

**Stephanie Pedrosa de Oliveira**

**Bebida láctea fermentada acrescida de óleo essencial de *Syzygium aromaticum*:  
parâmetros microbiológicos, físico-químicos e potencial antioxidante por meio de  
análises *in silico*, *in vitro* e *in vivo***

Dissertação apresentada ao Curso de  
Mestrado em Produção Animal  
Universidade Federal de Minas Gerais,  
como requisito parcial para a obtenção do  
título de Mestre em Produção Animal.

**Área de Concentração:** Produção Animal

**Orientadora:** Anna Christina de Almeida

**Coorientadores:**

Eliane Macedo Sobrinho Santos

Sérgio Henrique Sousa Santos

MONTES CLAROS

2019

Oliveira, Stephanie Pedrosa de.

O48b  
2010

Bebida láctea fermentada acrescida de óleo essencial de *Syzygium aromaticum*: parâmetros microbiológicos, físico-químicos e potencial antioxidante por meio de análises *in sílico*, *in vitro* e *in vivo* / Stephanie Pedrosa de Oliveira. Montes Claros, 2019.  
93 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Área de concentração em Produção Animal, Universidade Federal de Minas Gerais / Instituto de Ciências Agrárias.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Anna Christina de Almeida.

Banca examinadora: Prof.<sup>a</sup> Viviane Aguiar Andrade, Prof.<sup>a</sup> Eliane Macedo Sobrinho Santos, Prof.<sup>a</sup> Francine Souza Alves Fonseca, Prof.<sup>a</sup> Lucinéia de Pinho.

Inclui referências: f. 23-27, 39-43, 54-57, 80-84.

1. Leite fermentado. 2. Laticínios -- microbiologia. 3. Antioxidantes. 4. Cravo. I. Almeida, Anna Christina de (Orientadora). II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Agrárias. III. Título.

CDU: 637.1

**Stephanie Pedrosa de Oliveira**

**Bebida láctea fermentada acrescida de óleo essencial de *Syzygium aromaticum*:  
parâmetros microbiológicos, físico-químicos e potencial antioxidante por meio de  
análises *in silico*, *in vitro* e *in vivo***

Dissertação apresentada ao Curso de  
Mestrado em Produção Animal da  
Universidade Federal de Minas Gerais,  
como requisito parcial para a obtenção do  
título de Mestre em Produção Animal Área  
de Concentração: Produção Animal  
Linha de Pesquisa: Qualidade de produtos  
de origem animal  
Orientadora: Anna Christina de Almeida  
Instituto de Ciências Agrárias da UFMG

Aprovado pela banca examinadora constituída pelos professores:

Prof. Dra. Viviane Aguiar Andrade  
Unimontes

Prof. Dra. Eliane Macedo Sobrinho Santos  
IFNMG-Campus Araçuaí

Prof. Dra. Francine Souza Alves Fonseca.  
ICA/UFMG

Prof<sup>a</sup>. Dra. Lucinéia de Pinho  
UNIMONTES

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Anna Christina de Almeida (Orientadora) - ICA/UFMG

Montes Claros, 10 de julho de 2019

## DEDICATÓRIA

Dedico essa dissertação a minha família e ao André pelo constante apoio, incentivo, companheirismo e que nunca me deixaram desistir dos meus sonhos. Aos meus amigos que estão sempre presente e a minha orientadora Anna Christina por estar sempre comigo nessa caminhada, pela paciência, confiança e apoio incondicional.

## AGRADECIMENTO

Agradeço primeiramente a Deus, porque sem ele nada disso se tornaria possível, por sempre me guiar e me abençoar durante minha vida.

A toda minha família, principalmente aos meus pais Mary e Júnior pela confiança, amor e apoio incondicional. Por sempre me escutar e trazer palavras de conforto e carinho quando necessário e principalmente por acreditar no meu potencial e pelo estímulo em todos os meus projetos.

Aos meus avôs, Maria e José Pimenta que são exemplos de vida e de amor. Que apensar da distância se fazem sempre presentes na minha vida e participam de cada conquista e vitória como se fossem deles também, meu muito obrigada.

Ao André, meu companheiro de vida, pelo incentivo, apoio, amor e companheirismo de sempre. Por participar e contribuir nos momentos que mais precisei, por me entender e por me tranquilizar sempre que precisava.

Aos meus irmãos, Dafny, Matheus, João Vitor e Henrique por sempre acreditarem em mim, por vibrar em cada conquista e pelo apoio de sempre.

As minhas sobrinhas, Júlia e Ana Amélia que são meus verdadeiros anjos, que só me trazem alegrias, novos aprendizados e são os melhores presentes que meus irmãos poderiam me dá. Amo vocês o infinito!

A família do André pela receptibilidade, apoio e por serem parte da minha família em Montes Claros.

Aos meus amigos e minhas amigas/irmãs da Republica Oásis por sempre estarem presentes na minha vida e pelas boas histórias e lembranças.

A minha orientadora Anna Christina que desde meu ingresso na universidade em 2012, vem me acompanhando, incentivando e me ajudando sempre. Seja com palavras de carinho ou estimulando pela busca do meu melhor. Deixo aqui meu eterno obrigado e minha admiração. Nenhuma palavra de agradecimento poderia expressar meu sentimento de carinho e gratidão.

A Keicy, minha companheira de projeto, pela amizade, companheirismo e pela troca de conhecimento.

Aos meus coorientadores, Eliane e Sérgio pela contribuição, paciência e novos aprendizados. Agradeço imensamente por terem aceitado a coorientação.

Agradeço a todos os envolvidos nesse projeto, em especial aos alunos do ICA/UFMG Iara, Samuel, Karol, Jennine, Nayara, Laura. Aos alunos da Funorte João Matheus e Pedro. Aos alunos do laboratório da Unimontes Victor, Luiz Paulo, Deborah, Daniela, Janaina e Daniel. Obrigada por toda contribuição, auxílio e amizade para que o projeto fosse executado com êxito e de forma leve e divertida.

Aos técnicos-administrativos do ICA/UFMG Francine, Cintya, Sérgio, Carla, Hugo e Sandro. Por toda contribuição, auxílio na execução das análises do projeto, pela ajuda, paciência em explicar e tirar dúvidas.

Ao professor Renato do curso de medicina veterinária da UFMG, pela contribuição e pela receptibilidade no laboratório. Aos alunos de veterinária Kateanne, Gabriela, Luciana e Tatiane por toda paciência em me ensinar a fazer as lâminas histológicas, pela ajuda e aprendizado.

Deixo aqui meu agradecimento a todos que de alguma forma contribuíram diretamente ou indiretamente para a conclusão dessa etapa na minha vida. Pelo apoio e contribuição.

Obrigada!

## RESUMO

O óleo essencial de cravo-da-índia apresenta atividade antimicrobiana, antioxidante, anticâncer entre outras. Estudos prévios analisaram o potencial do cravo-da-índia como substituto ao conservante sintético sorbato de potássio em bebida láctea fermentada. Sendo assim, neste trabalho verificou-se *in sílico*, *in vitro* e *in vivo*, o potencial antioxidante da bebida láctea com óleo essencial de cravo-da-índia e os impactos da ingestão dessa bebida para o organismo. Foram produzidas bebidas lácteas fermentadas com óleo essencial de cravo-da-índia (2 ul/ml), bebidas sem conservantes e com conservante sintético (sorbato de potássio). Análises previstas na legislação foram realizadas, como as físico-químicas de teor de gordura, proteína e acidez, testes microbiológicos e análise de calorimetria. Para avaliar a atividade antioxidante foram realizadas análises de DPPH e CE<sub>50</sub>. Análise de *headspace* foi realizada para identificação de compostos envolvidos nessa ação. Lâminas histopatológica utilizando tecido adiposo de camundongos machos *swiss* e análises de atividade antioxidante *in vivo* como avaliação das enzimas antioxidantes e quantificação por PCR em tempo real das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutaciona peroxidase (GP<sub>x</sub>). Os resultados demonstram que as bebidas lácteas produzidas atenderam os parâmetros físico-químicos para proteína (2,06g de proteína/100g) e acidez (0,75 a 0,88%). Para gordura (0,84g de gordura/100g), obteve-se resultados considerados para bebida láctea parcialmente desnatada. As análises microbiológicas apresentaram resultados negativos para *Salmonella sp.*, coliformes totais e coliformes termotolerantes e valores maiores que 10<sup>-6</sup> UFC/mL de bactérias lácteas durante o período de estocagem de 14 dias. Nas análises de atividade antioxidante *in vitro* a bebida láctea com óleo essencial apresentou atividade antioxidante com valores de 82,7 a 93,4%, em relação à bebida com sorbato de potássio (5,60 a 44,8%) e a bebida sem conservantes (4,86 a 42,3%). Os resultados da concentração efetiva (CE<sub>50</sub>) mostraram maior capacidade da bebida com o óleo em seqüestrar radicais livres utilizando menor concentração do que o antioxidante convencional Butil hidroxitolueno (BHT). O eugenol foi detectado nas análises de *headspace* da bebida, sendo este composto um dos responsáveis pela atividade antioxidante do óleo. O grupo que recebeu a bebida láctea com o óleo essencial apresentou menor quantidade de enzimas antioxidantes expressas e menor área dos adipócitos em relação aos outros grupos experimentais. Deste modo o óleo essencial de cravo-da-índia é um potencial substituto aos conservantes sintéticos, apresentam atividade antioxidante comprovada *in vitro* e *in vivo* e não apresentou alterações histológicas no tecido adiposo após a ingestão.

**Palavras-chave:** Antioxidantes. Cravo-da-índia. Leite fermentado. Laticínios- microbiologia.

## ABSTRACT

Clove essential oil has antimicrobial, antioxidant, anticancer activity among others. Previous studies have looked at the potential of clove as a substitute for the synthetic preservative potassium sorbate in fermented dairy beverage. Thus, in this work it was verified *in silico*, *in vitro* and *in vivo*, the antioxidant potential of the milk drink with clove essential oil and the impacts of the intake of this drink for the organism. Fermented dairy beverage with clove essential oil (2 µl/ml), preservative-free beverages and synthetic preservative (potassium sorbate) were produced. Analyzes provided for in the legislation were performed, such as physicochemical of fat content, protein and acidity, microbiological tests and calorimetry analysis. To evaluate antioxidant activity, DPPH and EC<sub>50</sub> analyzes were performed. Headspace analysis was performed to identify compounds involved in this action. Histopathological slides using adipose tissue from swiss male mice and *in vivo* antioxidant activity analyzes as evaluation of antioxidant enzymes and real time PCR quantification of the enzymes superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPx). The results show that the dairy drinks produced met the physicochemical parameters for protein (2.06g protein / 100g) and acidity (0.75 to 0.88%). For fat (0.84g fat / 100g) results were obtained for partially skimmed milk drink. Microbiological analyzes showed negative results for *Salmonella sp.*, Total coliforms and thermotolerant coliforms and values greater than 10<sup>-6</sup> CFU / mL of dairy bacteria during the 14 days storage period. In the *in vitro* antioxidant activity analyzes the essential oil fermented dairy beverage presented antioxidant activity with values of 82.7 to 93.4%, compared to the potassium sorbate drink (5.60 to 44.8%) and the preservative-free drink (4.86 to 42.3%). The results of the effective concentration (EC<sub>50</sub>) showed greater ability of the drink with the oil to sequester free radicals using lower concentration than the conventional antioxidant butylated hydroxytoluene (BHT). Eugenol was detected in the headspace analysis of the drink, being this compound responsible for the antioxidant activity of the oil. The group that received the milk drink with the essential oil presented less amount of expressed antioxidant enzymes and smaller area of adipocytes in relation to the other experimental groups. As such, clove essential oil is a potential substitute for synthetic preservatives, has proven *in vitro* and *in vivo* antioxidant activity and showed no histological changes in adipose tissue after ingestion.

