UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

CÁSSIA DIAS MACHADO DE SOUSA

**Cravo da Índia na microbiota intestinal e no metabolismo glicídico e
lipídico de camundongos alimentados com dieta hiperlipídica**

Ribeirão Preto
2020

CÁSSIA DIAS MACHADO DE SOUSA

Cravo da Índia na microbiota intestinal e no metabolismo glicídico e lipídico de camundongos alimentados com dieta hiperlipídica

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP para obtenção de título de Mestre em Clínica Médica

Área de concentração: Clínica Médica

Opção: Investigação Biomédica

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Vivian Marques Miguel Suen

Versão corrigida. A versão original encontra-se disponível tanto na Biblioteca da Unidade que aloja o Programa, quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD).

Ribeirão Preto

2020

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo de pesquisa, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

de Sousa, Cássia Dias Machado

Cravo da índia na microbiota intestinal e no metabolismo glicídico e lipídico de camundongos alimentados com dieta hiperlipídica, 2020.

81 p. : il. ; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Investigação Biomédica.

Orientador: Suen, Vivian Marques Miguel.

1. Obesidade. 2. Microbiota Intestinal. 3. Cravo da índia. 4. Diabetes tipo 2. 5. Fitoterapia.

FOLHA DE APROVAÇÃO

de Sousa, C. D. M.

Cravo da Índia na microbiota intestinal e no metabolismo glicídico e lipídico de camundongos alimentados com dieta hiperlipídica

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas.

Aprovado em: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof.(a) Dr.(a) _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof.(a) Dr.(a) _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof.(a) Dr.(a) _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

"O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001".

Dedicatória

Aos meus pais Alcídio e Jânia que dedicaram e dedicam suas vidas para tornar minha jornada possível, ao meu esposo Ivan, companheiro que sempre me ajuda, impulsiona e apoia e ao meu irmão Josué.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus, por seu amor e pela sua infinita misericórdia, sou apenas vaso de barro em suas mãos.

A minha orientadora Prof^a Dra^a Vivian Suen pela oportunidade, confiança, amizade e apoio. Uma grande referência para mim.

A todos os colegas do Laboratório de Nutrição, Neurociências e Metabolismo - LANNEM. De mãos dadas temos como resultado este trabalho.

A equipe do laboratório de Nutrição do HC e aos Técnicos do Biotério da Clínica Médica que com paciência compartilharam experiências que agregaram a este trabalho.

À pós doutoranda Priscila Fassini pelas contribuições, oportunidades e ensinamentos.

À doutoranda Caroline Bertoncini, pela paciência dedicada, pelas várias vezes que me forneceu ajuda em todas as etapas do processo deste mestrado, a verdadeira recompensa nunca virá de mãos humanas, que Deus a abençoe muito.

À doutoranda Letícia Bizari, pelas contribuições com essa dissertação, oportunidades de aprendizado, conselhos, apoio e companhia.

À mestranda Marina Rodrigues, verdadeira companheira.

Ao colega Anderson Gregório pelas discussões produtivas, ajudas nas compreensões de estatísticas e na companhia de disciplinas.

Ao laboratório da Profª Daniela Carlos Sartori, pelo auxílio técnico com as dosagens de colesterol, triglicerídeos, insulina, extração de DNA das fezes e análise de PCR.

Ao laboratório do Profº Eduardo Coelho, em especial à pesquisadora Andreia Leone, pelo auxílio técnico com os procedimentos de histologia.

Ao laboratório de patologia do HC, em especial a Profª. Drª. Leandra Ramalho, pelo auxílio com análise das lâminas histológicas.

Ao laboratório de Cultura de Células da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, em especial a Maria Ap. Nunes Ferreira (Ceci), pelo auxílio no armazenamento dos materiais.

Ao laboratório do Prof. Dr. Osvaldo de Freitas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto por nos guiar e auxiliar com o preparo do suplemento utilizado nesta pesquisa. A Maira pertencente a este laboratório pela paciência e disponibilidade empregadas a mim quando necessário.

Ao Prof. Dr. Edemílson C. da Conceição que preparou o extrato de cravo da índia que motivou este estudo.

A CAPES, pelo auxílio e apoio concedido, que me permitiu dedicação exclusiva a esse trabalho.

A minha madrasta Viviane Machado por todo apoio e torcida.

Não conheço quem tenha se desenvolvido sozinho, devo a várias pessoas que com carinho, trabalho e dedicação me ajudam a escrever a minha trajetória.

RESUMO

de Sousa, C. D. M. **Cravo da índia na microbiota intestinal e no metabolismo glicídico e lipídico de camundongos alimentados com dieta hiperlipídica**. 2020. 81f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto, 2020.

Introdução: obesidade é uma doença crônica e multifatorial, podendo ser determinada pelo excesso relativo ou absoluto das reservas corporais de gordura. Diante do aumento de sua prevalência, inúmeros tratamentos têm surgido e dentre eles, um grande interesse pelo potencial dos fitoterápicos. Entre as espécies de vegetais estudadas, tem-se o cravo da índia (*Syzygium aromaticum*), com possíveis atividades antioxidante, anti-inflamatória e hipoglicemiante, desempenhando assim um papel importante na obesidade. **Objetivo:** avaliar os efeitos do uso de cravo da índia na microbiota intestinal, no perfil lipídico e glicídico, peso corporal, peso dos tecidos e acúmulo de lipídio hepático e pancreático em animais alimentados com dieta hiperlipídica. **Metodologia:** foram utilizados 48 camundongos (C57BL/6) machos, os quais foram divididos em 4 grupos com 12 animais cada: dieta padrão, dieta padrão com cravo, dieta hiperlipídica e dieta hiperlipídica com cravo. Os animais do grupo dieta padrão foram alimentados com uma ração padrão *ad libitum* (Nuvilab®) e os do grupo dieta hiperlipídica foram alimentados com ração hiperlipídica durante 10 semanas. A suplementação de extrato de cravo da índia foi feita via gavagem na dose de 250 mg/kg/dia nos grupos dieta padrão com cravo e dieta hiperlipídica com cravo. Durante o experimento o peso corporal foi avaliado semanalmente e ingestão diariamente. Foi realizado o teste de tolerância à glicose na última semana de experimento e o teste de sensibilidade à insulina foi realizado 48 horas após o teste de tolerância a glicose, ambos após jejum de 8 horas. Ao final do período experimental, os animais foram eutanasiados e coletadas amostras sanguíneas para dosagem de: insulina, colesterol total e triglicerídeos, além dos órgãos e tecidos: fígado, pâncreas, tecido adiposo retroperitoneal, epididimal e marrom. Todos os testes de hipóteses desenvolvidos neste trabalho consideraram uma significância de 5%. As análises foram feitas via ANOVA *one way* seguida pelo teste *post hoc* de Tukey. **Resultados:** para ingestão o grupo dieta padrão apresentou maior consumo, logo, ganhando mais peso quando comparado ao dieta padrão com cravo da índia. Nos grupos de dieta hiperlipídica, observa-se que a dieta foi eficiente para o ganho de peso, pois ao comparar com os grupos de dieta padrão tiveram maior ganho de peso, apesar do grupo dieta padrão ter apresentado maior ingestão. Para as gorduras retroperitoneal e epididimal, essas não se diferiram entre os grupos de dieta padrão e nos grupos de dieta hiperlipídica foram maiores no grupo suplementado. Na gordura marrom, o suplemento não se mostrou eficaz. Para a histologia foi possível observar que o cravo da índia foi eficiente em prevenir o acúmulo de gordura hepática. Quanto a microbiota observou-se melhora através do aumento no filo *Bacteroidetes* nos grupos suplementados. **Conclusão:** o cravo da índia pareceu melhorar um filo benéfico na microbiota intestinal dos grupos suplementados e aparentou exercer efeito protetor no fígado dos grupos de dieta hiperlipídica, apesar de não prevenir o ganho de peso e o aumento de gordura corporal. Também não promoveu melhora no metabolismo glicídico e lipídico.

Palavras-chave: obesidade, microbiota intestinal, cravo da índia, diabetes tipo 2, fitoterapia.

ABSTRACT

de Sousa, C. D. M. **Clove in the gut microbiota and glycemic and lipid profile of high fat diet-fed mice**. 2020. 81s. Dissertation (Master of Science) – Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo. Ribeirão Preto, 2020.

Introduction: obesity is a chronic and multifactorial disease, which can be determined by the relative or absolute excess of body fat reserves. In view of the increase in its prevalence, numerous treatments have emerged and among them, a great interest in the potential of herbal medicines. Among the vegetable species studied, there is the clove (*Syzygium aromaticum*), with possible antioxidant, anti-inflammatory and hypoglycemic activities, thus playing an important role in obesity. **Objective:** to evaluate the effects of the use of cloves on the intestinal microbiota, on the lipid and glycidic profile, body weight, tissue weight and accumulation of hepatic and pancreatic lipid in animals fed a high-fat diet. **Methods:** 48 male mice (C57BL / 6) were used, which were divided into 4 groups with 12 animals each: standard diet, standard diet with cloves, hyperlipidic diet and hyperlipidic diet with cloves. Animals in the standard diet group were fed a standard *ad libitum* diet (Nuvilab®) and those in the high-fat group were fed with high-fat diet for 10 weeks. The supplementation of clove extract was done via gavage at a dose of 250 mg / kg / day in the groups of standard diet with cloves and hyperlipidic diet with cloves. During the experiment, body weight was assessed weekly and daily intake. The glucose tolerance test was performed in the last week of the experiment and the insulin tolerance test was performed 48 hours after the glucose tolerance test, both after fasting for 8 hours. At the end of the experimental period, the animals were euthanized and blood samples were collected to measure: insulin, total cholesterol and triglycerides, in addition to organs and tissues: liver, pancreas, retroperitoneal, epididymal and brown adipose tissue. All hypothesis tests developed in this work considered a 5% significance. The analyses were conducted by, ANOVA one way and post hoc Tukey. **Results:** for ingestion, the standard diet group had higher consumption, therefore, gaining more weight when compared to the standard diet with cloves. In the high-fat diet groups, it was observed that the diet was efficient for weight gain, because when comparing with the standard diet groups, they had greater weight gain, despite the fact that the standard diet group had greater intake. For retroperitoneal and epididymal fats, these did not differ between the standard diet groups and in the high-fat diet groups were higher in the supplemented group. In brown fat, the supplement was not effective. For histology, it was possible to observe that cloves were efficient in preventing the accumulation of liver fat. As for the microbiota, improvement was observed through the increase in the phylum *Bacteroidetes* in the supplemented groups. **Conclusion:** cloves appeared to improve a beneficial phylum in the intestinal microbiota of the supplemented groups and appeared to have a protective effect on the liver of the high-fat groups, despite not preventing weight gain and increasing body fat. It also did not promote improvement in glycidic and lipid metabolism.

Keywords: obesity, gut microbiota, clove, type 2 diabetes, phytotherapy.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Mecanismos do acúmulo de gordura hepática.	19
Figura 2 - Adipócito branco de um rato.....	20
Figura 3 - Adipócito marrom de um rato.	21
Figura 4 - Botões de flores de cravo da índia desidratados.....	24
Figura 5 - Organograma de divisão dos grupos de animais e tempos de tratamento.	33
Figura 6 - Cromatografia gasosa do extrato de cravo da índia.....	43
Figura 7 - A e B - Análise da ingestão alimentar dos camundongos ao longo das 8 semanas de tratamento e consumo total de cada grupo.....	44
Figura 8 - A e B - Análise de peso corporal dos camundongos ao longo das 8 semanas de tratamento e ganho de peso total de cada grupo.....	45
Figura 9 - A e B - Valores de glicemia no teste de GTT nos diferentes tempos e diferentes grupos e área sob a curva no teste de GTT.	46
Figura 10 - A e B - Valores de glicemia no teste de ITT nos diferentes tempos e diferentes grupos e área sob a curva no teste de ITT.	47
Figura 11 - Cortes de tecido hepático corados com H&E de cada grupo.	50
Figura 12 - Cortes de tecido pancreático corados com H&E de cada grupo.	51
Figura 13 - A- D – Gráficos de cada filo de bactéria comparando todos os grupos.	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição da DH.....	36
Tabela 2 - Composição de macronutrientes das dietas padrão e hiperlipídica (G/100G).	36
Tabela 3 - Sequência de primers para as bactérias de interesse neste estudo...40	
Tabela 4 - Análise bioquímica dos camundongos após 8 semanas de tratamento, comparando os grupos.....	48
Tabela 5 - Análise do peso dos tecidos dos camundongos coletados no momento da eutanásia, comparando os grupos.	49

