

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA
CURSO DE FARMÁCIA

**EFEITOS DO EXTRATO RICO EM POLIFENOIS DA FOLHA DE *SYZYGIUM
CUMINI* (L.) SKEELS SOBRE A DOENÇA HEPÁTICA GORDUROSA NÃO
ALCOÓLICA EM CAMUNDONGOS COM OBESIDADE INDUZIDA POR L-
GLUTAMATO MONOSSÓDICO**

IVANA LETÍCIA SANTOS SOUZA

São Luís – MA

2018

IVANA LETÍCIA SANTOS SOUZA

EFEITOS DO EXTRATO RICO EM POLIFENÓIS DA FOLHA DE *SYZYGIUM CUMINI* (L.) SKEELS SOBRE A DOENÇA HEPÁTICA GORDUROSA NÃO ALCOÓLICA EM CAMUNDONGOS COM OBESIDADE INDUZIDA POR L-GLUTAMATO MONOSSÓDICO

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à banca examinadora do Curso de Farmácia da Universidade Federal do Maranhão/UFMA, como requisito para obtenção do título de Bacharel em Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. Antônio Marcus de Andrade Paes

Co-orientador: Prof. Dr. Vinicyus Teles Chagas

São Luís – MA

2018

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Núcleo Integrado de Bibliotecas/UFMA

Souza, Ivana Letícia Santos.

EFEITOS DO EXTRATO RICO EM POLIFENÓIS DA FOLHA DE SYZYGIUM CUMINI L. SKEELS SOBRE A DOENÇA HEPÁTICA GORDUROSA NÃO ALCOÓLICA EM CAMUNDONGOS COM OBESIDADE INDUZIDA POR L-GLUTAMATO MONOSSÓDICO / Ivana Letícia Santos Souza. - 2018.

41 f.

Coorientador(a): Vinicyus Teles Chagas.

Orientador(a): Antônio Marcus de Andrade Paes.

Monografia (Graduação) - Curso de Farmácia,
Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2018.

1. Compostos polifenólicos. 2. DHGNA. 3. Syzygium cumini. I. Chagas, Vinicyus Teles. II. Paes, Antônio Marcus de Andrade. III. Título.

IVANA LETÍCIA SANTOS SOUZA

EFEITOS DO EXTRATO RICO EM POLIFENÓIS DA FOLHA DE *SYZYGIUM CUMINI* (L.) SKEELS SOBRE A DOENÇA HEPÁTICA GORDUROSA NÃO ALCOÓLICA EM CAMUNDONGOS COM OBESIDADE INDUZIDA POR L-GLUTAMATO MONOSSÓDICO

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à banca examinadora do Curso de Farmácia da Universidade Federal do Maranhão/UFMA, como requisito para obtenção do título de Bacharel em Farmácia.

Data de aprovação: São Luís - MA, ____/____/____.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Antônio Marcus de Andrade Paes (Orientador)
Universidade Federal do Maranhão

Profa. Dra. Denise Fernandes Coutinho
Universidade Federal do Maranhão

Prof. Ms. Péricles Mendes Nunes
Universidade Estadual do Maranhão

Dedico este trabalho ao meu pai (in memoriam), Ivanil Evagelista Souza, por todo o amor e incentivo exalado a mim durante a sua estadia aqui na Terra.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a **Deus**, por ser o perfeito criador, nos fazer a sua imagem e semelhança e ter me dado a vida. Essa dádiva deve ser valorizada, por isso tenho coragem para buscar meus objetivos a cada amanhecer do dia.

A minha família, por me ensinarem o sentido do amor ao próximo, partilha e felicidade. Sobretudo um agradecimento mais que especial a minha mãe, **Antonilde Monteiro Santos Souza**, por ser exemplo de mulher perseverante e de garra, meu espelho de vida, e a minha irmã, **Jessica Raiane Santos Souza**, pela cumplicidade desde o ventre de nossa mãe. Vocês são meu alicerce de vida, meu porto seguro e incentivo diário. Sempre acreditam em mim, até mesmo quando eu acho que não conseguirei. E não poderia deixar de citar minhas meninas, as quais nos intitulamos carinhosamente de “**bicho solto**”. Vocês são a alegria dos meus dias e motivo da recarga da minha bateria. Obrigada por tudo, família, amo vocês demais.

A minha família científica, o **Laboratório Experimental de Fisiologia (LEFsisio)**, os quais me acolheram de braços abertos. Tenho um carinho enorme por cada um de vocês, em especial o meu orientador, **Antonio Marcus de Andrade Paes**, que desde quando foi meu professor, fiquei apaixonada pelo seu amor à docência e o fazer científico. O senhor é incrível, nunca vi alguém para saber de tanta coisa, e dos mais variados assuntos, desde a ciência até a literatura. Quando crescer, quero ter só um pouquinho dessa dedicação toda. Agradeço também ao meu co-orientador, **Vinicyus Chagas** e ao meu braço direito (e esquerdo também) **Caio Coêlho**, por me guiarem tão bem nessa jornada científica. Pelos sábados, domingos e feriados de experimentos, pelos ensinamentos e por aguentarem durante várias tardes e noites. Muito obrigada!

A minha família acadêmica, a **Turma 86 (141)**, pelos 5 anos intensamente vividos, pela amizade e companheirismo, pelas gargalhadas e desesperos, pelas conquistas e confraternizações que não tivemos (agora vai!). Todos vocês, sem exceção, foram fundamentais para a construção do meu ser. “**Abôrinhas**”, “**FitTretas**” e “**Tricotas**”, vocês moram no meu coração. Eu sou super suspeita para falar, mas como as outras pessoas mesmo dizem: vocês são a melhor turma!! Vocês vão longe, obrigada, obrigada e obrigada!

A **Rafael dos Anjos**, pelos momentos únicos de confiança e força. Obrigada!

O meu muito obrigada a todos que, direta ou indiretamente, fizeram parte da conquista dessa etapa na minha vida, e me moldaram a pessoa que sou hoje.

“A persistência é o caminho do êxito”

Charles Chaplin

RESUMO

A obesidade é uma das condições metabólicas mais prevalentes da sociedade moderna e advém do desequilíbrio crônico entre a energia gasta e as calorias ingeridas. É um fator de risco para a doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA), a qual é decorrente do acúmulo excessivo de lipídios no fígado, tendo prevalência global de 82% em indivíduos obesos. Assim, a busca por alternativas terapêuticas desperta o interesse pelas plantas medicinais, dentre elas *Syzygium cumini*, pertencente à família Myrtaceae e conhecido popularmente como jambolão. Com isso, o objetivo deste trabalho foi investigar os efeitos do extrato rico em polifenóis (ERP) e da miricetina (MCT) sobre a DHGNA de camundongos com obesidade induzida por L-glutamato monossódico. Para tanto, obteve-se o ERP das folhas de *Syzygium cumini*, a partir dos processos de maceração, centrifugação, concentração, partição e liofilização, utilizando-o como tratamento para a desordem metabólica de camundongos da espécie *Mus musculus*, linhagem Swiss, com 120 dias de vida. Estes foram divididos em 4 grupos experimentais: controle (dose de 0,1 mL/Kg/dia de soro fisiológico 0,9%), obeso (dose de 0,1 mL/Kg/dia de soro fisiológico 0,9%), obeso + ERP (dose de 0,5 g/Kg/dia de ERP) e obeso + MCT (dose de 0,5 g/Kg/dia de miricetina), todos administrados através de gavagem, durante 45 dias. Foram realizados acompanhamento de peso, comprimento nasoanal, perfil glicolipídico e bioquímico durante todo o período observacional. Ao final do tratamento, foi realizada a coleta do fígado para análise histológica, além da avaliação da atividade antioxidante do ERP, a partir do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH[•]). Observou-se que tanto o ERP quanto a MCT apresentam efeitos anti-obesogênicos: diminuíram consideravelmente a glicemia de jejum, a resistência à insulina e a hipertrigliceridemia dos animais obesos tratados, quando comparados ao controle magro. Além disso, o ERP atenuou significativamente a esteatose hepática dos animais tratados, enquanto que a MCT foi capaz de reverter completamente todos os parâmetros da DHGNA dos animais tratados. Quanto a atividade antioxidante, o ERP se demonstrou altamente eficiente, visto que foi capaz de eliminar rapidamente os radicais DPPH[•]. Portanto, a espécie *Syzygium cumini* é uma alternativa promissora de tratamento para doenças metabólicas de cunho degenerativo-crônico associadas ao estresse oxidativo, por possuir elevada quantidade de compostos polifenólicos, sobretudo a MCT.

Palavras-chave: DHGNA, compostos polifenólicos, *Syzygium cumini*.

ABSTRACT

Obesity is one of the most prevalent metabolic conditions in modern society and stems from the chronic imbalance between the energy expended and the calories ingested. It is a risk factor for non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD), which is due to excessive accumulation of lipids in the liver, with a global prevalence of 82% in obese individuals. Thus, the search for therapeutic alternatives arouses interest in medicinal plants, among them *Syzygium cumini*, belonging to the family Myrtaceae and popularly known as jambolan. With this, the objective of this work was to investigate the effects of polyphenol-rich extract (PRE) and myricetin (MCT) on the NAFLD of mice with obesity induced by monosodium L-glutamate. For this, the PRE of the leaves of *Syzygium cumini* was obtained from the maceration, centrifugation, concentration, partition and lyophilization processes, using it as a treatment for the metabolic disorder of *Mus musculus*, Swiss strain, with 120 days of life. These were divided into 4 experimental groups: control (dose of 0.1 mL/Kg/day of saline 0.9%), obese (dose of 0.1 mL/Kg/day of saline 0.9%), obese + ERP (dose of 0.5 g/Kg/day of PRE) and obese + MCT (dose of 0.5 g/Kg/day of myricetin), all administered through gavage, for 45 days. Weight, nasoanal length, glycolipid and biochemical profile were monitored throughout the observational period. At the end of the treatment, the liver was collected for histological analysis, in addition to the evaluation of the antioxidant activity of the PRE, from the free radical 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl (DPPH[•]). It was observed that both PRE and MCT had anti-obesogenic effects: they considerably decreased the fasting glycemia, insulin resistance and hypertriglyceridemia of treated obese animals, when compared to lean control. In addition, PRE significantly attenuated the hepatic steatosis of the treated animals, whereas MCT was able to completely reverse all the parameters of the NAFLD of the treated animals. Regarding antioxidant activity, PRE was highly efficient, since it was able to eliminate DPPH[•] radicals rapidly. Therefore, the species *Syzygium cumini* is a promising alternative treatment for metabolic diseases of degenerative-chronic association with oxidative stress, because it has a high amount of polyphenolic compounds, especially MCT.

