**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO**

MARINA RODRIGUES

**Efeitos do eugenol na microbiota intestinal e no metabolismo de glicose e
lipídios de camundongos alimentados com dieta hiperlipídica**

RIBEIRÃO PRETO

2020

MARINA RODRIGUES

Efeitos do eugenol na microbiota intestinal e no metabolismo de glicose e lipídios de camundongos alimentados com dieta hiperlipídica

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Metabolismo do Departamento de Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Nutrição e Metabolismo

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Vivian M. 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 e pesquisa, desde que citada a fonte.

Rodrigues, Marina

Efeitos do eugenol na microbiota intestinal e no metabolismo de glicose e lipídios de camundongos alimentados com dieta hiperlipídica

74 p.

Dissertação de mestrado apresentada a Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências Área de concentração: Nutrição e Metabolismo

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

1. obesidade, eugenol, 2. microbiota intestinal,
3. esteatose hepática, 4. dieta hiperlipídica.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Marina Rodrigues

Efeitos do eugenol na microbiota intestinal e no metabolismo de glicose e lipídios de camundongos alimentados com dieta hiperlipídica

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do **Título de Mestre em Ciências**. Área de concentração: Nutrição e Metabolismo.

Aprovado em: __/__/__

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedicatória

A Deus por transformar todos os meus sonhos em realidade.

Aos meus pais que sempre deram um apoio incondicional, e se dedicaram com muito empenho, amor e carinho para que minha vida acadêmica fosse possível.

Ao meu namorado que esteve presente em toda trajetória sempre me motivando, encorajando e torcendo pelo meu sucesso.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus pela saúde, por tornar um sonho possível e sempre me guiar.

A minha orientadora Vivian Marques Miguel Suen pela oportunidade, confiança, acreditar que eu era capaz, além de todo o ensinamento e amizade. Uma enorme referência para mim.

A doutoranda Caroline Bertoncini que desde o princípio sempre me ajudou, apoiou e caminhou ao meu lado durante todo o processo, passando muitos ensinamentos além de uma amizade, você foi essencial.

Ao mestre e colega Anderson Gregório por toda ajuda, conselhos, ensinamentos e paciência, sempre muito disponível.

A mestre Cássia Machado que me acolheu no princípio e sempre deu forças e apoio.

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

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

Aos Técnicos do Biotério da Clínica Médica que compartilharam experiências e ensinamentos que agregaram muito este trabalho.

A toda equipe do laboratório de Nutrição do HC e amigos e colegas do Laboratório de Nutrição, Neurociências e Metabolismo – LANNEM pela troca de conhecimento, acolhimento e companhia durante a dedicação ao trabalho.

A toda comissão da secretaria de pós-graduação, por sempre responder minhas perguntas e toda ajuda em questões burocráticas nesses anos de pesquisa.

A toda minha família principalmente mãe e pai, Sueli e Célio, que sempre acreditaram e ampararam, ao meu namorado Gabriel grande incentivador, torcedor e fã de todas minhas conquistas, aos meus avôs (saudades eternas) que sempre admiraram, e a minha vó que me deu força emocionalmente.

Aos amigos, que mesmo longe se mantiveram presentes, e a todos que de alguma forma sempre deram forças e acreditaram em mim, tornando a jornada mais leve e ajudando na motivação e emocional.

Enfim, obrigada pela ajuda e apoio de todos, pois todas as conquistas são frutos de um trabalho em equipe.

RESUMO

RODRIGUES, M. **Efeitos do eugenol na microbiota intestinal e no metabolismo de glicose e lipídios de camundongos alimentados com dieta hiperlipídica.** 2020. 74f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto, 2020.

Introdução: A obesidade é uma doença crônica, multifatorial, com prevalência crescente a nível mundial. Possui associação com fatores genéticos, emocionais e ambientais. A inflamação de tecidos e anomalias metabólicas que ocorrem na obesidade está associada com a disbiose, o desequilíbrio entre as bactérias patogênicas e benéficas que compõem a microbiota intestinal. Dentre os tratamentos para obesidade, as terapias não convencionais têm ganhado destaque e entre elas estão os medicamentos baseados em plantas. O eugenol é o principal composto bioativo extraído do óleo do cravo da Índia, e possui propriedades: antimicrobianas, antiinflamatória, antioxidante, entre outras. Diante da alta prevalência da obesidade, da importância da composição da microbiota intestinal na fisiopatologia dessa doença, e considerando os componentes do eugenol, é fundamental a busca de novas medidas para controle desta doença. **Objetivo:** avaliar os efeitos do eugenol no peso corporal, peso dos tecidos adiposos, hepático e pancreático, perfil lipídico e glicídico, acúmulo de lipídio hepático e pancreático, bem como a microbiota intestinal de animais alimentados com dieta hiperlipídica. **Metodologia:** foram utilizados 40 camundongos (C57BL/6) machos, alimentados com ração industrializada, e divididos em 4 grupos: dieta padrão (DP), dieta hiperlipídica (DH), dieta padrão com eugenol (DPE) e dieta hiperlipídica com eugenol (DHE) durante 8 semanas. A suplementação do eugenol foi via gavagem na dose de 500mg/kg. O peso corporal foi avaliado semanalmente e ingestão diariamente. Foi realizado o teste de tolerância à glicose e o teste de tolerância à insulina na última semana do experimento. Ao final do tratamento, os animais foram eutanasiados e coletadas fezes, sangue e tecidos: hepático, pancreático, adiposos retroperitoneal, epididimal e marrom. As análises foram realizadas via ANOVA e Tukey. O nível de significância adotado foi de 5%. **Resultados:** para a ingestão alimentar obteve-se diferença entre os grupos DP e DH, onde o grupo hiperlipídico apresentou 20% menor consumo. Em relação ao ganho de peso corporal, a diferença foi entre os grupos DPE e DHE, onde o grupo DHE ganhou mais peso (40%). Apesar dos grupos hiperlipídicos terem apresentado um menor consumo da dieta, o eugenol não preveniu o ganho de peso no grupo DHE. Porém, notou-se um efeito do eugenol em prevenir o ganho de peso no grupo DPE. Para as gorduras retroperitoneal e epididimal a diferença foi entre os grupos DP e DH, tendo este último apresentado maior peso nessas gorduras. Na histologia, foi possível observar que o eugenol foi eficiente em prevenir o acúmulo de gordura hepática devido à presença de gotículas de gordura no grupo DH e à ausência no grupo DHE. Quanto à microbiota intestinal, observou-se melhora através do aumento no filo *Actinobactéria* nos grupos tratados (DPE e DHE) e redução de *Proteobactéria* no grupo DHE. **Conclusão:** o eugenol não preveniu o ganho de peso na DH, não preveniu o ganho de gordura corporal e também não melhorou o perfil glicídico e lipídico. Porém, a suplementação aparentou ter efeito protetor no acúmulo de gordura do fígado em camundongos alimentados com DH, além de ter proporcionado um aumento no filo *Actinobactéria* e redução no filo *Proteobactéria*.

Palavras-chave: obesidade, eugenol, microbiota intestinal, esteatose hepática, dieta hiperlipídica.

ABSTRACT

RODRIGUES, M. **Effects of eugenol in the gut microbiota, glycemic and lipid profile of high fat diet-fed mice.** 2020. 74s. Dissertation (Master of Science) – Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo. Ribeirão Preto, 2020.

Introduction: Obesity is a chronic, multifactorial disease, with increasing prevalence worldwide. It is associated with several factors, including genetic, emotional, environmental. Tissue inflammation and metabolic abnormalities that occur in obesity is associated with dysbiosis, the imbalance between the pathogenic and beneficial bacteria that compose the gut microbiota. Among obesity treatments, unconventional therapies have been gaining prominence and among them are herbal medicines. Eugenol is the main bioactive compound extracted from clove oil, and has several properties: antimicrobial, anti-inflammatory, antioxidant, among others. Therefore, in view of the high prevalence of obesity, the importance of the composition of the gut microbiota in the pathophysiology of this disease, and considering the components of eugenol, it is essential search for new measures to control this disease. **Objective:** evaluate the effects of eugenol on body weight, adipose tissue weight, lipid and glycidic profile, hepatic and pancreatic lipid accumulation and gut microbiota in mice fed a high-fat diet. **Methods:** 40 male mice (C57BL/6) were used, fed with industrialized feed, and divided into 4 groups: standard diet (SD), high-fat diet (HFD), standard diet with eugenol (SDE) and high-fat diet with eugenol (HFDE) during 8 weeks. Eugenol supplementation was via gavage at a dose of 500mg/kg. Body weight was assessed weekly and daily intake. The glucose tolerance test and the insulin tolerance test were performed in the last week of the experiment. At the end of the treatment, the animals were euthanized and were collected feces, blood and tissues: hepatic, pancreatic, retroperitoneal, epididymal and brown adipose. The analyzes were performed via ANOVA and Tukey. The significance level adopted was 5%. **Results:** for food intake, the difference was found between the SD and HFD groups, where the HFD group showed 20% less consumption. In relation to body weight gain, the difference was between the SDE and HFDE groups, where the HFDE group gained more weight (40%). Although the high-fat diet groups had a lower consumption of the diet, eugenol did not prevent weight gain in the HFDE group. However, an effect of eugenol in preventing weight gain in the SDE group was noted. For the retroperitoneal and epididymal fats, the difference was between the SD and HFD groups, once HFD group presented greater weight in these fats. In histology, it was possible to observe that eugenol was effective in preventing the accumulation of liver fat due to the presence of fat droplets in the HFD group and the absence in the HFDE group. Regarding the gut microbiota, improvement was observed through the increase in the phylum Actinobacteria in the treated groups (SDE and HFDE) and the reduction of Proteobacteria in the HFDE group. **Conclusion:** Eugenol did not prevent weight gain in HFD group, did not prevent the body fat gain, nor did it improve the glycidic and lipid profile. However, supplementation appeared to have a protective effect on the accumulation of liver fat in mice fed with HFD, in addition to providing an increase in the phylum Actinobacteria and a reduction in the phylum Proteobacteria.

Keywords: obesity, eugenol, gut microbiota, hepatic steatosis, high-fat diet.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Organograma de divisão dos grupos de animais e tempos de tratamento	30
Figura 2. Evolução do consumo alimentar.....	39
Figura 3. Evolução do peso corporal	40
Figura 4. Peso dos tecidos corrigidos por 100g do peso do animal	41
Figura 5. Peso dos tecidos adiposos nas regiões retroperitoneal	42
Figura 6. Cinética do comportamento da glicemia durante o teste de tolerância a glicose	44
Figura 7. Cinética do comportamento da glicemia durante o teste de tolerância a insulina	45
Figura 8. Imagem histológica do fígado.....	46
Figura 9. Imagem histológica do pâncreas.....	47
Figura 10. Abundancia relativa dos filis	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Constituição das dietas padrão (AIN 93 G) e dieta hiperlipídica (AIN 93 HF 40%) em 1000g de dieta.....	31
Tabela 2 - Composição Nutricional das dietas padrão e hiperlipídica referente à 100g de dieta.....	32
Tabela 3 - Sequência de <i>primers</i> utilizados para as bactérias de interesse neste estudo.....	35
Tabela 4 - Valores dos exames bioquímicos após 8 semanas de experimento.....	43