LISTA DE ABREVIATURAS

AGL – Fluxo de ácidos graxos livres

CG-EM – Cromatógrafo gasoso acoplado a um espectrômetro de massas

CLS – Estruturas semelhantes a uma coroa

CT – Colesterol total

DCNT – Doença crônica não transmissível

DM2 – Diabetes mellitus tipo 2

DHC – Dieta hiperlipídica + extrato de cravo da índia

DHGNA – Doença hepática gordurosa não alcoólica

DH – Dieta hiperlipídica

DNA – Ácido desoxirribonucleico

DPC – Dieta padrão + extrato de cravo da índia

DP – Dieta padrão

FAS – FAS ligante

FCFRP – USP – Faculdade de ciências farmacêuticas de Ribeirão Preto –
Universidade de São Paulo

GTT – Teste de tolerância à glicose

H&E – Hematoxilina-Eosina

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IMC – Índice de Massa Corporal

ITT – Teste de sensibilidade à insulina

OMS – Organização Mundial da Saúde

PCR - Reação em cadeia da polimerase

POF – Pesquisa de Orçamentos Familiares

PPAR γ – Receptor ativado por proliferador de peroxissoma gama

RDC – Resolução da diretoria colegiada

RI – Resistência à insulina

SREBP-1 – Fator de transcrição 1 de ligação ao elemento regulador de esterol

TACO – Tabela Brasileira de Composição de Alimentos

TG – Triglicérides

TNF- α – Fator de necrose tumoral-alfa

UCP1 – Proteína desacopladora 1

VIGITEL – Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico

VLDL – Lipoproteína de muito baixa densidade

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 JUSTIFICATIVA.....	27
3 HIPÓTESE	29
4 OBJETIVOS.....	31
5 METODOLOGIA	33
5.1 Desenho Experimental	33
5.2 Preparo do extrato de cravo da índia	34
5.3 Análise dos constituintes químicos do extrato de cravo da índia	35
5.4 Composição da dieta e análise do consumo alimentar	35
5.5 Análise ponderal.....	36
5.6 Teste de tolerância à glicose (GTT)	37
5.7 Teste de sensibilidade à insulina (ITT)	37
5.8 Eutanásia dos Animais	37
5.9 Parâmetros bioquímicos.....	38
5.9.1 Insulina	38
5.9.2 Colesterol total e triglicerídeos	38
5.10 Análise Histológica	39
5.11 Análise da microbiota intestinal	39
5.12 Análise estatística.....	40
6 RESULTADOS.....	43
6.1 CG-EM do extrato de cravo da índia	43
6.2 Ingestão alimentar	44
6.3 Peso corporal	45
6.4 Parâmetros bioquímicos.....	48
6.5 Peso dos tecidos	49
6.6 Histologia.....	50
6.6.1 Fígado	50
6.6.2 Pâncreas	51

6.7 Microbiota intestinal.....	52
7 DISCUSSÃO	54
8 CONCLUSÃO	62
REFERÊNCIAS.....	64
ANEXOS	71
ANEXO 1 - Aprovação do CEUA – Comitê de Ética para Uso Animal da FMUSP.....	71
ANEXO 2 - Condições instrumentais de análise dos constituintes químicos do extrato de cravo da Índia.....	72
ANEXO 3 - Relatório da análise dos constituintes químicos do extrato de cravo da Índia.....	75
ANEXO 4 - Histologia em Parafina.....	81

Introdução

1 INTRODUÇÃO

A obesidade é considerada uma doença crônica não transmissível (DCNT), ^{1, 2} de etiologia multifatorial onde fatores genéticos, ambientais, sócio econômico e sedentarismo contribuem para o desequilíbrio crônico entre a ingestão calórica e o gasto energético, resultando em um saldo positivo de calorias. ^{3, 4}

Atualmente a obesidade é um problema de saúde global e estudos recentes estimam que cerca de 1,5 milhões de pessoas estão acima do peso ideal de acordo com o Índice de Massa Corporal (IMC).^{1,5} Anteriormente mais incidente em países desenvolvidos, hoje só se faz aumentar em países subdesenvolvidos e em desenvolvimento,⁵ tanto em áreas urbanas como em áreas rurais, fato surpreendente nos estudos, pois se esperava baixos índices nas zonas rurais, no entanto, o acesso à tecnologia e aos alimentos industrializados levou ao aumento da prevalência de obesidade nesta população.⁶

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), em 2025, cerca de 2,3 bilhões de adultos estarão com sobrepeso e mais de 700 milhões, obesos no mundo todo.⁷

No Brasil, a última Pesquisa de Orçamentos Familiares (POF) 2008-2009 realizada em parceria com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) e o Ministério da Saúde, analisando dados de 188 mil brasileiros de todas as idades, mostrou que 29,4% apresentavam obesidade.⁸ Dados mais recentes do levantamento do programa Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico (VIGITEL) apurou em 2017 que o excesso de peso e a obesidade cresceram em 10 anos, cerca de 26,3% e 60%, respectivamente, dados alarmantes que exigem medidas urgentes de prevenção e tratamento.⁹

A doença tem como indicador epidemiológico de diagnóstico o IMC, calculado por meio da divisão do peso em kg pela estatura em metros elevada ao quadrado (kg/m^2). A circunferência abdominal, por sua vez, reflete de modo indireto o conteúdo de gordura visceral. Ambas são medidas que indicam o risco de desenvolvimento de comorbidades associadas à obesidade como o diabetes mellitus tipo 2 (DM2) e as doenças cardiovasculares.¹⁰

A obesidade desempenha papel fisiopatológico relevante no desenvolvimento de problemas de saúde. Pelo fato de o tecido adiposo atuar no metabolismo lipídico e glicídico e causar inflamação de baixo grau. É necessário classificar a obesidade

também com base na composição e distribuição da gordura corporal, do que apenas estimar pelo cálculo de IMC.⁴

O excesso de peso também está relacionado ao desenvolvimento de outras doenças crônicas, como: doenças cardiovasculares, acidente vascular encefálico, problemas ortopédicos, esteatose hepática e câncer.^{1,10-13} Em casos extremos, a obesidade pode reduzir a expectativa de vida em 6 a 14 anos.⁴

Recentemente, o excesso de adiposidade tem sido associado às características fisiopatológicas subjacentes ao DM2. O acúmulo de lipídios no fígado, por exemplo, está associado à resistência à insulina (RI), controle glicêmico prejudicado e aumento do risco de doenças cardiovasculares. Pequenas quantidades de gordura nas células musculares, no pâncreas e no miocárdio também têm sido associadas à resistência periférica à insulina, secreção diminuída de insulina e hipertensão.¹⁴⁻¹⁸

Na obesidade e na RI, há um aumento do fluxo de ácidos graxos livres (AGL) no fígado, estes sofrem β -oxidação ou são esterificados com glicerol para formar triglicerídeos, levando ao acúmulo hepático de gordura. Atualmente, existem evidências substanciais de que os AGL podem causar diretamente toxicidade, aumentando o estresse oxidativo e a ativação de vias inflamatórias.¹⁹

Os AGL surgem no fígado de três fontes distintas: lipólise (hidrólise de AGL e glicerol a partir de triglicerídeos) no tecido adiposo, alimentação e de novo lipogênese. Em contraste, os AGL podem sofrer β oxidação para a produção de energia, podem ser reesterificados em triglicerídeos e armazenados como gotículas de lipídios, ou embalados e exportados como lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL).¹⁹

Portanto, o acúmulo hepático de gordura pode ocorrer como resultado do aumento da síntese de gordura, aumento da oferta de gordura, diminuição da exportação de gordura e/ou diminuição da oxidação da gordura (Figura 1).²⁰

Figura 1 - Mecanismos do acúmulo de gordura hepática.

Alterações metabólicas que levam ao desenvolvimento de esteatose hepática.²⁰

O tecido adiposo era considerado um tecido inerte, entretanto, após 1993 quando Hostamigil e seus colaboradores descobriram que células de tecido adiposo de roedores eram capazes de secretar a citocina pró-inflamatória TNF- α (fator de necrose tumoral- α , do inglês: tumor necrosis factor α), e 1994 com a descoberta da leptina por Zhang e sua equipe, o tecido adiposo deixou de ser caracterizado como um sítio inerte e passou a ser conhecido como um órgão endócrino ativo com várias funções em diferentes vias fisiológicas além das já conhecidas homeostase energética e termorregulação.²¹

Nas mais recentes funções inclui-se: inflamação, sensibilidade a insulina, homeostase vascular, com habilidade de produzir e liberar uma variedade de peptídeos inflamatórios bioativos conhecidos coletivamente como adipocinas.²¹

No corpo humano, há dois tipos principais de tecido adiposo: tecido adiposo marrom, localizado nas regiões supraclavicular e paravertebral e o tecido adiposo branco que é o mais abundante e inclui o tecido adiposo subcutâneo e visceral, ambos com características morfológicas e funcionais distintas.^{22, 23}

Os adipócitos brancos contêm uma única gota lipídica grande, ocupando cerca de 90% do volume celular, o núcleo é próximo às imediações celulares e o citoplasma forma uma borda muito fina.²⁴

As organelas são pouco desenvolvidas, as mitocôndrias são particularmente bem pequenas, alongadas e com cristais curtos e aleatoriamente organizados.²⁴

Com essas características essas células são chamadas de adipócitos uniloculares (Figura 2).²⁵⁻²⁶ O excesso de deposição de gordura do tipo branco é associado ao aumento de riscos de morbidade e mortalidade.²⁴

Figura 2 - Adipócito branco de um rato.

Microscopia eletrônica de transmissão de um adipócito branco epididimático de um rato de 3 semanas de idade. N, núcleo; m, mitocôndrias; L, gotícula lipídica. Barra de escala: 3 mm. (Cinti S. O órgão adiposo. Milão: Kurtis, 1999).

Já os adipócitos marrons são menores que os adipócitos brancos, seu citoplasma contém várias gotículas lipídicas, um núcleo arredondado e muitas mitocôndrias grandes, geralmente esféricas com crista laminar. Essas mitocôndrias

contêm uma proteína única chamada de proteína desacopladora 1 (UCP1), que realiza a função mitogênica dos adipócitos marrons e com essas características essas células são chamadas de adipócitos multiloculares (Figura 3).^{27, 28}

Figura 3 - Adipócito marrom de um rato.

Microscopia eletrônica de transmissão de um adipócito marrom interescapular de um rato de 10 dias de idade. Mitocôndrias grandes e geralmente esféricas com crista laminar (m). N, núcleo; L, gota lipídica; CAP, capilar. Barra de escala: 3 μ m. (Cinti S. O órgão adiposo. Milão: Kurtis, 1999).

A diferença morfológica dos adipócitos branco e marrom sustenta seus diferentes papéis funcionais. O adipócito branco armazena energia (na forma de lipídios) que é liberada entre as refeições: sua gota lipídica é esférica porque esta é a forma geométrica que maximiza o volume e minimiza a ocupação do espaço. O adipócito marrom queima lipídios para produzir calor: sua multilocularidade maximiza a interface citoplasmática-lipídica, disponibilizando rapidamente grandes quantidades de ácidos graxos para desacoplamento mitocondrial e consequentemente termogênese.²⁷

A etiopatogenia da obesidade ainda não está bem estabelecida, sendo multifatorial, porém alguns estudos têm esclarecido algumas outras causas prováveis.⁴

Outro destaque quando se trata da obesidade é a microbiota intestinal dada à sua possível participação na fisiopatologia da doença. Ela é composta por mais de 2000 espécies diferentes de bactérias e mais de 70 filos.²⁹

Atualmente, a composição e a diversidade da microbiota intestinal são reveladas por técnicas metagenômicas e cultura genética independente.³⁰

A análise metagenômica e o sequenciamento de genes RNA ribossômico 16S mostraram que *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Fusobacteria*, *Spirochaetae* e *Verrucomicrobia* são os filos bacterianos predominantes entre as bactérias intestinais em adultos, sendo que *Firmicutes* e *Bacteroidetes* constituem cerca de 90% de todas as células microbianas intestinais.³¹

O genoma de microrganismos presentes na microbiota intestinal é passível de alterações dinâmicas na configuração de seus componentes com o intuito de adaptação de um componente individual ou de uma comunidade em resposta ao tipo de alimentação, alguma anormalidade, ambiente ou uso de antibióticos.³² Quando essa microbiota se encontra em estado de disbiose, ela é relacionada a várias condições clínicas, como: obesidade, DM2, doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA), aterosclerose, doenças alérgicas, doenças gastrointestinais, doenças autoimunes e câncer.³³

Além dos papéis já conhecidos como barreira protetora contra bactérias patogênicas, absorção de vitaminas e homeostase energética, atualmente tem sido estudado o seu papel no desenvolvimento da obesidade e de suas complicações.³⁴

Indivíduos com obesidade têm menos *Bacteriodes* e mais *Firmicutes*, em comparação com indivíduos eutróficos. As alterações nas quantidades relativas de filos estão associadas com aumento da capacidade de captação de energia dos alimentos, com o aumento da gordura visceral e da inflamação de baixo grau a ela associada, disfunção hepática e desordens metabólicas.³⁵

O mecanismo pelo qual a maior proporção de *Firmicutes* aumenta a absorção de energia parece estar relacionado com a presença de genes que codificam enzimas que decompõem polissacarídeos que não podem ser digeridos pelo hospedeiro.