Key-words: NAFLD, polyphenolic compounds, *Syzygium cumini*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** – Imagem de uma espécie de *Syzygium cumini* e seus frutos do campus Dom Delgado da Universidade Federal do Maranhão (UFMA), São Luís - MA..... 15
- Figura 2** – Alguns compostos polifenólicos majoritários de *Syzygium cumini* e seus possíveis mecanismos de ação sobre a síndrome metabólica..... 16
- Figura 3** – Avaliação da evolução ponderal e comprimento nasoanal de camundongos *Mus Musculus*..... 22
- Figura 4** – Avaliação do Índice de Lee de camundongos *Mus Musculus*..... 23
- Figura 5** – Avaliação do peso corporal e do Índice de Lee de camundongos *Mus Musculus* após tratamento..... 24
- Figura 6** – Avaliação da glicemia de jejum de camundongos *Mus musculus* antes e após tratamento..... 25
- Figura 7** – Avaliação do TyG de camundongos *Mus musculus* antes e após tratamento..... 27
- Figura 8** – Avaliação dos triglicerídeos séricos de camundongos *Mus musculus* antes e após tratamento..... 28
- Figura 9** – Análise histológica..... 30
- Figura 10** - Capacidade antioxidante do ERP contra os radicais 1,1-difenil-2-picrilidrazilo (DPPH')..... 32

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGL	Ácidos Graxos Livres
CCBS	Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
COMT	Catecol-O-MetilTransferase
CTR	Controle
DHGNA	Doença Hepática Gordurosa Não-Alcoólica
DPPH'	2,2-Difenil-1-Picril-Hidrazil
EHNA	Esteato-Hepatite Não-Alcoólica
ERP	Extrato Rico em Polifenóis
GLUT-4	Transportador de glicose 4
HESc	Extrato Hidroalcoólico de <i>Syzygium cumini</i>
HMG-CoA	3-Hidroxi-3-Metil-Glutaril-Coenzima A
IL	Índice de Lee
IMC	Índice de Massa Corporal
MCT	Miricetina
MSG	L-Glutamato Monossódico
M/V	Massa/Volume
RPM	Rotação por minuto
TG	Triglicerídeos
UFMA	Universidade Federal do Maranhão
VLDL	Lipoproteína de muito baixa densidade
V/V	Volume/Volume

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	13
2 REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1 Obesidade: causas e consequências	15
2.2 Desordens metabólicas no contexto da obesidade: a DHGNA.....	16
2.3 Alternativas terapêuticas: <i>Syzygium cumini</i>	17
3 OBJETIVOS.....	21
3.1 Objetivo geral	21
3.2 Objetivos específicos	21
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	22
4.1 Material botânico e obtenção do Extrato Rico em Polifenóis	22
4.2 Animais e indução da obesidade por L-glutamato monossódico.....	22
4.3 Desenho Experimental	23
4.4 Histologia hepática	23
4.5 Atividade antioxidante	24
4.6 Análise estatística dos resultados.....	24
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
5.1 Avaliação metabólica.....	25
5.2 Avaliação da atividade antioxidante	34
6 CONCLUSÃO.....	36
REFERÊNCIAS	37
ANEXO	42

1 INTRODUÇÃO

A obesidade é uma condição metabólica frequente na sociedade moderna, devido ao consumo das altas concentrações de carboidratos e lipídios existentes nas dietas contemporâneas (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA PARA O ESTUDO DA OBESIDADE E DA SÍNDROME METABÓLICA, 2016). O início cada vez mais precoce desse distúrbio em crianças e adolescentes está aumentando de maneira rápida e significativa, sendo apontado pela Organização Mundial de Saúde como um dos maiores problemas de saúde pública no mundo (ABARCA-GÓMEZ et al., 2017). Este cenário é preocupante, uma vez que a obesidade representa fator de risco para o desenvolvimento de outras doenças metabólicas, como as dislipidemias, diabetes mellitus tipo 2, a hipertensão arterial e doenças cardiovasculares, além da doença hepática gordurosa não-alcóolica (DHGNA) (YOUNOSSI et al., 2016).

A DHGNA possui associação com manifestações da síndrome metabólica como resistência à insulina, dislipidemia, além da obesidade (Masarone et al., 2014), sendo que a DHGNA está presente em 82% dos indivíduos obesos em todo o mundo (YOUNOSSI et al., 2018). O excesso de tecido adiposo induz a lipólise, favorecendo o acúmulo de ácidos graxos livres (AGL) em outros tecidos e, conseqüentemente, levando ao quadro de resistência insulínica (ATTIE & SCHERER, 2009). Dentre os órgãos que primeiro são afetados por essas alterações adipocitárias, destaca-se o fígado que, como tecido lipogênico que é, sintetiza triglicerídeos (TG) tanto a partir do maior influxo de AGL, como através da lipogênese *de novo* de lipídeos, processo gerado a partir desse acúmulo de lipídeos, fazendo com que haja uma diminuição da sensibilidade à insulina no tecido hepático, que juntamente com a hiperinsulinemia compensatória, resulta na resistência insulínica periférica. Esse maior acúmulo de gordura hepática faz com que ele exporte mais TG na forma de lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL), resultando no desenvolvimento da hipertrigliceridemia e DHGNA (CHOI e GINSBERG, 2011).

A busca por novas alternativas no tratamento da DHGNA desperta o interesse pelo estudo de plantas medicinais, pois o reino vegetal representa uma rica fonte de metabólitos ativos que podem ser utilizados para a formulação de novos medicamentos (RATES, 2001; CHAGAS et al., 2015). Portanto, apesar dos inegáveis avanços observados na medicina moderna nas últimas décadas, as espécies vegetais ainda são alvo de interesse de

estudos e pesquisas científicas, sendo responsáveis por 25% da origem dos medicamentos utilizados atualmente (ROSA, et al., 2012).

Os onerosos processos de obtenção dos medicamentos tradicionais sintéticos, os potenciais efeitos adversos destes - principalmente em politerapias - além dos duradouros e dispendiosos tratamentos para doenças metabólicas (YANOVSKI and YANOVSKI, 2014; CHAGAS et al., 2015) são fatores que levaram o Ministério da Saúde a contribuir e fomentar o desenvolvimento científico do estudo das plantas medicinais. Uma destas contribuições foi a elaboração da Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (RENISUS), constituída de algumas espécies vegetais com potencial terapêutico, baseada no uso tradicional regional, visando novas alternativas para o tratamento de doenças, onde destaca-se a espécie *Syzygium cumini* (L.) Skeels (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009).

Syzygium cumini (Myrtaceae) possui ampla distribuição no Brasil e tradicionalmente tem sido empregado no tratamento de vários distúrbios metabólicos, como diabetes mellitus tipo 2 (TROJAN-RODRIGUES et al., 2012.), controle da obesidade (CERCATO et al., 2015) e da hipertensão (RIBEIRO et al., 2014). Diversas propriedades farmacológicas são descritas para a espécie, como atividade antiviral, anti-inflamatória, antialérgica, antiulcerogênica, cardioprotetora, hepatoprotetora, antioxidante e anticancerígena, devido à presença de metabólitos secundários com potencial terapêutico (BALIGA et al., 2011; ULLA et al., 2017).

O extrato hidroalcoólico da folha de *Syzygium cumini* possui elevada atividade antioxidante, o que confere-lhe uma atuação importante contra as doenças de cunho crônico-degenerativas, como a síndrome metabólica (CHAGAS et al., 2018). Além disso, melhora a sensibilidade à insulina e a função das ilhotas pancreáticas, reduz a hipertrigliceridemia e esteatose hepática (SANCHES et al., 2016) e possui atividades anti-hiperglicêmicas e anti-inflamatórias (AJIBOYE et al., 2018).

Tomando-se como base os crescentes estudos voltados às frações do extrato de *Syzygium cumini*, objetiva-se investigar os efeitos do extrato rico em polifenóis e da miricetina, flavonoide previamente identificado nas folhas desta espécie, no metabolismo lipídico associado à obesidade e sobre a DHGNA em camundongos com obesidade induzida por L-glutamato monossódico.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Obesidade: causas e consequências

A obesidade é determinada pelo desequilíbrio crônico entre a energia gasta e as calorias ingeridas, levando a um saldo energético positivo. Esse saldo calórico é armazenado nas células, principalmente nos adipócitos, na forma de triglicerídeos, que se acumulam cada vez mais, resultando em excesso de tecido adiposo e aumento de peso. Essa epidemia do século 21, como essa doença crônica é considerada, vem aumentando vertiginosamente, mas teve seu alicerce construído na década de 1970, a partir de profundas mudanças no padrão alimentar e comportamental da sociedade, sobretudo nos países ocidentais (POPKIN et al., 2012).

O panorama da obesidade no Brasil também é alarmante. Segundo o último inquérito domiciliar de vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas, 54,0% da população adulta de todas as 27 capitais, está com excesso de peso, ou seja, mais da metade da população brasileira, sendo esta proporção maior entre homens (57,3%) do que entre mulheres (51,2%). Já em relação aos adultos clinicamente obesos, a frequência foi de 18,9%, sem diferença entre os sexos (BRASIL, 2018).

A obesidade é fator de risco para o desenvolvimento da DHGNA, bem como a hiperglicemia, diabetes mellitus tipo 2, hipertensão arterial e hipertrigliceridemia. Dentro deste quadro, uma proporção de pacientes desenvolve a esteato-hepatite não-alcoólica (EHNA), uma forma mais acentuada desta doença, a qual é associada à resistência à insulina e à disfunção mitocondrial, a partir do estresse oxidativo (COLLISON, et al., 2010). Dentre essas transformações, destaca-se o consumo exacerbado de alimentos e bebidas de alto teor calórico, alimentos processados, aumento da ingestão de alimentos fora de casa e do uso de óleos comestíveis, além da redução na prática de atividades físicas e aumento do sedentarismo, sendo esses fatores as principais causas da obesidade na sociedade atual (POPKIN et al., 2012).

Em animais, a obesidade e resistência insulínica podem ser induzidas experimentalmente através de injeções de L-glutamato monossódico (MSG), utilizando-se a administração subcutânea durante o período neonatal. O mecanismo pelo qual o MSG atua é através de lesões do núcleo arqueado, o que desencadeia uma disfunção na regulação da saciedade e alimentação dos animais, áreas estas insuficientemente protegidas por uma

barreira hematoencefálica imatura, além de provocar desregulação na secreção do hormônio do crescimento (FRANÇA, 2018). Além disso, essa administração neonatal de MSG também afeta o metabolismo de lipídios, resultando em acúmulo de gordura na vida adulta e mudanças na distribuição de gordura, bem como pode causar esteatose microvesicular hepática, inflamação e displasia em camundongos (COLLISON, et al., 2010).

2.2 Desordens metabólicas no contexto da obesidade: a DHGNA

A DHGNA merece destaque no cenário das doenças metabólicas, uma vez que é a principal doença hepática crônica no mundo. Esta é desencadeada quando a síntese de lipídios é maior do que a capacidade hepática de exportação e/ou oxidação destes (LONARDO et al., 2016). A confirmação da DHGNA é dada a partir da evidência de esteatose hepática por imagem ou histologia, além da ausência de causas secundárias de acúmulo de gordura hepática, como o etilismo, uso crônico de medicação esteatogênica ou distúrbios genéticos hereditários (CHALASANI et al., 2018).