**Keywords:** Antioxidant. Clove. Fermented milk. Dairy-microbiology



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### ARTIGO 1

Figura 1: Genes-alvo envolvidos na ação antioxidante do cravo obtido no Genecards (A) e possíveis parceiros funcionais obtidos no banco de dados String (B).....	31
Figura 2: Rede de “interação gene-gene” baseada nos dados de ação antioxidante do cravo-da-índia.....	32
Figura 3: Força de interação entre os genes da rede.....	34
Figura 4: Ontologia Gênica (GO). Processo Biológico (A). Função Molecular (B). Componente Celular (C). .....	36
Figura 5: Diagrama esquemático da ação do cravo no estresse oxidativo .....	39

### ARTIGO 3

Figura 1A: Resultados da análise de <i>headspace</i> da bebida láctea fermentada com óleo essencial de cravo-da-índia. ....	69
Figura 1B: Resultados da análise de <i>headspace</i> do óleo essencial de cravo-da-índia puro. ....	70
Figura 2: Resultados da análise de regressão da relação do consumo de DPPH com a concentração das amostras e CE <sub>50</sub> obtida.....	74
Figura 3: Avaliação da área dos adipócitos no tecido adiposo visceral, de camundongos após a ingestão das dietas avaliadas .....	75
Figura 4: Avaliação histopatológica do tecido adiposo visceral de camundongos machos <i>swiss</i> de acordo com as diferentes dietas ofertadas .....	76
Figura 5: Avaliação da atividade das enzimas antioxidante em tecido adiposo visceral de camundongos do grupo controle e dos que receberam dieta elaborada. ....	77
Figura 6: Quantificação da expressão de mRNA das enzimas antioxidantes em tecido adiposo visceral de camundongos machos <i>swiss</i> .....	78

**LISTA DE TABELAS**

## ARTIGO 2

Table 1: Results obtained in the microbiological analyzes of the different productions of the fermented dairy beverages added with the clove essential oil and the fermented dairy beverages added with potassium sorbate when evaluated the first and the second week of conservation ..... 52

Table 2: Results obtained in the physical-chemical analyzes of the different productions of fermented dairy beverage added with clove essential oil and fermented dairy beverage added with potassium sorbate when evaluated the first and second week of storage. .... 54

Table 3: Results obtained in the calorimetric analyzes of the different productions of the fermented dairy beverages added with the clove essential oil and the fermented dairy beverages added with potassium sorbate..... 55

## ARTIGO 3

Tabela 1: Sequência de primers oligonucleotídicos específicos usados no qRT-PCR..... 67

Tabela 2: Resultados obtidos nas análises antioxidantes pelo método do DPPH das bebidas lácteas fermentadas. .... 72

Tabela 3: Resultados do CE<sub>50</sub> com porcentagem do sequestro de radicais livres de acordo com a concentração das amostras. .... 73

### LISTA DE ABREVIATURAS e SIGLAS

ABS.	Absorbância
ABTS	2,2-azino-bis(3-etilbenzotiazolin)-6-sulfônico.
AKT	Proteína quinase de serina-treonina
ALT	Alanino aminotransferase
ANOVA/ANAVA	Analysis of variance/ Análise da variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AST	Aspartato aminotransferase
BHT	Butil hidroxitolueno
BLF	Bebida Láctea Fermentada
	Bebida láctea fermentada com conservante sintético sorbato de potásio
BSO	
BO	Bebida láctea fermentada com óleo essencial de cravo-da-índia
BP	Bebida láctea fermentada pura sem adição de conservantes
BOD	Biochemical oxygen demand
C	Dependent values chosen for the statistical power and level of significance
	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior Brasil
CAPES	
CG	Cromatógrafo gasoso
CG-EM	Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas
CPCA	Centro de pesquisa em Ciências Agrárias
cDNA	Ácido Desoxirribonucleico complementar
CAT	Catalase
CCl <sub>4</sub>	Tetracloroeto de carbono
CE <sub>50</sub>	Concentração efetiva a 50%
	Animal Experimentation Ethics Committee of the Minas Gerais Federal University/ Comitê de Ética em experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais
CEUA/UFMG	
	Committee on Experimentation and Animal Welfare of the Montes Claros State University – Unimontes/ Comitê de Ética em experimentação Animal da Unimontes
CEUA/Unimontes	
	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
CONCEA	
CP	Ciclofosfamida
d	Expected difference between the groups
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazilo
EPAMIG	Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais
ERO	Espécies reativas ao oxigênio
EO	Essential oil

EUA/USA	Estados Unidos da América
F	Primer Forward
FAPEMIG	Fundação de Amparo a pesquisa de Minas Gerais
FDA	Food and Drug Administration
FAO	Food and Agriculture Organization
g	Grama
g/kg	Gramas por quilograma
g/ml	Gramas por mililitro
g/mL	Gramas por mililitro
G1	Grupo controle
G2	Grupo 2
G3	Grupo 3
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GP <sub>x</sub>	Glutaciona Peroxidase
GRAS	Generally Recognized as Safe/Geralmente reconhecido como seguro
GSH	Glutaciona reduzida
GST	Glutaciona S-transferase
H <sub>2</sub> O DEPC	Água de pirocarbonato de dietila
ICA/UFMG	Agrarian Sciences Institute - Minas Gerais Federal University / Instituto de Ciências Agrárias – Universidade Federal de Minas Gerais
ISO	Organization for Standardization/ Organização Internacional para Padronização
Kcal	Quilocalorias
kcal/g	Quilocalorias por grama
MAPA	Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
MDA	Malondialdeído
mg/dL	Miligramas por decilitro
mg/kg	Miligramas por quilograma
µl	Microlitro
µl/ mL	Microlitro por mililitro
min	Minutos
mL	Mililitro
M-MLV RT	Moloney murine leukemia virus reverse
n	Número de animais
NIST	National Institute of Standards and Technology/ Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia
ng	Nanograma
nm	Nanômetro

OE	Óleo essencial
OE/kg	Óleo essencial por quilograma
OEs	Óleos essenciais
OMS/WHO	Organização Mundial da Saúde/ World Health Organization
pH	Potencial hidrogeniônico
PIK3	Fosfatidilinositol 3-quinases
PS	Potassium sorbate
qRT-PCR	Reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa quantitativa em tempo real
R	Primer Reverse
RPM	Rotações por minuto
RNA	Ácido ribonucleico
RNAm	Ácido ribonucleico mensageiro
s	Coefficient of variation
SOD	Superóxido dismutase
SP	Sorbato de potássio
<i>S. aromaticum</i>	<i>Syzygium aromaticum</i>
SRL	Sequestro de radicais livres
TBARS	Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico
UHT	Temperatura ultra alta
UI	Unidade internacional
UI/kg	Unidades internacionais por quilograma
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
UNIMONTES	Universidade Estadual de Montes Claros
$z\alpha$	Level of significance
$z\beta$	Statistical power
$\mu\text{g/mL}$	Micrograma por mililitro
$\mu\text{g/mL}^{-1}$	Micrograma por mililitro
$\mu\text{L}$	Microlitro
$\mu\text{l/ml}$	Microlitro por mililitro
V	Volume
WNL	Weighted number of links

**LISTA DE NOTAÇÕES OU SIMBOLOS**

$\alpha$	Alfa
$\beta$	Beta
$^{\circ}\text{C}$	Grau Celsius
%	Porcentagem
®	Registrado

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	16
2 OBJETIVOS .....	17
2.1 Objetivo Geral .....	17
2.2 Objetivos Específicos .....	17
3 REVISÃO DE LITERATURA.....	18
3.1 Bebidas lácteas .....	18
3.2 Plantas medicinais e os conservantes naturais .....	19
3.4 Cravo da Índia ( <i>Syzygium aromaticum</i> ) .....	20
3.5 Efeito antioxidante e o estresse oxidativo .....	20
3.6 Análise de bioinformática .....	21
3.10 Referências .....	23
4 ARTIGOS .....	28
4.1 Artigo 1 – Análise bioinformática prediz mecanismo molecular envolvido na ação antioxidante do <i>Syzygium aromaticum</i> .....	28
4.2 Artigo 2 – Preservation of fermented dairy beverages with addition of clove ( <i>Syzygium aromaticum</i> ) essential oil.....	44
4.3 Artigo 3 - Avaliação da atividade antioxidante de bebida láctea fermentada com adição de óleo essencial de cravo-da-Índia <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> .....	58
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	85
APÊNDICE(S) .....	86
APÊNDICE A – Ficha de Identificação para as gaiolas dos Grupos de Animais do Experimento .....	86
APÊNDICE B - Ficha de controle do peso individual dos animais de cada grupo por semana .	87
APÊNDICE C - Ficha de controle da quantidade de ração consumida pelos animais por semana.....	88
APÊNDICE D - Ficha de controle da quantidade de água consumida pelos animais por semana	89
ANEXO(S) .....	90
ANEXO A – Protocolo de aprovação pelo comitê de ética em experimentação animal - Unimontes .....	90
ANEXO B – Protocolo de aprovação pelo comitê de ética em experimentação animal – ICA/UFMG.....	91

## 1 INTRODUÇÃO

Bebida láctea fermentada tem em sua composição leite misturado ao soro e acrescidos de aditivos conservadores como ácido sórbico, sorbato de sódio, sorbato de cálcio e sorbato de potássio (BRASIL, 2005). Os conservantes de alimentos possuem ação antimicrobiana, antioxidante e previne a deterioração, aumentando a vida de prateleira dos produtos (DEHGHAN *et al.*, 2018).

