



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO

POLYANA CAMPOS NUNES

**CARACTERIZAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS E AVALIAÇÃO DO
POTENCIAL HIPOLIPEMIANTE, ANTIOXIDANTE E ANTI-INFLAMATÓRIO DO
JAMBO VERMELHO (*Syzygium malaccense* (L.) Merr. & L.M. Perry) EM RATOS
DISLIPIDÊMICOS**

Recife
2019

POLYANA CAMPOS NUNES

**CARACTERIZAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS E AVALIAÇÃO DO
POTENCIAL HIPOLIPEMIANTE, ANTIOXIDANTE E ANTI-INFLAMATÓRIO DO
JAMBO VERMELHO (*Syzygium malaccense* (L.) Merr. & L.M. Perry) EM RATOS
DISLIPIDÊMICOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para obtenção do Grau de Doutor em Nutrição.

Área de concentração: Ciência dos Alimentos

Orientador: Prof^a. Dra. Tânia Lúcia Montenegro Stamford.

Coorientador: Prof^a. Dra. Jailane de Souza Aquino.

RECIFE
2019

Catalogação na Fonte
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4-1010

N972c Nunes, Polyana Campos.
Caracterização de compostos bioativos e avaliação do potencial
hipolipemiante, antioxidante e anti-inflamatório do jambo vermelho
(*Syzygium malaccense* (L.) Merr. & L.M. Perry) em ratos dislipidêmicos /
Polyana Campos Nunes. – 2020.
145 f.: il.; tab.; quad.; 30 cm.

Orientadora: Tânia Lúcia Montenegro Stamford.
Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS.
Programa de Pós-Graduação em Nutrição. Recife, 2020.
Inclui referências, apêndices e anexos.

1. Dislipidemia. 2. Estresse oxidativo. 3. Inflamação. 4. *Syzygium
malaccense*. I. Stamford, Tânia Lúcia Montenegro (Orientadora). II. Título.

612.3 CDD (20.ed.) UFPE (CCS2020-228)

POLYANA CAMPOS NUNES

**CARACTERIZAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS E AVALIAÇÃO DO
POTENCIAL HIPOLIPEMIANTE, ANTIOXIDANTE E ANTI-INFLAMATÓRIO DO
JAMBO VERMELHO (*Syzygium malaccense* (L.) Merr. & L.M. Perry) EM RATOS
DISLIPIDÊMICOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para obtenção do Grau de Doutor em Nutrição.

Aprovada em: 26 de fevereiro de 2019

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Tânia Lúcia Montenegro Stamford (Presidente)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a. Dr^a. Elizabeth do Nascimento (Examinadora Interna)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a. Dr^a. Giselia de Santana Muniz (Examinadora Interna)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a. Dr^a. Débora Catarine Nepomuceno (Examinadora Interna)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^o. Dr^o. Adriano Francisco Alves (Examinador Externo)
Universidade Federal da Paraíba

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a **DEUS**, por escutar minhas preces, me fortalecer em todos os momentos. Tudo de bom que tenho é graça Dele.

Agradeço à minha mãe, **Safira de Queiroz Campos Nunes (*in memorian*)**, alicerce da minha personalidade, minha maior incentivadora, sem ela eu não teria chegado até aqui. Ao meu pai, **Alberto Nunes da Silva**, por transmitir sempre seu amor incondicional. A vocês agradeço minha existência.

A toda minha **família**, meu bem maior, alicerce da minha vida.

A minha orientadora Prof^a. Dra. Tânia Lúcia Montenegro Stamford que me recebeu de braços abertos e dispôs seu conhecimento, atenção e compreensão.

Ao Prof^a. Dra. Jailane de Souza Aquino, pelos ensinamentos e orientação. Me ensinou como ser uma pesquisadora melhor.

A todos meus colegas da turma do doutorado, sempre me encorajando, agradeço pelo carisma. Em especial a Ana Júlia Athayde, pelo carinho, pela força, pela atenção prestada e amizade incondicional.

Ao Departamento de Pós-graduação em Nutrição da UFPE, seus docentes e secretários.

Agradeço àqueles que fizeram parte direta ou indiretamente desta dissertação.

Muito obrigada!

RESUMO

Pesquisas recentes têm focado no potencial de frutos como o jambo vermelho (*Syzygium malaccense*) na redução dos riscos de doenças crônicas como a dislipidemia. Nesse contexto, o objetivo deste estudo foi caracterizar os compostos bioativos do jambo vermelho (MA) e avaliar seu potencial hipolipemiante, antioxidante e anti-inflamatório em ratos dislipidêmicos. Inicialmente, 32 ratos foram randomizados em dois grupos: grupo saudável e grupo dislipidêmico, por três semanas para indução da dislipidemia. Posteriormente, estes animais foram randomizados em quatro grupos: grupo controle sadio (HCG), grupo sadio suplementado (HMA), grupo controle dislipidêmico (DCG) e grupo dislipidêmico suplementado (DMA) e receberam administração do MA (400 mg/kg de peso corporal) via gavagem por mais três semanas. A suplementação com MA melhorou o perfil lipídico e os níveis de enzimas hepáticas, ureia e creatinina nos ratos. Ainda protegeu o fígado do dano tecidual induzido pela dieta dislipidêmica, diminuiu os níveis de colesterol hepático, bem como aumentou a excreção de gordura fecal, colesterol e de ácidos biliares. Apresentou capacidade antioxidante *in vitro* equivalente a EC₅₀ 372,26 (g p. f./g DPPH), aumentou significativamente ($p<0,05$) a capacidade antioxidante total dos animais suplementados e diminuiu os níveis séricos e hepáticos de peroxidação lipídica ($p<0,05$). A suplementação reverteu alterações no tecido adiposo do grupo DMA e diminuiu os níveis séricos de citocinas inflamatórias. Estes resultados mostram efeitos benéficos do MA no metabolismo lipídico e nas capacidades antioxidante e anti-inflamatória de ratos dislipidêmicos.

Palavras-chave: Dislipidemia. Estresse Oxidativo. Inflamação. *Syzygium Malaccense*.

ABSTRACT

Recent research has focused on the potential of fruits such as red jambo (*Syzygium malaccense*) in reducing the risks of chronic diseases such as dyslipidemia. In this context, the objective of this study was to characterize the bioactive compounds of red jambo (MA) and to evaluate its hypolipidemic, antioxidant and anti-inflammatory potential in dyslipidemic rats. Initially, 32 rats were randomized into two groups: healthy group and dyslipidemic group, for three weeks to induce dyslipidemia. Later, these animals were randomized into four groups: healthy control group (HCG), supplemented healthy group (HMA), dyslipidemic control group (DCG) and supplemented dyslipidemic group (DMA) and received MA administration (400 mg / kg body weight) via gavage for another three weeks. MA supplementation improved the lipid profile and hepatic enzyme levels, urea and creatinine in rats. It further protected the liver from tissue damage induced by the dyslipidemic diet, decreased liver cholesterol levels, as well as increased excretion of fecal fat, cholesterol and bile acids. EC₅₀ 372.26 (g pf / g DPPH), significantly increased ($p < 0.05$) the total antioxidant capacity of the supplemented animals and decreased the serum and hepatic levels of lipid peroxidation ($p < 0.05$). Supplementation reversed changes in adipose tissue of the DMA group and decreased serum levels of inflammatory cytokines. These results show beneficial effects of MA on lipid metabolism and the antioxidant and anti-inflammatory properties of dyslipidemic rats.

Keywords: Dyslipidemia. Oxidative Stress. Inflammation. *Syzygium Malaccense*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Ciclos de transporte de lipídios	16
Figura 2 - Formação da placa aterosclerótica	19
Figura 3 - Mecanismos de hipertrigliceridemia associada à inflamação.	24
Figura 4 - Fatores relacionados às dislipidemias e à inflamação	26
Figura 5 - Fontes e respostas celulares às espécies reativas de O ₂	28
Figura 6 - Esquema de classificação dos principais compostos fenólicos	32
Figura 7 - Estrutura química dos flavonoides.....	34
Figura 8 - Fruto Jambo vermelho (<i>Syzygium malaccense</i>)	35
Figura 9 - Árvore do fruto Jambo vermelho (<i>Syzygium malaccense</i>)	35
Figura 10 - Delineamento experimental.....	43
Figura 11 - Ganho de peso corporal, consumo dietético e ingestão de gordura	55
Figura 12 - Teste de tolerância oral à glicose e à insulina.....	56
Figura 13 - Histopatologia do fígado	57
Figura 14 - Scores histológicos da esteatose hepática	57
Figura 15 - Análises bioquímicas.....	59
Figura 16 - Níveis de gordura e colesterol hepático	60
Figura 17 - Níveis de excreção fecal de gordura, colesterol e ácidos biliares...	61
Figura 18 - Composição de ácidos graxos fecais e hepáticos	62
Figura 19 - Capacidade Antioxidante Total <i>in vivo</i>	63
Figura 20 - Níveis de peroxidação lipídica	64
Figura 21 - Análises histológicas.....	65
Figura 22 - Análises morfométricas do tecido adiposo	65
Figura 23 - Citocinas séricas.....	66
 Quadro 1 - Modelos de indução à dislipidemia em roedores.	20
Quadro 2 - Principais meios de defesa antioxidante	30

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Valores de referência para avaliação dos níveis de lipídios na circulação sanguínea.....	18
Tabela 2 - Reação de redução glutathiona peroxidase (GPx).....	30
Tabela 3 - Superóxido Dismutase (SOD).....	31
Tabela 4 - Catalase (CAT)	31
Tabela 5 - Composição das dietas controle e dislipidêmica	44
Tabela 6 - Caracterização do Jambo Vermelho (<i>Syzygium malaccense</i>)	53

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	OBJETIVOS	14
2.1	OBJETIVO GERAL	14
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
3	REVISÃO DA LITERATURA	15
3.1	METABOLISMO LIPÍDICO	15
3.2	DISLIPIDEMIAS	17
3.2.1	Modelos dietéticos para indução de dislipidemias em roedores	19
3.3	PROCESSO INFLAMATÓRIO E DISLIPIDEMIAS	22
3.4	ESTRESSE OXIDATIVO E DEFESA ANTIOXIDANTE NAS DISLIPIDEMIAS	27
3.4.1	Antioxidantes endógenos	29
3.4.2	Antioxidantes em Alimentos	31
3.5	JAMBO VERMELHO (<i>SYZYGium MALACCENSE</i>)	34
4	MATERIAIS E MÉTODOS	37
4.1	CARACTERIZAÇÃO DO MA E DETERMINAÇÃO DOS COMPOSTOS BIOATIVOS	37
4.1.1	Teor de Ácido Ascórbico e Fibras Solúveis e Insolúveis	38
4.1.2	Perfil de Compostos Fenólicos	38
4.1.3	Perfil de açúcares e ácidos orgânicos	39
4.1.4	Determinação da Capacidade Antioxidante <i>in vitro</i>	40
4.2	ENSAIO BIOLÓGICO	41
4.2.1	Animais e dietas	41
4.2.2	Protocolo de suplementação	44
4.2.3	Teste de Tolerância à Insulina (TTI) e Teste Oral de Tolerância à Glicose (TOTG)	45
4.2.4	Avaliação semanal do peso corporal e do consumo alimentar	45
4.2.6	Eutanásia	46
4.3	METABOLISMO LIPÍDICO	46
4.3.1	Dosagens bioquímicas	46
4.3.2	Quantificação de lipídios totais e determinação de ácidos graxos em fezes e fígado	47

4.3.3	Extração de lipídios e teor de colesterol total em fezes e fígado	48
4.4	PERFIL ANTI-INFLAMATÓRIO E ANTIOXIDANTE	49
4.4.1	Parâmetros Oxidativos.....	49
4.4.2	Análise histopatológica do fígado, intestino, gordura visceral e coração	50
4.4.3	Morfometria do tecido adiposo	51
4.4.2	Medida de citocinas por citometria de fluxo	51
4.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	52
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES	53
5.1	CARACTERIZAÇÃO DO JAMBO VERMELHO E AVALIAÇÃO DO EFEITO HIPOLIPEMIANTE <i>IN VIVO</i>	53
5.1.1	Parâmetros biométricos, consumo dietético e ingestão de gordura	54
5.1.2	Teste de tolerância oral à glicose e à insulina	55
5.1.3	Histopatologia do fígado e scores histológicos da esteatose hepática ..	56
5.1.4	Análises bioquímicas	58
5.1.5	Níveis de gordura e colesterol hepático	59
5.1.6	Níveis gordura, colesterol e teor de ácidos biliares nas fezes	60
5.1.7	Composição de ácidos graxos no fígado e nas fezes	61
5.2	CARACTERIZAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DO JAMBO VERMELHO <i>IN VITRO</i> E AVALIAÇÃO DOS EFEITOS ANTIOXIDANTE E ANTI-INFLAMATÓRIO <i>IN VIVO</i>	62
5.2.1	Parâmetros oxidativos <i>in vivo</i>	62
5.2.2	Análises histológicas e morfométricas	64
5.2.3	Marcadores inflamatórios séricos.....	66
5.3	DISCUSSÕES SOBRE A CARACTERIZAÇÃO DO JAMBO VERMELHO E AVALIAÇÃO DO EFEITO HIPOLIPEMIANTE <i>IN VIVO</i>	66
5.4	DISCUSSÕES SOBRE A CARACTERIZAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DO JAMBO VERMELHO <i>IN VITRO</i> E AVALIAÇÃO DOS EFEITOS ANTIOXIDANTE E ANTI-INFLAMATÓRIO <i>IN VIVO</i>	71
6	CONCLUSÃO.....	75
	REFERÊNCIAS	75
	APÊNDICE A – COMPROVAÇÃO DA DISLIPIDEMIA.....	87
	APÊNDICE B – OUTROS RESULTADOS.....	88

APÊNDICE C – ARTIGO 01 – MALAY APPLE (<i>SYZYGium MALACCENSE</i>) IMPROVES GLYCAEMIC RESPONSE AND LIPID METABOLISM IN DYSLIPIDAEMIC RATS.....	89
APÊNDICE D – ARTIGO 02 – ANTIOXIDANT AND ANTI-INFLAMMATORY PROPERTIES OF MALAY APPLE (<i>SYZYGium MALACCENSE</i>) IN HIGH- FAT DIET-INDUCED WISTAR RATS.....	120
ANEXO A – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA.....	145

1 INTRODUÇÃO

A dislipidemia é considerada um problema de saúde pública a nível nacional e internacional, sendo caracterizada por alterações nos lipídios circulantes e nas lipoproteínas séricas (MORAIS; CHECCHIO; FREITAS, 2013; WHO, 2016). Esta condição contribui para o estabelecimento de processos inflamatórios e de estresse oxidativo no organismo, podendo levar ao estado de aterogênese nos vasos sanguíneos (RAGGI *et al.*, 2018), além de alterações histológicas em órgãos como coração, fígado e intestino (HU *et al.*, 2018; SAFAEIAN *et al.*, 2018; BATISTA *et al.*, 2018).

A alarmante incidência e prevalência de doenças cardiovasculares estão associadas à transição nutricional, caracterizada por padrões dietéticos com alto consumo de gorduras totais, trans e saturadas, colesterol, açúcares simples e outros carboidratos refinados, concomitante ao baixo consumo de ácidos graxos poli-insaturados e fibras (RÍOS-HOYO *et al.*, 2014)

A prática de hábitos alimentares saudáveis, bem como a associação com mudanças no estilo de vida e, em alguns casos, o tratamento farmacológico, fazem parte e são primordiais para o tratamento das dislipidemias e prevenção do risco cardiovascular (VAN DIEPEN *et al.*, 2013; SARIN *et al.*, 2018; RAGGI *et al.*, 2018). Sendo que os cuidados dietéticos são reconhecidos como a intervenção mais importante durante a prevenção e o tratamento das dislipidemias (WHO, 2016). Neste sentido, modelos animais induzidos à dislipidemia por via dietética vêm sendo utilizados em diversos estudos para entender de maneira mais aprofundada a relação causa-efeito da doença, bem como formas de prevenção e tratamentos (BATISTA *et al.*, 2018; BEZERRA *et al.*, 2018).

O consumo diário de alimentos de origem vegetal tem sido associado a menor risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares, devido à presença de compostos bioativos como os carboidratos não digeríveis (fibras alimentares do tipo solúveis e insolúveis), antioxidantes (como polifenóis, carotenoides, tocoferóis, tocotrienóis, compostos organossulfurados), esteroides vegetais e fitoestrógenos (RÍOS-HOYO *et al.*, 2014; ZAMORA-ROS *et al.*, 2015). De uma maneira geral, as frutas, os demais vegetais e as bebidas como chás e vinho tinto são as principais

fontes dietéticas desses compostos. Um mecanismo possível para explicar os efeitos protetores desses compostos em relação a certos processos patológicos é por meio da redução do estresse oxidativo e neutralização de radicais livres (MITTLER, 2016). Alternativamente, os compostos presentes em dietas baseadas em vegetais podem aumentar também a capacidade antioxidante endógena e modular o estado redox celular modificando vias de transdução de sinal por meio de diversos mecanismos (JOSEPH; EDIRISINGHE; BURTON-FREEMAN, 2016; MITTLER, 2016).

Mais recentemente, os compostos fenólicos têm sido estudados também pela sua ação em vias de sinalização celular, particularmente na modificação das vias inflamatórias. Algumas das ações podendo ser diretas, enquanto que outras podem ser resultantes da modificação do balanço redox celular (JOSEPH; EDIRISINGHE; BURTON-FREEMAN, 2016).

Nesse contexto, o Jambo Vermelho (*Syzygium malaccense*) conhecido internacionalmente como Malay apple (MA) ou maçã malaia apresenta vários compostos bioativos e fibras dietéticas que podem ser usadas em intervenções dietéticas, como a modulação do perfil lipídico e atenuação da dislipidemia, assim como no estresse oxidativo e em processos inflamatórios. Os antioxidantes presentes no MA também podem inibir a peroxidação lipídica causando a redução da oxidação da Lipoproteína de Baixa Densidade (LDL) (BONFANTI, *et al.*, 2013; NUNES *et al.*, 2016; SANTOS *et al.*, 2016; SOBEH, *et al.*, 2018).

Procurando entender como o aumento no consumo de determinados alimentos leva à melhora da dislipidemia, considerando a subexploração do MA, sua popularidade em diversas regiões, a deficiência de informações em relação à composição e propriedades nutricionais e a falta de apelo comercial que promova o produto (SANTOS *et al.*, 2016), o estudo do MA pode contribuir para a expansão da fruticultura no Nordeste brasileiro, aumentando as oportunidades de trabalho nas indústrias e atendendo à crescente demanda da indústria alimentícia e de consumidores pelo estudo de alimentos funcionais. Diante dos aspectos abordados, nós delineamos a hipótese de que o MA apresenta propriedades hipolipemiante, antioxidante e anti-inflamatória *in vivo*.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar o jambo vermelho (MA) quanto aos compostos bioativos e analisar o potencial hipolipemiante, antioxidante e anti-inflamatório em ratos dislipidêmicos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar o potencial antioxidante *in vitro*, os teores de fibras solúveis e insolúveis, vitaminas C, o perfil fenólico e de ácidos orgânicos do jambo vermelho (MA);
- Analisar o metabolismo lipídico e parâmetros glicídicos de ratos saudáveis e dislipidêmicos tratados com o jambo vermelho (MA);
- Comparar os efeitos da administração do MA relacionados aos potenciais antioxidante, hipolipemiante e anti-inflamatório em ratos saudáveis e dislipidêmicos.

3 REVISÃO DA LITERATURA

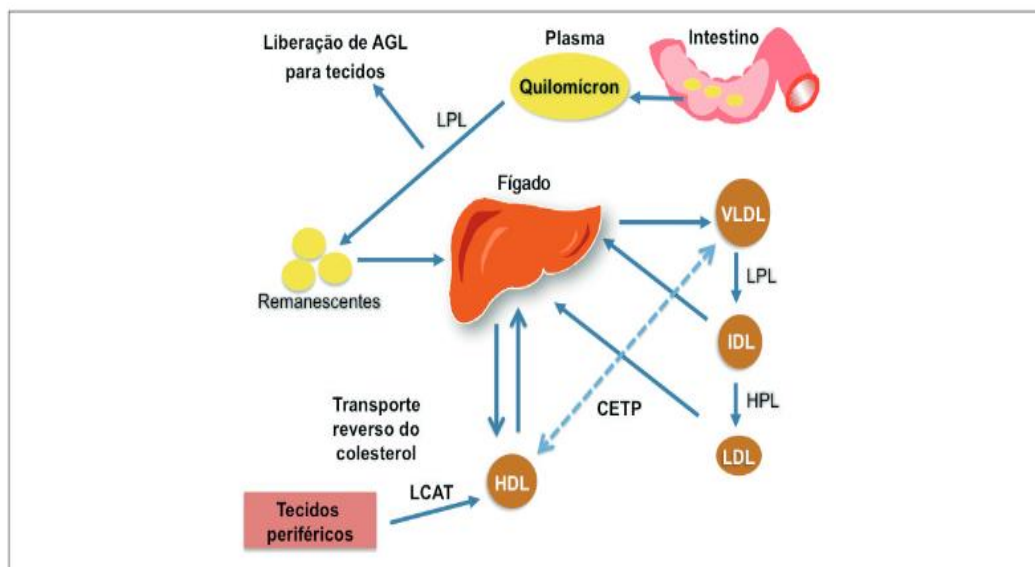
3.1 METABOLISMO LIPÍDICO

Os lipídios nos humanos exibem uma imensa diversidade combinatória e estrutural e desempenham um papel biológico essencial na sinalização, organização e transporte celular (RAGGI *et al.*, 2018), sendo o fígado um dos principais órgãos envolvidos nesse metabolismo, e também o responsável pela regulação dos ácidos graxos, triglicerídeos e colesterol necessários para atender às necessidades metabólicas na fisiologia normal (VAN DIEPEN *et al.*, 2013).

A maior parte das gorduras ingeridas são representadas pelos triglicerídeos (TG) e, de modo geral, após a ingestão, as lipases pancreáticas hidrolisam esses TG emulsificados, em ácidos graxos livres (AGL), monoglicerídeos e diglicerídeos. Sais biliares liberados na luz intestinal emulsificam estes e outros lipídios oriundos da dieta e da circulação entero-hepática, com formação de micelas, permitindo sua absorção pelos enterócitos (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2017).

Na Figura 1 estão demonstrados os principais ciclos de transporte dos lipídios no nosso organismo. O primeiro ciclo pode ser descrito após a absorção dos lipídios pelas células intestinais, nos quais as diversas partículas lipídicas, particularmente os Ácidos Graxos Livres (AGL), são utilizadas na produção de Quilomícrons (QM). Os QM são então secretados pelas células intestinais para o interior do sistema linfático. Enquanto circulam, os QM sofrem lipólise por uma enzima localizada na superfície endotelial de capilares do tecido adiposo e músculos, denominada Lipase Lipoproteica (LPL) com subsequente liberação de AGL, os quais são capturados por células musculares e também por adipócitos, sendo esses últimos importantes reservatórios de TG elaborados a partir de AGL. Remanescentes de quilomícrons e AGL são capturados pelo fígado, onde são utilizados na formação das Lipoproteínas de Densidade Muito Baixa (VLDL) ou utilizados em outras vias metabólicas (XAVIER *et al.*, 2013; SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2017).

Figura 1. Ciclos de transporte de lipídios



Fonte: Atualização da Diretriz Brasileira de Dislipidemia e Prevenção da Aterosclerose, 2017.

O outro ciclo envolve a ação de um transporte carregado por lipoproteínas, realizado, principalmente, pelo fígado. Nesse ciclo, as VLDL, produzidas e secretadas pelo fígado na circulação periférica, são então hidrolisadas pela Lipase Lipoproteica, liberando os AGL que são redistribuídos para os tecidos, podendo ser prontamente utilizados (a exemplo dos músculos esqueléticos) ou armazenados (como no tecido adiposo). O processo de catabolismo da VLDL resulta na formação da Lipoproteína de Baixa Densidade (LDL) responsável pelo transporte do colesterol para os tecidos periféricos (XAVIER *et al.*, 2013). Já as partículas de Lipoproteínas de Alta Densidade (HDL) são formadas no fígado, no intestino e modificadas na circulação, sendo encarregadas de transporte do colesterol no metabolismo de LDL e dos Quilomícrons (transporte reverso do colesterol).

No transporte reverso do colesterol, no qual as gorduras, principalmente o colesterol dos tecidos, retorna para o fígado, as HDL nascentes captam colesterol não esterificado dos tecidos periféricos pela ação da Lecitina-colesterol Aciltransferase (LCAT), formando as HDL maduras. Por meio da ação da Proteína de Transferência de Ésteres de Colesterol (CETP, do inglês *cholesteryl ester transfer protein*), ocorre também a transferência de ésteres de colesterol da HDL para outras lipoproteínas como LDL e VLDL, em troca de triglicérides. Logo, a HDL

enriquecida por triglicérides, após a ação da CETP, encontra-se mais suscetível a hidrólise pela lipase hepática, promovendo assim, a redução da Lipoproteína de Alta Densidade Circulante (HDL) (ZHANG *et al.*, 2015; SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2017).

Atualmente, as alterações no metabolismo lipídico são um fator de risco para desenvolvimento de obesidade, dislipidemia, hiperglicemia, hipertensão, esteatose hepática e outras desordens metabólicas (SUGIMOTO *et al.*, 2016; HU *et al.*, 2018).

3.2 DISLIPIDEMIAS

A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que mais de 7 milhões de pessoas morram anualmente em virtude de doenças arteriais coronarianas e outros 6 milhões de pessoas morrem anualmente em virtude de doenças cardiovasculares tipo hemorrágicas, sendo a maioria destas mortes nos países em desenvolvimento, em parte devido ao aumento da longevidade, da urbanização e das mudanças do estilo de vida (WHO, 2016).

A dislipidemia é um quadro clínico caracterizado por concentrações anormais de lipídios ou lipoproteínas no sangue (BANGALORE *et al.*, 2016), havendo a presença de, no mínimo, uma alteração do perfil lipídico: elevada concentração sérica de Lipoproteína de Baixa Densidade (LDL), Triglicérides (TG) e/ou reduzida de Lipoproteína de Alta Densidade (HDL) (XAVIER *et al.*, 2013). Conforme o tipo de alteração dos níveis séricos de lipídios, a dislipidemia é classificada como: hipercolesterolemia isolada, hipertrigliceridemia isolada, hiperlipidemia mista e HDL baixo, e sua principal consequência é o desenvolvimento de Doenças Cardiovasculares (XAVIER *et al.*, 2013).

As lipoproteínas são as estruturas que permitem a solubilização e transporte dos lipídios, que são substâncias hidrofóbicas, no meio aquoso plasmático (BANGALORE *et al.*, 2016). De acordo com a Sociedade Brasileira de Cardiologia (2017), as lipoproteínas estão divididas em quatro grandes classes separadas em dois grupos: (1) as ricas em triglicérides, maiores e menos densas, representadas pelos quilomícrons (de origem intestinal), e pelas Lipoproteínas de Densidade Muito

Baixa ou *‘very low density lipoprotein’* (VLDL), e (2) as ricas em colesterol, incluindo as de densidade baixa, do inglês *‘low density lipoprotein’* (LDL) e as de densidade alta ou *‘high density protein’* (HDL).

Os valores de referência para avaliação dos níveis lipídicos na circulação sanguínea, de acordo com a Atualização da Diretriz Brasileira de Dislipidemia e Prevenção da Aterosclerose (2017) estão apresentados na tabela 1.

Tabela 1. Valores de referência para avaliação dos níveis de lipídios na circulação sanguínea

Lípides	Com jejum (mg/dL)	Sem jejum (mg/dL)	Categoria referencial
Colesterol Total	< 190	< 190	Desejável
HDL	> 40	> 40	Desejável
Triglicerídeos	< 150	< 175	Desejável
Categoria de risco			
LDL	< 130	< 130	Baixo
	< 100	< 100	Intermediário
	< 70	< 70	Alto
	< 50	< 50	Muito alto
Não HDL	< 160	< 160	Baixo
	< 130	< 130	Intermediário
	< 100	< 100	Alto
	< 80	< 80	Muito alto

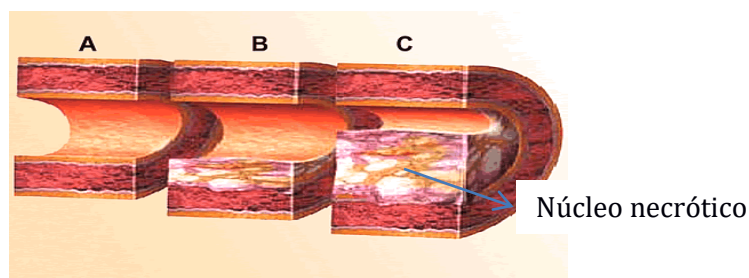
Fonte: Adaptado de V Diretriz Brasileira sobre Dislipidemias (2017).

De acordo com a Agência Brasileira de Vigilância Sanitária (Brasil, 2013), no conjunto das 27 capitais dos Estados brasileiros, incluindo o Distrito Federal, a frequência do diagnóstico médico prévio de dislipidemia foi de 20,0%, sendo maior entre as mulheres (22,2%) em comparação com os homens (17,6%), sendo o diagnóstico de dislipidemia crescente de acordo com a elevação da idade em ambos os sexos.

Anormalidades no metabolismo das lipoproteínas plasmáticas, principalmente em lipoproteínas de Baixa Densidade (LDL) e Lipoproteínas de Alta Densidade (HDL), são fatores de risco primários para Doenças Cardio Vasculares, sendo a de maior evidência, a arteriosclerose, cuja lesão mais precocemente reconhecível caracteriza-se por uma agregação de macrófagos carregados de colesterol (células espumosas) e linfócitos T no interior da artéria. As lesões iniciais progridem em função de uma resposta inflamatória fibroproliferativa exagerada à injúria ou disfunção das células endoteliais e musculares lisas da parede arterial (RAPOSO, 2010).

Uma das possíveis causas da disfunção endotelial é a elevada concentração de LDL oxidada, ou seja, a LDL alterada em relação a sua forma natural. Sabe-se que, em sua forma natural, essas lipoproteínas não são patogênicas, tornando-se danosas apenas quando modificadas pelo processo de oxidação. Uma vez modificada, a LDL é captada pelo macrófago, formando as células espumosas que formam o núcleo necrótico e depositam-se na placa de ateroma (Figura 2). Nesse processo, a LDL oxidada torna-se citotóxica, suas partículas ficam retidas, perde-se a mobilidade e a função removedora de lipídios (FRANÇA, 2002).

Figura 2. Formação da placa aterosclerótica



Fonte: França (2002).

O acúmulo excessivo e a concentração de metabólitos lipídicos intracelulares também resultam em prejuízo na síntese do glicogênio e, conseqüentemente, no metabolismo da diabetes, assim como influenciam na regulação de outros genes e síntese protéica, sendo cruciais na patogênese de inúmeras doenças (DEREK; HYUN-JUN; HUI-YOUNG, 2016).

3.2.1 Modelos dietéticos para indução de dislipidemias em roedores

Devido à elevada incidência e prevalência da dislipidemia na população mundial, muitos estudos vêm sendo realizados em modelos animais induzidos a esta condição, com a finalidade de buscar mais alternativas para prevenção e tratamento da dislipidemia (SHAO *et al.*, 2013; BATISTA, *et al.*, 2014; HU *et al.*, 2018; BEZERRA *et al.*, 2018;).

Por causa da grande variabilidade genética e dos variados hábitos dietéticos das populações humanas, o modelo experimental com ratos mostra-se adequado para tais estudos. O sucesso dos estudos em animais está associado ainda à similaridade geral entre o sistema cardiovascular de ratos com o de outros mamíferos, incluindo o homem (ÁGUILA *et al.*, 2002). Apesar da dificuldade de produzir hiperlipidemia e aterosclerose em ratos, dietas especiais podem induzir o aumento do nível de colesterol sanguíneo, assim como outras disfunções, como a hipertensão arterial ou doenças renais (SHAO *et al.*, 2013; HU *et al.*, 2018).

De maneira geral, a forma de indução a dislipidemia varia de acordo com o objetivo do estudo, sendo o modelo de indução mais comum a oferta de dietas ricas em colesterol e em ácidos graxos saturados e trans, devido à simulação mais fidedigna ao que ocorre em seres humanos (WHITE *et al.*, 2013; CREGE *et al.*, 2016; LIU, *et al.*, 2018).

No Quadro 1, foram reunidos alguns modelos de indução à dislipidemia utilizando dietas em animais.

Quadro 1. Modelos de indução à dislipidemia em roedores.

Referência	Animais utilizados	Duração do experimento	Composição da dieta	Principais resultados
Zhang <i>et al.</i> , 2014.	Ratos Sprague Dawley (machos)	12 semanas	Dieta hiperlipídica: 58% (30,4g AGS. 5,3g AGI.	Esteatose hepática; Acúmulo excessivo de gordura corporal; Aumento da AST e ALT; Aumento do TG;
Hosomi <i>et al.</i> , 2015.	Ratos Wistar (machos)	4 semanas	Dieta hipercolesterolêmica: AIN-93G (óleo de soja + 1% de colesterol).	Aumento de TG no sangue e fígado; Diminuição de excreção fecal de ácidos graxos.
Li <i>et al.</i> , 2015.	Hamster (machos)	6 semanas	Dieta hiperlipídica: 80% de dieta padrão + adição de 1% de colesterol + 15% de gordura e colato de sódio a 1%.	Aumento do CT, do LDL e do TG; Maior acúmulo de colesterol no fígado; Elevação do colesterol biliar;
Ipsen <i>et al.</i> , 2016.	Cobaías Hartley	25 semanas	Dieta hiperlipídica: 80g	Aumento do CT, TG, LDL e

	(fêmeas)		+ Adição de 1,4g colesterol	VLDL; Diminuição do HDL; Presença de esteatose hepática.
Akaki <i>et al.</i> , 2018.	Camudongos (machos)	4 semanas	Dieta hiperlipídica: 32% de lipídios (20% óleo vegetal 5% clara de ovo + 1% de colesterol)	Aumento da captação de colesterol pelas células intestinais; Aumento do acúmulo de gordura e peso corporal; Aumento do TG, da AST e ALT; Diminuição da excreção de lipídios totais e colesterol nas fezes.
Batista <i>et al.</i> , 2018.	Ratos Wistar (fêmeas)	4 semanas	Dieta dislipidêmica: 6% banha 3% gordura vegetal + 1% colesterol + 0,5% ácido cólico	Aumento do CT, TG e LDL; Diminuição do HDL; Aumento da gordura visceral e gordura hepática; Esteatose hepática; Menor excreção de gordura nas fezes; Prejuízo na integridade do cólon.
Bezerra <i>et al.</i> , 2018.	Ratos Wistar (machos)	5 semanas	Dieta dislipidêmica: 6% banha 3% gordura vegetal + 1% colesterol + 0,5% ácido cólico	Aumento dos níveis de CT e LDL e diminuição dos níveis de HDL; Aumento dos níveis de AST e gordura hepática; Redução de bactérias benéficas a nível intestinal; Aumento no valor de GPx e diminuição de SOD; Aumento do dano oxidativo nos tecidos e danos aos

				hepatócitos; Destruição epitelial do cólon.
Sandoval- Gallegos <i>et al.</i> , 2018.	Ratos Wistar (machos)	32 dias	Dieta hipercoleterolêmica: (1% colesterol + 5% manteiga + 4,5% ovos)	Aumento dos níveis de CT e LDL; Aumento do TG na proporção de duas vezes maior do grupo alimentado com dieta padrão; Diminuição do HDL; Aumento do indicador para DC na proporção de quatro vezes mais do grupo alimentado com dieta padrão.

Fonte: Elaborado pela autora. PTN: proteína; CHO: carboidrato; LIP: lipídios; CT: colesterol total; TG: triglicerídeos; AST: aspartato aminotransferase; ALT: alanina aminotransferase; DC: doença cardíaca; AGS: ácido graxo saturado; AGI: ácido graxo insaturado; GPx: glutathione peroxidase; SOD: superóxido dismutase.

Dessa forma, os resultados de estudos experimentais trazem a perspectiva de possíveis vias de prevenção e tratamento da dislipidemia. Corroborando com isso, alguns estudos já realizados em humanos, sugerem ainda que o aumento do consumo de antioxidantes por fontes alimentares de origem vegetal reduz o risco de doenças cardiovasculares, prevenindo também o desenvolvimento da dislipidemia (WALLACE, 2011; TEIXEIRA *et al.*, 2012).

3.3 PROCESSO INFLAMATÓRIO E DISLIPIDEMIAS

De modo geral, a inflamação é uma resposta a um determinado fator estressor, e, em condições normais é resolvida assim que a agressão é suprimida. Essa resposta inflamatória pode ser induzida também por outros fatores como obesidade, dislipidemia e hábitos dietéticos inadequados (RAGGI *et al.*, 2018). Nesse contexto, a aterosclerose é reconhecida como uma doença inflamatória, onde o sistema imune desempenha um papel crucial na sua iniciação e progressão, tendo na sua patogênese a desregulação da homeostasia dos lipídeos, pelo que os níveis

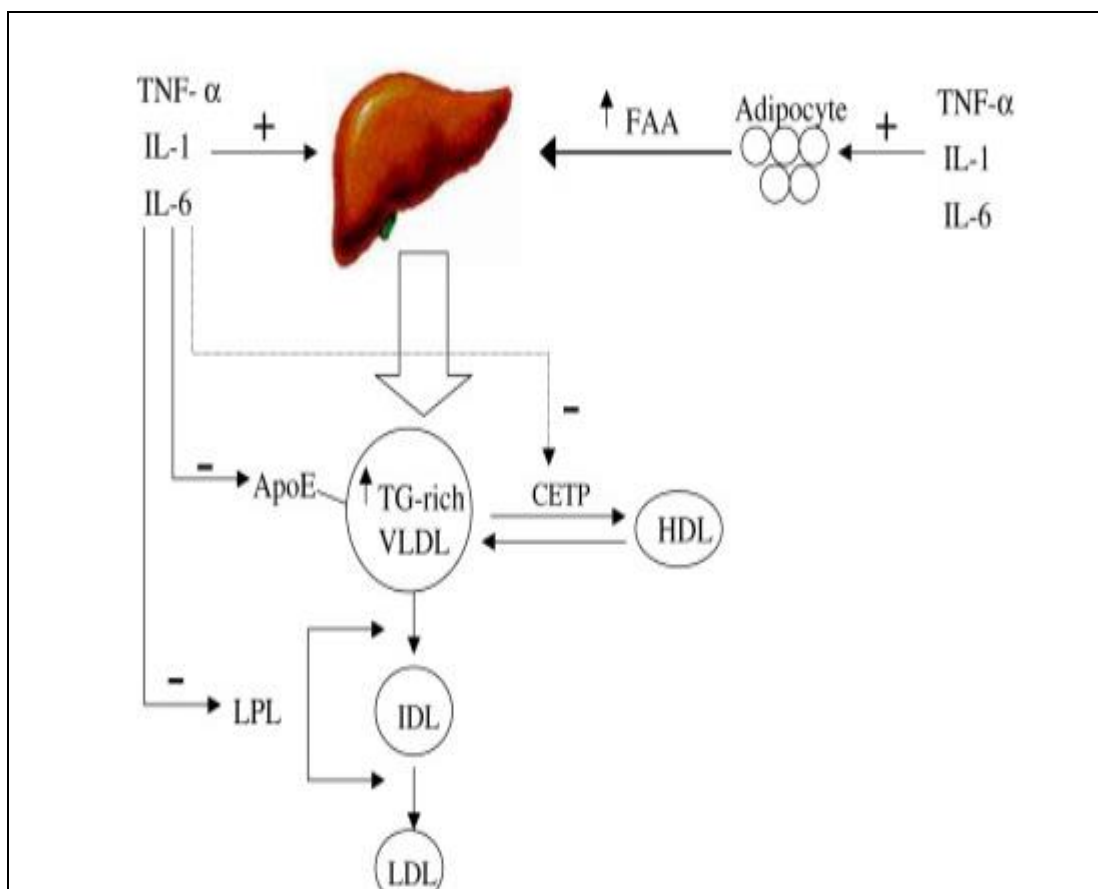
circulantes de colesterol plasmático têm sido um alvo primário da terapêutica na prevenção e tratamento da Doença cardiovascular (DCV) aterosclerótica (RAGGI *et al.*, 2018)

O transporte de colesterol e ácidos graxos através das lipoproteínas plasmáticas que ocorre livremente no sistema circulatório, no qual partículas de lipoproteínas são secretadas diretamente no sangue e têm acesso imediato às células e a vários tecidos. Porém, a inflamação a partir da dislipidemia origina-se na instauração de uma inflamação da parede vascular e uma desregulação do metabolismo lipídico. (VAN DIEPEN *et al.*, 2013).