O espectro da histopatologia da DHGNA varia desde a esteatose simples, com acúmulo de gordura nos hepatócitos, até a esteato-hepatite, que inclui inflamação tecidual e balonização dos hepatócitos, com risco progressivo de fibrose, que pode levar à cirrose. O estágio final da evolução dessa doença culmina com o carcinoma hepatocelular, resultando na perda de atividade da unidade funcional do fígado, o hepatócito (YEH and BRUNT, 2008; CHALASANI et al., 2018).

A patogênese da DHGNA no contexto da obesidade acontece a partir do maior influxo de AGL, advindo de um tecido adiposo hipertrófico e que provoca a resistência à insulina. Em condições fisiológicas, esses lipídeos em excesso seriam oxidados no interior da mitocôndria. Todavia, esse excesso de AGL, típico de indivíduos obesos, são transformados diretamente em TG. Juntando a isso, a síntese desse último é potencializada pela lipogênese *de novo* de lipídeos. Essa lipotoxicidade provoca uma diminuição da sensibilidade à insulina no tecido hepático, induzindo a resistência insulínica no fígado. Assim, os novos AGL serão esterificados, formando mais TG e resultando na DHGNA. Concomitante a esse processo, o excesso de glicose e insulina resultantes da resistência à insulina desencadeiam a diabetes mellitus tipo 2 (FRANÇA, 2018).

2.3 Alternativas terapêuticas: *Syzygium cumini*

Até o momento, não há nenhum fármaco, aprovado pelos órgãos de regulamentação, indicado para o tratamento da DHGNA (RINELLA and SANYAL, 2016). Entretanto, muitos estudos científicos são desenvolvidos, sobretudo na área de produtos naturais, o que torna-os novas alternativas para o tratamento de doenças crônicas. Dentre as espécies de plantas medicinais com potencial terapêutico, tem-se *Syzygium cumini*, pertencente à família Myrtaceae, uma das maiores da flora brasileira. Esta família distribui-se vastamente nas regiões tropicais e subtropicais, sendo composta por 121 gêneros, com 3800 a 5800 espécies no mundo inteiro (STEFANELLO et al., 2011; WILSON, 2011).

O gênero *Syzygium*, um dos maiores da família Myrtaceae, compreende por volta de 1100 espécies nativas dos trópicos, particularmente América tropical e Austrália (AYYANAR and SUBASH-BABU, 2012). Por possuir dimensões continentais, o Brasil é detentor de uma rica diversidade biológica, sendo um dos principais países que apresenta grande diversidade desta família. Encontram-se, aproximadamente, 24 gêneros e 986 espécies de árvores e arbustos em território nacional, espalhados nos diversos estados da região norte, sudeste, sul e nordeste (SOBRAL et al., 2013), sobretudo no estado do Maranhão, onde é facilmente encontrada, principalmente nas regiões litorâneas, de clima quente e úmido (**Figura 1A**) (RIBEIRO, 2007).

Estudos científicos mostram que os extratos das várias partes de *Syzygium cumini* possuem um amplo espectro de atividades farmacológicas: a casca do caule é digestiva, hipoglicêmica, antihelmíntica e antibacteriana; as frutas e sementes são usadas para tratar diabetes, faringite, esplenopatias e micoses; já as folhas possuem uma propriedade antibacteriana e também são amplamente utilizadas para tratar diabetes, constipação, leucorreia, febre, gastropatias e dermatopatias (SRIVASTAVA and CHANDRA, 2013). Outras propriedades e usos tradicionais também já foram descritos: antidiarreica, antiviral, anti-inflamatória, antialérgica, antiulcerogênica, cardioprotetora, hepatoprotetora, antioxidante e anticancerígena. (BALIGA et al., 2011).

Do ponto de vista fitoquímico, a espécie é rica em compostos das várias rotas do metabolismo secundário. Suas folhas apresentam altos níveis de flavonoides, especialmente quercetina, miricetina e seus derivados glicosídicos, além de saponina, taninos hidrossolúveis e fenóis simples, como ácido elágico e ácido gálico (MAHMOUD et al., 2001; RUAN et al., 2008; CHAGAS et al., 2015).

Na casca do caule são encontrados isoquercetina, quercetina e miricetina (RUGGIERO, 2004; MIGLIATO et al., 2006; BALIGA et al., 2011). No fruto, são encontradas as antocianidinas, como cianidina, delphinidina e petudinina, responsáveis pela sua coloração roxa brilhante, como observado na figura 1B (MIGLIATO et al., 2006; FARIA et al., 2011; RAMYA et al., 2012; CHAGAS et al., 2015). Em relação às sementes, há maior quantidade de taninos hidrolisáveis derivados do ácido hexahidroxi-difênico – HDDP e terpenos, como o α -terpineol e o eugenol (AYYANAR and SUBASH-BABU, 2012; RAMYA et al., 2012; CHAGAS et al., 2015), carotenoides, além de óleos essenciais e materiais resinosos (MIGLIATO et al., 2006). Por fim, as flores apresentação composição química similar às sementes (MIGLIATO et al., 2006; BALIGA et al., 2011).



Figura 1 - (A): Imagem de uma espécie de *Syzygium cumini* do campus Dom Delgado da Universidade Federal do Maranhão (UFMA), São Luís – MA. (B): Detalhes das folhas e frutos desta espécie. Fonte: próprio autor.

Como observa-se, a espécie possui muitos compostos fenólicos, como flavonoides e seus derivados glicosilados, além de taninos, metabólitos presentes em elevadas concentrações nas sementes e, sobretudo, nas folhas, o que confere-lhe alta capacidade antioxidante (RICE-EVANS et al., 1997; RUAN et al., 2008; LOSADA-BARREIRO et al., 2017). Essa atividade é advinda de compostos específicos que desempenham mecanismos atuantes no estresse do retículo endoplasmático e que são de fundamental importância no contexto da síndrome metabólica, além de atuarem no metabolismo da glicose, a nível do seu transportador, atuando na sensibilização da insulina e melhorando o quadro de resistência e, conseqüentemente, da diabetes mellitus tipo 2, como demonstrado na figura 2 (FRANÇA et al., 2018).

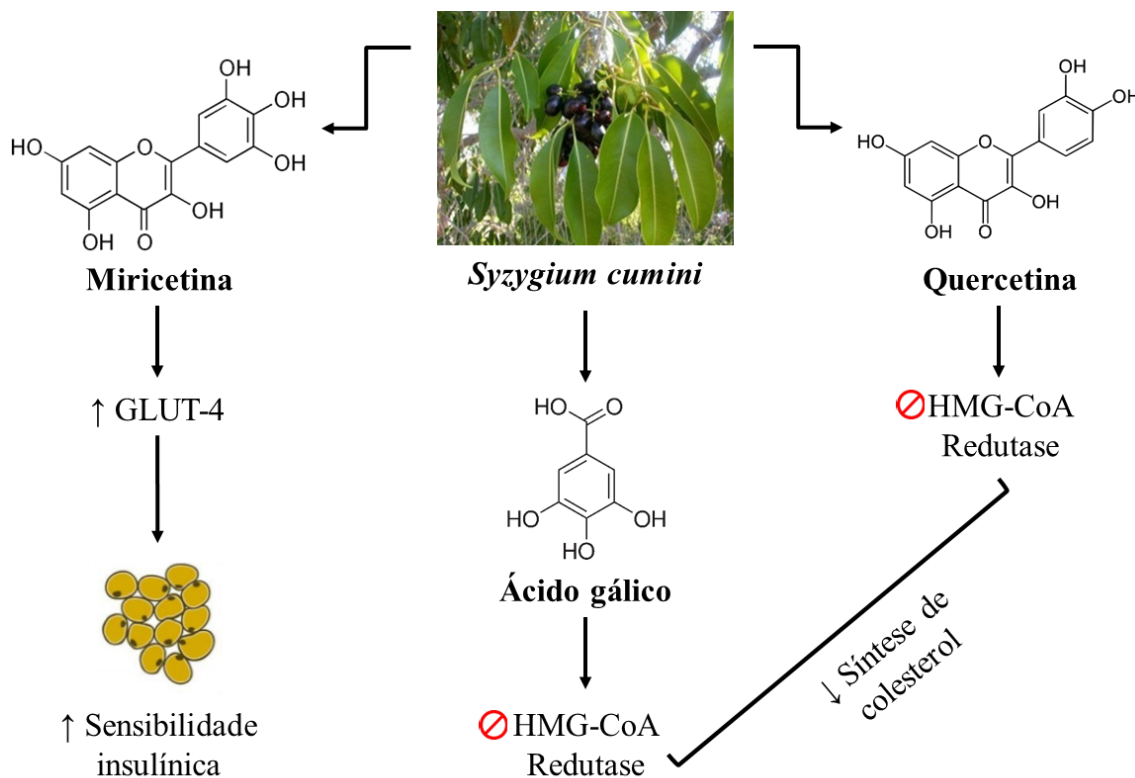


Figura 2 - Alguns compostos polifenólicos majoritários de *Syzygium cumini* e seus possíveis mecanismos de ação sobre a síndrome metabólica. A miricetina, por favorecer o aumento da expressão do GLUT-4 no tecido adiposo, melhora a sensibilidade insulínica periférica. O ácido gálico e a quercetina, por inibirem a HMG-CoA redutase hepática, diminuem a síntese de colesterol. Fonte: FRANÇA (2018) com modificações.

Na literatura, muitos são os estudos em animais que avaliam os efeitos do tratamento com extratos de *Syzygium cumini* (predominantemente utilizando o extrato hidroalcoólico) em roedores que apresentam distúrbios metabólicos: Sanches et al. (2016) avaliaram o tratamento com extrato hidroalcoólico das folhas de *Syzygium cumini* em ratos obesos induzidos por MSG. Posteriormente, França (2018) caracterizaram os efeitos do extrato hidroalcoólico das folhas de *Syzygium cumini* sobre a esteatose hepática de camundongos obesos MSG. Por último, Chagas et al. (2018) caracterizaram os efeitos do extrato rico em polifenóis em ratos diabéticos induzidos por aloxana.

O Laboratório Experimental de Fisiologia (LEFisio) têm desenvolvido projetos voltados ao tratamento de roedores que apresentam síndrome metabólica, utilizando esta espécie vegetal em busca da elucidação dos seus mecanismos de ação atuantes e caracterização da composição química desta. Nos trabalhos de Sanches et al. (2016) e França (2018), o tratamento com extrato hidroalcoólico de *Syzygium cumini* foi capaz de reduzir níveis séricos de triglicerídeos, colesterol e glicemia. Também foi possível verificar a redução no acúmulo de depósitos de gorduras (hepático, mesentérica, retroperitoneal e periepídídima) dos animais obesos.

A partir dos relevantes dados biológicos obtidos anteriormente, manifestou-se o interesse de avaliar as consequências do tratamento com extrato rico em polifenóis sobre a DHGNA, a partir de camundongos obesos MSG, sobretudo o reflexo da miricetina, principal flavonoide existente no ERP das folhas de *Syzygium cumini*, em relação às desordens metabólicas, principalmente porque esta ainda é pouco caracterizada na literatura em relação a esse parâmetro.