O sorbato de potássio é um produto muito utilizado na indústria como conservante de alimentos, pois previne o crescimento de bactérias, leveduras e fungos. Porém a utilização desse conservante tem sido associada a diferentes problemas como danos toxicológicos, mutagênicos, genotóxicos e citotóxicos (DEHGHAN *et al.*, 2018; ZENGİN *et al.*, 2011). A busca por produtos naturais em substituição aos conservantes sintéticos vem crescendo, principalmente na indústria de alimentos de produtos lácteos (CALEJA *et al.*, 2015; 2016).

A bebida láctea fermentada utilizada no presente estudo foi desenvolvida pelo grupo de estudo em Biotecnologia (GEBIO), do Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Minas Gerais (ICA/UFMG), sendo acrescida de ferro e polpa de frutos do cerrado como cajá, mangaba, tamarindo, umbu, coquinho azedo e cagaita. Farias (2016), buscando uma alternativa de conservante natural e que tivesse propriedades antimicrobianas e antioxidantes, formulou uma bebida láctea com óleo essencial de *Syzygium aromaticum* e avaliou o potencial antimicrobiano, os parâmetros físico-químicos e a atividade antioxidante do óleo. Em trabalho realizado por Souza (2019), avaliou a utilização dessa bebida láctea com adição de 2 ul/ml do óleo essencial de cravo-da-índia em camundongos, analisando toxicidade hepática, índices glicêmicos e expressão de marcadores inflamatórios.

Contudo, é necessário avaliar a atividade antioxidante da bebida láctea com o óleo essencial *in vitro* para verificar a eficiência desta atividade em matriz láctea e se ocorre redução durante o período de estocagem e *in vivo* para verificar o potencial antioxidante no tecido adiposo e possíveis conseqüências da ingestão desta bebida.



## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Caracterizar bebida láctea fermentada acrescida de óleo essencial de *Syzygium aromaticum*, avaliando parâmetros microbiológicos, físico-químicos e potencial antioxidante por meio de análises *in silico*, *in vitro* e *in vivo*.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Predizer o mecanismo molecular envolvido na ação antioxidante da bebida láctea fermentada acrescida de óleo essencial de *Syzygium aromaticum* por meio de análises de bioinformática;
- Avaliar a adição do óleo essencial de *Syzygium aromaticum* em bebida láctea fermentada como potencial substituto para conservantes sintéticos;
- Avaliar o potencial antioxidante da bebida láctea fermentada acrescida de óleo essencial de *Syzygium aromaticum* *in vitro* e *in vivo*.

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 Bebidas lácteas

A bebida láctea tem em sua composição pelo menos 51% (cinquenta e um por cento) de base láctea e consiste em uma mistura de leite e soro, podendo ter adição ou não, de produtos ou substâncias alimentícias, como fermentos lácteos selecionados, gordura vegetal, leites fermentados e outros produtos lácteos (BRASIL, 2005).

O soro é considerado resíduo da produção nas fábricas de queijo, e o descarte desse resíduo está associado a problemas ambientais devido ao alto teor de matéria orgânica, sendo assim o reaproveitamento do soro visa minimizar os impactos ambientais e melhorar a eficiência econômica (OLIVEIRA; BRAVO; TONIAL, 2012).

O soro é rico em componentes nutricionais e a sua utilização tem contribuindo para o surgimento de novos produtos como as bebidas lácteas (OLIVEIRA; BRAVO; TONIAL, 2012). A bebida láctea com adição de soro de leite tem ganhado espaço no mercado e atraindo o consumidor, devido ao seu baixo custo e valor nutricional agregado (THAMER & PENNA, 2006). Para a conservação das bebidas lácteas fermentadas podem ser usados sorbato de potássio, sorbato de cálcio, ácido sórbico e sorbato de sódio (BRASIL, 2005).

Porém nota-se que existe uma alta demanda dos consumidores por produtos saudáveis e que possuem a capacidade de prevenir doenças (BALDISSERA et al., 2011). Os alimentos funcionais possuem valor nutricional e benefícios a saúde, podendo reduzir riscos de doenças, melhorias na saúde e no bem-estar (SOARES et al., 2011). A busca por alimentos funcionais vêm crescendo devido aos benefícios a saúde trazida por estes alimentos. Os produtos lácteos com adições de ingredientes apresentam esta capacidade, dentre eles estão os que possuem capacidade funcional como carotenóides, ácidos graxos poli-insaturados, probióticos, fibras alimentares, fitoesteróis, entre outros, sendo assim um alimento nutricional completo com componentes bioativos que podem ser potencializados atendendo o consumidor (BALDISSERA et al., 2011).

Com isso Farias (2016) elaborou bebidas lácteas fermentadas com adição de óleos essenciais de *Syzygium aromaticum*, *Lippia alba* e *Cymbopogon citratus* avaliando o potencial conservante destes óleos e os parâmetros nutricionais e de qualidade previstos na legislação. Priorizando a utilização de um conservante natural e o potencial funcional dos óleos em estudo, o *Syzygium aromaticum* apresentou melhores resultados antioxidantes e antimicrobianos, sem alterar a quantidade de bactérias lácteas desejáveis. Devido à escassez de trabalhos utilizando a bebida láctea fermentada com óleo essencial de cravo-da-índia, torna-se necessário estudos da atividade antioxidante na matriz láctea e análises *in vivo* para verificar o potencial funcional da bebida.

### 3.2 Plantas medicinais e os conservantes naturais

O uso de plantas medicinais tem se tornado crescente como recurso alternativo no tratamento de diversas doenças em grande parte no mundo, isso ocorre, pois o uso de plantas são mais fáceis quando comparada aos medicamentos alopáticos. Segundo a Organização Mundial de Saúde em torno de dois bilhões de pessoas no mundo recorrem à utilização da medicina popular por meio da extração dos princípios ativos presentes nas plantas medicinais em busca de tratamento de doenças (BEVILACQUA, 2010; SMITH-HALL *et al.*, 2012).

De acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) planta medicinal é parte de uma planta ou toda ela que tenha em sua constituição substâncias ou classes que possuem ações terapêuticas (BRASIL, 2010).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS) plantas medicinais são espécies que podem ser cultivadas ou não, que tenham fins terapêuticos, podendo ser usadas tanto secas quando frescas. Planta fresca entende-se que é aquela que é utilizada logo após a colheita e planta seca aquela em que sofreu processo de secagem (WHO, 2003).

A utilização de plantas com a finalidade para uso terapêutico vem acontecendo desde a civilização humana que por muitos anos foi utilizada para a saúde humana. Em torno de 25% de todos os medicamentos atuais são derivados indiretamente ou diretamente de plantas medicinais, podendo ser por meio de conhecimentos tradicionais ou tecnologias modernas (BRASIL, 2006).

Um dos produtos das plantas medicinais são os óleos essenciais. Estes originam-se dos metabolismos secundários tendo em sua constituição: monoterpenos, sesquiterpenos, substâncias contendo enxofre ou nitrogênio e fenilpropanoides. São misturas complexas de substâncias voláteis lipofílicas, sendo seus compostos: aldeídos, ésteres, cetonas, hidrocarbonetos terpênicos, ácidos orgânicos, fenóis e outros. Estes compostos estão em diferentes concentrações. (BAJPAI; RAHMAN; KANG, 2008; BURT, 2004).

O uso de óleos essenciais na alimentação animal pode ser interessante, pois estes possuem princípios ativos que podem agir em conjunto com outros aditivos alimentares ou individualmente podendo ter diferentes ações e ocasionar uma redução no surgimento de cepas bacterianas resistentes. Além disso, devem ser avaliados os efeitos que dependem de diversos fatores tais como a concentração do óleo na dieta, natureza química, o estado de saúde dos animais e a quantidade consumida (ACAMOVIC & BROOKER, 2005).

Existem pesquisas que buscam produtos alternativos para serem usados como conservantes de alimentos que agregam também propriedades desejáveis, dentre eles temos os óleos essenciais que estão no grupo de bioativos pesquisados, pois apresentam capacidade de conservação de produtos alimentares e diferentes outras atividades (ASENSIO *et al.*, 2015).

Os óleos essenciais são produtos provindos de plantas medicinais estes por sua vez apresentam diversas atividades farmacológicas e possuem capacidade de conservar

alimentos, sendo assim, estes podem ser utilizados como substitutivo aos conservantes químicos (PEREIRA et al., 2008).

### 3.4 Cravo da Índia (*Syzygium aromaticum*)

O cravo-da-Índia é uma espécie da família *Myrtaceae*, conhecido cientificamente por *Eugenia caryophyllata* Tumb, *Caryophyllus aromaticus* L., *Eugenia aromatica* (L) Baill, *Eugenia caryophyllus* (Sprengel) e atualmente por *Syzygium aromaticum* (L) Merr. Originado na Indonésia nas ilhas Molucas, é uma planta do tipo arbórea que pode atingir de oito a dez metros de altura. Com as copas alongadas, possui folhas ovais e aromáticas com comprimento de sete a 11 centímetros, as flores são consideradas pequenas com coloração verde-amarelado e um pouco avermelhado. O botão da flor seca é muito utilizado na culinária devido ao aroma e sabor existente. O principal constituinte é o eugenol, assim como outros compostos e as concentrações dos mesmos varia de acordo com a porção da planta onde o óleo essencial é extraído (AFFONSO et al., 2012; MAEDA et al., 1990; MAZZAFERA, 2003).

O eugenol (4-alil-2-metoxifenol) é o componente majoritário existente na composição do óleo essencial do cravo-da-Índia é um composto semivolátil. Em menores concentrações encontra-se o acetato de eugenol e o  $\beta$ -cariofileno. Possui a cor castanha escuro com sabor e odor forte e característico e pode corresponder até 95% da composição do óleo essencial.

De acordo com a Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura e a Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) o consumo diário máximo do eugenol que é aceitável é de 2,5 mg/kg (CARDOSO et al., 2007; FENG et al., 2014; JAVAHERY et al., 2012).

### 3.5 Efeito antioxidante e o estresse oxidativo

Os antioxidantes podem trazer grandes benefícios à saúde e melhorias na qualidade de vida, podendo retardar ou evitar o aparecimento de doenças tais como: hipertrofia muscular, artrite, câncer, doenças cardiovasculares entre outras. Pois estes possuem a capacidade de proteger o organismo de possíveis danos que os radicais livres podem causar, além do mais, estes podem apresentar menor custo. Os antioxidantes podem agir através de mecanismos como a ruptura da propagação de radicais livres, interrompendo a formação destes ou estimulando o sistema de defesa antioxidante das células (ALAM; BRIST; RAFIQUZZAMAN, 2012; OLIVEIRA, 2015; ROSÉS, 2015).

Pensando na saúde pública e animal o produto que obtém a capacidade de inibir a produção e liberação ou capturar radicais livres e desempenham ações de defesa antioxidante nas células podem desempenhar um papel muito importante na prevenção de doenças. (ALAM; BRIST; RAFIQUZZAMAN, 2012; OLIVEIRA, 2015; ROSÉS, 2015).

