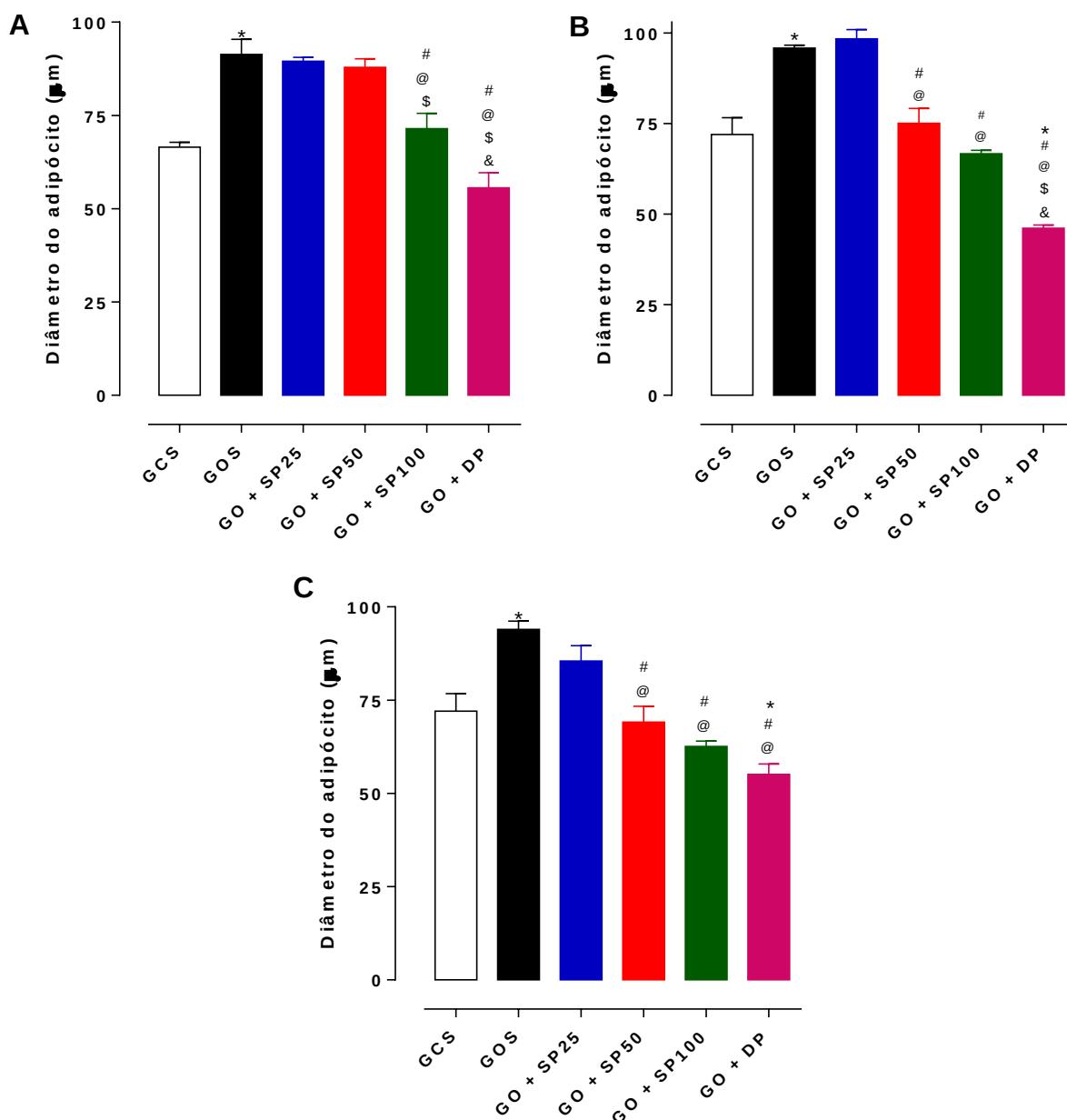
(Continuação)



Aumento na objetiva de 20x, (n = 5). GCS = grupo controle salina; GOS = grupo obeso salina; GO + SP25, GO + SP50 e GO + SP100 = grupos obesos suplementados com *S. platensis* 25, 50 e 100 mg/kg, respectivamente; GO + DP = grupo obeso alimentado com dieta padrão.

Fonte: Ferreira, 2017.

Gráfico 3 – Diâmetro dos adipócitos dos tecidos adiposos epididimal (A), retroperitoneal (B) e inguinal (C) dos GCS, GOS, GO + SP25, GO + SP50, GO + SP100 e GO + DP.



As colunas e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente, (n = 5). ANOVA *one-way* seguido do pós-teste de Tukey. * $p < 0,05$ (GCS vs. GOS e GO + DP); # $p < 0,05$ (GOS vs. GO + SP50, GO + SP100 e GO + DP); @ $p < 0,05$ (GO + SP25 vs. GO + SP50, GO + SP100 e GO + DP); \$ $p < 0,05$ (GO + SP50 vs. GO + SP100 e GO + DP) e & $p < 0,05$ (GO + SP100 vs. GO + DP). GCS = grupo controle salina; GOS = grupo obeso salina; GO + SP25, GO + SP50 e GO + SP100 = grupos obesos suplementados com *S. platensis* 25, 50 e 100 mg/kg, respectivamente; GO + DP = grupo obeso alimentado com dieta padrão.

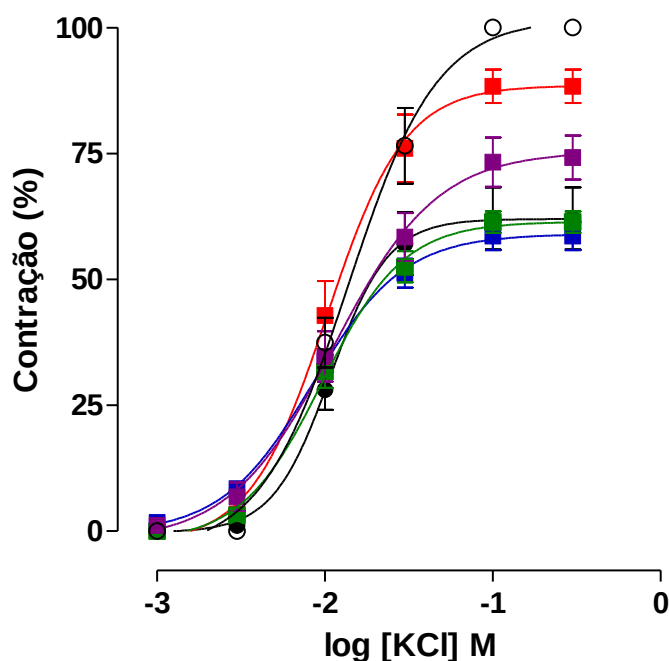
Fonte: Ferreira, 2017.

5.4 Efeito da obesidade e da suplementação com *Spirulina platensis* sobre a reatividade contrátil de íleo de rato obeso

5.4.1 Efeito da obesidade e da suplementação com *Spirulina platensis* sobre as contrações cumulativas induzidas por KCl

As curvas concentrações-respostas cumulativas ao KCl foram atenuadas, conforme o valor de E_{max} , que foi reduzido de 100% (GCS) para $62,1 \pm 6,1\%$ no grupo GOS. As curvas obtidas para o grupo GOS, não apresentaram potencialização nos grupos GO + SP25 ($58,6 \pm 2,8\%$) e GO + DP ($74,2 \pm 4,4\%$), entretanto, para o grupo GO + SP50 ($88,3 \pm 3,3\%$), estas curvas foram potencializadas. Além disso, não foram observadas diferenças quanto à potência contrátil, conforme os valores de pD_2 dos grupos GOS ($1,9 \pm 0,02\%$), GO + SP25 ($2,0 \pm 0,07\%$), GO + SP50 ($1,9 \pm 0,07\%$), GO + SP100 ($2,0 \pm 0,04\%$) e GO + DP ($1,9 \pm 0,07\%$), quando comparados com o grupo GCS ($1,8 \pm 0,07\%$) (Gráfico 4 e Tabela 7).

Gráfico 4 – Curvas concentrações-resposta cumulativas ao KCl dos GCS (○), GOS (●), GO + SP25 (■), GO + SP50 (■), GO + SP100 (■) e GO + DP (■) em íleo isolado de rato.



Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente (n = 5). GCS = grupo controle salina; GOS = grupo obeso salina; GO + SP25, GO + SP50 e GO + SP100 = grupos obesos suplementados com *S. platensis* 25, 50 e 100 mg/kg, respectivamente; GO + DP = grupo obeso alimentado com dieta padrão.

Fonte: Ferreira, 2017.

Tabela 7 – Valores de E_{max} e de PD_2 do KCl nos grupos dos GCS, GOS, GO + SP25, GO + SP50, GO + SP100 e GO + DP em íleo isolado de rato.

Grupos	E_{max} (%)	PD_2
GCS	100	$1,8 \pm 0,07$
GOS	$62,1 \pm 6,1^*$	$1,9 \pm 0,02$
GO + SP25	$58,6 \pm 2,8$	$2,0 \pm 0,07$
GO + SP50	$88,3 \pm 3,3^{#@}$	$1,9 \pm 0,07$
GO + SP100	$61,4 \pm 2,1^{\$}$	$2,0 \pm 0,04$
GO + DP	$74,2 \pm 4,4$	$1,9 \pm 0,07$

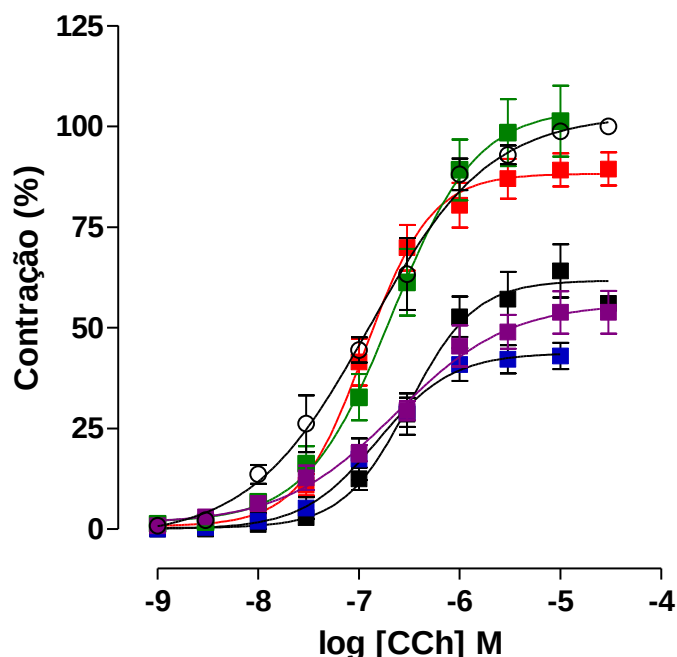
ANOVA one-way seguido do pós-teste de Tukey. * $p < 0,05$ (GCS vs. GOS, GO + SP25 e GO + DP); # $p < 0,05$ (GOS vs. GO + SP50); @ $p < 0,05$ (GO + SP25 vs. GO + SP50); \$ $p < 0,05$ (GO + SP50 vs GO + SP100) (n = 5). GCS = grupo controle salina; GOS = grupo obeso salina; GO + SP25, GO + SP50 e GO + SP100 = grupos obesos suplementados com *S. platensis* 25, 50 e 100 mg/kg, respectivamente; GO + DP = grupo obeso alimentado com dieta padrão.

Fonte: Ferreira, 2017.

5.4.2 Efeito da obesidade e da suplementação com *Spirulina platensis* sobre as contrações cumulativas induzidas por CCh

As curvas concentrações-respostas cumulativas ao CCh foram atenuadas, conforme os valores de E_{max} , que foi reduzido de 100% (GCS) para $60,0 \pm 6,4\%$ no grupo GOS. As curvas obtidas para o grupo GOS, não apresentaram potencialização nos grupos GO + SP25 ($43,0 \pm 3,2\%$) e GO + DP e ($54,1 \pm 4,12\%$), entretanto, em relação aos GO + SP50 ($86,8 \pm 5,4\%$) e GO + SP100 ($102,9 \pm 9,3\%$), essas curvas foram potencializadas. Além disso, não foram observadas diferenças quanto à potência contrátil, conforme os valores de pD_2 dos grupos GOS, GO + SP25, GO + SP50, e GO + DP ($6,5 \pm 0,1$; $6,8 \pm 0,1$; $6,9 \pm 0,06$; e $6,7 \pm 0,06$), em relação ao grupo GCS ($6,9 \pm 0,1$) (Gráfico 5 e Tabela 8).

Gráfico 5 – Curvas concentrações-resposta cumulativas ao CCh dos GCS (○), GOS (●), GO + SP25 (■), GO + SP50 (■), GO + SP100 (■) e GO + DP (■) em íleo isolado de rato.



Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente (n = 5). GCS = grupo controle salina; GOS = grupo obeso salina; GO + SP25, GO + SP50 e GO + SP100 = grupos obesos suplementados com *S. platensis* 25, 50 e 100 mg/kg, respectivamente; GO + DP = grupo obeso alimentado com dieta padrão.

Fonte: Ferreira, 2017.

Tabela 8 – Valores de E_{max} e de PD_2 do CCh nos grupos dos grupos GCS, GOS, GO + SP25, GO + SP50, GO + SP100 e GO + DP em íleo isolado de rato.

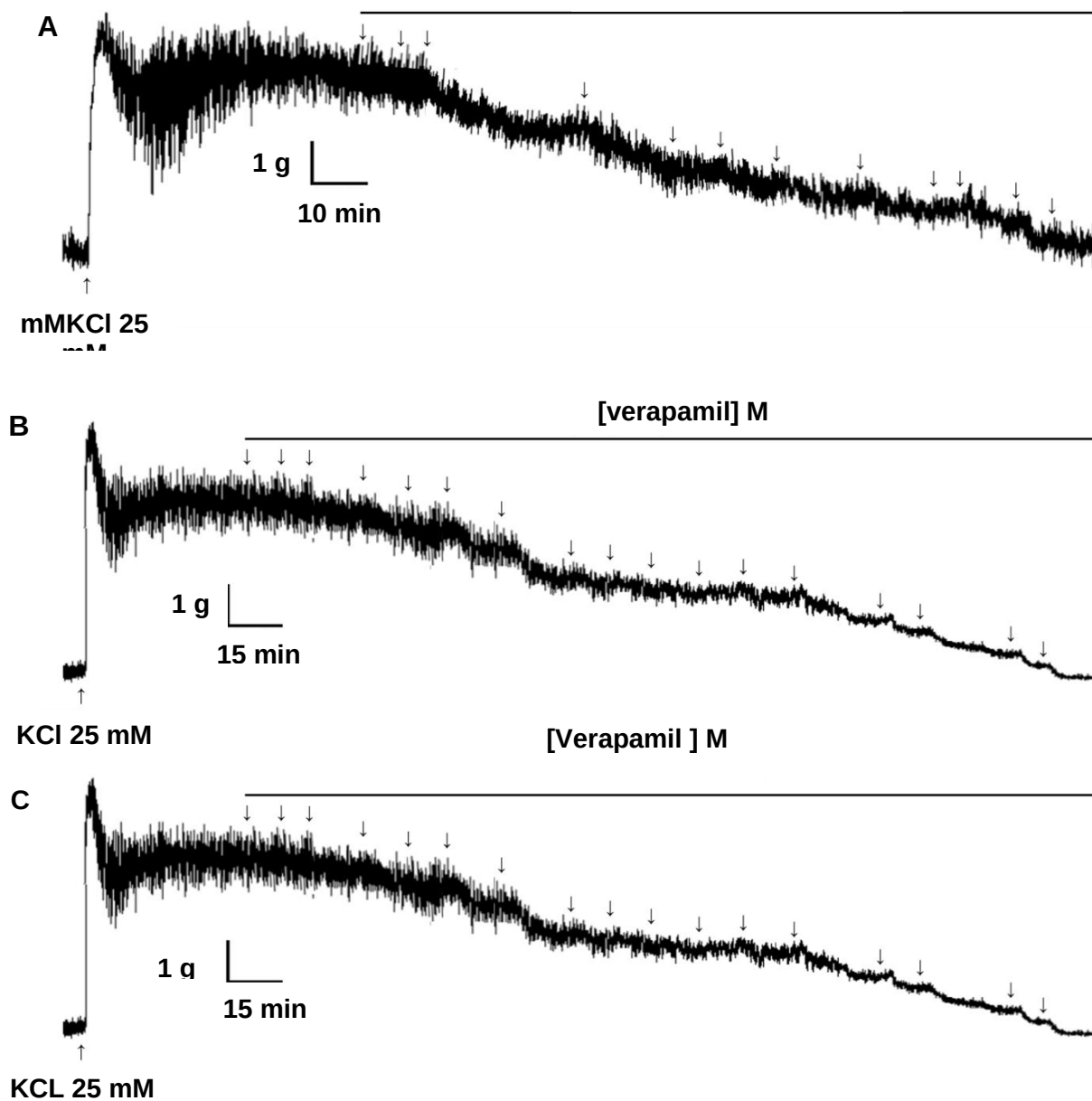
Grupos	E_{max} (%)	PD_2
GCS	100	$6,9 \pm 0,1$
GOS	$60,0 \pm 6,4^*$	$6,5 \pm 0,1$
GO + SP25	$43,0 \pm 3,2$	$6,8 \pm 0,1$
GO + SP50	$86,8 \pm 5,4^{#@}$	$6,9 \pm 0,06$
GO + SP100	$102,9 \pm 9,3^{#@}$	$6,7 \pm 0,1$
GO + DP	$54,1 \pm 4,1^{\$&}$	$6,7 \pm 0,06$

ANOVA *one-way* seguido do pós-teste de Tukey. * $p < 0,05$ (GCS vs. GOS, GO + SP25 e GO + DP); # $p < 0,05$ (GOS vs. GO + SP50, GO + SP100), @ $p < 0,05$ (GO + SP25 vs. GO + SP50, GO + SP100) \$ $p < 0,05$ (GO + SP50 vs. GO + DP); & $p < 0,05$ (GO + SP100 vs. GO + DP) (n = 5). GCS = grupo controle salina; GOS = grupo obeso salina; GO + SP25 e GO + SP50 = grupos obesos suplementados com *S. platensis* 25, 50 e 100 mg/kg, respectivamente; GO + DP = grupo obeso alimentado com dieta padrão.