LISTA DE ABREVIATURAS

ACO – Acyl-CoA oxidase

AEE – Éster de aspirina e eugenol

AGCC – Ácido graxo de cadeia curta

AMPK – Proteína quinase ativada por monofosfato de adenosina

CPT-1 – Carnitine palmitoyltransferase-1

CT – Colesterol total

DCNT – Doença crônica não transmissível

DH – Dieta hiperlipídica

DHE – Dieta hiperlipídica + Eugenol

DHGNA – Doença hepática gordurosa não alcoólica

DL50 – Dose letal mediana

DM2 – Diabetes mellitus tipo 2

DP – Dieta padrão

DPE – Dieta padrão + Eugenol

EM – Endotoxemia metabólica

GTT – Teste de tolerância à glicose

H&E – Hematoxilina-Eosina

HCFD – Dieta rica em colesterol e gordura

HDL – Lipoproteína de alta densidade

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IL-6 – Interleucina-6

IMC – Índice de massa corporal

ITT – Teste de tolerância à insulina

MI – Microbiota intestinal

MS – Ministério da Saúde

OMS – Organização Mundial da Saúde

POF – Pesquisa de Orçamentos Familiares

RDC – Resolução da diretoria colegiada

RI – Resistência à insulina

SIRT1 – Sirtuína 1

SM – Síndrome metabólica

TA – Tecido adiposo

TAB – Tecido adiposo branco

TAG – Triacilglicerol

TAM – Tecido adiposo marrom

TG – Triglicérides

TNF- α – Fator de necrose tumoral-alfa

TRPV1 – Potencial receptor transitório vanilóide 1

VIGITEL – Vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 JUSTIFICATIVA.....	24
3 HIPÓTESE	26
4 OBJETIVOS.....	28
4.1 Objetivo Geral	28
4.2 Objetivos Específicos	28
5 METODOLOGIA	30
5.1 Desenho Experimental	30
5.2 Composição da Dieta e Análise do Consumo Alimentar	31
5.3 Ingestão Alimentar.....	32
5.4 Suplementação	32
5.4.1 Estudo Piloto	32
5.5 Avaliação Ponderal.....	33
5.6 Teste de Tolerância à Glicose (GTT) e Teste de Sensibilidade à Insulina (ITT) ..	33
5.7 Eutanásia dos Animais.....	34
5.8 Análise Histológica	34
5.9 Análise da Microbiota Intestinal.....	34
5.10 Quantificação de DNA bacteriano por PCR quantitativo	35
5.11 Avaliações Bioquímicas.....	35
5.12 Análise Estatística	36
6 RESULTADOS.....	39
6.1 Consumo Alimentar	39
6.2 Peso Corporal	40
6.3 Peso dos Tecidos.....	41
6.3.1 Fígado e Pâncreas	41
6.3.2 Gordura Retroperitoneal, Epididimal e Marrom	42
6.4 Parâmetros Bioquímicos	43
6.5 GTT e ITT	44

6.5.1 GTT	44
6.5.2 ITT	45
6.6 Análise Histológica do Fígado e Pâncreas	46
6.6.1 Fígado	46
6.6.2 Pâncreas	47
6.7 Microbiota Intestinal.....	48
 7 DISCUSSÃO	50
 8 CONCLUSÃO	60
 REFERÊNCIAS.....	62
 ANEXOS	72
Anexo 1 – Aprovação do CEUA – Comitê de Ética para Uso Animal da FMUSP.	72
Anexo 2 – Certificado de análise do eugenol.	73

Introdução

1 INTRODUÇÃO

A obesidade é uma doença crônica não transmissível (DCNT) caracterizada pelo acúmulo de gordura nos adipócitos.¹⁻³ Ela é resultado de alterações no balanço energético como, por exemplo, a maneira em que o organismo regula a ingestão, o gasto e o armazenamento de energia, e nesse caso a ingestão se sobrepõe a perda causando um balanço energético positivo.⁴ De etiologia multifatorial, é relacionada a vários fatores, entre eles, ambientais, emocionais, genética, estilo de vida.¹⁻³

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), a obesidade é classificada de acordo com o Índice de Massa Corporal (IMC) obtido pela divisão do peso, medido em quilogramas, pela altura ao quadrado, medida em metros (kg/m^2). Assim, considera-se um indivíduo obeso quando o mesmo apresenta IMC igual ou acima de 30 kg/m^2 , e ainda pode ser classificado em obeso grau I, II ou III conforme os valores de IMC.⁵

Devido à proporção que a obesidade tem alcançado nos últimos anos, essa doença constitui um grave problema de saúde pública a nível mundial, o que também representa um fator de risco importante para o surgimento de outras DCNT,⁶ tais como doenças cardiovasculares, arteriais, diabetes mellitus,⁷ câncer, hipertensão arterial^{8,9} doença arterial coronariana, acidente vascular cerebral, doenças respiratórias, entre outras.¹⁰ O excesso da ingestão energética associado ao estilo de vida sedentário são os principais fatores que levam ao aumento da incidência de obesidade, e consequentemente, maior risco para o desenvolvimento de resistência à insulina (RI).¹¹ Atualmente existem vários estudos que comprovam a relação da obesidade com a RI.¹²

Segundo a OMS, a obesidade a nível mundial quase triplicou desde 1975, no ano de 2016 mais de 1,9 bilhão de adultos se encontraram acima do peso, e destes, mais de 650 milhões eram obesos.¹³ De acordo com a Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico (VIGITEL), considerando a população adulta (≥ 18 anos), de ambos os sexos, das capitais dos 26 estados brasileiros e do Distrito Federal nos anos de 2006 a 2019, a taxa de obesidade no Brasil passou de 11,8% para 20,3% respectivamente.¹⁴

A OMS aponta a obesidade como um dos maiores problemas de saúde pública no mundo. A projeção é que, em 2025, cerca de 2,3 bilhões de adultos estejam com sobrepeso; e mais de 700 milhões, obesos.¹⁵

A atual epidemia de obesidade, no contexto do estilo de vida, é atribuída ao consumo crescente de dietas ocidentais, ricas em calorias, com alto teor de açúcar e gorduras saturadas.¹⁶ 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 (MS), mostra que o sobrepeso e a obesidade vêm crescendo em todos os sexos, faixas etárias, e níveis de renda, porém na população de baixa renda a velocidade do crescimento é maior.¹⁷

O tecido adiposo (TA) é um dos principais órgãos quando falamos de obesidade, sendo assim possui uma forte relação com a mesma. Esse órgão sempre foi estudado, mas nos últimos anos tem sido identificado como um órgão multifuncional, produtor e secretor de inúmeros peptídeos e proteínas bioativas, que são denominadas de adipocinas.¹⁸ Sendo assim, possui uma importante função endócrina, estando associado à fisiopatologia de algumas doenças, entre elas, obesidade, doenças cardiovasculares, diabetes, aterosclerose, entre outros.¹⁹

O crescimento hipertrófico dos adipócitos e a deposição de gordura em órgãos além do tecido adiposo,⁸ principalmente no fígado, causa uma série de doenças, desde doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) até RI.²⁰ A desregulação da expansibilidade do tecido adiposo e a produção anormal de adipocinas são dois mecanismos que nos ajudam compreender a resistência à insulina associada à obesidade.⁸

Contudo, o maior avanço do entendimento do TA como órgão secretor ocorreu no ano de 1994 com a descoberta da leptina, sendo a primeira adipocina a ser identificada,²¹ onde pesquisadores verificaram que camundongos ob/ob portadores de uma mutação disfuncional do gene da leptina eram obesos e tinha o apetite aumentado.¹⁹

Desde o seu descobrimento, várias outras adipocinas foram sendo descobertas e posteriormente estudadas. Observaram que estas desempenham funções autócrinas, parácrinas ou endócrinas, interferindo no metabolismo de lipídios e de glicose, e quando há produção desregulada, podem gerar diversas complicações patológicas.¹⁸ Dentre inúmeras adipocinas que estão relacionadas com o processo inflamatório, pode-se citar a interleucina-6 (IL-6), o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), leptina e a adiponectina.²²

O TA consiste no principal reservatório energético do nosso organismo, e os adipócitos são as únicas células especializadas no armazenamento de lipídios na

forma de triacilglicerol (TAG) em seu citoplasma.^{23,24} É composto por dois citotipos, tecido adiposo marrom (TAM) e o tecido adiposo branco (TAB).^{22,24}

Os adipócitos caracterizam-se pela abundância de gotas lipídicas citoplasmáticas. Os adipócitos brancos (que formam o TAB) têm como característica uma única gota esférica de lipídeo grande (adipócitos uniloculares), e o excesso dessa deposição de gordura está associado ao aumento de riscos de morbidade e mortalidade, além de que os adipócitos brancos podem alterar seu tamanho (diâmetro e volume) conforme a quantidade de TAG acumulada.^{23,24,25} O TAB pode ser dividido em dois tipos: subcutâneo e visceral. O subcutâneo se localiza na hipoderme, sob a pele, e o visceral é a gordura que une os órgãos internos e se acumula no mediastino e na cavidade abdominal.¹¹

Já os adipócitos do tecido marrom (que compõe o TAM), são menores que os brancos, e o núcleo é central e arredondado, com presença de várias gotículas lipídicas citoplasmáticas (adipócitos multiloculares).²⁵ O TAM é encontrado principalmente em fetos e recém-nascidos e está quase ausente em adultos. Sua característica principal é ser termogênico, ou seja, regular a produção de calor e também a temperatura corporal. A sua capacidade de produzir calor é devido a suas mitocôndrias não possuírem o complexo enzimático necessário para a síntese de ATP e utilizarem a energia liberada principalmente dos ácidos graxos para a termogênese.^{24,26}

PENG et al. (2020) constataram que o tecido adiposo marrom apresentou menor teor de gordura, maior fração de água e maior vascularização em comparação ao tecido adiposo branco. E para chegar a essas conclusões, realizaram a quantificação da concentração de gordura em ambos os tecidos em ratos Wistar através de imagem espectral por meio da tomografia computadorizada.²⁷

Já está definido que na obesidade além de ocorrer uma inflamação de baixo grau, ocorre também o aumento da expressão de citocinas pró-inflamatórias, como a IL-6, que atua na lipólise, metabolismo oxidativo, gasto energético e eliminação de glicose, regulando assim, vários aspectos do metabolismo.²⁸

O acúmulo de tecido adiposo visceral provoca o aumento de algumas citocinas pró-inflamatórias, como a proteína C reativa e como já mencionada a IL-6, tanto no tecido adiposo de humanos, como em modelos animais,²⁹ e na circulação sanguínea. Essa inflamação crônica gera alteração da sinalização insulínica em tecidos, como fígado, músculo e adipócitos, fazendo surgir então, a resistência insulínica (RI).^{12,30}

A RI faz parte de um conjunto de alterações conhecido como síndrome metabólica (SM), que por sua vez é definida por alguns fatores, entre eles intolerância à glicose, obesidade central/abdominal, dislipidemia e hipertensão. A RI exerce um importante papel na patogênese entre o pré-diabetes e a SM, além de deixar os indivíduos com um risco aumentado de doença cardiovascular, assim como o diabetes.³¹

Recentemente a microbiota intestinal (MI) passou a ser estudada como desempenhando importante papel na fisiopatologia da obesidade. Alguns estudos já têm mostrado a forte relação entre o ganho peso/obesidade e a composição da MI.³²⁻³⁵ O trato intestinal humano é composto por um grande número de microrganismos chegando até 100 trilhões (10^{14}), que são conhecidos como a MI.^{33, 36,37} A microbiota é composta por 7 principais filos: *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria*, *Fusobacteria*, *Verrucomicrobia*, *Cyanobacteria* e *Actinobactérias*. Sendo os grupos mais dominantes os *Bacteroidetes* e *Firmicutes*.^{32,38}

É importante ressaltar que os filos representam apenas uma categoria da classificação taxonômica, sendo assim, após os filos e em ordem decrescente, existem também as classes, ordem, família, gênero e espécies³³⁻³⁵.