Alterações dessas moléculas lipídicas podem gerar danos a nível fisiológico. Durante os processos de inflamação e infecção, ocorre uma série de alterações conhecidas como Respostas de Fase Aguda (APR, do inglês, *acute-phase response*), que têm a finalidade de proteger o organismo contra lesões nos tecidos e facilitar os mecanismos de reparação. Nas Respostas de Fase Aguda, podem ocorrer distúrbios característicos do metabolismo lipídico (pela presença de moléculas plasmáticas circulantes), como aumento da concentração sérica de TG e diminuição do HDL-colesterol (HDL), bem como ocorrer alterações no colesterol total (CT) e no colesterol LDL (LDL) (ESTEVE; RICART, FERNANDÉZ-REAL, 2005; RAGGI *et al.*, 2018).

Como está demonstrado na Figura 3, o aumento na produção de partículas ricas em triglicerídeo hepático ocorre naturalmente pela reesterificação do ácido graxo plasmático proveniente tanto da lipólise quanto da síntese aumentada de ácidos graxos no fígado, mas também pode ficar aumentada devido ao processo inflamatório, reduzindo assim a atividade da Lipase Lipoprotéica (LPL) e reduzindo também os níveis de apoE associados a VLDL (prejudicando a captação celular de partículas ricas em TG) (ESTEVE; RICART, FERNANDÉZ-REAL, 2005).

Figura 3. Mecanismos de hipertrigliceridemia associada à inflamação.



Fonte: Adaptado de ESTEVE; RICART, FERNANDÉZ-REAL, 2005)

TNF, Fator de Necrose Tumoral; IL, Interleucina; apoE, apolipoproteína-E; CETP, proteína de transferência de éster de colesterol; LPL, lipase lipoproteica; TG, triglicerídeo; FAAs, ácidos graxos livres.

Um dos papéis desempenhados pelo processo inflamatório nas dislipidemias está relacionado a alterações dentro dos vasos sanguíneos e o desenvolvimento da aterosclerose, que inclui a ativação de células endoteliais (ECs), que levam à expressão de moléculas de adesão (por exemplo. ICAM – 1), que, por sua vez, atraem células inflamatórias como neutrófilos, células-T e monócitos para a parede dos vasos. As vias inflamatórias intracelulares (por exemplo, IKK E JNK) também desempenham um papel fundamental nesse processo, envolvendo múltiplos fatores de transcrição e citocinas (GETZ; REARDON, 2005).

As citocinas são produzidas no nosso organismo de forma regulada para modulação da resposta imune. Uma vez expressas, as citocinas TNF-α e IL-1β levam a uma consequente ativação da resposta imune inata, caracterizada pela produção adicional de outras citocinas efetoras ou imunorreguladoras que

aumentam a expressão de moléculas de adesão em leucócitos e células endoteliais. A ativação dos monócitos e macrófagos e a intensa ação dos mediadores iniciais acarretam a síntese de IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IFN- γ e outros mediadores pró e antiinflamatórios que tentam restaurar o equilíbrio na resposta inflamatória (CALDER, 2011).

No estado precoce da aterogênese, a oxidação da lipoproteína de baixa densidade (LDL) e o desequilíbrio do balanço das lipoproteínas levam à expressão dessas citocinas próinflamatórias, tendo como consequência a disfunção e o dano do endotélio arterial, que, por sua vez, levam à acumulação sub-endotelial de lipoproteínas aterogênicas e à adesão leucocitária no endotélio, promovendo a formação de placas ateromatosas associadas à deposição de colesterol e de outros produtos de excreção celular, ativando os macrófagos. A modulação da função macrofagocitária, os compostos lipídicos, como por exemplo lipoproteínas oxidadas, ácidos gordos livres e o colesterol, entre outros, propiciam a instabilidade da placa ateromatosa na parede arterial e contribuem para o desenvolvimento de doenças inflamatórias em vários órgãos (VAN DIEPEN *et al.*, 2013).

A ativação de processos inflamatórios pode ocorrer em vários órgãos após alimentação com alto teor de gordura ou colesterol também é um processo que acontece no nosso organismo. As escolhas alimentares têm uma consequência da interferência direta e indireta de lipoproteínas e lipídios com vias inflamatórias, células imunes e /ou tecidos metabolicamente ativos (CALDER, 2011).

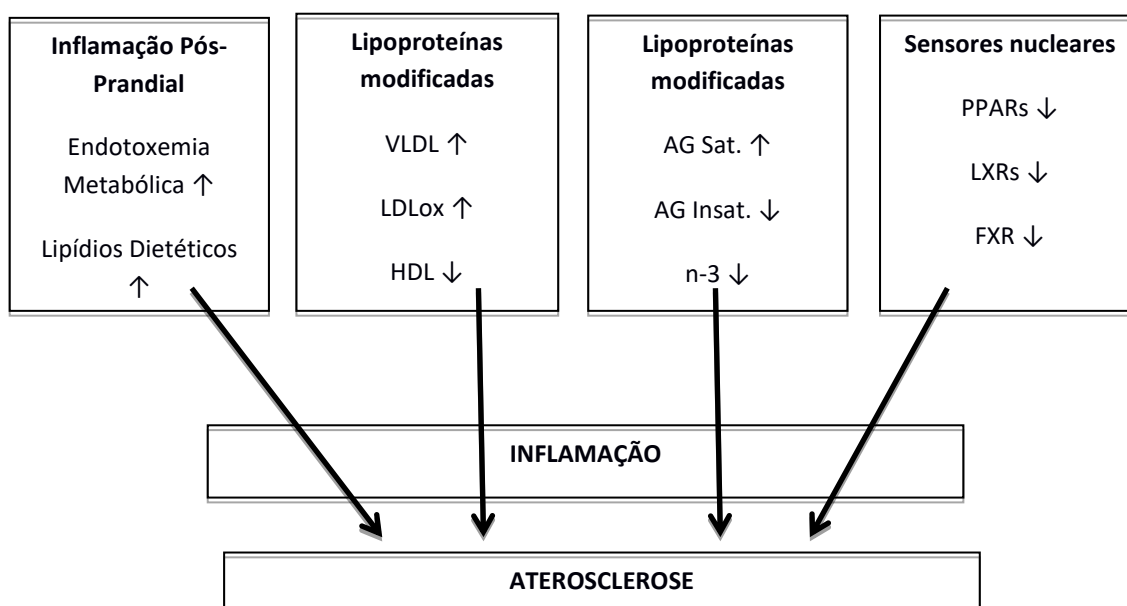
A ingestão hipercalórica, o consumo de dietas/refeições ricas em lipídios e carboidratos rapidamente digeríveis (padrão da dieta ocidental), por exemplo, pode induzir uma resposta inflamatória aguda no organismo, tanto para indivíduos eutróficos quanto obesos (RÍOS-HOYO *et al.*, 2014).

No período pós-pandrial o metabolismo oxidativo também gera espécies reativas de oxigênio (EROs), resultando em estresse oxidativo diante do consumo de energia em excesso. Essa mudança do estado celular redox ativa as vias sinalizadoras como o fator nuclear kappa (NF- κ B) e quinases c-Jun-N-terminal (JNK) e outras moléculas sinalizadoras aumentando a expressão de genes pró-inflamatórios (KHURANA *et al.*, 2013; JOSEPH; EDIRISINGHE; BURTON-FREEMAN, 2016).

Na interface entre o metabolismo lipídico e a inflamação pode ainda destacar-se o papel de receptores nucleares, tais como o receptor ativado por proliferadores de peroxissoma (PPAR, peroxisome-proliferated activated receptor) e o recetor X hepático (LXR, liver X receptor) que desempenham a função de sensores lipídicos (VAN DIEPEN *et al.*, 2013).

A maiorias dos efeitos globais dos fatores supracitados relacionados à inflamação e à dislipidemia está apresentado na Figura 4.

Figura 4. Fatores relacionados às dislipidemias e à inflamação



Fonte: Adaptado de VAN DIEPEN *et al.*, 2013.

Algumas possíveis ações diretas dos compostos bioativos presentes em fontes vegetais (em frutas, por exemplo) nas vias de sinalização celular, particularmente na modificação das vias inflamatórias, incluem: (1) bloqueio ou inibição da transcrição de receptores que aumentam a expressão de genes pró-inflamatórios como receptores de interleucinas (IL), receptores tipo toll (TLR-4), o NF-κB, a proteína ativadora (AP-1) e as JNK; (2) ligantes naturais para receptores proliferadores ativados por peroxissomos (PPAR-γ), que modulam a expressão de genes pró-inflamatórios. Uma vez ativado (por ingestão de gordura saturada, por exemplo, que ativam os receptores TLR-4), o NF-κB aumenta a expressão de diversos genes que codificam para proteínas envolvidas na resposta inflamatória (JOSEPH; EDIRISINGHE; BURTON-FREEMAN, 2016)

3.4 ESTRESSE OXIDATIVO E DEFESA ANTIOXIDANTE NAS DISLIPIDEMIAS

O estresse oxidativo está associado à alta produção de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS, do inglês, *Reactive Oxygen Species*), as quais possuem elevada reatividade com os lipídios insaturados nas membranas, proteínas e ácidos nucleicos, alterando de forma significativa a função celular (MITTLER, 2016).

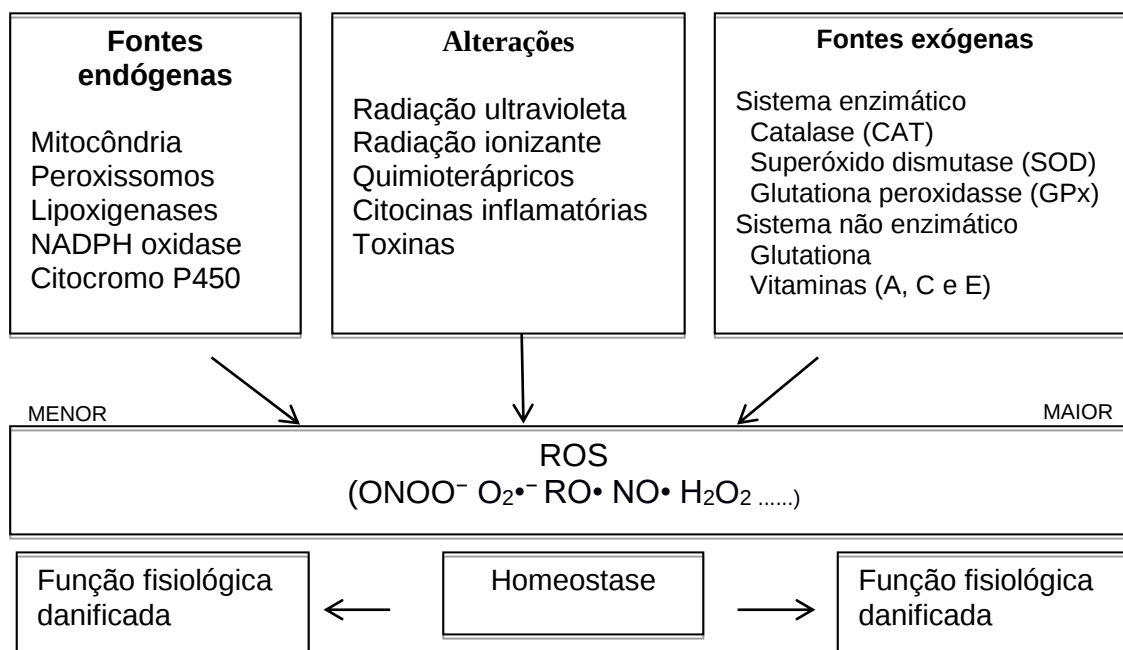
As principais ROS distribuem-se em dois grupos: os radicalares (possuem elétrons desemparelhados), a exemplo das hidroxilas ($\text{HO}\bullet$), superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), peroxila ($\text{ROO}\bullet$) e alcóxil ($\text{RO}\bullet$) e os não-radicalares (não possuem elétrons desemparelhados), a exemplo do oxigênio, peróxido de hidrogênio e ácido hipocloroso. Há também o grupo das espécies reativas de nitrogênio, que incluem o óxido nítrico ($\text{NO}\bullet$), o óxido nitroso (N_2O_3), o ácido nitroso (HNO_2), os nitritos (NO_2^-), os nitratos (NO_3^-) e os peroxinitritos (ONOO^-).

Os oxidantes são gerados, naturalmente, não só como consequência do metabolismo normal intracelular das mitocôndrias e peroxissomos, mas também a partir de uma variedade de sistemas de enzimas citosólicas. Em contrapartida, o organismo humano possui um sofisticado sistema de defesa antioxidante enzimático (ou não-enzimático) incluindo a da catalase (CAT), a superóxido dismutase (SOD) e a glutatona peroxidase (GPx), que são responsáveis pela neutralização e regulação dos níveis globais das espécies reativas de oxigênio, mantendo a homeostase fisiológica. Além dessa produção endógena, há também alguns agentes externos a exemplo de vitaminas e compostos fenólicos, que também podem auxiliar na neutralização das ROS (JUNIOR *et al.*, 2001).

É necessário haver um equilíbrio na produção de espécies reativas. A redução dos níveis das ROS abaixo do ponto de ajuste homeostático pode interromper o papel fisiológico de oxidantes na proliferação celular e defesa. Do mesmo modo, o aumento das ROS também pode ser prejudicial e levar à morte celular ou a uma aceleração no envelhecimento e ao desenvolvimento de doenças relacionadas à idade. Tradicionalmente, relaciona-se o prejuízo causado pelo aumento das ROS com danos protéicos, lipídicos e no DNA, mas, além destes efeitos, os níveis aumentados de espécies reativas pode também constituir um sinal de estresse, ativando vias específicas de sinalização que, uma vez desencadeadas,

podem ter ações danosas (FINKEL; HOLBROOK, 2000; PRASAD; GUPTA; TYAGI, 2016) (Figura 5).

Figura 5. Fontes e respostas celulares às espécies reativas de O₂



Fonte: Adaptado de Finkel; Holbrook, 2000.

Em consequência do aumento na produção de radicais livres e seus consequentes danos a nível celular em sistemas biológicos (destruição celular e depleção do ATP, impedimento da apoptose controlada e perda da função celular), o aumento das ROS também está diretamente relacionado à fisiopatologia de diversas doenças como aterosclerose, mal de Parkinson, Alzheimer, câncer, obesidade e diabetes (PRASAD; GUPTA; TYAGI, 2016). Quando associado a altas doses de ácidos graxos livres no plasma, o estresse oxidativo parece ser um dos principais problemas no metabolismo lipídico, causando necrose, edema celular e perda da integridade da membrana (RAGGI *et al.*, 2018)

Entre os efeitos patológicos em sistemas celulares dislipidêmicos, uma das principais consequências está relacionada à modificação da lipoproteína transportadora de frações lipídicas LDL em sua forma oxidada (LDL oxidada), essa modificação na estrutura da lipoproteína resulta na formação de células espumosas pela fagocitose dos macrófagos, acarretando uma ação inflamatória e a proliferação

celular no espaço subendotelial, induzindo a formação de placas ateroscleróticas, a obstrução de vasos sanguíneos e o desenvolvimento de doenças cardiovasculares graves (SIQUEIRA *et al.*, 2006; VAN DIEPEN *et al.*, 2013).

Alguns estudos já conseguiram correlacionar positivamente o consumo de alimentos de origem vegetal com a diminuição de alguns produtos da peroxidação lipídica no plasma sanguíneo. Bub *et al.*, (2000) viram que o consumo de 330 mL/dia de suco de tomate (contendo 40 mg de licopeno) durante duas semanas reduziu em 12% a produção de produtos da peroxidação lipídica no plasma de 23 indivíduos saudáveis e outro estudo mostrou que o consumo diário de um litro de bebida à base de soja (contendo 25g de soja e 82,9mg de isoflavonas) reduziu em 16,6% a produção de produtos de peroxidação lipídica (de 1,82 nM/L para 1,49 nM/L) em 60 indivíduos hipercolesterolêmicos (BRICARELLO *et al.*, 2004; PEREIRA *et al.*, 2014).

3.4.1 Antioxidantes endógenos

O desenvolvimento de sistemas de defesa antioxidante pelo organismo está relacionado ao processo evolutivo da vida anaeróbica para a aeróbica. Os primeiros organismos vivos sobre a Terra eram essencialmente anaeróbicos; sua evolução para a forma de vida aeróbica envolveu a adaptação a maiores níveis de oxigênio. Para que isto fosse possível, foi necessário o desenvolvimento de mecanismos de defesa antioxidante contra as propriedades tóxicas do oxigênio (GUTTERIDGE, 1995).

Desde então as espécies radicalares estão envolvidas nos mecanismos de reações inflamatórias ou atuam como segundos mensageiros para manter diversas funções celulares. A presença de radicais livres têm sido correlacionada a um grande número de doenças, indicando que estas espécies têm um papel etiológico na grande maioria dos estados patológicos, e que podem participar diretamente dos mecanismos fisiopatológicos que determinam a continuidade e as complicações presentes nestes processos (KAWASHIMA *et al.*, 2007; KHAN *et al.*, 2008).

Neste contexto, alguns dos principais meios de defesas antioxidantes não enzimáticos para proteção do organismo estão exemplificados abaixo (quadro 2).

Quadro 2. Principais meios de defesa antioxidante

Não-enzimático (Alimentos)	Exemplo de fontes alimentares
Tocoferóis (Vitamina E)	Nozes, vegetais, frutas, óleos e sementes
Ácido ascórbico (Vitamina C)	Frutas e outros vegetais
Carotenoides	Frutas, outros vegetais e algas
Flavonoides	
Flavonois (quercetina e kaempferol)	Cebola e brócolis
Isoflavonas (daidzeína e ginasteína)	Soja
Catequinas (epicatequina e epigallocatequina)	Chá e cacau
Polifenóis	Cacau, chocolate e vinho tinto
Antocianinas	Frutas e vegetais
Ácido cafeico e derivados	
Ácido Clorogênico	Soja e café
Orizanol	Sementes de arroz
Lignanas	Sementes de sésamo
Lignina	Linhaça
Sesaminol, sesamina e sesamolina	Semente de gergelim
Melanoidinas	Produtos fermentados de soja
Aminoácidos e peptídeos	Proteínas hidrolisadas (peixe, soja)
Ervas e especiarias	Terpenos e curcuminoides (cúrcuma)
Glutathiona	Brócolis e carne de porco

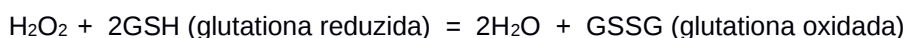
Fonte: Adaptado de Sies, 1997; Osawa; Kato, 2005.

Os sistemas endógenos são sintetizados no organismo humano, e constituem um sofisticado sistema enzimático e não-enzimático de defesa. As principais enzimas antioxidantes envolvidas são a enzima do ciclo redox da glutathiona, particularmente a glutathiona peroxidase (GPx), a superóxido dismutase (SOD) e a catalase (CAT).

A glutathiona peroxidase (GPx) usa vários doadores de elétrons para reduzir o H_2O_2 a H_2O . Na reação de redução, o tripeptídeo glutathiona (GSH, ou glutathiona reduzida) é o substrato, sendo oxidado formando um dissulfeto (GSSG, ou glutathiona oxidada), mas a glutathiona redutase (GR) converte-o novamente a GSH, usando NADPH (Tabela 2).

Tabela 2. Reação de redução glutathiona peroxidase (GPx)

Glutathiona Peroxidase (GPx – fora do peroxissoma)



Fonte: Adaptado de Sies, 1997

A Superóxido Dismutase (SOD), é dependente de Cu^{2+} e Zn^{2+} como cofatores, promove a dismutação do radical superóxido em peróxido de hidrogênio e oxigênio.

Tabela 3. Superóxido Dismutase (SOD)

Superóxido Dismutase (SOD – citoplasma, mitocôndria)
$\text{O}_2^{\bullet-} + \text{O}_2^{\bullet-} + 2\text{H}^+ = \text{O}_2 + \text{H}_2\text{O}_2$ (Reação de dismutação)
Fonte: Adaptado de Sies, 1997

A Catalase (CAT) elimina H_2O_2 por meio de dismutação bivalente, onde H_2O_2 é transformado em O_2 e $2\text{H}_2\text{O}$

Tabela 4. Catalase (CAT)

Catalase (CAT – dentro do peroxissoma)
$\text{H}_2\text{O}_2 + \text{H}_2\text{O}_2 = \text{O}_2 + 2\text{H}_2\text{O}$
Fonte: Adaptado de Sies, 1997

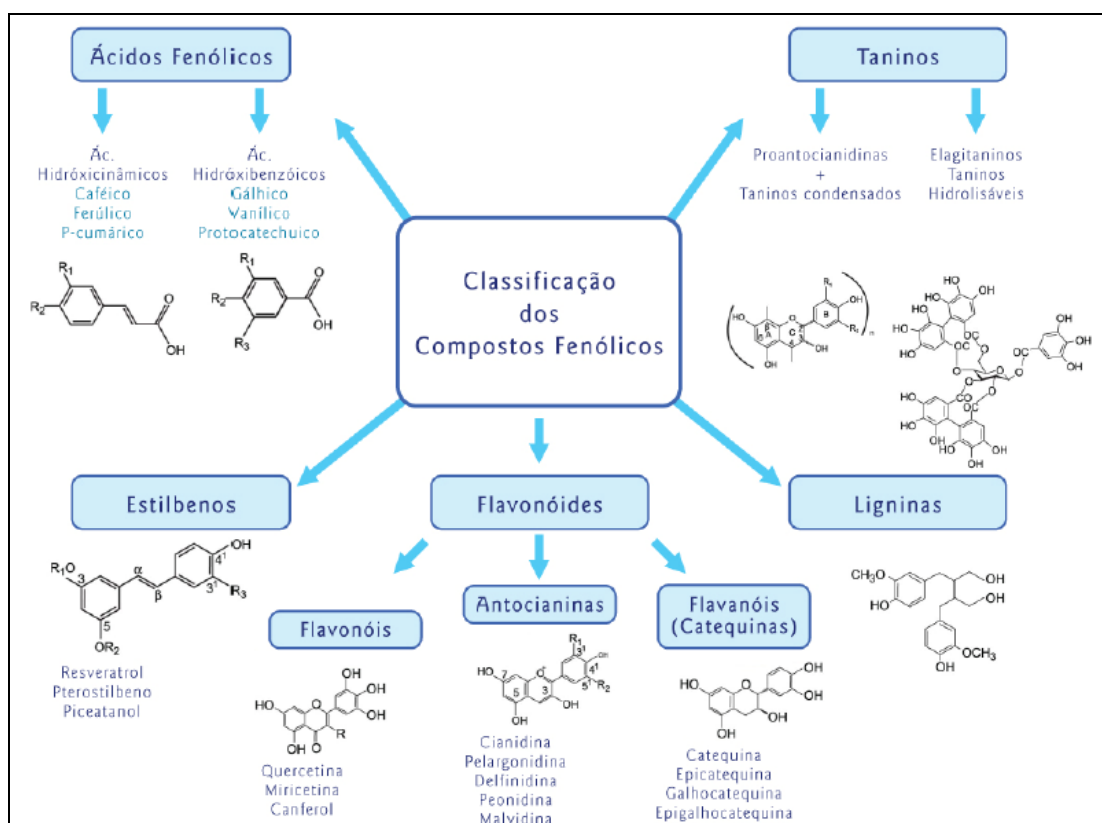
3.4.2 Antioxidantes em Alimentos

A fonte da maioria dos antioxidantes não enzimáticos é a alimentação, consequentemente, a defesa antioxidante torna-se ainda mais comprometida pela baixa ingestão de nutrientes e compostos bioativos antioxidantes (JOSEPH; EDIRISINGHE; BURTON-FREEMAN, 2016). Os compostos antioxidantes estão presentes em diversos alimentos como cereais integrais, oleaginosas, frutas e hortaliças.

Na ausência da quantidade adequada de nutrientes e compostos bioativos, não ocorre a modulação antioxidante necessária, aumentando, assim, a produção de radicais livres, resultando em efeitos deletérios como a peroxidação lipídica – oxidação da LDL e das membranas celulares, levando ao envelhecimento precoce, a desnaturação de proteínas musculares como a actina e a miosina, e ao aumento da possibilidade de lesões (JOSEPH; EDIRISINGHE; BURTON-FREEMAN, 2016).

Os antioxidantes presentes em maior quantidade na dieta humana são os compostos fenólicos (Figura 6), que podem ser definidos como substâncias que possuem um anel aromático com uma ou mais hidroxilas, podendo apresentar também outros grupos substituintes em sua estrutura, como os ésteres, metil-ésteres e glicosídeos. Quando formam estruturas poliméricas são também denominados polifenóis (BALASUNDRAM; SUNDRAM; SAMMAN, 2006).

Figura 6. Esquema de classificação dos principais compostos fenólicos



Fonte: Paredes-López *et al.*, 2010.

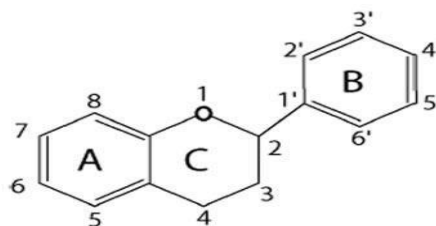
Uma diversidade de propriedades bioativas já foram identificadas nos compostos fenólicos, e é de amplo conhecimento que eles exercem atividade antioxidante em sistemas biológicos. Para estimar a capacidade inibitória destes compostos em relação a espécies reativas, frequentemente são reportados na literatura dados de correlação entre atividade antioxidante e concentração de compostos fenólicos. No entanto, quando os valores de correlação são baixos, a conclusão é de que os compostos fenólicos não são os responsáveis pela atividade antioxidante (SCALZO *et al.*, 2005; DEEPA *et al.*, 2007).

Embora em alguns casos isto possa ser verdadeiro, esta interpretação não considera fatores como as diferenças no perfil fenólico que podem ser qualitativas (tipo de fenólicos presentes) e quantitativas (concentrações relativas ou proporcionais dos fenólicos presentes). Esses estudos, geralmente, também não apresentam testes dessas substâncias em modelos animais. É necessário considerar também que as amostras avaliadas podem incluir diferentes genótipos, amostras em diferentes estágios de maturação, ou até amostras expostas a diferentes condições de armazenamento após a colheita (JACOBO-VELÁZQUEZ; CISNEROS-ZEVALLOS, 2009).

A atividade antioxidante de um composto fenólico está relacionada com o número de grupos hidroxila disponíveis presentes na estrutura química. Assim, a maneira pela qual este composto vai neutralizar os radicais livres vai depender da sua concentração relativa na matriz da amostra. Além disso, os compostos fenólicos podem atuar de forma sinérgica (CIRICO; OMAYE, 2006), agonista (HEO *et al.*, 2007), ou antagonística (PEYRAT-MAILLARD; CUVELIER; BERSET, 2003) para inibir espécies reativas.

Em geral, o poder antioxidante dessas substâncias também depende das posições do grupo hidroxila e seus substituintes, assim como da glicosilação das moléculas de flavonoides. No caso dos flavonoides, que possuem um esqueleto difenilpropano, sua eficiência como neutralizadores de radicais livres parece depender principalmente do número de grupos hidroxila e sua posição na molécula. O potencial antioxidante é relacionado à estrutura em termos de rearranjo de elétrons no núcleo aromático. Por exemplo, o ângulo de torção do anel B (Figura 7) em relação ao restante da molécula em flavonas e flavanonas comparado a um arranjo planar em flavonóis e flavanóis com um 3-OH sugere que a conformação planar favorece a conjugação, o rearranjo de elétrons, e um aumento na estabilidade do radical fenoxil. Além disso, a presença de glicosilações na molécula pode diminuir sua atividade antioxidante. Em geral, os arranjos estruturais dos flavonóides são considerados os responsáveis por conferir maior atividade antioxidante e a presença de determinados grupos hidroxila no núcleo da molécula de flavonoide aumenta a capacidade antioxidante (CAI *et al.*, 2006).

Figura 7. Estrutura química dos flavonoides



Fonte: CAI *et al.* (2006).

3.5 JAMBO VERMELHO (*SYZYGIUM MALACCENSE*)

O Brasil, em função de sua vasta extensão territorial e ampla variação climática, possui uma das maiores diversidades de espécies frutíferas do mundo. As regiões Norte e Nordeste, em especial, produzem grande variedade de frutos tropicais, nativos e exóticos com boas perspectivas para exploração econômica (BRASIL, 2015).

Estudos recentes indicam que a ingestão desses frutos ou produtos vegetais está associada com uma redução no risco de uma variedade de marcadores crônicos em roedores dislipidêmicos, efeitos que têm sido particularmente atribuídos aos compostos que possuem atividade antioxidante nos vegetais (SHAO *et al.*, 2013; BATISTA *et al.*, 2018; HU *et al.*, 2018). Por outro lado, a população ainda convive com carências nutricionais, provocadas principalmente pela deficiência de alimentos ou pelo consumo inadequado deles.

Syzygium malaccense (L.) Merr. & L. M. Perry (Figura 8) pertence à família Myrtaceae e é conhecido como jambo vermelho e, na língua inglesa, como “malay apple”. É uma árvore frutífera de países tropicais e subtropicais e possui frutos comestíveis que contêm vitaminas A, B1, B12, além de cálcio, ferro e fósforo, podendo ser consumidos in natura ou em forma de subprodutos (polpas, doces e compotas, por exemplo). A árvore popularmente conhecida como jambo-vermelho ou jambeiro, tem origem asiática, mais especificamente da Índia e da Malásia. No Brasil, é encontrado nos estados da região Norte, Nordeste e nas regiões quentes do Sudeste e seus frutos (MELO *et al.*, 2009; BRASIL, 2015).

Figura 8. Fruto Jambo vermelho (*Syzygium malaccense*)



Fonte: Acervo da autora.

O jambeiro pode atingir de 12 m a 15 m de altura (Figura 9). O seu fruto possui forma de pêra, com aproximadamente 7 cm de comprimento, possuindo epicarpo fino e vermelho quando maduro e polpa branca, suculenta, crocante e levemente adocicada, dotado de uma única semente (BRASIL, 2015). O fruto pesa em média 62,21 g e mede cerca de 5,91 cm longitudinalmente de diâmetro e 4,87 cm transversalmente de diâmetro (NUNES *et al.*, 2016).

Figura 9. Árvore do fruto Jambo vermelho (*Syzygium malaccense*)



Fonte: Acervo da autora.

A família Myrtaceae compreende cerca de 80 gêneros, com aproximadamente 3.000 espécies de árvores e arbustos, é largamente distribuída nas florestas brasileiras e presente em regiões tropicais e subtropicais do globo. O gênero *Syzygium* é considerado um dos maiores da família Myrtaceae, com aproximadamente 500 espécies de árvores e arbustos, dos quais cerca de 400 distribuem-se no Brasil e assume destaque especial, por fornecer extratos utilizados

na medicina tradicional como antioxidantes, antimicrobianos, anti-inflamatórios, hipoglicemiante, cardiotônicos, representando uma fonte promissora a ser explorada (VENDRUSCOLO *et al.*, 2005; OLIVEIRA *et al.*, 2005; NUNES, *et al.*, 2016).

Nunes *et al.* (2016) caracterizaram física e quimicamente os frutos do jambo vermelho e avaliaram sua atividade antioxidante, assim como fizeram a identificação dos principais compostos bioativos presentes. Eles comprovaram que a casca do jambo vermelho tem boa atividade antioxidante, possivelmente devido aos compostos fenólicos, e entre eles, destaca-se a presença das antocioninas, sendo Cianidina 3-Glucosídeo a composto majoritário presente no fruto. Ademais, foi observado que os extratos de casca isolada demonstraram um maior poder de inibição de oxidação em comparação com extratos de porções comestíveis. Ainda, a adaptação morfológica e climática da fruta em diferentes regiões geográficas pode refletir sobre as características físicas e químicas

Reynertson *et al.* (2008) num estudo com frutos de plantas pertencentes à família Myrtaceae, determinaram e quantificaram por cromatografia líquida de alta eficiência a presença nos frutos de *Syzygium malaccense* dos seguintes compostos fenólicos: cianidina 3-glicosídeo (antocianina), ácido elágico, quercitina, quercitrina e rutina cujas atividades antioxidante e antiinflamatória foram confirmadas.

Pino *et al.* (2004), identificaram 133 compostos voláteis dos frutos de *S. malaccense* que estão diretamente relacionados com o seu aroma. O composto predominante foi o 2-feniletanol e seus ésteres representados principalmente pelo acetato de 2-feniletil, isopentanoato de 2-feniletil, benzoato de 2-feniletil e fenilacetato de 2-feniletil.

Outros estudos mais recentes também avaliaram a presença de compostos bioativos e o potencial antioxidante do MA, assim como sua atividade hipoglicêmica (PEIXOTO *et al.*, 2016; BATISTA *et al.*, 2017; GIBBERT; BERTIN; KRUGER, 2017). Entretanto, não foram encontrados relatos na literatura de testes relacionando a caracterização do fruto a efeitos antioxidantes, anti-inflamatórios e hipolipemiantes em modelos animais.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

O presente estudo experimental foi realizado nos seguintes laboratórios:

- Caracterização dos Compostos Bioativos: Laboratório de Águas e Bebidas (Departamento de Tecnologia em Alimentos/ IFPE).
- Ensaio Biológico: Laboratório de Nutrição Experimental (LANEX/ CCS/UFPB)
- Quantificação dos marcadores do Metabolismo Lipídico: Laboratório de Estudos do Treinamento Físico Aplicado ao Desempenho e à Saúde (LETFADS/CCS/UFPB) e Laboratório de Combustíveis e Materiais (LACOM/CTDR/UFPB).
- Ensaio de Perfil Antioxidante e Anti-inflamatório: Laboratório de Estudos do Treinamento Físico Aplicado ao Desempenho e à Saúde (LETFADS/CCS/UFPB) e Laboratório de Farmacologia Cardiovascular (LAFARC/CBIotec/UFPB)
- Análises histológicas: Laboratório de Patologia (ICB/UFMG)

4.1 CARACTERIZAÇÃO DO MA E DETERMINAÇÃO DOS COMPOSTOS BIOATIVOS

Para obtenção das amostras foram adquiridos 20 kg de frutos, selecionados de acordo com a coloração vermelho escuro, característica da casca de frutos maduros. Três lotes de frutos foram adquiridos entre os meses de dezembro e fevereiro de 2016, na Central de Abastecimento do Estado da Paraíba CEASE-PB. Os frutos foram selecionados, sanitizados com água clorada (200 mg L⁻¹ de cloro) por 10 min, lavados em água corrente por 15 min e enxaguados e secos a temperatura ambiente. Após a higienização, foi realizada a retirada do caroço, as polpas e cascas foram fracionadas em porções de 10 g e congeladas. Posteriormente, as amostras foram submetidas à liofilização nas seguintes

condições: temperatura de -30°C , pressão a vácuo abaixo de $260\ \mu\text{Hg}$ e velocidade de liofilização de 1m/h por aproximadamente 36 h, em liofilizador (modelo Enterprise 1, marca TERRONI, São Carlos-SP, Brasil), utilizando técnica de rotina utilizada no laboratório. Após a secagem, as amostras foram trituradas utilizando um Mixer (modelo Versatile NM03, marca MONDIAL) para obtenção de um pó fino. As amostras liofilizadas constituíram um único lote e foram armazenadas em embalagens vítreas de baixa densidade, sendo armazenados ao abrigo da luz sob refrigeração (4°C).

4.1.1 Teor de Ácido Ascórbico e Fibras Solúveis e Insolúveis

Nas amostras liofilizadas foram determinados, em triplicata, os teores de Ácido Ascórbico ($\text{mg.}100\text{g}^{-1}$ de produto) determinado por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) segundo metodologia descrita por Arakawa *et al.* (1981) e o teor de Fibra Alimentar Solúvel ($\text{g.}100\text{g}^{-1}$ de produto) e Fibra Alimentar Insolúvel ($\text{g.}100\text{g}^{-1}$ de produto) (AOAC, 2012).

4.1.2 Perfil de Compostos Fenólicos

A obtenção dos extratos para a análise do perfil de compostos fenólicos foi realizada em duplicata através da hidrólise ácida de acordo com a metodologia modificada por Ross, Beta, Arntfield (2009) e Krygier, Sosulski e Hogge (1982). Para isso, 1g da amostra foi homogeneizado em $10\ \text{mL}$ de metanol. O pH ajustado com $\text{HCl}\ 6\text{M}$ ($\text{pH}=1$) e conduzido à estufa ($T=85^{\circ}\text{C}$) por 30 min. Após esse período, ajustou-se o pH ($\text{pH}=2$) com $\text{NaOH}\ 6\text{M}$ e as amostras foram transferidas para tubos de polietileno de 25mL , adicionadas de 5mL de éter etílico e, em seguida, agitadas em vórtex por 10 min. O sobrenadante (extrato) foi levado ao rota-evaporador e ressuspendido em $3\ \text{mL}$ de metanol e armazenados à -5°C .

Os compostos fenólicos foram determinados seguindo a metodologia validada

por Padilha *et al.*, (2017) e adaptada por Dutra *et al.*, (2018). As análises cromatográficas foram realizadas usando um sistema LC Agilent 1260 Infinity (Agilent Technologies, Santa Clara - EUA) cromatógrafo líquido acoplado a detector de arranjo de diodo (DAD) (modelo G1315D). Os dados foram processados usando o software Open LAB CDS Chem Station Edition (Agilent Technologies, Santa Clara - EUA). A coluna usada foi Zorbax Eclipse Mais RP-C18 (100 × 4,6 mm, 3,5 µm) e a pré-coluna Zorbax C18 (12,6 × 4,6 mm, 5µm) ambas fabricadas pela Zorbax (EUA). A temperatura do forno foi de 35°C sendo o volume da injeção de 20 µL da amostra, antecipadamente diluído na fase A e filtrados através de membrana de 0,45 µm (Millipore, Barueri, São Paulo, Brasil). O fluxo de solventes foi de 0,8 mL min⁻¹. O gradiente usado na separação foi de 0 a 5 min: 5% de B; 5 a 14 min: 23% de B; 14 a 30 min: 50% de B; 30 a 33 min: 80% B, onde o solvente A foi uma solução de ácido fosfórico (0,1 M, pH = 2,0) e o solvente B metanol acidificado com 0,5% de H₃PO₄.

A detecção dos compostos foi realizada em 220, 280, 320, 360 e 520 nm, e a identificação e quantificação em comparação com padrões externos. A detecção dos compostos foi realizada a 220 nm para (+) -catequina, (-) -epigallocatequina, (-) -galato de epicatequina, procianidina B1 e procianidina B2; 280 nm para ácido gálico e ácido sirínico; 320 nm para ácido cafárico, ácido cafeico e ácido p-cumárico; e 520 nm para malvidina 3,5-diglucosídeo, cianidina 3,5 diglucosídeo, plargonidina 3,5-diglucosídeo, peonidin 3-O glucosídeo e malvidin 3-O glicosídeo.

4.1.3 Perfil de açúcares e ácidos orgânicos

O conteúdo de açúcares e ácidos orgânicos no jambo vermelho foi analisado por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) usando um sistema LC 1260 Infinity (Agilent Technologies, Santa Clara, Califórnia, EUA) acoplado a um detector de matriz de fotodiodo (PDA) (G1315D) e um detector de índice de refração (RID) (G1362A). Especificamente, os teores de ácidos orgânicos foram determinados no PDA a 210 nm e os açúcares foram quantificados no RID.

Para análise, foi utilizada uma coluna Agilent Hi-Plex H (300 x 7,7 mm) com tamanho de partícula de 8,0 µm; a coluna foi protegida com uma coluna de proteção

PL Hi-Plex H (5 x 3 mm) (Agilent Technologies). As temperaturas da coluna foram mantidas a 50 ° C. A amostra foi diluída em água ultrapura filtrada através de uma membrana de poros de 0,45 µm; um volume de injeção de 10 µL, fluxo de 0,5 mL min⁻¹ e tempo de execução de 20 min. A fase foi H₂SO₄ 4,0 mM em água ultrapura. Os dados obtidos foram processados usando o OpenLAB CDS ChemStation EditionTM (Agilent Technologies) (COELHO *et al.*, 2018).

4.1.4 Determinação da Capacidade Antioxidante *in vitro*

Desenvolvido por Brand-Williams, Cuvelier e Berset (1995), o método DPPH tem como base a redução da absorbância na região visível de comprimento de onda de 515 nm do radical DPPH• (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) por antioxidantes.