5.4.3 Efeito da obesidade e da suplementação com *Spirulina platensis* sobre a reatividade relaxante do verapamil

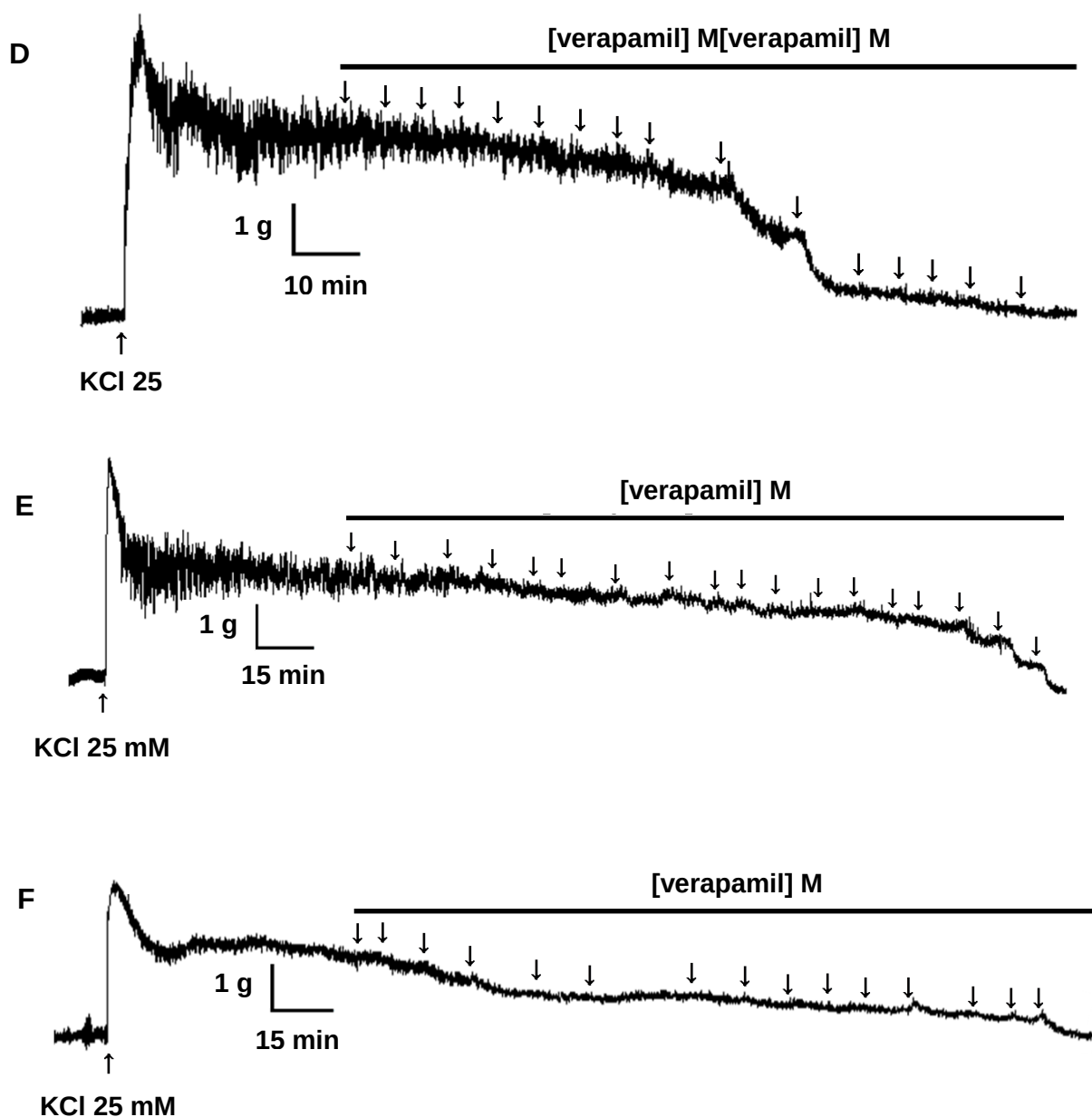
As curvas concentrações-resposta cumulativas ao verapamil não apresentaram diferença estatística quanto aos valores de $E_{\max}$ nos grupos GOS (100%), GO + SP50 ($100,7 \pm 0,7$), GO + SP100 ($106,7 \pm 2,3$) e GO + DP ($102,9 \pm 1,7$), em relação ao GCS ($101,2 \pm 0,5$). Quanto à potência contrátil, as curvas do grupo GOS ($11,6 \pm 0,6$) foram desviadas para a direita, em relação ao grupo GCS ($13,7 \pm 0,2$), conforme os valores de pD_2 . Quanto aos grupos GO + SP25, GO + SP50 ($11,7 \pm 0,2$), GO + SP100 ($9,0 \pm 0,2$) e GO + DP ($12,4 \pm 0,1$), apenas o grupo que recebeu a dose de 100 mg/kg apresentou as curvas concentrações-resposta desviadas para a direita, em relação ao grupo GOS ($11,6 \pm 0,6$), conforme os valores de pD_2 (Figura 8, Gráfico 6 e Tabela 9).

Figura 8 – Registros representativos do efeito relaxante do verapamil em íleo isolado de rato pré-contráido por 25 mM de KCl dos GCS (A), GOS (B), GO + SP25, (C) GO + SP50 (C), GO + SP100 (D) e GO + DP (E).



(Continua)

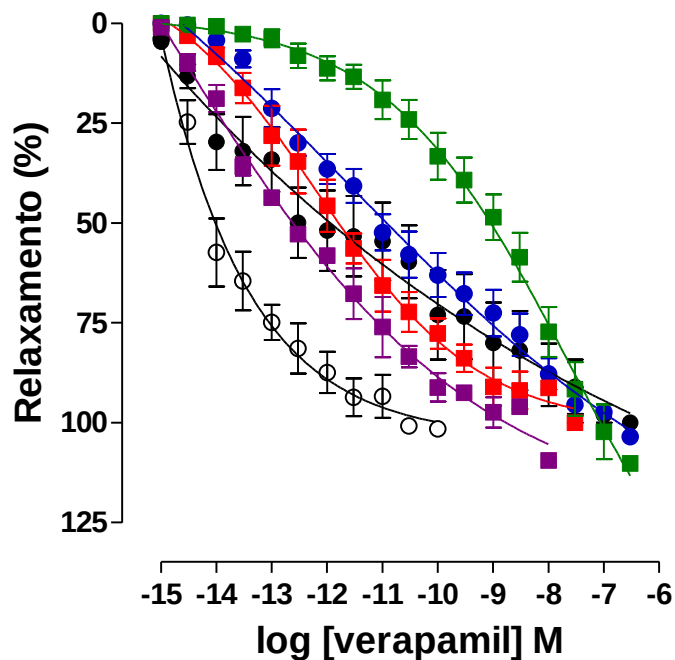
(Continuação)



As setas para baixo representam a adição cumulativa de verapamil nas concentrações de 10^{-15} , 3×10^{-15} , 10^{-14} , 3×10^{-14} , 10^{-13} , 3×10^{-13} , 10^{-12} , 3×10^{-12} , 10^{-11} , 3×10^{-11} , 10^{-10} , 3×10^{-10} (A); 10^{-15} , 3×10^{-15} , 10^{-14} , 3×10^{-14} , 10^{-13} , 3×10^{-13} , 10^{-12} , 3×10^{-12} , 10^{-11} , 3×10^{-11} , 10^{-10} , 3×10^{-10} , 10^{-9} , 3×10^{-9} , 10^{-8} , 3×10^{-8} , 10^{-7} (B); 10^{-15} , 3×10^{-15} , 10^{-14} , 3×10^{-14} , 10^{-13} , 3×10^{-13} , 10^{-12} , 3×10^{-12} , 10^{-11} , 3×10^{-11} , 10^{-10} , 3×10^{-10} , 10^{-9} , 3×10^{-9} , 10^{-8} , 3×10^{-8} (C); 10^{-15} , 3×10^{-15} , 10^{-14} , 3×10^{-14} , 10^{-13} , 3×10^{-13} , 10^{-12} , 3×10^{-12} , 10^{-11} , 3×10^{-11} , 10^{-10} , 3×10^{-10} , 10^{-9} , 3×10^{-9} , 10^{-8} , 3×10^{-8} , 10^{-7} , 3×10^{-7} (D) e 10^{-15} , 3×10^{-15} , 10^{-14} , 3×10^{-14} , 10^{-13} , 3×10^{-13} , 10^{-12} , 3×10^{-12} , 10^{-11} , 3×10^{-11} , 10^{-10} , 3×10^{-10} , 10^{-9} , 3×10^{-9} , 10^{-8} (E) M. KCl = cloreto de potássio; GCS = grupo controle salina; GOS = grupo obeso salina; GO + SP25; GO + SP50 e GO + SP100 = grupos obesos suplementados com *S. platensis* 50 e 100 mg/kg, respectivamente; GO + DP = grupo obeso alimentado com dieta padrão.

Fonte: Ferreira, 2017.

Gráfico 6 – Curvas concentrações-resposta cumulativas ao verapamil dos GCS (○), GOS (●), GO + SP25 (■), GO + SP50 (■), GO + SP100 (■) e GO + DP (■) em íleo isolado de rato pré-contraído com KCl.



AQ

Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente (n = 5). GCS = grupo controle salina; GOS = grupo obeso salina; GO + SP25, GO + SP50 e GO + SP100 = grupos obesos suplementados com *S. platensis* 25, 50 e 100 mg/kg, respectivamente; GO + DP = grupo obeso alimentado com dieta padrão.

Fonte: Ferreira, 2017.

Tabela 9 – Valores de $E_{\max}$ e PD_2 do verapamil dos GCS, GOS, GO + SP25, GO + SP50, GO + SP100 e GO + DP em íleo isolado de rato.

Grupos	$E_{\max}$ (%)	PD_2
GC	101,7 ± 0,5	13,7 ± 0,2
GO	100 ± 0,0	11,6 ± 0,6*
GO + SP25	103,9 ± 1,1	10,5 ± 0,2*
GO + SP50	100,7 ± 0,7	11,7 ± 0,2***
GO + SP100	106,7 ± 2,3 [#]	9,0 ± 0,2* [#] @\$
GO + DP	102,9 ± 1,7	12,4 ± 0,1 @&

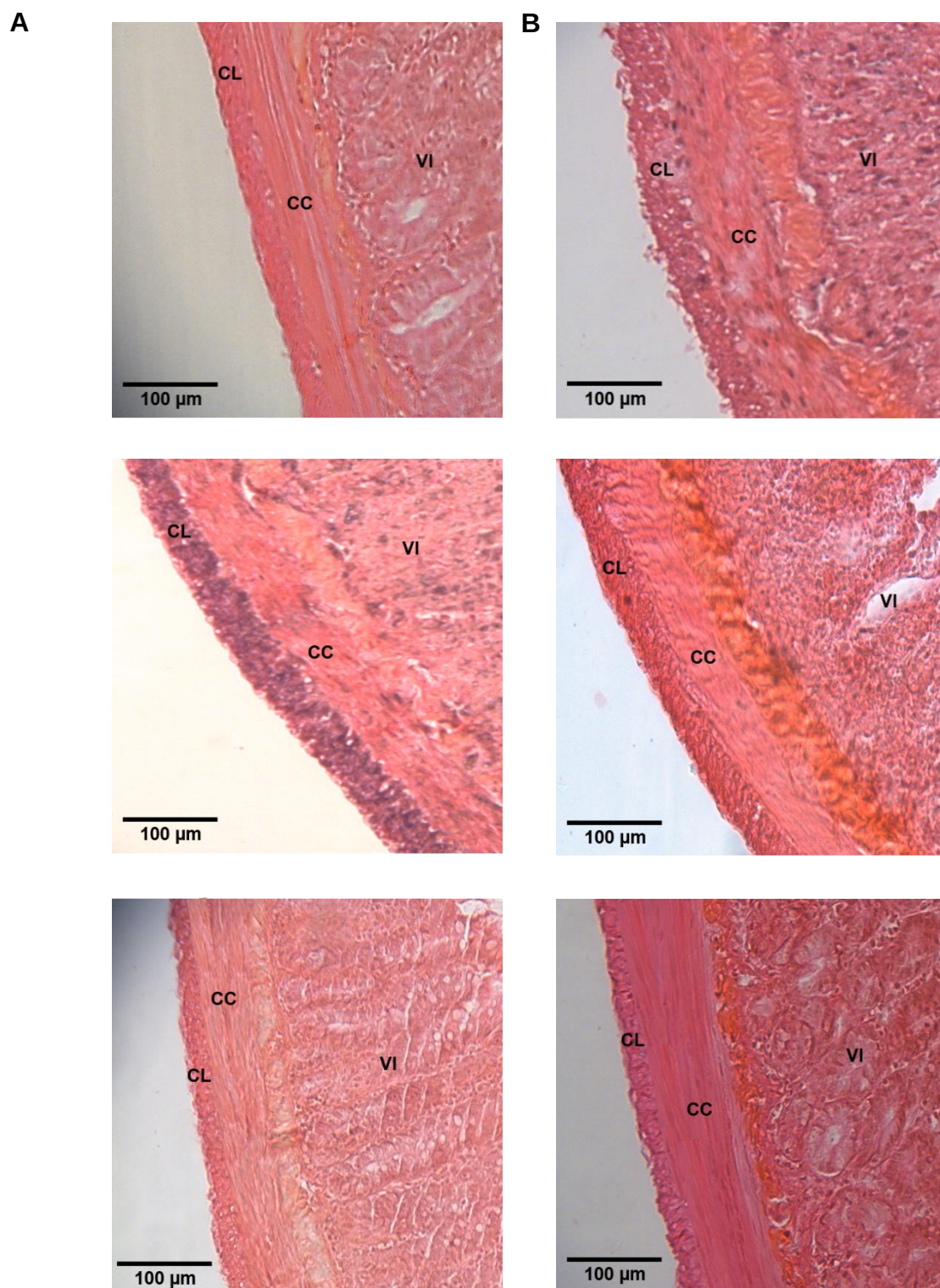
ANOVA *one-way* seguido do pós-teste de Tukey. * $p < 0,05$ (GCS vs. GOS, GO + SP25, GO + SP50, GO + SP100 e GO + DP); [#] $p < 0,05$ (GOS vs. GO + SP100); $p < 0,05$ (GO + SP25 vs. GO + SP100, GO + DP); ^{\$} $p < 0,05$ (GO + SP50 vs. GO + SP100) e ^{\$} $p < 0,05$ (GO + SP100 vs. GO + DP), ($n = 5$).. GCS = grupo controle salina; GOS = grupo obeso salina; GO + SP50 e GO + SP100 = grupos obesos suplementados com *S. platensis* 25, 50 e 100 mg/kg, respectivamente; GO + DP = grupo obeso alimentado com dieta padrão.

Fonte: Ferreira, 2017.

5.5 Efeito da obesidade e da suplementação com *S. platensis* sobre a morfologia do íleo isolado de ratos obesos

A espessura das camadas musculares circular e longitudinal do íleo não apresentou diferença em nenhum dos grupos experimentais (Figura 9 e Gráfico 7).

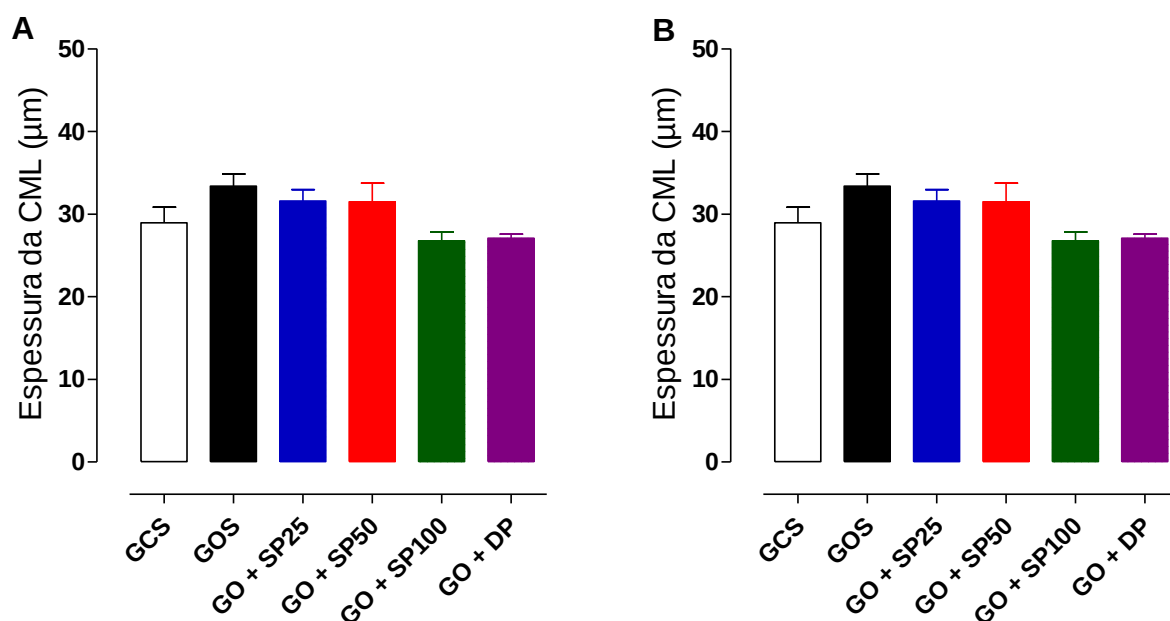
Figura 9 – Microfotografia das camadas musculares dos GCS (A) e GOS (B) em íleo isolado de rato.



Aumento da objetiva: 20x, (n = 5); CL = camada longitudinal; CC = camada circular; VI = vilosidades; GCS = grupo controle salina; GOS = grupo obeso salina; GO + SP25, GO + SP50 e GO + SP100 = grupo obeso suplementado com *S. platensis* nas doses de 25, 50 e 100 mg/kg; GO + DP = grupo obeso alimentado com dieta padrão.

Fonte: Ferreira, 2017

Gráfico 7 – Espessura das camadas musculares circular (A) e longitudinal (B) dos GCS (○), GOS (●), GO + SP50 (■), GO + SP100 (■) e GO + DP (■) em íleo isolado de rato.



As colunas e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente (n = 5). GCS = grupo controle salina; GOS = grupo obeso salina; GO + SP25, GO + SP50 e GO + SP100 = grupos obesos suplementados com *S. platensis* 25, 50 e 100 mg/kg, respectivamente; GO + DP = grupo obeso alimentado com dieta padrão..

Fonte: Ferreira, 2017

5.6 Efeito da obesidade e da suplementação com *S. platensis* sobre o estresse oxidativo

5.6.1 Efeito da obesidade e da suplementação com *Spirulina platensis* sobre a peroxidação lipídica

A concentração de MDA no plasma não foi alterada no GOS ($3,1 \pm 0,3 \mu\text{Mol/g}$) em relação ao GCS ($4,01 \pm 0,2 \mu\text{Mol/g}$), assim como os grupos GO + SP25 ($3,1 \pm 0,3 \mu\text{Mol/g}$), GO + SP50 ($2,9 \pm 0,2 \mu\text{Mol/g}$), GO + SP100 ($2,7 \pm 0,09 \mu\text{Mol/g}$) e GO + DP ($2,9 \pm 0,2 \mu\text{Mol/g}$) não apresentaram diferença em relação ao GOS.