Dessa forma, buscando-se o aprofundamento nas investigações sobre o efeito hipolipemiante de *Syzygium cumini* e com intuito de elucidar possíveis mecanismos moleculares de atuação dos seus compostos, caracterizou-se neste trabalho os efeitos do ERP das folhas desta espécie e do seu flavonoide predominante, a miricetina, sobre a DHGNA de camundongos obesos MSG.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Investigar os efeitos do extrato rico em polifenóis (ERP) e da miricetina da folha de *Syzygium cumini* (L.) Skeels sobre a Doença Hepática Gordurosa Não-Alcoólica (DHGNA) de camundongos com obesidade induzida por L-glutamato monossódico.

3.2 Objetivos específicos

3.2.1 Verificar as alterações morfométricas produzidas pelo tratamento com ERP e miricetina em camundongos obesos-MSG;

3.2.2 Determinar os parâmetros bioquímicos relacionados à resistência à insulina de camundongos obesos-MSG submetidos ao tratamento com ERP e miricetina;

3.2.3 Verificar os parâmetros histopatológicos da DHGNA no fígado de camundongos obesos-MSG tratados com ERP e miricetina;

3.2.4 Investigar o potencial antioxidante do ERP.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Material botânico e obtenção do Extrato Rico em Polifenóis

A preparação do extrato foi realizada segundo a metodologia descrita por Sharma et al. (2008), com modificações. As folhas da espécie vegetal *Syzygium cumini* (L.) Skeels foram coletadas no mês de setembro (ano de 2017), no Campus Bacanga Dom Delgado, da Universidade Federal do Maranhão (São Luís, MA). A espécie foi identificada, catalogada e a exsicata encontra-se no Herbário do Maranhão (MAR), vinculado à universidade, sob o nº 4573. Após a coleta, as folhas foram selecionadas previamente, livres de contaminantes. Em seguida, foram submetidas à secagem em estufa com circulação de ar, a 30°C - 40°C, por 3 dias e levadas para pulverização em moinho de facas.

O pó resultante foi submetido à macerações, com hidromódulo 1:6 m/v, com etanol 70%, sob agitação constante por 24 horas em mesa agitadora, durante três dias subsequentes. Os filtrados obtidos (executados através de gaze e algodão) foram reunidos e submetidos à centrifugação, com rotação de 3500 rpm por 10 minutos, em temperatura ambiente. O sobrenadante foi concentrado em rotaevaporador, com rotação de 240 rpm e temperatura sem ultrapassar o limite de 40°C. O extrato concentrado foi particionado com clorofórmio (1:1 v/v), três vezes consecutivas, seguido da partição da fase aquosa residual com acetato de etila (1:1 v/v), também três vezes consecutivas, obtendo-se o extrato rico em polifenóis (ERP).

4.2 Animais e indução da obesidade por L-glutamato monossódico

Logo a partir do 2º dia de vida, camundongos machos da espécie *Mus musculus* (Swiss) foram induzidos à obesidade com L-glutamato monossódico (MSG), através de injeção por via subcutânea, na região dorso-cervical, na dose de 4,0 g/Kg/dia, em dias alternados durante 10 dias (5 injeções). Os filhotes controle receberam uma injeção de soro fisiológico 0,9%, também na dose de 4,0 g/Kg/dia. Todos os animais utilizados nos experimentos foram provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Maranhão (UFMA) e, desde o seu nascimento, foram mantidos no Biotério Setorial da Pós-Graduação em Ciências da Saúde/CCBS, em gaiolas de polietileno forradas com maravalha (máximo de 4 animais por gaiola), com temperatura (23 ± 2 °C), umidade (60%) e luminosidade (ciclo

claro/escuro de 12 horas) controladas e acesso livre a água filtrada e ração (Nuvilab[®], Nuvital).

Antes do tratamento, a obesidade foi constatada através do cálculo do Índice de Lee (IL), que resulta do quociente da raiz cúbica do peso corporal (g), pelo comprimento nasoanal (cm) (BERNARDIS E PATTERSON, 1968). A partir da 7^a semana de vida, o peso corporal (para avaliação do progresso ponderal) e o consumo de ração foram mensurados 2 vezes por semana, durante todo o seu período de vida.

Os protocolos experimentais realizados neste projeto foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da UFMA (em anexo).

4.3 Desenho Experimental

Uma vez constatada a obesidade dos camundongos-MSG em relação aos controles, na 13^a semana de vida os animais foram randomizados e divididos em 4 grupos experimentais:

- CTR: camundongos magros que receberam soro fisiológico 0,9% na dose de 0,1 mL/Kg/dia (n = 8);
- MSG: camundongos obesos que receberam soro fisiológico 0,9% na dose de 0,1 mL/Kg/dia (n = 8);
- ERP: camundongos obesos submetidos ao tratamento com o extrato rico em polifenóis (ERP) na dose de 0,5 g/Kg/dia (n = 8);
- MCT: camundongos obesos submetidos ao tratamento com miricetina (MCT) na dose de 0,5 g/Kg/dia (n = 8).

Todos os grupos foram administrados através de gavagem, durante 45 dias. Ao final, o IL foi remensurado, para avaliar o efeito do tratamento sobre a obesidade.

4.4 Histologia hepática

Após o sacrifício dos animais, amostras de fígado foram pesadas e acondicionadas em formol 10% tamponado. Em seguida, o material passou pelos processos de desidratação, diafanização e inclusão, para posterior microtomia, sendo feitos 4 lâminas com cortes de 5 µm de espessura e 50 µm de espaçamento entre cada corte, seguido de coloração com hematoxilina/eosina.

As lâminas foram analisadas em microscópio de luz (10x, 20x e 40x) e avaliadas segundo o critério de escore proposto por Kleiner et al. (2005), para a classificação do grau de esteatose e esteato-hepatite. O mesmo indica que, para animais obesos que apresentam características de esteatose hepática, a análise histológica consiste no escore baseado na somatória de pontuações de: inflamação lobular (0-2), esteatose (0-3) e balonização (“ballooning”) hepatocelular (0-2).

4.5 Atividade antioxidante

A avaliação da atividade antioxidante do ERP foi determinada mediante adaptação da metodologia proposta por Sanchez-Moreno et al. (1998). Primeiramente, diluiu-se o extrato liofilizado em metanol, na concentração de 1 mg/mL. Em seguida, preparou-se uma solução estoque de DPPH^{*} (2,2-difenil-1-picril-hidrazil), sob abrigo da luz, na concentração de 25 µg/mL, preparada no dia do experimento e armazenada em frasco âmbar. A partir desta, fez-se diluições seriadas, realizadas em triplicata, nas seguintes concentrações: 50 µg/mL; 25 µg/mL; 12,5 µg/mL; 6,25 µg/mL e 3,125 µg/mL.

A leitura foi realizada através de espectrofotometria, em 515 nm, utilizando metanol como branco, sendo monitorada a cada minuto para verificação dos parâmetros cinéticos, durante 10 minutos.

4.6 Análise estatística dos resultados

Todos os resultados obtidos foram expressos como média ± erro padrão da média, e analisados estatisticamente através do software GraphPad Prism[®], versão 6.0 (GraphPad Software Inc., San Diego CA, EUA). As análises estatísticas foram calculadas através do teste “t” Student não pareado one-tailed (quando foram comparados os resultados de dois grupos experimentais) ou ANOVA com pós teste de Newman Keuls (quando foram comparados mais de dois grupos experimentais). Os valores de $p < 0,05$ são considerados significativos.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Avaliação metabólica

Durante o acompanhamento do peso dos grupos de animais, observa-se que o grupo MSG tem menor peso corporal, quando comparado ao grupo CTR (**Figura 3A**). Isso se deve a uma peculiaridade desse modelo de obesidade, a qual os animais com a obesidade induzida são mais “curtos” do que seus controles magros (**Figura 3B**). Essa característica se deve às lesões neonatais do núcleo arqueado do hipotálamo, a partir das administrações subcutâneas de MSG, o que desencadeia uma disfunção na regulação da saciedade dos animais e na secreção do hormônio do crescimento (FRANÇA, 2018). Sanches et al. (2016) também verificaram que os animais, antes do tratamento com extrato hidroalcoólico, intitulado HESc, eram mais leves e possuíam menor ganho de peso.

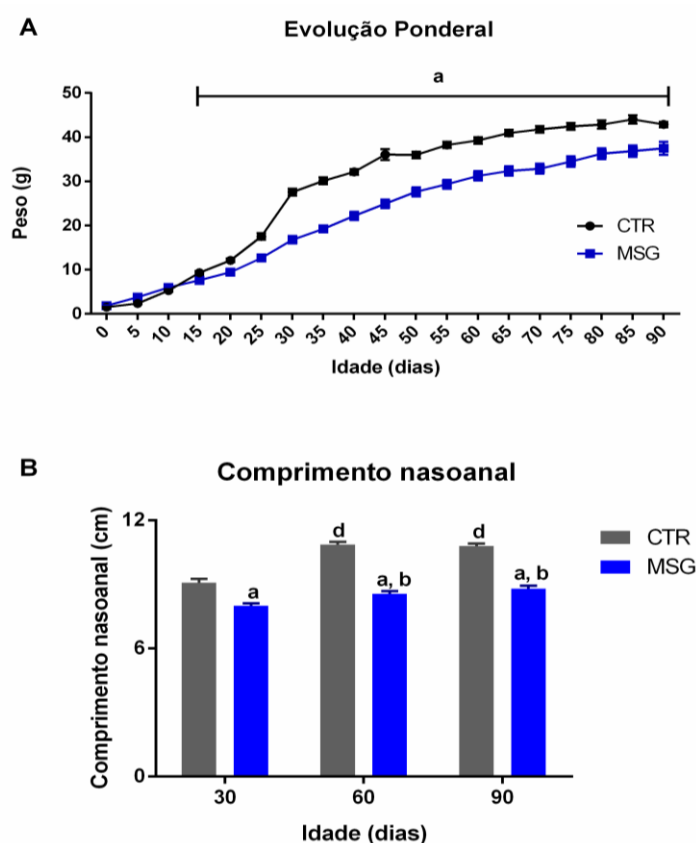


Figura 3 – Avaliação da evolução ponderal e comprimento nasoanal de camundongos *Mus musculus*. Parâmetros de evolução ponderal (A) e comprimento nasoanal (B) dos grupos de animais antes do tratamento com ERP e MCT. Os dados representam média \pm erro padrão, analisados pelo teste “t” Student não pareado one-tailed (entre os dois grupos experimentais) e ANOVA com pós teste de Newman Keuls (entre as três datas de idade), com $p < 0,05$. As letras representam diferença estatisticamente significativa entre os grupos vs. (p<0,05) vs. aCTR; bMSG.

Outra característica evidente desse modelo animal é o aumento expressivo do seu tecido adiposo, resultante da baixa atividade simpática e hiperatividade vagal (FRANÇA, 2018), além do desenvolvimento precoce de gordura no fígado (FRANÇA et al., 2018), o que caracteriza-os como obesos, e que é constatado a partir do IL (**Figura 4**).

O IL é uma fórmula que avalia a massa corporal de roedores em relação ao seu comprimento nasoanal, especialmente os obesos que apresentam crescimento atrofiado, o que corresponde ao índice de massa corporal (IMC) em humanos. Esse aumento do índice, observado na figura 4, também foi constatado por Sanches et al. (2016) e França (2018), que trabalharam com este modelo animal MSG.