Para o procedimento de extração, pesou-se 10g do fruto liofilizado e adicionou-se um volume de 40 mL de metanol 50%, seguido de homogeneização e repouso por 60 min. A amostra foi então centrifugada a 25.406,55 g durante 15 min. Após o primeiro ciclo de extração, o sobrenadante foi retirado e acrescentou-se mais 40 mL de acetona 70%, realizando-se um segundo ciclo de extração nas mesmas condições.

O sobrenadante da segunda extração foi transferido para um balão volumétrico e o volume ajustado para 100 mL. A atividade antioxidante do extrato do *S. malaccense* foi determinada a partir de uma solução inicial de DPPH (60 µM) e, em sequência, soluções diluídas preparadas em álcool metílico nas concentrações de 10 µM a 50 µM. Alíquotas do extrato (0,1 mL) foram colocadas em diferentes tubos de ensaio, e adicionadas da solução de DPPH em metanol (3,9 mL). Em seguida, os tubos foram deixados em repouso, ao abrigo da luz. Todas as leituras foram feitas em triplicata em espectrofotômetro (Biospectro SP-22, Curitiba, Brasil) a 515 nm.

A capacidade de seqüestrar o radical foi expressa em concentração eficiente (EC₅₀) considerando o peso da amostra fresca (p. f.) (EC₅₀ (g p. f./g DPPH), ou seja, a quantidade de antioxidante necessária para decrescer a concentração inicial de DPPH em 50%.

4.2 ENSAIO BIOLÓGICO

O protocolo experimental seguiu as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e todos os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) sob o protocolo de número 23076.013011/2017-47 (Anexo A).

4.2.1 Animais e dietas

Foram utilizados na pesquisa 32 ratos *Wistar* machos provenientes do Biotério do Departamento de Nutrição da UFPE. Ao final da segunda semana de vida, após o desmame, os animais foram propriamente transportados para o laboratório de Nutrição Experimental da UFPB, onde ficaram alojados em gaiolas coletivas de polipropileno, sendo quatro ratos por gaiola, em temperatura de $21 \pm 1^\circ\text{C}$, 50-55% de umidade relativa do ar, com água *ad libitum* e submetidos a ciclos alternados de claro e escuro de 12 h (início da fase clara 6:00 AM) durante todo o período de vida.

Os animais receberam ração padrão (labina) *ad libitum* até completarem os 50 dias de idade. Com 50 dias de vida dos animais e um peso médio de 65g, iniciou-se o experimento. Os animais foram randomizados em dois grupos por um período de três semanas, período de indução à dislipidemia, os quais:

1. Grupo Sadio (HG; n = 16): ratos alimentados com dieta AIN-93M *ad libitum*;
2. Grupo Dislipidêmico (DG; n = 16): ratos alimentados com ração dislipidêmica (Rhooster, Araçoiaba da Serra, SP, Brasil) *ad libitum*.

Posteriormente, cada grupo foi subdividido em dois para o tratamento. Os animais foram randomizados nos quatro grupos abaixo por um período de três semanas:

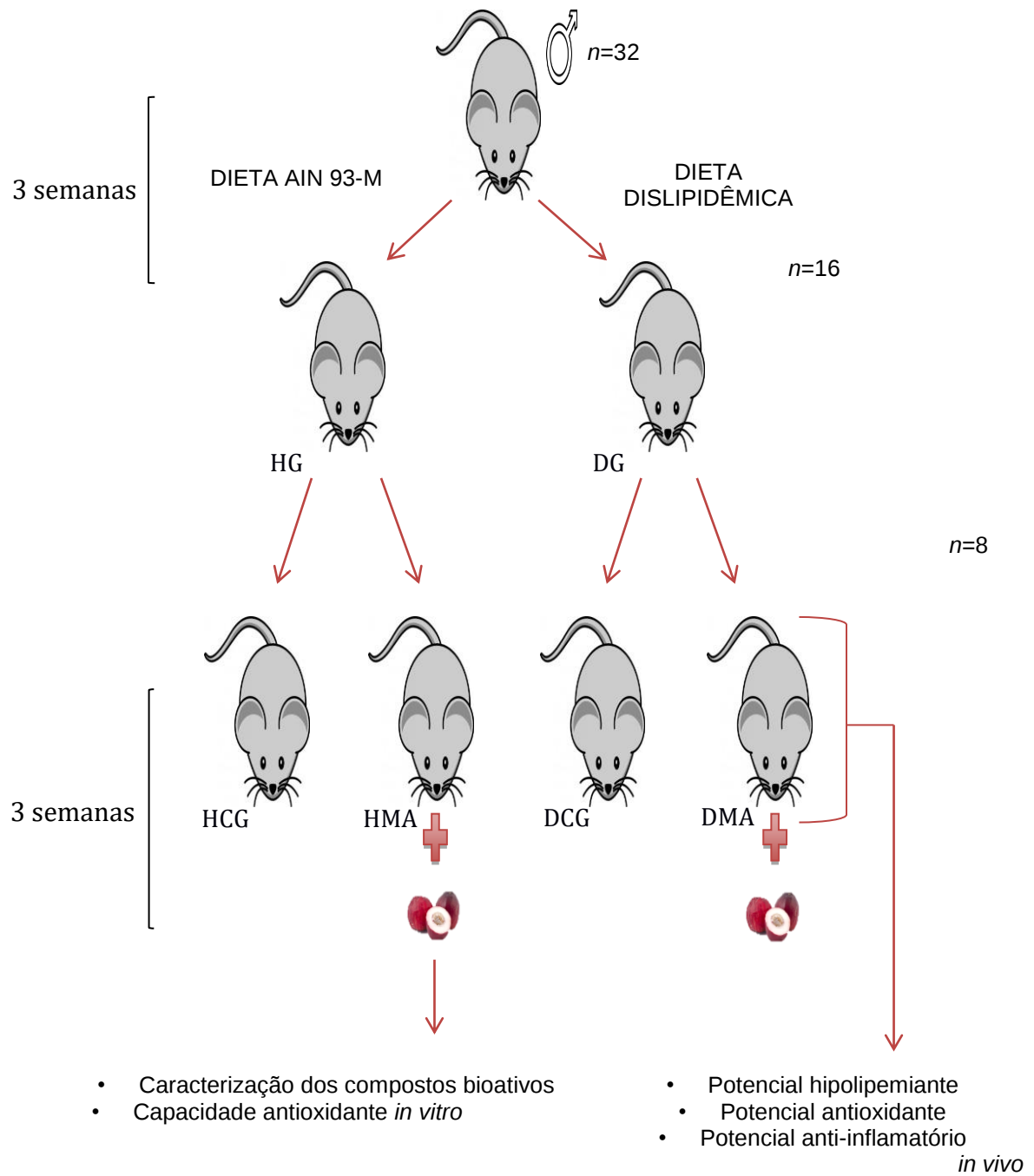
- 1) **Grupo Controle Sadio (HCG; n = 8):** ratos sadios recebendo dieta AIN-93M *ad libitum* + gavagem com 2 mL de soro fisiológico;
- 2) **Grupo Experimental Sadio + Jambo (HMA; n = 8):** ratos sadios dieta AIN-93M *ad libitum* + gavagem com jambo na dose de 400 mg/kg de peso corporal diluído em 2 mL de soro fisiológico;
- 3) **Grupo Controle Dislipidêmico (DCG; n = 8):** ratos dislipidêmicos recebendo ração dislipidêmica *ad libitum* + gavagem com 2 mL de soro fisiológico;
- 4) **Grupo Experimental Dislipidêmico + Jambo (DMA; n = 8):** ratos dislipidêmicos recebendo ração dislipidêmica *ad libitum* + gavagem com jambo na dose de 400 mg/kg de peso corporal diluído em 2 mL de soro fisiológico.

Durante o período de tratamento, os animais receberam gavagem diariamente, às 11h da manhã, sem serem submetidos a jejum prévio. A composição de Ácidos Graxos (AG) da dieta dislipidêmica utilizada foi constituída, em média, de 37,31% de AG saturados, com destaque para os ácidos palmítico (26,76%) e esteárico (8,66%); 38,04% de AG monoinsaturados, com predominância de ácido oléico (34,52%) e 24,65% de AG poliinsaturados, com maior proporção de ácido linoléico (22,35%). A dieta também apresentava quantidades aumentadas de colesterol (1%) e ácido cólico (0,50%) (Tabela 5).

Após o período de três semanas de indução da dislipidemia, foram realizados exames bioquímicos (triglicerídios, colesterol total e HDL) (Apêndice A) para constatação do estado dislipidêmico dos animais (BATISTA *et al.*, 2018). O sangue foi coletado pelo plexo orbital dos animais e, em seguida, as análises foram realizadas através de kits comerciais específicos da marca Labtest® (Minas Gerais, Brasil).

Após a confirmação da alteração do perfil lipídico dos animais do grupo DG, estes animais continuaram consumindo dieta dislipidêmica por mais três semanas (período de tratamento). O grupo controle sadio (HG) (posteriormente grupos HCG e HMA) consumiram dieta AIN-93 M (REEVES *et al.*, 1993) durante todo o experimento, tendo esta, como principal fonte lipídica, o óleo de soja (4%) (Figura 10, Tabela 5).

Figura 10. Delineamento experimental



Fonte: Elaborado pela autora.

Tabela 5. Composição das dietas controle e dislipidêmica

Ingredientes (g/100g)	Dietas	
	AIN-93M*	Dislipidêmica**
Caseína Láctea	14,00	16,50
Amido de Milho	47,00	36,45
Amido Dextrinizado	15,50	15,50
Sacarose	10,00	6,00
Fibras	5,00	5,00
Óleo de Soja	4,00	3,00
Gordura Animal (banha de porco)	-	6,00
Gordura Vegetal não-hidrolisada	-	5,00
Ácido Cólico Sigma	-	0,50
Colesterol Sigma	-	1,00
Mix de Minerais AIN -93M	3,50	3,50
Mix Vitamínico	1,00	1,00
L-Cistina	0,18	0,30
Bitartarato de Colina	0,25	0,25
t-BHQ***	0,008	0,014
Calorias (kcal/g)	3,82	4,25
Carboidratos (kcal %)	75,77	54,54
Proteínas (kcal %)	14,82	15,81
Lipídios (kcal %)	9,40	29,64
Ácidos graxos saturados (%)	28,34	39,21
Ácidos graxos monoinsaturados (%)	30,95	35,14
Ácidos graxos polinsaturados (%)	40,71	25,65

Fonte: *Adaptado de Reeves *et al.*, (1993). ** Rhoister – Indústria e Comércio Ltda.; ***t-BHQ: tert-butylhydroquinone.

4.2.2 Protocolo de suplementação

A suplementação foi realizada diariamente durante as três semanas finais do experimento. Os animais dos grupos tratados (HMA e DMA) receberam 400 mg/kg de peso do animal de jambo vermelho liofilizado diluídos em 2 mL de soro fisiológico, administrado por gavagem (i.g.) diária. Essa dose foi estabelecida a partir de estudos pilotos desenvolvidos com frutos liofilizados e animais dislipidêmicos realizados no Laboratório de Nutrição Experimental (LANEX) da UFPB, e a partir de estudos prévios publicados na literatura científica (LAKSHMI; SUDHAKAR; APARNA, 2013; BATISTA *et al.*, 2018). Simultaneamente, os animais dos grupos

controles (HCG e HMA) receberam gavagem diária de 2 mL de soro fisiológico, simulando o mesmo estresse a que foram submetidos os grupos experimentais.

4.2.3 Teste de Tolerância à Insulina (TTI) e Teste Oral de Tolerância à Glicose (TOTG)

No antepenúltimo dia de tratamento foi realizado o TTI, com os animais a 90 dias de idade. O TTI foi realizado pela manhã, com os animais alimentados normalmente. Foi administrada 0,75 UI de insulina/kg, diluída em solução salina 0,9% estéril, via intraperitoneal. Após incisão na ponta da cauda, coletou-se uma amostra de sangue e foi feita a verificação da glicemia utilizando glicosímetro Accu Check Active® (Roche Diagnóstica Ltda., São Paulo, Brasil), tempos 0, 30, 60 e 90 min (GOMES NATAL *et al.*, 2015).

No dia seguinte à realização do TTI, foi realizado o TOTG, através da coleta da primeira amostra de sangue por punção da veia cauda para dosagem da glicemia (tempo 0) utilizando glicosímetro Accu Check Active® (Roche Diagnóstica Ltda., São Paulo, Brasil). Em seguida foi administrada por via oral uma solução de glicose a 0,007 mL/g de peso corporal do animal e aferida a glicemia via incisão na cauda do animal nos intervalos de tempo de 0, 30, 60 e 90 min (GOMES NATAL *et al.*, 2015).

4.2.4 Avaliação semanal do peso corporal e do consumo alimentar

A aferição do peso corporal foi realizada semanalmente, no horário entre 11 h e 13 h, durante todo o experimento. No procedimento foi utilizada balança eletrônica digital modelo Toledo prix com capacidade máxima de 15kg (menor divisão 0,1kg). O consumo alimentar foi avaliado semanalmente ao final de cada semana os rejeitos eram quantificados, sendo equivalente à quantidade de sobra de ração presente na tampa da gaiola dos animais. Posteriormente foi calculada a média de consumo por animal. A determinação do consumo alimentar semanal foi realizada pela equação:

$$CA = RO - RL$$

(1)

Onde: CA: Consumo alimentar; RO: Ração Oferecida e RL: Rejeito Limpo (EL ELJ *et al.*, 2012).

4.2.6 Eutanásia

Após as 6 semanas de experimento os animais foram submetidos a jejum por 8 h e, em seguida, foram anestesiados por via intraperitoneal com cloridrato de quetamina (75 mg/kg) e cloridrato de xilasina (5 mg/kg) para cada quilograma de peso corporal do animal (SIROIS, 2007). Posteriormente, o tórax foi aberto bilateralmente ao osso externo desde o músculo diafragma até a altura das clavículas para evidenciar o coração. Em seguida, foi realizada a punção cardíaca direta para retirada de aproximadamente 4 mL de sangue dos animais. A eutanásia e a coleta do sangue foi realizada através da perfusão do ventrículo esquerdo (punção cardíaca) para a realização das análises bioquímicas.

4.3 METABOLISMO LIPÍDICO

4.3.1 Dosagens bioquímicas

Imediatamente após coletadas, as amostras séricas foram coletadas em tubos estéreis e centrifugadas a 5.8136 x g por 15 min. O sobrenadante foi retirado e refrigerado a -20° C até as análises, que ocorreram uma semana depois da coleta para dosagem de lipídios, enzimas hepáticas, ureia, creatinina e ácido úrico. As análises de colesterol total e fração de lipoproteína de alta densidade (HDL- c), lipoproteína de baixa densidade (LDL), triglicerídios (TG), foram realizadas através de kits comerciais específicos da marca Labtest® (Belo Horizonte, Brasil) e leitura em analisador bioquímico automático Labmax 240 (Belo Horizonte, Brasil) nas

absorbâncias de 500nm para colesterol total, 600 nm para HDL e 505 nm para triglicerídios, seguindo as recomendações do fabricante. O VLDL foi obtido pela equação de Friedewald (1972), onde: $[VLDL = TG / 5]$.

As atividades da Alanina Amino Transferase (ALT) e da Aspartato Amino Transferase (AST) foram quantificadas em modo cinético, em soro, por meio dos kits comerciais ALT/GPT Liquiform e AST/GOT Liquiform Labtest® (Belo Horizonte, Brasil). Todas as análises seguiram as instruções do fabricante e as absorbâncias foram obtidas no analisador automático Labmax 240 premium (Belo Horizonte, Brasil) nos comprimentos de onda de 340nm (AST e ALT).

As análises de creatinina, ureia e ácido úrico foram realizadas através de kits comerciais específicos da marca Labtest® (Belo Horizonte, Brasil) e leitura em analisador bioquímico automático Labmax 240 (Belo Horizonte, Brasil) nas absorbâncias, respectivamente 510nm, 600 nm e 520 nm, seguindo as recomendações do fabricante.

4.3.2 Quantificação de lipídios totais e determinação de ácidos graxos em fezes e fígado

As fezes dos animais foram coletadas durante os três últimos dias do experimento anteriores à eutanásia, obtendo-se um *pool* de amostras para cada grupo. A extração e quantificação dos lipídios fecais e hepáticos foram realizadas de acordo com o método descrito por Folch (1957).

Para a determinação do perfil de ácidos graxos das amostras de fezes e fígado foi utilizada uma metodologia de Cromatografia Gasosa (CG). Os extratos lipídicos passaram por uma esterificação metílica seguindo a metodologia descrita por Hartman e Lago (1973). A quantificação dos compostos foi obtida por curva de calibração com padrões de ésteres metílicos (Supelco® 37 Component FAME Mix), utilizando um GCMS-QP2010 (Shimadzu, Kyoto, Japan) equipado com uma coluna Durabound DB-23 (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm). A temperatura do injetor e do detector foram fixados em 230 °C e temperatura da coluna em 90 °C. O gradiente de eluição na coluna foi de 90 a 150 °C (10 °C/min), 150 a 200 °C (2 °C/min), 200 a 230

°C (10 °C/min) em um tempo total de corrida de 39 min com um split de 100. O gás transportador utilizado foi He.

4.3.3 Extração de lipídios e teor de colesterol total em fezes e fígado

A extração dos lipídios e determinação dos lipídios totais foram realizadas através da metodologia de Folch, Less e Stanley (1957). O teor de colesterol foi determinado por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Foi utilizado um sistema de CLAE, com sistema isocrático. Utilizou-se como fase móvel a mistura acetonitrila/isopropanol (60/40), na qual foi injetada manualmente volumes de 20 µL de amostra e/ou padrão. A detecção do colesterol total ocorreu em detector UV-VIS (PDA, 330) a 210 nm. A separação cromatográfica foi realizada a um fluxo constante de 1 mL/min, à temperatura de 30°C. A metodologia utilizada foi descrita por Bragagnolo; Rodriguez-Amaya (1992), que consistiu em quatro etapas: extração dos lipídios, saponificação, extração dos insaponificáveis e injeção do extrato lipídico no cromatógrafo (CLAE).

Foram retirados 5 mL de extrato lipídico correspondente a cada repetição por tratamento, colocados em tubo e levados para secar sob ação do gás nitrogênio. Com a amostra totalmente seca, foram adicionados 10 mL de KOH 12% em etanol 90% e em seguida deixado em banho-maria com agitação a 80 °C por 15 min. Após esse período, adicionou-se 5 mL de água destilada e esperou-se alguns min até a amostra esfriar. Com amostra fria adicionou-se 10 mL de hexano, agitou-se em vortex por um minuto, esperando a separação das fases. Com as fases separadas, coletou-se 5mL da porção superior e repetiu-se o procedimento, coletando mais 5mL da fração superior. Os 10 mL colhidos de cada repetição por tratamento foi levado para secar sob ação do gás nitrogênio. Após secagem, a mostra foi diluída em 1 mL da fase móvel, que corresponde a acetonitrila/isopropanol (60/40), agitado em vortex por um minuto para homogeneização. O material obtido foi filtrado (0,45 µm) e injetado (20 µl) em cromatógrafo líquido de alta eficiência.

A identificação do pico de colesterol foi feita por comparação dos tempos de retenção do padrão e o da amostra em espectros de absorbância. A metodologia de

calibração utilizada foi por padrão externo utilizando curvas em concentrações para cada tipo de amostra analisada. O tempo de corrida cromatográfica foi de 10 min. Todos os solventes foram grau cromatográfico, filtrados e degaseificados em ultrassom antes do uso.

4.4 PERFIL ANTI-INFLAMATÓRIO E ANTIOXIDANTE

4.4.1 Parâmetros Oxidativos

4.4.1.1 Capacidade Antioxidante Total (CAT)

As amostras do soro, do coração, do intestino, do fígado e do tecido adiposo dos animais foram colocadas em microtubos protegidos da luminosidade. A análise foi baseada no método descrito por Brand-Williams, Cuvelier e Berset (1995) no qual uma alíquota de 1,25 mg de 2,2 diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) foi diluída em 100 mL de etanol (álcool etílico absoluto 99,5%), mantida sob refrigeração e protegida da luz. Foram adicionadas 3,9 mL da solução de DPPH a 100 µL de plasma em tubos, que em seguida foram agitados em vórtex e deixados em repouso por 30 min. Posteriormente, foram centrifugados a 18.000 g à temperatura de 20°C por 15 min e o sobrenadante utilizado para a realização da leitura em espectrofotômetro (Biospectro SP-22, Curitiba, Brasil) a um comprimento de onda de 515 nm. Os resultados foram expressos como percentual da atividade antioxidante (AOA):

$$AOA = (100 - [DPPH\bullet R]_t / [DPPH\bullet R]_B) \times 100 \quad (2)$$

Onde, $[DPPH\bullet R]_t$ e $[DPPH\bullet R]_B$ correspondem às concentrações de DPPH• remanescente após 30 min, avaliadas na amostra (t) e no branco (B) preparado com água destilada.

4.4.1.2 Avaliação da Peroxidação Lipídica do Malonaldeído

A atividade oxidante foi obtida a partir da peroxidação lipídica do malonaldeído (MDA), pela reação do ácido tiobarbitúrico (TBARS), com os produtos de decomposição dos hidroperóxidos (OHKAWA, OHISHI e YAGI, 1979). Para a quantificação de peroxidação de lipídios dos órgãos, eles foram lavados, retalhados, homogeneizados em solução de cloreto de potássio (0,05 M) em banho de gelo. O homogenato foi diluído e centrifugado a 7000 x g por 6 min. a 4 °C para obtenção do sobrenadante.

Em seguida, 250 µL do sobrenadante obtido dos homogenatos dos órgãos e da alíquota do plasma foram incubados em banho maria a 37°C por 60 min. Em seguida, a amostra foi precipitada com ácido perclórico AA 35% e centrifugada a 18.000 g por 20 min à 4°C. O sobrenadante foi transferido para novos microtubos onde adicionou-se 400 µL de ácido tiobarbitúrico a 0,6 %, seguido de incubação a 100° C por 60 min. Após resfriamento até temperatura ambiente, o material foi analisado em espectrofotômetro ultravioleta (Biospectro SP-22, Curitiba, Brasil) em comprimento de onda de 532 nm, em temperatura ambiente.

4.4.2 Análise histológica do fígado, intestino, gordura visceral e coração

Para análise histológica, foram coletados de cada animal fragmentos do coração, do fígado (lóbulo superior hepático), o intestino (cólon) e o tecido adiposo, sendo fixados em formol tamponado a 10 % e processados de acordo com a técnica histológica de rotina. As lâminas obtidas foram coradas através da técnica de Hematoxilina de Harris e Eosina, realizando a montagem entre lâmina e lamínula com resina sintética (Entellan-Merck) para análise em objetivas crescentes e fotografadas em aumento total de 40x em microscópio óptico comum (Motic BA 200, Santa Mônica, EUA).

A análise morfológica do fígado incluiu a avaliação da ocorrência de processos degenerativos por degeneração gordurosa e parâmetros inflamatórios, incluindo migração de leucócitos, edema, hiperemia, hemorragia, necrose,

preservação do parênquima hepático e presença de micro trombos. A análise morfológica do cólon buscou avaliar a presença de processos inflamatórios, como estase, migração de leucócitos, hemorragia, vasodilatação e necrose, bem como para preservação epitelial, hipertrofia e hiperplasia da camada muscular externa (RIGO, *et. al.*, 2013; ERBEN, *et al.*, 2014; BATISTA, *et al.*, 2018). Para confirmar as observações, as lâminas foram reavaliadas pelo mesmo patologista após serem randomizadas por uma pessoa independente e a concordância geral entre as duas análises foi considerada como critério de avaliação.

4.4.3 Morfometria do tecido adiposo

Para análise morfométrica da área dos adipotícos foram realizadas a captura de 20 imagens aleatórias através de microcâmara acoplada ao microscópio, em cada tipo de marcação. A área foi calculada através de algoritmos construídos no software KS300 licenciado à Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Em cada imagem foi criada uma imagem binária, processamento digital e cálculo da área em μm^2 (PRATA *et al.*, 2016).

4.4.2 Medida de citocinas por citometria de fluxo

Com o soro coletado dos animais, os marcadores inflamatórios interferon-gama (INF- γ), monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), interleucina-6 (IL-6), interleucina-10 (IL-10), factor de necrose tumoral (TNF), e os níveis de interleucina-12p70 (IL-12p70) foram medidos em uma única amostra, através da técnica de CBA ("Cytometric Bead Array", BD nº cat 552364) seguindo as instruções do fabricante (CHESSELL *et al.*, 2005). As amostras foram levadas ao citômetro FACS Canto-II equipado com laser de argônio com 15 mW e $\lambda = 488 \text{ nm}$ para leitura das amostras e análise no software DIVA 6.0 (BD, Santa Mônica, EUA).

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para tabulação e análise de dados, foi utilizado o pacote de dados GraphPadPrism7® (GraphPad Software Inc. La Jolla, EUA). Foram realizadas análises de estatísticas descritivas, tais como média, desvio padrão e porcentagens para caracterização dos compostos bioativos da amostra, e análises inferenciais, como teste t e Análise de Variância (ANOVA). Para as análises bioquímicas pré-intervenção utilizou-se o teste T. Os dados de consumo alimentar, TTG e TTI foram submetidos a Two Way (ANOVA). Os dados das demais análises biológicas foram analisadas via One Way ANOVA. Quando houve diferença entre as variáveis realizou-se o pós-teste de Tukey a significância de 5 % ($p < 0,05$).

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Neste capítulo os resultados são apresentados em forma de subitens, visando uma apresentação mais clara e objetiva dos dados coletados, buscando descrever os dados e discutí-los com base na literatura publicada.

5.1 CARACTERIZAÇÃO DO JAMBO VERMELHO E AVALIAÇÃO DO EFEITO HIPOLIPEMIANTE *IN VIVO*

Os principais compostos bioativos presentes no MA foram avaliados nesse estudo (Tabela 6). O MA apresentou uma quantidade maior de fibras insolúveis (19.93 g/100g) em relação ao teor de fibras solúveis (5.10g/100g). O total de compostos fenólicos presentes no fruto corresponde a 32.16 g/100g, sendo as antocianinas a classe majoritária, correspondendo a mais de 80% da quantidade total identificada e quantificada, principalmente a Cyanidin-3-O-glucoside, Cyanidin-3,5- O-glucoside e peonidin-3-O-glucoside nesta ordem.

Tabela 6. Caracterização do Jambo Vermelho (*Syzygium malaccense*)

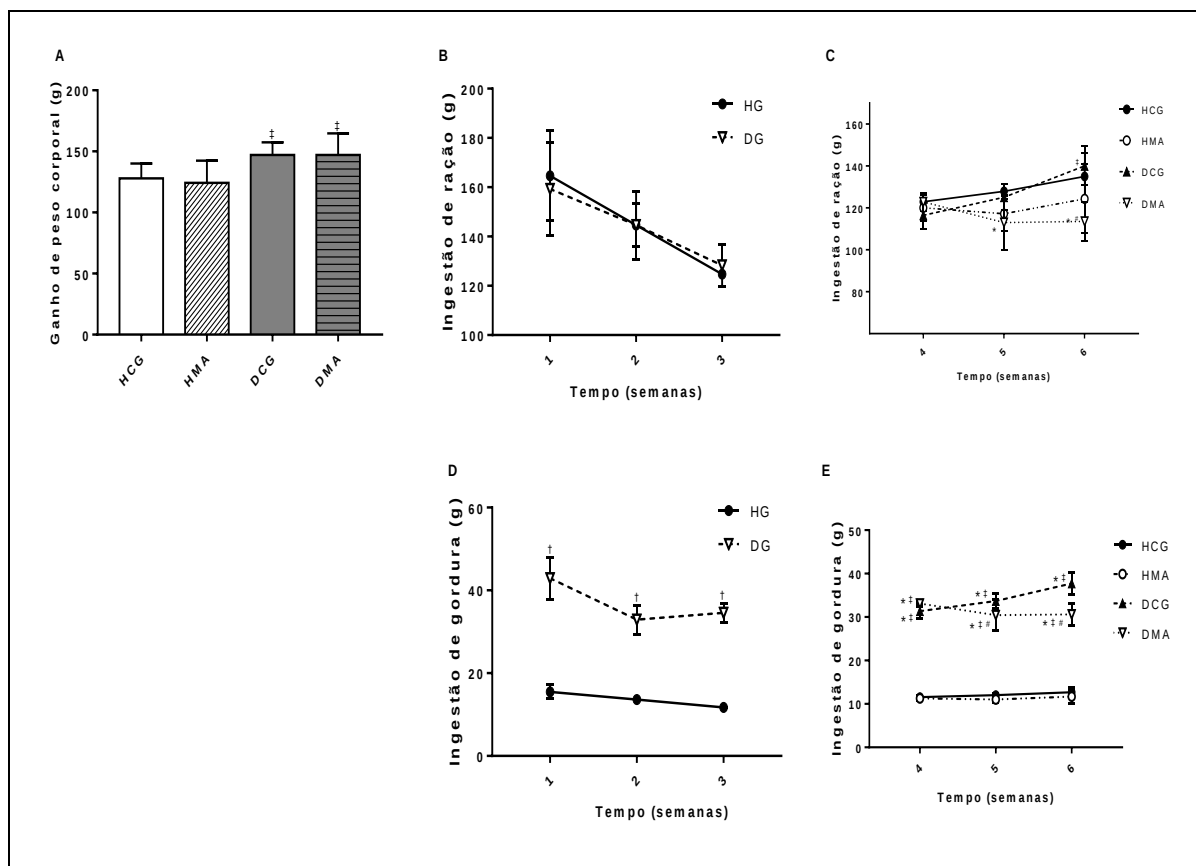
Determinação	<i>S. malaccense</i>
Teor de Fibras (g 100 g⁻¹)	
Fibra Alimentar Insolúvel	19,93 ± 0,02
Fibra Alimentar Solúvel	5,10 ± 0,01
Teor Total de Fibras	25,03 ± 0,53
Relação FI/FS	3,90
Açúcares Simples (g 100 g⁻¹)	
Frutose	0,49 ± 0,01
Glicose	0,45 ± 0,01
Maltose	0,02 ± 0,00
Ácido Ascórbico (mg 100g⁻¹)	Tr < 1,00 *
Ácidos Orgânicos (g 100 g⁻¹)	
Ácido Cítrico	0,03 ± 0,00
Ácido Tartárico	0,90 ± 0,02
Ácido Málico	0,98 ± 0,01
Ácido Succínico	0,38 ± 0,01
Ácido Fórmico	0,05 ± 0,00

Ácido Acético	0,16 ± 0,19
Compostos Fenólicos (mg 100 g⁻¹)	
Ácidos Fenólicos	
Ácido Gálico	1,07 ± 0,20
Ácido Caftárico	0,30 ± 0,01
Flavanonas	
Naringenina	0,09 ± 0,01
Quercitina	0,23 ± 0,08
Rutina	0,05 ± 0,04
Flavonois e Procianidinas	
Catequina	2,55 ± 0,33
Procianidina B1	0,12 ± 0,02
Procianidina B2	0,34 ± 0,10
Epigallocatequina galato	0,57 ± 0,04
Estilbenos	
Cis-Resveratrol	0,25 ± 0,14
Antocianinas	
Cianidina 3-glucosídeo	23,01 ± 4,60
Cianidina 3,5-glucosídeo	3,32 ± 0,43
Peonidina 3-glucosídeo	0,26 ± 0,09
Total phenolic compounds	32,16 ± 3,09
Atividade Antioxidante – DPPH	
EC ₅₀ (g p. f./g DPPH)	372,26 ± 1,06

Fonte: Elaborado pela autora a partir de dados primários da pesquisa. DPPH, 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo; p. f., peso da amostra fresca. Média ± Estimativa de Desvio Padrão

5.1.1 Parâmetros biométricos, consumo dietético e ingestão de gordura

A dieta dislipidêmica e a suplementação com MA não foram capazes de influenciar o ganho de peso dos ratos durante o experimento ($p > 0.05$) (Figura 11A). Nas três primeiras semanas de estudo, durante o período de indução da dislipidemia, apesar do consumo alimentar ter sido similar entre os grupos HG e DG ($p > 0.05$) (Figura 11B), o consumo lipídico foi superior no grupo DG em comparação ao HG ($p \leq 0.05$) (Figura 11D). Todavia, a suplementação com jambo em ratos dislipidêmicos (DMA) reduziu o consumo alimentar (Figura 11C) e lipídico (Figura 11E) nas duas últimas semanas de experimento quando comparados aos demais grupos ($p \leq 0.05$).

Figura 11. Ganho de peso corporal, consumo dietético e ingestão de gordura

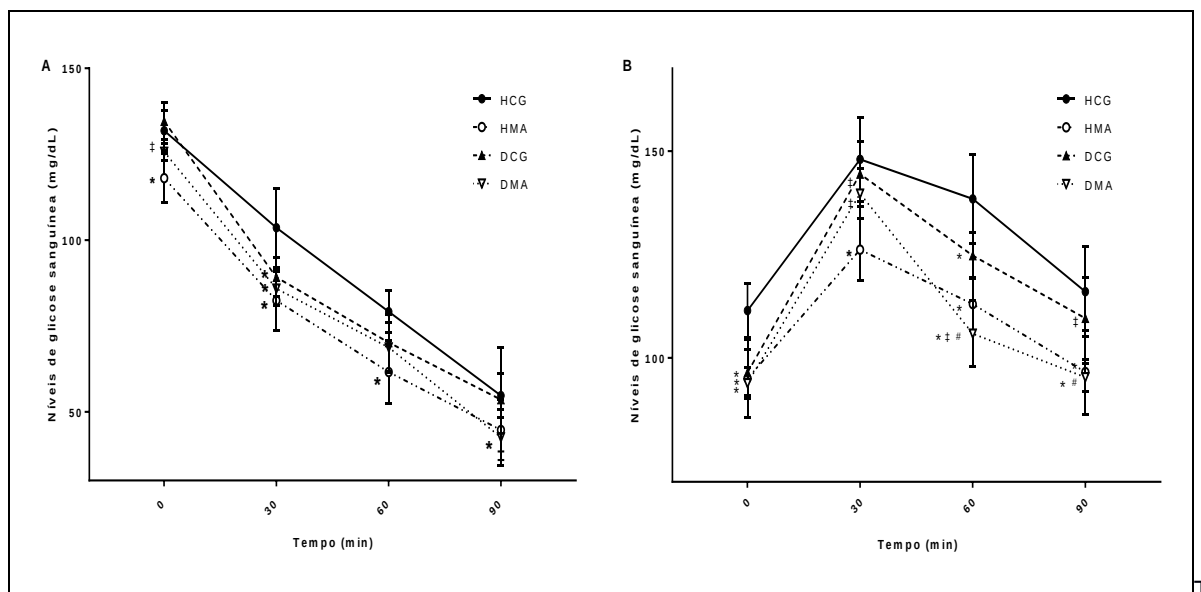
Ganho de peso corporal (A) do Grupo Controle Sadio (HCG); Grupo Controle Sadio Suplementado com MA (HMA); Grupo Controle Dislipidêmico (DCG) e Grupo Controle Dislipidêmico Suplementado com MA (DMA). Média e desvio-padrão (one-way ANOVA, $p \leq 0.05$, Tukey's post hoc test).

Ingestão de ração e ingestão de gordura (B), (C), (D), (E) do Grupo Sadio (HG), Grupo Dislipidêmico (DG), (HCG), (HMA), (DCG), (DMA). Média e desvio-padrão (two-way ANOVA, $p \leq 0.05$, Tukey's post hoc test).

†Diferença estatisticamente significativa comparada ao grupo HG; *Diferença estatisticamente significativa comparada ao grupo HCG; ‡Diferença estatisticamente significativa comparada ao grupo HMA; #Diferença estatisticamente significativa comparada ao grupo DCG.

5.1.2 Teste de tolerância oral à glicose e à insulina

A suplementação com MA melhorou a sensibilidade à glicose e à insulina nos ratos sadios. Entretanto, nos animais dislipidêmicos (DMA), a melhora da tolerância à glicose só foi observada a partir do tempo 60 min (Figura 12A e 12B).

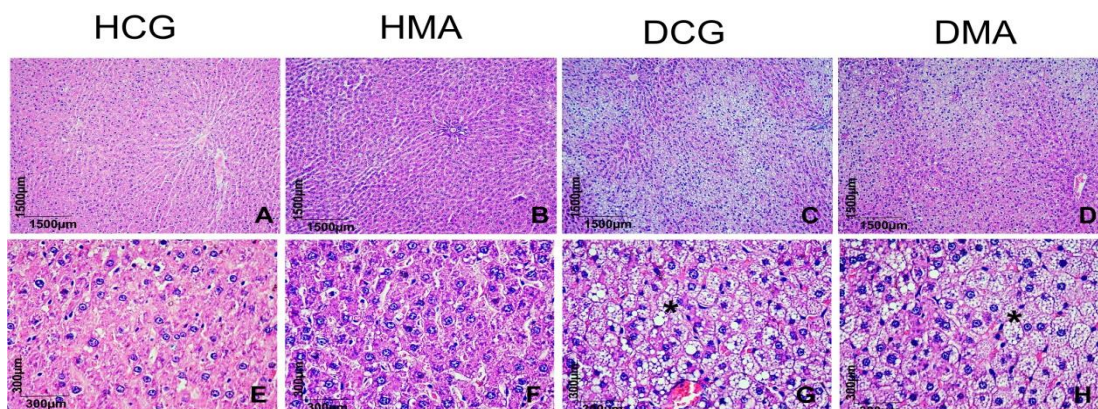
Figura 12. Teste de tolerância oral à glicose e à insulina

este de tolerância à insulina (a) e à glicose (b) aplicado ao Grupo Controle Sadio (HCG); Grupo Controle Sadio Suplementado com MA (HMA); Grupo Controle Dislipidêmico (DCG) e Grupo Controle Dislipidêmico Suplementado com MA (DMA). Média e desvio-padrão (two-way ANOVA, $p \leq 0.05$, Tukey's post hoc test). *Diferença estatisticamente significativa comparada ao grupo HCG; ‡Diferença estatisticamente significativa comparada ao grupo HMA; #Diferença estatisticamente significativa comparada ao grupo DCG.

5.1.3 Histopatologia do fígado e scores histológicos da esteatose hepática

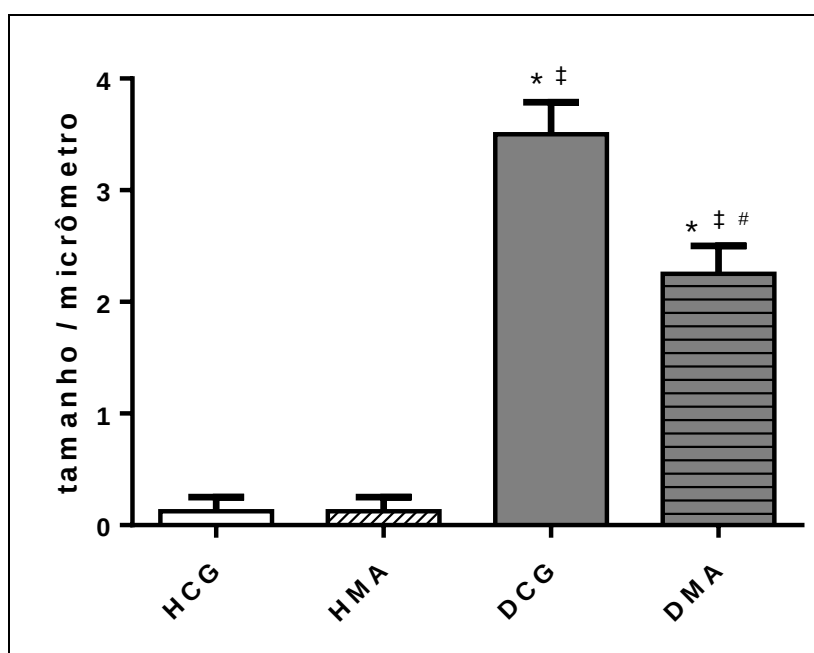
O fígado dos grupos HCG e HMA não apresentaram alterações (Figura 13A, 13B, 13E, 13F). Entretanto, a dieta dislipidêmica causou um acúmulo de gordura nos hepatócitos, configurando quadro de esteatose hepática (Figura 13C, 13D, 13G e 13H), sendo o grau de esteatose diminuído nos ratos suplementados com MA (DMA) ($p \leq 0,0001$) (Figura 14).