A partir da fermentação desses polissacarídeos formam-se ácidos graxos de cadeia curta, os quais são convertidos em triglicerídeos no fígado. Ressalta-se

também que a composição da microbiota intestinal influencia a regulação dos genes que promovem a deposição de lipídios nos adipócitos.³⁶

Diante do exposto, o tratamento e/ou a prevenção da obesidade são extremamente necessários e urgentes. Há diversas abordagens para promover a perda de peso, intervenções comportamentais e farmacológicas são mais indicadas, no entanto, essas intervenções parecem ter pouco eficácia na obesidade. A cirurgia bariátrica, embora eficaz na redução do peso corporal, nas comorbidades relacionadas, e na melhoria da qualidade de vida, é invasiva e está associada a várias outras complicações e, muitas vezes, têm benefícios a curto prazo.³⁷

Sem elucidar os aspectos biológicos, ambientais e sociais, e as causas da atual epidemia de obesidade, permaneceremos sem estratégias eficientes para prevenir, gerenciar e tratar essa complexa desordem.³⁸

Existem ainda terapias complementares, em que o uso é crescente no mundo todo, como exemplo a Fitoterapia, que tem sido utilizada há centenas de anos.³⁹

A legislação brasileira RDC Nº 26, (13 de maio de 2014, artigo 3º) diz que fitoterápicos são:

produto obtido de matéria-prima ativa vegetal, exceto substâncias isoladas, com finalidade profilática, curativa ou paliativa, incluindo medicamento fitoterápico e produto tradicional fitoterápico, podendo ser simples, quando o ativo é proveniente de uma única espécie vegetal medicinal, ou composto, quando o ativo é proveniente de mais de uma espécie vegetal.⁴⁰

Dentre as várias espécies estudadas, tem-se o *Syzygium aromaticum*, popularmente conhecido no Brasil como cravo da Índia (Figura 4), nativo das ilhas Maluku do leste da Indonésia. Ele é um botão de flor aromático comercializado para uso culinário e medicinal na Europa Medieval no século XIV. Atualmente ainda é usado em preparações picantes e como fitoterápico principalmente na África e na Ásia, tem cor marrom, intensa fragrância e sabor ardente. É conhecido por possuir ação antioxidante, antifúngica, anti-inflamatória, antiviral, antimicrobiano, antidiabético, antitrombótico, anestésico, anticarcinogênico, anticonsulsivo e analgésico.^{41,42}

Figura 4 - Botões de flores de cravo da Índia desidratados.

(Fonte: <https://www.bhmudas.com.br/Cravo-da-India> acessado em 16/09/19).

O cravo da Índia é uma fonte rica de eugenol, acetato de eugenol, cariofileno, éster de sesquiterpeno, fenilpropanóide e β -cariofileno, além de taninos e triterpenóides.⁴¹⁻⁴⁴

Dentre as ações benéficas do eugenol, Adefegha SA e Oboh (2012) demonstraram que ele estimulou a produção interna de muco na mucosa intestinal de camundongos (um aumento médio de 59%) em comparação com camundongos não tratados. A camada reduzida de muco também interfere na homeostase intestinal com maior absorção de energia.⁴⁵

Khathi et al. (2013) utilizaram o extrato de cravo da Índia em camundongos com DM2 e sua ação retardou a digestão de monossacarídeos, dissacarídeos e polissacarídeos melhorando a hiperglicemia pós-prandial, sem efeitos colaterais.⁴⁶

Estudo realizado por Jung et al. (2012), forneceu evidências sólidas de que a suplementação com cravo da Índia exerce um efeito anti-obesidade em camundongos obesos induzidos por dieta hiperlipídica por meio da regulação dos genes: fator de transcrição 1 de ligação ao elemento regulador de esterol (SREBP-1), FAS ligante (FAS), CD36 e receptor ativado por proliferador de peroxissoma gama (PPAR γ) que estão relacionados ao metabolismo lipídico no fígado e na gordura epididimal, de uma maneira que resulta na redução do acúmulo lipídico. Esses resultados apoiam fortemente o potencial do cravo da Índia como um complemento anti-obesidade atuando na regulação do peso corporal.⁴⁷

O cravo da Índia tem um grande potencial de emprego em vários segmentos da saúde. Porém, apesar do número crescente de investigação científica sobre plantas medicinais como suplementos naturais para redução do peso corporal, poucos estudos especificamente citam o uso de cravo da Índia na prevenção da obesidade e doenças metabólicas como o DM2 e a síndrome metabólica.⁴⁷

Diante de todos os benefícios demonstrados do cravo da Índia até o momento e do papel da microbiota intestinal na fisiopatologia da obesidade, o estudo do efeito do cravo da Índia na modulação da microbiota intestinal é de fundamental importância.

Justificativa

2 JUSTIFICATIVA

O cravo da Índia é uma planta muito versátil e ainda pouco conhecidos seus efeitos na prevenção e tratamento da obesidade. Além disso, seus efeitos na microbiota intestinal e relação obesidade versus microbiota ainda não estão completamente esclarecidos, o que motivou o desenvolvimento desse estudo.

Hipótese

3 HIPÓTESE

A suplementação de cravo da índia em camundongos alimentados com dieta hiperlipídica, modula a microbiota intestinal, previne o acúmulo de tecido adiposo e melhora o perfil lipídico e glicídico.

Objetivos

4 OBJETIVOS

Avaliar os efeitos do uso de cravo da Índia em modelo animal alimentado com dieta hiperlipídica:

- Na abundância relativa dos filos: *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Actinobacteria* e *Proteobacteria* na microbiota intestinal;
- Na concentração sérica de triglicérides (TG), colesterol total (CT), glicemia, insulina;
- No peso corporal total, peso dos tecidos adiposos branco, adiposo marrom, fígado, pâncreas e acúmulo de lipídio hepático e pancreático.

Metodologia

5 METODOLOGIA

5.1 Desenho Experimental e manutenção dos animais

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP, em 02/12/2015, protocolo nº 16/2015-1 e iniciado somente após aprovação (Anexo 1).

Estudo experimental, longitudinal, prospectivo, randomizado de abordagem quantitativa, utilizou-se de 48 camundongos machos C57BL/6, 60 dias após o nascimento, provenientes do Biotério Central da Universidade de São Paulo, *campus* Ribeirão Preto.

Figura 5 - Organograma de divisão dos grupos de animais e tempos de intervenção.

Recebido os 48 animais no Biotério da Clínica Médica eles foram mantidos em gaiolas seletivas à temperatura de $25 \pm 1,0$ °C em ambiente com ciclo de luminosidade de 12 horas (6:00 às 18:00h) com água e ração padrão (NUVILAB® CR1) *ad libitum* por um período de adaptação de uma semana com quatro animais por caixa.

Após, foram randomizados em dois grupos com 24 animais cada para adaptação da dieta hiperlipídica, assim ficaram por duas semanas, como indicado a seguir:

- Dieta padrão (DP): submetidos à DP do biotério (NUVILAB® CR1);
- Dieta hiperlipídica (DH): submetidos à DH.

Após, os grupos foram novamente randomizados e divididos em subgrupos conforme descrito abaixo:

- Dieta padrão (DP, n=12): animais que receberam a DP;
- Dieta padrão + cravo da índia (DPC, n=12): animais que receberam DP + suplemento de extrato de cravo da índia
- Dieta hiperlipídica (DH, n=12): animais que receberam DH manipulada;
- Dieta hiperlipídica + cravo da índia (DHC, n=12): animais que receberam DH manipulada + suplemento de extrato de cravo da índia.

5.2 Preparo do extrato de cravo da índia

O extrato de cravo da índia foi elaborado e preparado em parceria com a Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP, de modo descrito a seguir:

Foi adquirido 1 kg de botões florais de cravo da índia (*Syzygium aromaticum*) em uma distribuidora de produtos naturais, no mercado central de Ribeirão Preto, SP.

Os botões foram moídos em moinho de martelos de malha com diâmetro de 2 cm. Em seguida, o pó originado da moagem foi colocado em contato com 5 litros de álcool etílico 96% em um recipiente de aço inox com capacidade de 10L e posteriormente agitado por um agitador de hélice a uma velocidade de 1000RPM durante 3 dias.

O extrato obtido após a agitação foi concentrado em um concentrador com velocidade forçada de ar até a consistência de uma massa (extrato mole) e então foi disposto em vidro âmbar, armazenado sob refrigeração e posteriormente encaminhado para análise dos constituintes químicos

5.3 Análise dos constituintes químicos do extrato de cravo da Índia

Realizada pelo Núcleo de Pesquisa em Produtos Naturais e Sintéticos na FCFRP – USP.

O preparo das soluções padrões para curva de calibração foram realizadas a partir de uma solução mãe de eugenol padrão (Sigma®) na concentração de 20,77g L⁻¹, foram feitos cinco soluções padrão com concentrações de 0,52g L⁻¹, 1,04g L⁻¹, 2,08g L⁻¹, 4,15g L⁻¹ e 6,23g L⁻¹. Utilizou-se como padrão interno o 1,8- Cineole (eucaliptol) na concentração de 1,63 g L⁻¹ em cada solução padrão de eugenol.

A amostra óleo de cravo da Índia foi preparada na concentração de 6,27 g L⁻¹, tendo como padrão interno 1,8-Cineole na mesma concentração usada nas soluções dos padrões, 1,63g L⁻¹.

A análise de quantificação do extrato de cravo da Índia foi realizada em um cromatógrafo gasoso acoplado a um espectrômetro de massas (CG-EM) Shimadzu®, modelo QP-2010, utilizando-se uma coluna capilar RTx-5MS –RESTEK de 30 m, 0,25mm de diâmetro interno e 0.25 µm de espessura da fase. Gás de arraste utilizado foi o Hélio e volume de injeção 1,0 µL.

A identificação dos compostos foi através da comparação de seus espectros de massa com os compostos do banco de dados do sistema descritos na literatura.

5.4 Composição da dieta e análise do consumo alimentar

A ração comercial Nuvilab® CR1 foi utilizada como DP, sendo disponibilizada como ração padrão do Biotério da Clínica Médica da FMRP-USP, baseada na recomendação pelo *American Institute of Nutrition*, AIN-93, para roedores em crescimento. A DH, previamente padronizada, foi constituída pela composição apresentada na (Tabela 1).

Tabela 1 - Composição da DH.

Ingredientes	Quantidades (g)
Ração comercial Nuvilab® CR1 moída	400
Frutose	400
Banha suína	200
Óleo de soja	100
BHT	0,004

A quantidade suplementada de extrato foi de 250 mg/kg peso do animal, e por via oral a solução foi introduzida no trato digestório dos animais através de cânula metálica acoplada a seringa (gavagem), por 8 semanas. Nos animais que não receberam a suplementação, foi administrado apenas óleo de soja (veículo) com o objetivo de gerar o mesmo estresse em todos os grupos e também para que a única diferença entre os grupos fosse o extrato.

A dieta oferecida diariamente foi fracionada em pequenas porções pesadas e acondicionadas em comedouro específico. A sobra do comedouro foi pesada para ser calculada a quantidade final de alimento ingerido diariamente. A água oferecida foi renovada diariamente.

Tabela 2 - Composição de macronutrientes das dietas padrão e hiperlipídica (g/100g).

	Padrão*	Hiperlipídica**
Carboidratos	62,5%	28,5%
Lipídios	25,5%	60%
Proteínas	12%	11,5%
Energia (kcal)	269,7	487,2

* Padrão. Fonte: Nuvilab®

** Hiperlipídica. Fonte: Tabela Brasileira de Composição de Alimentos – Taco Versão 4. ⁴⁸

5.5 Análise ponderal

Os animais, durante 12 semanas, foram acompanhados por meio do levantamento de medidas de peso pré-tratamento e a cada semana. A balança

utilizada foi digital com capacidade máxima para 15 kg (Filizola S. A., São Paulo, Brasil).

5.6 Teste de tolerância à glicose (GTT)

Foi realizado na última semana do experimento o teste de tolerância à glicose (GTT), após jejum de 8 horas, assim como a primeira coleta de sangue (tempo 0) por meio de corte na extremidade caudal do animal. Logo a seguir, foi administrada, via intraperitoneal, uma solução de glicose na dose de 1mg/g peso do animal, de acordo com protocolo desenvolvido pelo mesmo grupo de pesquisa. A coleta de sangue foi realizada nos tempos 0', 30', 60' e 120'. As concentrações de glicose foram determinadas através de glicosímetro Accu-Chek® (Accu-chek Performa Roche, Mannheim, Alemanha), de acordo com as especificações do fabricante.