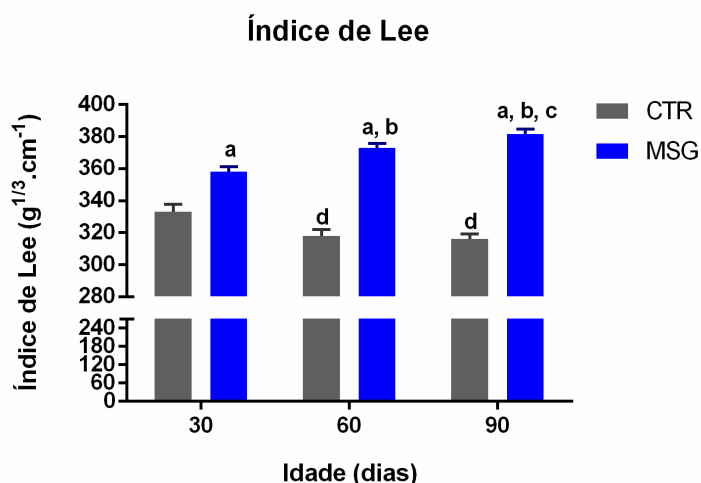


Figura 4 - Avaliação do Índice de Lee de camundongos *Mus musculus*. Índice de Lee do grupo CTR e do grupo MSG antes do tratamento com ERP e MCT. Os dados representam média \pm erro padrão, analisados pelo teste “t” Student não pareado one-tailed (entre os dois grupos experimentais) e ANOVA com pós teste de Newman Keuls (entre as três datas de idade), com $p < 0,05$. As letras representam diferença estatisticamente significativa entre os grupos vs. ($p < 0,05$) vs. aCTR; bMSG.

Após o tratamento com o ERP e a MCT, foi constatado que os animais não apresentaram diferença significativa no parâmetro de peso corporal (**Figura 5A**) entre os grupos (CTR: 45,2 g; MSG: 35,7 g; ERP: 32,5 g e MCT: 38,8 g) e nem em relação ao IL dos animais MSG tratados (CTR: 313,2; MSG: 376,1; ERP: 362,4 e MCT: 349,5) (**Figura 5B**). Todavia, Sanches et al. (2016) observaram que o extrato hidroalcoólico diminuiu o IL, apesar de não haver alterações na ingestão de alimentos entre os grupos. Xia et al. (2016), ao avaliarem o tratamento dietético feito com MCT por 12 semanas, também observaram que este flavonoide diminuiu significativamente o peso corporal dos camundongos alimentados com dieta hiperlipídica.

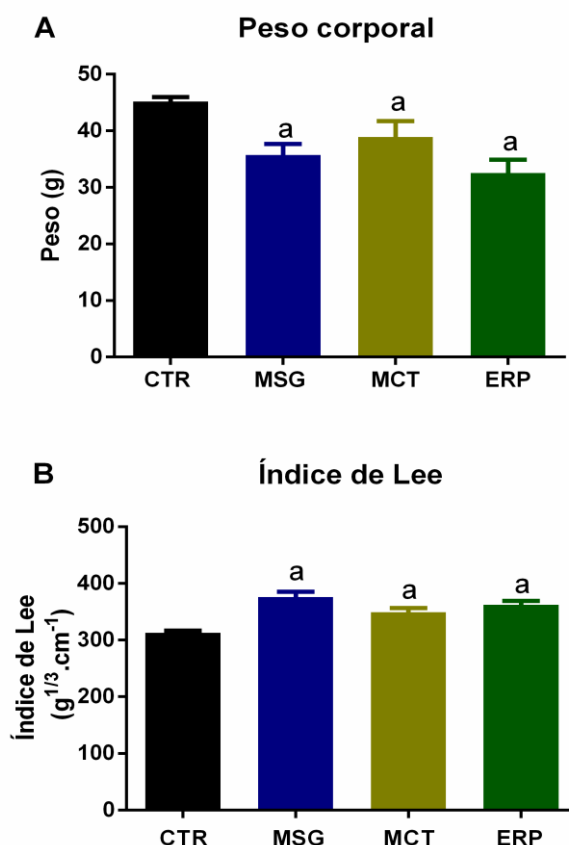


Figura 5 - Avaliação do peso corporal e do Índice de Lee de camundongos *Mus musculus* após tratamento. Avaliação dos parâmetros de peso corporal (A) e Índice de Lee (B) dos quatro grupos experimentais submetidos ao tratamento de 45 dias com ERP e MCT. Os dados representam média \pm erro padrão, analisados pelo teste ANOVA com pós teste de Newman Keuls, com $p < 0,05$. As letras representam diferença estatisticamente significativa entre os grupos vs. ($p < 0,05$) vs. aCTR; bMSG.

França et al. (2018) constatou que o extrato hidroalcoólico das folhas de *S. cumini* aumenta a taxa de lipólise dos camundongos obesos tanto em condições basais quanto sob estímulo adrenérgico com isoproterenol, o que contribui para o menor acúmulo de gordura nos animais tratados, a partir do aumento da atividade simpática. Esta atividade se dá devido a presença da miricetina e seus derivados, visto que este metabólito é responsável pela inibição da atividade da enzima catecol-O-metiltransferase (COMT), que é responsável pela degradação da norepinefrina, o que permite que este neurotransmissor continue induzindo a atividade lipolítica (ZHU and JIA, 2014). Chang et al. (2012) também observaram esse efeito hipolipemiante da MCT em modelo dietético, a partir de ratos com obesidade induzida por dieta rica em gordura (DRG). Esta, que foi administrada por via oral na dose de 300 mg/Kg/dia por oito semanas, diminuiu o peso e os depósitos adiposos desses animais.

Em relação ao perfil glicêmico, os animais MSG com 90 dias de vida ainda não apresentavam uma hiperglicemia, quando comparados ao grupo CTR (**Figura 6A**). Entretanto, o que observa-se é que estes, com 60 dias de vida, já eram obesos, mas ainda não tinham desenvolvido síndrome metabólica. O dano causado ao hipotálamo, decorrente da administração neonatal de MSG, induz a hiperatividade do nervo vago, levando à uma hiperinsulinemia e resistência à insulina precoce (logo aos 60 dias de vida), que não necessariamente é acompanhada de hiperglicemia (COELHO et al., 2018).

Somente a partir dos 90 até os 135 dias de vida (período correspondente ao tratamento) pode-se observar a hiperglicemia dos animais MSG, típica da síndrome metabólica (**Figura 6B**). Após o período de tratamento de 45 dias, os animais MSG apresentaram valores de glicemia maior que os animais CTR (145,1 mg/dL vs. 103,3 mg/dL) e o tratamento utilizando tanto o ERP quanto a MCT reverteram os valores de glicemia (para 88,4 mg/dL e 87,0 mg/dL, respectivamente), em relação aos animais MSG e CTR (**Figura 6B**).

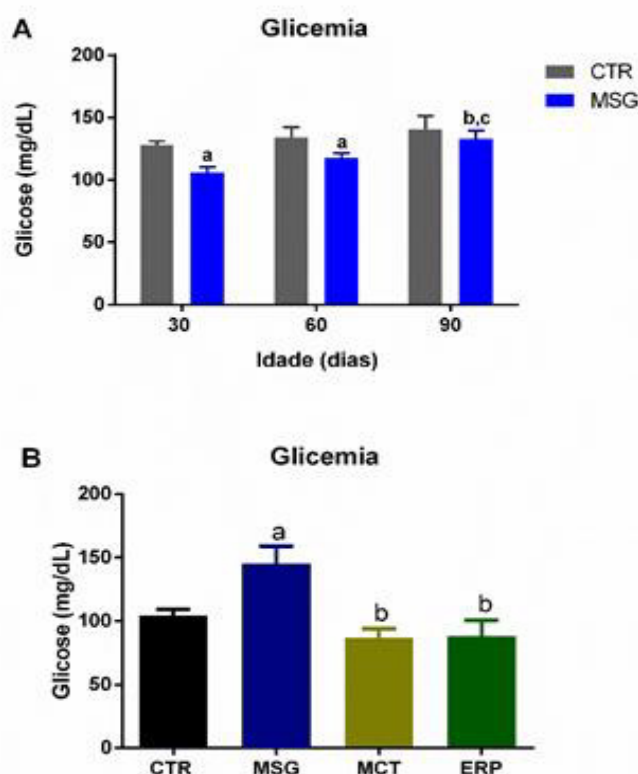


Figura 6 - Avaliação da glicemia de jejum de camundongos *Mus musculus* antes e após tratamento. Parâmetros de glicemia de jejum antes (A) e após o tratamento (B) de 45 dias com ERP e MCT. Os dados representam média \pm erro padrão, analisados pelo teste “t” Student não pareado one-tailed e ANOVA com pós teste de Newman Keuls, respectivamente, com $p < 0,05$. As letras representam diferença estatisticamente significativa entre os grupos vs. ($p < 0,05$) vs. aCTR; bMSG.

Este resultado também foi constatado por Chagas et al. (2018), o qual observaram que o tratamento de 7 dias com ERP de *S. cumini* diminuiu acentuadamente os níveis glicêmicos e lipídêmicos de ratos com diabetes induzida por aloxana, além de apresentarem redução da resistência à insulina, principalmente no grupo tratado 7 dias antes e 7 dias após a injeção da aloxana.

Ajiboye et al. (2018) também observaram este perfil, a partir do tratamento de 14 dias com a fração acetato de etila do extrato das folhas de *S. cumini*, também intitulado ERP, em ratos com diabetes induzida por aloxana, o que demonstrou que esse extrato reduziu significativamente a glicemia, hemoglobina glicada, resistência à insulina e a atividade da glicose-6-fosfatase, além de aumentar os níveis de glicogênio, insulina das células β pancreáticas e do transportador de glicose nos animais diabéticos, o que confere-lhe atividade anti-hiperglicêmicas. Xia et al. (2016) também constataram esse efeito hipoglicemiante, relacionado à MCT, a qual foi capaz de reduzir significativamente os níveis de glicose em jejum e insulina, bem como a resistência à insulina, a partir dos valores de HOMA-IR.

De acordo com Liu et al. (2007), a MCT, um dos flavonoides mais prevalentes na folha, tem demonstrado melhorar a expressão de RNAm do transportador de glicose (GLUT-4), importante mediador da insulina, tanto no tecido adiposo quanto no músculo esquelético, o que confere essa melhora no metabolismo da glicose. Esses dados são complementados a partir dos resultados de TyG. Esse índice é tido à partir do produto de triglicerídeos (TG) e glicose em jejum, tendo alta sensibilidade para o reconhecimento da resistência à insulina, uma vez que esses dois parâmetros metabólicos são validados por seus papéis nessa resistência, além de estar bem validado para humanos (DU et al., 2014).