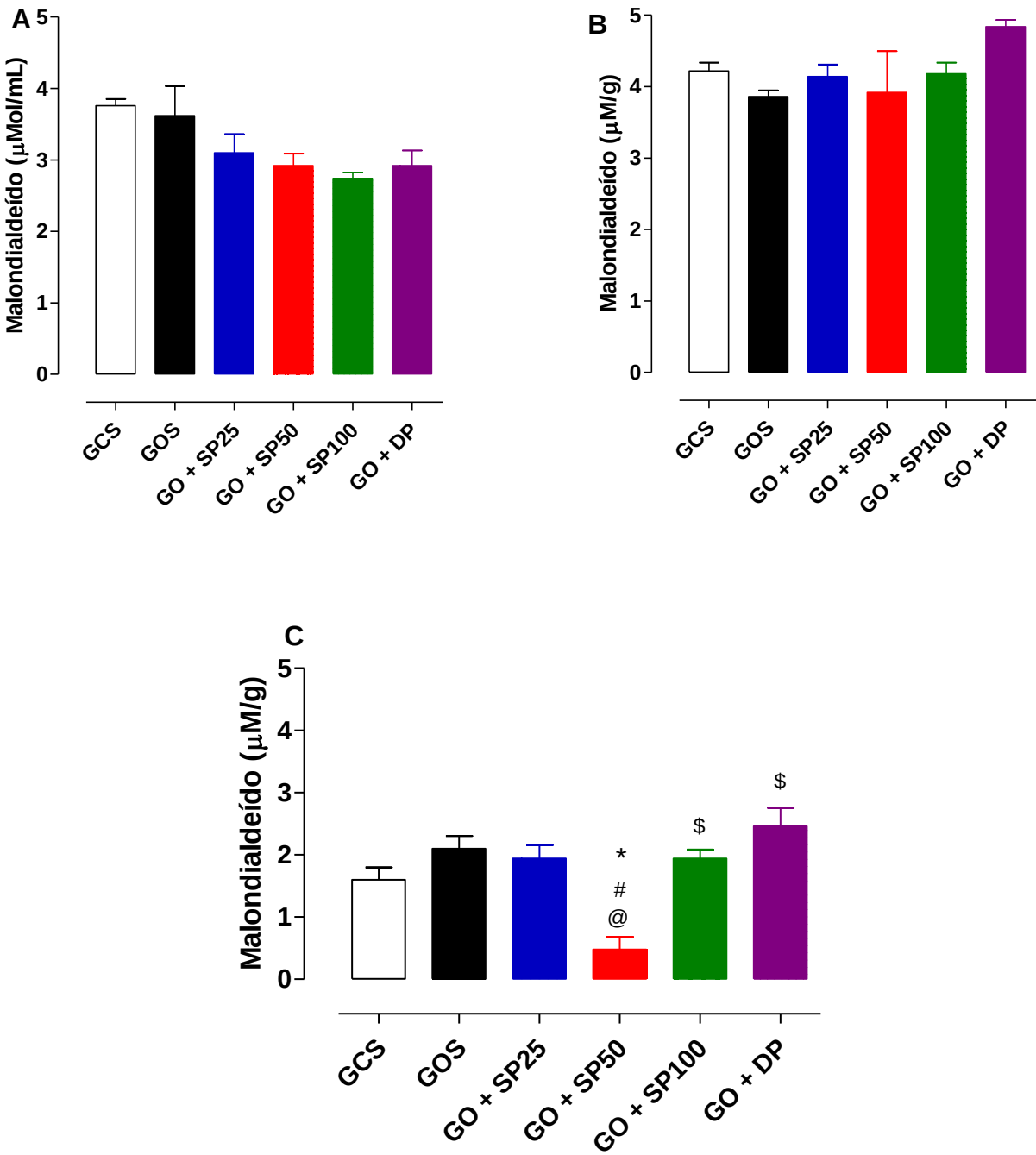
No íleo, a concentração de MDA não foi alterada no GOS ($3,9 \pm 0,09 \mu\text{Mol/g}$) em relação ao GCS ($4,2 \pm 0,1 \mu\text{Mol/g}$). Entre os grupos suplementados com *S. platensis*, GO + SP25 ($4,1 \pm 0,2 \mu\text{Mol/g}$), GO + SP50 ($3,9 \pm 0,6 \mu\text{Mol/g}$) e GO + SP100 ($4,2 \pm 0,1 \mu\text{Mol/g}$) assim como o GO + DP ($5,0 \pm 0,1 \mu\text{Mol/g}$), não foi observado diferença em relação ao GOS.

No tecido adiposo epididimal, o grupo GOS apresentou a concentração de MDA aumentada, de $0,6 \pm 0,9$ para $2,5 \pm 0,4 \mu\text{Mol/g}$. Os grupos GO + SP25 ($1,4 \pm 0,1 \mu\text{Mol/g}$), GO + SP50 ($0,6 \pm 0,1 \mu\text{Mol/g}$), GO + SP100 ($0,7 \pm 0,1 \mu\text{Mol/g}$) e o GO + DP ($1,2 \pm 0,1 \mu\text{Mol/g}$) apresentaram uma diminuição na concentração de MDA em relação ao grupo GOS, sem diferenciar do grupo GCS (Gráfico 8C).

Na reserva adiposa retroperitoneal, o grupo GOS apresentou a concentração de MDA aumentada de $0,6 \pm 0,1$ para $1,4 \pm 0,2 \mu\text{Mol/g}$. Entre os grupos suplementados com *S. platensis* e o GO + DP, apenas o grupo GO + SP50 ($0,6 \pm 0,1 \mu\text{Mol/g}$) mostrou diminuída a concentração de MDA em relação ao GOS, sem diferenciar do GCS. Os grupos GO + SP50 ($0,6 \pm 0,1 \mu\text{Mol/g}$) e GO + SP100 ($0,7 \pm 0,1 \mu\text{Mol/g}$) não mostraram diferença em relação ao grupo GOS (Gráfico 8D).

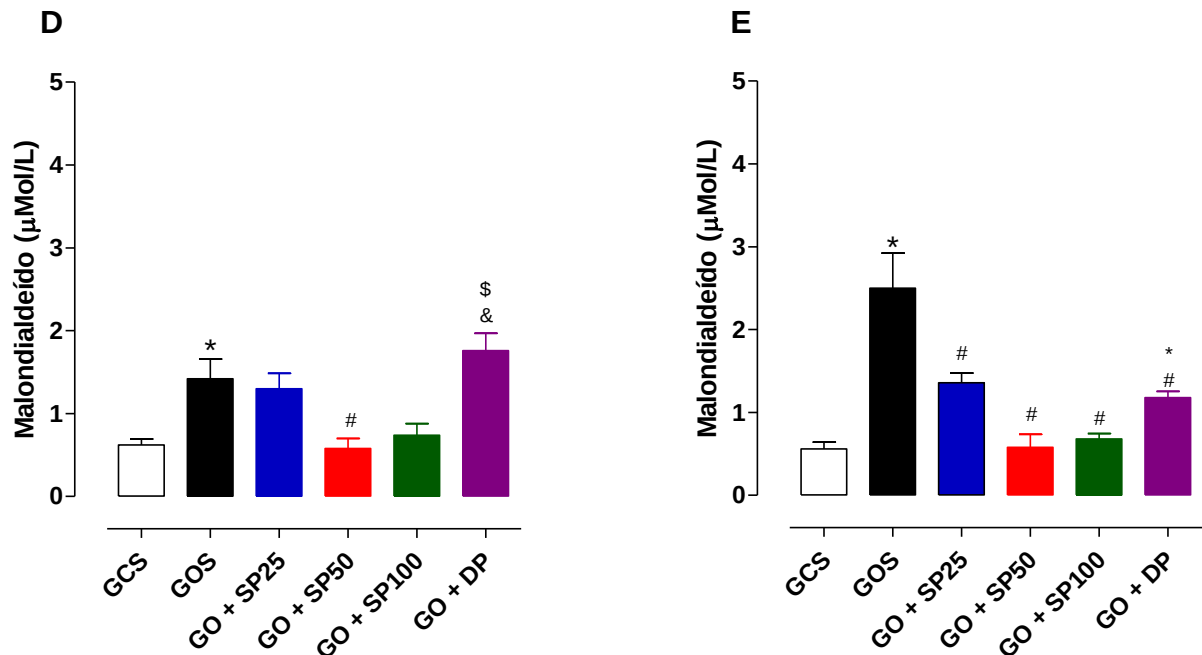
A concentração de MDA no tecido adiposo inguinal não diferiu nos grupos GCS ($1,6 \pm 0,2 \mu\text{Mol/g}$) e GOS ($2,1 \pm 0,2 \mu\text{Mol/g}$). O grupo GO + SP50 ($0,5 \pm 0,2 \mu\text{Mol/g}$), apresentou a concentração de MDA foi inferior a todos os grupos experimentais (Gráfico 8E)

Gráfico 8 – Concentração de MDA em plasma (A), em íleo (B) e em tecidos adiposos inguinal (C), epididimal (D) e retroperitoneal (E) de rato dos GCS, GOS, GO + SP25, GO + SP50, GO + SP100 e GO + DP.



(Continua)

(Continuação)



As colunas e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente ($n = 5$). ANOVA *one-way* seguido do pós-teste de Tukey. * $p < 0,05$ (GCS vs. GOS); # $p < 0,05$ (GOS vs. GO + SP25, GO + SP50, GO + SP100 e GO + DP); \$ $p < 0,05$ (GO + SP50 vs. GO + DP) e & $p < 0,05$ (GO + SP100 vs. GO + DP), ($n = 5$). GCS = grupo controle salina; GOS = grupo obeso salina; GO + SP25 e GO + SP50 = grupos obesos suplementados com *S. platensis* 25 e 50 mg/kg, respectivamente; GO + DP = grupo obeso alimentado com dieta padrão.

Fonte: Ferreira, 2017.

5.6.2 Efeito da obesidade e da suplementação com *Spirulina platensis* sobre a inibição da oxidação (atividade antioxidante)

Os grupos GCS ($0,2 \pm 0,1$), GOS ($0,2 \pm 0,1$), GO + SP25 ($0,2 \pm 0,1$), GO + SP50 ($0,2 \pm 0,1$), GO + SP100 ($0,2 \pm 0,1$) e GO + DP ($0,2 \pm 0,1\%$) não apresentaram diferença no percentual de inibição da oxidação no plasma.

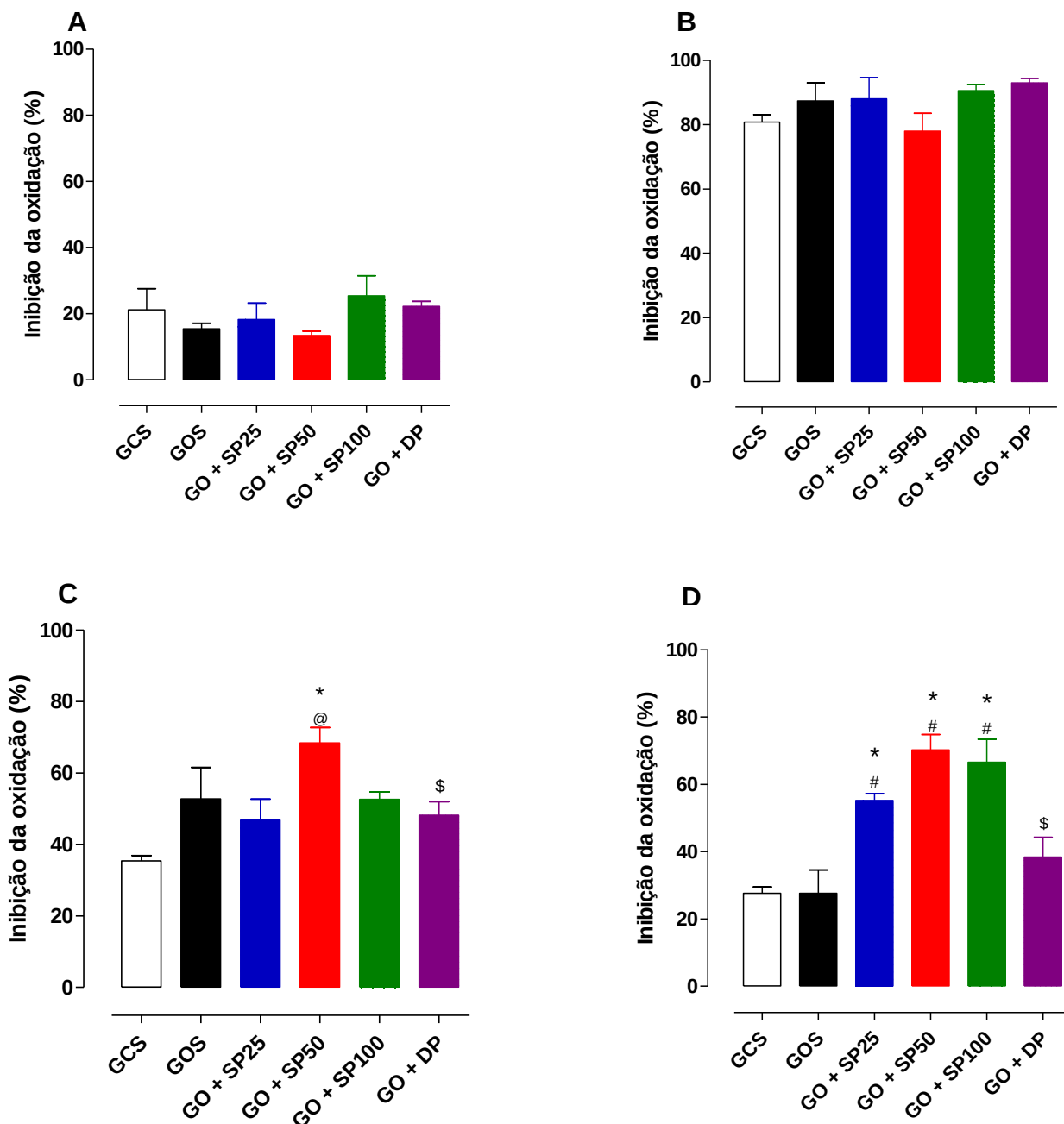
No íleo, não foi observado diferença entre os grupos GCS ($81,0 \pm 2,3$) em relação ao GOS ($86,4 \pm 5,6$). Entre os grupos suplementados com *S. platensis* GO + SP25 ($88,0 \pm 7,0$); GO + SP50 ($78,0 \pm 5,5$), GO + SP100 ($91,0 \pm 2,0$) e o GO + DP ($93,0 \pm 1,4\%$) não foi observado diferença em relação ao GOS (Gráfico 9A, 9B).

No tecido adiposo epididimal, o grupo GOS ($52,7 \pm 8,8 \%$) não apresentou diferença em relação ao GCS ($35,4 \pm 1,5 \%$). Entre os grupos suplementados com *S. platensis*, o GO + SP50 ($68,4 \pm 4,3\%$) apresentou um aumento em relação aos GO + SP25 ($46,8 \pm 5,9$) e GO + DP ($48,2 \pm 3,8\%$) (Gráfico 9C).

No tecido adiposo retroperitoneal, o grupo GOS ($28,0 \pm 7,0\%$) não diferiu do grupo GCS ($28,0 \pm 2,0\%$). Os grupos suplementados com *S. platensis*, GO + SP25 ($55,2 \pm 2,0\%$), GO + SP50 ($70,2 \pm 4,6\%$) e GO + SP100 ($66,6 \pm 6,8\%$) apresentaram um aumento do percentual de inibição da oxidação em relação ao GOS, e o grupo GO + SP50 mostrou elevação neste percentual em relação ao GO + DP ($38,4 \pm 5,8\%$) (Gráfico 9D).

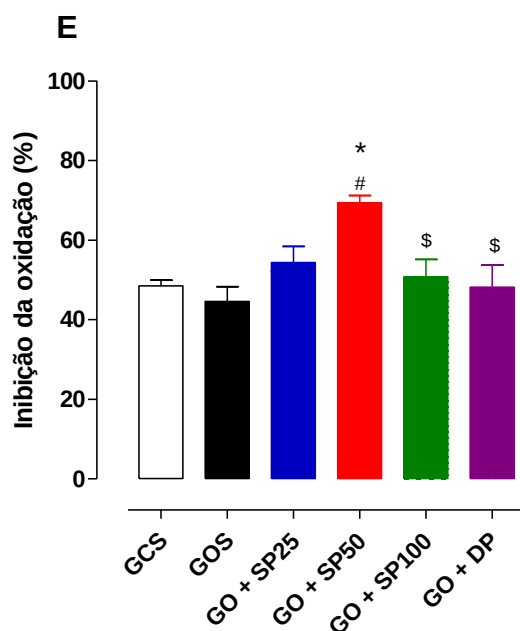
No tecido adiposo inguinal, os grupos GOS ($45,0 \pm 4,0\%$) e GCS ($48,5 \pm 1,4\%$) não apresentaram diferença entre si. Entre os grupos suplementados com *S. platensis*, apenas o GO + SP50 ($69,4 \pm 1,8\%$) apresentou um aumento no percentual de inibição da oxidação em relação ao GOS, GO + SP100 ($50,8 \pm 4,3\%$) e GO + DP ($48,2 \pm 5,5\%$), sem diferenciar do GO + SP25 ($54,4 \pm 4,0\%$) (Gráfico 9E).

Gráfico 9 – Percentual da inibição da oxidação em plasma (A), em íleo (B) e em tecidos adiposos epididimal (C), retroperitoneal (D) e inguinal (E) de rato dos GCS, GOS, GO + SP25, GO + SP50, GO + SP100 e GO + DP.



(Continua)

(Continuação)



As colunas e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente (n = 5). As colunas e barras verticais representam a média e S.E.M., respectivamente (n = 5). ANOVA One-way seguido pelo pós-teste de Tukey. *p<0,05 (GCS vs GO + SP25, GO + SP50 e GO + SP100); #p <0,05 (GOS vs GO + SP25, GO + SP50 e GO + SP100); @p <0,05 (GO + SP25 vs GO + SP50) e \$p <0,05 (GO + SP50 vs GO + SP100). GCS= grupo controle salina; GOS = grupo obeso salina; GO + SP25, GO + SP50 e GO + SP100 = grupos obesos suplementados com *S. platensis* nas doses de 25, 50 e 100 mg/kg, respectivamente; GO + DP = grupo obeso alimentado com uma dieta padrão.

Fonte: Ferreira, 2017.

6 Discussão

No presente trabalho, utilizando um modelo de obesidade experimental induzido por dieta hipercalórica em ratos Wistar, foi observado que a obesidade diminui a reatividade contrátil e relaxante em íleo de rato, e aumenta a peroxidação lipídica no tecido adiposo epididimal e retroperitoneal. Concomitantemente, foi visto que, a suplementação alimentar com *Spirulina platensis* em ratos obesos, nas doses de 50 e 100 mg/kg promoveu efeito antiobesidade, entretanto, apenas a dose de 50 mg/kg de *S. platensis* restaurou a reatividade contrátil intestinal, e no tecido adiposo atenuou a peroxidação lipídica e aumentou a capacidade antioxidante, melhorando o estresse oxidativo nesse tecido. Ademais, foi observado que a mudança de dieta também promove efeito antiobesidade, entretanto não restaura a reatividade contrátil do íleo de ratos Wistar.

A obesidade é considerada um grave problema de saúde pública e é caracterizada pelo excesso de tecido adiposo no organismo, podendo comprometer a saúde do indivíduo devido às comorbidades a ela associadas (NASCIMENTO et al., 2008). Para investigar as alterações causadas por esta doença, e devido às limitações éticas em estudar a susceptibilidade da obesidade em humanos, modelos animais têm sido propostos no intuito de entender melhor a fisiopatologia e estabelecer um tratamento eficaz para a obesidade (PEREIRA; FRANCISCHI; LANCH JR, 2003; NAVES; PASCHOAL, 2007).

A obesidade tem sido induzida nos animais por alguns modelos, como indução de lesões neuronais, anormalidades genéticas, alterações endócrinas e alterações alimentares (SCLAFANI; SPRINGER, 1976). As dietas hipercalóricas e hiperlipídicas são bastante utilizadas para induzir um estado de obesidade experimental, por mimetizar o comportamento nutricional humano bem como os efeitos orgânicos associados à obesidade (BOUSTANY et al., 2005; CARROL; ZENEBE, 2006; DU TOIT; NABEM; LOCHNER, 2005).

Barros e Silva (2015) demonstraram que, uma dieta hipercalórica, composta por ração padrão do tipo Presence[®], chocolate ao leite, amendoim torrado e biscoito maisena, foi capaz de induzir obesidade em ratos Wistar, alimentados durante oito semanas, e Oliveira et al. (2016), mostraram que, em ratos obesos, a reatividade contrátil do íleo foi atenuada frente aos agentes contráteis KCl e CCh.