5.7 Teste de sensibilidade à insulina (ITT)

Foi realizado 48hrs após do GTT o teste de sensibilidade à insulina (ITT) após jejum de 8 horas, quando foi feita a primeira coleta de sangue (tempo 0) por meio de corte na extremidade caudal do animal. Logo a seguir, foi administrada, via intraperitoneal, uma solução de insulina na dose de 2UI diluída em 10ml de soro fisiológico. A coleta de sangue foi realizada nos tempos 0', 30', 60' e 120'. As concentrações de glicose sanguínea foram determinadas através de glicosímetro Accu-Chek® (Accu-chek Performa Roche, Mannheim, Alemanha), de acordo com as especificações do fabricante.

5.8 Eutanásia dos Animais

Ao final do período de tratamento e com 12hrs de jejum, os animais foram eutanasiados por decapitação e foram coletadas amostras sanguíneas para dosagem de glicemia, insulina e lipidograma. Durante a eutanásia, foram coletadas amostras de tecido hepático, tecido adiposo epididimal, tecido adiposo retroperitoneal, tecido adiposo marrom e pâncreas, os quais foram pesados e imediatamente mantidos em nitrogênio líquido até o termino da eutanásia, quando foram conservados em freezer

-70°C. Fragmentos de tecidos hepático e pancreático foram separados para análise histológica.

Ainda no momento da eutanásia, o sangue coletado foi prontamente centrifugado a 3500rpm, a 4°C durante 15 minutos para a obtenção do soro, o qual foi armazenado em freezer a -70°C.

5.9 Parâmetros bioquímicos

5.9.1 Insulina

A concentração de insulina no soro dos camundongos foi determinada pelo Kit Elisa Ultrassensível (Mouse Ultrasensitive Insulin ELISA, Alpco Diagnostics, Salem, USA). Este kit é um imunoenensaio do tipo sanduíche, em que cada microplaca é revestida com anticorpo monoclonal específico para insulina.

5.9.2 Colesterol total e triglicerídeos

O CT analisado no soro foi determinado pelo método de colorímetro enzimático através de kits comerciais da Labtest® (Labtest Diagnóstica S.A., Brasil). Os ésteres de colesterol foram hidrolisados pelo colesterol esterase a ácidos graxos e a colesterol livre, que foi então oxidado pelo colesterol oxidase a colest-4-en-ona e a peróxido de hidrogênio. O fenol e a 4-aminoantipirina foram oxidados, na presença de peroxidase e peróxido de hidrogênio, formando a antipirilquinonimina com absorvidade máxima a 500nm, com intensidade da cor vermelha formada na reação final diretamente proporcional à concentração do colesterol da amostra.

Os TG hepáticos no soro foram determinados por meio da metodologia colorimétrica enzimática através de kits comerciais da Labtest® (Labtest Diagnóstica S. A., Brasil). A hidrólise dos triglicerídeos foi realizada pela lipase da lipoproteína, liberando o glicerol, que foi convertido em glicerol-3-fosfato, pela gliceriquinase. O glicerol-3-fosfato foi então oxidado a dihidroxiacetona e peróxido de hidrogênio na presença de glicerolfosfato oxidase. Posteriormente, foi realizada uma reação de acoplamento entre peróxido de hidrogênio, 4-aminoantipirina e 4-clorofenol, catalisada pela peroxidase, produzindo uma quinoneimina com absorvância máxima

de 505nm, sendo que a intensidade da cor vermelha formada é diretamente proporcional à concentração dos triglicerídeos da amostra.

Após a precipitação, alíquotas de 10µl foram adicionadas a 1ml de reagente de cor, encubados e então foi feita a leitura em espectrofotômetro. Para o padrão foi usado o reagente fornecido pelo kit.

Os resultados de todas as dosagens foram calculados a partir da diferença do resultado da absorbância das amostras, divididas pela absorbância do padrão, conforme recomendações do protocolo.

5.10 Análise Histológica

As secções de tecido fixadas com formalina e embebidas em parafina foram cortadas com uma espessura de 5 µm e coradas com hematoxilina e eosina para exame histológico. As preparações foram avaliadas, com as identificações não reveladas, por um patologista experiente através de microscopia óptica, o qual estimou a intensidade de esteatose hepática, balonização hepatocelular e sua localização no ácino hepático. A análise foi realizada em 10 campos de maior aumento escolhidos aleatoriamente (ampliação x400) em cada lâmina.

A classificação da gravidade das alterações histológicas foi a seguinte: ausência de alterações, alterações leves, alterações moderadas e alterações graves.

5.11 Análise da microbiota intestinal

Para avaliação da microbiota intestinal foi realizada coleta fecal simples após a eutanásia e então congeladas em nitrogênio líquido a -70°C até a sua utilização. A extração de DNA foi realizada para avaliar a expressão gênica de filos de bactérias da microbiota intestinal (*Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Proteobacteria* e *Actinobactéria*). O DNA das amostras de fezes foi extraído utilizando o kit de extração de DNA QuiampStool (Quiagen®) de acordo com as instruções do fabricante. A concentração de DNA foi determinada utilizando o aparelho NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, USA).

A reação em cadeia da polimerase (PCR) quantitativa de bactérias dos filos *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria* e *Proteobacteria* foi realizada usando primers universal para o gene 16S ribossômico (rRNA 16S) (eubactéria) ou

específicos para os diferentes filos. As diferenças (ΔCT) entre os valores do limiar do ciclo (CT) de eubactérias e grupos bacterianos específicos foram usadas para obter níveis normalizados de cada grupo bacteriano ($2^{-\Delta CT}$). A abundância relativa de cada grupo bacteriano foi obtida após a normalização com os grupos controle.

Tabela 3 - Sequência de primers para as bactérias de interesse neste estudo.

Nome	Sequência
Actinobacteria	F- TGTAGCGGTGGAATGCGC R- AATTAAGCCACATGCTCCGCT
Bacteroidetes	F- GTTTAATTTCGATGATACGCGAG R- TTAASCCGACACCTCACGG
Firmicutes	F- ATGTGGTTTAATTCTGAAGCA R- AGCTGACGACAACCATGCAC
Proteobacteria	F- CATGACGTTACCCGCAGAAGAAG R- CTCTACGAGACTCAAGCTTGC
Eubacteria universal (16S)	F- ACTCCTACGGGAGGCAGCAGT R- ATTACCGCGGCTGCTGGC

5.12 Análise estatística

Para a comparação do peso dos órgãos foi feita uma análise utilizando o modelo de ANOVA *guet way* com os pós teste de comparações múltiplas de Tukey.

Valores p inferiores ao nível de significância adotado ($\leq 0,05$) trazem evidências de que pelo menos um dos grupos se difere dos demais.

Intervalos de confiança da diferença entre grupos que não englobam o valor zero, trazem evidências de diferença entre os grupos e seus limites mostram a magnitude desta diferença. Intervalos de confiança que englobam o valor zero, não trazem evidências de diferença entre os grupos.

Para a comparação do peso e da ingestão foi utilizado modelo linear com efeitos mistos para a análise das variáveis. Este modelo considera um efeito aleatório por indivíduo, informando que o indivíduo possui medidas tomadas longitudinalmente nos 8 momentos observados.

São apresentadas as diferenças estimadas com seus respectivos valores p e intervalos de confiança 95% da diferença. Intervalos de confiança que não englobam

o valor zero, trazem evidências de diferença entre os grupos (ou momentos) e seus limites mostram a magnitude desta diferença. Intervalos de confiança que englobam o valor zero, não trazem evidências de diferença entre os grupos (ou momentos).

Resultados

6 RESULTADOS

6.1 CG-EM do extrato de cravo da índia

Na análise por cromatografia gasosa (Figura 6), evidenciou-se que os óleos essenciais do extrato de cravo da índia comercial empregado nesse experimento contêm como componentes majoritários: Eugenol (76,76%) – pico 1; β -cariofileno (11,21%) - pico 2; α -humuleno (1,21%) - pico 3; Acetato de eugelina (10,38%) - pico 4; Óxido de cariofileno (0,44%) - pico 5.

Figura 6 - Cromatografia gasosa do extrato de cravo da índia.

6.2 Ingestão alimentar

Em relação a ingestão alimentar pode-se observar que o grupo DPC apresentou menor ingestão ao longo do tempo em relação aos demais grupos (Figura 7A). Para a ingestão alimentar total do período, o único grupo que apresentou menor ingestão foi o DPC quando comparado ao DP (Figura 7B).

Figura 7 - A e B - Análise da ingestão alimentar dos camundongos ao longo das 8 semanas de tratamento e consumo total de cada grupo.

Média±DP DP - dieta padrão, DPC - dieta padrão + cravo da Índia, DH - dieta hiperlipídica, DHC - dieta hiperlipídica + cravo da Índia. $P < 0,05$. *dif. de DP; #dif. de DPC; +dif. de DH.

6.3 Peso corporal

Nesta variável, houve diversas mensurações antes da primeira semana de tratamento. Foi calculada a média de peso destes momentos e o resultado foi colocado como "0" na variável tempo na modelagem de ANOVA com medidas repetidas no tempo.

Os grupos de DH ganharam mais peso em relação aos grupos de DP, como esperado, comprovando o efeito da DH (Figura 8A). Em relação ao ganho de peso total, não se observou efeito significativo do cravo da índia na DH ao longo do tempo de tratamento (Figura 8B).

Embora não significativo, o grupo DPC apresentou um menor ganho de peso em relação ao grupo DP, sugerindo um possível efeito benéfico do cravo da índia nesta dieta (Figura 8B).

Figura 8 - A e B - Análise de peso corporal dos camundongos ao longo das 8 semanas de tratamento e ganho de peso total de cada grupo.

Média±DP DP - dieta padrão, DPC - dieta padrão + cravo da índia, DH - dieta hiperlipídica, DHC - dieta hiperlipídica + cravo da índia. $P < 0,05$. *dif. de DP; #dif. de DPC; +dif de DH.

GTT e ITT

Observou-se, na Figura 9A, que as glicemias de jejum no tempo 0' em todos os grupos foram semelhantes. Após a sobrecarga de glicose, houve aumento da glicemia em todos os grupos, sendo a média do grupo de DH maior, porém sem significância estatística. A Figura 9B mostra as áreas sob a curva das dosagens de glicemia, as quais também não apresentaram diferenças estatisticamente significantes. Porém, é possível observar que o grupo DP teve uma menor área sob a curva, quando comparados aos grupos que receberam DH, mostrando a eficácia da DH.

Figura 9 - A e B - Valores de glicemia no teste de GTT nos diferentes tempos e diferentes grupos e área sob a curva no teste de GTT.

Média $\pm$ DP. DP - dieta padrão, DPC - dieta padrão + cravo da índia, DH - dieta hiperlipídica, DHC - dieta hiperlipídica + cravo da índia

No ITT (Figura 10 A-B) nota-se que a glicemia em jejum dos animais no tempo 0' eram semelhantes e assim se mantiveram até o final do experimento, porém apesar não significativo, o grupo DP apresentou a maior glicemia, com uma recuperação mais rápida.

Figura 10 - A e B - Valores de glicemia no teste de ITT nos diferentes tempos e diferentes grupos e área sob a curva no teste de ITT.

Média $\pm$ DP. DP - dieta padrão, DPC - dieta padrão + cravo da índia, DH - dieta hiperlipídica, DHC - dieta hiperlipídica + cravo da índia.

6.4 Parâmetros bioquímicos

Em relação a insulina, o único grupo que apresentou diferença foi o DH quando comparado ao DHC, sendo o DHC com maior insulina, sugerindo que não houve efeito do cravo da índia nesta variável.

Para o TG observou-se diferença do grupo DH em comparação ao DP, sendo o grupo DH com menor TG. Observou-se também diferença entre os grupos DHC e DPC, sendo o grupo DHC com menor TG.

Quanto ao CT, foi possível encontrar diferença entre os grupos DP e DH, sendo o último com maior valor. O grupo DHC apresentou maior valor em relação ao DPC, não sendo possível observar um efeito protetor do cravo da índia.

Tabela 4 - Análise bioquímica dos camundongos após 8 semanas de tratamento, comparando os grupos.

Variáveis	DP	DPC	DH	DHC
Insulina (ng/dL)	0,32 ± 0,31	0,57 ± 0,68	0,20 ± 0,16	0,54 ± 0,46 ⁺
TG (mg/dL)	104,7 ± 32,7	86,9 ± 17,2	64 ± 12,4 [*]	61,1 ± 12,5 [#]
CT (mg/dL)	75,3 ± 11,1	80,4 ± 7	101,2 ± 8,5 [*]	97,7 ± 10,2 [#]

TG: triglicerídeos; TC: colesterol total.