A mesma desempenha um papel importante na permeabilidade da mucosa gastrointestinal, e também regula a fermentação e absorção de polissacarídeos, o que pode explicar sua importância na regulação do acúmulo de gordura e no consequente desenvolvimento de doenças relacionadas à obesidade,³² afetando então tanto a aquisição de nutrientes quanto a regulação da energia adquirida.³⁷

Quando a microbiota se encontra em estado de disbiose, ou seja, o desequilíbrio entre as bactérias patogênicas e benéficas que habitam a microbiota intestinal,^{33,39} gera um supercrescimento bacteriano, que irá levar ao aumento da permeabilidade intestinal e produção de toxinas,³⁷ que podem resultar em uma série de doenças, hipertensão,⁴⁰ depressão, doenças intestinais, inflamações, lesões articulares; como artrite reumatoide, hipovitaminose, perda de peso de forma não saudável, entre diversas outras.⁴¹

O estilo de vida, alimentação, sistema imune, uso de alguns tipos de medicamentos (antibióticos)⁴² idade, infância, tipo de parto, são alguns fatores que afetam a MI e podem contribuir para disbiose^{43,44} que está frequentemente associada ao aumento da suscetibilidade a infecções, doenças crônicas não transmissíveis,

como obesidade, síndrome metabólica,⁴³ doenças neurodegenerativas, neurológicas e câncer.⁴⁵

Dada essas informações, estudos têm demonstrado e comprovado que a composição da MI entre indivíduos magros e com obesidade se difere, tanto em modelo animal como em humanos.^{36,46} Indivíduos com obesidade possuem menor quantidade de *Bacteroidetes* e maior quantidade de *Firmicutes*, em comparação com indivíduos eutróficos.^{33,37,47} De acordo com o que foi observado recentemente por AMABEBE et al. (2020), uma dieta rica em gordura e carboidrato irá predominar os filos *Firmicutes*, *Prevotella* e deixar deficiente os *Bacteroidetes*, *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*. Essa alteração na MI está associada à expressão diminuída dos ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), que por sua vez mantem a integridade da barreira epitelial intestinal, aumentam a expressão de hormônios que suprimem a fome, reduzem a inflamação e a translocação bacteriana.³⁴ Porém à medida que o indivíduo perde peso, tanto com uma dieta hipocalórica restrita em gorduras ou carboidratos, os *Bacteroidetes* vão aumentando.⁴⁸

A fermentação de carboidratos por *Bacteroidetes*, *Bifidobacterium*, *Enterobacteria*, entre outros, resulta na síntese de AGCC que são utilizados pelo hospedeiro como fonte de energia, fornecendo uma proporção significativa da necessidade de energia diária. E esses AGCC e peptídeos microbianos inibem o crescimento de microorganismos patogênicos.^{37,44,49}

Segundo TURNBAUGH et al. (2006), quando a microbiota de camundongos obeso é transferida para camundongos com microbiota livre de germes, esses ganharam maior quantidade de gordura corporal comparado ao grupo controle que recebeu a microbiota de camundongos magros. Além de maior ganho de gordura, esses resultados indicam que a microbiota obesa possui capacidade aumentada de absorver energia da dieta.⁴⁸

Diversos estudos foram feitos a fim de associar as diferenças alimentares (alimentação saudável/balanceada *versus* não saudável/hipercalórica) com a composição da microbiota (indivíduo com obesidade *versus* magro), e de acordo com um desses estudos, foi constatado que as crianças africanas que viviam em comunidades rurais tinham padrões opostos da composição da MI ao comparar com as crianças de um centro urbano europeu.⁵⁰

A camada do muco intestinal é uma barreira contra invasores patógenos e alguns micróbios comensais. O consumo regular de fibra alimentar ajuda na

prevenção da erosão dessa barreira do muco pela MI diminuindo a infecção por patógenos e também a incidência de colite.⁵¹

Atualmente existem diversas opções para o tratamento da obesidade, sendo ele multidisciplinar e complexo, porém os mais utilizados consistem no tratamento dietético,² mudança dos hábitos alimentares associados ao exercício físico; a fim de obter um balanço energético negativo proporcionando um maior gasto de energia,⁵² tratamento farmacológico, fitoterápico, psicológico, cirúrgico, entre outros.^{2,37,53}

Segundo TOMAZZONI; NEGRELLE; CENTA (2006), foi a partir do século XIX que a fitoterapia teve maior avanço, devido ao progresso científico na área da química, o que permitiu analisar, identificar e separar os princípios ativos das plantas.⁵⁴ Verificou-se pelos estudos realizados com fitoterápicos, que os resultados obtidos na redução de peso foram satisfatórios, existindo poucos trabalhos contrários. Mas o tema ainda é bastante controverso, necessitando de muita pesquisa sobre forma de prescrição, de utilização, toxicidade, eficácia, entre outros.⁵⁵

Quando os tratamentos convencionais (reeducação alimentar, tratamento medicamentoso, cirúrgico, entre outros) não são eficazes, muitas pessoas procuram terapias não convencionais. Entre elas estão os medicamentos baseados em plantas que podem contribuir para a saciedade, aumento do metabolismo e, conseqüentemente maior perda de peso.⁵⁶ Isso é devido elas conterem componentes com efeitos anti-obesidade e anti-oxidante, que vão auxiliar no metabolismo e também na oxidação de gordura.⁵⁷ Estudos já demonstraram que os antioxidantes podem atuar como reguladores da obesidade em animais.⁵⁸

Sendo assim, o uso da fitoterapia que tem sido utilizada há centenas de anos, está cada vez mais crescente no mundo todo.⁵⁸ De acordo com a legislação brasileira RDC Nº 26, (13 de maio de 2014, artigo 3º), fitoterápico é definido como: “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”.⁵⁹

Dentre as inúmeras espécies existentes e estudadas, tem-se o eugenol que é o componente bioativo majoritário constituinte do óleo extraído do Cravo da Índia (*Syzygium aromaticum*).^{60,61} Os botões florais na forma seca do Cravo da Índia são frequentemente utilizados na culinária como condimento devido ao seu aroma e sabor

marcante⁶¹⁻⁶³ mas o cravo tem sido utilizado há milhares de anos como uma erva medicinal chinesa.⁶² Ele provem de uma árvore de porte arbóreo, com uma copa alongada que pode atingir em média 10 metros de altura, e seu ciclo vegetativo pode alcançar até mais de cem anos,^{63,64} e vale salientar que a influência do clima e do solo dos locais de cultivo podem ocasionar variações tanto na composição química quanto nos teores dos óleos essenciais.⁶⁴

Além de o eugenol ser o componente mais abundante encontrado no extrato, AFFONSO et al. (2012) realizaram uma síntese de relatos da literatura, onde foi constatado que ele é também o grande responsável por vários efeitos atribuídos à planta, entre eles: efeito anti-inflamatório, antimicrobiano, antioxidante, antiviral, anestésico, antitumoral, antidiabético, antisséptico, antibacteriano, inseticida, entre outros.⁶¹⁻⁶⁴

WLODARSKA et al. (2015) realizaram um estudo com camundongos onde testaram 6 fitonutrientes, entre eles o eugenol, com a finalidade de avaliar o mecanismo de ação e capacidade de alterar as respostas imunes da mucosa no intestino. Como resultado obteve-se que todos os fitonutrientes apresentaram alterações variáveis na expressão de genes imunes inatos no cólon, porém, apenas o eugenol estimulou a produção da camada interna de muco, que é uma importante barreira mucosa aos micróbios, e o mecanismo pelo qual essa substância causa esse espessamento da camada de muco envolve provavelmente estimulação microbiana. Sendo assim, esses achados sugerem que o eugenol age para fortalecer a barreira mucosa, aumentando a espessura da camada interna de muco, que protege contra patógenos e doenças invasoras.⁶⁵

O Brasil é um grande exportador de eugenol, e entre seus diversos usos pode-se destacar na odontologia como antisséptico e anestésico, em perfumaria, e na aromatização de doces, chocolates, sorvete devido a vanilina, pois é utilizado como matéria-prima para sua obtenção.^{63,66} O eugenol também pode ser extraído da canela, pimenta, louro, e outros óleos, e possui consistência líquida e oleosa, com aroma de cravo bem característico, coloração amarelada, além de ser solúvel em álcool e gordura.⁶⁷

Diante de todos os benefícios demonstrados do eugenol até o momento e do papel da microbiota intestinal na fisiopatologia da obesidade, o estudo do efeito do eugenol na modulação da microbiota intestinal é de fundamental importância, pois poderia ser uma opção na prevenção da obesidade.

Justificativa

2 JUSTIFICATIVA

Diante dos estudos supracitados a respeito do eugenol demonstrando seu potencial como anti-inflamatório, antimicrobiano, antioxidante, antidiabético, antibacteriano, entre outros, e diante do aumento da prevalência da obesidade, o estudo do possível efeito do eugenol na prevenção do ganho de peso, controles glicídico e lipídico e possível modulação da microbiota intestinal é muito importante.

Ou seja, esses resultados poderão ser relevantes para auxiliar na prevenção de uma doença de etiologia multifatorial como a obesidade.

Hipótese

3 HIPÓTESE

A suplementação do eugenol previne ganho de peso, diminui peso dos tecidos adiposos, melhora o perfil glicídico e lipídico, e modula a microbiota intestinal de camundongos alimentados com dieta hiperlipídica.

Objetivos

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

O objetivo do presente trabalho foi investigar os efeitos do eugenol na microbiota intestinal, perfil metabólico e peso corporal de camundongos C57BL/6 alimentados com dieta hiperlipídica.

4.2 Objetivos Específicos

Avaliar e comparar entre os grupos tratados e controles:

- A ingestão alimentar ao longo do tratamento;
- O ganho de peso corporal;
- O peso dos tecidos hepático, pancreático, adiposo retroperitoneal, adiposo epididimal e adiposo marrom;
- O perfil lipídico pela dosagem sérica de colesterol total, triglicerídeos e HDL-colesterol;
- A dosagem sérica de insulina;
- A resistência à insulina pelo Teste de Tolerância à Glicose (GTT) e Teste de Tolerância à Insulina (ITT);
- O acúmulo de lipídio hepático e pancreático através da análise histológica;
- Determinação dos filos da microbiota intestinal.

Metodologia

5 METODOLOGIA

5.1 Desenho Experimental

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP, em 11 de dezembro de 2017, como adendo ao protocolo nº 16/2015-1 e iniciado somente após aprovação (Anexo 1).

Foi realizado um estudo experimental, longitudinal, randomizado de abordagem quantitativa. Utilizou-se de 40 camundongos machos C57BL/6, 60 dias após o nascimento, provenientes do Biotério Central da Universidade de São Paulo, campus Ribeirão Preto e divididos em 4 grupos de 10 animais cada.

Figura 1. Organograma de divisão dos grupos de animais e tempos de tratamento

Quando recebidos os animais no Biotério da Clínica Médica, os mesmos foram mantidos em gaiolas seletivas à temperatura de $25 \pm 1,0$ °C em ambiente com ciclo de luminosidade de 12 horas (7:00h às 19:00h) com livre acesso à água e ração industrializada AIN 93 G (dieta padrão) por uma semana para adaptação do ambiente.

Após essa semana, os animais foram randomizados em dois grupos de 20 camundongos cada para adaptação da dieta: dieta padrão (DP, n=20) e dieta hiperlipídica (DH, n=20), e assim ficaram por mais duas semanas.

Após essas 3 semanas de adaptação, os grupos foram novamente randomizados e divididos em subgrupos com 10 camundongos em cada conforme descrito abaixo:

- Dieta Padrão (DP, n=10): animais que receberam somente dieta padrão;
- Dieta Hiperlipídica (DH, n=10): animais que receberam somente dieta hiperlipídica;
- Dieta Padrão + eugenol (DPE, n=10): animais que receberam dieta padrão + a suplementação do eugenol.
- Dieta Hiperlipídica + eugenol (DHE, n=10): animais que receberam dieta hiperlipídica + a suplementação do eugenol.

5.2 Composição da Dieta e Análise do Consumo Alimentar

Foi utilizada como dieta padrão a ração industrializada AIN 93 G, sendo disponibilizada no Biotério da Clínica Médica da FMRP-USP, baseada na recomendação do *American Institute of Nutrition*, AIN-93, para roedores em crescimento. E como dieta hiperlipídica, foi utilizada dieta hiperlipídica AIN 93 HF 40% também industrializada, com 40% de lipídeos em sua composição.

A composição das dietas padrão e hiperlipídica estão apresentadas na tabela 1.

Tabela 1 - Constituição das dietas padrão (AIN 93 G) e dieta hiperlipídica (AIN 93 HF 40%) em 1000g de dieta.

Ingredientes	DP		DH	
	g/kg	kcal	g/kg	kcal
Amido de milho	397,5	1590	273,7	1095
Caseína	200	800	220	880
Amido dextrinizado	132	528	100	400
Sacarose	100	400	100	400
Óleo de soja	70	630	40	360
Banha	-	-	167	1503
Celulose microcristalina	50	-	50	-
Mix de mineral (AIN 93 M) ¹	35	-	35	-
Mix de vitamina (AIN 93) ²	10	40	10	40
L cistina	3	12	1,8	7,2
Bitartarato de colina	2,5	-	2,5	-
BHT	0,014	-	0,014	-
Total	1000	4000	1000	4685,2

A composição nutricional da dieta padrão e da dieta hiperlipídica, está descrita na tabela 2.

Tabela 2 - Composição Nutricional das dietas padrão e hiperlipídica referente à 100g de dieta.