Brito (2014) avaliou a reatividade relaxante da aorta em função do treinamento de força e da suplementação com *S. platensis* (nas doses de 150 e 500 mg/kg), e demonstrou que ambos, isoladamente, promovem um aumento na

reatividade relaxante à acetilcolina, e uma diminuição da reatividade contrátil frente à fenilefrina em aorta de ratos saudáveis. Além disso, esses tratamentos quando realizados simultaneamente potencializam esses efeitos.

Dessa forma, sabendo que a obesidade induzida com oito semanas, atenua a reatividade contrátil em íleo de rato, e que a *S. platensis* melhora a reatividade de órgãos como aorta, inicialmente foi questionado se a obesidade atenuaria a reatividade contrátil e relaxante do íleo de ratos Wistar alimentados durante 16 semanas com dieta hipercalórica, e se a suplementação alimentar com *S. platensis* poderia melhorar ou restaurar essa reatividade em ratos Wistar obesos. Além disso, questionou-se se a mudança de dieta, saindo de uma dieta hipercalórica para uma dieta padrão simulando um processo de reeducação alimentar, restauraria a reatividade contrátil do íleo.

Para isso, e com base nos estudos de Barros e Silva (2015), ratos Wistar foram alimentados com dieta hipercalórica durante 16 semanas, sendo as oito primeiras semanas destinadas à indução da obesidade e as oito semanas seguintes, destinadas à suplementação com *S. platensis* nas doses de 25, 50 e 100 mg/kg. E para simular o processo de reeducação alimentar, um outro grupo de animais foram alimentados com a dieta hipercalórica durante 8 semanas e nas 8 semanas posteriores, receberam a dieta padrão.

Inicialmente, avaliou-se o efeito da obesidade e da suplementação alimentar com *S. platensis* nos parâmetros nutricionais, como as ingestões alimentar estimada e calórica. Para isso, diferentes parâmetros foram monitorados nos animais durante todo o período de experimentação.

Na ingestão alimentar, o grupo GOS apresentou ingestão alimentar estimada total (g) e calórica total (kcal) inferiores ao grupo GCS (Tabela 2 e 3, respectivamente). Esses resultados diferem dos encontrados por Fernandes et al. (2013), que observaram um aumento no consumo alimentar de camundongos que receberam dieta hipercalórica, em relação ao grupo controle. Entretanto, é comum observar a diminuição do consumo alimentar dos animais alimentados com dieta hipercalórica, quando comparado aos animais que se alimentam com a dieta padrão, devido a elevada eficiência energética da dieta, como também sugere-se que o aumento da ingestão alimentar em ratos obesos ocorra pelo aumento da secreção de hormônios relacionados com a saciedade, como colecistocinina (CCK) e peptídeo semelhante ao glucagon (GLP-1), induzidos pelo consumo de uma alta quantidade

de lipídios presentes na dieta hipercalórica utilizada nesse estudo (HIMAYA et al., 1997; KONTUREK et al., 2004).

Quanto aos grupos suplementados com *S. platensis* nas doses de 25, 50 e 100 mg/kg, foi observado que todos apresentaram ingestão alimentar estimada e calórica total superior ao grupo GOS, exceto o grupo GO + SP50, que não apresentou diferença em relação ao grupo GOS quanto à ingestão alimentar calórica. Esse parâmetro é calculado utilizando a quantidade de kcal da dieta (4,17 kcal). O aumento da ingestão alimentar promovido pela *S. platensis*, pode estar associado à uma diminuição nos níveis de CCK e GLP-1, e dessa forma, diminuindo a saciedade. Entretanto, são necessários mais estudos para comprovar essa hipótese.

O grupo GO + DP apresentou a ingestão alimentar estimada e calórica superior ao GOS, e isso pode ser explicado pela diminuição da quantidade de lipídeos presente nessa dieta, de forma que não foi suficiente para estimular o aumento nos níveis de hormônios relacionados à saciedade, como CCK e GLP-1, e isso provavelmente contribuiu para que esses animais apresentassem uma ingestão alimentar maior.

Diante do exposto, conclui-se que a obesidade pode estar diminuindo a ingestão alimentar através do aumento de hormônios relacionados com a saciedade em ratos Wistar e que a suplementação alimentar com *S. platensis* pode estar promovendo uma diminuição na concentração destes hormônios com consequente aumento na ingestão alimentar. Ademais, sugere-se também que a mudança de dieta promove um aumento no consumo alimentar diminuindo a saciedade através da baixa quantidade de lipídeos presentes nesta dieta.

Com a finalidade de garantir que as possíveis alterações no ganho de massa corporal dos animais, fosse resultado do consumo da dieta diferenciada, todos os grupos experimentais apresentaram a mesma faixa de massa corporal no início do protocolo experimental (Gráfico 1, Tabela 4). No final do período de 16 semanas, não foi observado diferença na massa corpórea final nem no ganho de massa corporal entre o grupo GOS em relação ao GCS.

Esses resultados estão de acordo com os resultados encontrados por Franco et al. (2009), Silva (2010) e White (2013), que demonstraram que não houve diferença na massa corporal final nos animais que receberam as dietas diferenciadas. Para a avaliação da obesidade, a massa corporal isolada não é o

parâmetro mais indicado, sendo necessário avaliar outros parâmetros que avaliem a relação da massa corporal com a quantidade de tecido adiposo armazenada.

Entre os grupos suplementados com *S. platensis* nas doses de 25, 50 e 100 mg/kg não foram observadas diferenças em relação ao GOS, quanto ao peso inicial, final e ganho de massa corporal, entretanto, o grupo que recebeu a dose de 25 mg/kg apresentou um aumento na massa corporal média semanal e no ganho de massa corporal em relação ao GOS.

Quanto à composição, a *S. platensis* possui cerca de 60 a 70% de conteúdo proteico. Segundo alguns autores, o aumento da ingestão proteica pode favorecer a perda de peso, além de dificultar a recuperação desse peso perdido. Esse efeito pode estar associado ao fato das proteínas apresentarem alto efeito termogênico, que pode ser causado pelo aumento da síntese proteica e do consumo de ATP para a síntese de ligações peptídicas (FLATT, 1978; PORRINI et al., 1997; GARLICK; MCNURLAN; BALMER, 1991). Mikkelsen et al. (2000) verificaram que, a substituição de 17-18% de carboidrato da dieta por proteína de carne de porco ou de soja produziu um aumento de 3% no gasto energético de 24 horas, em humanos saudáveis, com sobrepeso ou obesidade.

Sendo assim, a quantidade de proteínas presentes na composição da *S. platensis* pode estar favorecendo a termogênese, e dessa forma, mesmo com uma ingestão alimentar superior à do grupo GOS, não houve aumento de peso, nos grupos que receberam as doses de 50 e 100 mg/kg. Em contrapartida, a dose de 25 mg/kg de *S. platensis*, pode não ter favorecido os efeitos termogênicos, por ser uma dose menor do produto e oferecer uma concentração menor de proteína aos animais.

Diante disso, sugere-se que a suplementação alimentar com *S. platensis* nas doses de 50 e 100 mg/kg pode estar favorecendo à termogênese, com consequente perda de peso.

Sabe-se que uma reeducação alimentar pode favorecer a perda de peso. Desta forma, foi questionado se a mudança da dieta hipercalórica para uma dieta padrão alteraria a massa corporal dos animais em estudo. Verificou-se que, o GO + DP não apresentou diferença quanto à massa corporal média semanal, massa corpora inicial e final e ganho de massa corporal em relação ao GOS (Tabela 4), evidenciando que, mesmo apresentando um consumo alimentar superior ao GOS,

não foi verificado o aumento na massa corporal. Dessa forma, conclui-se que, a mudança de hábitos alimentares é eficaz em promover a perda de peso.

Alguns fatores podem influenciar o ganho de massa corporal, entre eles, a capacidade de ingestão de alimentos; de transformar a dieta fornecida por meio da seleção do material ingerido; de aproveitar melhor o alimento ingerido ou o potencial genético para acúmulo de massa corporal (fator limitante) (FERNANDES et al., 2004). Sendo assim, o uso de coeficientes como o CCA, CEA e o CGPCC, podem ser utilizados para determinar a eficiência do animal na converção da ração consumida em massa corporal. O CCA, calculado pela razão entre o consumo de ração em g pelo ganho de massa corporal, e por esse índice, é possível verificar qual animal aumentou sua massa corporal comendo menos. Desta forma, quanto menor esse índice, maior o desempenho. O CEA e o CGPCC são calculados pela razão entre o ganho de massa corporal pelo consumo de ração em g ou kcal, respectivamente, e demonstram qual animal utilizou melhor o alimento ingerido, sendo que quanto maior esses índices, maior o desempenho (FERNANDES et al., 2004; LUPATINI, 2015).

O GOS apresentou valores de CEA superiores, e de CAA inferiores ao GCS, não diferenciando quanto aos valores de CGPCC. Esses resultados demonstram que houve um melhor desempenho na conversão da ração consumida em massa corporal no GOS (Tabela 5).

Nos grupos que foram suplementados com *S. platensis*, não foi observado diferença no CEA, CAA e no CGPCC em relação ao GOS (Tabela 5), indicando que esses animais também apresentaram um bom desempenho na conversão da ração consumida em massa corporal. Entretanto não aumentaram o peso corporal, mesmo apresentando uma maior ingestão alimentar, como mostrado na tabela 2 e 3.

Sabe-se que, a ingestão crônica de dietas diferenciadas pode levar a mudanças no perfil da microbiota intestinal, promovendo um estado de disbiose, com um aumento de bactérias gram-negativas, como as enterobactérias, em relação às bactérias gram-positivas, como as bifidobactérias. As bactérias gram-negativas apresentam em sua superfície celular os lipopolissacarídeos (LPS), que funcionam como antígenos, estimulando a resposta imune. Dietas hipercalóricas promovem um aumento dessa endotoxina, e conseqüentemente, um aumento da secreção de mediadores inflamatórios, como TNF- α , IL-1, IL-4 e IL-13, aumentando a permeabilidade intestinal, e dessa forma, permitido que ocorra a translocação de

LPS para a circulação, bem como de ácidos graxos e outros nutrientes (CANI, et al., 2008; CARICILLI, et al., 2011).

Sabendo da propriedade da *S. platensis* em promover um aumento da microflora intestinal, em especial das bifidobactérias, sugere-se que, a suplementação com a *S. platensis*, esteja promovendo uma diminuição da permeabilidade intestinal, através do aumento da população das bifidobactérias, com consequente diminuição da inflamação, produção de LPS e absorção dos ácidos graxos. Dessa forma, mesmo que não ocorra diferença nos coeficientes CEA, CCA e CGPCC, como foi observado nos animais suplementados com *S. platensis*, não ocorre aumento de massa corporal. Entretanto, estudos mais aprofundados e específicos são necessários para comprovar tal hipótese, como análise do conteúdo fecal.

No grupo que recebeu a dieta padrão, foi observado uma diminuição no CEA, aumento no CAA e diminuição no CGPCC em relação ao GOS, sugerindo dessa forma, que a mudança de dieta hipercalórica para uma dieta padrão, dificulta a conversão da ração em massa corporal (Tabela 5).

Como parâmetro de confirmação da obesidade, muitos autores utilizam o ganho de massa corporal, entretanto, esse parâmetro não fornece informações sobre a distribuição do tecido adiposo no corpo e sobre a composição corporal, dificultando a identificação do quadro de obesidade. Dessa forma, para melhor caracterizar essa doença, deve-se abordar outros parâmetros como o índice de Lee, o índice de massa corporal, a massa dos depósitos de tecido adiposo, o diâmetro dos adipócitos e o índice de adiposidade dos animais em experimentação.

Sendo assim, foi questionado se o consumo de dieta hipercalórica durante 16 semanas induziria a obesidade em ratos Wistar. Para responder a esse questionamento, foram avaliados alguns critérios da obesidade experimental, como índice de Lee, índice de massa corporal, massa dos tecidos adiposos, índice de adiposidade e diâmetro dos adipócitos. Não foi observado diferença quanto ao índice de Lee, entre os animais do grupo GOS e GCS (Tabela 6). Resultados semelhantes foram observados por. Malafaia et al. (2013), com o modelo de indução da obesidade em ratos pela sacarose; Silva (2014), em um modelo de obesidade induzida por dieta em ratas, e Barros e Silva (2015), que avaliaram a disfunção erétil em ratos submetidos a uma dieta hipercalórica durante 8 semanas.

Nos animais que receberam a suplementação com *S. platensis* nas doses de 25, 50 e 100 mg/kg, assim como no GO + DP não foi observado diferença no índice de Lee em relação ao GOS (Tabela 6).

Para o cálculo desse parâmetro, é utilizado a razão entre a raiz cúbica da massa corporal e o comprimento nasoanal do animal (LEE et al., 1929). O índice de Lee não apresenta um nível classificatório, no entanto, animais que apresentam um maior valor desse índice, estão propensos a desenvolver a obesidade (GOMES, 2009; MACEDO, 2010).

Em virtude da instabilidade de uso do índice de Lee em muitos estudos de obesidade, validou-se a correlação entre o IMC e a composição de lipídios da carcaça de ratos, demonstrando a importância desse índice quando se deseja estimar a gordura corporal em ratos (NOVELLI et al., 2007). Em humanos, o IMC é principal medida antropométrica utilizada para diagnóstico da obesidade (ABESO, 2016). A faixa do IMC considerada normal para ratos de 30 a 150 dias de idade varia de 0,38 a 0,68 g/cm². (NOVELLI et al., 2007). Os grupos experimentais desse estudo apresentaram IMC que variou de 0,59 a 0,68 g/cm², e não foi observado diferença quanto ao IMC em nenhum dos grupos experimentais (Tabela 6), podendo correlacionar-se a não alteração do comprimento naso-anal para a maioria dos grupos experimentais.

Um outro parâmetro avaliado para confirmar a indução da obesidade foi a massa dos depósitos de tecido adiposo, onde o GOS apresentou as massas das reservas adiposas epididimal, retroperitoneal e inguinal superiores ao GCS (Gráfico 2A, 2B e 2C). O aumento das reservas adiposas é resultado da ingestão de dietas hipercalóricas ricas em lipídeos, pois o consumo dessas dietas pode aumentar a eficiência alimentar, devido ao baixo efeito térmico dos lipídeos para serem metabolizados. Dessa forma, os ácidos graxos que não são utilizados para a produção de energia, são depositados na forma de triglicerídeos nos adipócitos, aumentando dessa forma, a massa dos tecidos adiposos (CANI et al., 2008).

Nos animais que receberam a suplementação com *S. platensis*, foi observado que apenas os grupos GO + SP50 e GO + SP100 apresentaram a reserva adiposa epididimal inferior ao grupo GOS, enquanto o GO + SP25 não apresentou diferença em relação ao GOS, assim como o GO + DP (Gráfico 2A).

Quanto à massa do tecido adiposo retroperitoneal, foi observado que, apenas o grupo GO + DP apresentou essa reserva inferior ao grupo GOS, enquanto os

grupos suplementados com *S. platensis* não apresentaram diferença em relação ao GOS (Gráfico 2B).

Em relação à massa do tecido adiposo inguinal, foi observado que, apenas o grupo GO + DP apresentou essa reserva inferior ao grupo GOS, enquanto os grupos suplementados com *S. platensis* nas doses de 25 e 100 não apresentaram diferença. O grupo GO + SP50 apresentou essa reserva superior ao grupo GOS (Gráfico 2C). O aumento dessa reserva adiposa ocorreu de forma não-dependente de dose.

Monteiro (2015) observou em camundongos tratados com proteínas do soro do leite, uma tendência ao controle da deposição excessiva de gordura epididimal e retroperitoneal nesses animais, e resultados semelhantes foram observados por Gasparetto et al (2013), em que ratos Wistar alimentados com *whey protein* em um período de 6 semanas, apresentaram uma diminuição da deposição da gordura visceral (epididimal e retroperitoneal), que é um tecido adiposo fortemente correlacionadas com resistência à insulina.

Nesse estudo foi observado que, no tratamento com a dose de 50 mg/kg, houve um aumento da reserva adiposa inguinal. Sendo assim, sugere-se que, a suplementação com *S. platensis* na dose de 50 mg/kg poderia ter induzido uma mobilização de gordura para o tecido adiposo inguinal, diminuindo assim os depósitos epididimal e retroperitoneal, e dessa forma, diminuindo as consequências da deposição de gordura nessas regiões, como a resistência hepática à insulina e inflamação sistêmica crônica induzida pelo aumento da secreção de citocinas pró-inflamatórias (FRAYN, 2002; RAVUSSIN; SMITH, 2002). Estudos mais aprofundados devem ser realizados para comprovar essa hipótese.

O grupo GO + DP apresentou duas, das três massas dos tecidos adiposos, inferiores ao grupo GOS, mostrando que a mudança dos hábitos alimentares é eficiente em promover a diminuição da massa dos tecidos adiposos (Gráfico 2A, 2B e 2C)

Entre os parâmetros utilizados para comprovar a indução da obesidade experimental, está o índice de adiposidade, que permite correlacionar o peso com os depósitos de gordura corporal de maneira consistente em roedores, e foi utilizado por Nascimento et al. (2008), Campos (2010) e Pereira (2011) como critério mais importante para constatar o estado de obesidade nos animais.

Na avaliação o índice de adiposidade, foi observado que o grupo GOS apresentou um índice de adiposidade superior ao GCS, o que pode ser justificado devido ao aumento da deposição lipídica em todas as reservas adiposas estudadas (Gráfico 2D).

Nos animais que receberam a suplementação com *S. platensis* nas doses de 25, 50 e 100 mg/kg e no GO + DP, foi observado redução no índice de adiposidade em relação ao GOS, sem diferir do GCS (Gráfico 2D).

Quanto ao aumento do diâmetro dos adipócitos, foi observado que, em todas as reservas adiposas, o GOS aumentou o diâmetro dos adipócitos, em relação ao GCS (Gráfico 3). Resultados semelhantes foram encontrados por Cani et al.(2008) em camundongos, onde os animais alimentados com dietas hiperlipídicas apresentaram um aumento no diâmetro dos adipócitos em comparação com animais alimentados com dieta padrão. Os adipócitos são responsáveis pelo armazenamento de gordura, na forma de triglicerídeos, de forma que, o tamanho dessas células varia de acordo com a quantidade de triglicerídeos armazenada. Dessa forma, a hipertrofia dessas células está associada ao aumento nos depósitos de tecido adiposo, característico da obesidade (HERMSDORFF; MONTEIRO, 2004). Diante desses resultados, pode-se concluir que a dieta hiperlipídica ingerida por 16 semanas foi eficiente em induzir a obesidade em ratos Wistar.

Em relação ao diâmetro dos adipócitos, nos grupos que receberam a suplementação com *S. platensis*, foi observado a redução em todas as reservas adiposas apenas nos GO + SP100, de forma que não houve diferença em relação ao GCS. O grupo GO + SP25 não apresentou redução do diâmetro dos adipócitos em nenhuma das reservas adiposas (Gráfico 3).

O grupo GO + SP50 apresentou o diâmetro dos adipócitos das reservas epididimal e inguinal diminuídos. Apesar de ter apresentado um aumento na massa do tecido adiposo inguinal, os adipócitos dessa reserva apresentaram-se diminuídos, e sugere-se que houve apenas a redução do tamanho dos adipócitos, sem alteração no número dessas células (Gráfico 3).

O grupo GO + DP apresentou os adipócitos de todas as reservas de tecido adiposo diminuídas, em relação ao GOS, sem diferenciar do GCS (Gráfico 3).