Figura 13. Histopatologia do fígado



Coloração com hematoxilina-eosina (H&E) para análise histológica do Grupo Controle Sadio (HCG) (A, E); Grupo Controle Sadio Suplementado com MA (HMA) (B, F); Grupo Controle Dislipidêmico (DCG) (C, G) e Grupo Controle Dislipidêmico Suplementado com MA (DMA) (D, H). Asterisco (*) = esteatose hepática.

Figura 14. Scores histológicos da esteatose hepática



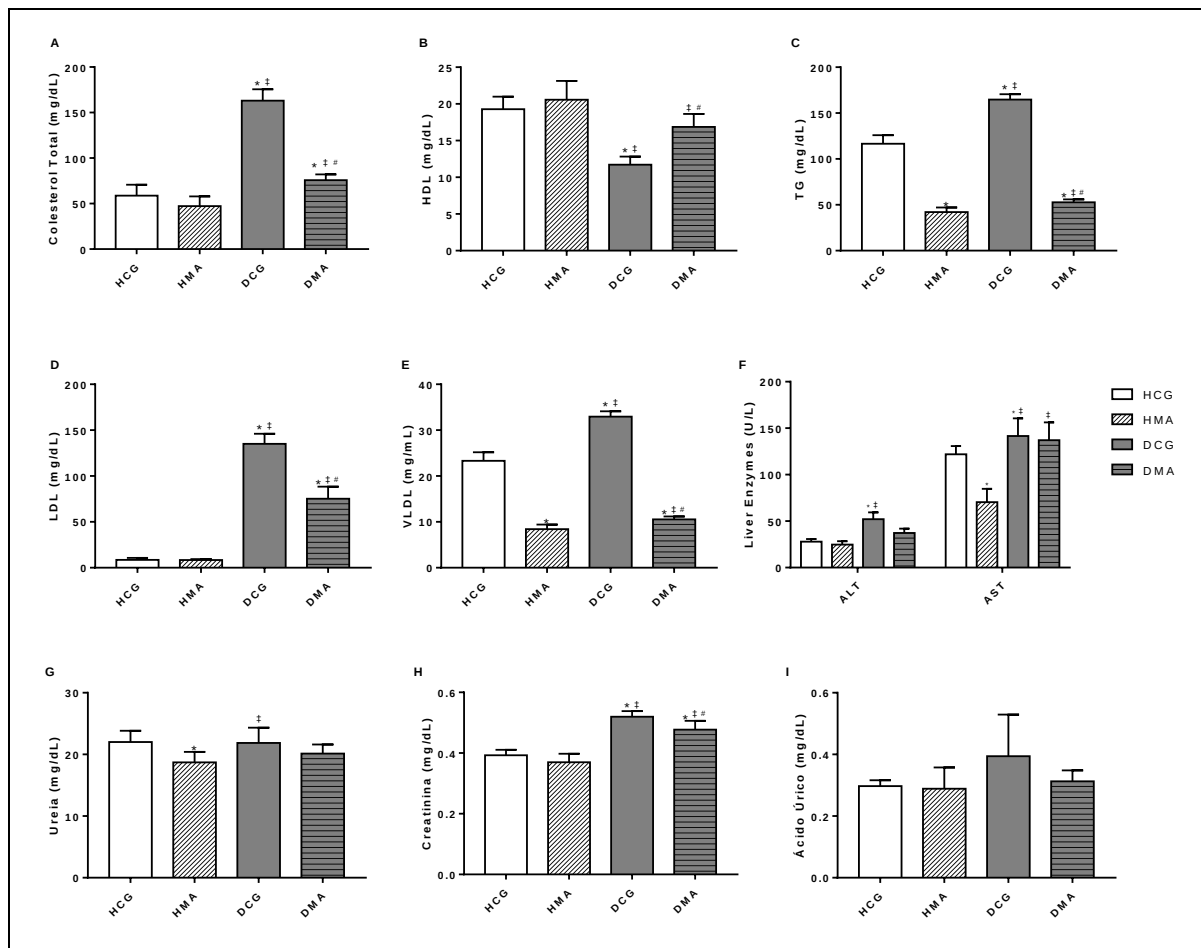
Score histológico da esteatose hepática no Grupo Controle Sadio (HCG); Grupo Controle Sadio Suplementado com MA (HMA); Grupo Controle Dislipidêmico (DCG) e Grupo Controle Dislipidêmico Suplementado com MA (DMA). Média e desvio-padrão (one-way ANOVA, $p \leq 0.05$, Tukey's post hoc test). *Diferença estatisticamente significativa comparada ao grupo HCG; †Diferença estatisticamente significativa comparada ao grupo HMA; #Diferença estatisticamente significativa comparada ao grupo DCG.

5.1.4 Análises bioquímicas

Os animais do grupo DG desenvolveram dislipidemia relacionada ao consumo da dieta quando comparados com o grupo HG (Apêndice A). A suplementação com MA reduziu os níveis de TG e VLDL nos ratos sadios (HMA), além de reduzir os níveis de todos os parâmetros lipídicos (CT, HDL, TG, LDL e VLDL) em ratos dislipidêmicos (DMA) ($p \leq 0,0001$) (Figura 15A, 15B, 15C, 15D e 15E).

Quanto às enzimas hepáticas, o consumo de dieta dislipidêmica aumentou os níveis de ALT e AST, no entanto, a suplementação com jambo reduziu apenas os níveis de AST nos ratos sadios suplementados (HMA) ($p \leq 0,0001$) (Figura 15F). A suplementação com jambo reduziu os níveis de ureia nos ratos HMA em comparação com seu controle ($p \leq 0,0001$) (Figura 15G), bem como os níveis de creatinina aumentados pelo consumo continuado de dieta dislipidêmica diminuíram nos ratos suplementados DMA ($p \leq 0,0001$) (Figura 15H). Foram quantificados níveis similares de ácidos úrico em todos os grupos avaliados ($p > 0,05$) (Figura 15I).

Figura 15. Análises bioquímicas



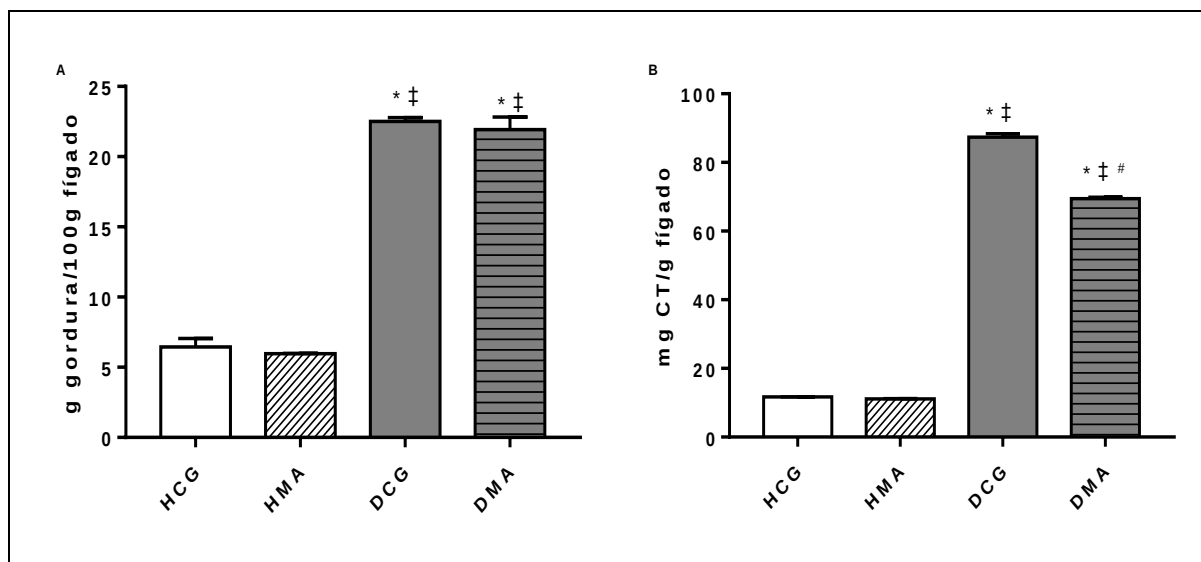
Colesterol Total (A), Lipoproteína de alta densidade (B), Triglicerídeos (C), Lipoproteína de baixa densidade (D), Lipoproteína de muito baixa densidade (E), Enzimas hepáticas (F), Ureia (G), Creatinina (H) e Ácido úrico (I) do Grupo Controle Sadio (HCG); Grupo Controle Sadio Suplementado com MA (HMA); Grupo Controle Dislipidêmico (DCG) e Grupo Controle Dislipidêmico Suplementado com MA (DMA). Média e desvio-padrão (one-way ANOVA, $p \leq 0.05$, Tukey's post hoc test). *Diferença estatisticamente significativa comparada ao grupo HCG; †Diferença estatisticamente significativa comparada ao grupo HMA; #Diferença estatisticamente significativa comparada ao grupo DCG.

5.1.5 Níveis de gordura e colesterol hepáticos

O percentual de gordura hepática e de colesterol hepático foi maior no DCG em comparação aos grupos HCG e HMA ($p \leq 0.0001$), indicando mais uma vez a efetividade da dieta na indução da dislipidemia (Figura 16A e 16B).

A suplementação com jambo não reduziu os níveis de gordura hepática seja nos ratos sadios (HCG vs HMA) ou dislipidêmicos (DCG vs DMA), mas foi possível verificar redução no armazenamento de colesterol hepático nos animais do grupo DMA em relação ao grupo DCG (Figura 16A e 16B).

Figura 16. Níveis de gordura e colesterol hepático

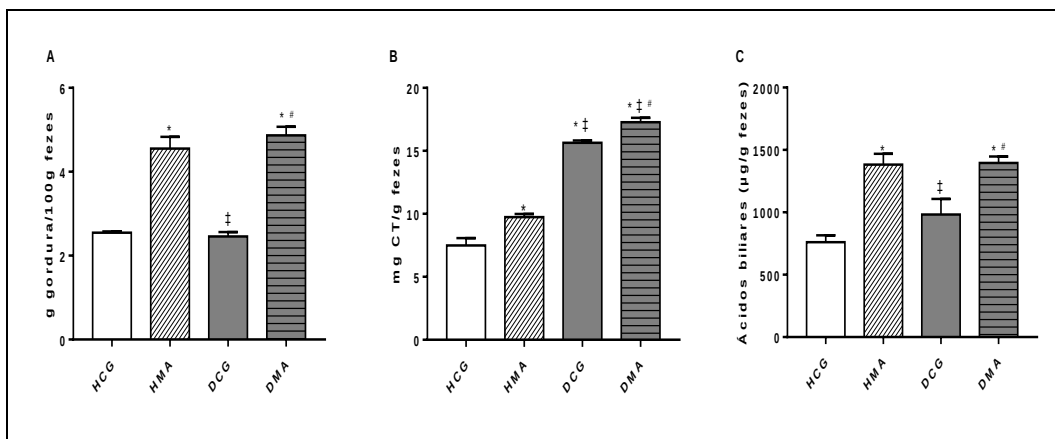


Porcentagem de gordura (A) e teor de colesterol (B) hepáticos do Grupo Controle Sadio (HCG); Grupo Controle Sadio Suplementado com MA (HMA); Grupo Controle Dislipidêmico (DCG) e Grupo Controle Dislipidêmico Suplementado com MA (DMA). Média e desvio-padrão (one-way ANOVA, $p \leq 0.05$, Tukey's post hoc test). *Diferença estatisticamente significativa comparada ao grupo HCG; ‡Diferença estatisticamente significativa comparada ao grupo HMA; #Diferença estatisticamente significativa comparada ao grupo DCG.

5.1.6 Níveis gordura, colesterol e teor de ácidos biliares nas fezes

MA provocou uma excreção aumentada da gordura total, do colesterol e dos ácidos biliares presentes nas fezes em ambos os grupos HMA e DMA ($p \leq 0,0001$) (Figura 17A, 17B e 17C).

Figura 17. Níveis de excreção fecal de gordura, colesterol e ácidos biliares

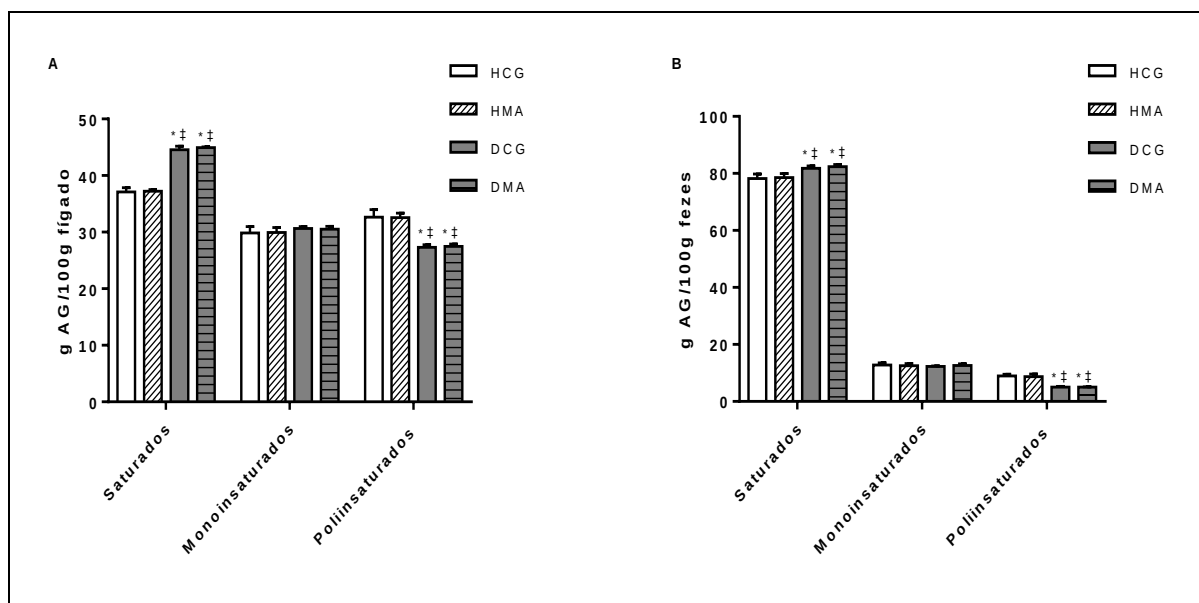


Porcentagem de gordura fecal (A), colesterol fecal (B) e excreção de ácidos biliares (C) do Grupo Controle Sadio (HCG); Grupo Controle Sadio Suplementado com MA (HMA); Grupo Controle Dislipidêmico (DCG) e Grupo Controle Dislipidêmico Suplementado com MA (DMA). Média e desvio-padrão (one-way ANOVA, $p \leq 0.05$, Tukey's post hoc test). *Diferença estatisticamente significativa comparada ao grupo HCG; ‡Diferença estatisticamente significativa comparada ao grupo HMA; #Diferença estatisticamente significativa comparada ao grupo DCG.

5.1.7 Composição de ácidos graxos no fígado e nas fezes

A suplementação com jambo não foi capaz de causar nenhuma diferença nos níveis de ácidos graxos saturados, monoinsaturados ou poli-insaturados hepáticos e fecais (Figura 18A), no entanto, o consumo de dieta dislipidêmica ocasionou mudanças no perfil dos ácidos graxos saturados e poli-insaturados armazenados no fígado (Figura 18A e Tabela S4) ($p \leq 0,001$) e excretados nas fezes (Figura 18B e Apêndice B) ($p \leq 0,001$).

Figura 18. Composição de ácidos graxos fecais e hepáticos



Ácidos graxos saturados, monoinsaturados e poli-insaturados no fígado (A) e nas fezes (B) do Grupo Controle Sadio (HCG); Grupo Controle Sadio Suplementado com MA (HMA); Grupo Controle Dislipidêmico (DCG) e Grupo Controle Dislipidêmico Suplementado com MA (DMA). Média e desvio-padrão (one-way ANOVA, $p \leq 0.05$, Tukey's post hoc test). *Diferença estatisticamente significativa comparada ao grupo HCG; †Diferença estatisticamente significativa comparada ao grupo HMA; #Diferença estatisticamente significativa comparada ao grupo DCG.

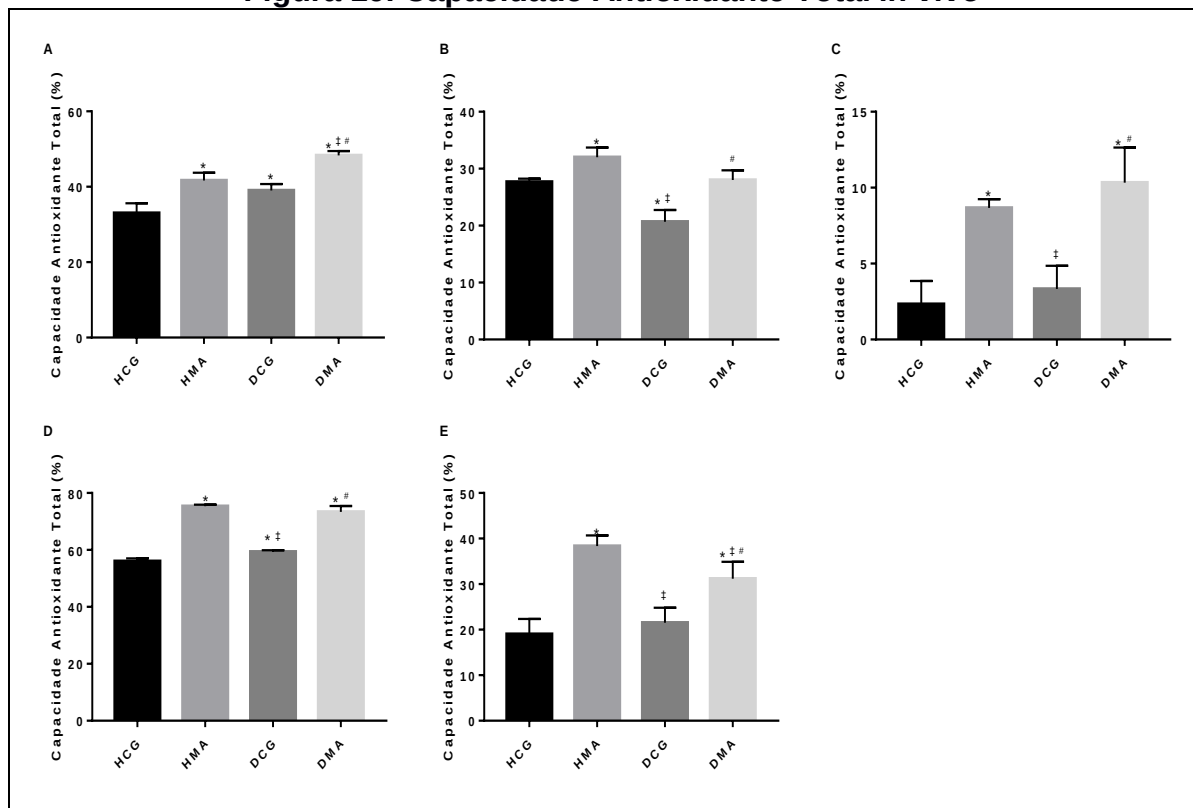
5.2 CARACTERIZAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DO JAMBO VERMELHO *IN VITRO* E AVALIAÇÃO DOS EFEITOS ANTIOXIDANTE E ANTI-INFLAMATÓRIO *IN VIVO*

As substâncias com ação antioxidante presentes nos extratos de MA analisados neste estudo reagiram com o radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH) e o converteram a difenil-picril-hidrazina, em uma reação cujo grau de oxidação do DPPH indica o potencial antioxidante do extrato através da mudança de cor. O resultado de atividade antioxidante para a amostra fresca da fruta foi $EC_{50} 372,26 \pm 1,06$ (g p. f./g DPPH).

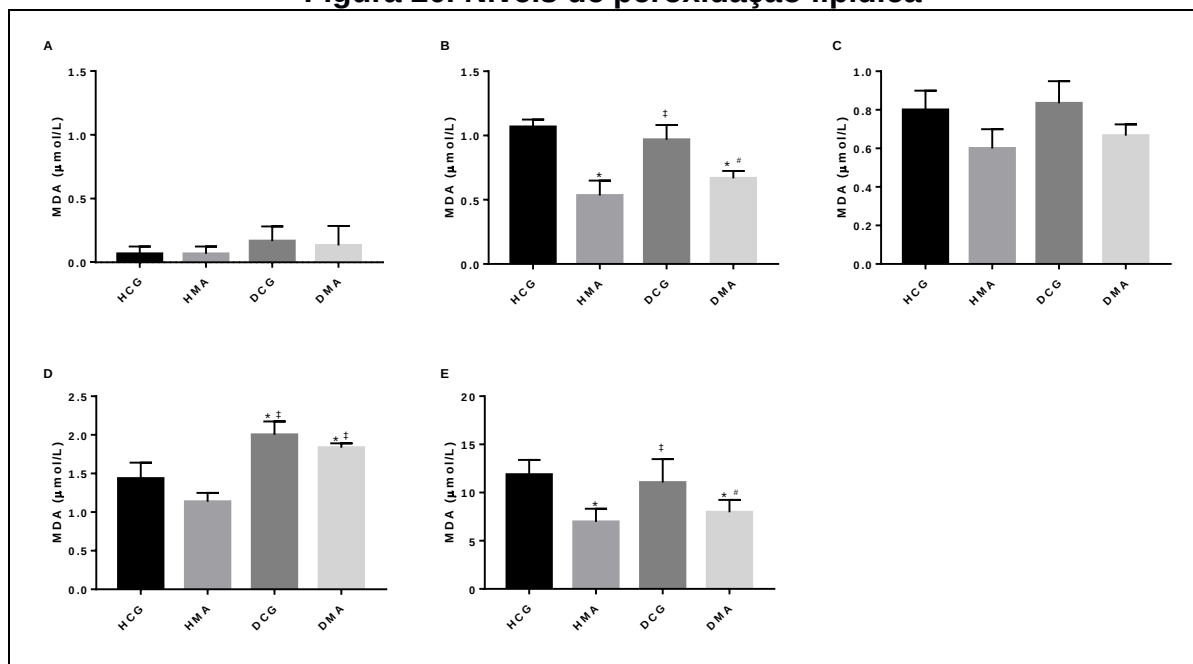
5.2.1 Parâmetros oxidativos *in vivo*

Como demonstrado na Figura 19 (A-E), os grupos tratados com MA foram capazes de aumentar significativamente a atividade antioxidante ($p < 0,05$) nos tecidos cardíaco, hepático e adiposo, assim como no intestino e no soro dos animais tratados. A suplementação com MA também melhorou os níveis de peroxidação lipídica no fígado e no soro dos animais ($p < 0.05$) (Figura 20B; 20E).

Figura 19. Capacidade Antioxidante Total *in vivo*



Efeitos do MA na capacidade antioxidante total do tecido cardíaco (A), hepático (B), adiposo (visceral) (C), intestinal (D) e no soro (E) do Grupo Controle Sadio (HCG); Grupo Controle Sadio Suplementado com MA (HMA); Grupo Controle Dislipidêmico (DCG) e Grupo Controle Dislipidêmico Suplementado com MA (DMA). Média e desvio-padrão (one-way ANOVA, $p \leq 0.05$, Tukey's post hoc test). *Diferença estatisticamente significativa comparada ao grupo HCG; [‡]Diferença estatisticamente significativa comparada ao grupo HMA; #Diferença estatisticamente significativa comparada ao grupo DCG.

Figura 20. Níveis de peroxidação lipídica

Níveis de malonaldeído no tecido cardíaco (A), hepático (B), adiposo (visceral) (C), intestinal (D) e no soro (E) do Grupo Controle Sadio (HCG); Grupo Controle Sadio Suplementado com MA (HMA); Grupo Controle Dislipidêmico (DCG) e Grupo Controle Dislipidêmico Suplementado com MA (DMA). Média e desvio-padrão (one-way ANOVA, $p \leq 0.05$, Tukey's post hoc test). *Diferença estatisticamente significativa comparada ao grupo HCG; ‡Diferença estatisticamente significativa comparada ao grupo HMA; #Diferença estatisticamente significativa comparada ao grupo DCG.

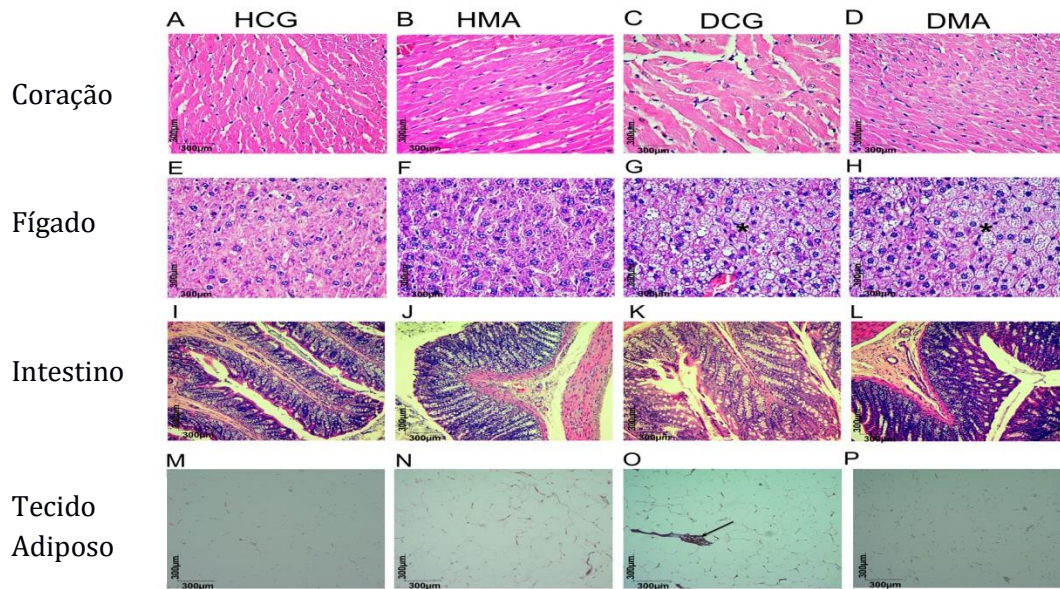
5.2.2 Análises histológicas e morfológicas

A avaliação histológica foi realizada através da análise de células cardíacas, hepáticas, intestinais e adiposas (Figura 21A-21P) dos animais controles e suplementados com MA assim como por análise morfológica do tecido adiposo (Figura 22A-22B). As análises não demonstraram lesão no tecido cardíaco ou no intestino (Figura 21A-21D; 21I-21L). No entanto, no fígado, os animais dos grupos DCG e DMA apresentaram esteatose, indicada pelo asterisco (Figura 21G; 21H).

No tecido adiposo, o grupo DCG apresentou vasodilatação, indicado pela seta (Figura 21N), enquanto o grupo DMA não apresentou nenhuma alteração (Figura 21O), indicando que houve uma ação protetora do MA no tecido adiposo dos animais. Esses resultados estão de acordo com a análise morfológica, que mostrou um aumento no número e na área dos adipócitos dos grupos DCG e DMA, e também uma diminuição no tamanho dos adipócitos grupo DMA (Figura 22A). A

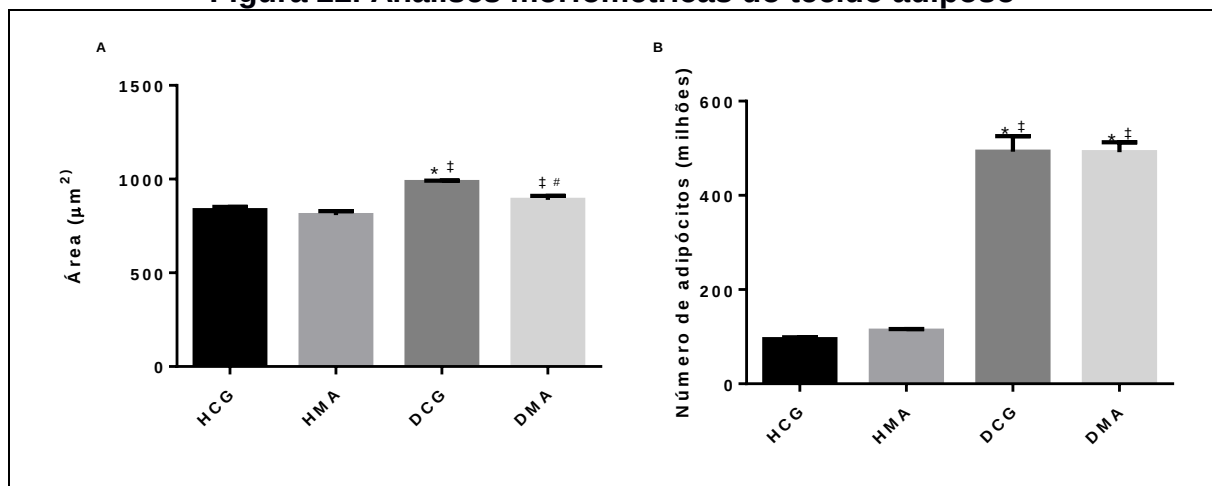
suplementação com MA não foi capaz de diminuir ($p>0,05$) o número de células de gordura no tecido adiposo.

Figura 21. Análises histológicas



Coloração com hematoxilina-eosina (H&E) (10x) para análise histológica do coração (A-D), fígado (E-H), intestino (I-L) e tecido adiposo (M-P) do Grupo Controle Sadio (HCG); Grupo Controle Sadio Suplementado com MA (HMA); Grupo Controle Dislipidêmico (DCG) e do Grupo Controle Dislipidêmico Suplementado com MA (DMA). Asterisco = esteatose hepática. Seta = vasodilatação.

Figura 22. Análises morfométricas do tecido adiposo

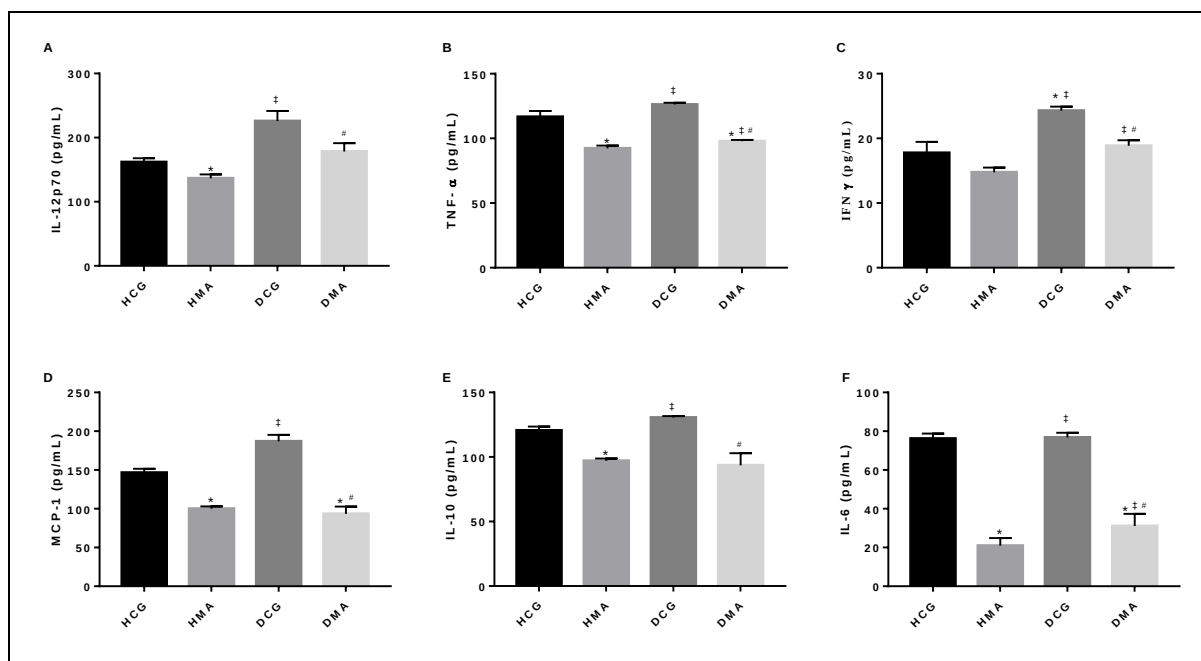


Área (A) e número (B) de adipócitos do Grupo Controle Sadio (HCG); Grupo Controle Sadio Suplementado com MA (HMA); Grupo Controle Dislipidêmico (DCG) e Grupo Controle Dislipidêmico Suplementado com MA (DMA). Média e desvio-padrão (one-way ANOVA, $p \leq 0.05$, Tukey's post hoc test). *Diferença estatisticamente significativa comparada ao grupo HCG; †Diferença estatisticamente significativa comparada ao grupo HMA; #Diferença estatisticamente significativa comparada ao grupo DCG.

5.2.3 Marcadores inflamatórios séricos

Foi possível observar um efeito protetor e a uma diminuição estatisticamente significativa ($p < 0,05$) nos níveis de citocinas nos grupos suplementados com MA (Figura 23A-23F).

Figura 23. Citocinas séricas



Níveis séricos das citocinas: IL-12p70 (A), TNF- α (B), IFN- γ (C), MCP-1 (D), IL-10 (E) and IL-6 (F) no Grupo Controle Sadio (HCG); Grupo Controle Sadio Suplementado com MA (HMA); Grupo Controle Dislipidêmico (DCG) e Grupo Controle Dislipidêmico Suplementado com MA (DMA). Média e desvio-padrão (one-way ANOVA, $p \leq 0.05$, Tukey's post hoc test). *Diferença estatisticamente significativa comparada ao grupo HCG; [‡]Diferença estatisticamente significativa comparada ao grupo HMA; [#]Diferença estatisticamente significativa comparada ao grupo DCG.

5.3 DISCUSSÕES SOBRE A CARACTERIZAÇÃO DO JAMBO VERMELHO E AVALIAÇÃO DO EFEITO HIPOLIPEMIANTE *IN VIVO*

O presente estudo demonstra que o consumo do MA é capaz de promover melhoras em alterações metabólicas associadas ao consumo de dieta dislipidêmica, como as dislipidemias, esteatose hepática, alterações nos níveis de gordura, colesterol, ácidos graxos e ácidos biliares armazenados no fígado ou excretados nas

fezes de ratos jovens Wistar. Esses benefícios podem estar associados ao perfil de compostos bioativos, principalmente às fibras e aos compostos fenólicos, que, no jambo, são majoritariamente as antocianinas. Os compostos fenólicos e fibras presentes no fruto foram relacionados à melhora do perfil lipídico em muitos dos aspectos avaliados.

Estudos anteriores realizados *in vitro* (ARUMUGAM *et al.*, 2014; BATISTA *et al.*, 2017; MARQUES PEIXOTO *et al.*, 2016) e *in vivo* (JUNG *et al.*, 2006; OJIAKO; CHIKEZIE; OGBUJI, 2016), citaram o MA como uma fonte promissora de compostos bioativos, de atividade antioxidante possivelmente relacionada à prevenção e tratamento de DCV, e de potencial ação hipoglicemiante.

Nas condições experimentais testadas, o jambo não teve influência no ganho de peso dos animais, mas apresentou influência na diminuição do consumo de dieta e gordura nas duas semanas do final do experimento para o grupo DMA. Apesar de apresentarem um consumo de gordura superior ($p \leq 0,0001$), os grupos DCG e DMA apresentaram ganho de peso corporal similar ao grupo HCG ($p > 0.05$), esse fato pode estar relacionado aos teores de gordura presentes na dieta dislipidêmica, que, mesmo apresentando um valor calórico mais elevado (Tabela 6), não ocasiona maior ganho de peso visto que a ingestão lipídica aumentada também está associada à expressão de peptídeos intestinais e compostos relacionados à saciedade, como o peptídeo-1, o glucagon (AFFANE *et al.*, 2018), a colecistocinina, o polipeptídeo pancreático, o peptídeo YY e a oxymomodulina (DUCA; ZHONG; COVASA, 2013). Esses resultados também estão de acordo com estudos que testaram a influência de produtos vegetais ricos em compostos bioativos e não obtiveram diferença no ganho de peso e no consumo alimentar de ratos (BATISTA *et al.*, 2018; SHAO *et al.*, 2013).

Os resultados deste estudo também demonstraram influência da suplementação com jambo nos parâmetros glicêmicos, observando-se melhor sensibilidade à glicose e à insulina dos ratos saudáveis. Entretanto, nos animais dislipidêmicos, a melhora da tolerância à glicose só foi observada a partir do tempo 60 min. Vale ressaltar que o MA é muito citado na literatura como uma opção terapêutica para a diabetes pelo seu potencial anti-hiperglicemiante (ARUMUGAM *et al.*, 2014; JUNG *et al.*, 2006; OJIAKO; CHIKEZIE; OGBUJI, 2016). Há vários possíveis mecanismos que podem explicar a sua influência no metabolismo

glicêmico, por exemplo, modulação da atividade ou expressão gênica de enzimas a exemplo da Glucose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) e da Fosfo-di- fosfatase (PAP) (KWON *et al.*, 2017), estímulo da secreção de insulina e proliferação de células β (JADHAV; PUCHCHAKAYALA, 2012; OJIAKO; CHIKEZIE; OGBUJI, 2016) e melhora da concentração de glutathione hepática, inibição das atividades da α -glucosidase intestinal, lipase pancreática e colesterol esterase (JUNG *et al.*, 2006), estando todos eles relacionados aos princípios bioativos de vegetais. De acordo com Jung *et al.* (2006), extratos de alcaloides do MA apresentaram ação anti-hiperglicêmica pela inibição da atividade da enzima α -glucosidase e da enzima glicogênio fosforilase *in vitro* e *in vivo*, assim como estimularam a taxa de captação basal de glicose em adipócitos de ratos.

Como demonstrado em estudos anteriores (AMATO *et al.*, 2017; BATISTA *et al.*, 2018; BEZERRA *et al.*, 2018; SANTOS *et al.*, 2017), as amostras histopatológicas dos fígados de animais roedores alimentados com dietas ricas em gordura, principalmente saturada e trans, apresentaram depósitos de gordura aumentados, sendo essas alterações reduzidas em animais que receberam alguma fonte dietética rica em flavonoides ou outros compostos fenólicos. Os efeitos de proteção hepática estão relacionados à presença e ação sinérgica dos compostos fenólicos presentes, que podem atenuar a esteatose hepática, atuar na regulação de enzimas antioxidantes e na diminuição da lipogênese hepática por meio da ativação da adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (cAMP), da proteína quinase A e do elemento de resposta de ligação proteica ao AMPc (WANG *et al.*, 2016).

No presente estudo, a ingestão do jambo foi capaz de melhorar o perfil lipídico dos grupos suplementados, sobretudo, no grupo DMA. A melhora do perfil lipídico nos grupos HMA e DMA parece estar relacionada a presença de compostos bioativos e ao teor de fibras presente no jambo. As Fibras Dietéticas (FD) têm grande capacidade de retenção de água, retardam o esvaziamento gástrico e são facilmente degradadas por bactérias no intestino, podendo levar a diferentes respostas metabólicas no organismo (DAI; HUANG; DENG, 2018). Em adição, as FD auxiliam no aumento da excreção fecal de gordura total e ácidos biliares nas fezes (dados apresentados nesse estudo e discutidos em seguida) e o aumento da viscosidade intestinal e interrupção do ciclo entero-hepático dos ácidos biliares (SHAO *et al.*, 2013).

Vários estudos já comprovaram a eficiência das FD em melhorar alterações metabólicas induzidas por dietas. Por exemplo, melhora na composição corporal, níveis metabólicos séricos e no perfil de ácidos graxos (DAI; HUANG; DENG, 2018), redução da adiposidade, nos níveis dos principais indicadores de dislipidemia (ADAM *et al.*, 2015) e na esteatose hepática (BROCKMAN; CHEN; GALLAHER, 2014) em ratos alimentados com alto teor de gordura saturada e trans. Esses resultados também foram encontrados em estudos anteriores que avaliaram a influência de alimentos ricos em compostos bioativos em animais dislipidêmicos, obtendo a reversão ou a melhora das alterações no perfil lipídico mediante o uso de suplementação de fontes de princípios bioativos de origem vegetal (BATISTA *et al.*, 2018; ROMAIN *et al.*, 2018; SHAO *et al.*, 2013; TERZO *et al.*, 2018).

Também foi possível observar melhora na função renal, com melhores níveis de ureia no grupo HMA e de creatinina no grupo DMA. A melhora dos marcadores renais ureia e creatinina parece estar associada à presença dos polifenóis antioxidantes que podem inibir a nefrotoxicidade associada ao estresse oxidativo em modelos animais (FAMUREWA *et al.*, 2018; FAROOQUI *et al.*, 2017).