Estudos mostram que os óleos essenciais possuem boa atividade antioxidante, sendo esta propriedade atualmente bem valorizada na indústria alimentar, pois estes produtos podem ser utilizados como conservantes e aditivos de alimentos. Para análise de atividade antioxidante em óleos essenciais utiliza-se diferentes métodos como: biológicos (na avaliação da peroxidação lipídica e oxidação protéica) e eletroquímicos e *in vitro*, colorimétricos: DPPH. (1,1 difenil-2-picrilhidrazila) ou ABTS (ácido 2,2'-azinobis-3 etilbenzotiazolina-6-sulfônico), sendo este último considerado o método mais simples e mais barato. Além disso, é o mais utilizado, cerca de 90% dos estudos utilizam este método (BORGES *et al.*, 2011; OLIVEIRA, 2015).

No metabolismo natural ocorre produção de espécies reativas de nitrogênio (ERN), espécies reativas de oxigênio (ERO), entre outras. Estas são observadas em diversas condições fisiológicas e são de grande importância em diversas funções como na fagocitose, onde estas são responsáveis por eliminar o agente invasor, porém quando a produção dessas espécies se eleva o organismo necessita de um bom sistema antioxidante para conseguir controlar esta falha de produção e manter o equilíbrio. O estresse oxidativo nada mais é do que o desequilíbrio do sistema antioxidante que pode acarretar doenças e o envelhecimento (VASCONCELOS *et al.*, 2007).

A alta produção dessas espécies reativas é compensada por mecanismos de defesa de sistemas de prevenção sendo estes: glutathione peroxidase (GPx), glutathione reduced (GSH), catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), tocoferol, glutathione reductase (GR) que podem também reconstituir estruturas lesadas (MARAVAI, 2016; VASCONCELOS *et al.*, 2007).

As espécies reativas de oxigênio (ERO) possuem a capacidade de degradar os lipídeos poli-insaturados das membranas celulares com isso ocorre um aumento de compostos de malondialdeído (MDA) que nada mais é do que um produto secundário da peroxidação lipídica. É possível quantificar a produção desta substância por meio das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Este teste é aplicado para quantificar a oxidação de lipídeos, sendo ele um biomarcador para medir o estresse oxidativo e a peroxidação lipídica no organismo (BARBOSA *et al.*, 2010; BERTOLIN *et al.*, 2011; DEVASAGAYAM; BOLOOR; RAMASARMA *et al.*, 2003)

### 3.6 Análise de bioinformática

A bioinformática é uma ferramenta computacional, que envolve dados biológicos moleculares já existentes para assim identificar genes e prever hipóteses, sendo de experimentos da expressão gênica, agrupamento de proteínas ou estabelecer árvores filogenéticas (ARAUJO *et al.*, 2008). Nos últimos anos esta ferramenta tem se tornado fundamental para manipular dados biológicos, devido à capacidade de gerar de forma rápida e eficiente dados utilizando as áreas da matemática, ciência da computação e estatística que auxiliam na interpretação de dados biológicos representados a nível molecular (SANTOS &

ORTEGA, 2003). O desenvolvimento e a criação de bancos de dados contribuem para estudos e pesquisas em outras áreas como a medicina, a biotecnologia, entre outras (BORÉM & SANTOS, 2001).

A bioinformática pode ser utilizada em diferentes segmentos como a interpretação da linguagem dos genes por algoritmo, geração de hipóteses a partir dos dados, criação de bancos de dados, leitura de informações contidas no código genético, criação de programas computacionais (ARAUJO et al., 2008). Além das diferentes áreas que envolvem essa análise computacional de sistemas biológicos, como a predição de função gênica, biologia de sistemas, dinâmica molecular (VERLI, 2014). Sendo esta ferramenta grande aliada atualmente para as pesquisas.

## 3.10 Referências

ACAMOVIC, T.; BROOKER, J.D. Biochemistry of plant secondary metabolites and their effects in animals. **The Proceedings of the Nutrition Society**, v.64, n.3, p.403-412, 2005.

ASENSIO, C.M.; GROSSO, N.R.; JULIANI, H.R. Quality preservation of organic cottage cheese using oregano essential oils. **Food Science And Technology**. v. 60, n. 2, p.664-671, mar. 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2014.10.054>>. Acesso em: 10 maio 2018.

AFFONSO, R. S. et al. Chemical and Biological Aspects of the Essential Oil of Indian Cloves. **Revista Virtual de Química**, v. 4, n. 2, p.146-161, 2012. Sociedade Brasileira de Química (SBQ). Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.5935/1984-6835.20120012>>. Acesso em: 22 set. 2018.

ALAM, M.d. N.; BRISTI, N. J.; RAFIQUZZAMAN, M.d.. Review on *in vivo* and *in vitro* methods evaluation of antioxidant activity. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 21, n. 2, p.143-152, abr. 2013. Elsevier BV. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jsps.2012.05.002>>. Acesso em: 20 set. 2018.

ARAÚJO, N. D., FARIAS, R. P., PEREIRA, P. B., FIGUEIRÊDO, F. M., MORAIS, A. M. B., SALDANHA, L. C., GABRIEL, J. E. A era da bioinformática: seu potencial e suas implicações para as ciências da saúde. *Estudos de Biologia*, v. 30, n. 70/72, p.143-148, 27 nov. 2008. Pontificia Universidade Católica do Paraná - PUCPR. <http://dx.doi.org/10.7213/rev.v30i70/72.22819>.

BAJPAI, V. K.; RAHMAN, A.; KANG, S. C.. Chemical composition and inhibitory parameters of essential oil and extracts of *Nandina domestica* Thunb. to control food-borne pathogenic and spoilage bacteria. **International Journal Of Food Microbiology**, v. 125, n. 2, p.117-122, jul. 2008. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.03.011>>. Acesso em: 07 set. 2018.

BALDISSERA, A.C. et al. Alimentos funcionais: uma nova fronteira para o desenvolvimento de bebidas protéicas a base de soro de leite. **Semina: Ciências Agrárias**, v.32, n.4, p.1497-1512, 2011.

BARBOSA K.B.F et al. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Rev Nutr**. 2010;4(23):629-43. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S1415-52732010000400013>. Acesso em: 20/10/2018 . Acesso em: 20/10/2017.

BEVILACQUA, HGCR. Planejamento de horta medicinal e comunitária. **Divisão Tec. Esc. Municipal de Jardinagem/Curso de Plantas medicinais**-São Paulo. 2010

BERTOLIN T.E et al. Antioxidant effect of phycocyanin on oxidative stress induced with monosodium glutamate in rats. **Braz Arch Biol Technol**. 2011;54(4):733-8. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-89132011000400012>. Acesso em: 20/10/2018.

BORGES, L. L. *et al.* Uma abordagem sobre métodos analíticos para determinação da atividade antioxidante em produtos naturais. **Enciclopédia Biosfera**, v. 7, n. 12, p. 1-20, 2011. Disponível em: <https://www.conhecer.org.br/enciclop/2011a/saude/uma%20abordagem.pdf>. Acesso em: 05 set. 2018.

BORÉM, A.; SANTOS, F.R. Biotecnologia Simplificada. Editora Suprema. Viçosa, MG., 2001.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods: a review. **International journal of food microbiology**, v. 94, p. 223-253, 2004. Disponível em: <http://goo.gl/TzQhuJ>. Acesso em: 30 dez. 2018.

BRASIL. (2010). Resolução nº 10, de 09 de março de 2010. **Ministério da Saúde: Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Disponível em: [http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2010/res0010\\_09\\_03\\_2010.html](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2010/res0010_09_03_2010.html). Acesso em: 15 out. 2018.

BRASIL. Instrução Normativa nº 16, de 23 de agosto de 2005. Aprova o regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Bebidas Láctea. 2005. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, Seção 1, p. 7. 24 ago. 2005. Disponível em: <http://goo.gl/8qJBDG>. Acesso em: 30 dez. 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. **Política e Programa Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos**. Brasília: MS, 2006. Disponível em: <http://goo.gl/gmxVR7>. Acesso em: 20 set. 2018.

CALEJA, C., BARROS, L., ANTONIO, A. L., CAROCHO, M., OLIVEIRA, M. B. P., & FERREIRA, I. C. Fortification of yogurts with different antioxidant preservatives: A comparative study between natural and synthetic additives. **Food Chemistry**, v. 210, p.262-268, 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.04.114>.

CALEJA, C., BARROS, L., ANTONIO, A. L., CIRIC, A., BARREIRA, J. C. M., SOKOVIC, M., et al. Development of a functional dairy food: Exploring bioactive and preservation effects of



chamomile (*Matricaria recutita* L.). **Journal Of Functional Foods**, v. 16, p.114-124, 2015. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2015.04.033>.

CARDOSO, M. G. et al. Avaliação do potencial fungitóxico do óleo essencial de *Syzygium aromaticum* (L.) Merr & Perry (cravo-da-índia). **Tecno-Lógica**, v. 11, n. 1, p. 11-14, 2007

DEHGHAN, P., MOHAMMADI, A., MOHAMMADZADEH-AGHDASH, H., E DOLATABADI, JEN. Pharmacokinetic and toxicological aspects of potassium sorbate food additive and its constituents. **Trends In Food Science & Technology**, v. 80, p.123-130, 2018. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2018.07.012>.

DEVASAGAYAM, T. P. A.; BOLOOR, K. K.; RAMASARMA, T. Methods for estimating lipid peroxidation: An analysis of merits and demerits. **Indian Journal of Biochemistry & Biophysics**, v. 40, n. 5, p. 300- 308, 2003.

FARIAS, P. K. S. **Elaboração de bebida láctea fermentada com adição de óleo essencial**. 2016. 67 f. (Mestrado em Produção Animal) – Universidade Federal de Minas Gerais, 2016.

FENG, Q. et al. A novel way for detection of eugenol via poly (diallyldimethylammonium chloride) functionalized graphene-MoS<sub>2</sub> nano-flower fabricated electrochemical sensor. **Sensors And Actuators B: Chemical**, v. 192, p.1-8, mar. 2014. Elsevier BV. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.snb.2013.10.087>>. Acesso em: 22 set. 2018.

JAVAHERY, S.; NEKOUBIN, H.; MORADLU L., ABDOLMAJID H. Effect of anaesthesia with clove oil in fish (review). *Fish Physiology And Biochemistry*, [s.l.], v. 38, n. 6, p.1545-1552, 30 jun. 2012. **Springer Nature**. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s10695-012-9682-5>>. Acesso em: 22 set. 2018.

MAEDA, J. A. et al. Craveiro-da-Índia: características físicas das sementes e seus efeitos na germinação e desenvolvimento vegetativo. **Bragantia**, v. 49, n. 1, p. 23-36, 1990. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/brag/v49n1/03.pdf>>. Acesso em: 17 set. 2018.