Diante desses resultados, sugere-se que a *S. platensis* nas doses de 50 e 100 mg/kg, pode estar atuando em mecanismos de mobilização dos triglicerídeos para serem utilizadas como fonte energética, diminuindo dessa forma, a quantidade

de triglicerídeos armazenada nos adipócitos, e conseqüentemente, seu diâmetro. Entretanto, são necessários estudos mais aprofundados para comprovar essa hipótese. Ademais, a mudança de dieta também promove uma diminuição no diâmetro dos adipócitos, devido a uma menor quantidade de triglicerídeos presentes na dieta, e conseqüente diminuição do armazenamento nas células adiposas.

Com esses dados, pode-se concluir que, tanto a suplementação alimentar com *S. platensis* nas doses de 50 e 100 mg/kg, quanto à mudança da dieta, que simula um processo de reeducação alimentar, foram capazes de reverter a obesidade em ratos Wistar, no entanto, estudos mais aprofundados devem ser realizados para melhor compreender os mecanismos que explicariam tais efeitos

Alguns processos fisiopatológicos estão relacionados com a obesidade, entre eles, as disfunções gastrointestinais como hérnia de hiato e coleliscistite (TAVARES; NUNES; SANTOS, 2010), colite ulcerativa (TEIXEIRA, 2012) e o aumento da constipação (FELIPPI et al., 2014). Barros e Silva (2015) observaram que a função erétil de animais submetidos à dieta hipercalórica foi prejudicada, de forma que a reatividade contrátil do corpo cavernoso frente à fenilefrina foi potencializada e a reatividade relaxante frente à ACh foi atenuada, indicando um possível dano endotelial nesse órgão. Utilizando a mesma dieta hipercalórica, Oliveira et al. (2016), mostraram que a obesidade diminui a reatividade contrátil do íleo de rato, frente ao agente contrátil do acoplamento eletromecânico KCl e ao agonista contrátil do acompanhamento misto CCh. Já Brito (2014) demonstrou que, a suplementação alimentar com *S. platensis* associado ao treinamento de força, melhorou a reatividade relaxante no leito aórtico.

Diante dessas premissas, levantou-se a hipótese de que, a obesidade diminuiria a reatividade contrátil do íleo de ratos alimentados com dieta hiperlipídica durante 16 semanas, e que a suplementação alimentar com *S. platensis* atenuaria ou reverteria esse efeito. Para testar essa hipótese, foram induzidas curvas concentração-respostas cumulativas ao KCl em íleo de ratos obesos e sadios. Nesse protocolo experimental, observou-se que a obesidade atenuou as curvas concentração-respostas cumulativas ao KCl, diminuindo conseqüentemente a reatividade contrátil do íleo de ratos obesos (Gráfico 4).

Em contrapartida, observou-se que a suplementação com *S. platensis* na dose de 50 mg/kg reverteu as curvas concentração - respostas cumulativas ao KCl, restaurando a eficácia contrátil, e conseqüentemente a reatividade contrátil do íleo

de ratos obesos. A mudança na dieta, ocorrida no grupo GO + DP não alterou a reatividade contrátil do íleo, mesmo se mostrando eficiente no tratamento da obesidade (Gráfico 4).

O mesmo foi observado quando a contração foi induzida pelo agente contrátil do acoplamento misto, o CCh. Com isso, verificou-se que, a obesidade atenuou as curvas concentração-resposta cumulativas ao CCh, com diminuição do efeito máximo, e dessa forma, diminuiu a reatividade contrátil do íleo de ratos Wistar. Foi observado também que, a suplementação com *S. platensis* na dose de 50 mg/kg reverteu as curvas concentração-respostas cumulativas ao CCh, restaurando a eficácia contrátil, e consequentemente a reatividade contrátil do íleo de ratos obesos (Gráfico 5).

Zhang et al.(2007), observaram que o influxo de cálcio em útero diminuiu em função da obesidade em mulheres. É provável que a obesidade também possa estar diminuindo o influxo de cálcio em íleo de rato, e um dos possíveis mecanismos que explicaria isso, seria através da diminuição da expressão de Ca_v , diminuindo dessa forma, o influxo de cálcio e a contração. Em contrapartida, a *S. platensis* poderia estar aumentando a expressão desses canais, e isso justificaria a reversão da reatividade contrátil. No entanto, para comprovar essa hipótese, são necessários estudos sobre expressão desses canais em íleo de rato em função da obesidade e da suplementação com *S. platensis*.

Como observado, a mudança de dieta, evidenciada no grupo GO + DP, não alterou a resposta contrátil intestinal em nenhum dos acoplamentos, ressaltando que, apenas a mudança nos hábitos alimentares não melhora as respostas contráteis intestinais, reforçando dessa forma, a importância da suplementação com *S. platensis* na restauração da resposta contrátil intestinal frente à obesidade.

Em conjunto, esses dados sugerem que, a obesidade diminui a reatividade contrátil do íleo de ratos alimentados por 16 semanas com dieta hipercalórica através de uma possível diminuição da expressão de Ca_v , e que a suplementação alimentar com *S. platensis* apenas na dose de 50mg/kg reverte a reatividade contrátil do íleo de ratos obesos, frente aos agentes contráteis dos acoplamentos eletromecânico e misto, por um possível aumento na expressão desses canais, sendo considerada a melhor dose para todos os parâmetros observados até agora nesse estudo.

Devido à escassez de estudos sobre a interferência da obesidade na reatividade relaxante intestinal, decidiu-se investigar se a obesidade promoveria alterações na reatividade relaxante do íleo de ratos. Para isso, o íleo foi pré-contráído com KCl, e em seguida foram induzidas curvas cumulativas concentração-respostas ao verapamil, um bloqueador de canais de cálcio do tipo L, que promove diminuição do influxo de cálcio, diminuindo a contração, e fazendo prevalecer o relaxamento (WOODRUM; BROPHY, 2001; SOMLYO; SOMLYO, 2003). Os resultados mostraram que houve uma atenuação da potência relaxante no grupo GOS em relação ao grupo GCS, sem alteração da eficácia relaxante (Gráfico 6).

Nesse protocolo experimental, avaliou-se o mecanismo eletromecânico de relaxamento, onde o verapamil foi adicionado sobre a contração tônica induzida por KCl, que é uma contração mantida principalmente pela via de sensibilização ao cálcio. Estudos realizados por Nishimatsu et al.(2004), mostraram que, a obesidade aumentou a vasoconstrição em anéis aórticos de ratos Zucker obesos, via mecanismo de sensibilização ao cálcio ROCK dependente. Dessa forma, é provável que a obesidade esteja aumentando a expressão de proteínas da via de sensibilização ao Ca^{2+} , especialmente a ROCK, promovendo um aumento da potência contrátil e dessa forma, prejudicando a potência relaxante do íleo de ratos obesos. Dessa forma, conclui-se que a obesidade pode estar diminuindo a reatividade relaxante de ratos Wistar obesos através de um possível aumento na expressão de proteínas relacionadas com a via da ROCK. Entretanto, são necessários estudos mais aprofundados para verificar a expressão de proteínas relacionadas com a via de sensibilização ao cálcio, como a ROCK e a Rho-A, para confirmar essa hipótese.

Diante disso, resolveu-se investigar se a suplementação com *S. platensis* atenuaria ou reverteria a diminuição da reatividade relaxante do verapamil, promovida pela obesidade em íleo de ratos Wistar. Para isso, foram induzidas curvas cumulativas concentração-respostas ao verapamil, um inibidor de Ca_v , no íleo pré-contráído com KCl, e foi observado que a suplementação alimentar com *S. platensis* na dose de 100 mg/kg atenuou a potência relaxante do íleo de rato, sem alteração da eficácia relaxante, enquanto os outros grupos GO + SP50 e GO + DP não apresentaram diferença em relação ao GOS (Gráfico 6). É provável que, assim como na reatividade contrátil, a *S. platensis* possa estar promovendo um aumento na expressão de proteínas relacionadas com os processos contráteis, e dessa

forma, prejudicando o relaxamento do músculo liso intestinal. Para confirmar essa hipótese, são necessários estudos mais aprofundados sobre o mecanismo de ação da *S. platensis* na reatividade relaxante.

É sabido que, o processo de hipertrofia das camadas musculares circular e longitudinal do intestino, pode afetar a contração ou o relaxamento desse órgão. Segundo Bertoni et al. (2004) e Bertoni et al. (2008), a hipertrofia da camada circular indica um aumento na eficácia contrátil, enquanto a hipertrofia da camada longitudinal exibe uma maior sensibilidade aos fatores relaxantes, levando à diminuição da eficácia contrátil.

Diante dessas premissas, questionou-se se a obesidade estaria promovendo alguma alteração nas camadas musculares do íleo de ratos Wistar. Para confirmar ou descartar essa hipótese, foram feitas análises histológicas nos íleos de todos os grupos experimentais. A partir destas análises, foi observado que não houve alteração na morfologia intestinal das camadas circular e longitudinal no tocante à hipertrofia, no grupo GOS, em relação ao grupo GCS (Gráfico 7). Resultados semelhantes foram encontrados por Oliveira et al. (2016), em animais obesos alimentados com uma dieta hipercalórica por 8 semanas, em relação a animais que receberam uma dieta padrão normocalórica. Esses resultados sugerem que a obesidade não exerce seus efeitos por alteração da arquitetura das camadas musculares circular e longitudinal do íleo.

Quanto aos animais suplementados com as diferentes doses de *S. platensis* e ao grupo que recebeu a dieta padrão, não foi observado diferença em relação ao GOS (Gráfico 7), sugerindo que os efeitos promovidos por essa alga e pela mudança de dieta, não envolvem modificações na arquitetura das camadas musculares do íleo.

Sabe-se que a obesidade humana é tida como uma condição crônica de estresse oxidativo (HIGDON; FREI, 2003), e as EROs podem afetar a contração da musculatura lisa intestinal diminuindo a afinidade agonista-receptor, a produção de IP_3 e modificando e inativando os Ca_v através de reações químicas, prejudicando dessa forma a mobilização e o influxo de cálcio (PRUNN; VAN GELDEREN, 1989; (VAN DER VLIET; TUINSTRA; BAST, 1989; EBERSOLE; MOLINOFF, 1991), podendo ser a possível causa da diminuição da reatividade contrátil provocada pela obesidade. De acordo com essas premissas, é possível que, a restauração da reatividade contrátil promovida pela *S. platensis* seja através de uma diminuição no

estresse oxidativo, visto que, este produto já tem uma atividade antioxidante bem descrita na literatura (CUVELIER, 2001; BASHANDY et al., 2016).

Para confirmar ou descartar a hipótese de que, o estresse oxidativo, presente na obesidade, esteja envolvido com a diminuição da reatividade contrátil intestinal pelos mecanismos mencionados anteriormente, e que a potencial atividade antioxidante da *S. platensis* pudesse estar minimizando esses danos, foram avaliados os níveis de MDA, um marcador da peroxidação lipídica, bem como o percentual de inibição da oxidação, um marcador da atividade antioxidante, em amostras de plasma, íleo e tecidos adiposos epididimal, retroperitoneal e visceral de ratos Wistar obesos.

Em relação à peroxidação lipídica, o grupo GOS não apresentou alterações na concentração de MDA no plasma e no íleo, em relação ao grupo GCS (Gráfico 8). Esses resultados diferem dos encontrados por Franco (2007), em que ratos Wistar foram alimentados por um período de oito semanas com dieta hiperlipídica e a produção de MDA no plasma dos animais que receberam esse tipo de dieta, foi superior a dos animais que receberam uma dieta normolipídica.

Nesse estudo, sugere-se que os animais poderiam ter se adaptado à condição de estresse oxidativo, e as células poderiam estar sendo estimuladas a produzir antioxidantes para combater os radicais livres e possíveis danos oxidativos, tendo em vista que com 8 semanas, houve um aumento do estresse oxidativo em animais alimentados com dieta hiperlipídica, como mostrado por Franco (2007), entretanto, com 16 semanas, não são observadas alterações em nenhum dos grupos experimentais.

Em relação aos grupos suplementados com as doses de 25, 50 e 100 mg/kg de *S. platensis*, e o GO + DP, não foi observado diferença em relação ao GOS no íleo e no plasma (Gráfico 8).

Nos tecidos adiposos epididimal e retroperitoneal, o grupo GOS apresentou níveis de MDA superiores ao grupo GCS (Gráfico 8). Quanto ao tecido adiposo inguinal, não houve alteração nos níveis de MDA no grupo GOS, em relação ao GCS.). Nos grupos suplementados com *S. platensis*, apenas a dose de 50 mg/kg de promoveu uma diminuição da concentração de MDA nos depósitos epididimal, retroperitoneal e inguinal (Gráfico 8).

O GO +DP apresentou diminuição na concentração de MDA apenas na reserva adiposa epididimal, em relação ao GOS (Gráfico 8).

Esse aumento na concentração de MDA no tecido adiposo pode ser atribuído a um possível aumento na produção de citocinas pró-inflamatórias em decorrência da obesidade, incluindo TNF- α , IL-1 e IL-6. Essas citocinas estimulam a produção de EROs por macrófagos e monócitos infiltrados no tecido adiposo. Dessa forma, um possível aumento na concentração de citocinas poderia ser responsável pelo aumento do EROs. Além disso, o TNF- α também inibe a atividade de PCR (proteína C reativa), aumentando a interação de elétrons com oxigênio para a geração de ânion superóxido. Isso poderia explicar o aumento do estresse oxidativo nesses tecidos adiposos estudados (MORROW, 2003; FONSECA-ALANIZ et al., 2007). Entretanto, são necessários mais estudos para comprovar essa hipótese.

A atividade antioxidante já descrita da *S. platensis* pode ter contribuído para a diminuição do estresse oxidativo no tecido adiposo.

Em relação à atividade antioxidante, no plasma e no íleo não foi observado diferença entre os grupos GCS e GOS, e a suplementação com *S. platensis* não alterou o percentual de inibição da oxidação no plasma e no íleo, em nenhuma das doses utilizadas (Gráfico 9A e 9B)). Esses dados refletem nos resultados de peroxidação lipídica desses órgãos. Para explicar tal fato, sugere-se que, o organismo, numa tentativa de adaptação ao estresse oxidativo promovido pela obesidade, aumentou as defesas antioxidantes endógenas para combater os radicais livres, com o intuito de diminuir os danos causados por eles. Esse aumento da atividade antioxidante no grupo GOS pode ter ocorrido de tal forma que, não houve diferença entre os grupos que foram suplementados com *S. platensis*, que já é esperado a atividade antioxidante. Entretanto, são necessários estudos mais aprofundados, como avaliação da expressão de enzimas antioxidantes, por exemplo, para comprovar essa hipótese. Dessa forma, sugere-se que a obesidade pode estar promovendo uma adaptação ao estresse oxidativo no plasma e no íleo de ratos Wistar.

No tecido adiposo epididimal, não foi observado diferença no percentual de inibição da oxidação entre os grupos GCS e GOS. Quanto aos grupos suplementados com *S. platensis*, não foi observado diferença em relação ao GOS, assim como no grupo GO + DP (Gráfico 9C)

Na reserva adiposa retroperitoneal, não foi observado diferença no percentual de inibição da oxidação entre os grupos GOS e GCS. Entretanto, todos os grupos

suplementados com *S. platensis* apresentaram aumento neste percentual em relação ao GOS, o que não foi observado no grupo GO + DP (Gráfico 9D).

Quanto ao tecido adiposo inguinal, não foi observado diferença no percentual de inibição da oxidação no grupo GOS em relação ao GCS. Nos grupos que receberam *S. platensis* apenas a dose de 50 mg/kg apresentou um aumento na capacidade antioxidante em relação ao GOS. O GO + DP não apresentou diferença em relação ao GOS (Gráfico 9E).

Com base nos dados de peroxidação lipídica e percentual de inibição da oxidação, conclui-se que a suplementação com *S. platensis* na dose de 50mg/kg, foi eficaz em diminuir o estresse oxidativo no tecido adiposo, e que a mudança de dieta não promoveu melhora no estresse oxidativo ocasionado pela obesidade em tecido adiposo.

Há uma vasta literatura demonstrando os efeitos antioxidantes da *S. platensis*, por vários mecanismos diferentes. Bashandy et al. (2016) mostraram que, em tecidos testiculares, a *S. platensis* aumentou a expressão das enzimas antioxidantes SOD, CAT e GSH. Além disso, outros estudos mostraram que a ficocianina presente na *S. platensis* possui um alto poder de sequestro de radicais livres, devido sua alta estabilidade, mostrando assim alta capacidade antioxidante (BHAT et al., 2000). Essa alga também possui em sua composição, carotenoides, vitaminas do complexo B e vitamina E, que promovem a regulação da SOD, CAT, bloqueio de radicais livres por quelação, podendo prevenir a peroxidação lipídica, e ainda captam radicais livres (CUVELIER, 2001).

A partir desse estudo, frente aos efeitos antiobesidade, restauração da reatividade contrátil intestinal e à diminuição do estresse oxidativo no tecido adiposo, têm-se como implicação prática que, a suplementação com *S. platensis*, pode trazer benefícios para pessoas obesas. No entanto, são necessários estudos mais aprofundados para elucidar o mecanismo de ação pelo qual a *S. platensis* exerce seus efeitos. Ademais, esse estudo reforça a idéia de que, apesar da mudança de dieta promover efeitos antiobesidade, apenas a reeducação alimentar não é suficiente para promover efeitos sobre a diminuição da reatividade contrátil do íleo e sobre aumento do estresse oxidativo promovido pela obesidade, reforçando mais uma vez a importância da suplementação com *S. platensis* na melhora dos problemas ocasionados pela obesidade no intestino e no tecido adiposo.

7 Conclusões

Na avaliação dos parâmetros nutricionais e morfométricos, da reatividade muscular e do estresse oxidativo em ratos Wistar alimentados com dieta hiperlipídica, suplementados com *Spirulina platensis* e que foram submetidos a mudança de dieta, pode-se concluir que:

- a ingestão alimentar reduzida em ratos obesos do grupo controle pode ser em decorrência da alta quantidade de lipídios presentes na dieta;
- o aumento do CEA, a diminuição do CC, o aumento da massa dos tecidos adiposos, do índice de adiposidade e do diâmetro dos adipócitos confirmam o quadro de obesidade;
- a obesidade promove diminuição da reatividade muscular contrátil e relaxante do íleo, e promove um aumento da peroxidação lipídica em tecido adiposo.

A suplementação alimentar com *Spirulina platensis*:

- Apesar de promover um aumento da ingestão alimentar em ratos obesos, interessantemente reverteu a obesidade por diminuir o índice de adiposidade e o diâmetro dos adipócitos;
- Restaura a redução da eficácia contrátil do carbacol e do KCl induzida pela obesidade, entretanto não reverte a diminuição da potência relaxante do verapamil em íleo isolado de rato, na dose de 50 mg/kg;
- Reverte o aumento da peroxidação lipídica e aumenta a capacidade antioxidante em tecido adiposo de ratos obesos na dose de 50 mg/kg, o que reforça o seu potencial antiobesidade.

A mudança de dieta:

- Induziu efeito antiobesidade;
- Não reverteu a diminuição da reatividade contrátil e relaxante do íleo de ratos obesos
- Não reverteu o aumento da peroxidação lipídica em tecido adiposo causado pela obesidade

Referências

ABESO. Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade e da Síndrome Metabólica. **Diretrizes Brasileiras de Obesidade**. 4^a edição. São Paulo, 2016.

ABESO. Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade e da Síndrome Metabólica. **Diretrizes Brasileiras de Obesidade**. 3^a edição. São Paulo, 2009.

ALVES CR, MELLO MAR, VOLTARELLI FA. *Spirulina* como fonte protéica na recuperação de ratos desnutridos: efeitos sobre o músculo esquelético. **Revista Digital – Buenos Aires**, v.10, n.86, 2005.