Antes do tratamento, os animais MSG apresentaram resistência à insulina a partir dos 60 dias de vida (**Figura 7A**). Após o tratamento, pode-se confirmar que o ERP e a miricetina diminuíram essa resistência (para valores de 4,4 e 4,2, respectivamente), uma vez que melhoraram a sensibilização deste hormônio em relação aos animais obesos tratados (MSG: 4,8 vs. CTR: 4,3) (**Figura 7B**). A melhora deste parâmetro contribuiu para a redução da glicemia dos grupos obesos tratados, dados estes que corroboram com os estudos de Sanches et al. (2016), que mostraram que o extrato hidroalcoólico melhora a sensibilidade periférica à insulina e a função das ilhotas pancreáticas, e de França et al. (2018), que comprovaram que o extrato hidroalcoólico melhorou a tolerância à glicose e insulina e os índices HOMA1-RI e TyG dos animais obesos.

Outro estudo também evidencia que a MCT foi capaz de reduzir significativamente os níveis séricos de glicose e insulina, bem como os valores de HOMA-IR, a partir da administração da suplementação de uma dieta contendo 0,12% de miricetina por 12 semanas, em camundongos alimentados com dieta rica em gordura e rica em sacarose (CHOI et al., 2014).

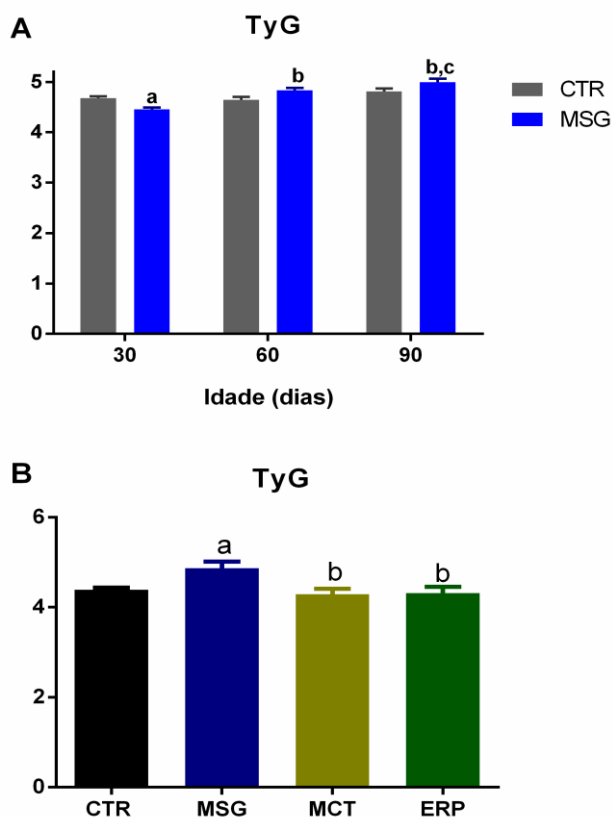


Figura 7 - Avaliação do TyG de camundongos *Mus musculus* antes e após tratamento. Parâmetros de TyG antes (A) e após o tratamento (B) de 45 dias com ERP e MCT. Os dados representam média \pm erro padrão, analisados pelo teste “t” Student não pareado one-tailed e ANOVA com pós teste de Newman Keuls, respectivamente, com $p < 0,05$. As letras representam diferença estatisticamente significativa entre os grupos vs. ($p < 0,05$) vs. aCTR; bMSG.

Quando se analisa o perfil lipídico, a hipertrigliceridemia de jejum associada à obesidade desse modelo animal é decorrente, principalmente, no que diz respeito ao aumento e acúmulo desses triglicerídeos hepáticos, que são exportados para a circulação como partículas de lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL) (RECCIA et al., 2017). A partir dos triglicerídeos séricos dos camundongos MSG, observa-se que no período anterior ao tratamento, logo com 60 dias de vida, os mesmos já apresentavam uma hipertrigliceridemia, quando comparados aos seus controles magros (132,5 mg/dL vs. 76,6 mg/dL) (**Figura 8A**).

Após o tratamento de 45 dias com ERP e MCT, evidencia-se uma diminuição significativa dos níveis de triglicerídeos desses animais tratados (para os valores de 72,6 mg/dL e 56,8 mg/dL, respectivamente) em relação aos animais obesos (97,15 mg/dL), valores esses similares ou até menores em relação aos animais CTR (61,8 mg/dL) (**Figura 8B**).

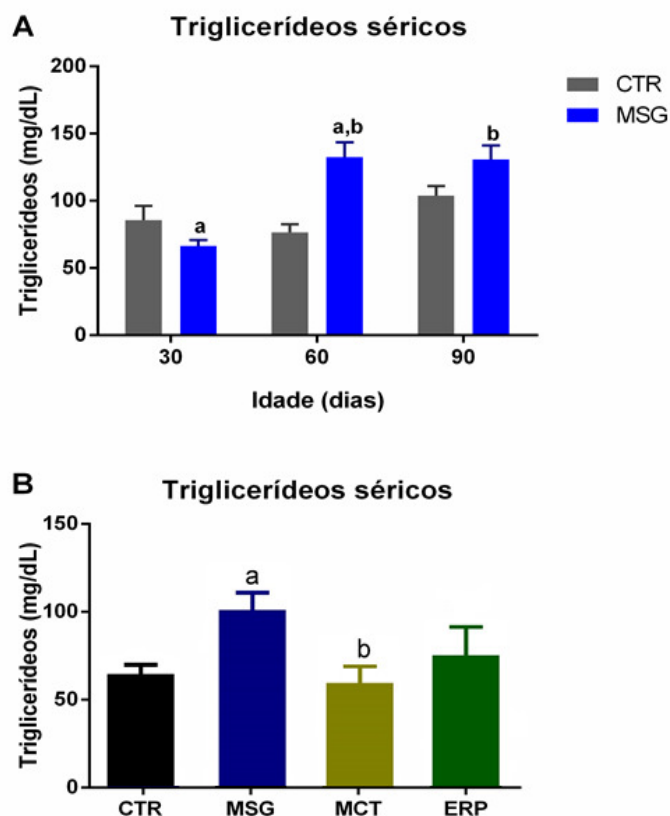


Figura 8 - Avaliação dos triglicerídeos séricos de camundongos *Mus musculus* antes e após tratamento. Triglicerídeos séricos antes (A) e após o tratamento (B) de 45 dias com ERP e MCT. Os dados representam média \pm erro padrão, analisados pelo teste “t” Student não pareado one-tailed ou ANOVA com pós teste de Newman Keuls, respectivamente, com $p \leq 0,05$. As letras representam diferença estatisticamente significativa entre os grupos vs. (p<0,05) vs. aCTR; bMSG.

Sanches et al. (2016) não observaram alterações nos níveis de glicose no soro de jejum de ratos magros ou obesos tratados com HESc, embora constataram que os níveis séricos de triglicérides tenham diminuído fortemente nos ratos obesos tratados com este extrato. Esse dado também é corroborado por França et al. (2018), o qual o tratamento com HESc foi capaz de reduzir o parâmetro sérico de trigliceridemia dos animais obesos-MSG.

Além disso, outros trabalhos também demonstram esse efeito hipolipemiante, tanto do extrato hidroalcoólico bruto das folhas de *S. cumini*, a partir de ratos diabéticos induzidos por uma dieta rica em gordura e baixas doses de estreptozotocina (BALDISSERA

et al., 2016), quanto da MCT, a partir de camundongos obesos induzidos por uma dieta hiperlipídica (XIA et al., 2016).

Esse efeito hipolipemiante pode ser explicado devido à capacidade que o ERP tem de inibir fatores de transcrição e enzimas lipogênicas, além de contribuir para a regulação da homeostase do retículo endoplasmático hepático (FRANÇA et al., 2018). Uma vez que a obesidade é uma doença de cunho crônico-degenerativo que envolve vários fatores pró-inflamatórios e estresse oxidativo, o ERP é uma alternativa de tratamento, à medida que possui muitos compostos polifenólicos e alta atividade antioxidante.

Em relação à análise histológica, foram avaliados três parâmetros: esteatose, inflamação e “ballooning”. Dentre estes, os animais obesos-MSG apresentaram esteatose associada à inflamação, em relação aos animais CTR, e ausência de “ballooning” (**Figura 9**). Quando se observa os animais tratados com ERP, estes apresentaram uma reversão total da inflamação e melhora significativa da esteatose, dados que corroboram com os achados de França et al., (2018), o qual obtiveram resultados de total reversão dos três parâmetros do escore, a partir do tratamento feito com extrato hidroalcoólico na dose de 1 g/Kg, o dobro da dose utilizada para o tratamento dos camundongos deste presente trabalho (0,5 g/Kg).

Já no que diz respeito aos animais tratados com a MCT, evidencia-se a reversão total da esteatose e inflamação. Em seu estudo, Xia et al. (2016) obtiveram resultados semelhantes: a miricetina atenuou os vacúolos lipídicos nos hepatócitos (esteatose) e diminuiu consideravelmente o acúmulo de lipídio hepático induzido pela dieta hiperlipídica, além de normalizar os níveis de triglicérides, colesterol total e ácidos graxos livres e reduzir as atividades das enzimas hepáticas aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT), bem como pelo aumento do gasto energético e utilização dos lipídios como combustível.