MARAVAI, S. G.. Efeitos da administração intracerebroventricular de carnosina sobre parâmetros de estresse oxidativo em cérebro de ratos . Dissertação (Mestrado) - Universidade do Extremo Sul Catarinense - Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Criciúma, SC, 2014. Ed. do Autor, 2014. 54 p.

MAZZAFERA, P.. Efeito alelopático do extrato alcoólico do cravo-da-índia e eugenol. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 26, n. 2, p. 231-238, 2003.

OLIVEIRA, G. L. S. Determinação da capacidade antioxidante de produtos naturais in vitro pelo método do DPPH\*: estudo de revisão. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, n. 1, p. 36-44, 2015. Disponível em: <[goo.gl/St5uD2](http://goo.gl/St5uD2)>. Acesso em: 25 mar. 2018.

OLIVEIRA, D. F.; BRAVO, C. E. C; TONIAL, I. B. Soro de leite: um subproduto valioso. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 67, n. 385, p. 64-71, 2012.

PEREIRA, A. D. A.; DAS GRAÇAS CARDOSO, M.; DE ABREU, L. R.; DE MORAIS, A. R.; DE LIMA GUIMARÃES, L. G., SALGADO, A. P. S. P.. Caracterização química e efeito inibitório de óleos essenciais sobre o crescimento de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 32, n. 3, p.887-893, 2008. Disponível em: <[goo.gl/TFvwmc](http://goo.gl/TFvwmc)>. Acesso em: 04 maio 2018.

ROSÉS, R. P.. **Evaluación de la actividad inmunomoduladora de biomoléculas de origen vegetal**. 2015. 196 f. Tese (Doutorado) - Curso de Farmacia, Facultat de Farmàcia Departament de Farmacologia I Química Terapèutica Unitat de Farmacologia I Farmacognòsia Programa de Doctorat: Recerca, Desenvolupament I Control de Medicaments, Barcelona, 2015. Disponível em: <[http://diposit.ub.edu/dspace/bitstream/2445/66386/1/RPR\\_TESIS.pdf](http://diposit.ub.edu/dspace/bitstream/2445/66386/1/RPR_TESIS.pdf)>. Acesso em: 20 set. 2018.

SANTOS, F. R.; ORTEGA, J. M.. Bioinformática aplicada à Genômica. **Melhoramento Genômico**, Minas Gerais: UFV, p. 93-98, 2003

SMITH-HALL, C.; LARSEN, H. O.; POULIOT, M. People, plants and health: a conceptual framework for plant consumption. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, v. 8, n. 43, 2012.

SOARES, D.S. et al. Aproveitamento de soro de queijo para produção de iogurte probiótico. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.63, n.4, p.996-1002, 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-09352011000400027>. Acesso em: 16 abr. 2018.

SOUZA, K. S. S. **Perfil glicêmico e metabolismo hepático de camundongos alimentados com bebida láctea fermentada adicionada de óleo essencial de *Syzygium aromaticum***. 2019. 74 f. (Mestrado em Produção Animal) – Universidade Federal de Minas Gerais, 2019.

Thamer, K. G & Penna, A. L. B. Caracterização de bebidas lácteas funcionais fermentadas por probióticos e acrescidas de prebiótico. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 26(3), 589-595. 2006. Retrieved from: <http://www.scielo.br/pdf/cta/v26n3/31761>.

VASCONCELOS S.M.L *et al.* Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova**. 2007; v. 30; n.5, p.1323-1338.

VERLI, H. Bioinformática da Biologia à flexibilidade molecular. **Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular**. 1. ed. - São Paulo, p. 282. 2014.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO **guidelines on good agricultural and collection practices (GACP) for medicinal plants**. Geneva: WHO, 2003. Disponível em: <[goo.gl/2zuxGT](http://goo.gl/2zuxGT)>.

Zengin, N., Yüzbas\_og̃lu, D., Ünal, F., Yılmaz, S., & Aksoy, H.. The evaluation of the genotoxicity of two food preservatives: Sodium benzoate and potassium benzoate. **Food And Chemical Toxicology**, v. 49, n. 4, p.763-769, 2011. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2010.11.040>.

#### 4 ARTIGOS

4.1 Artigo 1 – Análise bioinformática prediz mecanismo molecular envolvido na ação antioxidante do *Syzygium aromaticum*

Este artigo foi elaborado conforme as normas da revista *bioinformatics and biology insights*.

## **Análise bioinformática prediz mecanismo molecular envolvido na ação antioxidante do *Syzygium aromaticum***

### **Bioinformatic analysis predicts molecular mechanism involved in the antioxidant action of *Syzygium aromaticum***

#### **Resumo**

O cravo-da-índia apresenta diversas funcionalidades, uma delas é a atividade antioxidante, importante função para reduzir níveis de espécies reativas ao oxigênio (ERO) e consequentemente o estresse oxidativo no organismo. Porém estudos *in vivo* e a nível molecular da ação desta atividade são escassos. Com isso, esta revisão de bioinformática tem como objetivo investigar a atividade antioxidante do *Syzygium aromaticum in vivo* e analisar o mecanismo molecular envolvido nesta atividade. Foi realizada uma busca de genes na plataforma GeneCards usando as palavras-chave “*Syzygium aromaticum*”, “*antioxidant*”, “*oxidative stress*”. Posteriormente foi feita uma rede de interação utilizando a plataforma STITCH. Os genes PIK3CD, PIK3CB, AKT1 e PIK3CA foram os genes líderes e o estudo sugere que estes atuam na inibição das ERO evitando estresse oxidativo. Este relato sugere que o *Syzygium aromaticum* possui atividade antioxidante a nível molecular. No entanto, estudos *in vivo* devem ser realizados para comprovar seu potencial.

**Palavras-Chave:** Cravo-da-índia, Espécies reativas ao oxigênio, Estresse oxidativo.

#### **Introdução**

O cravo da Índia (*Syzygium aromaticum*) é uma especiaria pertencente à família *Myrtaceae*<sup>1</sup>, nativa do leste da Indonésia, bastante utilizada na culinária e muito cultivado nos países africanos e asiáticos, sendo este um dos fatores que contribuem para o desenvolvimento econômico nos países asiáticos<sup>2,3</sup>. Entre os fatores que atraem a atenção para esta especiaria estão as atividades biológicas a ela atribuídas como: atividade antioxidante, fungicida, acaricida, inseticida, antimicrobiano, antiséptico, entre outras<sup>4,5,6</sup>.

A busca por produtos que possuem atividade antioxidante vêm ganhando espaço, pois estes podem trazer benefícios à saúde e melhorias na qualidade de vida podendo retardar ou evitar o aparecimento de doenças como: câncer, doenças cardiovasculares, artrite, entre outras<sup>7,8,9</sup>. Isso ocorre devido à capacidade de proteger o organismo dos possíveis danos causados pelos radicais livres. Os antioxidantes utilizam mecanismos como a ruptura da propagação desses radicais livres, interrompendo a sua formação ou estimulação a ação do sistema de defesa antioxidante das células<sup>7,8,9</sup>.

Os polifenóis possuem elevada propriedade antioxidante e conseqüentemente alta capacidade de sequestrar radicais livres. Esta atividade está correlacionada com a capacidade de inibir as enzimas responsáveis pela produção das espécies reativas ao oxigênio (ERO) e por regular as enzimas antioxidantes<sup>10, 11</sup>.

O cravo da Índia está entre as especiarias com maior teor de polifenóis e de compostos antioxidantes<sup>12</sup>, e quando avaliado em ensaios *in vitro* nota-se alta eficiência de sua atividade antioxidante em diferentes métodos<sup>13, 14</sup>. Um dos fatores que podem ser relacionados com o mecanismo de ação desta atividade é o fato do eugenol o componente majoritário do cravo da Índia, permitir a doação de um átomo de hidrogênio, ocasionando uma estabilização do radical fenoxila, sendo assim o composto estável não pode iniciar ou propagar a oxidação<sup>14, 15</sup>. Porém estudos que abordam o mecanismo molecular desta atividade são escassos.

Sendo assim, o presente trabalho tem como objetivo prever o mecanismo molecular envolvido na atividade antioxidante do *Syzygium aromaticum* por meio de análises *in silico*.

## Material e métodos

A busca por genes envolvidos na ação antioxidante do cravo-da-Índia foi realizada na plataforma Genecards (<http://www.genecards.org>)<sup>16</sup>. Foram utilizadas as seguintes palavras chaves: "*Syzygium aromaticum*", "*antioxidant*", "*oxidative stress*". Os genes extraídos da plataforma GeneCards foram utilizados como entrada para a plataforma STITCH 10 (<http://stitch.embl.de/>)<sup>17,18</sup>, para obter a rede de interação da ação antioxidante do cravo-da-Índia com as proteínas. Para a construção da rede foram utilizados "Experimentos", "Bancos de dados", "*Textmining*", "*Co-expression*", "*Neighborhood*", "Fusão gênica" e "Co-ocorrência". Utilizou-se um escore mínimo de interação com confiança média de 0.4, não apresentando mais que dez interatores na primeira e na segunda camada<sup>18</sup>.

A cada interação genética realizada, obteve-se o escore de interação de cada gene, obtendo assim uma pontuação de associação. Esta pontuação foi ajustada, multiplicando o valor obtido por mil<sup>19,20,21</sup>, para assim obter uma única pontuação denominada "maior número de links" (WNL), sendo esta variável a representação da força de interação gene-gene.

Os genes que apresentaram maiores valores de WNL são denominados "genes líderes"<sup>19,20,21</sup>, por ser importantes na sinalização da atividade antioxidante do cravo-da-Índia a nível molecular.