Macronutrientes ^{&}	DP*		DH [#]	
	%	kcal	%	kcal
Carboidratos	64	2558	41,3	1935
Lipídeos	15,8	630	39,8	1863
Proteínas	20,3	812	18,9	887,2
Total	100	4000	100	4685,2

*Padrão. [#]Hiperlipídica. [&]Fonte:PragSoluções

5.3 Ingestão Alimentar

A dieta foi oferecida semanalmente, 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. A água oferecida foi renovada diariamente.

5.4 Suplementação

Os animais foram suplementados com eugenol (Ref: E5504 Sigma- Aldrich – Eugenol Liquid, poder $\geq 97\%$ - HPLC) (Anexo 2). A quantidade suplementada foi de 500 mg/kg de peso do animal, definida em estudo piloto, e a mesma foi administrada via gavagem com agulhas específicas por 8 semanas. Nos animais que não receberam a suplementação, foi administrado apenas óleo de soja como veículo a fim de gerar o mesmo estresse em todos os grupos, para que a única diferença entre os grupos fosse apenas o extrato.

5.4.1 Estudo Piloto

Devido à falta de estudos na literatura que relatassem possível toxicidade e doses ideais do eugenol, foi realizado um estudo piloto com 48 camundongos

divididos em 4 grupos com 12 animais cada. Dois grupos alimentados com a DP (um com e um sem a suplementação), e mais dois grupos alimentados com a DH (um com e um sem a suplementação).

Para estabelecer a dose e consequentemente testar sua toxicidade, foi observado e avaliado o bem-estar geral dos animais, através da análise do apetite, da ausência de sangramento, queda de pelo e consequente se haveria óbito dos animais. Como não houve nenhuma intercorrência durante o teste, a dose estabelecida do eugenol foi de 500mg/kg de peso.

5.5 Avaliação Ponderal

Os animais foram pesados no início, semanalmente e no final do experimento. O peso (gramas) foi aferido em balança digital com capacidade máxima para 15 kg (Filizola S. A., São Paulo, Brasil).

5.6 Teste de Tolerância à Glicose (GTT) e Teste de Sensibilidade à Insulina (ITT)

Na última semana após o tratamento, foram realizados o GTT e o ITT.

No GTT após jejum de 8 horas foi feita a primeira coleta de sangue (tempo 0) por meio do 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, segundo 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 do glicosímetro Accu-Chek (Accu-chek Performa Roche, Mannheim, Alemanha), de acordo com as especificações do fabricante.⁶⁸

O ITT foi realizado após jejum de 6 horas, momento em que foi feita a primeira coleta de sangue (tempo 0) por meio do corte na extremidade caudal do animal. A seguir, foi administrada, via intraperitoneal, uma solução de insulina na dose de 2UI diluída em 10 ml 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.

5.7 Eutanásia dos Animais

Ao final do tratamento, os animais foram eutanasiados por decapitação. Durante o sacrifício foram coletadas amostras sanguíneas para dosagem de insulina e lipidograma, as quais foram prontamente centrifugadas a 3500rpm, a 4°C durante 15 minutos para a obtenção do soro, o qual foi armazenado em freezer a -70°C.

Nesse momento, também foram coletadas amostras de tecidos hepático, pancreático, adiposo epididimal, adiposo retroperitoneal e adiposo marrom, as quais foram pesadas e armazenadas no freezer -70°C. Após pesados, fragmentos dos tecidos hepático e pancreático, foram retirados e imediatamente mantidos em formol, até o momento da análise histológica.

Também foram coletadas amostras de fezes e armazenadas em microtubo estéril e congeladas até o momento da análise da microbiota intestinal.

5.8 Análise Histológica

As secções dos tecidos foram fixadas com formol e embebidas em parafina, cortadas com uma espessura de 5 µm e coradas com hematoxilina e eosina (H&E) para exame histológico. As preparações foram avaliadas, com as identificações não reveladas, por um patologista experiente através de microscopia óptica, o mesmo estimou a intensidade de esteatose hepática, balonização hepatocelular e sua localização no ácino hepático. A análise foi feita em 10 campos de maior aumento escolhidos de forma aleatória com ampliação x40 em cada lâmina. As classificações da gravidade das alterações histológicas foram: ausência de alterações, alterações leves, alterações moderadas e alterações graves.⁶⁹

5.9 Análise da Microbiota Intestinal

Para avaliar a abundância relativa dos filos da microbiota intestinal, foi realizada a coleta fecal simples das fezes íntegras e estéreis, localizadas na parte final do intestino (reto), e transportadas imediatamente para um microtubo estéril, a fim de evitar contaminação da amostra. A pinça usada para coleta dessas amostras foi exclusiva e separada dos demais materiais. Para a PCR quantitativa de bactérias dos filos das amostras fecais, elas foram congeladas até a sua utilização.

5.10 Quantificação de DNA bacteriano por PCR quantitativo

O DNA fecal foi obtido usando o Kit DNeasy® PowerSoil® (Qiagen, Hilden, Alemanha). A 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. A sequência de *primers* está descrita na Tabela 3.⁷⁰ 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* utilizados para as bactérias de interesse neste estudo.

Nome	Sequência
<i>Actinobacteria</i>	F- TGTAGCGGTGGAATGCGC R- AATTAAGCCACATGCTCCGCT
<i>Bacteroidetes</i>	F- GTTTAATTTCGATGATACGCGAG R- TTAASCCGACACCTCACGG
<i>Firmicutes</i>	F- ATGTGGTTTAATTCTGAAGCA R- AGCTGACGACAACCATGCAC
<i>Proteobacteria</i>	F- CATGACGTTACCCGCAGAAGAAG R- CTCTACGAGACTCAAGCTTGC
<i>Eubacteria</i> universal	F- ACTCCTACGGGAGGCAGCAGT R- ATTACCGCGGCTGCTGGC

5.11 Avaliações Bioquímicas

O colesterol total 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 triglicerídeos totais 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 gliceroquinase. 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.

O HDL sérico, medido no soro, foi determinado pelo método calorímetro enzimático por meio do kit comercial (Labtest Diagnóstica S.A., Brasil). Neste, as lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL) e as lipoproteínas de baixa densidade (LDL) foram quantitativamente precipitadas e, após centrifugação, o colesterol ligado às lipoproteínas de alta densidade (HDL) foi determinado no sobrenadante.

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.⁶⁸

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 imunoensaio do tipo sanduíche, em que cada microplaca é revestida com anticorpo monoclonal específico para insulina.⁶⁸

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.

5.12 Análise Estatística

Os dados foram apresentados como média e desvio padrão. As variáveis foram testadas utilizando-se ANOVA de uma via, seguida pelo pós-teste de comparações múltiplas de Tukey. Os dados obtidos foram analisados utilizando-se o software SPSS

versão 22 para confecção de gráficos e a realização de testes estatísticos. O nível de significância adotado foi de 5%.

Resultados

6 RESULTADOS

6.1 Consumo Alimentar

Para o consumo alimentar, observa-se que no momento pré, não houve diferença entre os grupos. A partir desse período pré até a semana 1 todos os grupos tiveram uma redução no consumo alimentar podendo esse fato ser explicado pelo início da gavagem, e ao longo do tratamento os animais se acostumaram com a intervenção e a ingestão se estabilizou (Figura 2A). Na figura 2B, observa-se que os grupos DP e DPE apresentaram maior consumo alimentar total, com diferença apenas entre DP versus DH (consumo ~20% menor).

Figura 2. Evolução do consumo alimentar (Painel A). Consumo alimentar total após protocolo experimental (Painel B). DP: dieta padrão; DH: dieta hiperlipídica; DPE: dieta padrão com eugenol; DHE: dieta hiperlipídica com eugenol. *diferente de DP para ANOVA seguido de pós-teste de Tukey (significância $p < 0,05$). Dados expressos como média $\pm$ desvio padrão, $n = 10$.

6.2 Peso Corporal

No início do tratamento os grupos partiram da mesma média de peso corporal. Após adaptação de 3 semanas (momento pré), todos os grupos começaram a ganhar peso, porém sem diferença entre eles (Figura 3A). Na figura 3B, observa-se diferença entre os grupos DPE e DHE, sendo o maior ganho de peso (~40%) no grupo DHE em relação ao DPE.

Figura 3. Evolução do peso corporal (Painel A). Ganho de peso após protocolo experimental (Painel B). DP: dieta padrão; DH: dieta hiperlipídica; DPE: dieta padrão com eugenol; DHE: dieta hiperlipídica com eugenol. & diferente de DPE para ANOVA seguido de pós-teste de Tukey (significância $p < 0,05$). Dados expressos como média $\pm$ desvio padrão, $n = 10$.

6.3 Peso dos Tecidos

6.3.1 Fígado e Pâncreas

Em relação ao peso dos tecidos hepático e pancreático, não foi possível observar diferenças entre os grupos (Figura 4A e 4B).

Figura 4. Peso dos tecidos corrigidos por 100g do peso do animal; fígado (painel A) e pâncreas (painel B). DP: dieta padrão; DH: dieta hiperlipídica; DPE: dieta padrão com eugenol; DHE: dieta hiperlipídica com eugenol. Dados expressos como média $\pm$ desvio padrão, $n = 10$.

6.3.2 Gordura Retroperitoneal, Epididimal e Marrom

O consumo de dieta hiperlipídica resultou em aumento significativo no depósito de gordura retroperitoneal (~90% maior no grupo DH comparado ao DP) e gordura epididimal (~75% maior em DH comparado à DP), figura 5A e 5B respectivamente. Apesar de observarmos menor depósito de gordura retroperitoneal (~23%) e epididimal (~5%) no grupo DHE comparado ao DH, estas diferenças não apresentaram significância estatística (Figura 5A e 5B). Já para o peso de tecido de gordura marrom, não se observou diferenças (Figura 5C).

Figura 5. Peso dos tecidos adiposos nas regiões retroperitoneal (painel A), epididimal (painel B) e gordura marrom (painel C). DP: dieta padrão; DH: dieta hiperlipídica; DPE: dieta padrão com eugenol; DHE: dieta hiperlipídica com eugenol. *diferente de DP para ANOVA seguido de pós-teste de Tukey (significância $p < 0,05$). Dados expressos como média $\pm$ desvio padrão, $n = 10$.

6.4 Parâmetros Bioquímicos

Mesmo com consumo de dieta hiperlipídica, a adição de eugenol no grupo DHE resultou em aumento expressivo e significativo de HDL (~73%) quando comparado ao DPE. Ainda no grupo DHE, apesar de não apresentar diferenças, os valores de HDL foram ~31% maiores quando comparado ao DH, o que mostra benefícios do eugenol nesta variável. A adição de eugenol na dieta hiperlipídica não impediu que o grupo DHE apresentasse valores ~45% maiores de CT quando comparado ao DH. Por outro lado, observou-se que o eugenol preveniu aumentos significativos de TG quando se comparou o grupo DHE versus DH. De maneira não esperada, o grupo DH apresentou valores significativos de TG ~38% menor quando comparado ao grupo DP. Já para a insulinemia, apesar de não ser observado diferenças, os grupos DH e DHE apresentaram ~4% e ~26% maiores valores respectivamente, quando comparados aos grupos de dieta padrão (DP e DPE). Na comparação entre DHE versus DH apenas, também não se encontrou diferenças na insulinemia, entretanto, na presença do eugenol (grupo DHE), se observou um aumento de ~36% na comparação com o grupo DH (Tabela 4).

Tabela 4 - Valores dos exames bioquímicos após 8 semanas de experimento.

Variável	DP	DH	DPE	DHE
HDL (mg/dL)	84,35 ± 26,89	77,66 ± 14,47	58,61 ± 30,59	101,5 ± 13,84 ^{&}
CT (mg/dL)	121,8 ± 29,64	123 ± 27,03	144,1 ± 47,44	178,1 ± 28,57 [#]
TG (mg/dL)	90,41 ± 29,28	55,89 ± 7,26 [*]	81,36 ± 28,12	61,21 ± 15,89
Insulina (ng/dL)	0,72 ± 0,40	0,75 ± 0,32	0,81 ± 0,53	1,02 ± 0,32

HDL: high-density lipoprotein; CT: colesterol total; TG: triglicerídeos. DP: dieta padrão; DH: dieta hiperlipídica; DPE: dieta padrão com eugenol; DHE: dieta hiperlipídica com eugenol. ^{*}diferente de DP, [#]diferente de DH e [&]diferente de DPE para ANOVA seguido de pós-teste de Tukey (significância $p < 0,05$). Dados expressos como média ± desvio padrão, n= 10.