ARAUJO, C.G.L.; FACCHINETTI, A.D.; SANTOS, C.P. Influência da ingestão de biomassas de spirulina (*arthrospira* sp.) sobre o peso corporal e consumo de ração em ratos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v. 23, n.1, p.6-9, 2003.

ARAUJO, L.C.C; SOUZA, I.L.L; VASCONCELOS, L.H.C.; BRITO, A.F.; QUEIROGA, F.R.; SILVA, A.S.; SILVA, P.M.; CAVALCANTE, F.A.; SILVA, B.A. Chronic aerobic swimming exercise promotes functional and morphological changes in rat ileum. **Bioscience Reports**, v.35, n.5, p.1-9, 2015.

ARAUJO, L. C. C. Exercício aeróbio crônico de natação promove alterações morfofuncionais em íleo de ratos. **Dissertação (mestrado em biologia celular e molecular)**. Universidade Federal da Paraíba, (2014).

BAHIA, L.; COUTINHO, E. S. F.; BARUFALDI, L. A. ABREU, G. A. The costs of overweight and obesity related diseases in the Brazilian public health system: cross-sectional study. **BMC Public Health**. v. 12, n. 440, 2012.

BALISTRERI, C.R.; CARUSO, C.; CANDORE, G. The Role of Adipose Tissue and Adipokines in Obesity-Related Inflammatory Diseases. **Mediators of Inflammation**, v. 2010, p.19-29, 2010.

BARROS, B. C.; SILVA, B. A. Avaliação de produtos naturais e sintéticos bioativos sobre a reatividade do corpo cavernoso de ratos não obesos e obesos. **XXIII Encontro de Iniciação Científica**. Universidade Federal da Paraíba, 2015.

BASHANDY S. A. E. B., SALLY A. E.A., HOSSAM E. AND IBRAHIM M. A. Antioxidant Potential of *Spirulina platensis* Mitigates Oxidative Stress and Reprotoxicity Induced by Sodium Arsenite in Male Rats. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**. v.16, p.122-130, 2016.

BECKER E.W.; JAKOBER B.; JUFT D.; SCHMILLING, R.W. Clinical and biochemical evaluations of *Spirulina* with regard to its application in the treatment of obesity. **Nutrition Report International**. v. 33, N.4 p-565-569, 1986.

BELAY, A.; OTA, Y.; MIYAKAWA, K.; SHIMAMATSU, H. Current knowledge on potential health benefits of *Spirulina*. **Journal of Applied Phycology** v.5, p.235-241. 1993.

BELLOMO, G., THOR, H. AND ORRENIUS, S. Alterations in inositol phosphate production during oxidative stress in isolated hepatocytes. **Journal of Biochemical.** v.262, p.1539-1534, 1987.

BELURY MA. Dietary conjugated linoleic acid in health: physiological effects and mechanism of action. **Annual Review of Nutrition**, v.22, p.505-531, 2002.

BERRIDGE, M. J. Cell Signalling Pathways. In: **Cell Signalling Biology**. Portland Press Limited, p. 1-118, 2009

BERTONI, S.; BALLABENI, V.; FLAMMINI, L.; GOBBETTI, T.; IMPICCIATORE, M.; BAROCELLI, E. Intestinal chronic obstruction affects motor responsiveness of rat hypertrophic longitudinal and circular muscles. **Neurogastroenterol Motil**, v. 20, p. 1234–1242, 2008.

BERTONI, S.; GABELLA, G.; GHIZZARDI, P. BALLABENI, V.; IMPICCIATORE, M.; LAGRASTA, C.; ARCARI, M. L.; BAROCELLI, E. Motor responses of rat hypertrophic intestine following chronic obstruction. **Neurogastroenterol Motil**, v. 16, p. 365–374, 2004.

BERVEN G. Safety of conjugated linoleic acid (CLA) in overweight or obese human volunteers. **European Journal of Lipid Science and Technology** v.102, p.455-462, 2000.

BHAT, V. B.; MADYASTHA, K. M.; C-phycocyanin: a potent peroxyl radical scavenger in vivo and in vitro. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 275, p. 20-25, 2000.

BIANCHI, M.L.P; ANTUNES L.M.G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição**, v.12, n.12, p.123-30, 1999.

BIERHALS V.S.; MACHADO V.G.; ECHEVENGUÁ W.O.; COSTA J.A.V.; FURLONG EB. Compostos fenólicos totais, atividade antioxidante e antifúngica de multimisturas enriquecidas com a microalga *Spirulina platensis*. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 68, n.1, p.42-48, 2009.

BLANKSON H, STAKKESTAD JA, FAGERTUN H, THOM E, WADSTEIN J, GUDMUNDSEN O. Conjugated linoleic acid reduces body fat mass in overweight obese humans. **Journal of Nutrition**, v.130, n.12, p.2943-2948, 2000.

BORGES, N. Determinantes da epidemiologia mundial da obesidade. **Cadernos de saúde- número especial obesidade**, v. 4, p.11-13, 2011.

BOUSTANY, C.M.; BROWN, D.R.; RANDALL, D.C.; CASSIS, L.A. AT1 receptor antagonism reverses the blood pressure elevation associated with diet-induced obesity. **American Journal of Physiology**. v. 289, n.1, p. R181-R186, 2005.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Food Science and Technology Lebensmittel-Wissenschaft and Technologie**, v. 28, n. 1, p. 25-30, 1995.

BRITO, A.F. Treinamento de força e suplementação alimentar com *Spirulina platensis* modulam a reatividade vascular de aorta de ratos wistar saudáveis dependente do óxido nítrico e da atividade antioxidante. **Tese (Doutorado em Farmacologia)**, Universidade Federal da Paraíba, 2014.

BRODIE AE, MANNING VA, FERGUSON KR, JEWELL DE, HU CY. Conjugated linoleic acid inhibits differentiation of pre- and post- confluent 3T3-L1 preadipocytes but inhibits cell proliferation only in confluent cells. **Journal of Nutrition**. v.129, n.3, 602-6, 1999.

BROINIZI, P.R.B.; ANDRADE-WARTHA,E.R.S.; SILVA, A.M.O.; TORRES,R.P.; AZEREDO, H.M.C.; ALVES, R.E.; MANCINI-FILHO, J. Propriedades antioxidantes em subproduto do pedúnculo de caju (*Anacardium occidentale* L.): efeito sobre a lipoperoxidação e o perfil de ácidos graxos poliinsaturados em ratos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, n. 4, p.773-771, 2008.

BUHMANN, H.; LE ROUX, C.W.; BUETER, M. The gut-brain axis in obesity. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology** , vol. 28, n.4, p.559-571, 2014.

CAMPOS, D.H.S. Influência da oxidação de glicose sobre a função miocárdica de ratos obesos. **Dissertação (Mestrado em Fisiopatologia em Clínica Médica)**. Universidade Estadual Paulista Júlio Mesquita Filho, 2010.

CANI, P.D.; BIBILONI, R.; KNAUF, C.; WAGET, A.; NEYRINCK, A.M.; DELZENNE, N.M. Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice. **Diabetes**. v.57, n.6, p.1470-1481, 2008.

CANNON, B.; NEDEGAARD J. Brown adipose tissue: function and physiological significance. **Physiological Research**, v. 84, p. 277-359, 2004.

CARROLL, J. F.; ZENEBE, W. J.; STRANGE, T. B. Cardiovascular function in a rat model of diet-induced obesity. **Hypertension**, v. 48, n. 1, p. 65-72, 2006.

CAVALCANTE-SILVA, L.H.A.; GALVÃO, J.G.F.M.; SILVA, J.S.F.; SALES-NETO, J.M.; MASCARENHAS, S.R. Obesity Driven Gut Microbiota Inflammatory Pathways to Metabolic Syndrome. **Frontiers in Physiology**. v.6, p. 341-352, 2015.

CHAMORRO, G., SALAZAR, M., FAVILA, L., BOURGES, H. Pharmacology and toxicology of *Spirulina* alga. **Revista de Investigación Clínica**, v. 48, p. 389-399, 1996.

CIFERRE, O. Spirulina, the edible microorganism. **Microbiology Reviews**. v.47, p. 551-578, 1983.

CONSIDINE, R.V.; SINHA, M.K.; HEIMAN, M.L.; KRIAUCIUNAS, A.; STEPHENS, T.W.; NYCE, M.R.; OHANNESIAN, J.P.; CHERYL, B.S.N.; C. MARCO, C.C.; MCKEE, L.J.; THOMAS L. BAUER, M.H.S.; M.D.; CARO, J.F. Serum immunoreactive leptin concentrations in normal weight and obese humans. **The New England Journal of Medicine** v.334, n.5, p:292-295, 1996.

CORREIA, A. C. C. **Estudo comparativo da atividade espasmolítica de óleos essenciais de espécies de Annonaceae: *Rollinia leptopetala* R. E. Fries, *Xylopia langsdorfiana* A. St.-Hil. & Tul. e *Xylopia frutescens* Aubl.** 2013. Tese (Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa.

CULBERT, K. M., S. E. RACINE, S.E.; KLUMP, K.L. Hormonal Factors and Disturbances in Eating Disorders. **Current Psychiatry Reports** , v.18, n.7, p. 65, 2016.

CUVELIER, M.E. Antioxidants in: functional foods and introductory course. **Universidade Católica Portuguesa – Escola Superior de Biotecnologia, Porto**, (2001).

DANILA, C. I.; HAMILTON, S. L. Phosphorylation of ryanodine receptors. **Biological Research**, v. 37, n. 4, p. 521–525, 2004.

DE JESUS RAPOSO, M.F.; MORAES, R.M.F.C; MORAES, A.M.M.B. Health applications of bioactive compounds from marine microalgae. **Life Sciences**. v. 93, p. 479–486, 2013.

DIBASE, J. K.; ZHANG, H.; CROWELL, M. D.; KRAJMALNIK-BROWN, R.; DECKER, G. A.; RITTMANN, B. Gut Microbiota and Its Possible Relationship With Obesity. **Mayo Clinic Proceedings**. v. 83, n. 4, p.460-69, 2008.

DIEMEN, V. V.; TRINDADE, E. N.; TRINDADE, M. R. M. Experimental model to induced obesity in rats. **Acta Cirurgia Brasileira**, v. 21, n. 6, p. 425-429, 2006.

DINIZ, Y. S.; Burneiko RM, Seiva FR, Almeida FQ, Galhardi CM, Filho JL, Mani F, Novelli EL Diet compounds, glycemic index and obesity-related cardiac effects. **International Journal of Cardiology**, v. 124, n. 1, p. 92-99, 2008.

DIPLOCK, A.T; CHARLEUX, J.–L.; CROZIER-WILLI, G.; KOK, F.J.; RICE-EVANS, C.; ROBERFROID, M.; STAHL, W; VIÑA-RIBES, J. Functional food science and defence against reactive oxidative species. **British Journal of Nutrition**, v. 80, p. 77-112, 1998.

DONIA, M.; HAMANN, M. T. Marine natural products and their potential applications as anti-infective agents. **Lancet Infectious Diseases**, v.3, n.6, p.338-348, 2003.

DRAPER, H.H; SQUIRES, E.J.; MAHMOODI, H.; WU, J. AGARWAL, S.; HADLEY, M. A comparative evaluation of thiobarbituric acid methods for the determination of malondialdehyde in biological materials. **Free Radical Biology and Medicine**, v.15, n.4, p.353-63, 1993.

DU TOIT, E. F.; NABBEN, M.; LOCHNER, A. A potential role for angiotensin II in obesity induced cardiac hypertrophy and ischaemic/reperfusion injury. **Basic Res Cardiol**, v. 100, n. 4, p. 346-54, 2005.

DUTTA, K.; CARMODY, M. W.; CALA, S. E.; DAVIDORFF, A. J. Depressed PKA activity contributes to impaired SERCA function and is linked to the pathogenesis of glucose-induced cardiomyopathy. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 34, n. 8, p. 985–996, 2002.

EBERSOLE, B.J.; MOLINOFF, P.B. Inhibition of binding of p200-110 to membranes from rat brain and heart by ascorbate is mediated by lipidic peroxidation. **Journal. Pharmacology Experimental Therapeutic**. v. 259, p.337-344, 1991.

EL-DESOKY, G.E., BASHANDY, S.A., ALHAZZA, I.M., AL-OTHMAN, Z.A., ABOUL-SOUD, M.A.M. YUSUF, K. Improvement of mercuric chloride-induced testis injuries and sperm quality deteriorations by *Spirulina platensis* in rats. **Plos one**. v. 8, p. 231-240, 2013.

ERIKSEN, N. T. Production of phycocyanin--a pigment with applications in biology, biotechnology, foods and medicine. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 1, p. 1-14, 2008.

ESTADELLA, D.; OYAMA, L.M.; DÂMASO, A. R.; RIBEIRO, E.B. NASCIMENTO, C.M.O. Effect of palatable hyperlipidic diet on lipid metabolism of sedentary and exercised rats. **Nutrition**, v. 20, p. 218-224, 2004.

FELIPPI, R.S.R., FRANCA, R., SILVA, L.R.; MARQUES, C.D.F. Prevalência de Constipação intestinal em pacientes com obesidade acompanhados no ambulatório de um hospital pediátrico. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**. v. 13, n. 2, p.152-155, 2014.

FENICAL, W. **Oceanography**. v. 19, p. 111, 2006.

FENTON, P. F.; DOWLING, M. T. Studies on obesity. I. Nutritional obesity in mice. **Journal of Nutrition**, v. 49, n. 2, p. 319-31, 1953.

FERNANDES, H. J.; PAULINO, M. F.; MARTINS, R. G. R.; VALADARES FILHO; S. C.; TORRES, R. A.; PAIVA, L. M.; MORAIS, G. F. B. K. Ganho de Peso, Conversão Alimentar, Ingestão Diária de Nutrientes e Digestibilidade de Garrotes Não-Castrados de Três Grupos Genéticos em Recria e Terminação. **Revista Brasileira de Zootecologia**, v. 33, n. 6., p. 2403-2411, 2004.

FERNANDES, S. A. T.; NATALI, A. J.; MATTA, S. L. P.; TEODORO, B. G.; FRANCO, F. S. C.; LATERZA, M. C.; PELUZIO, M. C. G. Efeito da dieta hiperlipídica e do treinamento aeróbico na aterosclerose em camundongos apo E^{-/-}. **Sociedade Brasileira de Medicina do Exercício e do Esporte**. v. 19, n. 6, 2013.

FERNÁNDEZ-SÁNCHEZ, A.; MADRIGAL-SANTILLÁN, E.; BAUTISTA, M.; ESQUIVEL-SOTO, J.; ÁNGEL MORALES-GONZÁLEZ, A.; ESQUIVEL-CHIRINO, C.;

DURANTE-MONTIEL, I.; SÁNCHEZ-RIVERA, G.; VALADEZ-VEJA, C.; MORALES-GONZÁLEZ, J.A. Inflammation, Oxidative Stress, and Obesity. **International Journal of Molecular Sciences**. v. 12, p. 3117-3132, 2011.

FLATT JP. The biochemistry of energy expenditure. In: Bray GA, ed. Recent advances in obesity research. **London: Newman**, 211-228, 1978.

FONSECA-ALANIZ, M.H.; TAKADA, J.; ALONSO-VALE, M.I.; LIMA, F.B. Adipose tissue as an endocrine organ: From theory to practice. **Journal of Pediatrics**, v. 83, p.192–203, 2007.

FONSECA-ALANIZ, M.H.; TAKADA, J.; ALONSO-VALE, M.I.C; LIMA, F.B. O Tecido Adiposo Como Centro Regulador do Metabolismo. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabolismo**. v. 50, n.2, 2006

FRANCISCHI RPP, PEREIRA LO, FREITAS CS, KLOPPER M, SANTOS RC, VIEIRA P, LANCHI JAH. Obesidade: atualização sobre sua etiologia, morbidade e tratamento. **Revista de Nutrição**, v.13, n.1, p.17-28, 2000

FRANCO, L. D. P.; CAMPOS, J. A. D. B.; DEMONTE, A. Teor lipídico da dieta, lipídios séricos e peso corporal em ratos exercitados. **Revista de Nutrição**. v. 22, n.3, p. 359-366, 2009.

FRANCO, L.D.P. Dieta hiperlipídica e exercício físico: conseqüências sobre o metabolismo e a peroxidação lipídica - estudo em modelo animal. **Dissertação (Mestrado em alimentos e nutrição)**. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Araraquara, 2007.

FRÜHBECK, G.; GÓMEZ-AMBROSI, J.; MURUZÁBAL, F. J.; BURRELL, M. A. The adipocyte: a model for integration of endocrine and metabolic signaling in energy metabolism regulation. **American Journal. Physiology Endocrinology. Metabolism**, v.280, p-827-847, 2001

FUKATA, Y.; AMANO, M.; KAIBUCHI, K. Rho–Kaibuchi, K-kinase pathway in smooth muscle contraction and cytoskeletal reorganization of non-muscle cells. **Trends in Pharmacological Sciences**. v. 22, p. 32-39, 2001.

GARLICK PJ, MCNURLAN MA, BALLMER PE. Influence of dietary protein intake on whole-body protein turnover in humans. **Diabetes Care**, v.14, p.1189–1198, 1991.

GASPARETTO D, LOLLO P C B, MOURA C S, PAULA F M M, CARNEIRO E M, AMAYA-FARFAN J. Metabolic Response of Sedentary Normotrophic Rats to Dietary Pre hydrolyzed Whey Proteins. **Food and Public Health**, v.3, p.21-27, 2013

GOMES, R. M. Efeito do exercício físico moderado sobre a obesidade induzida por dieta hiperlipídica em ratos wistar. **Monografia (Licenciatura em Educação Física)**. Universidade Estadual de Maringá. Maringá-Paraná, 2009.

GRANLUND L, JUVET L, PEDERSEN J, NEBB H. *Trans*-10, *cis*-12-conjugated linoleic acid prevents triacylglycerol accumulation in adipocytes by acting as a PPAR γ modulator. **The Journal of Lipid Research**, v. 44, n.8, p.1441-1452, 2003.

GRATÃO, P.L.; POLLE, A.; LEA, P.J.; AZEVEDO, R.A. Making the life of heavy metalstressed plants a little easier. **Functional Plant Biology**, v. 32, n. 6, p. 481-494, 2005.

GREGOR, M. F.; HOTAMISLIGIL, G. S. Inflammatory Mechanisms in Obesity. **Annu. Reviews Immunology**. n. 29, p, 415-445, jan. 2011.

GURNEY, A. M. Mechanisms of drug-induced vasodilation. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 46, n. 4, p. 242-251, 1994

HALLIWELL B, GUTTERIDGE JMC. **Free Radical in Biology and Medicine**. 3^aed. Oxford: Oxford University 10 maio 2007, 704p.

HARO, A. M.; ARTACHO, R.; VIQUE, C. C. Ácido linoleico conjugado: interes actual em nutrición humana. **Medical Clinics**, v. 127, n. 13, p. 508-515, 2006.

HAVALE, S.H.; PAL, M. Medical cheminstry approaches to the inhibition of the dipeptydil peptidase-4 for the treatment of type-2 diabetes. **Bioorganic and medical cheminstry**, v.17, n.5, p. 1783 -1882, 2009.

HENRIKSON, R. **Microalga *Spirulina* – Superalimento del futuro**. Barcelona: Ediciones S.A. Urano, 1994.

HENRIQUES, A.M.P.S.D. Caracterização farmacológica da contração intestinal induzida pela metformina. **Dissertação (Bioquímica)**. Universidade de Coimbra, 2011.