Nesse estudo foi observado um aumento da excreção de ácidos biliares, colesterol e gordura total nas fezes dos grupos HMA e DMA suplementados com jambo. Em situação de abundância de colesterol, há uma diminuição da biossíntese de colesterol, aumento no efluxo de colesterol para a circulação, assim como a síntese de sais biliares e a esterificação (FIORUCCI *et al.*, 2010; GONZÁLEZ-PEÑA *et al.*, 2017).

Os flavonoides presentes no jambo podem estar relacionados ao aumento da excreção fecal de colesterol e a diminuição dos níveis de colesterol plasmático e hepático através da supressão das atividades da 3-hidroxi-3-methyl-glutaril-CoA redutase hepática (HMG-CoA) e da acil-CoA: colesterol aciltransferase (ACAT) (OJIAKO; CHIKEZIE; OGBUJI, 2016).

A composição dos ácidos graxos na dieta também está muito relacionada ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares e distúrbios metabólicos, uma vez que estes são componentes estruturais de membranas biológicas e fonte de energia para o organismo vivo, desempenhando um papel importante na regulação de processos fisiológicos como inflamação, controle glicêmico, metabolismo lipídico e estresse oxidativo (LI *et al.*, 2018). No presente estudo, além dos efeitos negativos

da dieta dislipidêmica nos níveis plasmáticos e teciduais de gordura e colesterol, houve também uma influência significativa na composição de ácidos graxos no fígado e nas fezes dos ratos. A dieta dislipidêmica afetou negativamente a taxa de PUFA n-6/n-3 no fígado, pois diminuiu os percentuais de ambos n-6 (10,79%) e n-3 (55,61%), enquanto aumentou os níveis de SFA (19,85%) entre HCG e DCG (Apêndice B). A diminuição dos PUFAs no fígado e na circulação está relacionada a níveis diminuídos de lipoproteínas de alta densidade, enquanto o aumento dos SFA está relacionado ao aumento de lipoproteínas de baixa densidade e colesterol, aumentando o risco de CVD (KAKIMOTO; KOWALTOWSKI, 2016; KAMAL-ELDIN *et al.*, 2000; LI *et al.*, 2018).

O SFA majoritário armazenado no fígado e excretado nas fezes dos animais sadios foi o ácido palmítico (C16:0), contudo nos animais dislipidêmicos o ácido esteárico apareceu em maior quantidade (Apêndice B). O excesso de ácido palmítico pode estar relacionado à lipotoxicidade de ácidos graxos nas células β pancreáticas, contribuindo para apoptose celular e alteração nos canais de potássio sensíveis a ATP (KATP) que servem como sensores de glicose e efetivamente iniciam a secreção de insulina estimulada pela glicose (RUAN *et al.*, 2018). Em relação ao excesso de ácido esteárico nos ratos dislipidêmicos, não foram encontrados resultados na literatura publicada que indicassem uma motivação para essa ocorrência. Apesar da suplementação com o jambo não ter sido capaz de influenciar o percentual total de SFA, MUFA e PUFA, esta suplementação provocou mudanças no percentual de alguns ácidos graxos tanto nos ratos sadios (HMA) como nos dislipidêmicos (DMA), a exemplo da redução do percentual de ácidos palmitoleico e oleico no fígado e do aumento da excreção do ácido linoleico nas fezes. Estudos demonstram que esses ácidos graxos promovem um efeito cardioprotetor envolvendo menor processo inflamatório, prevenção à arritmias, vasodilatação e controle nos níveis de lipídios no sangue (SHIKAMA, 2018).

O consumo regular de jambo seja em ratos sadios (HMA) ou dislipidêmicos (DMA) foi capaz de melhorar diversos parâmetros relacionados ao metabolismo glicídico e lipídico, além de marcadores bioquímicos da função hepática e renal, sugerindo-se que estudos translacionais com a população sadia e portadora de dislipidemia sejam realizados a partir da quantidade de jambo administrada aos ratos que equivale a 3,64 g para consumo humano (NAIR; JACOB, 2016).

5.4 DISCUSSÕES SOBRE A CARACTERIZAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DO JAMBO VERMELHO *IN VITRO* E AVALIAÇÃO DOS EFEITOS ANTIOXIDANTE E ANTI-INFLAMATÓRIO *IN VIVO*

A capacidade antioxidante apresentada pelo MA (EC_{50} 372,26 g p. f./g DPPH) não se destacou quando comparada a outras frutas tropicais da mesma família (Mytaceae), a exemplo do Araçá (EC_{50} 721,85 g p.f./g DPPH) e da Cagaita (EC_{50} 337,88 g p.f./g DPPH) (SCHIASSI *et al.*, 2018). No entanto, a suplementação com MA foi capaz de aumentar a CAT nos ratos dos grupos HMA e DMA no soro e em todos os órgãos avaliados dos animais ($p < 0,05$). Esse aumento da capacidade antioxidante pode ser atribuído a alguns compostos bioativos presentes no fruto, a exemplo dos polifenóis, que desempenham um papel fundamental como antioxidantes devido à presença de estruturas substituintes do radical hidroxila e de estruturas aromáticas, que lhes permitem neutralizar radicais livres no organismo (VILLANO *et al.*, 2007).

A CAT *in vivo* é uma medida utilizada para avaliar a capacidade de sistemas antioxidantes não enzimáticos do organismo de proteger-se contra os danos oxidativos (Chu *et al.*, 2019) como os causados pelo consumo continuado de dietas ricas em gordura saturadas ou trans que podem produzir uma quantidade aumentada de radicais livres e comprometer o sistema de defesa antioxidante (Chu *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2018).

A peroxidação lipídica também é um mecanismo bem estabelecido de geração de dano oxidativo causado por espécies reativas de oxigênio em excesso (WU *et al.*, 2010). No presente estudo, a suplementação com MA foi capaz de promover um decréscimo nos níveis de MDA no fígado e no soro dos animais ($p < 0,05$). Este resultado foi semelhante ao demonstrado em estudo prévio, no qual o consumo de dois sucos produzidos a partir de um mix de frutos tropicais, administrados nas doses de 100, 200 e 400mg/kg durante 4 semanas, foi capaz de diminuir os níveis de peroxidação lipídica no fígado e no soro de ratos (PEREIRA *et al.*, 2014). KHENNOUF *et al.*, (2010) também relataram o efeito inibidor de compostos fenólicos e taninos na peroxidação lipídica no cérebro de coelhos.

Os resultados da análise histológica indicaram que o tecido hepático nos ratos dislipidêmicos apresentou acúmulo excessivo de gordura, e que a suplementação com MA não foi capaz de reverter esta lesão causada pelo consumo continuado de dieta dislipidêmica como observados em estudos anteriores com a suplementação de outras frutas (LAMAS *et al.*, 2018; WANNASIRI; CHANSAKAOW; SIREERATAWONG, 2017) ou de subprodutos de frutas como cascas e sementes (BATISTA *et al.*, 2018). Tal resultado pode estar associado a menor quantidade e aos diferentes compostos bioativos presentes na polpa em comparação com a casca do MA (BATISTA *et al.*, 2017; NUNES *et al.*, 2016). Além disso, outro fator que pode estar associado ao processo de dano hepático pode ser a peroxidação lipídica (Figura 20E), sendo este um importante marcador do dano oxidativo e da produção de MDA frequentemente relacionado à ocorrência do acúmulo de gordura e do estresse oxidativo no fígado (WU *et al.*, 2010).

A histologia do tecido adiposo indicou que o MA apresentou um efeito protetor dos adipócitos no grupo DMA (Figura 21P), indicado pela ausência de vasodilatação, uma alteração que funciona como um marcador de inflamação tecidual. O tecido adiposo é dinâmico e modificável, desenvolvendo-se tardiamente durante a gestação em humanos e durante o início do desenvolvimento pós-natal nos roedores (PARLEE *et al.*, 2014). O distúrbio metabólico induzido pelo excesso de gordura saturada e trans ofertada aos animais no presente estudo ocasionou uma remodelação tecidual nos adipócitos, aumentando as células adiposas em número (hiperplasia) e em tamanho (hipertrofia), modificando o perfil do tecido adiposo nos grupos DCG e DMA (Figura 22A-B). O excesso de adipócitos hipertróficos, por sua vez, gerou uma sobrecarga de lipídios, que acabou sendo depositado ectopicamente em outros órgãos como no fígado, ocasionando esteatose (Figura 21G; 21H).

A morfometria dos adipócitos no grupo DMA também indicou um efeito positivo da suplementação na diminuição do tamanho dos adipócitos (Figura 22A). Essa diminuição não foi acompanhada pelo decréscimo estatisticamente significativo ($p > 0,05$) do número de adipócitos (Figura 22B), entretanto, é possível que o número de adipócitos não sofra alteração, e, mesmo assim, haja um efeito protetor pela diminuição no tamanho geral das células (PARLEE *et al.*, 2014).

A redução dos níveis das citocinas pró-inflamatórias nos animais suplementados indicou que o MA foi capaz de melhorar o dano inflamatório no

organismo a nível sistêmico. O dano inflamatório ocasionado pela dislipidemia pode ocorrer tanto por um acréscimo das respostas imunes do sistema nervoso central, como por lesões teciduais vasculares que impulsionam as células imunes inatas a desencadearem um processo inflamatório, elevando os níveis de citocinas (CHU, 2014; OLIVEIRA *et al.*, 2018). O estresse oxidativo também associado à dislipidemia pode induzir a secreção de MCP-1, IL-6, TNF- α e outras citocinas inflamatórias (MASLOV *et al.*, 2019).

As principais substâncias relacionadas ao efeito antioxidante e à ação anti-inflamatória do MA são os compostos fenólicos, sobretudo as antocianinas (CHENG *et al.*, 2014; FIGUEIRA *et al.*, 2016), compostos majoritários do MA (NUNES *et al.*, 2016). Os principais compostos fenólicos encontrados nas amostras de MA avaliadas por (Batista *et al.*, 2017) foram, respectivamente, cyanidin-3-O-glucoside (42.77 ± 3.36 mg/100 g), cyanidin-3,5-O-diglucoside (5.52 ± 0.25 mg/100 g), isorhamnetin-3-O-glucoside (3.33 ± 0.20 mg/100 g), procyanidin A2 (1.74 ± 0.25 mg/100 g), epicatechin (1.37 ± 0.03 mg/100 g), epicatechin gallate (1.37 ± 0.25 mg/100 g), Kaempferol-3-O-glucoside (1.32 ± 0.16 mg/100 g), procyanidin B1 (1.31 ± 0.25 mg/100 g), catechin (1.12 ± 0.09 mg/100 g), benzoic acid (0.75 ± 0.06 mg/100 g), Isoquercitrin (0.55 ± 0.01 mg/100 g) and peonidin-3-O-glucoside (0.51 ± 0.03 mg/100 g). O principal mecanismo de ação anti-inflamatória dos polifenóis é a capacidade de inativar ROS, dessa maneira, os compostos fenólicos atuam em vias de sinalização mantendo ou restaurando a homeostase tecidual, levando à redução e geração de mediadores pró-inflamatórios. Alguns exemplos das vias de ação dos polifenóis na inflamação são: a atividade antioxidante pela inativação de ROS, a redução da agregação plaquetária, vasodilatação, inibição da Cyclooxygenase (COX), inativação do Peroxisome Proliferator-activated Receptor gamma (PPAR γ), síntese do Endothelial Nitric Oxide Synthase (eNOS), ativação de SirT1 e inibição da enzima ACE. (CHU, 2014).

A inserção de MA na dieta deve ser encorajada a partir de outros estudos não clínicos e de estudos clínicos conduzidos tanto com a população sadia como com a portadora de dislipidemia, enfatizando o consumo do fruto inteiro e também da casca e da polpa separadamente para avaliação do potencial funcional e nutracêutico desta fruta.

6 CONCLUSÃO

Em conclusão, nossos resultados sugerem que o MA pode ser útil para prevenir e melhorar distúrbios metabólicos, apresentando potencial hipolipemiante, melhorando parâmetros como adiposidade, esteatose hepática, resistência à insulina e hiperlipidemia in vivo. Além disso, este estudo também demonstrou que a suplementação com MA foi capaz de promover melhora nos potenciais antioxidante e anti-inflamatório, aumentando a capacidade antioxidante total no soro e nos órgãos dos animais, assim como diminuindo os níveis séricos e hepáticos de peroxidação lipídica nos animais suplementados. O estudo também estende descobertas anteriores ao relatar a composição do fruto e seus efeitos positivos no metabolismo.

De maneira geral, o estudo de caracterização do MA e das suas propriedades antioxidante in vitro e in vivo e propriedades hipolipemiante, e anti-inflamatória in vivo, apresentou dados que evidenciam sua importância nutricional, assim como destacam a importância do seu consumo e seu aproveitamento pela população e pela indústria de alimentos.

REFERÊNCIAS

- A.O.A.C. Association Of Official Analytical Chemists. **Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists**. LATIMER, G. W. JR. (Ed.). 19 ed. Gaithersburg, Maryland: Chapter 32 Met. 991.43, v. 2, p. 7-10, 2012.
- ADAM, C. L. *et al.* Soluble fermentable dietary fibre (pectin) decreases caloric intake, adiposity and lipidaemia in high-fat diet-induced obese rats. **PLoS ONE**, v. 10, n. 10, p. 1–14, 2015.
- AFFANE, F. *et al.* Hypolipidemic, antioxidant and antiatherogenic property of sardine by-products proteins in high-fat diet induced obese rats. **Life Sciences**, v. 199, n. x, p. 16–22, 2018.
- ÁGUILA, M. B.; LOUREIRO, C. C.; PINHEIRO, A. de R.; MANDARIM-DE-LACERDA, C. A. Metabolismo Lipídico de Ratos Alimentados com diferentes Tipos de Lipídios. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**. v. 78, n.1, p. 25-31, 2002.
- AKAKI, J. *et al.* Promotive effect of Bofutsushosan (Fangfengtongshengsan) on lipid and cholesterol excretion in feces in mice treated with a high-fat diet. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 220, n. x, p. 1-8, 2018.
- AMATO, A. *et al.* NAFLD and atherosclerosis are prevented by a natural Natural Dietary Supplement Containing Curcumin, Silymarin, Guggul, Chlorogenic Acid and Inulin in Mice Fed a High-Fat Diet. **Nutrients**, v. 9, n. 1, 2017.
- ARAKAWA, N. *et al.* Separative Determination of Ascorbic Acid and Erythorbic Acid by High-Performance Liquid Chromatography. **Journal of Nutrition Science and Vitaminology**, v. 27, p. 1-7, 1981.
- ARUMUGAM, B. *et al.* Antioxidant and antiglycemic potentials of a standardized extract of *Syzygium malaccense*. **LWT - Food Science and Technology**, v. 59, n. 2P1, p. 707–712, 2014.
- ARUMUGAM, B. *et al.* Potential antihyperglycaemic effect of myricetin derivatives from *Syzygium malaccense*. **Journal of Functional Foods**, v. 22, p. 325–336, 2016.
- BALASUNDRAM, N.; SUNDRAM, K.; SAMMAN, S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. **Food Chemistry**, v. 99, n. 1, p. 191-203, 2006.
- BANGALORE, S. *et al.* Cholesterol guidelines revisited: Percent LDL-c reduction or attained LDL-c level or both for prognosis? **American Journal of Medicine**, v.129, n.4, p. 384-391, 2016.
- BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, p. 113-123, 2006.

- BATISTA, A. G. *et al.* Intake of jaboticaba peel attenuates oxidative stress in tissues and reduces circulating saturated lipids of rats with high-fat diet-induced obesity. **Journal of Functional Foods**, v. 6, p. 450-461, 2014.
- BATISTA, Â. G. *et al.* Red-jambo (*Syzygium malaccense*): Bioactive compounds in fruits and leaves. **LWT - Food Science and Technology**, v. 76, p. 284–291, mar. 2017.
- BATISTA, K. S. *et al.* Beneficial effects of consumption of acerola, cashew or guava processing by-products on intestinal health and lipid metabolism in dyslipidaemic female Wistar rats. **British Journal of Nutrition**, v. 119, n.1, p. 30-41, 2018.
- BEZERRA, M. L. R. *et al.* Effects of honey from *Mimosa quadrivalvis* L. (malícia) produced by the *Melipona subnitida* D. (jandaíra) stingless bee on dyslipidaemic rats. **Food & Function**, v. 9, n. 8, p. 4480–4492, 2018.
- BONFANTI, G. *et al.* *Syzygium jambos* and *Solanum guaraniticum* Show Similar Antioxidant Properties but Induce Different Enzymatic Activities in the Brain of Rats. **Molecules**, v. 18, n. 8, p. 9179-9194, 2013.
- BRAGAGNOLO, N.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Teores de colesterol em carnes de frango. **Revista de Farmácia e Bioquímica da Universidade de São Paulo**, v. 28, n. 2, p. 122-131, 1992.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT – Food Science and Technology**, v. 22, p. 25-30, 1995.
- BRASIL. ANVISA. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Saúde e Economia. Dislipidemias. Ano III; n.6 de 11 de Outubro de 2013.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Alimentos regionais brasileiros**, Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Atenção Básica. – 2. ed. – Brasília: Ministério da Saúde, 2015.
- BRICARELLO, L. P. *et al.* Comparison Between the Effects of Soy Milk and Non-Fat Cow Milk on Lipid Profile and Lipid Peroxidation in Patients With Primary Hypercholesterolemia. **Applied Nutritional Investigation**, v. 20, p.200-204, 2004.
- BROCKMAN, D. A.; CHEN, X.; GALLAHER, D. D. High-Viscosity Dietary Fibers Reduce Adiposity and Decrease Hepatic Steatosis in Rats Fed a High-Fat Diet. **Journal of Nutrition**, v. 144, n. 9, p. 1415–1422, 2014.
- BUB, A. *et al.* Moderate Intervention with Carotenoid-Rich Vegetable Products Reduces Lipid Peroxidation in Men. **The Journal of Nutrition**, v.130, p 2200-2206, 2000.
- CAI, Y-Z. *et al.* Structure–radical scavenging activity relationships of phenolic compounds from traditional Chinese medicinal plants. **Life Sciences**, v.78, p. 2872-2888, 2006.

CALDER, P. C. Fatty acids and inflammation: The cutting edge between food and pharma. **European journal of pharmacology**, v. 668, n. 1, p. S50-S58, 2011.

CHENG, A. *et al.* Polyphenols from blueberries modulate inflammation cytokines in LPS-induced RAW264.7 macrophages. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 69, p. 382–387, 2014.

CHESSELL, I. P. *et al.* Disruption of the P2X7 purinoceptor gene abolishes chronic inflammatory and neuropathic pain. **Pain**, v. 114, n.3, p. 386-396, 2005.

CHU, A. J. Antagonism by bioactive polyphenols against inflammation: a systematic view. **Inflammation & allergy drug targets**, v. 13, n. 1, p. 34–64, fev. 2014.

CHU, L. *et al.* Chemical composition, antioxidant activities of polysaccharide from Pine needle (*Pinus massoniana*) and hypolipidemic effect in high-fat diet-induced mice. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 125, p. 445–452, 2019.

CIRICO, T. L.; OMAJE, S. T. Additive or synergetic effects of phenolic compounds on human low-density lipoprotein oxidation. **Food and Chemical Toxicology**, v. 44, n. 4, p. 510–516, 2006.

CLOSE, G. L. *et al.* The emerging role of free radicals in delayed onset muscle soreness and contraction-induced muscle injury. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 142, p. 257-266, 2005.

COELHO, E. M. *et al.* Simultaneous analysis of sugars and organic acids in wine and grape juices by HPLC: Method validation and characterization of products from northeast Brazil. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 66, p. 160-167, 2018.

CREGE, D. R. X. O. *et al.* Alterações cardiometabólicas em ratos *Wistar* alimentados com dieta hiperlipídica e hipercolesterolêmica por seis semanas. **International Journal of Cardiovascular Sciences**, v. 29, n. 5, p. 362-369, 2016.

CUCINOTTA, D. Prevention of pathological aging by comprehensive clinical, functional and biological assessment. **Archives of Gerontology and Geriatrics**, v.44, p. 125-132, 2007.

DAI, B.; HUANG, S.; DENG, Y. Modified insoluble dietary fibers in okara affect body composition, serum metabolic properties, and fatty acid profiles in mice fed high-fat diets: an NMR investigation. **Food Research International**, n. May, 2018.

DE OLIVEIRA, R. N.; DIAS I. J. M.; CÂMARA, C. A. G. Estudo comparativo do óleo essencial de *Eugenia punicifolia* (HBK) DC. de diferentes localidades de Pernambuco. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v.15, p. 39-43, 2005.

- DEEPA, N. *et al.* Antioxidant constituents in some sweet pepper (*Capsicum annuum* L.) genotypes during maturity. **LWT - Food Science and Technology**, v. 40, n. 1, p. 121–129, 2007.
- DEREK, M. E.; HYUN-JUN, P.; HUI-YOUNG, L. The role of lipids in the pathogenesis and treatment of type 2 diabetes and associated co-morbidities. **BMB Reports**, v. 49, n. 3, p. 139-148, 2016.
- DUCA, F. A.; ZHONG, L.; COVASA, M. Reduced CCK signaling in obese-prone rats fed a high fat diet. *Hormones and Behavior*, v. 64, n. 5, p. 1–6, 2013.
- DUTRA, M. DA C. P. *et al.* Integrated analyses of phenolic compounds and minerals of Brazilian organic and conventional grape juices and wines: Validation of a method for determination of Cu, Fe and Mn. **Food Chemistry**, 269, 157-165, 2018.
- ERBEN, U. *et al.* A guide to histomorphological evaluation of intestinal inflammation in mouse models. **International Journal of Clinical and Experimental Pathology**, v.7, n.8, p. 4557-4576, 2014.
- ESTEVE, E.; RICART, W.; FERNÁNDEZ-REAL, J. M. Dyslipidemia and inflammation: an evolutionary conserved mechanism. **Clinical Nutrition**, v. 24, n. 1, p. 16-31, 2005.
- FAMUREWA, A. C. *et al.* Antioxidant and anti-inflammatory mechanisms of polyphenols isolated from virgin coconut oil attenuate cadmium-induced oxidative stress-mediated nephrotoxicity and inflammation in rats. *Journal of Applied Biomedicine*, v. 16, n. 4, p. 281–288, 2018.
- FAROOQUI, Z. *et al.* Protective effect of *Nigella sativa* oil on cisplatin induced nephrotoxicity and oxidative damage in rat kidney. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 85, p. 7–15, 2017.
- FIGUEIRA, M. E. *et al.* Protective effects of a blueberry extract in acute inflammation and collagen-induced arthritis in the rat. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 83, p. 1191–1202, 2016.
- FINKEL, T.; HLOBROOK, N. J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. **Nature**, v.408, p.239-247, 2000.
- FIORUCCI, S. *et al.* Bile acid-activated receptors in the treatment of dyslipidemia and related disorders. *Progress in Lipid Research*, v. 49, n. 2, p. 171–185, 2010.
- FOLCH, J.; LESS, M.; STANLEY, G. H. S. A simple method for isolation and purification of total lipids from animal tissues. **Journal Biological Chemistry**, v. 226, p. 497-509, 1957.
- FRANÇA, H. H. O paradoxo da doença coronariana. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v.79, p. 419-421, 2002.

FRISARD, M.; RAVUSSIN, E. Energy Metabolism and Oxidative Stress (Impact on the Metabolic Syndrome and the Aging Process). **Endocrine**, v.29, p.27-32, 2006.

GETZ, G. S.; REARDON, C. A.; Atherogenic lipids and macrophage subsets. **Current Opinion in Lipidology**, v. 26, p. 357-361, 2015.

GIBBERT, L.; BERTIN, R.; KRUGER, C. H. Breve revisão da espécie *Syzygium malaccense* (L.) MERR. & L.M. PERRY como fonte de compostos bioativos. **Visão Acadêmica**, v. 18, n. 4, p. 140- 152, 2017.

GOMES NATAL, D. I. *et al.* Ubá mango juices intake decreases adiposity and inflammation in high-fat diet-induced obese Wistar rats. **Nutrition**, v. 32, n. 9, p. 1011-1018, 2016.

GONZÁLEZ-PEÑA, D. *et al.* Role of dietary onion in modifying the faecal bile acid content in rats fed a high-cholesterol diet. **Food and Function**, v. 8, n. 6, p. 2184–2192, 2017.

GUTTERIDGE, J. M. C. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. **Clinical Chemistry**, v.41, p. 1819-1828, 1995.

HARTMAN, L.; LAGO, C. A. Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. **Laboratory Practice**, v.22, n.6 p. 475-476, 1973.

HEO, H. J. *et al.* Antioxidant capacities of individual and combined phenolics in a model system. **Food Chemistry**, v. 104, n. 1, p. 87–92, 2007.

HOSOMI, R. *et al.* Dietary ϵ -Polylysine Decreased Serum and Liver Lipid Contents by Enhancing Fecal Lipid Excretion Irrespective of Increased Hepatic Fatty Acid Biosynthesis-Related Enzymes Activities in Rats. **Preventive Nutrition and Food Science**, v. 20, n. 1, p. 43-51, 2015.

HU, R. *et al.* Extracts of *Ganoderma lucidum* attenuate lipid metabolism and modulate gut microbiota in high-fat diet fed rats. **Journal of Functional Foods**, v. 46, n. x, p. 403-412, 2018.

IPSEN, D. H. *et al.* High-fat but not sucrose intake is essential for induction of dyslipidemia and non-alcoholic steatohepatitis in guinea pigs. **Nutrition & metabolism**, v. 13, n. 1, p. 51, 2016.

JACOBO-VELÁZQUEZ, D. A.; CISNEROS-ZEVALLOS, L. Correlations of antioxidant activity against phenolic content revisited: A new approach in data analysis for food and medicinal plants. **Journal of Food Science**, v. 74, n. 9, p. 107-113, 2009.

JADHAV, R.; PUCHCHAKAYALA, G. Hypoglycemic and antidiabetic activity of flavonoids: Boswellic acid, Ellagic acid, Quercetin, Rutin on streptozotocin-nicotinamide induced type 2 diabetic rats. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 4, n. 2, p. 251–256, 2012.

JAKOBSDOTTIR, G. *et al.* High-Fat Diet Reduces the Formation of Butyrate, but Increases Succinate, Inflammation, Liver Fat and Cholesterol in Rats, while Dietary Fibre Counteracts These Effects. **PLOS ONE**, v. 8, n. 11, p.xx-xx, 2013.

JOSEPH, S. V.; EDIRISINGHE, I.; BURTON-FREEMAN, B. M. Fruit polyphenols: A review of anti-inflammatory effects in humans. **Food Science and Nutrition**, v. 56, n. 3, p. 419-444, 2016.

JUNG, M. *et al.* Antidiabetic Agents from Medicinal Plants. **Current Medicinal Chemistry**, v. 13, n. 10, p. 1203–1218, 2006.

JUNIOR, L. R. *et al.* Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutatona associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. **Química Nova**, v.24, p.112-119, 2001.

KAKIMOTO, P. A.; KOWALTOWSKI, A. J. Effects of high fat diets on rodent liver bioenergetics and oxidative imbalance. **Redox Biology**, v. 8, p. 216–225, 2016.

KAMAL-ELDIN, A. *et al.* Effects of dietary phenolic compounds on tocopherol, cholesterol, and fatty acids in rats. **Lipids**, v. 35, n. 4, p. 427–435, 2000.

KAWASHIMA, A. *et al.* Four week supplementation with mixed fruit and vegetable juice concentrates increased protective sérum antioxidants and folate and decreased plasma homocysteine in Japanese subjects. **Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition**, v.116, p. 411-421, 2007.

KEDAR, E.; SIMKIN, P. A. A perspective on diet and gout. **Advances in Chronic Kidney Disease**, v. 19, n. 6, p. 392-397, 2012.

KHAN N.; AFAQ, F.; MUKHTAR, S. Cancer chemoprevention through dietary antioxidants: progress and promise. **Antioxidant & Redox Signaling**, v. 10, p. 475-510, 2008.

KHENNOUF, S. *et al.* Effect of Some Phenolic Compounds and Quercus Tannins on Lipid Peroxidation. **World Applied Sciences Journal**, v. 8, n. 9, p. 1144–1149, 2010.

KHURANA, S. *et al.* Polyphenols: Benefits to the cardiovascular System in Health na in Aging. **Nutrients**, v. 5, p. 3779-3827, 2013.

KRYGIER, K.; SOSULSKI, F.; HOGGE, L. Free, esterified, and insoluble-bound phenolic acids. 1. Extraction and purification procedure. **Journal Agricultural Food Chemistry**, v. 30, p. 330-334, 1982.

KWON, E. Y. *et al.* Seabuckthorn leaves extract and flavonoid glycosides extract from seabuckthorn leaves ameliorates adiposity, hepatic steatosis, insulin resistance, and inflammation in diet-induced obesity. **Nutrients**, v. 9, n. 6, p. 1–14, 2017.

LAKSHMI, B.V.S.; SUDHAKAR, M.; APARNA, M. Protective potential of black grapes against lead induced oxidative stress in rats. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 35, p. 361-368, 2013.

LAMAS, C. A. *et al.* Jaboticaba extract prevents prediabetes and liver steatosis in high-fat-fed aging mice. **Journal of Functional Foods**, v. 47, n. May, p. 434–446, 2018.

LI, K. *et al.* Uncommon fatty acids and cardiometabolic health. **Nutrients**, v. 10, n. 10, p. 1–14, 2018.

LI, X-Y; *et al.* Effect of Berberine on promoting the excretion of cholesterol in high-fat diet-induced hyperlipidemic hamsters. **Journal of Translational Medicine**, v. 13, n. 278, p. 1-9, 2015.

LIU, L. *et al.* Polyphenol-enriched extract of *Rosa rugosa* Thunb regulates lipid metabolism in diabetic rats by activation of AMPK pathway. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 100, p. 29–35, 2018.

MARQUES PEIXOTO, F. *et al.* Simulation of in vitro digestion coupled to gastric and intestinal transport models to estimate absorption of anthocyanins from peel powder of jaboticaba, jamelão and jambo fruits. **Journal of Functional Foods**, v. 24, p. 373–381, 2016.

MASLOV, L. N. *et al.* Is oxidative stress of adipocytes a cause or a consequence of the metabolic syndrome? **Journal of Clinical and Translational Endocrinology**, v. 15, n. May 2018, p. 1–5, 2019.

MELO, R. R. *et al.* Características farmacobotânicas, químicas e biológicas de *Syzygium malaccense* (L.) Merr. & I. M. Perry. **Revista Brasileira de Farmacologia**, v.90, p. 298-302, 2009.

MITLER, R. ROS are good. **Trends in plant cells**, v.xx, p. 1-9, 2016.

MORAIS, S. A.; CHECCHIO, M. V.; FREITAS, I. C. M. Dislipidemia e fatores associados em adultos residentes em Ribeirão Preto, SP. Resultados do Projeto EPIDCV. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabolismo**, v. 9, n. 57, p. 691-701, 2013.

MUSIAL, C. D. *et al.* Comparative study of hypocholesterolemic potential of pineapple and passion fruit peels in rats and mice, Revista **Brasileira de Pesquisa em Alimentos**, v. 6, n. 1, p. 64-69, 2015.

NAIR, A.; JACOB, S. A simple practice guide for dose conversion between animals and human. **Journal of Basic and Clinical Pharmacy**, v. 7, n. 2, p. 27, 2016.

NUNES, P. C. *et al.* Physico-chemical characterization, bioactive compounds and antioxidant activity of Malay apple [*Syzygium malaccense* (L.) Merr. & L.M. Perry]. **PLoS ONE**, v. 11, n. 6, 2016a.

- OHKAWA, H., OHISHI, N., & YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical Biochemistry**, v. 95, p. 351–358, 1979.
- OJIAKO, O. A.; CHIKEZIE, P. C.; OGBUJI, A. C. Blood glucose level and lipid profile of alloxan-induced hyperglycemic rats treated with single and combinatorial herbal formulations. **Journal of Traditional and Complementary Medicine**, v. 6, n. 2, p. 184–192, 2016.
- OLIVEIRA, B. C. DE L. *et al.* Inflammation as a Possible Link Between Dyslipidemia and Alzheimer's Disease. **Neuroscience**, v. 376, p. 127–141, 2018.
- OSAWA, T.; KATO, Y. Protective Role of Antioxidative Food Factors in Oxidative Stress Caused by Hyperglycemia. **Annals of New York Academy of Sciences**, v.1043, p.440-451, 2005.
- PADILHA, C. V. S. *et al.* Rapid determination of flavonoids and phenolic acids in grape juices and wines by RP-HPLC/DAD: Method validation and characterization of commercial products of the new Brazilian varieties of grape. **Food Chemistry**, v. 228, 106–115, 2017.
- PAREDES-LÓPEZ, O. *et al.* Berries: Improving human health and healthy aging, and promoting quality life- A review. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 65, p. 299-308, 2010.
- PARLEE, S. D. *et al.* Quantifying Size and Number of Adipocytes in Adipose Tissue. In: Quantifying Size and Number of Adipocytes in **Adipose Tissue Sebastian**. [s.l: s.n.]. p. 93–122.
- PEIXOTO, F. M. *et al.* O. Simulation of *in vitro* digestion coupled to gastric and intestinal transport models to estimate absorption of anthocyanins from peel poder of jabuticaba, jamelão and jambo fruits. **Journal of Food Function**, v. 24, p. 373-381, 2016.
- PEREIRA, A. C. D. S. *et al.* Effect of antioxidant potential of tropical fruit juices on antioxidant enzyme profiles and lipid peroxidation in rats. **Food Chemistry**, v. 157, p. 179–185, 2014.
- PEYRAT-MAILLARD, M. N.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Antioxidant activity of phenolic compounds in 2,2'-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH)-induced oxidation: Synergistic and antagonistic effects. **Journal of the American Oil Chemistry Society**, v. 80, n. 10, p. 1007–1012, 2003.
- PINO, A.P. *et al.* Volatile constituents of Malay rose apple [Syzygium malaccense (L.) Merr. & Perry]. **Flavour and Fragrance Journal**. v.19, p.32-35, 2004.
- PRASAD, S.; GUPTA, S. C.; TYAGI, A. K. Reactive oxygen species (ROS) and cancer: Role of antioxidative nutraceuticals. **Cancer Letters**, v.xx, p. 1-11, 2016.

PRATA, L. O. *et al.* ACE2 activator associated with physical exercise potentiates the reduction of pulmonary fibrosis. **Experimental Biology and Medicine**, v.242, n.1, p. 8-21, 2016.

RAGGI, P. *et al.* Role of inflammation in the pathogenesis of atherosclerosis and therapeutic interventions. **Atherosclerosis**, v. 276, n. x p. 98-108, 2018.

RAPOSO, H. F. Efeito dos ácidos graxos n-3 e n-6 na expressão de genes do metabolismo de lipídeos e risco de aterosclerose. **Revista de Nutrição**, v.3, p. 871-879, 2010.

REEVES, P.G.; NIELSEN, F. H.; FAHEY, G. C. AIN- 93 Purified diets for laboratory rodents: final report f the american institute of nutrition and hoe writing comitee on the reformulation of the American Institute of Nutrition AIN -76A rodent diet. **The Journal of Nutrition**, v.123, p.1939-1951, 1993.

REYNERTSON, K.A. *et al.* Quantitative analysis of antiradical phenolic constituents from fourteen edible Myrtaceae fruits. **Food Chemistry**, v.4, p. 883-890, 2008.

RIGO, R. S. *et al.* Renal Histopathological findings in dogs with visceral leishmaniasis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical São Paulo**, v 55, n.2, p.113-116, 2013.

RÍOS-HOYO, A. *et al.* Obesity, Metabolic Syndrome and Dietary Therapeutical Approaches with a special focus on nutraceuticals (polyphenols): A mini-review. **International jornal of Vitamin and Nutrition Research**, v. 84, n.3-4, p. 113-123, 2014.

ROMAIN, C. *et al.* Anti-Atherosclerotic Effect of a Polyphenol-Rich Ingredient, Oleactiv®, in a Hypercholesterolemia-Induced Golden Syrian Hamster Model. **Nutrients**, v. 10, n. 10, p. 1511, 2018.

ROSS, K. A.; BETA, T.; ARNTFIELD, S. D. A comparative study on the phenolic acids identified and quantified in dry beans using HPLC as affected by diferente extraction and hydrolysis methods. **Food Chemistry**, v. 113, p. 336-344, 2009.

RUAN, J. S. *et al.* Chronic palmitic acid-induced lipotoxicity correlates with defective trafficking of ATP sensitive potassium channels in pancreatic β cells. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 59, n. 1, p. 37–48, 2018.

SANDOVAL-GALLEGOS, E. M. *et al.* In Vitro Bioaccessibility and Effect of Mangifera indica (Ataulfo) Leaf Extract on Induced Dyslipidemia. **Journal of Medicinal Food**, v. 21, n. 1, p. 47-56, 2018.

SAFAEIAN, L. *et al.* The effects of hydroalcoholic extract of *Allium elburzense* Wendelbo bulb on dexamethasone-induced dyslipidemia, hyperglycemia, and oxidative stress in rats. **Research in Pharmaceutical Sciences**, v. 13, n. 1, p. 22–29, 2018.

SANTOS, I. B. *et al.* Supplementation with *Vitis vinifera* L. skin extract improves insulin resistance and prevents hepatic lipid accumulation and steatosis in high-fat diet-fed mice. **Nutrition Research**, v. 43, p. 69–81, 2017.

SANTOS, P. H. *et al.* Influence of temperature, concentration and shear rate on the rheological behavior of malay apple (*Syzygium malaccense*) juice. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 19, 2016.

SARIN, S. *et al.* Effects of preoperative statin on liver reperfusion injury in major hepatic resection: A pilot study. **Updates in Surgery**, v. 68, n. 2, p. 191-197, 2016.

SCALZO, J. *et al.* Plant genotype affects total antioxidant capacity and phenolic contents in fruit. **Nutrition**, v. 21, n. 2, p. 207–213, 2005.

SCHIASI, M. C. E. V. *et al.* Fruits from the Brazilian Cerrado region: Physico-chemical characterization, bioactive compounds, antioxidant activities, and sensory evaluation. **Food Chemistry**, v. 245, n. October 2017, p. 305–311, 2018.

SHAO, D. *et al.* Plasma and hepatic cholesterol-lowering effects of tomato pomace, tomato seed oil and defatted tomato seed in hamsters fed with high-fat diets. **Food Chemistry**, v. 139, p. 589-596, 2013.

SHIKAMA, Y. Free fatty acids may be involved in the pathogenesis of oral-related and cardiovascular diseases. **Journal of Oral Biosciences**, v. 60, n. 3, p. 65–69, 2018.

SIES, H. Physiological society symposium: impaired endothelial and smooth muscle cell function in oxidative stress. **Experimental Physiology**, v.82, p. 291-295, 1997.

SIQUEIRA, A. F. A.; ABDALLA, D. S. P.; FERREIRA, S. R. G. LDL: da Síndrome Metabólica à Instabilização da Placa Aterosclerótica. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia Metabólica**, v.50, p. 334-342, 2006.

SIROIS, M. **Medicina De Animais de Laboratório- Princípios e Procedimentos**. São Paulo: ROCA, p. 75-77, 2007.

SOBEH, M. *et al.* Phenolic compounds from *Syzygium jambos* (Myrtaceae) exhibit distinct antioxidant and hepatoprotective activities in vivo. **Journal of Functional Foods**, v. 41, p. 223-231, 2018.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. Atualização Da Diretriz Brasileira De Dislipidemias E Prevenção Da Aterosclerose. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 109, supl. 1, p. 1-4, 2017.

SUGIMOTO, T. *et al.* Lifestyle-related metabolic disorders, osteoporosis, and fracture risk in Asia: A systematic review. **Value in Health Regional Issues**, v. 9, n.x, p. 49-56. 2016.

TEIXEIRA, L. *et al.* Regular physical exercise training assists in preventing type 2 diabetes development: focus on its antioxidant and anti-inflammatory properties. **Cardiovascular Diabetology**, v. 10, 2012.

TERZO, S. *et al.* Pistachio Consumption Prevents and Improves Lipid Dysmetabolism by Reducing the Lipid Metabolizing Gene Expression in Diet-Induced Obese Mice. **Nutrients**, v. 10, n. 12, 2018.

VAN DIEPEN, J. A. *et al.* Interactions between inflammation and lipid metabolism: Relevance for efficacy of anti-inflammatory drugs in the treatment of atherosclerosis. **Atherosclerosis**, v. 228, n. 2, p. 306-315, 2013.