Média ± DP. DP - dieta padrão, DPC - dieta padrão + cravo da índia, DH - dieta hiperlipídica, DHC - dieta hiperlipídica + cravo da índia. P < 0,05. ^{*}dif. de DP; [#]dif. de DPC; ⁺dif de DH.

6.5 Peso dos tecidos

Para todas as variáveis foi possível observar que houve diferença entre os grupos DH e DP e entre os grupos DHC e DPC.

Em relação às gorduras retroperitoneal e epididimal, observou-se um aumento nos grupos de DH em comparação aos de DP, confirmando o efeito da dieta.

Não foi possível observar efeito benéfico do cravo da índia associado à DH nessas variáveis.

Tabela 5 - Análise do peso dos tecidos dos camundongos coletados no momento da eutanásia, comparando os grupos.

Variáveis	DP	DPC	DH	DHC
Fígado (g)	4,09 ± 0,29	3,92 ± 0,26	3,08 ± 0,32*	3,17 ± 0,14 [#]
Pâncreas (g)	0,67 ± 0,08	0,62 ± 0,13	0,53 ± 0,11*	0,50 ± 0,06 [#]
Gordura retroperitoneal (g)	0,36 ± 0,15	0,30 ± 0,16	1,64 ± 0,62*	1,55 ± 0,45 [#]
Gordura epididimal (g)	1,38 ± 0,40	1,44 ± 0,43	4,16 ± 1,34*	4,15 ± 0,97 [#]
Gordura marrom (g)	0,51 ± 0,15	0,52 ± 0,13	0,32 ± 0,09*	0,28 ± 0,34 [#]

Média±DP. DP - dieta padrão, DPC - dieta padrão + cravo da índia, DH - dieta hiperlipídica, DHC - dieta hiperlipídica + cravo da índia. P < 0,05. *dif. de DP; [#] dif. de DPC.

6.6 Histologia

6.6.1 Fígado

Na figura 11, verifica-se o fígado de um animal do grupo DP sem alterações, com aspecto normal. Em DPC, nota-se o fígado de um animal do grupo DP tratado com cravo da índia sem alterações, com aspecto normal. Em DH, nota-se o fígado de um animal do grupo DH com esteatose microgoticular de baixo grau e, em DHC, nota-se o fígado de um animal do grupo de DH tratado com cravo da índia, sem alterações, com aspecto normal, o que sugere um possível efeito protetivo do cravo da índia contra o acúmulo de gordura hepático.

Figura 11 - Cortes de tecido hepático corados com H&E de cada grupo.

6.6.2 Pâncreas

Na Figura 12 é possível observar que para o pâncreas não houve alteração em nenhum grupo.

Figura 12 - Cortes de tecido pancreático corados com H&E de cada grupo.

6.7 Microbiota intestinal

Na figura 13 em A, observa-se que para o filo *Firmicutes* não houve diferença entre os grupos, porém os grupos suplementados apresentam menor quantidade do que os não suplementados. Em B, o grupo DPC apresentou maior quantidade de *Bacteroidetes* em comparação ao grupo DP. O grupo DHC apresentou menor quantidade em comparação ao grupo DPC e o grupo DH apresentou menor quantidade em comparação ao grupo DHC.

Em C, verifica-se que os grupos DPC e DH demonstraram menor quantidade de *Actinobacteria* quando comparado ao grupo DP.

Em D, nota-se que o grupo DPC teve maior quantidade de *Proteobacteria* em relação ao grupo DP e o grupo DHC teve menor quantidade quando comparado ao grupo DPC.

Figura 13 - A- D – Gráficos de cada filo de bactéria comparando todos os grupos.

Média±DP DP - dieta padrão, DPC - dieta padrão + cravo da índia, DH - dieta hiperlipídica, DHC - dieta hiperlipídica + cravo da índia. P < 0,05. *dif. de DP; #dif. de DPC; +dif. de DH. AR: Abundância relativa. FC: fold change

Discussão

7 DISCUSSÃO

A obesidade é resultante de um desequilíbrio entre o consumo e o gasto energético. Olhando apenas para esse fato isolado, pode-se dizer que é possível fazer com que toda população se mantenha em um peso adequado, porém a realidade que temos é a doença sendo considerada pela OMS uma epidemia mundial, logo se fazem necessários os estudos que investiguem melhor todos os aspectos que levam a obesidade, assim como suas comorbidades para então elaborar estratégias importantes de prevenção e tratamento.⁴⁹

Nesse contexto e considerando a fitoterapia como opção no manejo da patologia, desenvolveu-se esse estudo com o cravo da Índia. Fitoterápico esse, que possui resultados na literatura que contribuem para a prevenção da obesidade, a fim de avaliar e destacar os resultados de sua adição na forma de extrato para camundongos C57BL/6 alimentados com DH, investigando-se, assim, o seu efeito preventivo no ganho de peso, resistência à insulina, acúmulo lipídico corporal, alterações bioquímicas e o efeito da modulação da microbiota intestinal.

Ao fornecer um tratamento alternativo à alimentação convencional previamente protocolada em um modelo animal com elevada predisposição genética para o desenvolvimento de doenças metabólicas, foi possível observar resultados que nos permitiram avaliar o desenvolvimento destes animais ao longo do experimento.

No que diz respeito aos resultados obtidos através da suplementação de cravo da Índia em camundongos alimentados com DP e DH, alguns resultados se mostraram diferentes daqueles encontrados na literatura.

A composição química dos óleos essenciais do extrato de cravo da Índia (*Syzygium aromaticum*) assemelham-se com os resultados obtidos por Oliveira et al. (2009) alterando o teor dos compostos majoritários. Os autores analisaram a mesma espécie de cravo da Índia do que este estudo e encontraram 3 compostos de destaque: Eugenol, β -cariofileno e Acetado de Eugenila, não encontraram nos botões florais: α humuleno e óxido de cariofileno, porém as quantidades que identificamos foram muito pequenas e por isso nossos resultados corroboram os resultados encontrados nesse estudo.⁵⁰

Costa et al. (2011) estudaram a ação do óleo essencial do cravo da Índia sobre as hifas de fungos fitopatogênicos e na quantificação dos componentes deste óleo identificaram três principais compostos: Eugenol, β -cariofileno e Acetado de Eugenila, outros dois não foram identificados, assim, nossos resultados corroboram quanto a identificação e quantificação dos óleos essenciais deste autor.⁵¹

Importante salientar que a composição química das espécies sofre alterações devido à ação dos fatores ambientais, como a temperatura, pluviosidade, nutrição e o horário de coleta.⁵²

Sobre a variável ingestão alimentar, a análise evidenciou diferença em todas as semanas. O grupo DPC teve menor ingestão ao longo de todas as semanas e também menor consumo total. Foi possível verificar que o grupo que teve o maior consumo na maioria das semanas de tratamento foi o grupo DP. Os grupos DH e DHC se mantiveram sem diferenças por cinco semanas e apesar de apresentarem diferenças em três semanas durante o tratamento, no consumo total (final do experimento) eles se mantiveram sem diferenças. Esse dado vai ao encontro do observado por Jung et al. (2012), em que animais alimentados com DH com e sem suplementação de cravo da Índia não apresentaram diferenças.⁴⁷

Em relação a variável peso corporal a análise evidenciou que ambos os grupos de DH ganharam mais peso em relação aos grupos de DP, o que demonstra a efetividade da dieta em promover o ganho de peso. Estes resultados também confirmam que o cravo da Índia não teve efeito significativo na prevenção do ganho peso quando associado com dietas hipercalóricas e embora não significativo, o grupo DPC apresentou um menor ganho de peso em relação ao grupo DP, sugerindo um possível efeito benéfico do cravo da Índia nesta dieta.

Os dados desta variável não confirmam os resultados de Ding et al. (2017) onde o ganho total de peso corporal de camundongos C57BL/6J alimentados com DH por 14 semanas foi menor no grupo tratado com cravo da Índia.⁵³ Assim como o trabalho de Jung et al. (2012) que verificou que a administração de cravo de Índia associado a DH por 9 semanas promoveu um menor ganho de peso em camundongos C57BL/6J.

47

Em relação ao GTT, os resultados deste estudo mostram que a glicemia em jejum dos animais estava semelhante e ao longo do experimento os grupos de DH com e sem cravo da Índia não tiveram redução significativa nos níveis de glicemia após 120 minutos da administração de glicose.

Andrikopoulos et al. (2008) fizeram uma pesquisa em 2007 em 100 artigos, utilizando como descritores: “glucose tolerance e mouse”, e encontraram algumas variações de metodologia para o GTT, como: forma de administração da glicose (intraperitoneal ou via oral), tempo de jejum, quantidade de glicose administrada, animais anestesiados ou conscientes, o que levou a dados discordantes. Dessa forma, essa variabilidade de metodologia, levou os autores a reavaliarem o GTT para definir o tempo de jejum mais adequado, a melhor via de administração e a quantidade de glicose a ser administrada. Notaram que, após um jejum de 6 horas, houve uma clara indicação de intolerância à glicose naqueles animais que foram alimentados com DH em comparação aos de DP, então definiram essa estimativa de tempo para conduzir os testes.⁵⁴

Também observaram que a administração oral de glicose na dose de 2g/kg de peso corporal, após 6h de jejum, sucedeu em acentuadas diferenças nos níveis de glicose plasmática e de insulina dos animais alimentados com DP em comparação aos de DH. Assim, é notório que as variáveis descritas anteriormente podem ter grande impacto sobre a mensuração da tolerância à glicose em camundongos.⁵⁴

Na literatura não há estudos que permitam comparação para essa variável.

Em relação ao ITT, realizado 48h após o GTT, a glicemia basal era semelhante entre os grupos e assim se mantiveram até o final do experimento, mostrando que o cravo da índia não foi efetivo e não proporcionou uma maior sensibilidade à insulina.

É válido destacar que a interpretação do ITT se baseia em quanto mais rápida e intensa for a queda da glicose, mais sensível o indivíduo é à insulina. As maiores críticas ao ITT são referentes à possibilidade de ativação de uma resposta contra regulatória pela hipoglicemia sobre hormônios que poderiam influenciar no desaparecimento da glicose, como o glucagon, catecolaminas e hormônio de crescimento. Porém, esta resposta em geral aparece apenas entre 15 a 20 minutos após a injeção da insulina.⁵⁵ Assim, a queda da glicose observada nos primeiros 15 minutos após o início do teste reflete a captação de glicose pelos tecidos induzida pela insulina, assim como a inibição da liberação de glicose pelo fígado.⁵⁶

Não foi possível encontrar na literatura estudos que discutem e permitem a comparação para esse dado.

Apesar de não encontrados estudos que nos permitam uma comparação direta, há estudos que mostram os possíveis efeitos hipoglicemiantes do cravo da índia, como os resultados de Zheng Tu et al. (2014) que investigaram os efeitos da erva no

metabolismo dos miócitos e demonstraram que este aumentou significativamente o consumo de glicose.⁵⁷

Sanae et al. (2013) observaram que em camundongos diabéticos e não diabéticos alimentados com DP, a suplementação de cravo da Índia em várias dosagens suprimiu claramente os níveis de glicose, prevenindo a progressão da hiperglicemia dos animais.⁵⁸

Quanto aos parâmetros bioquímicos analisados, não foi observado efeito protetor do cravo da Índia para nenhuma dessas variáveis, o que não corrobora os resultados de Jung et al. 2012, que analisaram camundongos C57BL/6J alimentados com DH e suplementados com cravo da Índia por 9 semanas e estes tiveram os níveis de insulina, TG e CT menores do que os grupos não suplementados.⁴⁷

Ding et al. (2017) avaliaram TG e CT de camundongos C57BL/6J alimentados com DH e suplementados com cravo da Índia por 14 semanas e estes foram menores no grupo tratado.⁵³

Sahar Y. et al. (2014) estudaram o óleo de cravo da Índia em ratos machos alimentados com dieta rica em frutose suplementada e não suplementada e dieta balanceada e o trabalho concluiu que o grupo que consumiu dieta rica em frutose com suplementação produziu melhora significativa (10%) dos níveis de CT e TC.⁵⁹

Nossos achados não confirmam os efeitos benéficos do cravo da Índia em uma DH nos parâmetros bioquímicos dos estudos descritos acima.

Em relação ao peso dos tecidos, nossos resultados para o peso do fígado não concordam com os resultados de Jung et al. (2012) onde camundongos C57BL/6J alimentados com DH associado ao cravo da Índia por 9 semanas tiveram um órgão com peso menor em relação ao fígado do animal não tratado.⁴⁷ Também não reafirmamos os resultados de Ding et al. (2017) onde o peso do fígado de camundongos C57BL/6J alimentados com DH e suplementados com cravo da Índia por 14 semanas foram menores no grupo tratado.⁵³ Uma possível justificativa para esse resultado seria o tempo de tratamento.