6.5 GTT e ITT

6.5.1 GTT

Para o GTT, os grupos DP e DPE apresentaram ~20% menor pico de glicemia (30') em comparação aos grupos DH e DHE. Apesar desta diferença percentual, o comportamento da cinética da glicose durante o GTT foi semelhante entre os grupos, não sendo observadas diferenças tanto para efeito da dieta quanto para efeito da suplementação de eugenol (Figura 6A). Na análise da área sob a curva da glicose (AUC), não se observou diferenças para efeitos da dieta e eugenol entre os grupos (Figura 6B).

Figura 6. Cinética do comportamento da glicemia durante o teste de tolerância a glicose (painel A) e área sob a curva da glicose do GTT (painel B). DP: dieta padrão; DH: dieta hiperlipídica; DPE: dieta padrão com eugenol; DHE: dieta hiperlipídica com eugenol. Dados expressos como média $\pm$ desvio padrão, n= 10.

6.5.2 ITT

No ITT, não se observou diferenças tanto para o efeito da dieta e efeito da suplementação no comportamento da cinética da glicose durante o teste (Figura 7A). Na análise da AUC, não se observou diferenças para efeitos da dieta e eugenol entre os grupos (Figura 7B).

Figura 7. Cinética do comportamento da glicemia durante o teste de tolerância a insulina (painel A) e área sob a curva da glicose do ITT (painel B). DP: dieta padrão; DH: dieta hiperlipídica; DPE: dieta padrão com eugenol; DHE: dieta hiperlipídica com eugenol. Dados expressos como média $\pm$ desvio padrão, $n=10$.

6.6 Análise Histológica do Fígado e Pâncreas

6.6.1 Fígado

Na análise da lâmina do fígado, foi possível observar que no grupo DH houve pequena formação de gordura (apontada pela flecha). Já no grupo DHE, não foi possível observar a formação dessas gotículas, sugerindo um possível efeito protetor do eugenol na prevenção do acúmulo de gotículas de gordura ectópica. Nos demais grupos não foi possível observar nenhuma alteração histológica (Figura 8).

Figura 8. Imagem histológica do fígado. DP: dieta padrão; DH: dieta hiperlipídica; DPE: dieta padrão com eugenol; DHE: dieta hiperlipídica com eugenol. Corado com hematoxilina e eosina aumentado em 40x.

6.6.2 Pâncreas

Na análise do pâncreas não foi observado nenhuma alteração histológica relacionada formação de gotículas de gordura (Figura 9).

Figura 9. Imagem histológica do pâncreas. DP: dieta padrão; DH: dieta hiperlipídica; DPE: dieta padrão com eugenol; DHE: dieta hiperlipídica com eugenol. Corado com hematoxilina e eosina aumentado em 40x.

6.7 Microbiota Intestinal

Para o filo *Firmicutes*, observou-se diferenças entre os grupos DH e DPE em comparação com o DP. Também se observou diferenças entre DH e DPE em comparação com DHE, onde os grupos suplementados com eugenol apresentaram maior quantidade de *Firmicutes* em relação aos grupos sem eugenol (Figura 10A).

Para o filo *Bacteroidetes*, foi observada uma diferença entre o grupo DPE em comparação com o DP. Observou-se também diferença entre DH e DPE em comparação com DHE, onde os grupos suplementados com eugenol apresentaram maiores quantidades de *Bacteroidetes* em relação aos grupos sem a suplementação (Figura 10B)

Para o filo *Actinobactéria*, foi observada diferença entre o grupo DPE em comparação com o DP. Também foi demonstrada diferença entre DH e DPE em comparação com DHE, onde os grupos suplementados com eugenol apresentaram maiores quantidades de *Actinobactéria* em relação aos grupos sem eugenol (Figura 10C).

E por último, para o filo *Proteobactéria*, observou-se diferença nos maiores valores do grupo DPE comparado ao DP e de maneira controversa, nos menores valores do grupo DHE comparado ao DPE (Figura 10D).

Figura 10. Abundancia relativa dos filios *Firmicutes* (A), *Bacteroidetes* (B), *Actinobacteria* (C) e *Proteobacteria* (D) na microbiota intestinal. FC: fold change. DPE: dieta padrão com eugenol; DHE: dieta hiperlipídica com eugenol. *diferente de DP, #diferente de DH e &diferente de DPE para ANOVA seguido de pós-teste de Tukey (significância $p < 0,05$). Dados expressos como média $\pm$ desvio padrão, $n = 10$.

Discussão

7 DISCUSSÃO

O indivíduo com obesidade é constantemente julgado por parte da sociedade por falta de força de vontade e autocontrole.⁷¹ Mas hoje já é sabido que a obesidade é uma doença crônica, de origem multifatorial sendo considerada pela OMS uma epidemia mundial.⁵ Sendo assim, são necessários estudos que avaliem estratégias nutricionais que possam ser eficazes e que auxiliem na prevenção dessa doença.

Nesse contexto e considerando a fitoterapia como opção de prevenção desta patologia, o uso do eugenol poderia exercer efeitos benéficos na obesidade devido sua ação relatada em literatura de efeito antioxidante, anti-inflamatório, antimicrobiano, antidiabético, antitumoral, entre outros. Dessa forma, foi desenvolvido esse trabalho, a fim de avaliar os resultados do efeito dessa suplementação em camundongos C57BL/6 alimentados com DH, investigando assim, seu possível efeito preventivo no ganho de peso, nas alterações do lipidograma, no acúmulo de lipídios corporais, na resistência à insulina e na modulação da microbiota intestinal.

Uma vez que são escassos na literatura os estudos com eugenol, para testar, avaliar e definir a dose ideal, foi realizado um estudo piloto avaliando o bem-estar geral dos animais, através do apetite, ausência de sangramento, queda de pelo e consequente, óbito. A dose utilizada foi de 500mg/kg de peso pelo fato de estar dentro de uma dose não tóxica segundo o estudo de DE SOUZA (2007), em que avaliaram a toxicidade aguda do eugenol por meio da dose letal mediana (DL50) em camundongos Swiss alimentados com DH. Os animais foram divididos em 3 grupos com diferentes doses do eugenol: 600mg, 1500mg e 3000mg/kg de peso. Após a administração, os camundongos foram observados de forma contínua por 120 minutos seguido de intervalos de 8/8h por 72 horas. Entre os parâmetros observados para a determinação da toxicidade aguda, estão atividade motora espontânea, alerta, locomoção, sedação, dispneia, ptose, piloereção, micção e morte determinando um DL50 de 1,2g/kg. Como conclusão, observaram que o eugenol administrado via oral apresenta baixa toxicidade, e na dose de 600mg/kg os animais não apresentaram nenhuma alteração nos parâmetros avaliados, já nas doses de 1500mg e 3000mg começaram a apresentar sintomas de toxicidade descritos acima.⁷²

Em relação ao modelo animal utilizado (C57BL/6), SURWIT et al. (1995) fez um estudo com 2 tipos de camundongos para ver qual seria o melhor modelo para desenvolver obesidade e diabetes, como resultado obteve-se que a linhagem

C57BL/6J é a mais predisposta a armazenar gordura em resposta à DH e também a desenvolver consequente obesidade, hiperglicemia e hiperinsulinemia.⁷³ Algumas características típicas desses camundongos são alta susceptibilidade a obesidade, diabetes tipo 2 e aterosclerose induzidos pela dieta, resistência à toxicidade a clorofórmio, baixa frequência de urinação e defecação e alta preferência ao álcool.⁷⁴

No que diz respeito às dietas utilizadas no presente trabalho (padrão e hiperlipídica), WHITE et al. (2013) utilizaram as mesmas dietas obtidas comercialmente da PragSoluções, com diferença apenas na porcentagem de lipídios da DH, sendo que no estudo de WHITE 2013 a DH continha 57,6% de lipídios e no presente estudo foi utilizado 40% de lipídios. Os autores concluíram que após 10 semanas de DH ofertada a camundongos Swiss, a mesma foi extremamente eficaz para induzir obesidade, promover resistência à ação da insulina e intolerância à glicose.⁷⁵ Segundo BUETTNER et al. (2006) um fator considerado importante para propiciar maior adiposidade, independentemente de uma maior ingestão calórica, é o tipo que gordura utilizada. De acordo com os autores as melhores gorduras para se utilizar são as saturadas e monoinsaturadas, e um exemplo dessas duas gorduras é a banha, muito recomendada para gerar um modelo válido de obesidade com alterações metabólicas em roedores.⁷⁶

Os resultados obtidos através da suplementação do eugenol em camundongos alimentados com DP e DH com relação à ingestão alimentar mostrou diferença entre os grupos DP e DH, concordando com WHITE et al. (2013), e embora de forma não significativa os grupos DP e DPE tiveram um maior consumo alimentar total.⁷⁵ Estudo realizado por JUNG et al. (2012) utilizando o extrato do cravo em camundongos C57BL/6J por 9 semanas, também não encontraram nenhuma diferença na ingestão alimentar entre a suplementação e a DH.⁷⁷ Outro estudo utilizando um éster de aspirina com eugenol (AEE) em ratos Wistar por 8 semanas, encontrou que o consumo alimentar do grupo DH e DH+AEE foi significativamente menor do que o grupo DP, e não foi observado diferença entre DH e DH+AEE, onde novamente nossos achados corroboraram.⁷⁸

Este último trabalho utilizou o éster de aspirina eugenol (AEE), um composto que exibe atividades anti-hiperlipidêmica eficazes.⁷⁸ A aspirina, que é utilizada no tratamento de inflamações, febre, prevenção de doenças cardiovasculares, tem mostrado efeito terapêutico na dislipidemia e hiperinsulinemia segundo alguns estudos.⁷⁹ O eugenol, como já visto, também melhora o perfil lipídico devido ao efeito

anti-hiperlipidêmico, porém os danos gastrointestinais da aspirina e a vulnerabilidade do eugenol limitam a aplicação. Sendo assim, para reduzir efeitos colaterais e melhorar estabilização, por meio de uma modificação estrutural química foi sintetizado o éster de aspirina e eugenol, foram feitos vários testes de toxicidade, metabolismo, farmacodinâmica, teratogenicidade, e foi confirmado que esse composto tem boa capacidade de drugabilidade e é bem promissor.⁷⁸

Em relação a variável peso corporal, a análise evidenciou diferença entre DPE e DHE, onde o grupo DHE apresentou 40% a mais de ganho de peso. Os grupos DP e DH ganharam peso aparentemente igual, o que explica mais uma vez, a efetividade da dieta, pois o grupo DH teve menor ingestão e ganhou mais peso devido à densidade energética da dieta hiperlipídica ser mais alta e consequentemente mais calórica, e entre todos os grupos embora não significativo, o grupo DPE foi o que ganhou menos peso.

Esses resultados não concordam com os resultados encontrados por JUNG et al. (2012) que verificaram que a suplementação do cravo da Índia associado à DH ofertados a camundongos C57BL/6J durante 9 semanas promoveu significativamente um menor ganho corporal comparado somente a DH.⁷⁷ Assim como DING et al. (2017) que também observou que o extrato do cravo adicionado na DH ofertado a camundongos C57BL/6J por 14 semanas promoveu ganho de peso corporal muito menor na DH com o suplemento.⁸⁰

Um estudo feito por AL-OKBI et al. (2014) verificou que microemulsões do extrato de cravo e do eugenol em ratos Sprague Dawley alimentados com dieta rica em frutose por 4 semanas não promoveram diferença no peso corporal entre os grupos experimentais, porém o grupo com a microemulsão de eugenol foi o que menos ganhou peso.⁸¹

HARB et al. (2019), utilizaram duas doses de eugenol 10mg e 100mg/kg de peso em ratos Wistar alimentados com dieta hipercolesterolêmica (DHC) e dieta padrão (DP) por 4 semanas e observaram que todos os grupos começaram o experimento com peso corporal semelhante, porém animais dos grupos DHC e DHC+eugenol 100mg ganharam menor peso comparado aos animais da DP, e os animais do grupo DHC+eugenol 10mg mostraram aumento no peso corporal em relação em relação ao DHC ficando ao lado do grupo DP ao final do experimento,⁸² sendo nossos achados diferentes desses citados.