VENDRUSCOLO, G.S.; RATES, S.M.K.; MENTZ, L.A. Dados químicos e farmacológicos sobre as plantas utilizadas como medicinais pela comunidade do bairro Ponta Grossa, Porto Alegre, Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v.15, p. 361-372, 2005.

VILLAÑO, D. *et al.* Radical scavenging ability of polyphenolic compounds towards DPPH free radical. **Talanta**, v. 71, n. 1, p. 230–235, 2007.

WALLACE, T. C. Anthocyanins in Cardiovascular Disease. **Advances in Nutrition**, v. 2, n. 1, p. 1-7, 2011.

WANESE, A.; BAHLAS, S.; SHOHAIB, S. Al. Simvastatin-induced rhabdomyolysis and acute renal injury. **Blood Purification**, v. 26, n. 4, p. 394-398, 2008.

WANG, Z. *et al.* Gut microbiome and lipid metabolism: From associations to mechanisms. **Current Opinion in Lipidology**, v. 27, n. 3, p. 216–224, 2016.

WANNASIRI, S.; CHANSAKAOW, S.; SIREERATAWONG, S. Effects of Solanum torvum fruit water extract on hyperlipidemia and sex hormones in high-fat fed male rats. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 7, n. 5, p. 401–405, 2017.

WHITE, P. A. S. *et al.* Modelo de obesidade induzida por dieta hiperlipídica e associada à resistência à ação da insulina e intolerância à glicose. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 57, n. 5, p.339-345, 2013.

WHO. World Health Organization. WHO sites. News. All News releases. 2016. **Global Hearts Initiative**. Disponível em: http://www.who.int/cardiovascular_diseases/global-hearts/Global_hearts_initiative/en/ Acesso em 27/jul/2018.

WU, H. T. *et al.* Chemical characterization of lycium barbarum polysaccharides and its inhibition against liver oxidative injury of high-fat mice. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 46, n. 5, p. 540–543, 2010.

XAVIER, H. T. *et al.* V Diretriz Brasileira de Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose. **Arquivo Brasileiro de Cardiologia**, v. 101, n. 4, supl. 1, p. 1-20, 2013.

ZAMORA-ROS, R. *et al.* Dietary polyphenol intake in Europe: the european Prospective Investigation into Cancer and nutrition (EPIC) study. **European Journal of Nutrition**, v. 55, n.4, p. 1359-1375, 2015.

ZHANG, M. *et al.* HDL surface lipids mediate CETP binding as revealed by electron microscopy and molecular dynamics simulation. **Scientific Reports**, v. 5, n. 8741, p.8, 2015.

ZHANG, Q. *et al.* Effects of oral selenium and magnesium co-supplementation on lipid metabolism, antioxidative status, histopathological lesions, and related gene expression in rats fed a high-fat diet. **Lipids in Health and Disease**, v. 17, n. 1, p. 1–12, 2018.

ZHANG, Q. *et al.* Polydatin supplementation ameliorates diet-induced development of insulin resistance and hepatic steatosis in rats. **Molecular Medicine Reports**, v. 11, n. 1, p. 603–610, 2014.

APÊNDICE A – COMPROVAÇÃO DA DISLIPIDEMIA

Tabela 1 - Perfil lipídico (mg/dL) após o período de indução à dislipidemia nos animais dos grupos sadio e dislipidêmico

Parâmetros	Groups			
	HG		DG	
	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão
CT (mg/dL)	49,79	3,72	102,50 ^a	15,26
TG (mg/dL)	51,36	5,53	54,36	3,13
HDL (mg/dL)	18,89	2,67	12,93 ^a	2,30
LDL (mg/dL)	21,09	4,67	78,7 ^a	15,44
VLDL (mg/mL)	10,27	1,11	10,87	0,62

HG: Grupo Sadio; DG: Grupo Dislipidêmico; HDL: Lipoproteínas de Alta Densidade; LDL: Lipoproteínas de Baixa Densidade; CT: Colesterol Total; TG: Triglicerídeos; VLDL: Lipoproteínas de Muito Baixa Densidade. Letras minúsculas na mesma linha indicam uma diferença significativa entre as médias dos grupos (teste t, $p \leq 0,05$).

APÊNDICE B – OUTROS RESULTADOS

Tabela 1 - Composição de Ácidos Graxos nas fezes e no fígado dos animais sadios e dislipidêmicos suplementados ou não com MA.

Ácidos Graxos (AG) (g 100g ⁻¹)	Liver				Feces			
	HCG	HMA	DCG	DMA	HCG	HMA	DCG	DMA
Myristic acid C 14:0	0,94 ± 0,07	0,80 ± 0,06	0,56 ± 0,04	0,82 ± 0,06	0,94 ± 0,03	0,78 ± 0,15	0,52 ± 0,13	0,44 ± 0,00
Pentadecanoic acid C15:0	-	-	-	-	2,83 ± 0,01	2,39 ± 0,07	0,70 ± 0,01	0,74 ± 0,01
Palmitic acid C16:0	27,87 ± 0,18	24,13 ± 0,17	40,19 ± 0,00	40,21 ± 0,34	31,88 ± 0,04	29,93 ± 0,59	29,92 ± 0,93	29,15 ± 0,07
Stearic acid C18:0	8,82 ± 0,16	12,5 ± 0,31	4,25 ± 0,27	3,81 ± 0,01	23,47 ± 0,16	21,48 ± 0,23	46,87 ± 0,03	47,26 ± 0,13
Arachidic acid C20:0	-	-	-	-	2,61 ± 0,13	3,37 ± 0,07	1,45 ± 0,28	1,57 ± 0,34
Behenic acid C22:0	-	-	-	-	4,95 ± 0,07	5,45 ± 0,37	1,56 ± 0,29	1,13 ± 0,14
Lignoceric acid C24:0	-	-	-	-	9,83 ± 0,16	11,18 ± 0,18	1,38 ± 0,22	1,50 ± 0,32
Cerotic acid C26:0	-	-	-	-	2,83 ± 0,04	3,03 ± 0,16	-	-
AG Saturados	37,63	37,43	45	44,84	79,34	77,61	82,4	81,79
Palmitoleic acid C16:1 n7	8,52 ± 0,16	12,90 ± 0,15	4,8 ± 0,16	7,83 ± 0,38	-	-	-	-
Oleic acid C18:1 n9	22,14 ± 0,02	16,43 ± 0,62	22,58 ± 0,76	20,05 ± 0,89	12,18 ± 0,18	13,05 ± 0,21	12,39 ± 0,07	12,99 ± 0,39
AG Monoinsaturados	30,66	29,33	30,38	30,88	12,18	13,05	12,39	12,20
Elaidic acid C18:1 n9t	5,74 ± 0,13	4,51 ± 0,32	5,10 ± 0,16	5,88 ± 0,11	2,13 ± 0,04	1,80 ± 0,04	2,52 ± 0,14	2,56 ± 0,13
Linoleic acid C18:2 n6	15,16 ± 0,42	13,82 ± 1,18	17,4 ± 0,00	17,07 ± 0,42	6,44 ± 0,12	7,56 ± 0,40	2,71 ± 0,10	3,56 ± 0,28
Alpha-linolenic acid C18:3n3	0,45 ± 0,05	0,64 ± 0,11	0,66 ± 0,66	0,43 ± 0,10	-	-	-	-
Cis-Eicosatetraenoic acid C20:4n6	8,94 ± 0,19	12,46 ± 0,02	4,10 ± 0,04	3,45 ± 0,21	-	-	-	-
Eicosapentaenoic acid C20:5n3 (EPA)	-	-	-	-	-	-	-	-
Docosahexaenoic acid C22:6n3 (DHA)	1,42 ± 0,06	1,7 ± 0,10	0,38 ± 0,11	0,34 ± 0,13	-	-	-	-
AG Poliinsaturados	31,71	33,13	27,64	27,17	8,57	9,36	5,23	5,12

Média ± desvio padrão

HCG - Grupo Controle Sadio; HMA - Grupo Controle Sadio Suplementado com MA; DCG - Grupo Controle Dislipidêmico e DMA - Grupo Controle Dislipidêmico Suplementado com

APÊNDICE C – ARTIGO 01

**Malay apple (*Syzygium malaccense*) improves glycaemic response and lipid metabolism
in dyslipidaemic rats**

PERIÓDICO: Nutrients

ÁREA: Nutrição

QUALIS: A1

ISSN: 2072-6643

FATOR DE IMPACTO: 4.196 (2017) ; 5-Year Impact Factor: 4.603 (2017)

**Malay apple (*Syzygium malaccense*) improves glycaemic response and lipid metabolism
in dyslipidaemic rats**

Polyana Campos Nunes¹, Jailane de Souza Aquino², Fabrizia Kelly Sousa Barbosa², Ana Karina Caminha de Araújo Silva², Marcos dos Santos Lima³, Adriano Francisco Alves⁴, Angela Maria Tribuzy de Magalhães Cordeiro⁵, Maristela Alves Alcântara⁵, Bruno Ranieri Lins de Albuquerque Meireles⁶, Tânia Lúcia Montenegro Stamford^{1*}

¹ *Departamento de Nutrição, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 50670-91, Pernambuco, Brazil*

² *Departamento de Nutrição, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 58051-900, Paraíba, Brazil*

³ *Departamento de Tecnologia de Alimentos, Instituto Federal do Sertão de Pernambuco, Petrolina, 56.314-520, Pernambuco, Brazil*

⁴ *Departamento de Fisiologia e Patologia, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 58051-900, Paraíba, Brazil*

⁵ *Departamento de Tecnologia de Alimentos, Centro de Tecnologia e Desenvolvimento Regional, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 58051-900, Paraíba, Brazil*

⁶ *Departamento de Engenharia de Alimentos, Unidade Acadêmica de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Campina Grande, Pombal, 58840-000, Paraíba, Brazil*

* Correspondence to:

Tânia Lúcia Montenegro Stamford

Departamento de Nutrição, Laboratório de Experimentação e Análise de Alimentos

Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brazil

CEP:50670-901

Phone:55-81-21268470

Fax:55-81-21268473

Email:tlmstamford@yahoo.com.br

Abstract

This study aimed to investigate the interaction of Malay apple (MA) (*Syzygium malaccense*) phyto-constituents and nutrients with glycaemic response and lipid metabolism, considering the impact of plant metabolites and components on dyslipidaemia markers. Male Wistar rats were initially randomly divided into two groups constituting a Healthy Group and Dyslipidaemia Group for three weeks. Dyslipidaemia detection was then performed after this period, and rats were randomly divided into four groups: Healthy Control Group, Healthy Group Supplemented with MA, Dyslipidaemia Control Group and Dyslipidaemia Group supplemented with MA. The fruit was administrated (400 mg/kg body weight) via orogastric administration for three weeks after inducing dyslipidaemia. Rats supplemented with MA showed increased glucose tolerance and decreased serum lipids, hepatic enzymes, urea and creatinine levels. Supplementation with MA protected the liver from tissue damage induced by the dyslipidaemic diet and decreased liver cholesterol levels, as well as increased faecal fat, cholesterol and bile acids excretion. Dietary fibres and phenolic compounds may be associated with these positive effects. The present study shows that MA consumption is able to prevent and improve dyslipidaemic-related alterations.

Keywords: cholesterol, dyslipidaemic diet, fatty acids, fibre, fruits, phenolic compounds.

1. Introduction

Dyslipidaemia is defined as a number of lipid disorders and refers to unhealthy levels of one or more kinds of circulating lipids and lipoproteins. The basic categories of dyslipidaemia are characterised by: increased total cholesterol (TC), elevated low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C), low high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) and hypertriglyceridemia, which may or not occur simultaneously ^[1]. Despite decades of significant studies about lipid metabolism disorders, the prevalence of cardiovascular disease

(CVD) is still a public concern, leading to death worldwide, and projected to become the seventh leading cause of death in the world by the year 2030 ^[2].

The equilibrium of lipid metabolism is critically affected by the composition of the diet. Increased CVD is directly related to dietary and lifestyle choices, including exposure to tobacco smoke, weight management, physical activity, diet, blood cholesterol and blood glucose ^[3]. Excessive intake of saturated fat and cholesterol and low fibre and phytochemicals intake have been related to CVD, dyslipidaemia and other chronic disease risks; thus, dietary and natural compounds have recently received much attention for playing an important role in metabolism regulation and chronic disease prevention ^[4]. Furthermore, cholesterol metabolism and bile acid synthesis are two important regulatory processes involved in the lipidic balance and have received attention. Excessive cholesterol in the liver is metabolized to produce bile acids, which is the predominant pathway for eliminating excess cholesterol from the human body ^[1]. Animal models have been used to investigate the action of functional foods in preventing and controlling dyslipidaemia, as well as in the control of cholesterol and bile acid levels ^[5-9].

In this context, an increasing number of fruits and herbal medicines have been extensively studied as an alternative to pharmacological treatment and to reduce or control risk factors for dyslipidaemia and lipid metabolism disorders ^[4-6]. *Syzygium malaccense*, known as Malay Apple (MA), is a fruit belonging to the *Myrtaceae* family, originally from Malaysia and currently spread across different tropical regions around the world ^[12]. MA is poorly studied regarding its chemical characteristics and their functional effects. The scientific literature reports nutritional composition and antioxidant capacity *in vitro* ^[7-9]; however, the mechanisms underlying the metabolic effects of MA in dyslipidaemia have not yet been reported. Therefore, the aim of the present study was to evaluate the effects of MA

on glycaemia response and lipid metabolism on healthy rats and diet-induced dyslipidaemic rats.

2. Material and Methods

2.1 Acquisition and preparation of Malay apple

MA samples were obtained from a local market (CEASA - State Central Supply, Joao Pessoa, Brazil) and were grown in a nearby region (Latitude S 7° 15' 38" and Longitude W 34° 54' 30"). Fruits were selected in the mature stage, showing dark red peels, and separated from the seed. This study considered the edible part of the fruit (pulp + peel). Samples were frozen (-80 °C) and freeze-dried (-68 °C, vacuum pressure at 130 mmHg) for approximately 3 days in a bench L-101 lyophilizer (LIOTOP, São Carlos, São Paulo, Brazil). The obtained freeze-dried material was ground in a domestic blender, sieved through a 1.0-mm mesh and stored (-10 °C) in glass containers under light protection.

All characterization analyses were performed in triplicate. Total, Soluble and Insoluble Dietetic Fibre (TDF, SDF and IDF, respectively) were measured using the enzymatic-gravimetric method ^[10]. Organic acids, sugars, phenolic contents and ascorbic acid were determined by high-performance liquid chromatography (HPLC) under analytical conditions described elsewhere ^[11–13]. The MA bioactive compound characterization is shown in Table 1.

2.2 Animals, diets and experimental design

Thirty-two (32) male adult Wistar rats, approximately 60 days old, were maintained in collective cages with water and food *ad libitum* at 21 ± 1 °C, relative humidity in the range of 50-55% and alternating 12 h light-dark cycles. The experimental protocol used in this study was approved by an Ethics Committee in Animal Experimentation (Bioscience Center of Federal University of Pernambuco, Recife, Brazil) under protocol number

23076.013011/2017-47. All experiments were performed in agreement with the guidelines of Brazilian Society of Science in Laboratory Animals (SBCAL, Brazil).

Wistar rats were initially randomly divided into two groups: Healthy Group (HG, n=16), which was fed on an AIN 93M diet (Rhoister, Araçoiaba da Serra, Brasil) ^[14] containing soybean oil (4%) as lipid source; and Dyslipidaemic Group (DG, n=16), which was fed a dyslipidaemic diet (Rhoister, Araçoiaba da Serra, Brasil), containing 6% lard, 5% non-hydrolysed vegetable fat, 1% cholesterol as lipid source (Table S1). The fatty acid profile of both diets was determined by gas chromatography under the conditions described below in item 2.9 (Table S2).

The rats had undergone previous treatment by consuming these diets for three weeks. After this period, dyslipidaemia detection was performed through biochemical examination of the lipid profile (Table S3). Afterwards, rats were randomly divided into four groups: Healthy Control Group (HCG, n=8) and Healthy Group Supplemented with MA (HMA, n=8), both fed an AIN 93M diet *ad libitum* for three weeks; and Dyslipidaemic Control Group (DCG, n=8) and Dyslipidaemic group supplemented with MA (DMA, n=8), both fed a dyslipidaemic diet *ad libitum* for the same period.

MA was administered for three weeks via gavage to HMA and DMA groups at a dose of 400 mg/kg, diluted in 2 mL of physiological solution at 0.9% ^[15]. Animals from HCG and DCG groups received the same volume of saline solution at 0.9% during the same period. Body weight and food intake were assessed weekly. Total lipid intake was measured based on the composition of the diet consumed by the groups.

After the 6th week of treatment, the animals were submitted to 8 h of fasting and then they were intraperitoneally anesthetized with 1 mL of ketamine hydrochloride (75 mg) associated with 1 mL of xylazine hydrochloride (5 mg) for each kilogram of body weight of the animal, followed by euthanasia.

Euthanasia was performed by puncture in the left ventricle for blood collection in sterile tubes for centrifugation (5.8136 g/10 min.) and obtaining serum. Livers were removed, weighed, and separated into two parts. Hepatic right lobe was immediately frozen (-80 °C) for hepatic total lipids, cholesterol and fatty acids determination. Other liver samples were collected for histological analysis. Faeces were collected during the last 3 consecutive days of the feeding period and stored at -20°C for posterior analysis of total lipids, cholesterol, fatty acids and bile acids.

2.3 *Glucose and insulin tolerance tests*

Oral Glucose Tolerance Test (GTT) and oral Insulin Tolerance Test (ITT) tests were performed on the second-to-last and last days of the experiment, respectively.

The oral GTT was done by the oral administration of a glucose solution at 0.007 mL/g. On the day prior to euthanasia of the animals, blood samples were collected after an 8-h fast by an incision to the animal's tail to gauge the blood glucose in times of 0, 30, 60 and 90 min using the Accu Check Active[®] glucometer (Roche Diagnóstica Ltda.).

ITT was performed with animals fed normally by oral administration of 0.75 IU insulin/kg, diluted in sterile 0.9% saline, intraperitoneally. Blood samples were collected by an incision to the animal's tail to gauge the blood glucose in times of 0, 30, 60 and 90 min using a Accu Check Active[®] glucometer (Roche Diagnóstica Ltda.)^[16].

2.5 *Histopathological evaluation of the liver tissue and scores of hepatic steatosis*

Fragments of hepatic lobe were collected from each animal for histopathological evaluation. The parts were washed in saline solution (0.9% NaCl) and immersed in a formaldehyde fixing solution buffered at 10% for 48 h for processing according to the routine histological technique. Samples were dehydrated in an increasing ethanol series, clarified in

xylene, embedded in paraffin and sectioned in a microtome to obtain 5 µm-thick slices. The obtained slides were stained by the Hematoxylin-Eosin (H&E) and periodic acid-Schiff (PAS) techniques. They were subsequently submitted to analysis using an optical microscope (Motif BA 200) at 4x, 10x, 20x and 40x magnifications ^[17]. The morphological analysis of liver included an evaluation of degenerative processes by fatty degeneration and inflammatory parameters, including leukocyte migration, oedema, hyperaemia, haemorrhage, necrosis, preservation of liver parenchyma and the presence of microthrombi. A semi-quantitative analysis was performed by creating a score related to the distribution of the main lesion (i.e. hepatic steatosis) ranging from 0-3, where 0-1: animal with absence of the lesion; 1-2: discrete lesion distribution (light focal); 2-3: moderate distribution (pronounced focal to diffuse light); and 3-4: sharp (multifocal accentuated to diffuse accentuated) ^[18]. The slides were randomly performed by 2 pathologists.

2.6 Biochemical analysis

Serum concentrations of total cholesterol (TC), VLDL, LDL and HDL were measured using the Trinder enzymatic method and the accelerator selective detergent method using appropriate kits (Labtest, Minas Gerais, Brazil). Triglyceride (TG) levels were determined using the Trinder method with a Triglyceride Liquiform kit (Labtest, Minas Gerais, Brazil). All analyses followed the manufacturer's recommendation, and absorbance was determined using a LabMax 240 Premium automatic analyzer (Labtest, Minas Gerais, Brazil) at 505 nm (TG), 500 nm (TC) or 600 nm (HDL, LDL and VLDL)

Alanine Aminotransferase (ALT), Aspartate Aminotransferase (AST), creatinine, uric acid and urea levels were quantified in kinetic mode in serum using the ALT/GPT Liquiform and AST/GOT Liquiform commercial kits, respectively (Labtest, Minas Gerais, Brazil). Analyses followed the manufacturer's instructions and absorbance was obtained on a Labmax

240 premium automatic analyser (Labtest, Minas Gerais, Brazil) at 340 nm (AST and ALT), 510 nm (creatinine), 520 nm (uric acid), 600 nm (urea).

2.7 Hepatic total lipids and cholesterol contents

Extraction and quantification of total hepatic lipids were performed according to the method adapted for total lipids from animal tissues ^[19].

The cholesterol analyses of the liver were performed according to the methodology described by Bragagnolo and Rodriguez-Amaya ^[20] with the following steps: lipid extraction: saponification, extraction of the unsaponifiable fraction and injection of the lipid extract by liquid chromatography.

High-resolution liquid chromatography (HPLC) with a binary solvent system (Varian Waters 9010, California, USA) was used and coupled to a “Rheodyne” valve with a sample loop of 20 µL and an Inertsil C18 column (4 µm x 4.6 x 150 mm) for determining the cholesterol content in the samples. The mobile phase consisted of a mixture of acetonitrile and isopropanol (70:30). The detection of total cholesterol was performed in a diode array detector (Varian 330). Chromatographic separation was performed with a flow rate of 1.0 mL/min (40 atm pressure). Data processing was performed with Galaxie (Version 1.X) software.

2.8 Analysis of total lipids, cholesterol contents and bile acids in faeces

Total lipids and cholesterol concentrations in faeces were determined using the same method described for liver total lipids and cholesterol. Total faecal bile acids were determined by the spectrophotometric method ^[21] by measuring the absorbance at 690 nm (uv-vis spectrophotometer, DRWELL, DU-8200). Each sample had 50 mg distilled (1 mL) and homogenized. Then, 4 mL of methanol was added and the solution was mixed in an ultrasonic

oven for 1 h, stored at room temperature until the temperature decreased and then centrifuged at 489.13 *g* for 10 min. The supernatant (0.5 mL) was removed and mixed with ethanol (1.75 mL), 6% barium hydroxide (0.1 mL) and 10% zinc sulfate (0.05 mL). The sample was then centrifuged at 489.13 *g* for a further 10 min and the proteins and pigment in the precipitant were removed. A volume of supernatant (0.2 mL) was removed, placed in a glass tube, steam-dried, reconstituted with 0.1 mL of distilled water, 3.9 mL of a chloroform/methanol mixture (2:1) and Folch solution (0.88 mL), mixed thoroughly and left for stratification. The supernatant containing total bile acid (1.8 mL) was withdrawn into a 5 mL tube. The extraction procedure was repeated three times on the remaining solution, in which 1 mL of resultant supernatant was removed each time. Methanol (0.2 mL) was added to the combined volume of supernatant, bringing the total volume to 5 mL. Next, 0.5 mL of this mixture was steam-dried in a glass tube, after which 2 mL of phosphomolybdate acid reagent was added. The solution was then maintained at 80 °C in a water bath for 60 min, before being cooled in ice water for 5 min to terminate the reaction. Diluent (2 mL) was then added, the solution was mixed and the absorbance was determined.

2.9 Faecal and hepatic fatty acids composition

The extraction of faecal and hepatic lipids was based on the method described by Folch et al. ^[19] and the esterification was performed according to the methodology described by Hartman and Lago ^[22].

The profile of fatty acids was determined by a calibration curve with methyl ester standards using a Gas Chromatograph Mass Spectrometer GCMS-QP2010 (Shimadzu, Kyoto, Japan) equipped with a Durabound DB-23 column featuring 30 m x 0.25 mm x 0.25 µm. The temperature of the injector and the detector was set at 230 °C and the column temperature set at 90 °C. The elution gradient in the column was from 90 to 150 °C (10°C/min), from 150 to

200 °C (5 °C/min), and from 200 to 230 °C (3 °C/min) in a total time of 34 min. The carrier gas was helium. The chromatograms were registered in Galaxie Chromatography Data System software.

2.10 Statistical Analysis

Significant differences to data with a single factor for group were analyzed via one-way analysis of variance (ANOVA). Two-way ANOVA was used to find statistical differences between food and fat intake, insulin and glucose tests. When there was a difference between the obtained data, Tukey's *post hoc* test was performed at a significance level of 5% ($p \leq 0.05$). Results are expressed as the means and standard deviation. GraphPad Prism software version 7.0 (GraphPad Software Inc.) was used to perform the statistical analysis and graphic design.

3. Results

3.1 Malay apple Characterization

The main bioactive compounds present in Malay apple were evaluated in this study (Table 1). MA shows a greater amount of insoluble fibres (19.93 g/100g) than the soluble fibre content (5.10g/100g). The total number of phenolic compounds present in the fruit corresponds to 32.16 g/100 g, with anthocyanin being the majority class corresponding to more than 80% of the total amount identified and quantified, mainly being Cyanidin-3-O-glucoside, Cyanidin-3,5-O-glucoside and peonidin-3-O-glucoside, in this order.

3.2 Biometric Parameters, Food and Fat Intake

The dyslipidaemic diet or MA supplementation were able to influence the weight gain of the rats during the experiment ($p > 0.05$) (Figure 1A). Although dietary intake was similar

between the HG and DG groups during the dyslipidaemia induction period in the first three weeks of the study ($p > 0.05$) (Figure 1B), lipid consumption was higher in the DG group than in the HG group ($p \leq 0.05$) (Figure 1D). However, MA supplementation in dyslipidaemic rats (DMA) reduced food (Figure 1C) and lipid intake (Figure 1E) in the last two weeks of the experiment when compared to the other groups ($p \leq 0.05$).

3.3 *Glucose and insulin tolerance tests*

MA supplementation improved glucose and insulin sensitivity in healthy rats. However, improvement in glucose tolerance in dyslipidaemic animals (DMA) was only observed after 60 min (Figure 2A and 2B).

3.4 *Liver histopathology and histological scores of hepatic steatosis*

The livers of the HCG and HMA groups did not show changes (Figure 3A, 3B, 3E, 3F). However, the dyslipidaemic diet caused fat accumulation in the hepatocytes and hepatic steatosis (Figure 3C, 3D, 3G and 3H), and the steatosis degree was decreased in the mice supplemented with MA (DMA) ($p \leq 0.0001$) (Figure 4).

3.5 *Biochemical Analysis*

The animals in the DG group developed diet-related dyslipidaemia when compared to the HG group (Table S1). MA supplementation reduced TG and VLDL levels in healthy rats (HMA), and reduced levels of all lipid parameters (CT, HDL, TG, LDL and VLDL) in dyslipidaemic rats (DMA) ($p \leq 0.0001$) (Figure 5A, 5B, 5C, 5D and 5E).

Regarding hepatic enzymes, the dyslipidaemic diet consumption increased ALT levels, however MA supplementation reduced AST levels in both healthy (HMA) and dyslipidaemic (DMA) rats ($p \leq 0.0001$) (Figure 5F). MA supplementation reduced the urea

levels in HMA rats compared to their control ($p \leq 0.0001$) (Figure 5G), as well as creatinine levels increased by continued consumption of the dyslipidaemic diet in DMA rats ($p \leq 0.0001$) (Figure 5H), however similar levels of uric acid were measured in all evaluated groups ($p > 0.0001$) (Figure 5I).

3.6 Quantification of hepatic fat and cholesterol contents

The hepatic fat and hepatic cholesterol percentages were higher in the DCG compared to the HCG and HMA groups ($p \leq 0.0001$), once again indicating the diet's effectiveness in dyslipidaemia induction (Figure 6A and 6B).

MA supplementation did not reduce hepatic fat levels in either healthy (HCG vs HMA) or dyslipidaemic (DCG vs DMA) rats, but it was possible to observe a reduction in hepatic cholesterol storage in animals in the DMA group compared to the DCG group (Figure 6A and 6B).

3.7 Faecal fat, cholesterol and bile acids contents

MA resulted in increased excretion of total fat, cholesterol and bile acids present in faeces in both HMA and DMA groups ($p \leq 0.0001$) (Figure 7A, 7B and 7C).

3.8 Faecal and hepatic fatty acids composition

However, MA supplementation was not able to cause any difference in hepatic and faecal saturated, monounsaturated or polyunsaturated fatty acid levels and faecal polyunsaturated fatty acids levels (Figure 8A); nevertheless, the dyslipidaemic diet consumption caused changes in the profile of saturated and polyunsaturated fatty acids stored in the liver (Figure 8A and Table S4) ($p \leq 0.001$) and excreted in the faeces (Figure 8B and Table S4) ($p \leq 0.001$).

4. Discussion

The present study demonstrates that the consumption of Malay apple is able to promote improvements in metabolic alterations associated to the consumption of a dyslipidaemic diet, such as dyslipidaemia, hepatic steatosis, changes in fat, cholesterol, fatty acids and bile acids stored in the liver or excreted in the faeces of Wistar rats. These benefits may be associated with the bioactive compounds' profile, mainly fibres and phenolic compounds, which are mostly anthocyanins in MA. The phenolic compounds and fibres present in the fruit were related to improvement in the lipid profile in many of the evaluated aspects.

Previously-performed *in vitro* [8,9,23] and *in vivo* [24,25] studies have cited MA as a promising source of bioactive compounds and antioxidant activity, possibly being related to preventing and treating CVD and possessing potential hypoglycaemic action.

In the tested experimental conditions, the MA had no influence on the weight gain of the animals, but showed an influence on the decrease in diet and fat consumption in the last days of the experiment for the DMA group. Although the DCG and DMA groups presented a higher fat intake ($p \leq 0.0001$), they presented similar body weight gain to the HCG group ($p > 0.05$). This fact may be related to the fat contents present in the dyslipidaemic diet, which despite having a higher caloric value (Table S1), did not result in greater weight gain since increased lipid intake is also associated with the expression of intestinal peptides and appetite-related compounds such as peptide-1, glucagon [26], cholecystokinin, pancreatic polypeptide, YY peptide and oxymomodulin [27]. These results are also in agreement with studies that tested the influence of vegetal products rich in bioactive compounds and did not obtain a difference in the weight gain or in the diet consumption of rats [15,28].

The results of this study also demonstrated the influence of MA supplementation on glycaemic parameters, with better sensitivity to glucose and insulin of healthy rats. However, improvement in glucose tolerance in dyslipidaemic animals was only observed from the time of 60 min. It is noteworthy that MA is very much cited in the literature as a therapeutic option for diabetes because of its antihyperglycaemic potential ^[23–25,29]. There are several possible mechanisms that may explain its influence on glycaemic metabolism; for example, modulating the activity or gene expression of enzymes such as Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) and phosphatidate phosphohydrolase (PAP) ^[30], stimulating insulin secretion and β -cell proliferation ^[24,31] and improving hepatic glutathione concentration, or inhibiting intestinal α -glucosidase activities, pancreatic lipase and cholesterol esterase ^[25], all of which are related to bioactive plant principles. According to Jung et al. ^[25], MA alkaloid extracts showed antihyperglycemic action by inhibiting the α -glucosidase enzyme and glycogen phosphorylase enzyme activity in vitro and in vivo, as well as stimulated the rate of basal glucose uptake in rat adipocytes.

As demonstrated in previous studies ^[15,32–34], the histopathological samples from livers of rodents fed with high fat diets (mainly saturated and trans fats) presented increased fat deposits, and these changes were reduced in animals that received some dietary source rich in flavonoids or other phenolic compounds. The effects of hepatic protection are related to the presence and synergistic action of the phenolic compounds present which can attenuate hepatic steatosis, act in regulating antioxidant enzymes and decrease hepatic lipogenesis through the activation of hepatic cyclic adenosine 3',5'-monophosphate (cAMP)/protein kinase A/cAMP-responsive element binding protein pathway ^[35].

In the present study, MA ingestion was able to improve the lipid profile of the supplemented groups, especially in the DMA group. Improvement in the lipid profile in the HMA and DMA groups seems to be related to the presence of bioactive compounds and to the

fibre content present in the MA (Table 1). Dietary Fibres (DF) have great capacity for water retention, delay gastric emptying and are easily degraded by bacteria in the intestine, which can lead to different metabolic responses in the body ^[36]. In addition, DF helps increase faecal excretion of total fat and bile acids in faeces (data presented in this study and discussed below) and increased intestinal viscosity and interruption of the enterohepatic bile acid cycle ^[28].

Several studies have already proven the efficiency of DF in improving metabolic changes induced by diets. For example, improvement in body composition, serum metabolic levels and fatty acid profile ^[36], as well as reduced adiposity, in the main indicator levels of dyslipidaemia ^[37], and hepatic steatosis ^[38] in rats fed diets with high saturated and trans fats. These results were also found in previous studies which evaluated the influence of foods rich in bioactive compounds on dyslipidaemic animals, obtaining the reversal or improvement of changes in lipid profile through using supplementation sources of bioactive principles of plant origin ^[15,28,39,40].

It was also possible to observe improvement in renal function, with better levels of urea in the HMA group and creatinine in the DMA group. Improvement in the urea and creatinine renal markers seems to be associated to the presence of the antioxidant polyphenols which can inhibit the nephrotoxicity associated to oxidative stress in animal models ^[41,42].

An increase in the excretion of bile acids, cholesterol and total fat in the faeces of the HMA and DMA groups supplemented with MA was observed in this study. When there is an abundance of cholesterol, there is a decrease in cholesterol biosynthesis, an increase in cholesterol efflux for circulation, as well as the synthesis of bile salts and esterification ^[5,43].

Flavonoids present in the MA may be related to increased faecal cholesterol excretion and decreased plasma and hepatic cholesterol levels by suppressing the activities of hepatic 3-

hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A (HMG-CoA) reductase and acyl CoA: cholesterol acyltransferase (ACAT) ^[24].

The composition of fatty acids in the diet is also very related to the development of cardiovascular diseases and metabolic disorders, since these are structural components of biological membranes and an energy source for the living organism, playing an important role in regulating physiological processes such as inflammation, glycemic control, lipid metabolism and oxidative stress ^[44]. In addition to the negative effects of the dyslipidaemic diet on plasma and tissue levels of fat and cholesterol in the present study, there was also a significant influence on the composition of fatty acids in the livers and faeces of rats. The dyslipidaemic diet negatively affected the n-6/n-3 PUFA rate in the liver, as it decreased the percentages of both n-6 (10.79%) and n-3 (55.61%), while increasing the SFA levels (19.85%) between HCG and DCG (Table S4). Decreased PUFAs in the liver and circulation are related to decreased levels of high density lipoprotein, while increased SFA is related to the increase of low density lipoprotein and cholesterol, increasing the risk of CVD ^[44–46].

The major SFA stored in the liver and excreted in the faeces of the healthy animals was palmitic acid (C16:0), but stearic acid appeared in greater quantity in the dyslipidaemic animals (Tables S2, S4). Excess palmitic acid may be related to fatty acid lipotoxicity in pancreatic β cells, contributing to apoptosis cells and alteration in ATP-sensitive potassium channels (KATP) which serve as glucose sensors and effectively initiate glucose-stimulated insulin secretion ^[47]. In relation to the excess of stearic acid in dyslipidaemic rats, no results were found in published literature which indicate a motivation for this occurrence. Although supplementation with MA was not able to influence the total SFA, MUFA and PUFA percentages, this supplementation caused changes in the percentage of some fatty acids in both healthy and dyslipidaemic rats (DMA), such as a reduction in the palmitoleic and oleic acid percentages in the liver and the increased excretion of linoleic acid in faeces. Studies

have shown that these fatty acids promote a cardioprotective effect involving a minor inflammatory process, arrhythmia prevention, vasodilation and control of blood lipid levels [48].

Regular MA consumption in healthy (HMA) or dyslipidaemic (DMA) rats was able to improve several parameters related to glucose and lipid metabolism, as well as biochemical markers of hepatic and renal function, suggesting that translational studies with the healthy population and having dyslipidaemia are performed from the amount of MA given to the rats, which is equivalent to 3.64 g for human consumption [49].

5. Conclusion

In conclusion, our results suggest that Malay Apple may be useful to prevent and improve metabolic disorders such as adiposity, hepatic steatosis, insulin resistance and hyperlipidaemia in rats. In addition, the study extends previous findings by reporting Malay Apple's composition and its potential positive effects on metabolism.

Acknowledgments: The authors are grateful for the scholarship granted by the *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico* (National Council for Scientific and Technological Development) – *CNPq* to P.C. Nunes.

Author Contributions: P.C.N., T.L.M.S. and J.S.A. conceived the study, performed literature searches, wrote the manuscript and reviewed the final draft; P.C.N., F.K.S.B., A.K.C.A.S, and A.F.A., performed the biological assays; M.S.L., A.M.T.M., M.A.A., B.R.L.A.M., performed the chromatographic analyses.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest.

Figures and tables

Table 1. Bioactive Compounds quantified in Malay Apple (*Syzygium malaccense*)

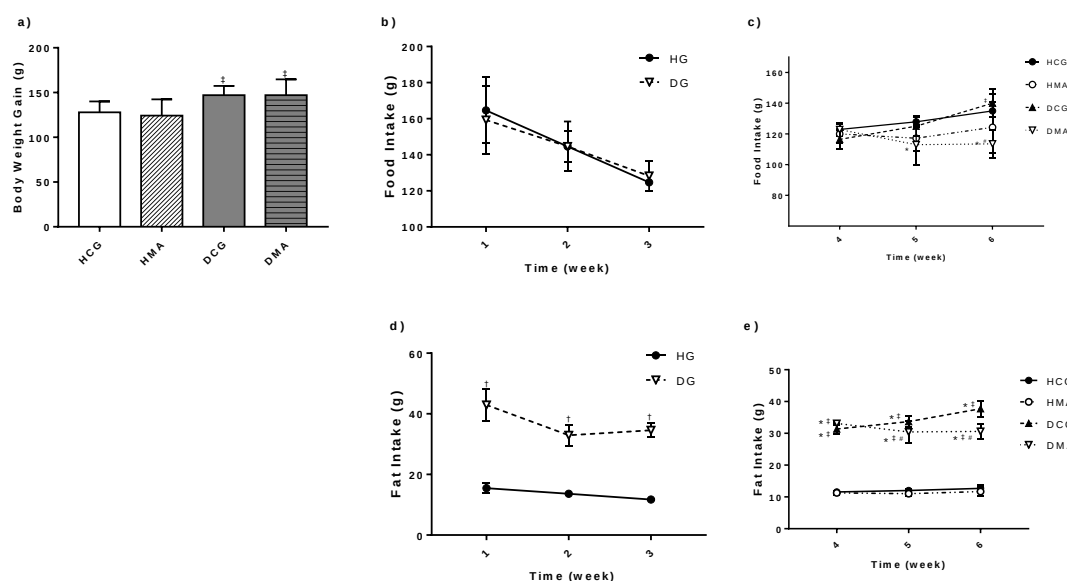
Compounds	<i>Syzygium malaccense</i>
Dietary Fiber (g 100 g ⁻¹)	
IDF	19,93 ± 0,02
SDF	5,10 ± 0,01
TDF	25,03 ± 0,53

IDF/SDF ratio	3,90
Simple Sugars (g 100 g⁻¹)	
Fructose	0,49 ± 0,01
Glucose	0,45 ± 0,01
Maltose	0,02 ± 0,00
Ascorbic Acid (mg 100g⁻¹)	Tr < 1,00 *
Organic Acids (g 100 g⁻¹)	
Citric	0,03 ± 0,00
Tartaric	0,90 ± 0,02
Malic	0,98 ± 0,01
Succinic	0,38 ± 0,01
Formic	0,05 ± 0,00
Acetic	0,16 ± 0,19
Phenolic Compounds (mg 100 g⁻¹)	
Flavanones	
Naringenin	0,09 ± 0,01
Flavanols and Procyanidins	
Catechin	2,55 ± 0,33
Epigallocatechin gallate	0,57 ± 0,04
Procyanidin B1	0,12 ± 0,02
Procyanidin B2	0,34 ± 0,10
Flavones	
Rutin	0,05 ± 0,04
Flavonols	
Quercitin 3-Glucoside	0,23 ± 0,08
Stilbenes	
Cis-Resveratrol	0,25 ± 0,14
Phenolic Acids	
Gallic Acid	1,07 ± 0,20
Caftaric acid	0,30 ± 0,01
Anthocyanins	
Cyanidin 3,5-diglucoside	3,32 ± 0,43
Cyanidin 3-glucoside	23,01 ± 4,60
Peonidin 3-glucoside	0,26 ± 0,09
Total phenolic compounds	32,16 ± 3,09

mean ± standard deviation

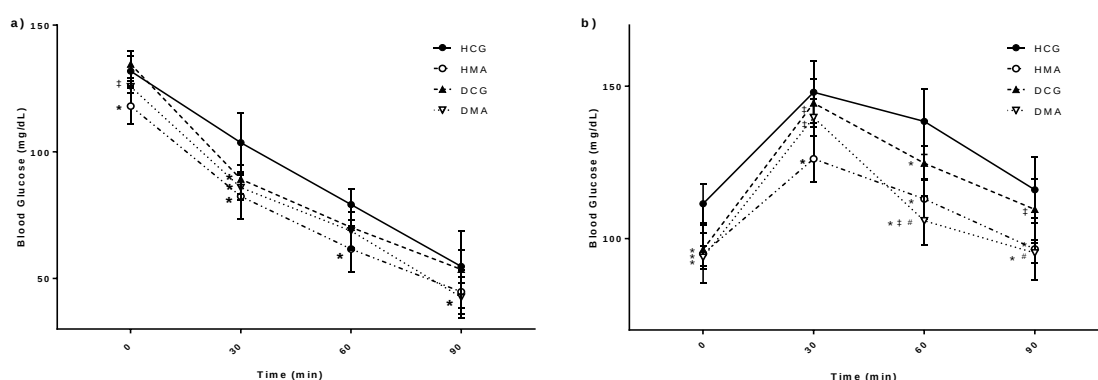
IDF: Insoluble Dietary Fiber; SDF: Soluble Dietary Fibre; TDF: Total Dietary Fibre.