Não foram encontrados na literatura estudos que investigaram a relação entre a suplementação de cravo da Índia e peso do pâncreas.

Sobre o tamanho do pâncreas DeSouza et al. (2018) com o objetivo de revisar sistematicamente estudos em adultos saudáveis e enfermos que foram submetidos a tomografia computadorizada ou ressonância magnética para medir o volume do pâncreas e assim determinar as faixas de volumes do órgão normal e alteradas,

verificou que o volume do pâncreas apresenta alterações nas seguintes patologias: DM2 e diabetes tipo 1 estão associados a um volume de pâncreas progressivamente reduzido, sobrepeso e obesidade estão associados a um volume de pâncreas progressivamente aumentado.⁶⁰

No nosso estudo o tamanho do pâncreas dos grupos DH não estavam em tamanho aumentado em relação aos grupos de DP, mas, sim diminuídos, e apesar de não termos um resultado de alteração no metabolismo glicídico, podemos constatar que possivelmente os animais estariam desenvolvendo alterações no pâncreas que poderiam progredir para a resistência à insulina e DM2. Apesar de não significativo o pâncreas dos animais do grupo DHC estavam menores do que do grupo DH, mostrando que o cravo da índia não teve um efeito protetor no órgão.

Sobre o peso dos tecidos adiposos foi verificado que o cravo da índia não exerceu efeito benéfico prevenindo o aumento desses tecidos, apenas ficou comprovado que a DH foi eficiente em causar acúmulo lipídico. De forma controversa aos dados do presente estudo, Jung et al. (2012) constataram que a suplementação de cravo da índia associado a DH por 9 semanas reduziu as gorduras retroperitoneal e epididimal em comparação ao grupo DH.

Não foram encontrados estudos na literatura que citam a relação entre a suplementação de cravo da índia e o peso da gordura marrom.

Observa-se que não houve efeitos benéficos do suplemento em aumentar a gordura marrom, algo que seria importante para o metabolismo energético, haja vista que esse tecido oxida lipídios para alimentar a termogênese.

Uma possível explicação para o tamanho reduzido destes tecidos nos animais alimentados com DH seria de que o conteúdo e a atividade do tecido adiposo marrom diminuem em indivíduos obesos, principalmente como resultado da conversão de adipócitos marrons em células uniloculares do tipo branco.

Em camundongos alimentados com DP mantidos à temperatura ambiente, os adipócitos branco e marrom são encontrados juntos em vários depósitos subcutâneos e viscerais.⁶¹⁻⁶³ Em contraste, no tecido adiposo de animais e humanos obesos, os adipócitos marrons são quase imperceptíveis, porque a maioria deles sofre um processo ainda pouco elucidado chamado de conversão para um fenótipo “branco”.⁶³

Essa conversão foi descrita pela primeira vez em 2004 por dois grupos de norte-americanos onde descobriram que o tecido adiposo obeso de ratos e humanos são infiltrados por macrófagos para remover os detritos de adipócitos mortos e que

essa infiltração coincide com o aparecimento de resistência à insulina e citocinas pró inflamatórias. Os macrófagos ativos formam estruturas semelhantes a uma coroa (CLS) eles rodeiam o remanescente da gota lipídica de adipócitos mortos.

Kotzbeck et al. (2018) investigaram as implicações na conversão de tecido marrom para branco em camundongos C57BL/6J. Seus dados mostraram que a aparência histológica da morte de adipócitos marrom e branco é muito semelhante e confirmou o clareamento do tecido adiposo marrom e a formação de CLS.⁶⁴

Esse mecanismo pode ser de importância crucial para a fisiopatologia da obesidade humana, porque a morte de adipócitos marrons além de um certo limiar pode induzir a inflamação; esse processo, combinado à inflamação do tecido adiposo branco, pode agravar o estado inflamatório sistêmico típico da obesidade.⁶⁴

O estudo concluiu que a exposição crônica a um ambiente obesogênico pode induzir o clareamento dos adipócitos marrons, podendo, portanto, fornecer uma importante contribuição para a inflamação relacionada à obesidade, oferecendo uma nova explicação para o forte papel da gordura visceral na determinação dos resultados metabólicos e cardiovasculares mais adversos da obesidade.⁶⁴

Em relação à histologia do fígado foi possível observar um efeito protetor no grupo DHC em comparação ao DH. Esse resultado confirma os achados de Shukri et al. (2012) que avaliaram por 15 semanas a ação de compostos isolados do cravo da índia em ratos com diabetes induzido e verificaram que a erva diminuiu as lesões teciduais do fígado.⁶⁵

Também confirmam os resultados de Jung et al. (2012) onde a suplementação de cravo da índia associado a DH por 9 semanas diminuiu o acúmulo de gordura hepática em comparação ao grupo DH.⁴⁷

A DHGNA associada à obesidade também tem ganhado destaque, uma vez que a obesidade é o fator de risco mais comum e bem estabelecido para esta patologia. Ela está intimamente associada não apenas com o risco de doença hepática avançada, mas também complicações metabólicas, incluindo DM2, doença cardiovascular e doença renal crônica.⁶⁶

Uma vez conhecido que o cravo da índia exerceu o efeito protetor no fígado de camundongos alimentados com DH e a sua real importância, se faz necessário mais estudos que esclareçam os mecanismos da prevenção com o suplemento.

Sobre a histologia do pâncreas observamos que não houve nenhuma alteração e não foram encontrados na literatura estudos que citam a relação entre a suplementação de cravo da Índia e as alterações histológicas do órgão.

Quanto a microbiota intestinal não foram encontrados estudos que a investigaram em animais alimentados com DH e a suplementação de cravo da Índia.

A atividade antimicrobiana do cravo da Índia é bem descrita na literatura, apesar de não haver estudos que o relacione com a microbiota intestinal de animais e/ou humanos obesos, podemos conjecturar o que aconteceu neste trabalho, onde observamos que houve um aumento do filo *Bacteroidetes* (bactérias benéficas).

Hussein et al. (2019) investigaram os efeitos de diferentes níveis de óleo de cravo da Índia prensado a frio no desempenho do crescimento, características de carcaça, parâmetros bioquímicos e a microbiota intestinal de codornas em crescimento e verificou que a população bacteriana intestinal do filo *Proteobacteria*, foi menor nos grupos tratados com cravo da Índia.⁶⁷

Nossos resultados para *Proteobacteria* não confirmam os resultados de Hussein et al (2019), uma vez que os grupos suplementados apresentaram maior quantidade do filo em relação aos grupos não tratados, porém apesar de não significativo houve diminuição do filo *Firmicutes* nos grupos suplementados e aumento significativo dos filos *Bacteroidetes*, o que é benéfico quando relacionamos com obesidade.

Em relação ao filo *Actinobacteria* que é um filo de bactérias probióticas não houve melhora quando suplementado o cravo da Índia.

Nossos resultados não se assemelham com o estudo de Hussein et al. (2019) mas, nos mostra uma possível ação do cravo da Índia em diminuir filos de bactérias patogênicas e aumentar filos de bactérias benéficas.

Algumas hipóteses para que este estudo não corrobore com a literatura podem estar relacionadas ao tempo de experimento, métodos de preparo do suplemento, dose suplementada e o veículo utilizado, (o óleo vegetal parece ser uma barreira de absorção dos constituintes do extrato, bem como a gordura presente na dieta).⁶⁸

Conclusão

8 CONCLUSÃO

É possível concluir que o cravo da índia parece aumentar o filo *Bacteroidetes* da microbiota intestinal e aparenta exercer efeito protetor no fígado de camundongos alimentados com DH, apesar de não prevenir o ganho de peso e o aumento de gordura corporal. Também mostrou não promover melhora no metabolismo glicídico e lipídico.

Referências¹

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT NBR 6023).

REFERÊNCIAS

1. Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade e da Síndrome Metabólica Diretrizes brasileiras de obesidade 2016 / **ABESO** – 4. ed, 2016.
2. Pollack, A. American Medical Association – (AMA). Recognizes Obesity as a Disease. **NYTimescom**. 2013. Disponível em: < [http:// nyti.ms/1Guko03](http://nyti.ms/1Guko03).> Acessado em: 02 mar 2016.
3. YANG, Y. Astrocytes: targets in obesity. **Oncotarget**, v.6, n.15, p.12835-6, 2015.
4. VECCHIÉ, A. et al. Obesity phenotypes and their paradoxical association with cardiovascular diseases. **Eur J Intern Med**, v.48, p. 6-17, 2018.
5. KITAHARA, C.M. et al. Association between class III obesity (BMI of 40-59 kg/m²) and mortality: a pooled analysis of 20 prospective studies. **PLoS Med**, v.11, n.7, p. e1001673, 2014.
6. OBIRIKORANG C. et al. Obesity and Cardio-Metabolic Risk Factors in an Urban and Rural Population in the Ashanti Region-Ghana: A Comparative Cross- Sectional Study, **PLoS One**, v.10, n.6, p. e0129494. 2015.
7. **WHO** - World Health Organization. Obesity and overweight. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight> Acesso em: 20 mar 2018.
8. Instituto Brasileiro de Geografia Estatística (IBGE). **Pesquisa de Orçamentos Familiares (POF) 2008-2009** – Antropometria e estado nutricional de crianças, adolescentes e adultos no Brasil. IBGE, 2010.
9. BRASIL. Ministério da Saúde. **Vigitel Brasil 2016**: vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico. Brasília: Ministério da Saúde, 2016.
10. ABESO 76 – outubro 2010 – Edição Especial. Atualização das diretrizes para o tratamento Farmacológico da obesidade e do sobrepeso. Disponível em: <<http://www.abeso.org.br/pdf/diretrizes2010.pdf>>, acessado em: 01 fev. 2018.
11. NEWELL-FUGATE, A. E. et al. Effects of Obesity and Metabolic Syndrome on Steroidogenesis and Folliculogenesis in the Female Ossabaw Mini-Pig. **PLoS One**, v.10, n.6, p. e0128749, 2015.

12. RAZIEL, A.; SAKRAN, N.; SZOLD A, GOITEIN, D. Current solutions for Obesity-Related Liver Disorders: Non-Alcoholic Fatty Liver Disease and Non-Alcoholic Steatohepatitis. **Isr Med Assoc J**, v.17, n.4, p. 234-8, 2015.
13. PIETRZYK, L.; TORRES, A.; MACIEJEWSKI, R.; TORRES, K. Obesity and Obese-related Chronic Low-grade Inflammation in Promotion of Colorectal Cancer Development. **Asian Pac J Cancer Prev**, v.16, n.10, p. 4161-8, 2015.
14. TARGHER, G.; DAY, C.; BONORA, E. Risk of cardiovascular disease in patients with nonalcoholic fatty liver disease. **N Engl J Med**, v.363, n.14, p. 1341–50, 2010.
15. BIRKENFELD, A.; SHULMAN, G. Nonalcoholic fatty liver disease, hepatic insulin resistance, and type 2 diabetes. **Hepatology**, v.59, n.2, p. 713–23, 2014.
16. FRUCI, B. et al. Nonalcoholic fatty liver: a possible new target for type 2 diabetes prevention and treatment. **Int J Mol Sci**, v.14, n.11, p. 22933–66, 2013.
17. STANNARD, S.; JOHNSON, N. Insulin resistance and elevated triglyceride in muscle: more important for survival than “thrifty” genes? **J Physiol**, v.554, n.pt3, p. 595– 607, 2004.
18. van RAALTE, D.; van DER, Z. N.; DIAMANT, M. Pancreatic steatosis in humans: cause or marker of lipotoxicity? **Curr Opin Clin Nutr Metab Care**, v.13, n.4, p. 478–85, 2010.
19. FELDSTEIN, A.E. et al. Free fatty acids promote hepatic lipotoxicity by stimulating TNF- α expression via a lysosomal pathway. **Hepatology**, v.40, n.1, p. 185-94, 2004
20. POSTIC, C.; GIRARD, J. Contribution of de novo fatty acid synthesis to hepatic steatosis and insulin resistance: lessons from genetically engineered mice. **J Clin Invest**, v.118, n.3, p. 829-38, 2008.
21. BRUNN, J. M.; STALLKNECHT, B.; HELGE, J.W.; RICHELSEN, B. Interlukin-18 in plasma and adipose tissue: effects of obesity, insulin resistance and weight loss. **European Journal of Endocrinology**, v.157, n.4, p. 465-471, 2007.
22. ABATE, N. et al. Relationships of generalized and regional adiposity to insulin sensitivity in men. **J Clin Invest**, v.96, n.1, p. 88–98, 1995.
23. DESCHENES, D.; COUTURE, P.; DUPONT, P.; TCHERNOF, A. Subdivision of the subcutaneous adipose tissue compartment and lipid-lipoprotein levels in women. **Obes Res**, v.11, n.3, p. 469–76, 2003.