Em relação ao peso dos tecidos, nossos resultados para o fígado não obtiveram nenhuma diferença, não concordando com os achados de JUNG et al. (2012) que observaram menor peso para esse órgão no grupo tratado em relação ao não tratado.⁷⁷ Os dados do presente estudo também não concordam com os resultados de DING et al. (2017) que encontraram o peso do fígado reduzido nos grupos tratados.⁸⁰ Nossos achados também discordam dos resultados de JO et al. (2014) que suplementaram eugenol em camundongos C57BL/6J alimentados com DH por 12 semanas, uma vez que os autores verificaram que o eugenol reduziu significativamente o peso do fígado comparado ao grupo DH sem tratamento.⁸³

Um estudo realizado por MA et al. (2018) sintetizando um éster de aspirina e eugenol (AEE) em ratos Wistar com DH por 8 semanas, mostrou que apesar de não significativo, o peso do fígado do grupo DH com tratamento foi menor do que o sem tratamento.⁷⁸ Esses resultados controversos podem explicar-se pelo tempo do tratamento do nosso trabalho que foi menor do que os demais.

Por último, HARB et al. (2019) concluíram que os grupos alimentados com DHC e DHC+eugenol 10mg e 100mg tiveram maior peso do fígado em comparação ao grupo DP, e o grupo DHC+eugenol 10mg teve o peso do fígado significativamente menor em comparação ao DHC.⁸²

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

Sobre o peso dos tecidos adiposos, JUNG et al. (2012) e DING et al. (2017) encontraram que o peso da gordura epididimal do grupo DH com suplementação do extrato de cravo foi significativamente menor do que o grupo DH.^{77,80} Esse achado não foi observado em nosso estudo, pois apesar de o grupo DHE ter apresentado 5% menos de depósito de gordura epididimal comparado ao DH, a mesma não representou diferença. Observou-se diferença apenas entre os grupos DP e DH, o que já era esperado devido à dieta hiperlipídica, e esses resultados vão ao encontro com os achados de WHITE et al. (2013) que mostrou que o peso das gorduras epididimal e retroperitoneal foram maiores na DH comparado à DP,⁷⁵ podendo comprovar mais uma vez a eficácia das dietas utilizadas.

Não foram encontrados na literatura estudos que avaliaram a relação entre o peso das gorduras retroperitoneal e marrom e a suplementação do eugenol.

Quanto aos parâmetros bioquímicos dos lipídios séricos (HDL, colesterol total e triglicérides), nossos achados mostraram diferença para o HDL entre os grupos DPE

e DHE, sendo que este último apresentou um aumento de 73%, o que não se é esperado devido ao consumo da dieta hiperlipídica. Porém, apesar de não significativo, no grupo DHE, o valor foi 31% maior quando comparado ao DH, mostrando efeito benéfico do eugenol na dieta hiperlipídica. Já com relação ao colesterol total, a diferença foi entre os grupos DH e DHE, sendo o grupo suplementado com valor 45% maior, mas pode-se especular que esse aumento tenha sido devido ao aumento do HDL. Os triglicérides, de forma também não esperada devido ao alto consumo de lipídios da dieta, apresentou diferença entre os grupos DP e DH, sendo que o grupo DH apresentou valores 38% mais baixos. Porém o eugenol evitou que o grupo DHE apresentasse maiores valores comparados ao DH, embora sem diferença, apresentou uma tendência à prevenção ao aumento significativo do TG.

Esses resultados não concordam com o estudo de JUNG et al. (2012) que observaram que os níveis de TC e TG da DH com suplemento do extrato de cravo foram significativamente menores do que o grupo DH, sugerindo que a suplementação exerce efeito hipolipidêmico.⁷⁷ Também não vai ao encontro dos achados de DING et al. (2017) que mostraram que o extrato de cravo na DH diminuiu significativamente os níveis de TG.⁸⁰ E nem aos de ELBAHY; MADKOUR; ABDEL-RAHEEM (2015) que realizaram um estudo em ratos hiperlipidêmicos mostrando que a administração de 250mg/kg de peso de eugenol mostrou-se benéfica no perfil lipídico, com redução significativa de CT e TG, no grupo hiperlipidêmico com eugenol comparado ao grupo sem a suplementação.⁸⁴

Ao final do tratamento de 4 semanas foi observada uma diminuição nos níveis de CT e LDL em ambos os grupos: DHC+eugenol 10mg e 100mg em comparação ao grupo DHC, confirmando a atividade hipocolesterolêmica do eugenol. Porém os níveis de HDL e TG não foram afetados pela suplementação sugerindo que o efeito de redução do colesterol induzido pelo eugenol foi atribuído exclusivamente ao declínio no LDL. Comparando as doses, houve maior redução nos valores de CT e LDL com a dose de eugenol à 10mg.⁸²

HARB et al. (2019) confirmaram o efeito do eugenol como hipolipidêmico e os autores sugerem que tal efeito é mediado em parte pelo potencial receptor transitório vanilóide 1 (TRPV1). O TRPV1 é expresso nos neurônios sensoriais aferentes, mas também foi descoberto em células não neuronais, como miócitos e hepatócitos. Os achados mostraram que a expressão de TRPV1 é regulada positivamente no fígado

de ratos hipercolesterolêmicos, porém, o mecanismo molecular preciso pelo qual o eugenol influencia o TRPV1 não é claro e pode ser multifacetado.⁸² Mas de fato, a ativação da sinalização TRPV1 promove o acúmulo de gordura, enquanto a inibição dessa sinalização protege contra o acúmulo de gordura.⁸⁵

No que diz respeito à insulina, o atual trabalho não apresentou diferença entre os grupos para essa variável. Porém o grupo DHE apresentou um valor 26% maior quando comparado ao grupo DPE, e entre os grupos DH e DHE, o grupo suplementado apresentou aumento de 36%, e então, dessa forma observa-se que o eugenol não preveniu o aumento da insulina. Trabalho realizado por JUNG et al. (2012) encontrou que os níveis de insulina na DH foram maiores do que na DH com o suplemento do extrato de cravo, sugerindo que os níveis aumentados foram reduzidos com a suplementação,⁷⁷ nossos achados não concordam com esse resultado.

Outro estudo feito por SRINIVASAN et al. (2014), administrou de forma intragástrica eugenol em doses de 2,5mg, 5mg e 10 mg/kg em ratos Wistar diabéticos por 30 dias. Os autores observaram que a suplementação de 10mg causou um declínio significativo nos níveis de glicose no sangue, aumento no nível de insulina no plasma e melhora no peso corporal e no conteúdo hepático de glicogênio.⁸⁶

Em relação ao GTT, os resultados do presente estudo não apresentaram diferença entre os grupos, porém os grupos DP e DPE apresentaram pico de insulina 20% menor (tempo 30') em comparação aos grupos DH e DHE, mas apesar dessa diferença em percentual, o comportamento da cinética de glicose durante o GTT foi semelhante entre os grupos. Na área sob a curva também não teve diferença para o efeito da dieta e suplementação, todavia, é possível notar que os grupos que receberam DH tiveram uma maior área sob a curva do que os grupos padrão (DP e DPE), e o grupo padrão com suplementação (DPE) apresentou uma menor área sob a curva quando comparado ao DP.

JEONG et al. (2014) realizaram o GTT intraperitoneal em camundongos C57BL/6J alimentados com DH por 15 semanas e suplementados com duas doses de eugenol, 20mg e 40mg/kg de peso, e como resultado observaram que o nível de glicose do grupo DH rapidamente aumentou em comparação ao padrão, e em relação à área sob a curva, observaram que a suplementação do eugenol em 20mg e 40mg diminuíram 14% e 17% respectivamente em comparação ao grupo DH.⁸⁷ Um estudo feito por SHUKRI; MOHAMED; MUSTAPHA (2010) em ratos Sprague-Dawley diabéticos com dieta padrão por 15 semanas, concluíram que a suplementação

dietética com o cravo reduziu significativamente o aumento de açúcar no sangue e peroxidação lipídica nos ratos diabéticos.⁸⁸

A grande variabilidade de metodologia no GTT pode exercer grande impacto sobre a mensuração da tolerância à glicose em camundongos, sendo assim, ANDRIKOPOULOS et al. (2008) realizaram um trabalho com o objetivo de determinar as condições ideais para avaliar a tolerância à glicose em camundongos C57BL/6J alimentados com DP ou DH por 8 semanas. As variáveis testadas foram: tempo de duração do jejum, via de administração (intraperitoneal ou oral) da glicose, quantidade de glicose administrada e estado de consciência. Notaram que a administração de glicose na dose de 2g/kg de peso administrada por via oral após 6h de jejum, resulta em intolerância à glicose nos animais que foram alimentados com DH em comparação aos que foram alimentados com DP, sendo assim, determinaram essas estimativas para conduzir o teste.⁸⁹

Em relação ao ITT, realizado 48h após o GTT, não foi possível encontrar diferença, nem para o efeito da dieta, nem para o uso do eugenol.

TU et al. (2014) em um estudo in vitro que investigou os efeitos do cravo no metabolismo dos miócitos C2C12, encontraram que o cravo aumentou significativamente o consumo de glicose, e tem o potencial para aumentar a glicólise muscular e a função das mitocôndrias ativando as vias Proteína Quinase Ativada por Monofosfato de Adenosina (AMPK) e Sirtuína 1 (SiRT1), que por sua vez regulam o metabolismo de glicose e ácidos graxos, demonstrando que o cravo pode servir como um agente hipoglicêmico e hipolipidêmico para o manejo de doenças metabólicas.⁹⁰

A interpretação do ITT consiste em quanto mais rápida e intensa for a queda da glicose, mais sensível o indivíduo é à insulina. Essa queda da glicose é determinada por dois fatores: pelo estímulo à captação de glicose pelos tecidos insulino-sensíveis e supressão da produção hepática de glicose.⁹¹

Em relação à histologia do fígado, foi possível observar uma pequena formação de gordura no grupo DH, e já no grupo DHE não se observou nenhuma formação dessas gotículas, sugerindo um efeito protetor do eugenol na prevenção do acúmulo de gotículas de gordura ectópica. Os grupos DP e DPE não apresentaram alterações.

Esse resultado confirma os achados de JUNG et al. (2012) que observaram que houve formação de poucas gotículas de gordura no fígado do grupo DH com extrato de cravo em comparação ao grupo DH sem suplementação.⁷⁷ Nossos achados também vão ao encontro com DING et al. (2017) que verificaram que o grupo DH com

o extrato de cravo apresentou uma menor esteatose, com menos acúmulo de gordura macrovesicular comparado ao DH sem suplemento.⁸⁰

Outro estudo feito por HARB et al. (2019), relatou que ambos os grupos tratados com DHC+eugenol (10mg e 100mg) mostraram menor deposição lipídica no fígado, menor porcentagem de esteatose macrovesicular e redução na infiltração de células inflamatórias comparado ao grupo DHC.⁸²

JO et al. (2014) também observaram o mesmo efeito ao suplementar 40mg de eugenol em camundongos C57BL/6J alimentados com DH por 12 semanas. As gotículas de gordura foram marcadamente reduzidas tanto em tamanho quanto em número na DH com eugenol, sugerindo que o mesmo tratou efetivamente a esteatose hepática evidentemente confirmada por uma diminuição significativa no conteúdo de triglicerídeos hepático. E os camundongos da DH apresentaram uma combinação leve de esteatose micro e macrovesicular afetando >60% dos hepatócitos.⁸³

Esse possível efeito pode ser explicado devido ao eugenol exercer um papel significativo na diminuição da acumulação de lipídio hepático, modulando/ativando a via de sinalização AMPK-SREBP, bem como a regulação de expressões gênicas de proteínas relacionadas à lipólise como CD36, carnitine palmitoyltransferase-1 (CPT-1) e acyl-CoA oxidase (ACO).⁸³

Quanto à histologia do pâncreas, foi possível observar que não houve alterações significativas em nenhum dos grupos.

Quanto a microbiota intestinal, nossos achados para o filo *Firmicutes* mostra que a suplementação do eugenol elevou o número desse filo tanto na DH quanto na DP. Os *Firmicutes* parecem absorver as calorias da dieta e aumentar o armazenamento de gordura no corpo, e então, consequentemente a redução desse filo pode levar a uma melhoria do perfil lipídico.⁷⁸

Em relação ao filo *Bacteroidetes*, a suplementação também aumentou a quantidade deste filo nos grupos DPE e DHE comparando com DP e DH.