Figure 1. *Body Weight Gain, Food and Fat Intake*



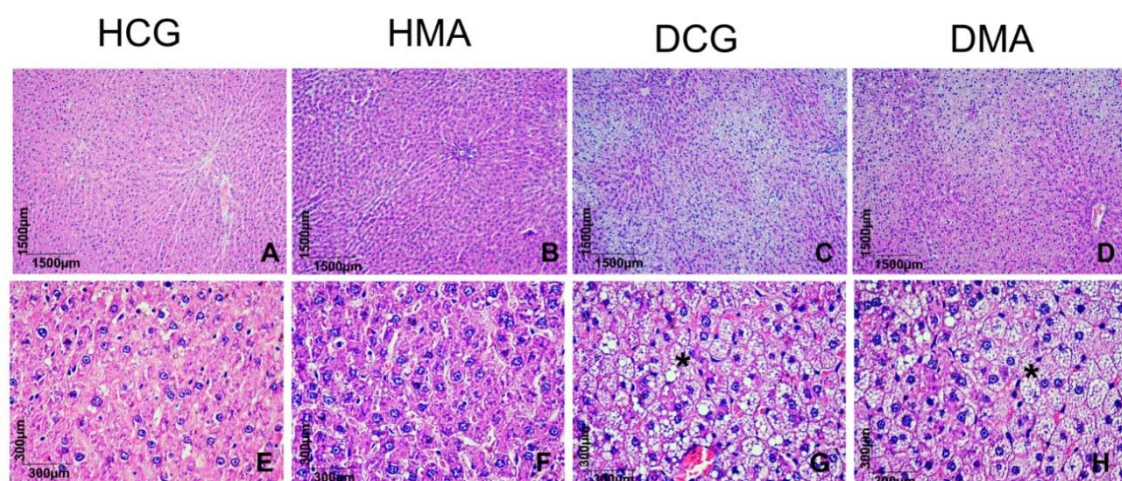
Food Intake and Fat Intake (b), (c), (d), (e) of Healthy Group (HG), Dyslipidemic Group (DG), Healthy Control Group (HCG), Healthy Group Supplemented with Malay Apple (HMA), Dyslipidemic Control Group (DCG) and Dyslipidemic Group Supplemented with Malay Apple (DMA). Values are means, with standard deviation (two-way ANOVA, $p \leq 0.05$, Tukey's post hoc test). Body Weight Gain (a) of HCG, HMA, DCG, DMA. Values are means, with standard deviation (one-way ANOVA, $p \leq 0.05$, Tukey's post hoc test). †Significant difference compared with HG group; *Significant difference compared with HCG group; ‡Significant difference compared with HMA group; #Significant difference compared with DCG group.

Figure 2. Glucose and Insulin Tolerance Tests



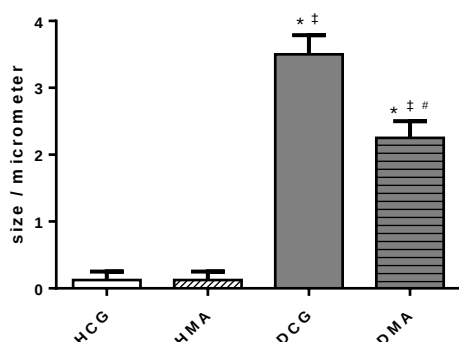
Insulin (a) and Glucose (b) Tolerance Tests performed in the Healthy Control Group (HCG), Healthy Group Supplemented with Malay Apple (HMA), Dyslipidemic Control Group (DCG) and Dyslipidemic Group Supplemented with Malay Apple (DMA). Values are means, with standard deviation (two-way ANOVA, $p \leq 0.05$, Tukey's post hoc test). *Significant difference compared with HCG group; ‡Significant difference compared with HMA group; #Significant difference compared with DCG group.

Figure 3. Histopathology of Liver



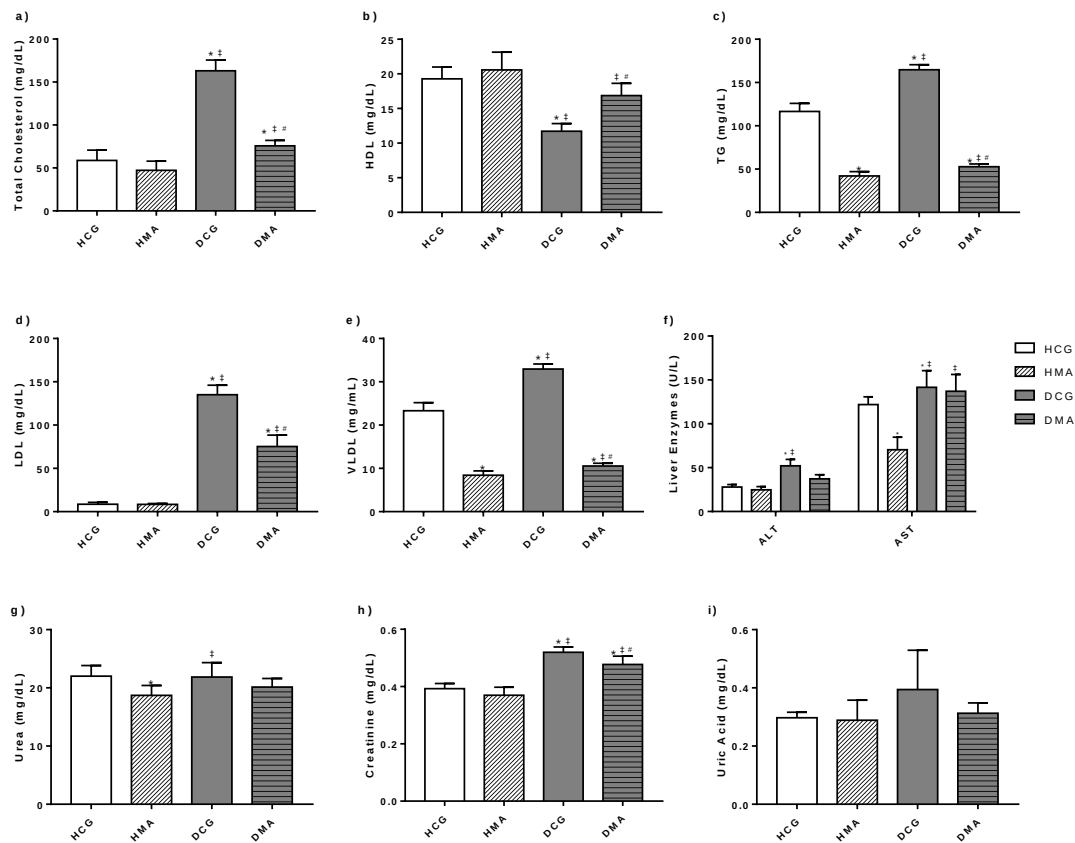
Hematoxylin-eosin staining (H&E) for hepatic histological analysis of groups: Healthy Control Group (HCG) (A, E), Healthy Group Supplemented with Malay Apple (HMA) (B, F), Dyslipidemic Control Group (DCG) (C, G) and Dyslipidemic Group Supplemented with Malay Apple (DMA) (D, H). Asterisk = hepatic steatosis.

Figure 4. *Histological scores of Hepatic Steatosis*



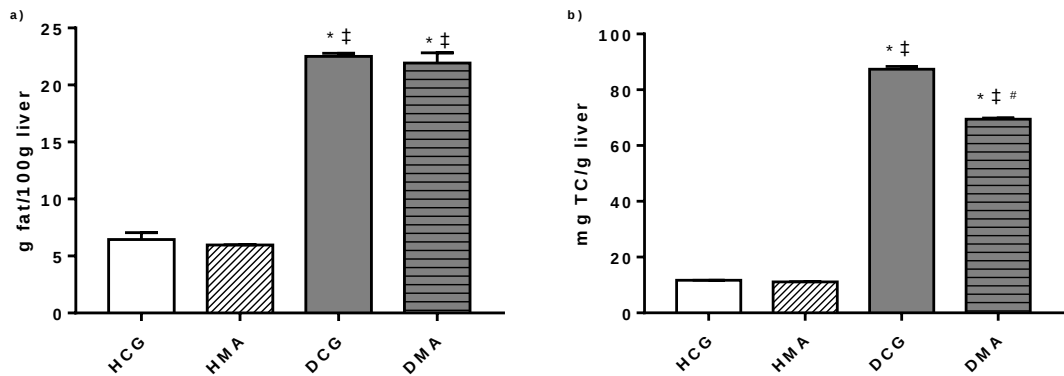
Histological scores of hepatic steatosis of Healthy Control Group (HCG), Healthy Group Supplemented with Malay Apple (HMA), Dyslipidemic Control Group (DCG) and Dyslipidemic Group Supplemented with Malay Apple (DMA). Values are means, with standard deviation (one-way ANOVA, $p \leq 0.05$, Tukey's post hoc test). *Significant difference compared with HCG group; †Significant difference compared with HMA group; #Significant difference compared with DCG group.

Figure 5. *Biochemical Analysis*



Total Cholesterol (a), High-Density Lipoprotein (b), Triglyceride (c), Low-Density Lipoprotein (d), Very-Low-Density Lipoprotein (e), Hepatic enzymes (f), Urea (g), Creatinine (h) and Uric Acid (i) of Healthy Control Group (HCG), Healthy Group Supplemented with Malay Apple (HMA), Dyslipidemic Control Group (DCG) and Dyslipidemic Group Supplemented with Malay Apple (DMA). Values are means, with standard deviation (one-way ANOVA, $p \leq 0.05$, Tukey's post hoc test). *Significant difference compared with HCG group; †Significant difference compared with HMA group; ‡Significant difference compared with DCG group.

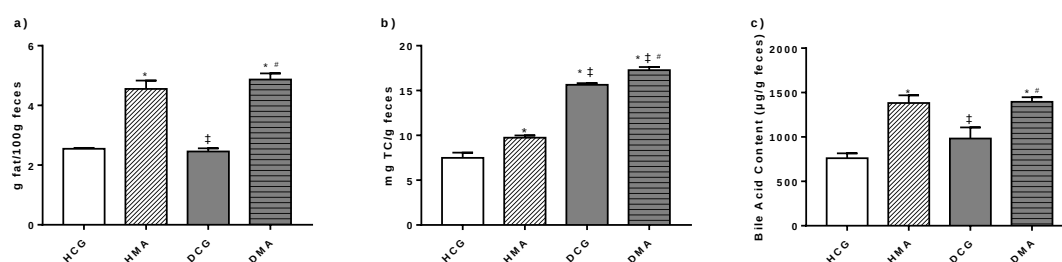
Figure 6. Quantification of Hepatic Fat and Cholesterol Contents



Percentage of hepatic fat (a) and hepatic cholesterol content (b) of Healthy Control Group (HCG), Healthy Group Supplemented with Malay Apple (HMA), Dyslipidemic Control Group (DCG)

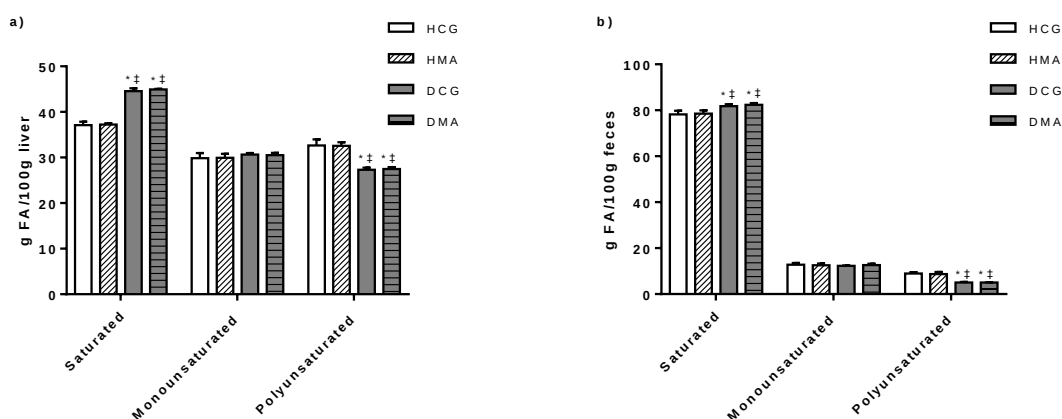
and Dyslipidemic Group Supplemented with Malay Apple (DMA). Values are means, with standard deviation (one-way ANOVA, $p \leq 0.05$, Tukey's post hoc test). *Significant difference compared with HCG group; ‡Significant difference compared with HMA group; #Significant difference compared with DCG group.

Figure 7. Fecal Fat, Cholesterol and Bile Acids Contents



Percentage of fecal fat (a), fecal cholesterol (b) and bile acids contents (c) of Healthy Control Group (HCG), Healthy Group Supplemented with Malay Apple (HMA), Dyslipidemic Control Group (DCG) and Dyslipidemic Group Supplemented with Malay Apple (DMA). Values are means, with standard deviation (one-way ANOVA, $p \leq 0.05$, Tukey's post hoc test). *Significant difference compared with HCG group; ‡Significant difference compared with HMA group; #Significant difference compared with DCG group.

Figure 8. Fecal and hepatic fatty acids composition



Saturated, Monounsaturated and Polyunsaturated hepatic (a) and fecal (b) fatty acids of Healthy Control Group (HCG), Healthy Group Supplemented with Malay Apple (HMA), Dyslipidemic Control Group (DCG) and Dyslipidemic Group Supplemented with Malay Apple (DMA). Values are means, with standard deviation (two-way ANOVA, $p \leq 0.05$, Tukey's post hoc test). *Significant difference compared with HCG group; ‡Significant difference compared with HMA group; #Significant difference compared with DCG group.

References

- (1) Castro Cabezas, M.; Burggraaf, B.; Klop, B. Dyslipidemias in Clinical Practice. *Clin.*

- Chim. Acta* **2018**, 487 (May), 117–125. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2018.09.010>.
- (2) Mathers, C. D.; Loncar, D. Projections of Global Mortality and Burden of Disease from 2002 to 2030. *PLoS Med.* **2006**, 3 (11), 2011–2030.
<https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0030442>.
 - (3) Reamy, B. V.; Williams, P. M.; Kuckel, D. P. Prevention of Cardiovascular Disease. *Prim. Care - Clin. Off. Pract.* **2018**, 45 (1), 25–44.
<https://doi.org/10.1016/j.pop.2017.11.003>.
 - (4) Poli, A.; Barbagallo, C. M.; Cicero, A. F. G.; Corsini, A.; Manzato, E.; Trimarco, B.; Bernini, F.; Visioli, F.; Bianchi, A.; Canzone, G.; et al. Nutraceuticals and Functional Foods for the Control of Plasma Cholesterol Levels. An Intersociety Position Paper. *Pharmacol. Res.* **2018**, 134 (May), 51–60. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2018.05.015>.
 - (5) Fiorucci, S.; Cipriani, S.; Baldelli, F.; Mencarelli, A. Bile Acid-Activated Receptors in the Treatment of Dyslipidemia and Related Disorders. *Prog. Lipid Res.* **2010**, 49 (2), 171–185. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2009.11.001>.
 - (6) Mohamed, S. Functional Foods against Metabolic Syndrome (Obesity, Diabetes, Hypertension and Dyslipidemia) and Cardiovascular Disease. *Trends Food Sci. Technol.* **2014**, 35 (2), 114–128. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2013.11.001>.
 - (7) Nunes, P. C.; De Souza Aquino, J.; Rockenbach, I. I.; Stamford, T. L. M. Physico-Chemical Characterization, Bioactive Compounds and Antioxidant Activity of Malay Apple [*Syzygium Malaccense* (L.) Merr. & L.M. Perry]. *PLoS One* **2016**, 11 (6), 1–11.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0158134>.
 - (8) Marques Peixoto, F.; Fernandes, I.; Gouvêa, A. C. M. S.; Santiago, M. C. P. A.; Galhardo Borguini, R.; Mateus, N.; Freitas, V.; Godoy, R. L. O.; Ferreira, I. M. P. L. V. O. Simulation of in Vitro Digestion Coupled to Gastric and Intestinal Transport Models to Estimate Absorption of Anthocyanins from Peel Powder of Jabuticaba,

- Jamelão and Jambo Fruits. *J. Funct. Foods* **2016**, *24*, 373–381.
<https://doi.org/10.1016/j.jff.2016.04.021>.
- (9) Batista, Â. G.; da Silva, J. K.; Betim Cazarin, C. B.; Biasoto, A. C. T.; Sawaya, A. C. H. F.; Prado, M. A.; Maróstica Júnior, M. R. Red-Jambo (*Syzygium Malaccense*): Bioactive Compounds in Fruits and Leaves. *LWT - Food Sci. Technol.* **2017**, *76*, 284–291. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.05.013>.
- (10) Prosky, L.; Asp, N. G.; Schweizer, T. F.; DeVries, J. W.; Furda, I.; Lee, S. C. Determination of Soluble Dietary Fiber in Foods and Food Products: Collaborative Study. *J. AOAC Int.* **1992**, *77* (3), 690–694.
- (11) Duarte, F. N. D.; Rodrigues, J. B.; da Costa Lima, M.; Lima, M. dos S.; Pacheco, M. T. B.; Pintado, M. M. E.; de Souza Aquino, J.; de Souza, E. L. Potential Prebiotic Properties of Cashew Apple (*Anacardium Occidentale* L.) Agro-Industrial Byproduct on *Lactobacillus* Species. *J. Sci. Food Agric.* **2017**, *97* (11), 3712–3719.
<https://doi.org/10.1002/jsfa.8232>.
- (12) Padilha, C. V. da S.; Miskinis, G. A.; de Souza, M. E. A. O.; Pereira, G. E.; de Oliveira, D.; Bordinon-Luiz, M. T.; Lima, M. dos S. Rapid Determination of Flavonoids and Phenolic Acids in Grape Juices and Wines by RP-HPLC/DAD: Method Validation and Characterization of Commercial Products of the New Brazilian Varieties of Grape. *Food Chem.* **2017**, *228*, 106–115.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.01.137>.
- (13) Arakawa, Nobuhiko; Otsuka, Megumi; Kurata, Tadao; Inagaki, C. Separative Determination of Ascorbic Acid and Erythorbic Acid by High-Performance Liquid Chromatography. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* **1981**, *27*, 1–7. <https://doi.org/10.1360/zd-2013-43-6-1064>.
- (14) Reeves, P. G.; Nielsen, F. H.; Fahey, G. C. AIN-93 Purified Diets for Laboratory

- Rodents: Final Report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the Reformulation of the AIN-76A Rodent Diet. *J. Nutr.* **1993**, 123 (11), 1939–1951. <https://doi.org/10.1093/jn/123.11.1939>.
- (15) Batista, K. S.; Alves, A. F.; Lima, M. D. S.; Da Silva, L. A.; Lins, P. P.; De Sousa Gomes, J. A.; Silva, A. S.; Toscano, L. T.; De Albuquerque Meireles, B. R. L.; De Magalhães Cordeiro, A. M. T.; et al. Beneficial Effects of Consumption of Acerola, Cashew or Guava Processing by-Products on Intestinal Health and Lipid Metabolism in Dyslipidaemic Female Wistar Rats. *Br. J. Nutr.* **2018**, 119 (1), 30–41. <https://doi.org/10.1017/S0007114517003282>.
- (16) Gomes Natal, D. I.; de Castro Moreira, M. E.; Soares Milião, M.; dos Anjos Benjamin, L.; de Souza Dantas, M. I.; Machado Rocha Ribeiro, S.; Stampini Duarte Martino, H. Ubá Mango Juices Intake Decreases Adiposity and Inflammation in High-Fat Diet-Induced Obese Wistar Rats. *Nutrition* **2016**, 32 (9), 1011–1018. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2016.02.008>.
- (17) Kazemi, S.; Mousavi Kani, S. N.; Ghasemi-Kasman, M.; Aghapour, F.; Khorasani, H.; Moghadamnia, A. A. Nonylphenol Induces Liver Toxicity and Oxidative Stress in Rat. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2016**, 479 (1), 17–21. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.08.164>.
- (18) Pinheiro, R. O.; Lins, P. P.; de Carvalho, J. L. P.; de Araújo, E. V.; Alves, A. F.; Pereira, R. de A.; Toscano, L. T.; Silva, A. S.; de Souza, E. L.; Alves, J. L. de B.; Aquino, J. de S. Maternal Dyslipidaemic Diet Induces Sex-Specific Alterations in Intestinal Function and Lipid Metabolism in Rat Offspring. *Br. J. Nutr.* **2019**, *In Press*.
- (19) Folch, J.; Lees, M.; Sloane Stanley, G. H. A Simple Method for the Isolation and Purification of Total Lipides from Animal Tissues. *J. Biol. Chem.* **1957**, 497–509. <https://doi.org/10.1007/s10858-011-9570-9>.

- (20) Bragagnolo, N.; Rodriguez-Amaya, D. Otimização Da Determinação de Colesterol Por Clae e Teores de Colesterol, Lipídios Totais e Ácidos Graxos Em Camarão Rosa (*Penaeus Brasiliensis*). *Ciência e Tecnol. Aliment.* **1997**, *17* (3), 275–280.
<https://doi.org/10.1590/S0101-20611997000300016>.
- (21) Huang, X.; Tang, J.; Zhou, Q.; Lu, H.; Wu, Y.; Wu, W. Polysaccharide from Fuzi (FPS) Prevents Hypercholesterolemia in Rats. *Lipids Health Dis.* **2010**, *9*, 1–7.
<https://doi.org/10.1186/1476-511X-9-9>.
- (22) Hartman, L.; Lago, R. C. Rapid Preparation of Fatty Acid Methyl Esters from Lipids. *Lab. Pract.* **1973**, *22* (6), 475–6 passim.
- (23) Arumugam, B.; Manaharan, T.; Heng, C. K.; Kuppusamy, U. R.; Palanisamy, U. D. Antioxidant and Antiglycemic Potentials of a Standardized Extract of *Syzygium Malaccense*. *LWT - Food Sci. Technol.* **2014**, *59* (2P1), 707–712.
<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.06.041>.
- (24) Ojiako, O. A.; Chikezie, P. C.; Ogbuji, A. C. Blood Glucose Level and Lipid Profile of Alloxan-Induced Hyperglycemic Rats Treated with Single and Combinatorial Herbal Formulations. *J. Tradit. Complement. Med.* **2016**, *6* (2), 184–192.
<https://doi.org/10.1016/j.jtcme.2014.12.005>.
- (25) Jung, M.; Park, M.; Lee, H.; Kang, Y.-H.; Kang, E.; Kim, S. Antidiabetic Agents from Medicinal Plants. *Curr. Med. Chem.* **2006**, *13* (10), 1203–1218.
<https://doi.org/10.2174/092986706776360860>.
- (26) Affane, F.; Louala, S.; el Imane Harrat, N.; Bensalah, F.; Chekkal, H.; Allaoui, A.; Lamri-Senhadji, M. Hypolipidemic, Antioxidant and Antiatherogenic Property of Sardine by-Products Proteins in High-Fat Diet Induced Obese Rats. *Life Sci.* **2018**, *199* (March), 16–22. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2018.03.001>.
- (27) Duca, F. A.; Zhong, L.; Covasa, M. Reduced CCK Signaling in Obese-Prone Rats Fed

- a High Fat Diet. *Horm. Behav.* **2013**, 64 (5), 1–6.
<https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2013.09.004>.
- (28) Shao, D.; Bartley, G. E.; Yokoyama, W.; Pan, Z.; Zhang, H.; Zhang, A. Plasma and Hepatic Cholesterol-Lowering Effects of Tomato Pomace, Tomato Seed Oil and Defatted Tomato Seed in Hamsters Fed with High-Fat Diets. *Food Chem.* **2013**, 139 (1–4), 589–596. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.01.043>.
- (29) Arumugam, B.; Palanisamy, U. D.; Chua, K. H.; Kuppusamy, U. R. Potential Antihyperglycaemic Effect of Myricetin Derivatives from *Syzygium Malaccense*. *J. Funct. Foods* **2016**, 22, 325–336. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2016.01.038>.
- (30) Kwon, E. Y.; Lee, J.; Kim, Y. J.; Do, A.; Choi, J. Y.; Cho, S. J.; Jung, U. J.; Lee, M. K.; Park, Y. B.; Choi, M. S. Seabuckthorn Leaves Extract and Flavonoid Glycosides Extract from Seabuckthorn Leaves Ameliorates Adiposity, Hepatic Steatosis, Insulin Resistance, and Inflammation in Diet-Induced Obesity. *Nutrients* **2017**, 9 (6), 1–14. <https://doi.org/10.3390/nu9060569>.
- (31) Jadhav, R.; Puchchakayala, G. Hypoglycemic and Antidiabetic Activity of Flavonoids: Boswellic Acid, Ellagic Acid, Quercetin, Rutin on Streptozotocin-Nicotinamide Induced Type 2 Diabetic Rats. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* **2012**, 4 (2), 251–256. <https://doi.org/10.1002/jwmg.744>.
- (32) Bezerra, M. L. R.; de Souza, E. L.; de Sousa, J. M. B.; Lima, M. dos S.; Alves, A. F.; Almeida, M. das G.; Coutinho Alves, R.; Veríssimo de Araújo, E.; Soares, N. L.; da Silva, G. A.; et al. Effects of Honey from *Mimosa Quadrivalvis* L. (Malícia) Produced by the *Melipona Subnitida* D. (Jandaíra) Stingless Bee on Dyslipidaemic Rats. *Food Funct.* **2018**, 9 (8), 4480–4492. <https://doi.org/10.1039/C8FO01044G>.
- (33) Amato, A.; Caldara, G. F.; Nuzzo, D.; Baldassano, S.; Picone, P.; Rizzo, M.; Mulè, F.; Di Carlo, M. NAFLD and Atherosclerosis Are Prevented by a Natural Dietary

- Supplement Containing Curcumin, Silymarin, Guggul, Chlorogenic Acid and Inulin in Mice Fed a High-Fat Diet. *Nutrients* **2017**, 9 (5). <https://doi.org/10.3390/nu9050492>.
- (34) Santos, I. B.; de Bem, G. F.; Cordeiro, V. S. C.; da Costa, C. A.; de Carvalho, L. C. R. M.; da Rocha, A. P. M.; da Costa, G. F.; Ognibene, D. T.; de Moura, R. S.; Resende, A. C. Supplementation with *Vitis Vinifera* L. Skin Extract Improves Insulin Resistance and Prevents Hepatic Lipid Accumulation and Steatosis in High-Fat Diet-fed Mice. *Nutr. Res.* **2017**, 43, 69–81. <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2017.05.007>.
- (35) Wang, Z.; Koonen, D.; Hofker, M.; Fu, J. Gut Microbiome and Lipid Metabolism: From Associations to Mechanisms. *Curr. Opin. Lipidol.* **2016**, 27 (3), 216–224. <https://doi.org/10.1097/MOL.0000000000000308>.
- (36) Dai, B.; Huang, S.; Deng, Y. Modified Insoluble Dietary Fibers in Okara Affect Body Composition, Serum Metabolic Properties, and Fatty Acid Profiles in Mice Fed High-Fat Diets: An NMR Investigation. *Food Res. Int.* **2018**, No. May. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.10.011>.
- (37) Adam, C. L.; Thomson, L. M.; Williams, P. A.; Ross, A. W. Soluble Fermentable Dietary Fibre (Pectin) Decreases Caloric Intake, Adiposity and Lipidaemia in High-Fat Diet-Induced Obese Rats. *PLoS One* **2015**, 10 (10), 1–14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0140392>.
- (38) Brockman, D. A.; Chen, X.; Gallaher, D. D. High-Viscosity Dietary Fibers Reduce Adiposity and Decrease Hepatic Steatosis in Rats Fed a High-Fat Diet. *J. Nutr.* **2014**, 144 (9), 1415–1422. <https://doi.org/10.3945/jn.114.191577>.
- (39) Romain, C.; Piemontese, A.; Battista, S.; Bernini, F.; Ossoli, A.; Strazzella, A.; Gaillet, S.; Rouanet, J.-M.; Cases, J.; Zanotti, I. Anti-Atherosclerotic Effect of a Polyphenol-Rich Ingredient, Oleactiv®, in a Hypercholesterolemia-Induced Golden Syrian Hamster Model. *Nutrients* **2018**, 10 (10), 1511. <https://doi.org/10.3390/nu10101511>.

- (40) Terzo, S.; Caldara, G.; Ferrantelli, V.; Puleio, R.; Cassata, G.; Mulè, F.; Amato, A. Pistachio Consumption Prevents and Improves Lipid Dysmetabolism by Reducing the Lipid Metabolizing Gene Expression in Diet-Induced Obese Mice. *Nutr.* **2018**, *10* (12). <https://doi.org/10.3390/nu10121857>.
- (41) Famurewa, A. C.; Ejezie, A. J.; Ugwu-Ejezie, C. S.; Ikekpeazu, E. J.; Ejezie, F. E. Antioxidant and Anti-Inflammatory Mechanisms of Polyphenols Isolated from Virgin Coconut Oil Attenuate Cadmium-Induced Oxidative Stress-Mediated Nephrotoxicity and Inflammation in Rats. *J. Appl. Biomed.* **2018**, *16* (4) Famurewa, A. C., Ejezie, A. J., Ugwu-Ejezie, C. S., Ikekpeazu, E. J., Ejezie, F. E. (2018). Antioxidant and anti-inflammatory mechanisms of polyphenols isolated from virgin coconut oil attenuate cadmium-induced oxidative stress-mediated nephrotoxicity), 281–288. <https://doi.org/10.1016/j.jab.2018.02.003>.
- (42) Farooqui, Z.; Ahmed, F.; Rizwan, S.; Shahid, F.; Khan, A. A.; Khan, F. Protective Effect of Nigella Sativa Oil on Cisplatin Induced Nephrotoxicity and Oxidative Damage in Rat Kidney. *Biomed. Pharmacother.* **2017**, *85*, 7–15. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.11.110>.
- (43) González-Peña, D.; Giménez, L.; De Ancos, B.; Sánchez-Moreno, C. Role of Dietary Onion in Modifying the Faecal Bile Acid Content in Rats Fed a High-Cholesterol Diet. *Food Funct.* **2017**, *8* (6), 2184–2192. <https://doi.org/10.1039/c7fo00412e>.
- (44) Li, K.; Sinclair, A. J.; Zhao, F.; Li, D. Uncommon Fatty Acids and Cardiometabolic Health. *Nutrients* **2018**, *10* (10), 1–14. <https://doi.org/10.3390/nu10101559>.
- (45) Kakimoto, P. A.; Kowaltowski, A. J. Effects of High Fat Diets on Rodent Liver Bioenergetics and Oxidative Imbalance. *Redox Biol.* **2016**, *8*, 216–225. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2016.01.009>.
- (46) Kamal-Eldin, A.; Frank, J.; Razdan, A.; Tengblad, S.; Basu, S.; Vessby, B. Effects of

- Dietary Phenolic Compounds on Tocopherol, Cholesterol, and Fatty Acids in Rats. *Lipids* **2000**, 35 (4), 427–435. <https://doi.org/10.1007/s11745-000-541-y>.
- (47) Ruan, J. S.; Lin, J. K.; Kuo, Y. Y.; Chen, Y. W.; Chen, P. C. Chronic Palmitic Acid-Induced Lipotoxicity Correlates with Defective Trafficking of ATP Sensitive Potassium Channels in Pancreatic β Cells. *J. Nutr. Biochem.* **2018**, 59 (1), 37–48. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2018.05.005>.
- (48) Shikama, Y. Free Fatty Acids May Be Involved in the Pathogenesis of Oral-Related and Cardiovascular Diseases. *J. Oral Biosci.* **2018**, 60 (3), 65–69. <https://doi.org/10.1016/j.job.2018.04.001>.
- (49) Nair, A.; Jacob, S. A Simple Practice Guide for Dose Conversion between Animals and Human. *J. Basic Clin. Pharm.* **2016**, 7 (2), 27. <https://doi.org/10.4103/0976-0105.177703>.

APÊNDICE D – ARTIGO 02

Antioxidant and anti-inflammatory properties of Malay Apple (*Syzygium malaccense*) in high-fat diet-induced Wistar rats

PERIÓDICO: Journal of Functional Foods

ÁREA: Nutrição

QUALIS: A1

ISSN: 1756-4646

FATOR DE IMPACTO: 3.470 (2017) ; 5-Year Impact Factor: 3.767 (2017)

Abbreviations

DCG: Dyslipidaemic control group

HCG: Healthy control group

MA: Malay apple

ROS: Reactive oxygen species

TNF: Tumour necrosis factor

HMA: Healthy group supplemented with MA

DMA: Dyslipidaemic group supplemented with MA

DPPH: 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl

ROS: Reactive oxygen species

T-AOC: Total antioxidant capacity

MDA: Malondialdehyde

MCP-1: Monocyte chemoattractant protein-1

Antioxidant and anti-inflammatory properties of Malay Apple (*Syzygium malaccence*) in high-fat diet-induced Wistar rats

Polyana Campos Nunes¹, Jailane de Souza Aquino², Thaís Helena Figueirêdo do Bonfim², Danielle Melo de Sousa² Alexandre Sérgio Silva³, Glêbia Alexa Cardoso³, Adriano Francisco Alves⁴, Ramon de Alencar Pereira⁵, Robson Cavalcante Veras⁶, Tânia Lúcia Montenegro Stamford^{1*}

¹ *Laboratório de Experimentação e Análise de Alimentos, Departamento de Nutrição, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife, 50670-91, Pernambuco, Brasil*

² *Laboratório de Nutrição Experimental (LANEX), Departamento de Nutrição, Universidade Federal da Paraíba (UFPB), João Pessoa, 58051-900, Paraíba, Brasil*

³ *Laboratório de Estudos do Treinamento Físico Aplicado ao Desempenho e a Saúde, Departamento de Educação Física, Universidade Federal da Paraíba (UFPB), João Pessoa, 58051-900, Paraíba, Brasil*

⁴ *Departamento de Fisiologia e Patologia, Universidade Federal da Paraíba (UFPB), João Pessoa, 58051-900, Paraíba, Brasil*

⁵ *Departamento de Patologia, Laboratório de Patologia, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, 31270-901, Minas Gerais, Brasil.*

⁶ *Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, Departamento de Farmácia, Universidade Federal da Paraíba (UFPB), João Pessoa, 58051-900, Paraíba, Brasil*

* *Corresponding author.* Laboratório de Experimentação e Análise de Alimentos, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil. Tel.: +55 81 21268470.

E-mail: tlmstamford@yahoo.com.br (T.L.M. STAMFORD).

Abstract

In the present study, the antioxidant and anti-inflammatory effects of Malay apple (MA) (*Syzygium malaccense*) were investigated in Wistar rats. Rats were randomised into two groups—healthy and dyslipidaemic—and dyslipidaemia was induced for 3 weeks. Subsequently, animals were randomised into four groups—healthy control (HCG), healthy supplemented (HMA), dyslipidaemic control (DCG), and dyslipidaemic supplemented (DMA). The fruit was administered (400 mg/kg of body weight) via gavage for more than 3 weeks. MA exhibited *in vitro* antioxidant activity equivalent to an EC₅₀ of 372.26 (g FW/g 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) and significantly increased the total antioxidant capacity ($p < 0.05$) and significantly decreased serum and liver lipid peroxidation levels ($p < 0.05$) in supplemented animals. Supplementation reversed changes in the adipose tissue of DMA rats and decreased serum inflammatory cytokine levels. These results show the benefits of MA supplementation through antioxidant and anti-inflammatory effects in dyslipidaemic rats.

Keywords: antioxidant, dyslipidaemic diet, inflammation, lipid peroxidation

1. Introduction

Dyslipidaemia is a risk factor for the development of cardiovascular diseases and is characterised as a non-communicable chronic disease caused by elevated serum cholesterol, low-density lipoprotein, and triglyceride levels, as well as reduced serum high-density lipoprotein levels (Vekic, Zeljkovic, Stefanovic, Jelic-Ivanovic, & Spasojevic-Kalimanovska, 2018).

Studies have demonstrated that oxidative stress is associated with dyslipidaemia (Maslov et al., 2019; Tangvarasittichai, 2015) and is characterised by a decreased efficiency of the antioxidant defense systems and overproduction of reactive oxygen species (ROS), such as hydrogen peroxide, hypochlorous acid, superoxide anion, singlet oxygen, lipid peroxides, hypochlorite and hydroxyl radical. ROS react with membrane lipids, nucleic acids, proteins, enzymes and other molecules and, thus, play an essential role in cell signalling.

Altered metabolism is related to oxidative damage and is also directly associated with the inflammatory process because these two conditions are interrelated in the body. The development of oxidative damage triggers an inflammatory process, and, in turn, inflammation induces oxidative stress, thereby exposing the body to sustained ROS levels and leading to cell and tissue injury (Siti, Kamisah, & Kamsiah, 2015; Vichaibun, Khananurak, & Sophonnithiprasert, 2019).

In dyslipidaemia, inflammation is often mediated by the rupture of the atherosclerotic plaque and by elevated adhesion molecule levels, which lead to an increase in the secretion of proinflammatory cytokines by the immune system cells (El-Seweidy, Amin, Atteia, El-Zeiky, & Al-gabri, 2019).

Antioxidant and anti-inflammatory compounds are molecules that play important roles in the protection of biological systems against ROS and that improve the body's response to inflammation (Siti et al., 2015). Several components of the endogenous defense system can reduce damage due to the attack of free radicals and by the inflammatory process, including enzymes, some free-radical scavenging molecules and defense cells; however, some dietary factors and compounds that are naturally present in foods play a role in cellular protection and, consequently, in disease prevention (Rajendran et al., 2014).

In this context, the induction of dyslipidaemia in animal models has been used in several studies to demonstrate the antioxidant and anti-inflammatory effects of bioactive

compounds naturally present in foods, particularly in fruits (Ajiboye et al., 2014; Donado-Pestana, Belchior, Festuccia, & Genovese, 2015; Hong, Beidler, Hooshmand, Figueroa, & Kern, 2018; Yang & Jo, 2018), to support further clinical trials.

Among the fruits that have been studied, the *Syzygium malaccense* fruit, also known as Malay apple (MA), has been used in traditional medicine, particularly for its antidiabetic activity (Arumugam, Palanisamy, Chua, & Kuppusamy, 2016; Jung et al., 2006). MA contains a large variety of polyphenolic compounds, including several anthocyanin pigments such as proanthocyanidin, cyanidin and peonidin glucoside, which are among its main biological components and contribute to its high antioxidant activity (Batista et al., 2017; Nunes, Aquino, Rockenbach, & Stamford, 2016).

The search for antioxidant compounds, inflammation and angiogenesis inhibitors is of great importance to humans because of their essential role in cell signalling processes, disease control and suppression of tumour proliferation. Therefore, the objective of this study was to investigate the effects of MA, through its antioxidant and anti-inflammatory properties, on Wistar rats with induced dyslipidaemia.