-
24. van DAM, A.D. et al. Targeting white, brown and perivascular adipose tissue in atherosclerosis development. **Eur J Pharmacol**, n.816, p. 82-92, 2017.
25. CINTI, S. The Adipose Organ. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids**, v.73, n.1, p. 9-15, 2005.
26. FRONTINI, A.; CINTI, S. Distribution and development of brown adipocytes in the murine and human adipose organ. **Cell Metabolism**, v.11, n.4, p. 253–256, 2010.
27. CANNON, B.; NEDERGAARD, J. Brown adipose tissue: function and physiological significance. **Physiological Reviews**, v.84, n.1, p. 277–359, 2004.
28. RICQUIER, D. Respiration uncoupling and metabolism in the control of energy expenditure. **Proceedings of the Nutrition Society**, v.64, n.1, p. 47–52, 2005.
29. ARSLAN, N. Obesity, fatty liver disease and intestinal microbiota. **World J Gastroenterol** v.20, n.44, p. 16452-16463, 2014.
30. ZOETENDAL, E.G.; VAUGHAN, E.E.; de VOS, W.M. A microbial world within us. **Mol Microbiol**, v.59, n.6, p. 1639-1650, 2006.
31. CHAN, Y.K.; ESTAKI, M.; GIBSON, D.L. Clinical consequences of diet-induced dysbiosis. **Ann Nutr Metab**, Suppl.63, v.2, p. 28-40, 2013.
32. LEY, R.E. Obesity alters gut microbial ecology. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 102, n.31, p. 11070-5.
33. KNIGHTS, D; LASSEN, K.G.; XAVIER, R.J. Advances in inflammatory bowel disease pathogenesis: linking host genetics and the microbiome. **Gut**, v.62, n.10 p.1505-1510, 2013.
34. ARSLAN, N. Obesity, fatty liver disease and intestinal microbiota. **World J Gastroenterol**, v.20, n.44, p. 16452-16463, 2014.
35. MIYAMOTO, J. et al. Gut microbiota confers host resistance to obesity by metabolizing dietary polyunsaturated fatty acids. **Nat Commun**, v.10, n.1, p. 4007, 2019.
36. CARICILLI, A. M.; SAAD, M. J. A. The Role of Gut Microbiota on Insulin Resistance. **Nutrients**, v.5, n.3, p. 829–851, 2013.

37. HASANI-RANJBAR, S; JOUYANDEH, Z; ABDOLLAHI, M. A systematic review of anti-obesity medicinal plants - an update. **J Diabetes Metab Disord**, v. 12, p. 28, 2013.
38. MEYDANI, M; HASAN, S. T. Dietary Polyphenols and Obesity. **Nutrients** v.2, n.7, p. 737–751, 2010.
39. KAMALI, S. H. et al. Efficacy of 'Itrifal Saghir', a combination of three medicinal plants in the treatment of obesity; A randomized controlled trial. **Daru**, v.20, n.1 p. 33, 2012.
40. BRASIL. Ministério da Saúde. Divisão Nacional de Vigilância Sanitária de Alimentos. **Resolução da diretoria colegiada** - rdc nº 26, de 13 de maio de 2014.
41. MIYAZAWA, M.; HISAMA, M. Antimutagenic activity of Phenylpropanoids from clove (*Syzygium aromaticum*). **J Agric Food Chem**, v.51, n.22, p. 6413-22, 2003.
42. SRIVASTAVA, K.C. Antiplatelets principles from a food spice clove (*Syzygium aromaticum* L). **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids**, v.48, n.5, p. 363-72, 1993.
43. TANAKA, T.; ORII, Y.; NONAKA, G.; NISHIOKA, I. Tannins and related compounds. CXXXIII: Chromone, acetophenone and phenylpropanoid glycosides and their galloyl and/or hexahydroxydiphenoyl ester from the leaves of *Syzygium aromaticum* MERR. et PERRY. **Chem Pharm Bull**, v.41, n. 7, p. 1232-7, 1993.
44. UMEHARA, K. et al. Studies on differentiation-inducing activities of triterpenes. **Chem Pharm Bull**, v.40, n.2, p. 401-5, 1992.
45. KAMATOU, G. P.; VERMAAK, I.; VILJOEN, A. M. Eugenol—From the Remote Maluku Islands to the International Market Place: A Review of a Remarkable and Versatile Molecule. **Molecules**, v.17, n.6, p. 6953-6981, 2012.
46. KHATHI, A. et al. Effects of *Syzygium aromaticum*-Derived Triterpenes on Postprandial Blood Glucose in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats Following Carbohydrate Challenge. **PLoS One**, v.8, n.11, p. e81632, 2013.
47. JUNG, C. et al. *Syzygium aromaticum* ethanol extract reduces high-fat diet-induced obesity in mice through downregulation of adipogenic and lipogenic gene expression. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v.4, n.3, p. 409-414, 2012.

48. **TACO:** Tabela Brasileira de Composição dos Alimentos. Disponível em: <https://www.unicamp.br/nepa/taco/contar/taco_4_edicao_ampliada_e_revisada> Acesso em: 05 set. 2017.
49. WHO - World Health Organization. Obesity – preventing and managing the global epidemic. Geneva: Report of a WHO Consultation, 2000.
50. Oliveira, R. A. et al. Constituintes químicos voláteis de especiarias ricas em eugenol. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.19, n.3, p. 771-775, 2009.
51. COSTA, A.R.T. et al. Ação do óleo essencial de *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & L.M.Perry sobre as hifas de alguns fungos fitopatogênicos. **Rev. Bras. Pl. Med.**, v.13, n.2, p.240-245, 2011.
52. MORAIS, L.A.S. Óleos essenciais no controle fitossanitário. In: BETTIOL, W; MORANDI, M. **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas**. Embrapa, 2009. p. 139-152. (Capítulo 9).
53. DING, Y. et al. Clove extract function as a natural fatty acid synthesis inhibitor and prevent obesity in a mouse model. **Food Funct**, v.8, n.8, p. 2847-2856, 2017.
54. ANDRIKOPOULOS, S. et al. Evaluating the glucose tolerance test in mice. **Am J Physiol Endocrinol Metab**. v.295, n.6, p.1323-32, 2008.
55. RIZZA, R. A.; CRYER, P. E.; GERICH, J. E. Role of glucagon, catecholamines, and growth hormone in human glucose counterregulation. Effects of somatostatin and combined alfa and beta-adrenergic blockade on plasma glucose recovery and glucose flux rates after insulininduced hypoglycemia. **J Clin Invest**, v.64, n.1, p. 62-71, 1979.
56. GELONEZE, B. et al. Standardization of insulin tolerance test (ITT) in Brazilian population. **Diabetes Res Clin Pract**, v. 50, (supl. 1): s102, 2000.
57. TU, Z. et al. *Syzygium aromaticum* L. (Clove) Extract Regulates Energy Metabolism in Myocytes. **J Med Food**, v.17, n.9, p. 1003-10, 2014.
58. SANAE, F. et al. Effects of eugenol-reduced clove extract on glycogen phosphorylase b and the development of diabetes in db/db mice. **Food Funct**, v.5, n.2, p. 214-9, 2014.
59. Al-Okbi, S.Y. et al. Protective Effect of Clove Oil and Eugenol Microemulsions on Fatty Liver and Dyslipidemia as Components of Metabolic Syndrome. **J Med Food**, v.17, n.7, p. 764-71, 2014.

60. de SOUZA, S.V. et al. Pancreas volume in health and disease: a systematic review and meta-analysis. **Expert Rev Gastroenterol Hepatol**, v.12, n.8, p. 757-766, 2018.
61. CANNON, B.; NEDERGAARD, J. Brown adipose tissue: function and physiological significance. **Physiol. Rev**, v.84, n.1, p. 277-359, 2004.
62. MURANO, I. et al. Noradrenergic parenchymal nerve fiber branching after cold acclimatisation correlates with brown adipocyte density in mouse adipose organ. **J. Anat**, v.214, n.1, p. 171–178, 2009.
63. VITALI, A. et al. The adipose organ of obesity-prone C57BL/6J mice is composed of mixed white and brown adipocytes. **J. Lipid Res**, v.53, n.4, p. 619–629, 2012.
64. Kotzbeck P. et al. Brown adipose tissue whitening leads to brown adipocyte death and adipose tissue inflammation. **J Lipid Res**, v.59, n.5, p. 784-794, 2018.
65. SHUKRI, R.; MOHAMED, S.; MUSTAPHA, N. M. Cloves protect the heart, liver and lens of diabetic rats. Food Chemistry, v.122, n.4, p. 1116-1121, 2010.
66. CHALASANI, N. et al., “The diagnosis and management of nonalcoholic fatty liver disease: practice guidance from the American Association for the Study of Liver Diseases.” **Hepatology**, v.67, n.1, p. 328–357, 2018.
67. HUSSEIN, M.M.A. et al. Effects of clove (*Syzygium aromaticum*) oil on quail growth, carcass traits, blood components, meat quality, and intestinal microbiota. **Poult Sci**, v.98, n.1, p. 319-329, 2019.
68. Rômulo O. H. et al. Estudo toxicológico pré-clínico (agudo) do extrato do *Syzygium aromaticum* (L) em roedores. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.19, n.2B, p. 557-560, 2009.

Anexos

ANEXOS

ANEXO 1 - Aprovação do CEUA – Comitê de Ética para Uso Animal da FMUSP.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo para Uso de Animais em Experimentação nº 016/2015-1, sobre o projeto intitulado "*Efeitos do Syzygium aromaticum adicionado à dieta hiperlipídica na microbiota intestinal e no metabolismo de glicose e lipídeos de camundongos obesos*", sob a responsabilidade da Professora Doutora Vivian Marque Miguel Suen está de acordo com os Princípios Éticos em Experimentação Animal adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi **APROVADO** em reunião de 02 de dezembro de 2015.

We certify that the protocol nº 016/2015-1, entitled "*Effects of Syzygium aromaticum added to high-fat diet on the intestinal microbiota and metabolism of glucose and lipids in obese mice*", is in accordance with the Ethical Principles in Animal Research adopted by the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA) and was approved by the Local Animal Ethical Committee from the Ribeirão Preto Medical School of the University of São Paulo in 12/02/2015.

Ribeirão Preto, 02 de dezembro de 2015,

Prof. Dr. Fernando Silva Ramalho
Presidente da CEUA – FMRP – USP

ANEXO 2 - Condições instrumentais de análise dos constituintes químicos do extrato de cravo da índia.

Sample Information

Analyzed by : Admin
 Analyzed : 15/5/2017 13:21:18
 Sample Type : Unknown
 Level # : 1
 Sample Name : Óleo Cravo Cássia_21,5mg/mL
 Sample ID : Óleo Cravo Cássia_21,5mg/mL
 IS Amount : [1]=1
 Sample Amount : 1
 Dilution Factor : 1
 Vial # : 2
 Injection Volume : 1.00
 Data File : C:\Amostras GCMS\Cássia Machado\Óleo Cravo Cássia_21,5mgmL.qgd
 Org Data File : C:\Amostras GCMS\Cássia Machado\Óleo Cravo Cássia_21,5mgmL.qgd
 Method File : C:\Amostras GCMS\Cássia Machado\22-05-2017\R Adams Quant2.qgm
 Org Method File : C:\Amostras GCMS\Cássia Machado\R Adams.qgm
 Report File :
 Tuning File : C:\GCMSsolution\System\Tune1\2017\11-05-2017.qgt
 Modified by : Admin
 Modified : 15/10/2019 09:49:18

Method

Gas Chromatograph Mass Spectrometer- Shimadzu -
 Model: QP-2010.
 Column: RTX-5MS (30m x 0.25mm x 0.25um) Restek.
 Carrier Gas: Hélio.
 Ionization mode: Electron ionization with a 70eV.