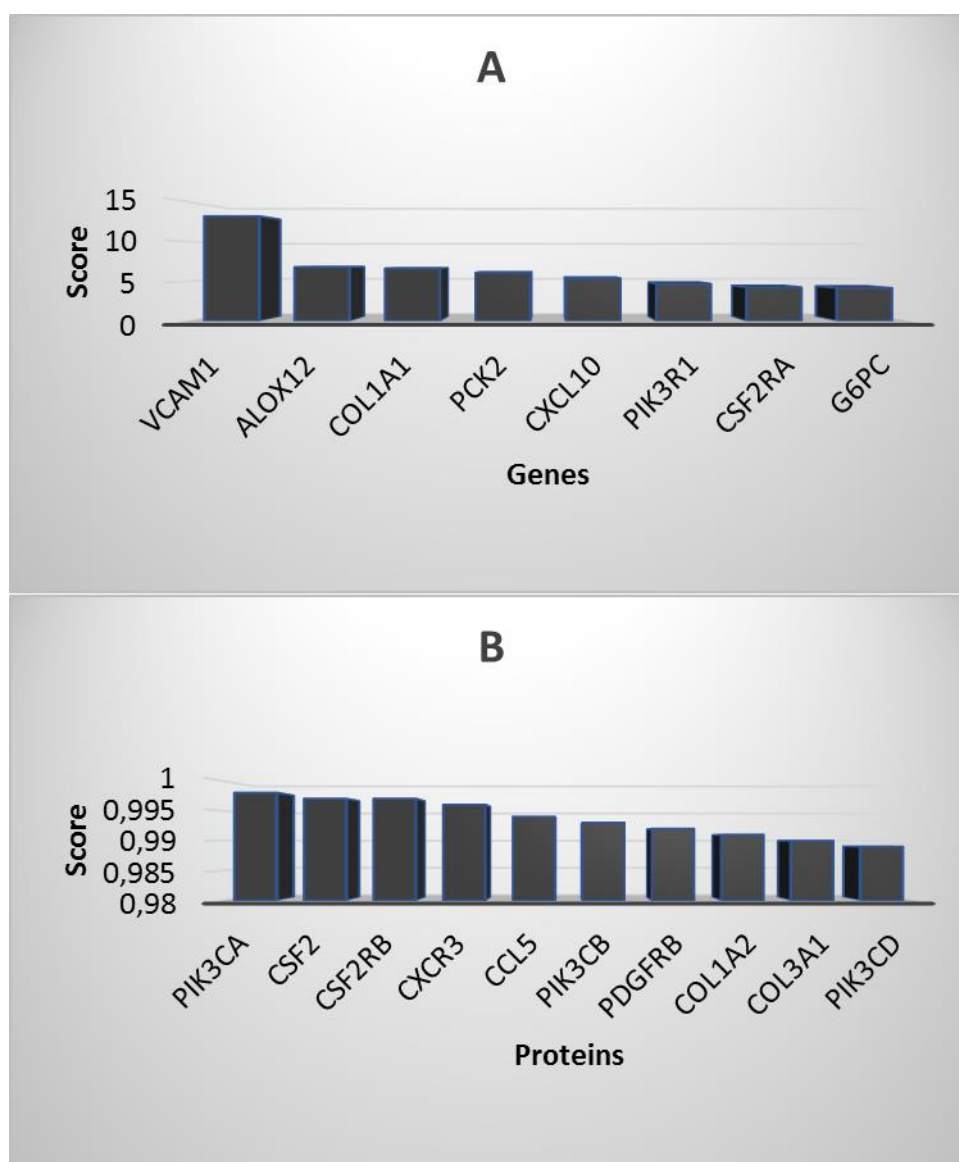
Posteriormente, os genes foram classificados de acordo com o parâmetro em *clusters*, pelo método de clusterização *K-means* (*software* SPSS 17.0)<sup>22</sup>. As diferenças entre as classes do WNL foi avaliada por teste estatístico ANOVA com significância de  $p < 0,001$ .

A partir da análise do banco de dados String, os dados para a análise ontológica também foram extraídos<sup>22</sup>.

## Resultados e discussão

Ao avaliar a nível molecular em pesquisas realizadas no Genecards obteve-se um total de oito genes, sendo estes o VCAM1, ALOX12, COL1A1, PCK2, CXCL10, PJK3P1, CSF2RA, G6PC. Os detalhes estão descritos na Figura 1A. A partir das análises realizadas na base de dados String foi possível obter os parceiros funcionais previstos, obtendo um total de dez proteínas PIK3CA, CSF2, CSF2RB, CXCR3, CCL5, PIK3CB, PDGFRB, COL1A2, COL3A1, PIK2CD. Os detalhes estão descritos na Figura 1B.

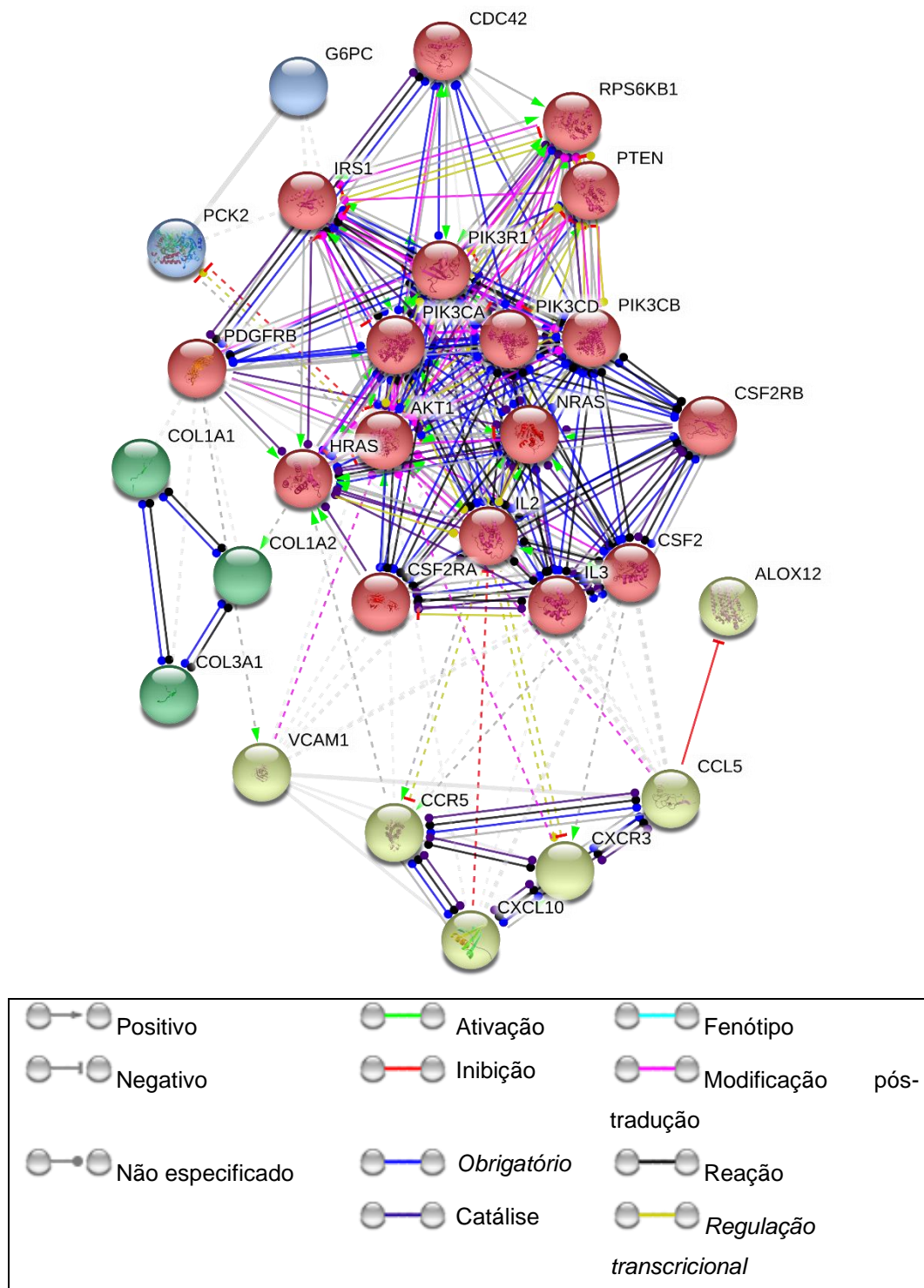
**Figura 1** – Genes e proteínas envolvidas na ação antioxidante do cravo-da-índia.



Relação e pontuação obtida dos genes-alvo envolvidos na ação antioxidante do cravo obtido no Genecards (A) e dos possíveis parceiros funcionais obtidos no banco de dados String (B), de acordo com os termos de buscas “*Syzygium aromaticum*”, “antioxidant” e “oxidative stress”.

Ao avaliar a interação entre os genes encontrados no Genecards obteve-se o a rede de interação (Figura 2), e as possibilidades de interação entre os genes envolvidos na ação antioxidante do *Syzygium aromaticum* com as proteínas da rede de interação protéica.

**Figura 2** - Rede de interação baseada nos dados de ação antioxidante do cravo-da-índia.





Ao verificar a força de interação (Figura 3A) entre os genes da rede, obteve-se que os genes PIK3CD, PIK3CB, AKT1 e PIK3CA foram os genes líderes, ou seja, aqueles que obtiveram maior número de interações. Os genes líderes possuem classificação mais alta, os genes que não mostram interação são denominados genes órfãos<sup>21</sup>.

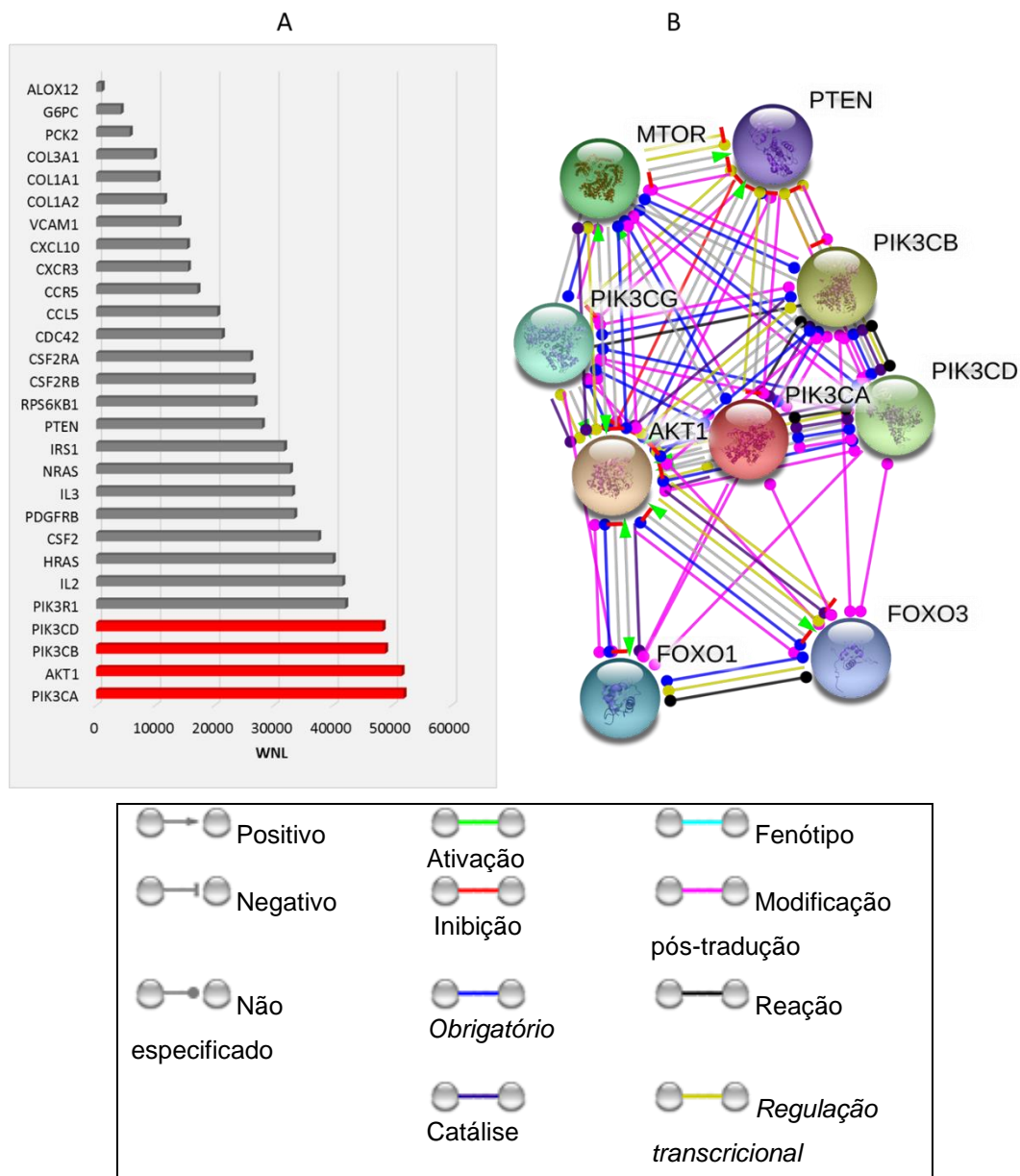
Os PIK3 pertencem ao grupo dos Fosfatidilinositol 3-quinases pertencente à família dos lipídios quinases. São divididos em três classes de acordo com sua especificidade e estrutura. Os genes PIK3CA (p110 $\alpha$ ), PIK3CB (p110 $\beta$ ) e PIK3CD (p110 $\delta$ ) codificam três isoformas catalíticas de classe IA. Estes possuem a capacidade de fosfolizar o grupo hidroxila de fosfatidilinositol e fosfoinositídeos. Os PIK3 estão integrados aos estímulos ambientais, sinais de fatores de crescimento e citocinas que produzem sinais intracelulares que são responsáveis por regular diferentes vias de sinalização, estas por sua vez, controlam processos celulares como crescimento, proliferação celular, metabolismo, motilidade e sobrevivência, assim como funções fisiológicas<sup>26,27, 28,29</sup>.