2. Material and Methods

2.1 Malay apple (MA) fruit samples

MA samples were obtained from the local market (CEASA - State Central Supply, Joao Pessoa, Brazil) and grown in a nearby region (Latitude 7° 15' 38" South and Longitude 34° 54' 30"). Fruits were selected in the mature stage, showing a dark red bark, and separated from the seed. This study considered the edible part of the fruit (pulp + peel). Samples were frozen (−80°C) and freeze-dried (−68°C, vacuum pressure at 130 mmHg) for approximately 3 days in bench lyophiliser model L-101 (LIOTOP, São Carlos, São Paulo, Brazil). The freeze-

dried material obtained was ground in a domestic blender, sieved through a 1.0-mm mesh and stored (-10°C) in glass containers under light protection.

2.2 *In vitro* antioxidant activity of Malay apple (MA)

Antioxidant activity was analysed using 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) stable radical scavenging capacity assay according to the manufacturer's instructions (Brand-Williams, Cuvelier, & Berset, 1995). Aliquots of the MA extract (0.1 mL) were placed in test tubes, and 3.9 mL of DPPH in methanol was added. Subsequently, tubes were kept protected from light. All readings were made in triplicate in a 1650-PC UV-visible spectrophotometer (Shimadzu, Tokyo, Japan) at 515 nm. Results were expressed as EC_{50} (g FW/g DPPH), considering the weight of the fresh sample (FW).

2.3 Experimental design and diets

Thirty-two male adult Wistar rats, approximately 60 days old, were maintained in collective cages with water and food *ad libitum* at $21^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, relative humidity in the range of 50%–55% and alternating 12 h light-dark cycles. The experimental protocol was approved by Animal ethics committee of the Bioscience Center of Federal University of Pernambuco, Recife, Brazil) under protocol number 23076.013011/2017-47. All experiments were performed in agreement with the guidelines of the Brazilian Society of Science in Laboratory Animals (SBCAL, Brazil).

Initially, Wistar rats were randomly divided into two groups as the healthy group (HG, $n = 16$), which was fed on an AIN 93M diet (Reeves, Nielsen, & Fahey, 1993) containing soybean oil (4%) as the lipid source, milky casein (14%), maize starch (47%), dextrinised starch (15.50%), sucrose (10%), fibres (5%), minerals mix AIN-93M (3.50%), vitamin mix (1%), L-cystine (0.18%), hill bitartrate (0.25%) and t-BHQ (0.008%), and the dyslipidaemic

group (DG, n = 16), which was fed on a dyslipidaemic diet (Rhooster, Araçoiaba da Serra, Brazil), containing 6% lard, 5% non-hydrolysed vegetable fat, 1% cholesterol and soybean oil (3%) as the lipid source, milky casein (16.5%), maize starch (36.45%), dextrinised starch (15.50%), sucrose (6%), fibres (5%), minerals mix AIN-93M (3.50%), vitamin mix (1%), L-cystine (0.30%), hill bitartrate (0.25%) and t-BHQ (0.014%).

The rats had undergone previous treatment by consuming these diets for 3 weeks. After this period, dyslipidaemia was detected through the biochemical examination of the lipid profile (Figure S1) using Labtest (Belo Horizonte, Brazil). The rats were then randomly divided into four groups—healthy control group (HCG, n = 8) and healthy group supplemented with MA (HMA, n = 8), both fed on an AIN 93M diet *ad libitum* for 3 weeks, and dyslipidaemic control group (DCG, n = 8) and dyslipidaemic group supplemented with MA (DMA, n = 8), both fed on a dyslipidaemic diet *ad libitum* for the same period.

MA was administered for 3 weeks via gavage to rats in the HMA and DMA groups at a dose of 400 mg/kg, diluted in 2 mL of physiological solution at 0.9% (Batista et al., 2018). Rats in the HCG and DCG groups received the same volume of saline solution at 0.9% during the same period.

After the 6th week of treatment, rats were subjected to 8 h of fasting and then intraperitoneally anaesthetised with 1 mL of ketamine hydrochloride (75 mg) associated with 1 mL of xylazine hydrochloride (5 mg) for each kilogram of body weight of the animal, followed by euthanasia. Euthanasia was performed by a puncture in the left ventricle for blood collection in sterile tubes for centrifugation (5.8136 g/10 min.) and serum collection. Serum was collected to evaluate oxidative and inflammatory parameters. Liver, intestine, heart and fatty tissue samples were collected for histological analysis and evaluation of antioxidant status *in vivo*.

2.4 *In vivo* oxidative parameters

Oxidation parameters were evaluated using lipid peroxidation analysis and total antioxidant capacity (T-AOC) in serum, liver homogenates and cardiac, intestinal and adipose tissues. To prepare the homogenates, livers were macerated and homogenised in 10 mL of potassium chloride (0.05 M) in an ice bath. Homogenates were centrifuged in a refrigerated centrifuge (Sorvall, st8, Waltham, MA, USA) at 18,000 *g* for 5 min at a temperature of 4°C to obtain the supernatant.

2.4.1 Total antioxidant capacity (T-AOC)

T-AOC was measured by assessing the free-radical scavenging activity using the DPPH method (Brand-Williams et al., 1995). Readings were made on a UV spectrophotometer (Biospectro SP-22, Curitiba, Brazil) at 515 nm and at room temperature.

2.4.2 Degree of lipid peroxidation

Lipid peroxidation was assessed by measuring thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), and results were expressed in terms of malondialdehyde (MDA) content (Ohkawa, Ohishi, & Yagi, 1979). Readings were made on a UV spectrophotometer (Biospectro SP-22, Curitiba, Brazil) at 532 nm and at room temperature.

2.5 Histological analysis of the liver, intestinal, cardiac and adipose tissues

Cardiac, liver, intestinal (colon) and adipose tissues were collected for histological analysis, fixed in 10% buffered formaldehyde and processed according to the standard histological technique. Prepared slides were stained using Harris' hematoxylin and eosin protocol, and coverslips were mounted onto the slides with synthetic resin (Entellan-Merck)

for observation under increasing magnification and photographed with a total magnification of 40× under an optical microscope (Motic BA 200, Campbell, CA, USA).

The morphological analysis of the liver included the assessment of degenerative processes through fatty degeneration and inflammatory changes, including leukocyte migration, oedema, hyperaemia, haemorrhage, necrosis, liver parenchyma preservation and the presence of microthrombi. The intestine was investigated to examine the presence of inflammatory processes, such as stasis, leukocyte migration, haemorrhage, vasodilation and necrosis, as well as epithelial preservation and hypertrophy and hyperplasia of the external muscle layer. The cardiac and adipose tissues were also evaluated to examine the presence of inflammatory processes, ectopic fat surrounding the heart and adipose tissue architecture (Batista et al., 2018; Erben et al., 2014).

2.6 Morphometry of the adipose tissue

The morphometric analysis was performed by taking 20 random images with a camera attached to the microscope for each type of staining and organ. The area was calculated using algorithms provided with the KS300 software. In each image, all brown colour pixels (positive immunohistochemical staining) were selected for the creation of a binary image, digital processing and area calculation (in μm^2) (Prata et al., 2017).

2.7 Serum inflammation markers

The inflammation markers interferon-gamma, monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), interleukin-6 (IL-6), IL-10, tumour necrosis factor (TNF) and IL-12p70 levels were measured using the cytometric bead array assay using a BDTM kit (cat # 552364) (BD Biosciences, Santa Monica, USA) according to the manufacturer's instructions (Chessell et al., 2005). Serum samples for cytokine analysis were acquired in a BD FACSCanto-II flow

cytometer (BD Biosciences, Santa Monica, USA) equipped with a 15-mW 488-nm argon laser, and the DIVA 6.0 software (BD Biosciences, Santa Monica, USA) was used in the analysis.

2.8 Statistical analysis

Data were analysed using one-way analysis of variance. Results are expressed as mean $\pm$ standard deviation. For differences between the variables, post-hoc Tukey's test was conducted at a significance level of 5% ($p < 0.05$). GraphPadPrism7[®] package (GraphPad Software Inc. La Jolla, CA, USA) was used.

3. Results

3.1 *In vitro* antioxidant activity

Substances that exhibited antioxidant activity in the MA extracts analysed in this study reacted with the radical DPPH and converted it to diphenyl picrylhydrazine in a reaction whose degree of DPPH oxidation indicates the antioxidant potential of the extract through colour change. The result of antioxidant activity for the fresh sample of fruit was EC_{50} 372.26 $\pm$ 1.06 (g FW/g DPPH).

3.2 *In vivo* oxidative parameters

As is shown in Figure 1A to 1E, antioxidant activity was significantly increased ($p < 0.05$) in the cardiac, liver and adipose tissues of rats in the supplemented groups, as well as in the intestine and serum. In addition, MA supplementation improved rats' liver and serum lipid peroxidation levels ($p < 0.05$) (Figure 2B and 2E).

3.3 Histological and morphometric analyses

The histological analysis was performed through the analysis of cardiac, liver, intestinal and adipose cells (Figure 3A to 3P) and morphometric analysis of adipose tissues (Figure 4A to 4B) of rats in the control and supplemented groups. The analyses did not reveal injury to the cardiac tissue or to the intestine (Figure 3A to 3D and 3I to 3L). However, the liver of rats in the DCG and DMA groups exhibited steatosis (indicated with an asterisk in Figure 3G and 3H).

The adipose tissue of rats in the DCG group exhibited vasodilation (indicated by the arrow in Figure 3N), whereas no change was observed in those in the DMA group (Figure 3O), which indicates that MA had a protective effect on the adipose tissue of these rats. These results are consistent with those of the morphometric analysis, which demonstrated an increase in the number and area of adipocytes in the DCG and DMA groups, as well as a reduction in the size of adipocytes in the DMA group (Figure 4A). MA supplementation did not lead to a reduction ($p > 0.05$) in the number of adipocytes in the adipose tissue of rats.

3.4 Serum inflammation markers

A protective effect and a statistically significant decrease ($p < 0.05$) were observed in cytokine levels in the groups supplemented with MA (Figure 5A to 5F).

4. Discussion

The antioxidant capacity exhibited by MA (EC_{50} 372.26 g FW/g DPPH) was not significant compared with that exhibited by other tropical fruits of the same family (Myrtaceae), e.g. Araçá (EC_{50} 721.85 g FW/g DPPH) and Cagaita (EC_{50} 337.88 g FW/g DPPH) (Schiassi, Souza, Lago, Campos, & Queiroz, 2018). However, MA supplementation led to an increase in T-AOC in the serum and in all assessed organs of rats in the HMA and DMA groups ($p < 0.05$). This increase in the antioxidant capacity may be attributed to the

presence of some bioactive compounds in the fruit, including polyphenols, which play a fundamental role as antioxidants because they contain structural elements exhibiting hydroxyl radical scavenging activity and other aromatic ring structures that allow neutralising free radicals in the body (Villaño, Fernández-Pachón, Moyá, Troncoso, & García-Parrilla, 2007). *In vivo* T-AOC is a measure used to assess the protection capacity of non-enzymatic antioxidant systems in the body against oxidative damage (Chu et al., 2019), such as those caused by the continued consumption of diets rich in saturated or trans fats that increase the formation of free radicals and, thus, compromise the antioxidant defense system (Chu et al., 2019; Zhang et al., 2018).

Lipid peroxidation is a well-known mechanism of oxidative damage induced by the excessive production of ROS (Wu et al., 2010). In the present study, MA supplementation promoted a decrease in MDA levels in the rats' liver and serum ($p < 0.05$). This result was similar to that obtained in a previous study in which the consumption of two juices made from a mix of tropical fruits for 4 weeks, at doses of 100, 200 and 400 mg/kg, led to a reduction in lipid peroxidation levels in the liver and serum of rats (Pereira et al., 2014). Khennouf et al. (2010) also reported that phenolic compounds and tannins have an inhibiting effect on lipid peroxidation in the brains of rabbits.

Results of the histological analysis indicated that the liver tissue of dyslipidaemic rats exhibited excessive fat accumulation and that MA supplementation did not reverse this injury caused by the continued consumption of a dyslipidaemic diet, as was observed in previous studies on supplementation with other fruits (Lamas et al., 2018; Wannasiri, Chansakaow, & Sireeratawong, 2017) or with byproducts of fruits, such as skins and seeds (Batista et al., 2018). This result may be explained by the lower amount and different composition of bioactive compounds in the pulp compared with the skin of MA (Batista et al., 2017; Nunes, Aquino, Rockenbach, & Stamford, 2016). Moreover, lipid peroxidation is a factor that may

also be associated with the liver damage process (Figure 2E) and is an important marker of oxidative damage and of MDA production frequently related to fat accumulation and oxidative stress in the liver (Wu et al., 2010).

The histological analysis of adipose tissue indicated that MA had a protective effect on the adipocytes in the DMA group (Figure 3P), as demonstrated by the absence of vasodilation, a phenomenon that is used as a marker of tissue inflammation. Adipose tissue is dynamic and modifiable and develops late during gestation in humans and during early post-natal development in rodents (Parlee, Lentz, Mori, & MacDougald, 2014). The metabolic disorder induced by excessive saturated and trans fats offered to the rats in the present study caused tissue remodelling in the adipocytes, thereby increasing the number (hyperplasia) and size (hypertrophy) of adipose cells and modifying the profile of adipose tissue in the DCG and DMA groups (Figure 4A and 4B). In turn, the excess of hypertrophic adipocytes generated an overload of lipids, which ended up ectopically deposited in other organs, including the liver, and causing steatosis (Figure 3G and 3H).

Adipocyte morphometry in the DMA group also indicated a positive effect of supplementation on the reduction in the size of these cells (Figure 4A). This reduction was not accompanied by a significant decrease ($p > 0.05$) in the number of adipocytes (Figure 4B); however, the occurrence of a protective effect caused by the reduction in the overall size of the cell is possible even if the number of adipocytes does not change (Parlee et al., 2014).

The reduction in proinflammatory cytokine levels in the supplemented animals suggests that MA systemically improved the inflammatory injury to the body. Inflammatory injury caused by dyslipidaemia occurs both due to an increase in the immune response from the central nervous system and due to vascular tissue damage that causes innate immune cells to trigger an inflammatory process, thereby elevating cytokine levels (A. J. Chu, 2014; Oliveira, Bellozi, Reis, & de Oliveira, 2018). Dyslipidaemia-associated oxidative stress

induces the production of MCP-1, IL-6, TNF- α and other inflammatory cytokines (Maslov et al., 2019).

The main substances related to the antioxidant effect and anti-inflammatory activity of MA are phenolic compounds, particularly anthocyanins (Cheng et al., 2014; Figueira et al., 2016), which are the main compounds in MA (Nunes et al., 2016). The main phenolic compounds found in MA samples analysed by Batista et al., 2017 were cyanidin-3-*O*-glucoside (42.77 ± 3.36 mg/100 g), cyanidin-3,5-*O*-diglucoside (5.52 ± 0.25 mg/100 g), isorhamnetin-3-*O*-glucoside (3.33 ± 0.20 mg/100 g), procyanidin A2 (1.74 ± 0.25 mg/100 g), epicatechin (1.37 ± 0.03 mg/100 g), epicatechin gallate (1.37 ± 0.25 mg/100 g), kaempferol-3-*O*-glucoside (1.32 ± 0.16 mg/100 g), procyanidin B1 (1.31 ± 0.25 mg/100 g), catechin (1.12 ± 0.09 mg/100 g), benzoic acid (0.75 ± 0.06 mg/100 g), isoquercitrin (0.55 ± 0.01 mg/100 g) and peonidin-3-*O*-glucoside (0.51 ± 0.03 mg/100 g). The primary mechanism of the anti-inflammatory action of polyphenols is the inactivation of ROS. Phenolic compounds act on signalling pathways to maintain or restore tissue homeostasis, which leads to reduction of proinflammatory mediators. Some examples of mechanisms of action of polyphenols in inflammation are as follows: antioxidant activity through the inactivation of ROS, reduction in platelet aggregation, vasodilation, inhibition of cyclooxygenase, inactivation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma, synthesis of endothelial nitric oxide synthase, activation of SirT1 and inhibition of the ACE enzyme (A. J. Chu, 2014).

The inclusion of MA in human diets should be supported by further non-clinical studies and clinical trials conducted both with samples of healthy individuals and individuals with dyslipidaemia, focusing on the consumption of the whole fruit as well as of the skin and pulp separately to assess the functional and nutraceutical potentials of this fruit.

5. Conclusions

Findings of the present study demonstrated that MA supplementation promoted an increase in the T-AOC in the animals' serum and organs and reduced the serum and liver lipid peroxidation levels. In addition, MA had anti-inflammatory activity in the serum of healthy and dyslipidaemic rats and prevented tissue changes in the adipocytes of dyslipidaemic rats. However, further studies are necessary to explore the mechanisms of action and other biological effects of MA.

Acknowledgments: The authors are grateful for the scholarship granted by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (National Council for Scientific and Technological Development) – CNPq to P.C. Nunes.

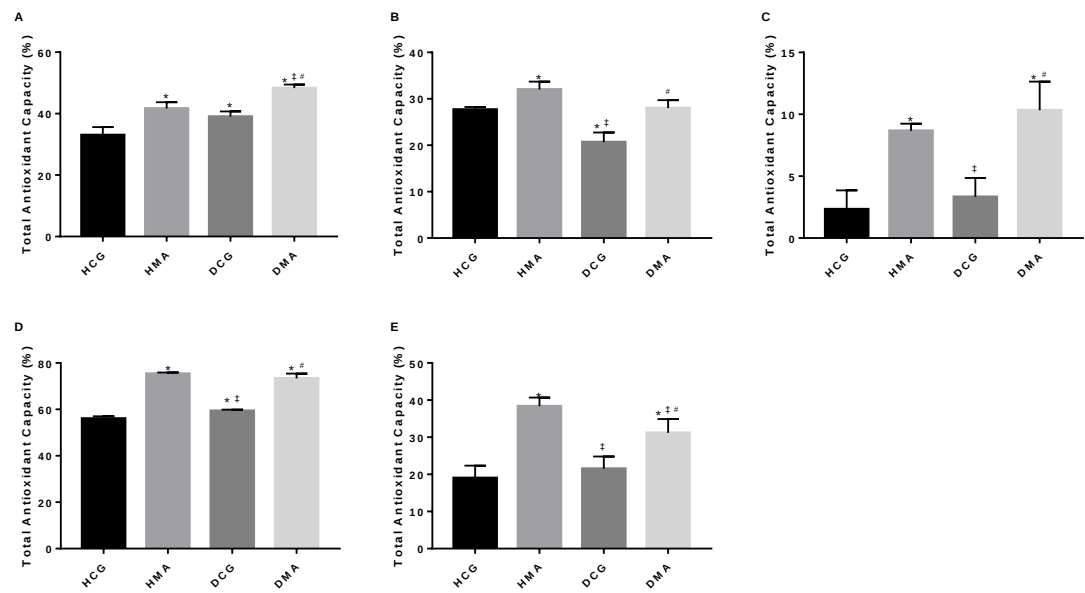
Funding: This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Author Contributions: P.C.N., T.L.M.S. and J.S.A. conceived the study, performed literature searches, wrote the manuscript and reviewed the final draft; P.C.N., T.H.F.B., D.M.S., A.S.S., G.A.C., R.C.V. performed the biological assays; A.F.A., R.A.P. performed the histological analyzes.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest.

Figures

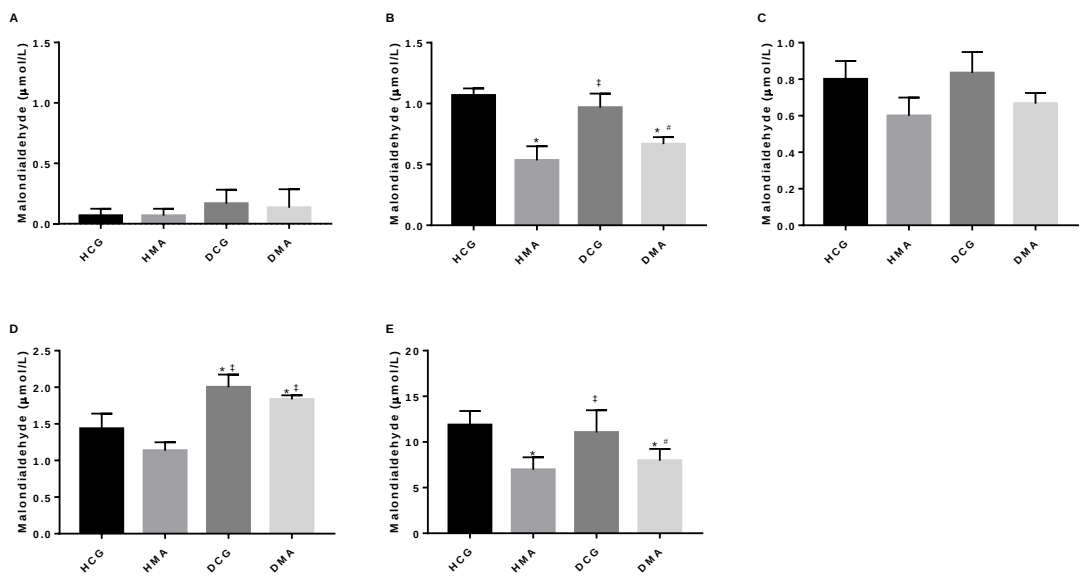
Figure 1. Total Antioxidant Capacity (T-AOC) *in vivo*



Effec

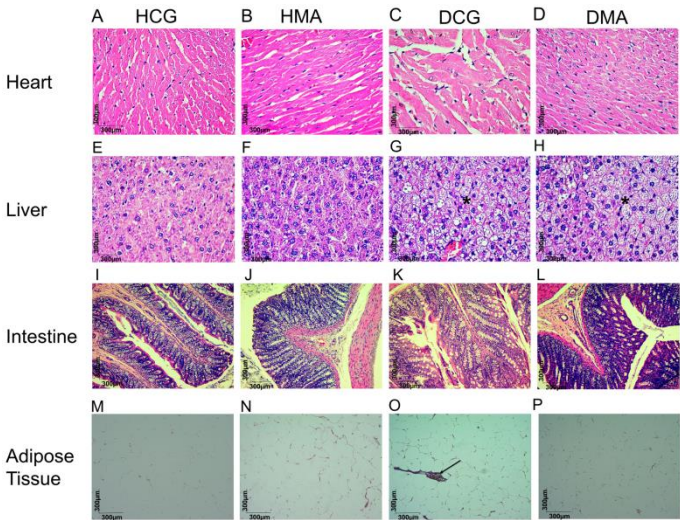
ts of MA on total antioxidant capacity in the heart (A), liver (B), fat tissue (C), intestine (D) and serum (E); of the Healthy Control Group (HCG), Healthy Group Supplemented with Malay Apple (HMA), Dyslipidaemic Control Group (DCG) and Dyslipidaemic Group Supplemented with Malay Apple (DMA). Values are means, with standard deviation (one-way ANOVA, $p \leq 0.05$, Tukey's post hoc test). *Significant difference compared with HCG group; ‡Significant difference compared with HMA group; #Significant difference compared with DCG group.

Figure 2. Levels of Malondialdehyde (MDA)



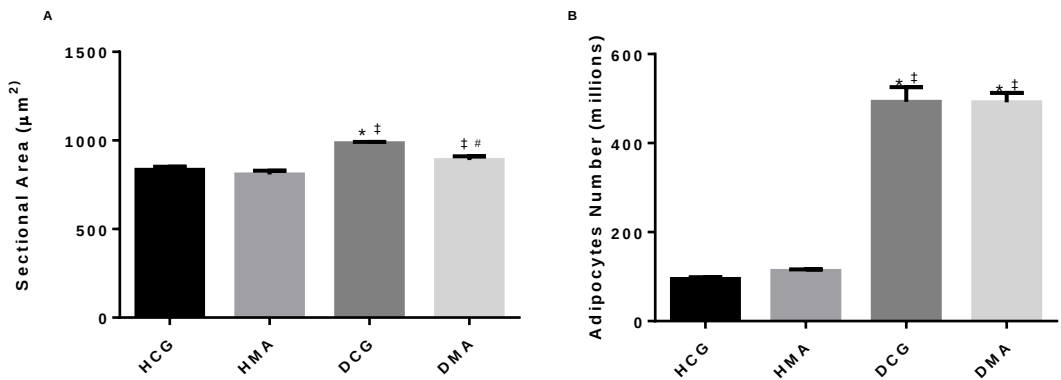
Level
s of malondialdehyde in the heart (A), liver (B), fat tissue (C), intestine (D) and serum (E); of the Healthy Control Group (HCG), Healthy Group Supplemented with Malay Apple (HMA), Dyslipidaemic Control Group (DCG) and Dyslipidaemic Group Supplemented with Malay Apple (DMA). Values are means, with standard deviation (one-way ANOVA, $p \leq 0.05$, Tukey's post hoc test). *Significant difference compared with HCG group; †Significant difference compared with HMA group; #Significant difference compared with DCG group.

Figure 3. Histological analyses



Hematoxylin-eosin staining (H & E) (10x) histological analyses of the heart (A-D), liver (E-H), intestines (I-L) and fat tissue (M-P); of the Healthy Control Group (HCG), Healthy Group Supplemented with Malay Apple (HMA), Dyslipidaemic Control Group (DCG) and Dyslipidaemic Group Supplemented with Malay Apple (DMA).

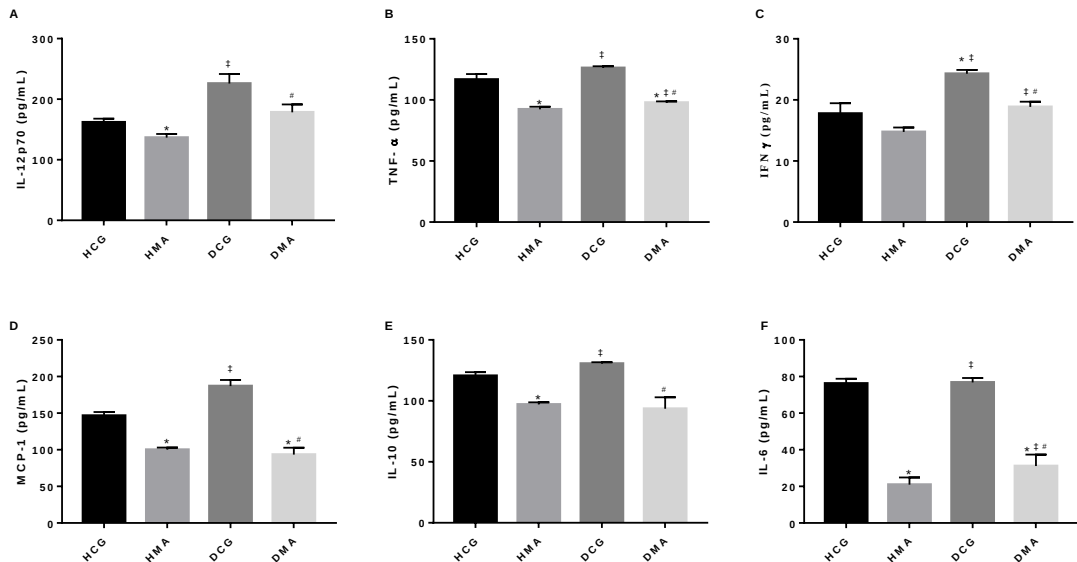
Figure 4. Morphometric analyses



Morp

hometric analyses of adipocyte area (A) Number of adipocytes (B); of the Healthy Control Group (HCG), Healthy Group Supplemented with Malay Apple (HMA), Dyslipidaemic Control Group (DCG) and Dyslipidaemic Group Supplemented with Malay Apple (DMA). Values are means, with standard deviation (one-way ANOVA, $p \leq 0.05$, Tukey's post hoc test). *Significant difference compared with HCG group; †Significant difference compared with HMA group; #Significant difference compared with DCG group.

Figure 5. Serum cytokines



Level

s of serum cytokines: IL-12p70 (A), TNF- α (B), IFN- γ (C), MCP-1 (D), IL-10 (E) and IL-6 (E); in the Healthy Control Group (HCG), Healthy Group Supplemented with Malay Apple (HMA), Dyslipidaemic Control Group (DCG), and Dyslipidaemic Group Supplemented with

Malay Apple (DMA). Values are means, with standard deviation (one-way ANOVA, $p \leq 0.05$, Tukey's post hoc test). *Significant difference compared with HCG group; ‡Significant difference compared with HMA group; #Significant difference compared with DCG group.

References

- Ajiboye, T. O., Akinpelu, S. A., Muritala, H. F., Ogunbode, S. M., Adeleye, A. O., Oladiji, A. T., & Oloyede, O. B. (2014). Trichosanthes Cucumerina Fruit Extenuates Dyslipidemia, Protein Oxidation, Lipid Peroxidation and DNA Fragmentation in the liver of high-fat diet-fed rats. *Journal of Food Biochemistry*, 38(5), 480–490.
<https://doi.org/10.1111/jfbc.12080>
- Arumugam, B., Palanisamy, U. D., Chua, K. H., & Kuppasamy, U. R. (2016). Potential antihyperglycaemic effect of myricetin derivatives from Syzygium malaccense. *Journal of Functional Foods*, 22, 325–336. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2016.01.038>
- Batista, Â. G., da Silva, J. K., Betim Cazarin, C. B., Biasoto, A. C. T., Sawaya, A. C. H. F., Prado, M. A., & Maróstica Júnior, M. R. (2017). Red-jambo (Syzygium malaccense) : Bioactive compounds in fruits and leaves. *LWT - Food Science and Technology*, 76, 284–291. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.05.013>
- Batista, K. S., Alves, A. F., Lima, M. D. S., da Silva, L. A., Lins, P. P., de Sousa Gomes, J. A., ... Aquino, J. D. S. (2018). Beneficial effects of consumption of acerola, cashew or guava processing by-products on intestinal health and lipid metabolism in dyslipidaemic female Wistar rats. *British Journal of Nutrition*, 119(01), 30–41.
<https://doi.org/10.1017/S0007114517003282>
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*, 28(1), 25–30.
[https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5)
- Cheng, A., Yan, H., Han, C., Wang, W., Tian, Y., & Chen, X. (2014). Polyphenols from

- blueberries modulate inflammation cytokines in LPS-induced RAW264.7 macrophages. *International Journal of Biological Macromolecules*, 69, 382–387.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.05.071>
- Chessell, I. P., Hatcher, J. P., Bountra, C., Michel, A. D., Hughes, J. P., Green, P., ... Buell, G. N. (2005). Disruption of the P2X7 purinoceptor gene abolishes chronic inflammatory and neuropathic pain. *Pain*, 114(3), 386–396. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2005.01.002>
- Chu, A. J. (2014). Antagonism by bioactive polyphenols against inflammation: a systematic view. *Inflammation & Allergy Drug Targets*, 13(1), 34–64. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24251781>
- Chu, L., Yang, L., Lin, L., Wei, J., Wang, N., Xu, M., ... Zheng, G. (2019). Chemical composition, antioxidant activities of polysaccharide from Pine needle (*Pinus massoniana*) and hypolipidemic effect in high-fat diet-induced mice. *International Journal of Biological Macromolecules*, 125, 445–452.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.12.082>
- Donado-Pestana, C. M., Belchior, T., Festuccia, W. T., & Genovese, M. I. (2015). Phenolic compounds from cambuci (*Campomanesia phaea* O. Berg) fruit attenuate glucose intolerance and adipose tissue inflammation induced by a high-fat, high-sucrose diet. *Food Research International*, 69, 170–178.
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.12.032>
- El-Seweidy, M. M., sarhan Amin, R., Hussein Attia, H., El-Zeiky, R. R., & Al-gabri, N. A. (2019). Dyslipidemia induced inflammatory status, platelet activation and endothelial dysfunction in rabbits: Protective role of 10-Dehydrogingerdione. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 110(November 2018), 456–464.
<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.11.140>
- Erben, U., Loddenkemper, C., Doerfel, K., Spieckermann, S., Haller, D., Heimesaat, M. M.,

- ... Kühl, A. A. (2014). A guide to histomorphological evaluation of intestinal inflammation in mouse models. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 7(8), 4557–4576. <https://doi.org/10.1097/MOT.0000000000000150>
- Figueira, M. E., Oliveira, M., Direito, R., Rocha, J., Alves, P., Serra, A. T., ... Sepodes, B. (2016). Protective effects of a blueberry extract in acute inflammation and collagen-induced arthritis in the rat. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 83, 1191–1202. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.08.040>
- Hong, M. Y., Beidler, J., Hooshmand, S., Figueroa, A., & Kern, M. (2018). Watermelon and L-arginine consumption improve serum lipid profile and reduce inflammation and oxidative stress by altering gene expression in rats fed an atherogenic diet. *Nutrition Research*, 58, 46–54. <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2018.06.008>
- Jung, M., Park, M., Lee, H., Kang, Y.-H., Kang, E., & Kim, S. (2006). Antidiabetic Agents from Medicinal Plants. *Current Medicinal Chemistry*, 13(10), 1203–1218. <https://doi.org/10.2174/092986706776360860>
- Khenouf, S., Amira, S., Arrar, L., & Baghiani, A. (2010). Effect of Some Phenolic Compounds and Quercus Tannins on Lipid Peroxidation. *World Applied Sciences Journal*, 8(9), 1144–1149.
- Lamas, C. A., Lenquiste, S. A., Baseggio, A. M., Cuquetto-Leite, L., Kido, L. A., Aguiar, A. C., ... Cagnon, V. H. A. (2018). Jaboticaba extract prevents prediabetes and liver steatosis in high-fat-fed aging mice. *Journal of Functional Foods*, 47(May), 434–446. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2018.06.005>
- Maslov, L. N., Naryzhnaya, N. V., Boshchenko, A. A., Popov, S. V., Ivanov, V. V., & Oeltgen, P. R. (2019). Is oxidative stress of adipocytes a cause or a consequence of the metabolic syndrome? *Journal of Clinical and Translational Endocrinology*, 15(May 2018), 1–5. <https://doi.org/10.1016/j.jcte.2018.11.001>

- Nunes, P. C., Aquino, J. S., Rockenbach, I. I., & Stamford, T. L. M. (2016). Physico-chemical characterization, bioactive compounds and antioxidant activity of Malay apple [*Syzygium malaccense* (L.) Merr. & L.M. Perry]. *PLoS ONE*, 11(6).
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0158134>
- Ohkawa, H., Ohishi, N., & Yagi, K. (1979). Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry*, 95(2), 351–358.
[https://doi.org/10.1016/0003-2697\(79\)90738-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(79)90738-3)
- Oliveira, B. C. de L., Bellozi, P. M. Q., Reis, H. J., & de Oliveira, A. C. P. (2018). Inflammation as a Possible Link Between Dyslipidemia and Alzheimer's Disease. *Neuroscience*, 376, 127–141. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2018.02.012>
- Parlee, S. D., Lentz, S. I., Mori, H., & MacDougald, O. A. (2014). Quantifying Size and Number of Adipocytes in Adipose Tissue. In *Quantifying Size and Number of Adipocytes in Adipose Tissue Sebastian* (pp. 93–122). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-411619-1.00006-9>
- Pereira, A. C. D. S., Dionísio, A. P., Wurlitzer, N. J., Alves, R. E., Brito, E. S. De, Silva, A. M. D. O. E., ... Mancini Filho, J. (2014). Effect of antioxidant potential of tropical fruit juices on antioxidant enzyme profiles and lipid peroxidation in rats. *Food Chemistry*, 157, 179–185. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.01.090>
- Prata, L. O., Rodrigues, C. R., Martins, J. M., Vasconcelos, P. C., Oliveira, F. M. S., Ferreira, A. J., ... Caliari, M. V. (2017). Original Research: ACE2 activator associated with physical exercise potentiates the reduction of pulmonary fibrosis. *Experimental Biology and Medicine*, 242(1), 8–21. <https://doi.org/10.1177/1535370216665174>
- Rajendran, P., Nandakumar, N., Rengarajan, T., Palaniswami, R., Gnanadhas, E. N., Lakshminarasiah, U., ... Nishigaki, I. (2014). Antioxidants and human diseases. *Clinica Chimica Acta*, 436, 332–347. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2014.06.004>

- Reeves, P. G., Nielsen, F. H., & Fahey, G. C. (1993). AIN-93 Purified Diets for Laboratory Rodents: Final Report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the Reformulation of the AIN-76A Rodent Diet. *The Journal of Nutrition*, 123(11), 1939–1951. <https://doi.org/10.1093/jn/123.11.1939>
- Schiassi, M. C. E. V., Souza, V. R. de, Lago, A. M. T., Campos, L. G., & Queiroz, F. (2018). Fruits from the Brazilian Cerrado region: Physico-chemical characterization, bioactive compounds, antioxidant activities, and sensory evaluation. *Food Chemistry*, 245(October 2017), 305–311. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.10.104>
- Siti, H. N., Kamisah, Y., & Kamsiah, J. (2015). The role of oxidative stress, antioxidants and vascular inflammation in cardiovascular disease (a review). *Vascular Pharmacology*, 71, 40–56. <https://doi.org/10.1016/j.vph.2015.03.005>
- Tangvarasittichai, S. (2015). Oxidative stress, insulin resistance, dyslipidemia and type 2 diabetes mellitus. *World Journal of Diabetes*, 6(3), 456. <https://doi.org/10.4239/wjd.v6.i3.456>
- Vekic, J., Zeljkovic, A., Stefanovic, A., Jelic-Ivanovic, Z., & Spasojevic-Kalimanovska, V. (2018). Obesity and dyslipidemia. *Metabolism*, 95(5), 893–902. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2018.11.005>
- Vichaibun, V., Khananurak, K., & Sophonnithiprasert, T. (2019). Comparative analysis of plasma total antioxidant capacity in patients with hyperglycemia and hyperglycemia plus dyslipidemia. *Diabetes and Metabolic Syndrome: Clinical Research and Reviews*, 13(1), 90–94. <https://doi.org/10.1016/j.dsx.2018.08.029>
- Villaño, D., Fernández-Pachón, M. S., Moyá, M. L., Troncoso, A. M., & García-Parrilla, M. C. (2007). Radical scavenging ability of polyphenolic compounds towards DPPH free radical. *Talanta*, 71(1), 230–235. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2006.03.050>
- Wannasiri, S., Chansakaow, S., & Sireeratawong, S. (2017). Effects of Solanum torvum fruit

water extract on hyperlipidemia and sex hormones in high-fat fed male rats. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 7(5), 401–405.

<https://doi.org/10.1016/j.apjtb.2017.01.027>

Wu, H. T., He, X. J., Hong, Y. K., Ma, T., Xu, Y. P., & Li, H. H. (2010). Chemical characterization of lycium barbarum polysaccharides and its inhibition against liver oxidative injury of high-fat mice. *International Journal of Biological Macromolecules*, 46(5), 540–543. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2010.02.010>

Yang, D. K., & Jo, D.-G. (2018). Mulberry Fruit Extract Ameliorates Nonalcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) through Inhibition of Mitochondrial Oxidative Stress in Rats. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2018, 1–9.

<https://doi.org/10.1155/2018/8165716>

Zhang, Q., Qian, Z. Y., Zhou, P. H., Zhou, X. L., Zhang, D. L., He, N., ... Gu, Q. (2018). Effects of oral selenium and magnesium co-supplementation on lipid metabolism, antioxidative status, histopathological lesions, and related gene expression in rats fed a high-fat diet. *Lipids in Health and Disease*, 17(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s12944-018-0815-4>

ANEXO A – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA



**Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Biociências**

Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
50670-420 / Recife - PE - Brasil
fones: (55 81) 2126 8840 | 2126 8351
fax: (55 81) 2126 8350
www.ccb.ufpe.br

Recife, 25 de abril de 2017.

Ofício nº 26/17

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE
Para: **Prof.ª Tânia Lucia Monetengro Stamford**
Departamento de Nutrição
Centro de Ciência da Saúde
Universidade Federal de Pernambuco
Processo nº **23076.013011/2017-47**

Certificamos que a proposta intitulada "**Avaliação das Propriedades Antioxidante, Hipolipemiante e Prebiótica do Jumbo Vermelho (SYZGIUM MALACCENSE)**" registrada com o nº **23076.013011/2017-47** sob a responsabilidade de Prof.ª **Tânia Lucia Monetengro Stamford** - 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 aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (UFPE), em reunião de 26/04/2017.

Finalidade	☐ Ensino ☒ Pesquisa Científica
Vigência da autorização	05/08/2017 a 20/10/2017
Espécie/linhagem/raça	Rato heterogêneo/ Wistar
Nº de animais	32
Peso/Idade	90 dias
Sexo	Macho
Origem	Biotério do Departamento de Nutrição

Atenciosamente


Prof. Sebastião R. F. Silva
 Vice-Presidente CEUA/UFPE
 SIAPE 2345691