==== Analytical Line 1 =====

[GC-2010]

Column Oven Temp.	:60.0 °C	
Injection Temp.	:240.00 °C	
Injection Mode	:Split	
Flow Control Mode	:Linear Velocity	
Pressure	:79.7 kPa	
Total Flow	:108.4 mL/min	
Column Flow	:1.30 mL/min	
Linear Velocity	:41.6 cm/sec	
Purge Flow	:3.0 mL/min	
Split Ratio	:80.0	
High Pressure Injection	:OFF	
Carrier Gas Saver	:ON	
Carrier Gas Saver Split Ratio	:5.0	
Carrier Gas Saver Time	:1.00 min	
Splitter Hold	:OFF	
Oven Temp. Program		
Rate	Temperature(°C)	Hold Time(min)
-	60.0	0.00
3.00	210.0	0.00

< Ready Check Heat Unit >

Column Oven : Yes
 SPL1 : Yes
 MS : Yes

< Ready Check Detector(FTD) >

< Ready Check Baseline Drift >

< Ready Check Injection Flow >

SPL1 Carrier : Yes
SPL1 Purge : Yes
< Ready Check APC Flow >
< Ready Check Detector APC Flow >
External Wait :No
Equilibrium Time :1.0 min

[GCMS-QP2010]

IonSourceTemp :250.00 °C
Interface Temp. :260.00 °C
Solvent Cut Time :3.50 min
Detector Gain Mode :Relative
Detector Gain :+0.00 kV
Threshold :1000

[MS Table]

--Group 1 - Event 1--

Start Time :4.00min
End Time :50.00min
ACQ Mode :Scan
Event Time :0.30sec
Scan Speed :1428
Start m/z :35.00
End m/z :400.00

Sample Inlet Unit :GC

[MS Program]

Use MS Program :OFF

Tuning

m/z : 69.00
Factor : 11.87
Inten. : 620351
Ratio : 100.00
FWHM : 0.59

m/z : 219.00
Factor : 29.54
Inten. : 250783
Ratio : 40.43
FWHM : 0.59

m/z : 502.00
Factor : 293.22
Inten. : 23951
Ratio : 3.86
FWHM : 0.58

Ionization Mode : EI
Tuning Date : 11/5/2017 08:
Filament# : 2
Lens1 : -0.7 V
Lens2 : -32.0 V
Lens3 : 0.5 V
Lens4 : -27.0 V
RF Gain : 4737
RF Offset : 4929
Pre-rod : -3.5 V
Deflector : -20.0 V
Detector : 1.41 kV

Ionization voltage : 70 V
Emission current : 60 uA
Main-rod : -3.5 V
Conversion dynode: -10 kV

IonSourceTemp : 250 °C
Low Vacuum : 7.5e+000 Pa
High Vacuum : 4.2e-004 Pa
Interface Temp. : 320 °C
Oven Temp. : 60 °C
Column Pressure : 87 kPa
Column Flow : 1.4 mL/min
Column Diameter : 0.25 mm
Column Length : 30.0 m

Scan Range: 10.00 - 700.00 Scan Speed : 78

Base Peak : 69.00 (610785)

Area Ratio

$$Y = 0.887119X - 0.1469868$$

$$R^2 = 0.999785$$

$$R = 0.9998925$$

Internal Standard

Curve: Linear

Origin: Not Forced

ANEXO 3 - Relatório da análise dos constituintes químicos do extrato de cravo da índia.

Sample Information

Analyzed by : Admin
 Analyzed : 15/5/2017 14:21:28
 Sample Type : Unknown
 Level # : 1
 Sample Name : Óleo Cravo Cássia_21,5mg/mL001
 Sample ID : Óleo Cravo Cássia_21,5mg/mL001
 IS Amount : [1]=1
 Sample Amount : 1
 Dilution Factor : 1
 Vial # : 2
 Injection Volume : 1.00
 Data File : C:\Amostras GCMS\Cássia Machado\Óleo Cravo Cássia_21,5mg/mL001
 Org Data File : C:\Amostras GCMS\Cássia Machado\Óleo Cravo Cássia_21,5mg/mL001
 Method File : C:\Amostras GCMS\Cássia Machado\22-05-2017\R Adams Quant2.qgr
 Org Method File : C:\Amostras GCMS\Cássia Machado\R Adams.qgm
 Report File :
 Tuning File : C:\GCMSsolution\System\Tune1\2017\11-05-2017.qgt

\$EndIf\$Modified by : Admin
 Modified : 23/5/2017 10:07:05

Peak Report TIC

Peak#	R.Time	Area	Area%	Name
1	20.903	72077892	76.76	Phenol, 2-methoxy-3-(2-propenyl)- (CA5
2	23.288	10522183	11.21	Caryophyllene
3	24.669	1139877	1.21	.alpha.-Humulene
4	27.749	9743578	10.38	Eugenyl acetate
5	29.781	413408	0.44	Caryophyllene oxide
		93896938	100.00	

Library

<< Target >>

Line#:1 R.Time:20.905(Scan#:3382) MassPeaks:110

RawMode:Averaged 20.900-20.910(3381-3383) BasePeak:164.05(2126138)

BG Mode:Calc. from Peak

Hit#:1 Entry:52834 Library:WILEY7.LIB

SI:97 Formula:C₁₀H₁₂O₂ CAS:1941-12-4 MolWeight:164 RetIndex:0

CompName:Phenol, 2-methoxy-3-(2-propenyl)- (CAS) Phenol, 3-allyl-2-methoxy- (CAS) 3-Allylgu:

Hit#:2 Entry:22315 Library:NIST11.lib

SI:97 Formula:C₁₀H₁₂O₂ CAS:1941-12-4 MolWeight:164 RetIndex:1392

CompName:Phenol, 2-methoxy-3-(2-propenyl)- \$\$ 3-Allyl-2-methoxyphenol # \$\$

Hit#:3 Entry:53660 Library:WILEY7.LIB

SI:96 Formula:C₁₀H₁₂O₂ CAS:97-53-0 MolWeight:164 RetIndex:0

CompName:Phenol, 2-methoxy-4-(2-propenyl)- (CAS) Eugenol \$\$ 1-(2-PROPENYL)-4-HYDROX

<< Target >>

Line#:2 R.Time:23.290(Scan#:3859) MassPeaks:94

RawMode:Averaged 23.285-23.295(3858-3860) BasePeak:41.05(223580)

BG Mode:Calc. from Peak

Hit#:1 Entry:18023 Library:NIST11s.lib

SI:96 Formula:C₁₅H₂₄ CAS:87-44-5 MolWeight:204 RetIndex:1494

CompName:Caryophyllene \$\$ Bicyclo[7.2.0]undec-4-ene, 4,11,11-trimethyl-8-methylene-, [1R-(1R'

Hit#:2 Entry:18022 Library:NIST11s.lib

SI:96 Formula:C₁₅H₂₄ CAS:118-65-0 MolWeight:204 RetIndex:1494

CompName:Bicyclo[7.2.0]undec-4-ene, 4,11,11-trimethyl-8-methylene-, [1R-(1R*,4Z,9S*)]- \$\$ Isoc

Hit#:3 Entry:100781 Library:WILEY7.LIB

SI:96 Formula:C₁₅H₂₄ CAS:87-44-5 MolWeight:204 RetIndex:0

CompName:trans-Caryophyllene \$\$ Bicyclo[7.2.0]undec-4-ene, 4,11,11-trimethyl-8-methylene-, [1R

<< Target >>

Line#:3 R.Time:24.670(Scan#:4135) MassPeaks:51

RawMode:Averaged 24.665-24.675(4134-4136) BasePeak:93.05(64583)

BG Mode:Calc. from Peak

Hit#:1 Entry:100736 Library:WILEY7.LIB

SI:96 Formula:C₁₅H₂₄ CAS:6753-98-6 MolWeight:204 RetIndex:0

CompName:.alpha.-Humulene \$\$ 1,4,8-Cycloundecatriene, 2,6,6,9-tetramethyl-, (E,E,E)- (CAS) 4,7,

Hit#:2 Entry:18070 Library:NIST11s.lib

SI:96 Formula:C₁₅H₂₄ CAS:6753-98-6 MolWeight:204 RetIndex:1579

CompName:Humulene \$\$.alpha.-Caryophyllene \$\$ 1,4,8-Cycloundecatriene, 2,6,6,9-tetramethyl-, (E,E,E)-

Hit#:3 Entry:1092 Library:FFNSC1.3.lib

SI:96 Formula:C₁₅H₂₄ CAS:6753-98-6 MolWeight:204 RetIndex:1454

CompName:Humulene <alpha->

<< Target >>

Line#:4 R.Time:27.750(Scan#:4751) MassPeaks:88

RawMode:Averaged 27.745-27.755(4750-4752) BasePeak:164.10(511395)

BG Mode:Calc. from Peak

Hit#:1 Entry:103 Library:FFNSC1.3.lib

SI:97 Formula:C₁₂H₁₄O₃ CAS:93-28-7 MolWeight:206 RetIndex:1521

CompName:Eugenyl acetate

Hit#:2 Entry:103535 Library:WILEY7.LIB

SI:96 Formula:C₁₂H₁₄O₃ CAS:93-28-7 MolWeight:206 RetIndex:0

CompName:Phenol, 2-methoxy-4-(2-propenyl)-, acetate (CAS) Aceteugenol \$\$ Acetyeugenol \$\$ Eu

Hit#:3 Entry:18321 Library:NIST11s.lib

SI:95 Formula:C₁₂H₁₄O₃ CAS:93-28-7 MolWeight:206 RetIndex:1552

CompName:Phenol, 2-methoxy-4-(2-propenyl)-, acetate \$\$ Phenol, 4-allyl-2-methoxy-, acetate \$\$ A

<< Target >>

Line#:5 R.Time:29.780(Scan#:5157) MassPeaks:46

RawMode:Averaged 29.775-29.785(5156-5158) BasePeak:41.00(8688)

BG Mode:Calc. from Peak

Hit#:1 Entry:145 Library:FFNSC1.3.lib

SI:93 Formula:C15 H24 O CAS:17627-43-9 MolWeight:220 RetIndex:1587

CompName:Caryophyllene oxide

Hit#:2 Entry:121057 Library:WILEY7.LIB

SI:93 Formula:C15 H24 O CAS:1139-30-6 MolWeight:220 RetIndex:0

CompName:(-)-Caryophyllene oxide \$(-)-5-Oxatricyclo[8.2.0.0(4,6)]dodecane,,12-trimethyl-9-meth

Hit#:3 Entry:121056 Library:WILEY7.LIB

SI:93 Formula:C15 H24 O CAS:1139-30-6 MolWeight:220 RetIndex:0

CompName:(-)-Caryophyllene oxide \$(-)-5-Oxatricyclo[8.2.0.0(4,6)]dodecane,,12-trimethyl-9-meth

ANEXO 4 - Histologia em Parafina.

Fixação: formol 10% tamponado (tampão fosfato 0,1 M pH 7,4) por 24 horas

Lavagem: banho em água corrente (tirar o excesso de formol)

Desidratação: para incluir em parafina

Álcool 80% por 30 minutos

Álcool 90% por 30 minutos

Álcool 95% por 30 minutos

As soluções puras (absolutas: 100%) não podem exceder o tempo estipulado, somente as misturas.

Álcool absoluto 1 por 30 minutos

Álcool absoluto 2 por 30 minutos

Álcool absoluto 3 por 30 minutos

Mistura álcool absoluto + xilol (1/1) durante a noite

No dia seguinte continua-se:

Diafanização: xilol para deixar a amostra transparente

Xilol 1 por 30 minutos

Xilol 2 por 30 minutos

Inclusão de parafina: Banho de parafina na estufa a 60°C por 2h

Banho 1 por 1 hora

Banho 2 por 1 hora

Inclusão da amostra na bandeja: Executar esse procedimento em chapa quente (60°C) para manter a parafina líquida. Colocar a amostra na bandeja na posição desejada (de tal forma que se consiga ter no corte as camadas da pele [epiderme, derme e subcutâneo]). Colocar a cassete, preencher com parafina líquida, tirar o molde da chapa quente para solidificar a parafina e, por fim, colocar o molde no freezer para se soltar perfeitamente da cassete.

Corte: regular no micrótomo a espessura para 3 µm. Para melhor qualidade do corte, ideal que a sala esteja bem fria e os blocos de parafina bem gelados. Afixar a cassete no micrótomo com a epiderme e derme lateralmente (ou na diagonal com a epiderme para cima) e começar a cortar. Pegar as "tripinhas" e colocar diretamente num banho histológico aquecido à 57°C para o corte esticar-se. Mergulhar parte da lâmina no banho e "pescar" a amostra. Secar o excesso de água com o papel higiênico. Colocar a lâmina em pé no suporte. A lâmina está pronta para ser corada.

Desparafinização: as lâminas são colocadas inclinadas no suporte, por 1h na estufa a 60° C. Em seguida, banhos de xilol são para retirar a parafina:

Xilol 2 por 5 minutos

Xilol 1 por 5 minutos

Hidratação: os corantes são hidrossolúveis. Deve-se hidratar a amostra para corar.

2 min em: Álcool absoluto 2

Álcool absoluto 1

Álcool 95%

Álcool 90%

Álcool 80%

2 min em água corrente

Coloração (HE): ou qualquer outro corante

5 minutos em Hematoxilina (o tempo pode variar)

5 minutos em água corrente

Álcool 80% (1 passada)

1 minuto em Eosina (esse tempo pode variar)

Desidratação: antes de montar precisa desidratar

Álcool 80% (passadas em poucos segundos)

Álcool 90%

Álcool absoluto 1

Álcool absoluto 2

Xilol 1

Xilol 2

Xilol 3

montagem

Montagem: colar a lamínula com Entelan, Permout ou Bálsamo do Canadá.