O gene AKT1 corresponde à proteína quinase de serina-treonina, também conhecida como proteína quinase B (PKB)<sup>30</sup>, é considerada fundamental para sobrevivência celular, crescimento e proliferação celular, angiogênese, metabolismo das células, migração celular e invasão. Pode ser considerada importante proteína quinase na fisiologia, pois de acordo com o ganho ou as perdas da ativação de AKT pode acarretar em sérias doenças como câncer<sup>31</sup>.

Estes genes classificados como líderes citados acima, são interligados, pois, é necessário que ocorra ativação de PIK3 para que posteriormente ocorra a de AKT<sup>32</sup>. Para isso, as tirosina quinases receptoras ativadas (RTKs) ativam a fosfatidilinositol 3-quinase de classe I (PIK3) por meio de ligação direta ou por um conjunto com proteínas adaptadoras (como IRS-1/2 (substrato do receptor de insulina-1/2) que se liga e ativa a PI3K. As PIK3s geradas fosforilam o fosfatidilinositol-4,5-bifosfato (PIP2) para gerar fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP3). AKT e PDK1 ligam-se a PIP3 na membrana plasmática que provoca uma alteração na conformação, resultando na fosforilação da AKT, em dois resíduos (Thr<sup>308</sup> e Ser<sup>473</sup>)<sup>31,33</sup>.

Sendo assim, existe uma via PIK3/AKT que está interligada em alguns processos fisiológicos como ao crescimento de tecidos utilizando uma sinalização semelhante a da insulina<sup>35</sup>. A ativação de AKT junto com PIK3 está interligada com a resposta a insulina e a transformação celular<sup>31</sup>. E nas células endoteliais contribuem para a sobrevivência, proliferação, crescimento e crescimento da célula endotelial, sendo ativada pelo fator de crescimento endotelial vascular<sup>31</sup>. Além disso, a via PIK3/AKT desempenham papel importante no sistema imune inato e no adaptativo<sup>32</sup>. A sinalização PIK3/AKT está envolvida com crescimento regenerativo de células. Podendo este fator contribuir no reparo de células danificadas pelo estresse oxidativo<sup>35</sup>.

**Figura 3** - Força de interação entre os genes da rede. Os genes líderes são mostrados em vermelho (A). A Rede de "interação gene-gene" com base nos dados dos genes dos líderes (B).

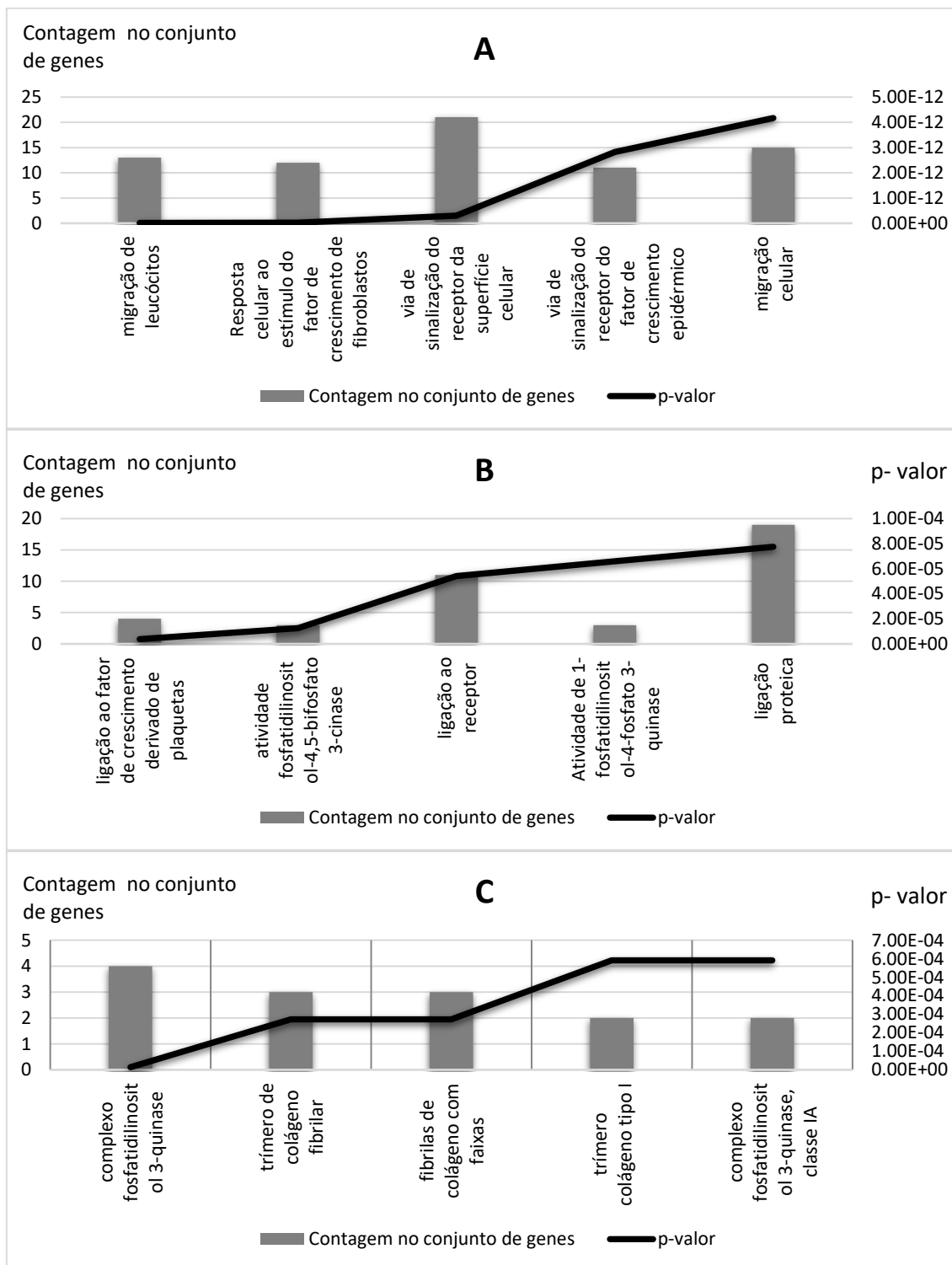


Os genes representados na rede de interações acima (Figura 3B) estão relacionados com funções fisiológicas interligadas aos genes líderes citados (PIK e AKT), expandindo o funcionamento dessa rede de sinalização pelo corpo. Quando ocorre câncer em humanos a via PIK3/AKT é interrompida e mutações genômicas como a PIK3CA podem ocorrer<sup>33</sup>.

Os genes encontrados estão presentes em processos biológicos, funções moleculares, ontologia genética e constituem células (Figura 4). Nota-se que os processos de migração de leucócitos, resposta celular ao fator de crescimento de fibroblastos, via de

sinalização do receptor da superfície celular, ligação do fator de crescimento derivado de plaquetas, atividade fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato 3-quinase e o complexo fosfatidilinositol-3 quinase apresentaram menor p-valor.

**Figura 4** - Ontologia Gênica (GO). Processo Biológico (A). Função Molecular (B). Componente Celular (C).



Sabe-se que o estresse oxidativo provoca alterações fisiológicas podendo acarretar em doenças autoimunes, neurológicas, inflamatórias entre outras. E quando ocorre alta produção de espécies reativas de oxigênio, sendo este maior que os sistemas de defesa antioxidante, podem provocar desnaturação de proteínas, oxidação de lipídios e causar danos a ácidos nucleicos<sup>36</sup>. A via da fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) / Akt tem como uma das suas funções sinalizar a sobrevivência celular, estimulando respostas biológicas. Porém, o estresse oxidativo possui a capacidade de regular a via PI3K / Akt, sendo assim capaz de alterar estes eventos de sinalização<sup>36</sup>.

Em situações de homeostase de regulamento o AKT aumenta os níveis intracelulares de espécies reativas de oxigênio (ERO), para que ocorra a nível mitocondrial estímulo do metabolismo oxidativo, reprimindo ao mesmo tempo sequestro de FoxO no citoplasma, a via de fosforilação e a transcrição de genes de enzimas antioxidantes, sendo que quando a sinalização de AKT está negativa, observa-se redução dos níveis de EROs, assim como da atividade mitocondrial e conseqüentemente aumento da expressão de enzimas antioxidantes mediadas por FoxO. O inverso é visualizado quando ocorre hiperativação da AKT, ou seja, aumento da atividade metabólica na mitocôndria, inibição da atividade da FoxO, aumento dos níveis de EROS, sendo este um dos caminhos percorridos por muitos tipos de células cancerígenas<sup>37</sup>.