No terceiro filo analisado, *Actinobactéria*, observou-se que a suplementação também aumentou as quantidades em relação aos grupos sem o eugenol, o que não concorda com MA et al. (2018) que encontraram que os grupos DH e DH com AEE diminuíram a quantidade de *Actinobactéria*.⁷⁸ Esse filo juntamente com o filo *Proteobactéria* representam apenas 10% de abundância relativa em nossa MI, e embora as *Actinobactérias* representem uma pequena porcentagem, são essenciais no desenvolvimento e manutenção homeostase intestinal. É suposto que esse filo seja

envolvido na modulação da permeabilidade intestinal, metabolismo, sistema imune e no eixo intestino-cérebro. E exerce um papel modulador e terapêutico em doenças intestinais como síndrome do intestino irritável, câncer colorretal, colite ulcerativa, entre outros, e também em doenças extra-intestinais, esteatose hepática não alcoólica, depressão, patologias respiratórias, psoríase, entre outras. Sendo assim, o interesse nesse filo, especialmente na família *Bifidobactérias*, tem aumentado constantemente.⁹²

O último filo analisado, *Proteobactéria*, esteve aumentado na DPE em comparação à DP, e foi o único filo que a suplementação reduziu as quantidades na DH mesmo sem diferença estatística, podendo sugerir um resultado benéfico devido as *Proteobactérias* serem reconhecidas como produtoras de endotoxemia metabólica (EM), isso é, quando a alteração da permeabilidade é devido aos lipopolissacarídeos,⁹³ e essa EM desregula o tônus inflamatório e desencadeia ganho de peso e pode levar ao quadro de diabetes,⁹⁴ além disso, esse filo também foi associado à inflamação das vias aéreas e o aumento de sua abundância causa um desequilíbrio ecológico, levando a uma maior gravidade das bronquiectasias.⁹⁵

Não foram encontrados mais estudos que investigassem a suplementação do eugenol e ou do óleo do cravo da índia em animais alimentados com DH, porém, a atividade antimicrobial do eugenol já está bem descrita na literatura,^{63,64,96,97} apesar de não haver estudos que o relacione com a microbiota intestinal de animais e/ou humanos obesos.

As limitações do presente estudo foram constituídas pela dificuldade de encontrar trabalhos com eugenol em si, por isso, foram utilizados também trabalhos que utilizaram o extrato do cravo da índia para as variáveis que não foram encontradas trabalhos com eugenol. Outra limitação importante foi a dose utilizada, pois, apesar de ser comprovado que está dentro de uma dosagem segura e não tóxica, o trabalho de HARB et al. (2019) mostrou que o eugenol em doses mais baixas apresentou maior eficácia e melhores resultados no peso corporal, peso do fígado e perfil lipídico usando doses de eugenol à 10mg e 100mg associados a dieta DHC em apenas 4 semanas de tratamento.⁸² Comprovando também que o tempo do tratamento utilizado no atual estudo não foi uma limitação, tendo em vista que a maioria estudos utilizou tempo superior de tratamento.

Conclusão

8 CONCLUSÃO

Concluimos que o eugenol apesar de não prevenir o ganho de peso, de gordura corporal, e não melhorar os perfis lipídico e glicídico de camundongos alimentados com DH, aparentou ter efeito protetor no acúmulo de gordura do fígado, aumentou o filo de *Actinobactéria* e reduziu *Proteobactéria*.

Referências

REFERÊNCIAS

- 1) PINHEIRO, A. R. O. P.; DE FREITAS, S, F, T.; CORSO, A, C, T. Uma abordagem epidemiológica da obesidade. **Revista de Nutrição**, v. 17, n. 4, p. 523-533, 2004 .
- 2) Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade e da Síndrome Metabólica Diretrizes brasileiras de obesidade 2016 / **ABESO** – 4. ed, 2016.
- 3) WANDERLEY, E, N.; FERREIRA, V. A. Obesidade: uma perspectiva plural. **Ciência e saúde coletiva**, v. 15, n. 1, p. 185-194, 2010.
- 4) DiBaise, J. K. et al. Gut microbiota and its possible relationship with obesity. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 83, n. 4, p. 460-469, 2008.
- 5) **WHO** - World Health Organization. Obesity – Preventing and managing the global epidemic. Geneva: Report of a WHO Consultation, 1997.
- 6) SOEIRO, R, Lima. et al . Educação em saúde em grupo no tratamento de obesos grau III: Um desafio para os profissionais de saúde. **Revista Brasileira Educação Médica**, v. 43, n. 1, p. 681-691, 2020.
- 7) STECKHAN, N. et al. Effects of different dietary approaches on inflammatory markers in patients with metabolic syndrome: A systematic review and meta-analysis. **Nutrition**, v. 32 , n. 3, p. 338–348, 2016.
- 8) SETHI, J. K.; VIDAL-PUIG, A. J. Adipose tissue function and plasticity orchestrate nutritional adaptation. **Journal of Lipid Research**, v. 12, p. 53-62, 2007.
- 9) MARIATH, A. B. et al . Obesidade e fatores de risco para o desenvolvimento de doenças crônicas não transmissíveis entre usuários de unidade de alimentação e nutrição. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 23, n. 4, p. 897-905, 2007.
- 10) KOPELMAN, P. Health risks associated with overweight and obesity. **Obesity Reviews**, v. 8, n. 1, v. 13–17, 2007.
- 11) GHAZARIAN, M. et al. Immunopathology of Adipose Tissue during Metabolic Syndrome. **Turk Patoloji Dergisi.**, v. 31, n. 1, p. 172–180, 2015.
- 12) KAHN, S. E.; HULL, R. L.; UTZSCHNEIDER, K. M. Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. **Nature**, v. 444, n. 7121, p. 840–846, 2006.

- 13) **WHO** - World Health Organization. Obesity and overweight. 2020. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>
- 14) BRASIL. Ministério da Saúde. **Vigitel Brasil 2019**: vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico. Brasília: Ministério da Saúde, 2019. Disponível em: <http://www.crn1.org.br/wp-content/uploads/2020/04/vigitel-brasil-2019-vigilancia-fatores-risco.pdf?x53725>
- 15) **ABESO** – Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade e da Síndrome Metabólica. Mapa da obesidade. Disponível em: <https://abeso.org.br/obesidade-e-sindrome-metabolica/mapa-da-obesidade/>
- 16) LI, X; SHIMIZU, Y; KIMURA, I. Gut microbial metabolite short-chain fatty acids and obesity. *Bioscience of Microbiota Food and Health*, v. 36, n. 4, p. 135–140, 2017.
- 17) **SBEN** - Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia. A Prevalência da Obesidade no Brasil. 2007. Disponível em: <https://www.endocrino.org.br/prevalencia-da-obesidade-no-brasil/>
- 18) BOOTH, A. et al. Adipose tissue, obesity and adipokines: role in cancer promotion. **Hormone Molecular Biology and Clinical Investigation**, v. 21, n. 1, p. 57–74, 2015.
- 19) LACERDA, M. S.; MALHEIROS, G, C.; DE ABREU, A, O, W. Tecido adiposo, uma nova visão: As adipocinas e seu papel endócrino. **Revista Científica da FMC**, v. 11, n. 2, 2016.
- 20) HEGELE, R. A. et al. Thematic review series: Adipocyte Biology. Lipodystrophies: windows on adipose biology and metabolism. **Journal of lipid research**, v. 48, n. 7, p. 1433–1444, 2007.
- 21) CAO, H-M. et al. Mimecan, a hormone abundantly expressed in adipose tissue, reduced food intake independently of leptin signaling. **EBioMedicine**, v. 2, n. 11, p. 1718–1724, 2015.
- 22) DO PRADO, W. L. et al. Obesidade e adipocinas inflamatórias: implicações práticas para a prescrição de exercício. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 15, n. 5, p. 378-383, 2009.
- 23) AHIMA, R. S.; FLIER, J.S. Adipose tissue as an endocrine organ. **Trends Endocrinology Metabolism**, v. 11, n. 8, p. 327–332, 2000.

- 24) FONSECA-ALANIZ, M. H. et al. O tecido adiposo como centro regulador do metabolismo. **Arquivos Brasileiros Endocrinologia Metabologia**, v. 50, n. 2, p. 216-229, 2006.
- 25) CINTI, S. O órgão adiposo: Implicações para a prevenção e o tratamento da obesidade. **ECOG – European Childhood Obesity Group**. Disponível em: <https://ebook.ecog-obesity.eu/pt/biologia/o-orgao-adiposo-implicacoes-para-a-prevencao-e-o-tratamento-da-obesidade/>
- 26) CANNON, B.; NEDERGAARD, J. Brown adipose tissue: Function and physiological significance. **Psychological Reviews**, v. 84, n. 1, p. 277-359, 2004.
- 27) PENG, X-G. et al. Quantification of fat concentration and vascular response in brown and white adipose tissue of rats by spectral CT imaging. **Korean Journal Radiology**, v. 21, n. 2, p. 248-256, 2020.
- 28) HAN, M. S. et al. Regulation of adipose tissue inflammation by interleukin 6. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 117, n. 6, p. 2751-2760, 2020.
- 29) HOTAMISLIGIL, G. S. Mechanisms of TNF-alpha-induced insulin resistance. **Experimental Clinical Endocrinology Diabetes**, v. 107, n. 2, p. 119-125, 1999.
- 30) SALTIEL, A. R.; KAHN, C. R. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. **Nature**, v. 414, n. 6865, p. 799-806, 2001.
- 31) GRAMS, J.; GARVEY, W. T. Weight loss and the prevention and treatment of type 2 diabetes using lifestyle therapy, pharmacotherapy, and bariatric surgery: mechanisms of action. **Current Obesity Reports**, v. 4, n. 2, p. 287–302, 2015.
- 32) LAU, E. et al. Beyond gut microbiota: Understanding obesity and type 2 diabetes. **Hormones (Athens)**, v. 14, n. 3, p. 358–369, 2015.
- 33) ARSLAN, N. Obesity, fatty liver disease and intestinal microbiota. **World journal of gastroenterology**, v. 20, n. 44, p. 16452–16463, 2014.
- 34) AMABEBE, E. et al. Microbial dysbiosis-induced obesity: Role of gut microbiota in homeostasis of energy metabolism. **British Journal of Nutrition**, p. 1–23, 2020.
- 35) KOBLYIAK, N.; VIRCHENKO, O.; FALALYEYeva, T. Pathophysiological role of host microbiota in the development of obesity. **Nutrition Journal**, v. 15, n.43, 2016.

- 36) LEY, R. E. et al. Human gut microbes associated with obesity. **Nature**, v. 444, p. 1022–1023, 2006.
- 37) ANDRADE, V. L. A. et al. Obesidade e microbiota intestinal. **Revista Médica Minas Gerais**, v. 25, n. 4, p. 583-589, 2015.
- 38) DEGRUTTOLA, A. K. et al. Current understanding of dysbiosis in disease in human and animal models. **Inflammatory bowel diseases**, v. 22, n. 5, p. 1137–1150, 2016.
- 39) 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.
- 40) LI, J. et al. Gut microbiota dysbiosis contributes to the development of hypertension. **Microbiome**, v. 5, n. 14, 2017.
- 41) ALMEIDA, L. B. et al. Disbiose intestinal. **Revista brasileira de nutrição clínica**, v.24, n.1, p. 58-65, 2009.
- 42) FLANDROY, L. et al. The impact of human activities and lifestyles on the interlinked microbiota and health of humans and of ecosystems. **Science Total Environment**, v. 627, p. 1018–1038, 2018.
- 43) SIRISINHA, S. The potential impact of gut microbiota on your health: Current status and future challenges. **Asian Pacific Journal Allergy Immunology**, v. 34, n. 4, p. 249–264, 2016.
- 44) JANDHYALA, S. M. et al. Role of the normal gut microbiota. **World Journal Gastroenterology**, v. 21, n. 29, p. 8787-8803, 2015.
- 45) PLUTA, R.; JANUSZEWSKI, S.; ULAMEK-KOZIOL, M. Mutual two-way interactions of curcumin and gut microbiota. **International Journal Molecular Sciences**, v 21, n. 3, p. 1055, 2020.
- 46) LEY, R. E. et al. Obesity alters gut microbial ecology. *Proceedings National Academy Sciences USA*, v.102, n. 31, p. 11070–11075, 2005.
- 47) MIYAMOTO, J. et al. Gut microbiota confers host resistance to obesity by metabolizing dietary polyunsaturated fatty acids. **Nature Communications**, v. 10, n. 4007, 2019.