HERMSDORFF, H.H.M.; MONTEIRO, J.B.R. Gordura Visceral, Subcutânea ou Intramuscular: Onde Está o Problema? **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabolismo**. v. 48 n. 6, p. 803-811, 2004.

HIGDON, J.V.; FREI, B. Obesity and oxidative stress: a direct link to cvd? **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**. v.23, p.365-367, 2003.

HIMAYA, A.; FANTINO, M.; ANTOINE, J.M.; BRONDEL, L.; LOUISSYLVESTRE, A. Satiety power of dietary fat: a new appraisal. American **Journal of Clinical Nutrition**, v.65, n.5, p.1410-8, 1997.

HORI, M.; KARAKI, H. Regulatory mechanisms of calcium sensitization of contractile elements in smooth muscle. **Life Science**, v. 62, p. 1689-1633, 1998.

HOUSEKNECHT KL, VANDEN HJP, MOYA-CAMARENA SY, PORTOCARRERO CP, PECK LW, NICKEL KP. Dietary conjugated linoleic acid normalizes impaired glucose tolerance in the Zucker diabetic fatty fa/fa rat. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v. 244, n.3, p.911-917, 1998.

HOWARD, D.W.; LEWIS, E.J.; KELLER, B.J.; SMITH, C.S. **Histological techniques for marine bivalve molluscs and crustaceans**. 2^a ed., 2004, p.218.

HWANG, J.H., CHEN, J., C. AND CHAN, Y.C. Effects of c-phycocyanin and spirulina on salicylate – induced tinnitus, expression of nmda receptor and inflammatory genes. **Plos one**, v.8, n.3, 2013.

INGLE, D. J. A simple means of producing obesity in the rat. Proceedings of **The Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 72, p. 604-5, 1949.

JEQUIER, E. & TAPPY, L. Regulation of body weight in humans. **Physiological Research**, v.79: 451-480, 1999.

KALRA, S.P. Appetite and body weight regulation: is it all in the brain? **Neuron**, v.19, p.227-30, 1997.

KARAKI H; MITSUI-SAITO, M.; AMANO, K.; HARADA, K.; MIYAMOTO, S.; NAKAZAWA, H.; WON, K.; SATO, K. Calcium movements, distribution, and functions in smooth muscle. **Pharmacological Reviews**, v. 49, n. 2, p.157-230, 1997.

KERSHAW EE, FLIER JS. Adipose Tissue as an Endocrine Organ. **Journal Clinical Endocrinology Metabolism** , v. 89, n.6, p.2548-2556, 2004.

KIJJOI, A.; SAWANGWONG, P. Drugs and cosmetics from the sea. **Mar. Drugs**, v. 2, n. 2 p.73-82, 2004.

KIMURA K.; ITO, M.; AMANO, M.; CHIHARA, K.; FUKATA, Y.; NAKAFUKU, M.; YAMAMORI, B.; FENG, J.; NAKANO, T.; OKAWA, K.; IWAMATSU, A.; KAIBUCHI, K. Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rho-associated kinase (Rho-kinase). **Science**, v. 273, p. 248-254, 1996.

KINGSTON, D.G.I. Modern natural products drug discovery and its relevance to biodiversity conservation. **Journal of Natural Products**. v. 7, n.3, p. 496-511, 2011.

KITAZAWA, T.; ETO, M.; WOODSOME, T.P.; BRAUNTINGAM, D.L. Agonists trigger G-protein mediated activation of the CPI-17 inhibitor phosphoprotein of myosin light chain phosphatase to enhance vascular smooth muscle contractility. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, p. 9897-9900, 2000.

KONTUREK, S.J.; KONTUREK, J.W.; PAWLIK, T.; BRZOZOWKI, T. Brain-gut axis and its role in the control of food intake. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v.55, p.137-54, 2004.

KU, C.S., YANG, Y., PARK, Y. AND LEE, J. Health benefits of blue-green algae: prevention of cardiovascular disease and nonalcoholic fatty liver disease. **Journal of Medicinal Food**. v.16, n.2, p.103-111, 2013.

KUDDUS, M.; SINGH, P.; THOMAS, G.; AL-HAZIMI, A. Recent developments in production and biotechnological applications of C-phycoerythrin. **BioMed Research International**, v. 19, p. 1-9, 2013.

KULSHRESHTHA, A., ZACHARIA, A.J., JAROULIYA, U., BHADAURIYA, P., PRASAD, G.B. AND BISEN, P.S. *Spirulina* in health care management. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v.9, n.5, p. 400-405, 2008.

LEE, M.O. Determination of the surface area of the White rat with its application to the expression of metabolic results. **American Journal of Physiology**, 89, p. 24-33, 1929.

LEUNG YM, KWAN CY. Dual vascular effects of leptin via endothelium: hypothesis and perspective. **China Journal of Physiology**.v.51, n.1, v.1-6, 2008.

LEVIN, B. E.; TRISCARI, E.; SULLIVAN, A. C. Metabolic features of diet-induced obesity without hyperphagia in young rats. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, v. 251, n. 3, p. 433-440, 1986.

LIRA, C.A.B., VANCINE, R.L., IHARA, S.S.M., SILVA A.C., ABOULAFIA, J. AND NOUAILHETAS, V.L.A. Aerobic exercise affects C57BL/6 murine intestinal contractile function. **European Journal of Applied Physiology**. v. 103, p.215-223, 2008.

LISSNER, L., HEITMANN, B.L. Dietary fat and obesity: evidence from epidemiology. **European Journal of Clinical Nutrition** v. 49, n. 2, p. 79-90, 1995.

LOLMÈDE K, DURAND DE SAINT FRONT V, GALITZKY J, LAFONTAN M, BOULOUMIÉ A. Effects of hypoxia on the expression of proangiogenic factors in differentiated 3T3-F442A adipocytes. **International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders**, v. 27, p.1187-1193, 2003.

LUMENG, C. N.; BODZIN, J. L.; SALTIEL, A. R. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. **Journal of Clinical Investigation**. v. 117, n. 1. p. 175–184, 2007.

LUPATINI, F. Avaliação do efeito de variáveis produtivas na conversão alimentar de frangos de corte. **Dissertação (Mestrado em Zootecnia)**. Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2015.

MACEDO, I.C. Estresse crônico associado a dieta hipercalórica em ratos Wistar: parâmetros ponderais e bioquímicos. **Mestrado (Ciências Biológicas e Fisiologia)**. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

- MACRINI, D.J. Obesidade e reprodução: efeitos da privação alimentar materna na prole de ratos machos. **Tese (Doutorado em Patologia ambiental e Experimental)**. Universidade Paulista, São Paulo, 2014.
- MALAFAIA, A. B.; NASSIF, P. A. N.; RIBAS, C. A. P. M. R.; ARIEDE, B. L.; SUE, K. N.; CRUZ, M. A. Indução de obesidade com sacarose em ratos. **Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva**, v. 26, p. 17-21, 2013.
- MAUER, M. M.; HARRIS, R. B.; BARTNESS, T. J. The regulation of total body fat: lessons learned from lipectomy studies. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 25, p. 15-28, 2001.
- MAZOKOPAKIS, E.E., STARAKIS, I.K., PAPADOMANOLAKI, M.G., MAVROEIDI, N.G. AND GANOTAKIS, E.S. The hypolipidaemic effects of *spirulina (arthrospira platensis)* supplementation in a cretan population: a prospective study. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.94, n.3, p. 432-437, 2014.
- MCCARTY, M. F. Clinical potential of Spirulina as a source of phycocyanobilin. **Journal of Medicinal Food**, v.10,n.4, p.566–570, 2007.
- MEDINA EA. Conjugated linoleic acid supplementation in humans: effects on circulating leptin concentrations and appetite. **Lipids**. v.35, n.7, p.783-788, 2000.
- MENESES, B.S.; AUGUSTO, M.M.M. Ácido linoléico conjugado. **Vetor**, v. 24, n. 2, p. 14-23, 2014.
- MIKKELSEN PB, TOUBRO S, ASTRUP A. Effect of fat-reduced on 24-h energy expenditure: comparisons between animal protein, vegetable protein and carbohydrate. **American Journal Clinical Nutrition** , v.72:p.1135-1141, 2000.
- MONTEIRO, N.E.S. Efeito das proteínas do soro do leite bovino sobre alterações metabólicas causadas por uma dieta hiperlipídica no camundongo C57BL/6: disbiose intestinal, resposta inflamatória e parâmetros associados. **Dissertação (Mestrado em alimentos e Nutrição)**. Universidade Estadual de Campinas, 2015.
- MORROW, J. Is a oxidative stress a connection between obesity and atherosclerosis. **Arterioscler. Tromb. Vasc. Biol.** 2003, 23, 368–370.
- MURTHY, K. S. Signaling for contraction and relaxation in smooth muscle of the gut. **Annual Review of Physiology**, v. 68, n. 1, p. 345-374, 2006.
- NAGAOKA, S., SHIMIZU, K., KANEKO, H., SHIBAYAMA, F., MORIKAWA, K., KANAMARU, Y., OTSUKA, A., HIRASHI, T. AND KATO, T. A novel protein cphycocyanin plays a crucial role in the hypocholesterolemic action of *spirulina platensis* concentrates in rats. **Journal of Nutrition**. v.135, p. 2425-2430, 2005.
- NASCIMENTO, A. F.; SUGIZAKI, M. M.; LEOPOLDO, A. S.; LIMA-LEOPOLDO, A. P.; LUVIZOTTO, R. A. M.; NOGUEIRA, C. R.; CICOGNA, A. C. A hypercaloric pellet-diet cycle induces obesity and co-morbidities in Wistar rats. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 52, v. 6, p. 968-974, 2008.

NAVES, A.; PASCHOAL, V. Regulação funcional da obesidade. **Conscientia e Saúde**. v.6, n.1, p.189-199, 2007.

NASLUND, E.; HELLSTROM, P.M. Appetite signaling: from gut peptides and enteric nerves to brain. **Physiology Behavior**, v.92, n.1-2, p. 256-262, 2007.

NEELS JG, OLEFSKY JM. Inflamed fat: what starts the fire? **Journal of Clinical Investigation** v.116, n. 1, p.33-5, 2006.

NERY, C. S.; PINHEIRO, I. L.; MUNIZ, G. S.; VASCONCELOS, D. A. A.; FRANÇA, S. P.; NASCIMENTO, E. Medidas murinométricas e eficiência alimentar em ratos provenientes de 27 ninhadas reduzidas na lactação e submetidos ou não ao exercício de natação. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 17, n. 1, p. 49-55, 2011.

NEUBIG, R. R.; SPEDDING, M.; KENAKIN, T.; CHRISTOPOULOS, A. International Union of Pharmacology Committee on Receptor Nomenclature and Drug Classification. XXXVIII. Update on terms and symbols in quantitative pharmacology. **Pharmacological Reviews**, v. 55, n. 4, p. 597-606, 2003.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. **Journal of Natural Products**, v. 75, p. 311-355, 2012.

NGUYEN, X. T.; LANE, J.; SMITH, B. R et al. Changes in inflammatory biomarkers across weightclasses in a representative US population: a link between obesity and inflammation. **Journal of Gastrointestinal Surgery** v.13, p.1205-1212, 2009.

NISHIMATSU, H.; ETSU SUZUKI, E.; HIROSHI SATONAKA, H.; RYO TAKEDA, R.; OMATA, M.; FUJITA, T.; NAGAI, R.; KITAMURA, T.; HIRATA, Y. Endothelial Dysfunction and Hypercontractility of Vascular Myocytes Are Ameliorated by Fluvastatin in Obese Zucker Rats. **American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology**, v.288, n.4, 2005.

NOVELLI, E. L. B.; DINIZ, Y. S.; GALHARDI, C. M.; EBAID, G. M. X.; RODRIGUES, H. G.; MANI, F.; FERNANDES, A.; CIGOGNA, A. C.; NOVELLI FILHO, J. L. V. B. Anthropometrical parameters and markers of obesity in rats. **Laboratory animals**, v. 41, n. 111-119, 2007.

OLIVEIRA GA , SOUZA ILL , BARROS BC , FERREIRA ES , VASCONCELOS LHC , QUEIROGA FR , SILVA PM , ANDRADE LFLI , CAVALCANTE FA , SILVA BA. **Effect of a Hyperlipidic Diet in the Contractile Reactivity and Morphology of Rats Ileum**. 48th Brazillian Congress of Pharmacology and Experimental Therapeutics and The 21st Latin American Congress of Pharmacology (SBFTE), Foz do Iguaçu, Paraná, Brasil, 2016.

OTTAVIANI, E.; MALAGOLI D.; FRANCHESCHINE, C. The evolution of the adipose tissue: a neglected enigma. **General and Comparative Endocrinology**, v. 174, p. 1-4, 2011.

PARISI, A.S., YOUNES, S., REINEHR, C.O., COLLA, L.M. Avaliação da atividade antibacteriana da microalga *Spirulina platensis*. **Revista Ciência Farmácia Básica**, v.30, n.3, p. 297-301, 2010.

PARK Y, ALBRIGHT KJ, LIU W, STORKSON JM, COOK ME, PARIZA MW. Effect of conjugated linoleic acid on body composition in mice. **Lipids**, v.32, n.8, p. 853-858, 1997.

PAULA, T.O Diversidade bacteriana intestinal e parâmetros nutricionais de indivíduos obesos, com sobrepeso e eutróficos. **Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas)**. Universidade Federal de Juiz de Fora, 2016.

PEREIRA, L. O.; FRANCISCHI, R. P.; LANCHA JR, A. H. Obesidade: hábitos nutricionais, sedentarismo e resistência à insulina. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 47, p. 111-127, 2003

PEREIRA, P.C. Efeitos da obesidade induzida por dieta sobre a resposta vascular adaptativa ao estresse agudo em ratos. **Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas)**. Universidade Estadual Paulista Júlio Mesquita Filho, 2011.

PHAM, T.X., PARK, Y.K., AND LEE, J.Y. Anti-Inflammatory Effects of *Spirulina platensis* Extract via the Modulation of Histone Deacetylases. **Nutrients**, v. 8, p. 381-393, 2016.

PIETTA PG. Flavonoids as antioxidants. **Journal Nature Products**, v.63, p.1035-42, 2000.

PORRINI M, SANTANGELO A, CROVETTI R, RISO P, TESTOLIN G, BLUNDELL JE. Weight, protein, fat and timing of preloads affect food intake. **Physiology Behavior**, v.62:p.563-570., 1997

PRUNN, F.B., VAN GELDEREN, A.B. The effect of radical stress and n-ethylmaleimide on rat hepatic α 1-adrenergic receptors. **Toxicol Lett.**, v. 45, p.73-82, 1989.

RADENKOVIC, M.; IVETIC, V.; POPOVIC, M.; MIMICA-DUKIC, N.; VELJKOVIC, S. Neurophysiological effects of Mistletoe (*Viscum album* L.) on isolated rat intestines. **Phytotherapy Research**. v. 20, p. 374–377, 2006.

RADMANN, E.M.; COSTA, J.A.V. Conteúdo lipídico e composição de ácidos graxos de microalgas expostas aos gases CO₂, SO₂ e NO. **Química Nova**, v. 31, n. 7, p.1609-1612, 2009

RAHMAN SM. Effects of conjugated linoleic acid on serum leptin concentration, body-fat accumulation, and β -oxidation of fatty acid in OLETF rats. **Nutrition**, v. 17, n.5, p. 385-90, 2001.

REMBOLD, C. M. Electromechanical and pharmacomechanical coupling. In: Bárány; M. **Biochemistry of smooth contraction**. San Diego, Academic Press, p. 227-239, 1996.

REMBOLD, C. M. Regulation of contraction and relaxation in arterial smooth muscle. **Hypertension**, v. 20, n. 2, p. 129-137, 1992.

RICCIONI, G.; D'ORAZIO, N.; FRANCESCHELLI, S.; SPERANZA, L. Marine carotenoids and cardiovascular risk markers. **Marine Drugs**, v. 9, p. 1166-1175, 2011.

ROBERTS, C.K., BARNARD, R.J., SINDHU, R.Z., JURCZAK, M., EHDAIEH, A., VAZIRI, N.D. Oxidative stress and dysregulation of Nad (p)h oxidase and antioxidant enzymes in diet-induced metabolic syndrome. **Metabolism clinical and experimental**, v.55, p. 928-934, 2006.

ROCHA, V.S. Influência da leptina na reatividade vascular em anéis de aorta de ratos obesos. **Dissertação (Fisiologia, Bioquímica e Exercício em Modelos Experimentais)**. Universidade Federal do Espírito Santo, 2015.

SAINSBURY, A.; COONEY, G.J.; HERZOG, H. Hypothalamic regulation of energy homeostasis. **Best Practice Research Clinical Endocrinology and Metabolism**, v.16, n.4, p.623-637, 2002.

SAMPAIO RC, MORAES C. Estresse oxidativo e envelhecimento: papel do exercício físico. Motriz: **Revista de Educação Física (online)**; v.16:p.506-515, 2010.

SAMUELS, R., MANI, U.V., NAYAK, U.S. Hypocholesterolemic effect of *Spirulina* in patients with hyperlipidemic nephrotic syndrome. **Journal of Medicinal Food**, v.5, p. 91-96, 2002.

SANDERS, K. M. Mechanisms of calcium handling in smooth muscles. **Journal of Applied Physiology**. v. 91, p. 1438-1449, 2001.

SANTOS, A.A.; CARVALHO, C.C.; CHAVES, E.C.L.; GOYATA, S.L.T. Qualidade de pessoas com obesidade grau III: um desafio comportamental. **Revista da Sociedade Brasileira de Clínica Médica**, v.10, p. 384-389, 2012.

SANTOS, C. F. Agonistas PPAR (Rosiglitazona, Bezafibrato e Fenofibrato) e alterações bioquímicas e estruturais em órgãos-alvo de camundongos C57BL/6 alimentados com dieta hiperlipídica rica em sacarose. **Tese (Doutorado em Biologia Humana e Experimental)**. Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.

SBEM. Sociedade brasileira de endocrinologia e metabologia. Obesidade: tratamento. **Projeto diretrizes**, p. 1-7, 2006.

SCHRAUWEN, P.; WESTERTEP, K. R. The role of high-fat diets and physical activity in the regulation of body weight. **Journal of Nutrition**, v. 84, n. 4, p. 417-27, 2000

SCHROEDER, C. I.; SMYTHE, M. L.; LEWIS, R. J. Development of small molecules that mimic the binding of omega-conotoxins at the N-type voltage-gated calcium channel. **Mol Divers**. 2004; v.8, n.2, p.127-34, 2004.

SCHWARTZ, M. V. Staying slim with insulin in mind. **Science**, v.289, p.2066-2067, 2000.

SCLAFANI, A.; SPRINGER, D. Dietary obesity in adult rats: similarities to hypothalamic and human obesity syndromes. **Physiology & Behavior**, v. 17, p. 461-71, 1976.

SENTHILKUMAR, K. Brown seaweed fucoidan: biological activity and apoptosis, growth signaling mechanism in cancer. **Int. Journal. Biologic Macromolecules. Guildford**, v. 60, p.366-374, 2013.

SHERWIN, C. M., CHRISTIANSEN, S. B., DUNCAN, I. J. H., ERHARD, H. W., LAY, D. C., MENCH, J. A., O'CONNOR, C. E., PETHERICK, C. J. Guidelines for the ethical use of animals in applied animal behaviour research. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 81, p. 291-305, 2003

SILVA, F. H.; LANARO, C.; LEIRIA, L. O.; RODRIGUES, R. L.; DAVEL, A. P.; CLAUDINO, M. A.; TOQUE, H. A.; ANTUNES, E. Oxidative stress associated with middle aging leads to sympathetic hyperactivity and downregulation of soluble guanylyl cyclase in corpus cavernosum. **American Journal of Physiology - Heart Circulation Physiology**, v. 307, p. H1393–H1400, 2014.