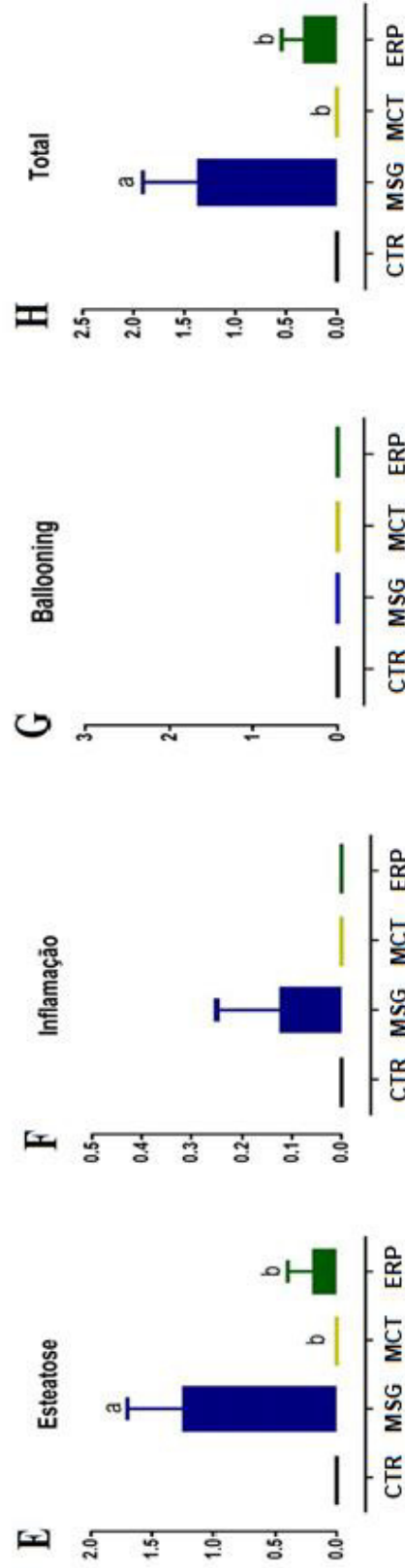
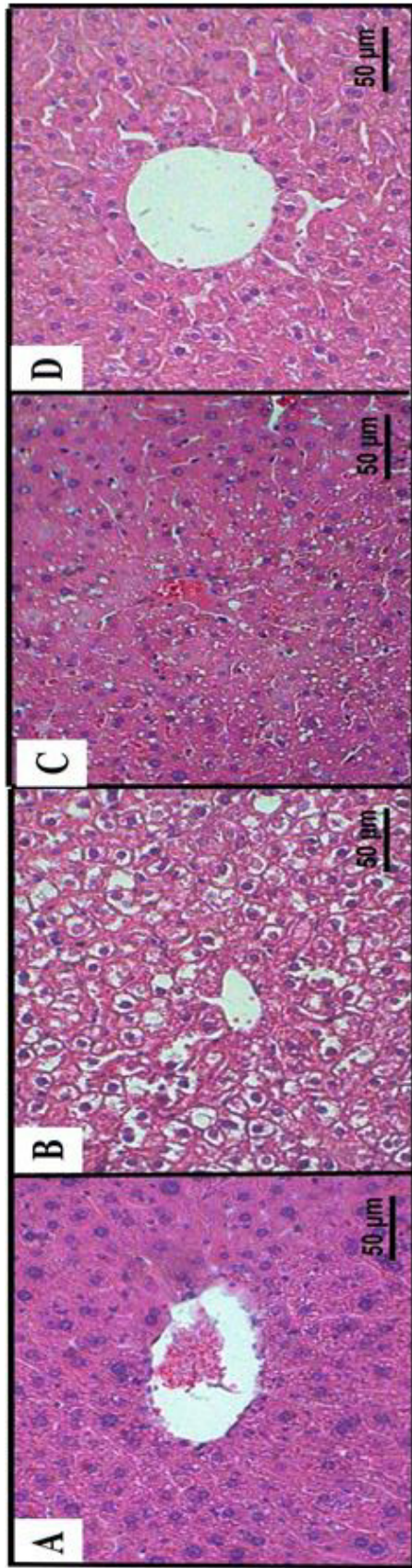


Figura 9 - Análise histológica. Análise histológica dos animais CTR (A), MSG (B), ERP (C) e MCT (D). Parâmetros de esteatose (E), inflamação (F), ballooning (G) e o somatório destes (H), para avaliação do escore de DHGNA. Os dados representam média \pm erro padrão, analisados pelo teste ANOVA com pós teste de Newman Keuls, com $p < 0,05$. As letras representam diferença estatisticamente significativa entre os grupos vs. (p<0,05) vs. aCTR; bMSG.

O efeito hipolipemiante do ERP e da MCT parece ser o responsável pela completa restauração do padrão histológico hepático dos ratos obesos, equiparando-os aos valores dos animais magros e saudáveis. Esses efeitos também podem ser correlacionados pela melhora da sensibilidade à insulina hepática, constatada a partir da diminuição do índice TyG nos animais obesos tratados com ERP e miricetina (FRANÇA et al, 2018).

Uma vez que esse índice foi proposto como um biomarcador de iniciação e progressão da DHGNA, mesmo em indivíduos assintomáticos (SIMENTAL-MENDÍA et al., 2017), a sua melhora confirma esse efeito do extrato e da miricetina na esteatose hepática.

5.2 Avaliação da atividade antioxidante

Um composto antioxidante é aquele que protege o sistema biológico contra um efeito nocivo, provocado por processos ou reações que desencadeiam uma oxidação excessiva no organismo (RUFINO et al., 2007). Essa capacidade refere-se à habilidade que certas moléculas têm de capturar ou neutralizar espécies reativas de oxigênio e nitrogênio e outros radicais livres, dentre elas os compostos polifenólicos, (GALLEANO et al., 2010).

Assim, observou-se que o ERP foi capaz de eliminar eficientemente os radicais 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH^{*}), apresentando atividade antioxidante de $6,80 \pm 1,07$ µg/mL, conforme mostra a figura 10. Resultados semelhantes foram demonstrados por Ruan et al. (2008) para o extrato metanólico (ME) e a fração acetato de etila (EaF) das folhas de *S. cumini*, mas em concentrações inibitórias mais elevadas (IC₅₀: 125,39 µg/mL e IC₅₀: 112,79 µg/mL, respectivamente), o que constata que o ERP possui maior atividade antioxidante que estes últimos. Chagas et al. (2018), ao avaliarem a capacidade antioxidante da MCT frente os radicais DPPH^{*}, obteve uma IC₅₀ de $9,81 \pm 0,74$ µg/mL. Isso demonstra que o perfil do ERP é similar a este padrão, apresentando uma concentração inibitória menor, o que confere-lhe eficiência e alta capacidade antioxidante.

Além disso, Begum e Banerjee (2018), a partir da análise da atividade antioxidante das folhas de 5 espécies da Índia frente à vários sistemas de radicais livres, obtiveram que a espécie *S. cumini* apresentou atividade antioxidante mais forte em todos os sistemas de ensaio, além de a MCT, importante flavonoide presente em alta concentração nesta espécie, apresentar uma IC₅₀ de $18,77 \pm 5,05$ µg/mL, o que confirma esse eficiente potencial antioxidante. Os valores de IC₅₀ (concentração efetiva para inibição de 50% do radical pré-formado) foram determinados por regressão não linear.

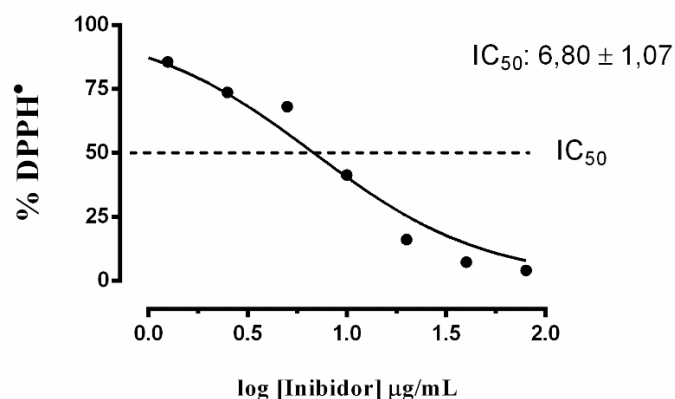


Figura 10 - Capacidade antioxidante do ERP contra os radicais 1,1-difenil-2-picril-hidrazil (DPPH^{*}). As inserções representam a concentração inibitória de 50% (IC₅₀) para ERP. Os dados representam média de 6,80 ± 1,07 em experimentos executados em triplicata e analisados pelo teste “t” Student não pareado one-tailed, com $p < 0,05$.

Isso se deve porque os polifenóis são excelentes doadores de hidrogênio, que são aceitos pelos radicais livres para produzir espécies muito menos reativas e radicais mais estáveis (LOSADA-BARREIRO et al., 2017). A presença de compostos polifenólicos nas várias partes da espécie, inclusive nas folhas, e a elevada capacidade antioxidante observada no EHB e, principalmente, no ERP, os habilita como potencial adjuvante no tratamento de doenças associadas ao estresse oxidativo, como as doenças metabólicas.

6 CONCLUSÃO

Os dados apresentados neste trabalho demonstram que o ERP foi capaz de melhorar parâmetros metabólicos, como a glicemia, a resistência à insulina e a hipertrigliceridemia dos animais tratados, quando comparados ao controle magro. Além disso, o ERP atenuou a esteatose e inflamação no tecido hepático dos animais obesos tratados.

Esses efeitos podem ser atribuídos à presença da miricetina, flavonoide predominante neste extrato, que foi capaz de reverter completamente todos os parâmetros da DHGNA dos animais obesos-MSG, o que faz com esta seja um dos principais componentes da espécie que atua no mecanismo de reversão dos parâmetros metabólicos e histológicos. Os efeitos biológicos observados estão associados à elevada atividade antioxidante dos compostos polifenólicos presentes no ERP.

Uma vez que as doenças metabólicas são de cunho crônico-degenerativo que envolvem vários fatores pró-inflamatórios e estresse oxidativo, os efeitos do ERP estão associados à capacidade antioxidante do mesmo. Assim, o *Syzygium cumini* é uma potencial espécie adjuvante no tratamento de doenças associadas ao estresse oxidativo, como as doenças metabólicas.

REFERÊNCIAS

ABARCA-GÓMEZ, Leandra et al. Worldwide trends in body-mass index, underweight, overweight, and obesity from 1975 to 2016: a pooled analysis of 2416 population-based measurement studies in 128· 9 million children, adolescents, and adults. **The Lancet**, v. 390, n. 10113, p. 2627-2642, 2017.

AJIBOYE, Basiru O. et al. Anti-Hyperglycemic and Anti-Inflammatory Activities of Polyphenolic-Rich Extract of *Syzygium cumini* Linn Leaves in Alloxan-Induced Diabetic Rats. **Journal of evidence-based integrative medicine**, v. 23, p. 2515690X18770630, 2018.

Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade e da Síndrome Metabólica. **Diretrizes brasileiras de obesidade**, 4ª ed. São Paulo, 2016.

ATTIE, Alan D.; SCHERER, Philipp E. Adipocyte metabolism and obesity. **Journal of lipid research**, v. 50, n. Supplement, p. S395-S399, 2009.

AYYANAR, Muniappan; SUBASH-BABU, Pandurangan. *Syzygium cumini* (L.) Skeels: A review of its phytochemical constituents and traditional uses. **Asian Pacific journal of tropical biomedicine**, v. 2, n. 3, p. 240-246, 2012.

BALDISSERA, G. et al. Effects of crude hydroalcoholic extract of *Syzygium cumini* (L.) Skeels leaves and continuous aerobic training in rats with diabetes induced by a high-fat diet and low doses of streptozotocin. **Journal of ethnopharmacology**, v. 194, p. 1012-1021, 2016.

BALIGA, Manjeshwar Shrinath et al. Phytochemistry, traditional uses and pharmacology of *Eugenia jambolana* Lam. (black plum): A review. **Food Research International**, v. 44, n. 7, p. 1776-1789, 2011.

BEGUM, Sainiara; BANERJEE, Archana; DE, Bratati. Analysis of Antioxidant Activities, Phenolic and Other Metabolites of Some Biomass Waste (Leaves) of India. **Free Radicals & Antioxidants**, v. 8, n. 2, 2018.

BERNARDIS, L.; PATTERSON, B. Correlation between 'Lee index' and carcass fat content in weanling and adult female rats with hypothalamic lesions. **Journal of Endocrinology**, v. 40, n. 4, p. 527-528, 1968.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Relação de plantas medicinais de interesse para o SUS**. Brasília, 2009.

Brasil. Vigitel Brasil 2017: vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico: estimativas sobre frequência e distribuição sociodemográfica de fatores de risco e proteção para doenças crônicas nas capitais dos 26 estados brasileiros e no Distrito Federal em 2017. Brasília: Ministério da Saúde, 2018. Disponível em: <http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/vigitel_brasil_2017_vigilancia_fatores_riscos.pdf>

BUZZETTI, Elena; PINZANI, Massimo; TSOCHATZIS, Emmanuel A. The multiple-hit pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). **Metabolism**, v. 65, n. 8, p. 1038-1048, 2016.