- 48) TURNBAUGH, P. J. et al. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. **Nature**, v. 444, p. 1027–1031, 2006.
- 49) WEXLER, H, M. Bacteroides: the Good, the Bad, and the Nitty-Gritty. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 20, n. 4, p. 593-621, 2007.
- 50) DE FILIPPO, C. et al. Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. **Proceedings of the National Academy Sciences USA**, v. 107, n. 33, p. 14691-14696, 2010.
- 51) DESAI, M. S. et al. A Dietary fiber-deprived gut microbiota degrades the colonic mucus barrier and enhances pathogen susceptibility. **Cell**, v. 167, n. 5, p. 1339–1353, 2016.
- 52) **SBEM** - Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia. Tratamento da obesidade, 2010. Acesso em: <https://www.endocrino.org.br/tratamento-da-obesidade/>
- 53) NONINO, C. B.; BORGES, R. M.; SANTOS, J. E. Tratamento clínico da obesidade. **Medicina (Ribeirão Preto)**, v. 39, n. 2, p. 246 – 252, 2006.
- 54) TOMAZZONI, M. I.; NEGRELLE, R. R. B.; CENTA, M. L. Fitoterapia popular: A busca instrumental enquanto prática terapêuta. **Texto contexto – enfermagem**, v. 15, n. 1, p. 115-121, 2006 .
- 55) DO PRADO, C. N. et al. O uso de fitoterápicos no tratamento da obesidade. **Revista Brasileira de Obesidade, Nutrição e Emagrecimento**, v. 4, n. 19, p 14 - 21, 2010.
- 56) DE FREITAS JUNIOR, L. M.; DE ALMEIDA JUNIOR, E. B. Medicinal plants for the treatment of obesity: ethnopharmacological approach and chemical and biological studies. **American journal of translational research**, v. 9, n. 5, p. 2050–2064, 2017.
- 57) HASANI-RANJBAR, S.; JOUYANDEH, Z.; ABDOLLAHI, M. A systematic review of anti-obesity medicinal plants - an update. **Journal Diabetes Metabolic Disorders**, v. 12, n. 1, p. 28, 2013.
- 58) 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 - journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 20, n. 1, p. 33, 2012.

- 59) BRASIL. Ministério da Saúde. Divisão Nacional de Vigilância Sanitária de Alimentos. **Resolução da diretoria colegiada** - rdc nº 26, de 13 de maio de 2014.
- 60) SCHERER, R. et al . Composição e atividades antioxidante e antimicrobiana dos óleos essenciais de cravo-da-índia, citronela e palmarosa. **Revista brasileira plantas medicinais**, v. 11, n. 4, p. 442-449, 2009.
- 61) MAZZAFERA, P. Efeito alelopático do extrato alcoólico do cravo-da-índia e Eugenol. **Revista Brasileira Botanica**, v. 26, n. 2, p. 231 - 238, 2003.
- 62) LIU, H. et al. Clove extract inhibits tumor growth and promotes cell cycle arrest and apoptosis. **Oncology research**, v. 21, n. 5, p. 247–259, 2014.
- 63) AFFONSO, R. S. et al. Aspectos Químicos e Biológicos do Óleo Essencial de Cravo da Índia. **Revista Virtual Química**, v. 4, n. 2, p. 146-161, 2012.
- 64) DE OLIVEIRA, R. A. et al . Constituintes químicos voláteis de especiarias ricas em Eugenol. **Revista brasileira farmacognosia**, v. 19, n. 3, p. 771-775, 2009.
- 65) WLODARSKA, M. et al. Phytonutrient diet supplementation promotes beneficial Clostridia species and intestinal mucus secretion resulting in protection against enteric infection. **Scientific Reports**, v. 5, n. 9253, 2015.
- 66) COSTA, P. R. R. Safrol e Eugenol: Estudo da reatividade química e uso em síntese de produtos naturais biologicamente ativos e seus derivados. **Química Nova**, v. 23, n. 3, p. 357-369, 2000.
- 67) ESCOBAR, R. G. Eugenol: Propiedades farmacológicas y toxicológicas. Ventajas y desventajas de su uso. **Revista Cubana Estomatologia**, v. 39, n. 2, p. 139-156, 2002.
- 68) SILVA, C. B. et al. Curcuma supplementation in high-fat-fed C57BL/6 mice: no beneficial effect on lipid and glucose profile or prevention of weight gain. **European Journal Nutrition**, v. 59, n. 1, v. 93–102, 2020.
- 69) BRUNT, E. M. et al. The NAS and The Histopathologic Diagnosis in NAFLD: Distinct Clinicopathologic Meanings. **Hepatology**, v. 53, n. 3, p. 810–820, 2011.
- 70) MIRANDA, M. C. G. et al. Frontline Science: Abnormalities in the gut mucosa of non-obese diabetic mice precede the onset of type 1 diabetes. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 106, n. 3, p. 513–529, 2019.

- 71) KANNO, P. K. et al. Discrepâncias na imagem corporal e na dieta de obesos. **Revista de Nutrição**, v. 21, n. 4, p. 423-430, 2008.
- 72) DE SOUZA, T. F. S. N. N. **Efeito antinociceptivo e antiedematogênico do eugenol**. 2007. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, Ceará, 2007.
- 73) SURWIT, R. S. et al. Differential Effects of Fat and Sucrose on the Development of Obesity and Diabetes in C57BL/6J and A/J Mice. **Metabolism**, v. 44, n. 5, p. 645-651, 1995.
- 74) UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO. Biotério Central da Faculdade de Medicina da USP. **Produtos e Serviços Oferecidos pelo Centro de Bioterismo: SPF - C57Bl/6**. Acesso em:
<https://www.biot.fm.usp.br/index.php?mpg=03.00.00&tip=CAMUNDONGO&id_ani=5&caract=sim>.
- 75) WHITE, P. A. S. et al. Modelo de obesidade induzida por dieta hiperlipídica e associada à resistência à ação da insulina e intolerância à glicose. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia Metabologia**, v. 57, n. 5, p. 339-345, 2013.
- 76) BUETTNER, R. et al. Defining high-fat-diet rat models: metabolic and molecular effects of different fat types. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 36, n. 3, p. 485-501, 2006.
- 77) JUNG, C. H. 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.
- 78) MA, N. et al. Aspirin eugenol ester regulates cecal contents metabolomic profile and microbiota in an animal model of hyperlipidemia. **BMC Veterinary Research**, v. 14, n. 405, 2018.
- 79) LIN, H. L. et al. Low-dose aspirin ameliorated hyperlipidemia, adhesion molecule, and chemokine production induced by high-fat diet in Sprague-Dawley rats. **Drug Development Research**, v. 75, n. 2, p. 97-106, 2014.
- 80) DING, Y. et al. Clove extract functions as a natural fatty acid synthesis inhibitor and prevents obesity in a mouse model. **Food and Function**, v. 8, 2017.
- 81) AL-OKBI, S. Y. et al. Protective effect of clove oil and eugenol microemulsions on fatty liver and dyslipidemia as components of metabolic syndrome. **Journal of Medicinal Food**, v. 17, n. 7, p. 764-771, 2014.

- 82) HARB, A. A. et al. Eugenol Reduces LDL Cholesterol and Hepatic Steatosis in Hypercholesterolemic Rats by Modulating TRPV1 Receptor. **Scientific Reports**, v. 9, n. 14003, 2019.
- 83) JO, H. K. et al. Eugenol ameliorates hepatic steatosis and fibrosis by down-regulating SREBP1 gene expression via AMPK-mTOR-p70S6K signaling pathway. **Biological Pharmaceutical Bulletin**, v. 37, n. 8, p. 1341-1351, 2014.
- 84) ELBAHY, D. A.; MADKOUR, H. I.; ABDEL-RAHEEM, M. H. Evaluation of Antihyperlipidemic Activity of Eugenol in Triton Induced Hyperlipidemia in Rats. **International Journal of Research Studies in Biosciences**, v. 3, n. 10, p. 19-26, 2015.
- 85) MOTTER, A. L.; AHERN, G. P. TRPV1-null mice are protected from diet-induced obesity. **FEBS Lett**, v. 582, n. 15, p. 2257-2262, 2008.
- 86) SRINIVASAN, S. et al. Ameliorating effect of eugenol on hyperglycemia by attenuating the key enzymes of glucose metabolism in streptozotocin-induced diabetic rats. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 385, p. 159-168, 2014.
- 87) JEONG, K. J. et al. Effects of eugenol on hepatic glucose production and AMPK signaling pathway in hepatocytes and C57BL/6J mice. **Fitoterapia**, v. 93, p. 150-162, 2014.
- 88) SHUKRI, R.; MOHAMED, S.; MUSTAPHA, N. M. Cloves protect the heart, liver and lens of diabetic rats. **Food Chemistry**, v. 122, p. 1116–1121, 2010.
- 89) ANDRIKOPOULOS, S. et al. Evaluating the glucose tolerance test in mice. **American Journal of Physiology Endocrinology Metabolism**, v. 295, n. 6, p. 1323-1332, 2008.
- 90) TU, Z. et al. Syzygium aromaticum L. (Clove) extract regulates energy metabolism in myocytes. **Journal of Medicinal Food**, v. 17, n. 9, p. 1003-1010, 2014.
- 91) GELONEZE, B.; TAMBASCIA, M. A. Avaliação laboratorial e diagnóstico da resistência insulínica. **Arquivos Brasileiros Endocrinologia Metabologia**, v. 50, n. 2, p. 208-215, 2006.
- 92) BINDA, C. et al. Actinobacteria: A relevant minority for the maintenance of gut homeostasis. **Digestive and Liver Disease**, v. 50, n. 5, p. 421-428, 2018.

- 93) CHANG, C. J. et al. Ganoderma lucidum reduces obesity in mice by modulating the composition of the gut microbiota. **Nature Communications**, v. 6, n. 7489, 2015.
- 94) CANI, P. D. et al. Metabolic Endotoxemia Initiates Obesity and Insulin Resistance. **Diabetes**, v. 56, n. 7, p. 1761-1772, 2007.
- 95) GUAN, W. J. et al. Proteobacteria community compositions correlate with bronchiectasis severity. **The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, v. 22, n. 9, p. 1095-1105, 2018.
- 96) NEJAD, S. M.; ÖZGÜNEŞ, H.; BAŞARAN, N. Pharmacological and Toxicological Properties of Eugenol. **Turkish journal of pharmaceutical sciences**, v. 14, n. 2, p. 201–206, 2017.
- 97) ALI, S. M. et al. Antimicrobial activities of Eugenol and Cinnamaldehyde against the human gastric pathogen *Helicobacter pylori*. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 4, n. 20, 2005.

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

CEUA
FMRP-USP
Comitê de Ética no Uso de Animais
Replacement/Reduction/Refinement

DECLARAÇÃO

Declaramos que o Adendo ao Protocolo para Uso de Animais em Experimentação número **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 **Profa. Dra. Vivian Marques 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 11 de dezembro de 2017.

We declare that the Addendum to the Protocol n° 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 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 12/11/2017.

Ribeirão Preto, 11 de dezembro de 2017

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

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP - Av. Bandeirantes, 3900 - Ribeirão Preto - SP - Brasil - 14049-900 - Tel.: (16) 3315-3301 / 3315-3275 - e-mail: ceua@fmrp.usp.br

Anexo 2 – Certificado de análise do eugenol.

04/11/2019

Certificate Of Analysis

Certificate of Analysis

SIGMA-ALDRICH®

Product Name	Eugenol, liquid
Product Number	E5504
Product Brand	SIGMA
CAS Number	97-53-0
Molecular Formula	4-(H ₂ C=CHCH ₂)C ₆ H ₃ -2-(OCH ₃)OH
Molecular Weight	164.20

TEST

APPEARANCE

IR SPECTRUM

PURITY BY HPLC

QC RELEASE DATE

SPECIFICATIONCLEAR COLORLESS TO LIGHT
YELLOW LIQUID

CONSISTENT WITH STRUCTURE

MINIMUM 97%

LOT 40K0667 RESULTS

CONFORMS

CONSISTENT

99%

APRIL 2000

Rodney Burbach, Manager
Quality Control
St. Louis, Missouri USA