SILVA, K. M. F. Efeitos da obesidade sobre parâmetros imunológicos, hematológicos e bioquímicos em ratos endotoxêmicos. **Dissertação (Mestrado em Nutrição)**. Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2010.

SILVA, M. C. C. **O óleo essencial de *Lippia microphylla* Cham. (Verbenaceae) modula a via do óxido nítrico para exercer efeito tocolítico em rata**. 2015. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa.

SISK MB, HAUSMAN DB, MARTIN RJ, AZAIN MJ. Dietary conjugated linoleic acid reduces adiposity in lean but not obese Zucker rats. **Journal of Nutrition**. v. 131, n.6, p. 1668-74, 2001.

SOMLYO, A. P.; SOMLYO, A. V.; Signal transduction and regulation in smooth muscle. **Nature**., v. 372, n. 6503, p. 231-236, 1994.

SOMLYO, A. P. AND SOMLYO, A. V. Ca²⁺ sensitivity of smooth muscle and non muscle myosin II: modulated by g proteins, kinases, and myosin phosphatase. **Physiological Reviews**. v. 83, p.1325-1358, (2003).

SOUZA, I.L.L.; BARROS, B.C.; OLIVEIRA, G.A.; VASCONCELOS, L.H.C.; SILVA, M.C.C.; ANDRADE, L.F.L.I.; CAVALCANTE, F.A.; SILVA, B.A. **Hyperlipidic diet establish a rat model of erectile dysfunction: Mechanisms underlying the endothelial damage**. 48th Brazilian Congress of Pharmacology and Experimental Therapeutics and The 21st Latin American Congress of Pharmacology (SBFTE), Foz do Iguaçu, Paraná, Brasil, 2016.

SPEAKMAN, J. R. Obesity: The Integrated Roles of Environment and Genetics. **Journal of Nutrition**, v. 134, p. 2090–2105, 2004.

STEIN CJ, COLDITZ GA. The epidemic of obesity. **Journal Clinical Endocrinology Metabolism**, v.89, n.6, p. 2522-2525, 2004.

STEPHENS, D.N. Does the Lee obesity index measure general obesity? **Physiology Behavior**, 1980;v.25, n.2, p.313-315, 1980.

STUNKARD, A. J.; WADDEN, T.A. **Obesity; theory and therapy**. New York; Rave press, v.1, 1993, 2^a ed.

SURWIT, R.S, FEINGLOS, M.N.; RODIN, J.; SUTHERLAND, A.; PETRO, A.E.; OPARA, E.C, KUHN, C.M.; SCRIVE, M. Differential effects of fat and sucrose on the development of obesity and diabetes in C57BL/6J and A/J mice. **Metabolism** 1995; v.44, p.645 -651, 1995.

TARTAGLIA LA, DEMBSKI M, WENG X, DENG N,CULPEPPER J, DEVOS R, RICHARDS GJ, CAMPFIELD LA, CLARK FT, DEEDS J, MUIR C, SANKER S, MORIARTY A, MOORE KJ, SMUTKO JS, MAYS GG, WOOL EA, MONROE CA, TEPPER RI. Identification and expression cloning of a leptin receptor. OB-R. **Cell**. v. 83, n.7, p.1263-1271, 1995

TAVARES, T.B., NUNES, S.M.; SANTOS, M.O. Obesidade e qualidade de vida: revisão da literatura. **Revista médica de Minas Gerais**. v. 20, n.3, p. 359-366, (2010).

TEIXEIRA, L.G. Interação entre obesidade induzida por dieta hiperlipídica e colite crônica aumenta reciprocamente a inflamação no tecido adiposo e no cólon. **Dissertação (Doutorado em Bioquímica e Imunologia)** Universidade Federal de Minas Gerais, (2012).

TRAYHURN P, WOOD IS. Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue. **British Journal of Nutrition** , v.92, n.3, p.347-355, 2004.

VADIVEL, V.; PUGALENTI, M. Studies on the incorporation of velvet bean (*Mucuna pruriens* var. *utilis*) as an alternative protein source in poultry feed and its effect on growth performance of broiler chickens. **Tropical Animal Health and Production**, v. 42, p. 1367-1376, 2010.

VAN DER VLIET, A. Effect of oxidative stress on receptors and signal transmission. **Chemical and biology interactions**. v. 85, p. 95-116, 1992.

VAN DER VLIET, T.J.R. TUINSTRA, A. B.; BAST, A. Modulation of oxidative stress in the gastrointestinal tract and effect on rat intestinal motility. **Biochemic Pharmacology**, v. 38, p. 2808-2819, 1989.

VARELA, L.; T. L. HORVATH, T.L. Leptin and insulin pathways in POMC and AgRP neurons that modulate energy balance and glucose homeostasis. **EMBO Reports**, v.13, n.12, p.1079- 1086, 2012.

VON DER WEID D, DILLON JC, FALQUET J. Malnutrition: a silent massacre. **Geneve: Antenna Technology**; 2000. 13p.

VERDICH, C.; TOUBRO, S.; BUEMANN, B. MADSEN, J.L.; HOLST J.J. & ASTRUP, A., **International Journal of Obesity**, v.25: 1206-14, 2001.

VINCENT, H. K., LINNES, K.E. AND VINCENT, K. R. Oxidative stress and potential interventions to reduce oxidative stress in overweight and obesity. **Diabetes, Obesity and Metabolism**, v.9, p. 813-839, 2007.

WEBB, R C. Smooth muscle contraction and relaxation. **Advances in Physiology Education**. v. 27, p- 201-206, (2003).

WEISBERG, S. P.; MCCANN, D.; DESAI, M.; ROSENBAUM, M. LEIBEL, R. L.; FERRANTE, A. W. JR. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. **Journal of Clinical Investigation**., v. 112, n. 12, p. 1796-1808, 2003.

WHITE, P.A.S.; CERCATO, L.M.; ARAÚJO, J.M.D.; SOUZA, L.A.; SOARES, A.F.; BARBOSA, A.O.; NETO, J.M.R.; MARÇA, A.C.; MACHADO, U.F.; CAMARGO, E.A.; SANTOS, M.R.V.; BRITO, L.C. Modelo de obesidade induzida por dieta hiperlipídica e associada à resistência à ação da insulina e intolerância à glicose. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabolismo**. v.57, n.5, p.339-345, 2013.

WILLIAMS, G.; BING, C.; CAI, X.J.; HAROLD, J.A.; KING, P.J.; LIU, X.H.- The hypothalamus and the control of energy homeostasis: different circuits, different purposes. **Physiology Behavior**: v.3, p.683-701, 2001.

WINTERBOURN CC, GUTTERIDGE JM, HALLIWELL B. Doxorubicindependent lipid peroxidation at low partial pressures of O₂. **Journal Free Radic Biology Medical**, v. 1, p. 43–49, 1985.

World Health Organization (WHO). **Obesity and overweight**. Geneva, Switzerland, 2011 .

WOOD IS, DE HEREDIA FP, WANG B, TRAYHURN P. Cellular hypoxia and adipose tissue dysfunction in obesity. **Proceedings of the Nutrition Society**. v.68, n.4, p.370-377, 2009.

WOODRUM, D. A.; BROPHY, C. M. The paradox of smooth muscle physiology. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 177, n. 1–2, p.135–143, 2001.

WOODS, S.C.; SEELEY, R.J.; PORTE JR, D. & SCHWARTZ, M.W. Signals that regulate food intake and energy homeostasis. **Science**, v.280, p.1378-1383, 1998

YAMAZAKI, D. A.; SUMILAT, S.; KANNO ET AL. A polybromodiphenyl ether from an Indonesian marine sponge *Lamellodysidea herbacea* and its chemical derivatives inhibit protein tyrosine phosphatase 1B, an important target for diabetes treatment. **Journal of Natural Medicines**, v. 67, n. 4, p. 730– 735, 2013.

YU, BP. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. **Physiology Review**. v.74, p.139 – 161, 1994.

ZEWEIL H., ABAZA, I. M., ZAHRAN, S. M., AHMED, M. H., HAIAM, M., ABOUL-ELA ASMAA, A. S. Effect of *Spirulina platensis* as dietary supplement on some biological traits for chickens under heat stress condition. **Asian Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences**, v.6, n.5, p. 08-12 (2016).

ZHANG, J.; BRICKER, L.; WRAY.S.; QUENBY, S. Poor uterine contractility in obese women. **General obstetrics**, v.114, p.343-348, 2007.

Anexos

Anexo 1 – Certificado da *Spirulina platensis*.

**Dongtai Spirulina
Bio-engineering Co., Ltd.**

Add: 4001 B-Building New World Center 88 Zhujiang Road Nanjing China Zip: 210008
Tel: +86-25-84732011 Fax: +86-25-84730935 or 84732012 FHL (Mobile): 13585177320
http://www.chinaspirulina.com http://www.dongtaibio.com Email: sales@chinaspirulina.com

MATERIAL SAFETY DATA SHEET

Manufacturer's Name: Dongtai Top Bio-engineering Co., Ltd.
Manufacture's Address: No.88 Zhujiang Road, Nanjing, 210008, China
Responsible Person in Charge and Signature:
Jiang yong
Telephone No.: +86-25-84732011
Fax No.: +86-25-84730935
Website.: www.chinaspirulina.com

Section 1. Product Identification

Common Name	Chemical Name	Contents
Spirulina Powder	Arthrospira	Moisture 6%; Protein 60%; Carbohydrate 15%; Crude Fat 8%; Crude Fiber 3%; Crude Ash 9%

Section 2. Hazardous Ingredients
None

Section 3. Physical & Chemical Characteristics

Boiling Point	Gravity	Vapor Pressure (mmHg)
N/A	0.4-0.5 (Bulk Density)	N/A
Percent Volatile by Volume	Vapor Density	Evaporation Rate
N/A	N/A	N/A

Appearance and Odor
Dark blue-green in color. A smell specific to dried seaweed

Flash Point	Extinguisher Media
N/A	Water from the upstream side of the prevailing winds, CO ₂
Auto Ignition Temperature	Unusual Fire and Explosion Hazards
N/A	N/A

Section 4. Physical Hazards

Stability	Incompatibility	Hazardous Decomposition Products
Stable	N/A	Ammonia

Hazardous Polymerization
Will not occur

Section 5. Health Hazards

Threshold Limit Value	Acute Overexposure
N/A	N/A
Chronic Overexposure	Medical Condition Generally Aggravated by Exposures
N/A	N/A

(Continua)

Continuação)

**Dongtai Spirulina
Bio-engineering Co.,Ltd.**

Add: 4001 B-Building New World Center 88 Zhujiang Road Nanjing China Zip: 210008
Tel: +86-25-8 4732011 Fax: +86-25-84730935 or 84732012 TEL (Mobile): 13586177320
<http://www.chinaspirulina.com> <http://www.dtbio.com> Email: sales@chinaspirulina.com

OSHA Permissible Exposure Limit	ACGIH Threshold Limit Value
N/A	N/A
Over Exposure Limit Used	
N/A	
Emergence and First Aid Procedure	
Eye contact: Since scarring on the eyeball could take place, don't rub. Wash out with water.	
Skin contact: Wash out with water.	
Inhalation: Do gargling or wash out with water.	
Ingestion: Wash the inside of the mouth out with water, if necessary.	
Section 6. Special Protection Information	
Respiratory Protection	
Seek professional advice prior to respirator selection and use	
Ventilation	
Provide general and local exhaust ventilation systems to maintain minimum airborne concentrations that promote worker safety and productivity. Local exhaust ventilation is preferred since it prevents contaminant dispersion into the work area by controlling it at its source.	
Protective Gloves	
Put on protective gloves.	
Eye Protection	
Wear protective eyeglasses or chemical safety goggles.	
Other Protective Clothing or Equipment	
Put on protective shoes, protective cap.	
Section 7. Special Precaution and Leak Procedures	
Precaution to be Taken in Handling and Storage	
Make available washing facilities. Do gargling and wash hands and face with water after handling. Store the products in storage temperature NMT 25 °C. Dry and dark, designated storage area to maintain the maximum stability of the product quality.	
Other Precaution	
Avoid contact with water	
Step to be Taken in case Material is Released or Spilled	
Sweep up the released powder and recover it all into a container.	
Disposal	
Incinerable discarded products. Follow applicable regulations.	

Anexo 2 – Certificado de análise do pó da *Spirulina platensis*.

Galena **Certificado de Análise**
Nr.Ctrl.: 0000324/201504G060319801

SPIRULINA NATURAL PO - 1,000 KG

Página: 01

Data de Fabricação: 10/11/2014 **Lote de Fabricação:** 2014007
Data de Validade: 09/11/2016 **País de Origem:** CHINA
Lote Galena (CIQ): 1504023402 **Ordem Fracionamento (OF):** 00692001001

Dados do Requisitante
Requisitante: Galena Química e Farmacêutica Ltda **CNPJ:** 57.442.774/0001-90 **Fone:** 0800 7714 270
Endereço: Rua Pedro Stancato, 860 **Cidade:** Campinas/SP **CEP:** 13.082/050
Classe Terapêutica: Suplemento alimentar

Informações Complementares: Nome Botânico: *Spirulina maxima*, *Spirulina platensis*
Distribuição Geográfica: *Spirulina* cresce em alguns lagos, principalmente aqueles ricos em sais, na América do Sul, América Central e África. Também é cultivada ao ar livre especificamente para serem colhidas para suplementos nutricionais.

Armazenamento: ARMAZ.TEMP.AMB.CONTROLADA, FECHADO, PROTEGIDO DA LUZ E UMIDADE

Análises/Componentes	Especificações	Incerteza de Medição (U)	Resultados das Análises
LABORATORIO FISICO-QUIMICO			
- PERDA POR DESSECAÇÃO (0)	Não mais que 7,0 %	0,17 %	5 %
- CINZAS (0)	Não mais que 7,0 %	0,08%	6,3 %
- ARSENIO * (0)	Não mais que 0,4 ppm		0,32ppm
- CADMIO * (0)	Não mais que 0,2 ppm		0,16ppm
- CHUMBO * (0)	Não mais que 2,0 ppm		1,2ppm
- MERCURIO * (0)	Não mais que 0,05 ppm		0,034ppm
- DENSIDADE APARENTE (0)	0,40 g/mL a 0,60 g/mL		0,46 g/mL
- DENSIDADE COMPACTADA (0)	0,60 g/mL a 0,90 g/mL		0,68 g/mL
- TAMANHO DE PARTICULAS * (0)	100 % passa por 80 mesh		Conforme
- ODOR (0)	Característico		Característico
- SABOR (0)	Característico		Positiv
- IDENTIFICAÇÃO POR TLC * (0)	Positivo		63,8 °
- PROTEÍNA * (0)	Não menos que 60,0 %		Po fir
- ASPECTO (7)	Po fino		Verc
- COR (7)	Azul escuro a verde		
LABORATORIO MICROBIOLOGICO			
- CONTAGEM TOTAL (0)	Não mais que 1000 UFC/g	71	110 UFC
- BOLORES E LEVEDURAS (0)	Não mais que 100 UFC/g	35	10 UFC
- E. COLI (0)	Ausente		Ausente
- S. AUREUS (0)	Ausente		Ausente
- SALMONELLA SP (0)	Ausente		Conform
- COLIFORMES * (0)	Não mais que 90 UFC/g		Negati
- SHIGELLA SPP * (0)	Ausente		

Observações
- Os resultados presentes neste Certificado de Análise tem seus valores restritos a este lote.
* - Análises de acordo com o certificado de análise do fabricante.
- As demais análises foram realizadas no Laboratório de Controle da Qualidade Galena.

Referências: (0)CONFORME METODOLOGIA PROPRIA DO FORNECEDOR; (7)CONFORME METODOLOGIA INTERNA GALENA

- A incerteza expandida de medição relatada é declarada como a incerteza padrão da medição multiplicada pelo fator de abrangência K. Para o ensaio Água por Karl Fisher K=2,52; pH K=2,37; Ponto de Fusão K=2,65; Perda por Dessecação K=2,10; para os demais testes do escopo, K=2, que, para uma distribuição normal, corresponde a uma probabilidade de 95%.
A incerteza padrão de medição foi determinada de acordo com a publicação EA-4/02.

(Continua)

(Continuação)

CERTIFICADO DE ANÁLISE

Substância: ESPIRULINA(36-BR)		Lote: 2014007
Fornecedor: GALENA QUIMICA FARMACEUTICA LTDA		Qtde. Amostras: 0,2G
Dta. Análise: 20/05/2015	Fabricação: 10/11/2014	Validade: 09/11/2016 CAS:
Farmacêutico Responsável: NATALIA BRAGA		CRF: 0000

Análise	Especificação Técnica	Resultado
FORMULA MOLECULAR	Sem especificação	-
PESO MOLECULAR	Sem especificação	-
REVISAO	SEM ESPECIFICAÇÃO	-
PAIS DE ORIGEM	CHINA	-
CATEGORIA	Suplemento nutricional fitoterápico	-
CARACTERES ORGANOLÉPTICOS	Pó fino azul-esverdeado escuro com odor característico	De acordo
ESPECIFICAÇÃO	Sem especificação	-
SOLUBILIDADE	Sem especificação	-
PONTO DE FUSAO	Sem especificação	-
DENSIDADE	Sem especificação	-
DENSIDADE APARENTE	Sem especificação	-
PH	Sem especificação	-
IDENTIFICACAO A	Sem especificação	-
IDENTIFICACAO B	Sem especificação	-
IDENTIFICACAO UV	Sem especificação	-
ACIDEZ	Sem especificação	-
DOSEAMENTO	Sem especificação	-
CONSERVAÇÃO	Manter em recipiente hermeticamente fechado, ao abrigo da luz e umidade	-
OUTROS	SEM ESPECIFICAÇÃO	-
REF. BIBLIOGRÁFICA	Certificado de Análise do Fornecedor	-
MÉTODO DE ANÁLISE	SEM ESPECIFICAÇÃO	-
MATERIAIS ESTRANHOS	SEM ESPECIFICAÇÃO	-
CONTAMINACAO MICROBIOLÓGICA	SEM ESPECIFICAÇÃO	-
UMIDADE	SEM ESPECIFICAÇÃO	-
CINZAS TOTAIS	SEM ESPECIFICAÇÃO	-
CARACTERES MACROSCÓPICOS	SEM ESPECIFICAÇÃO	-
CARACTERES MICROSCÓPICOS	SEM ESPECIFICAÇÃO	-
VOLUME	SEM ESPECIFICAÇÃO	-

Resultado Final: APROVADO (X) REPROVADO ()

Assinatura do Responsável: Natalia Braga

Anexo 3 – Certidão de aprovação do projeto na Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFPB).

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)

**CERTIFICADO**

Certificamos que o projeto intitulado “**Avaliação do efeito da suplementação com *Spirulina platensis* sobre a reatividade contrátil do íleo de ratos obesos**”, protocolo nº **017/2016** sob a responsabilidade da pesquisadora **Profa. Dra. Bagnólia Araújo da Silva** – que envolve a produção, manutenção e/ou a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal da Paraíba (CEUA-UFPB).

Vigência do Projeto	2016 - 2016
Espécie/linhagem	<i>Rattus norvegicus</i> / Wistar
Número de animais	47
Idade/peso	180 g
Sexo	Machos
Origem	Biotério Thomas George - UFPB

Prof. Dr. Ricardo Romão Guerra
Vice-Coordenador CEUA-UFPB