CERCATO, Luana M. et al. A systematic review of medicinal plants used for weight loss in Brazil: Is there potential for obesity treatment?. **Journal of ethnopharmacology**, v. 176, p. 286-296, 2015.

CHAGAS, Vinicyus Teles et al. Syzygium cumini (L.) skeels: a prominent source of bioactive molecules against cardiometabolic diseases. **Frontiers in pharmacology**, v. 6, 2015.

CHAGAS, Vinicyus Teles et al. Protective Effects of a Polyphenol-Rich Extract from Syzygium cumini (L.) Skeels Leaf on Oxidative Stress-Induced Diabetic Rats. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2018, 2018.

CHALASANI, Naga et al. The diagnosis and management of nonalcoholic fatty liver disease: practice guidance from the American Association for the Study of Liver Diseases. **Hepatology**, v. 67, n. 1, p. 328-357, 2018.

CHANG, Chia Ju et al. Myricetin increases hepatic peroxisome proliferator-activated receptor α protein expression and decreases plasma lipids and adiposity in rats. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2012, 2012.

CHOI, Ha-Neul et al. Ameliorative effect of myricetin on insulin resistance in mice fed a high-fat, high-sucrose diet. **Nutrition research and practice**, v. 8, n. 5, p. 544-549, 2014.

CHOI, Sung Hee; GINSBERG, Henry N. Increased very low density lipoprotein (VLDL) secretion, hepatic steatosis, and insulin resistance. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 22, n. 9, p. 353-363, 2011.

COLLISON, Kate S. et al. Effect of dietary monosodium glutamate on HFCS-induced hepatic steatosis: expression profiles in the liver and visceral fat. **Obesity**, v. 18, n. 6, p. 1122-1134, 2010.

COUTINHO, Walmir; DUALIB, P. Etiologia da obesidade. **Revista da ABESO**, v. 7, n. 30, p. 1-14, 2007.

DAY, Christopher P.; JAMES, Oliver FW. **Steatohepatitis: a tale of two “hits”?**. 1998.

DU, Tingting et al. Clinical usefulness of lipid ratios, visceral adiposity indicators, and the triglycerides and glucose index as risk markers of insulin resistance. **Cardiovascular diabetology**, v. 13, n. 1, p. 146, 2014.

FARIA, Adelia F.; MARQUES, Marcella C.; MERCADANTE, Adriana Z. Identification of bioactive compounds from jambolão (*Syzygium cumini*) and antioxidant capacity evaluation in different pH conditions. **Food chemistry**, v. 126, n. 4, p. 1571-1578, 2011.

FRANÇA, Lucas Martins et al. MECANISMOS MOLECULARES ENVOLVIDOS NA REVERSÃO DA HIPERTRIGLICERIDEMIA E ESTEATOSE HEPÁTICA DE ANIMAIS OBESOS TRATADOS COM O EXTRATO HIDROALCOÓLICO DAS FOLHAS DE SYZYGIUM CUMINI. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Maranhão – UFMA, São Luís, 2018.

GALLEANO, Mónica; VERSTRAETEN, S. V.; OTEIZA, P. I.; FRAGA, C. G. Antioxidant actions of flavonoids: thermodynamic and kinetic analysis. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 501, n. 1, p. 23-30, 2010.

KLEINER, D. E. et al. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. **Hepatology**, v. 41, n. 6, p. 1313-1321, 2005.

LIU, I.-Min et al. Myricetin, a naturally occurring flavonol, ameliorates insulin resistance induced by a high-fructose diet in rats. **Life sciences**, v. 81, n. 21, p. 1479-1488, 2007.

LONARDO, Amedeo et al. Non-alcoholic fatty liver disease and risk of cardiovascular disease. **Metabolism**, v. 65, n. 8, p. 1136-1150, 2016.

LOSADA-BARREIRO, Sonia; BRAVO-DÍAZ, Carlos. Free radicals and polyphenols: The redox chemistry of neurodegenerative diseases. **European Journal of Medicinal Chemistry**, 2017.

MAHMOUD, Ibrahim I. et al. Acylated flavonol glycosides from *Eugenia jambolana* leaves. **Phytochemistry**, v. 58, n. 8, p. 1239-1244, 2001.

MIGLIATO, K. F.; BABY, A. R.; ZAGUE, V.; VELASCO, M. V. R.; CORRÊA, M. A.; SACRAMENTO, L. V. S.; SALGADO, H. R. N. Ação farmacológica de *Syzygium cumini* (L.) Skeels. **Acta Farmacéutica Bonaerense**, v. 25, n. 2, p. 310-314, 2006.

POPKIN, Barry M.; ADAIR, Linda S.; NG, Shu Wen. Global nutrition transition and the pandemic of obesity in developing countries. **Nutrition reviews**, v. 70, n. 1, p. 3-21, 2012.

RAMYA, S.; NEETHIRAJAN, K.; JAYAKUMARARAJ, R. Profile of bioactive compounds in *Syzygium cumini* – A review. **J. Pharm. Res**, v. 5, p. 4548-4553, 2012.

RATES, Stela Maria Kuze. Plants as source of drugs. **Toxicon**, v. 39, n. 5, p. 603-613, 2001.

RECCIA, Isabella et al. Non-alcoholic fatty liver disease: a sign of systemic disease. **Metabolism**, v. 72, p. 94-108, 2017.

RIBEIRO, Rachel Melo. **Estudo da Atividade Hipotensora de *Syzygium jambolanum* D.C (jambolão)**. Dissertação em Mestrado de Saúde e Meio Ambiente, Universidade Federal do Maranhão. Maranhão, 2007.

RIBEIRO, Rachel Melo et al. Antihypertensive effect of *Syzygium cumini* in spontaneously hypertensive rats. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2014, 2014.

RINELLA, Mary E.; SANYAL, Arun J. Management of NAFLD: a stage-based approach. **Nature reviews Gastroenterology & hepatology**, v. 13, n. 4, p. 196, 2016.

ROSA, R. L.; BARCELOS, A. L. V.; BAMPI, G. Investigação do uso de plantas medicinais no tratamento de indivíduos com diabetes melito na cidade de Herval D'Oeste-SC. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, n. 2, p. 306-310, 2012.

RUAN, Zhi Ping; ZHANG, Liang Liang; LIN, Yi Ming. Evaluation of the antioxidant activity of *Syzygium cumini* leaves. **Molecules**, v. 13, n. 10, p. 2545-2556, 2008.

RUFINO, M. S. M. et al. Comunicado técnico–metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH. Fortaleza: **Embrapa**, p. 4, 2007.

RUGGIERO, Andrea de Andrade. **Estudo farmacognóstico do jambolão *Syzygium cumini* (L.) Skeels Myrtaceae**. 2004. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

SANCHES, Jonas R. et al. Polyphenol-rich extract of *Syzygium cumini* leaf dually improves peripheral insulin sensitivity and pancreatic islet function in monosodium l-glutamate-induced obese rats. **Frontiers in pharmacology**, v. 7, p. 48, 2016.

SHARMA, Bhavna et al. Effects of flavonoid-rich extract from seeds of *Eugenia jambolana* (L.) on carbohydrate and lipid metabolism in diabetic mice. **Food chemistry**, v. 110, n. 3, p. 697-705, 2008.

SIMENTAL-MENDÍA, Luis E. et al. The product of triglycerides and glucose as biomarker for screening simple steatosis and NASH in asymptomatic women. **Annals of hepatology**, v. 15, n. 5, p. 715-720, 2017.

SOBRAL, M.; PROENÇA, C.; SOUZA, M.; MAZINE, F.; Lucas, E. **Myrtaceae in lista de espécies da flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2013.

SRIVASTAVA, Shalini; CHANDRA, Deepak. Pharmacological potentials of *Syzygium cumini*: a review. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 93, n. 9, p. 2084-2093, 2013.

STEFANELLO, Maria Élide Alves; PASCOAL, Aislan CRF; SALVADOR, Marcos J. Essential oils from neotropical Myrtaceae: chemical diversity and biological properties. **Chemistry & biodiversity**, v. 8, n. 1, p. 73-94, 2011.

TROJAN-RODRIGUES, M. et al. Plants used as antidiabetics in popular medicine in Rio Grande do Sul, southern Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 139, n. 1, p. 155-163, 2012.

ULLA, Anayt et al. Supplementation of *Syzygium cumini* seed powder prevented obesity, glucose intolerance, hyperlipidemia and oxidative stress in high carbohydrate high fat diet induced obese rats. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 17, n. 1, p. 289, 2017.

WILSON, P.G. Myrtaceae. In: Kubitzki, K. (ed.) The families and genera of vascular plants - Sapindales, Cucurbitales, Myrtaceae, vol. 10. Springer, Berlin, p. 212 - 271, 2011.

XIA, Shu-Fang et al. Regressive effect of myricetin on hepatic steatosis in mice fed a high-fat diet. **Nutrients**, v. 8, n. 12, p. 799, 2016.

YANOVSKI, Susan Z.; YANOVSKI, Jack A. Long-term drug treatment for obesity: a systematic and clinical review. **Jama**, v. 311, n. 1, p. 74-86, 2014.

YEH, Matthew M.; BRUNT, Elizabeth M. Pathology of fatty liver: differential diagnosis of non-alcoholic fatty liver disease. **Diagnostic histopathology**, v. 14, n. 12, p. 586-597, 2008.

YOUNOSSI, Zobair M. et al. Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease—meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. **Hepatology**, v. 64, n. 1, p. 73-84, 2016.

YOUNOSSI, Zobair et al. Global burden of NAFLD and NASH: trends, predictions, risk factors and prevention. **Nature reviews Gastroenterology & hepatology**, v. 15, n. 1, p. 11, 2018.

ZHU, Xu; JIA, Yun-Hong. Inhibition of catechol-o-methyltransferase (COMT) by myricetin, dihydromyricetin, and myricitrin. **Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 69, n. 3, p. 183-186, 2014.

ANEXO



UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS-CEUA
CIAEP:01.0341.2014

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada “Efeitos do extrato rico em polifenóis da folha de *Syzygium cumini* (L.) Skeels sobre a síntese e exportação de triacilgliceróis hepática em camundongos com obesidade induzida por L-glutamato monossódico” registrada com o nº 23115.0044322/2017-92, sob a responsabilidade de **Antonio Marcus de Andrade Paes**, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 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 de Experimentação Animal (CONCEA), e foi considerado **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA - UFMA) da Universidade Federal do Maranhão em reunião de 22/05/2017.

FINALIDADE	()Ensino (x) Pesquisa ()Extensão
Vigência da autorização	19/06/2017 à 19/06/2019
Espécie/linhagem/raça	Camundongos <i>Mus musculus</i>
Nº de animais	15
Peso/Idade	Animais recém-nascidos acompanhados a partir do 1º dia de vida.
Sexo	5 Machos e 10 Fêmeas
Origem	Biotério Central da UFMA

Prof. Dra. Lucilene Amorim Silva
Presidente da Comissão de Ética no uso de animais-CEUA
UFMA