Em trabalhos utilizando alimentos que possuem atividade antioxidante é possível notar a importância da via PIK3/AKT para combater o estresse oxidativo. A via da fosfatidilinositol 3-quinase PIK3 / AKT desempenha papéis importantes tanto na ativação de Nrf2 quanto na sobrevivência celular<sup>39</sup>. Neste mesmo trabalho os autores notaram que os níveis de proteína fosfo-PI3K e fosfo-AKT aumentaram e ao ocorrer o aumento da relação p-AKT / AKT ocorre a fosforização de Nrf2 melhorando a atividade antioxidante e o combate ao estresse oxidativo<sup>38</sup>. O eugenol possui função supressora em células de câncer de pulmão, utilizando a via PI3K/AKT o eugenol exerce o papel supressor na invasão, migração e viabilidade das células do câncer, sendo assim um potente agente quimioterápico externo para este tipo de câncer<sup>39</sup>.

O estresse oxidativo é um componente metabólico diário das células que fazem respiração aeróbia. Os radicais presentes são eletronegativos e possuem alto poder de ligação com as estruturas celulares, podendo causar mudanças estruturais e conseqüentemente modificar as propriedades biológicas. As espécies reativas ao oxigênio podem causar mutações no DNA, inibindo proteínas importantes ou induzindo a síntese de proteínas indesejáveis que podem causar morte celular por apoptose. Por outro lado, o estresse oxidativo pode induzir o surgimento de grupos de células neoplásicas. Portanto, para reduzir a possibilidade das células passarem por esses processos, mecanismos evolutivos de controle foram desenvolvidos para permitir a sobrevivência dos seres vivos frente à ameaça representada pelos radicais livres gerados pelo metabolismo celular.

Além de estudos para entendimento dos mecanismos celulares antioxidantes presentes no organismo, existem também a busca pelos antioxidantes presentes nas plantas.

O cravo-da-índia foi considerado um poderoso antioxidante natural, sendo necessários estudos para esclarecer o mecanismo molecular da ação antioxidante. Na análise teológica, foram identificados parâmetros biológicos, moleculares e celulares que auxiliam na elucidação do mecanismo molecular da ação antioxidante do cravo-da-índia (Figura 4A - 4C). Um componente celular importante evidenciado foi o complexo fosfatidilinositol 3-quinases (Figura 4C). Essa análise indica a importância dos genes líderes no desempenho antioxidante da via de sinalização PI3K / AKT. O fosfoinosítido 3-quinase/Akt é uma das principais cadeias envolvidas na proliferação, sobrevivência e metabolismo celular<sup>30,41</sup>.

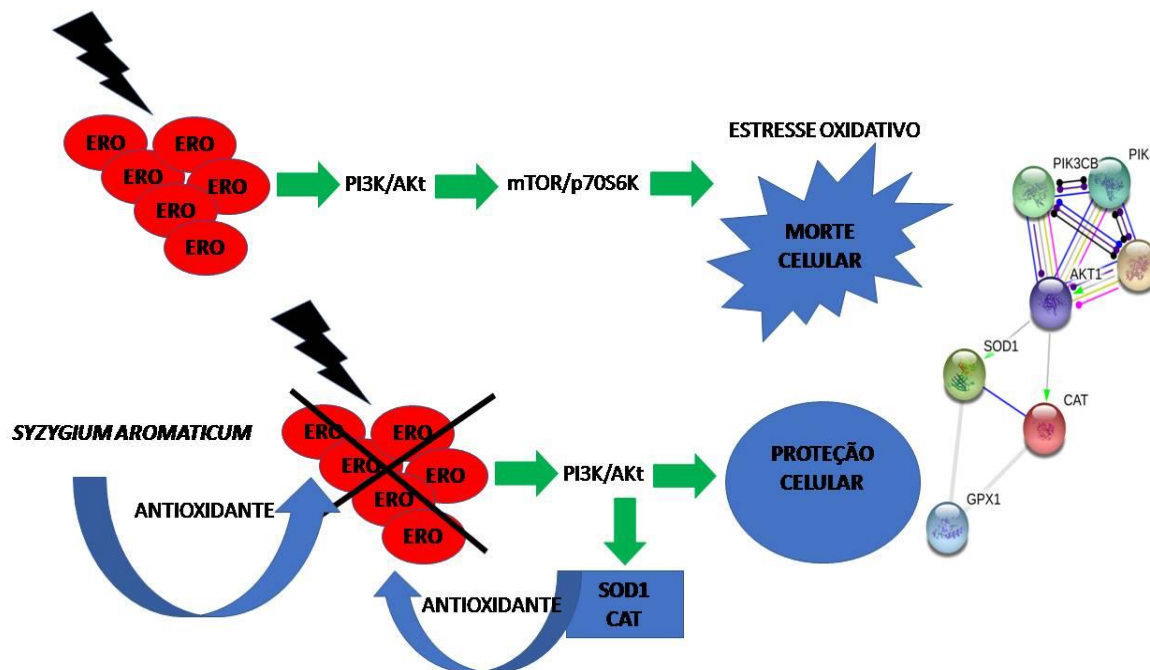
O aumento intracelular das espécies reativas ao oxigênio podem provocar o estresse oxidativo, que pode desencadear a morte celular por apoptose, por ativação de cascatas apoptóticas intrínsecas. O estresse oxidativo pode estar presente em diversos órgãos e tecidos e em diferentes momentos, este estresse induzido por radicais livres podem resultar na apoptose de células<sup>42</sup>.

Substâncias antioxidantes, como alguns compostos, atuam inibindo a produção em excesso de espécies reativas de oxigênio (ERO), eliminam os radicais livres e, conseqüentemente, diminuem a apoptose. As EROs inativam a via de sinalização PI3K/Akts, e ativam a via alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR)/ p70 ribossomal S6 proteína quinase (p70S6K). A ativação da via mTOR / p70S6K induz estresse oxidativo e eleva a expressão da enzima acetilcolinesterase<sup>43</sup>.

No entanto, muitos dos efeitos antiapoptóticos dos fatores de crescimento podem ser atribuídos, em parte, à ativação dessa via, que foi primeiramente demonstrada em células PC12<sup>44</sup>. Alguns estudos identificaram a via PI3K/Akt são importantes na proteção contra a morte celular<sup>45</sup>.

Diante disso, sugere-se que o cravo-da-índia inibe a produção de EROs por meio da ativação da via de proteção celular PI3K/AKT. No presente estudo, a bioinformática analisou hipóteses que componentes agrupados desempenham um papel protetor nas células ao inibir a apoptose e o estresse oxidativo. Portanto, o mecanismo antioxidante pode ser mediado pela ativação da via de sobrevivência PI3K/Akt para a redução das EROs, como mostrado na Figura 5.

Figure 5 – Diagrama esquemático da ação do cravo no estresse oxidativo



ERO: Espécies reativas ao oxigênio; CAT: Catalase; SOD: Superóxido dismutase; mTOR / p70S6K: Via alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR)/ p70 ribossomal S6 proteína quinase (p70S6K); PI3K: Fosfatidilinositol 3-quinases; AKT: Proteína quinase de serina-treonina

**Fonte:** Dos autores (2019).

A ativação do PI3K / Akt, no entanto, não é totalmente necessária, para combater o estresse oxidativo, a utilização de antioxidantes exógenos junto aos antioxidantes endógenos existentes no organismo podem evitar o acúmulo de ERO.

Assim, por meio do entendimento das ações moleculares, é possível compreender melhor o papel protetivo e tóxico do fitoterápico no organismo humano. Assim, plantas como o cravo-da-índia e outras, que têm potencial antioxidante já comprovado *in vitro*, podem-se tornar alternativas sustentáveis para a terapia natural, controlando os efeitos predispostos do estresse oxidativo.

### Agradecimentos

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento científico e tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), Universidade Estadual de Minas Gerais (UNIMONTES), Pró Reitoria de Extensão da UFMG (PROEX-UFMG) e Pró Reitoria de Pesquisa da UFMG (PRPq-UFMG).

## Financiamento

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

## REFERÊNCIAS

1. Wang, Y. et al. Extract of *Syzygium aromaticum* suppress eEF1A protein expression and fungal growth. *Journal Of Applied Microbiology*. 2017; 123(1): 80-91. Doi: 10.1111/jam.13478.
2. Darvishi E. *et al.* The Antifungal Eugenol Perturbs Dual Aromatic and Branched-Chain Amino Acid Permeases in the Cytoplasmic Membrane of Yeast. *PLoS ONE*. 2013; 8(10): e76028. Doi: 10.1371/journal.pone.0076028.
3. Kamatou, G. P .; Vermaak, I.; Viljoen, A. M. Eugenol - das remotas Ilhas Molucas ao mercado internacional: uma revisão de uma molécula notável e versátil. *Moléculas*. 2012; 17(6): 6953-6981.
4. Affonso, R. S. et al. Chemical and Biological Aspects of the Essential Oil of Indian Cloves. *Revista Virtual de Química*. 2012; 4(2): 146-161. Doi: 10.5935/1984-6835.20120012.
5. Nerio, L. S.; Olivero-Verbel, J.; Stashenko, E.. Repellent activity of essential oils: A review. *Bioresource Technology*. 2010; 101 (1): 372- 378. Doi: 10.1016/j.biortech.2009.07.048.
6. Sichieri, A.P.M.P. Potencial antioxidante de extratos de especiarias em sistemas modelo e na estabilidade oxidativa do óleo de soja. 2013. Tese (Doutorado – Ciências e Tecnologias de Alimentos) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba. 126p
7. Alam, M.D. N.; Bristi, N. J.; Rafiqzaman, M.d.. Review on *in vivo* and *in vitro* methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharmaceutical Journal*. 2013; 21 (2): 143-152. Doi: 10.1016/j.jsps.2012.05.002.
8. Oliveira, G. L. S. Determinação da capacidade antioxidante de produtos naturais *in vitro* pelo método do DPPH•: estudo de revisão. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*. 2015; 17(1): 36-44. Disponível em: <goo.gl/St5uD2>. Acesso em: 25 dez. 2018.
9. Rosés, R. P.. Evaluación de la actividad inmunomoduladora de biomoléculas de origen vegetal. 2015. 196 f. Tese (Doutorado) - Curso de Farmacia, Facultat de Farmàcia Departament de Farmacologia I Química Terapèutica Unitat de Farmacologia I Farmacognòsia

Programa de Doctorat: Recerca, Desenvolupament I Control de Medicaments, Barcelona, 2015. Disponível em: <[http://diposit.ub.edu/dspace/bitstream/2445/66386/1/RPR\\_TESIS.pdf](http://diposit.ub.edu/dspace/bitstream/2445/66386/1/RPR_TESIS.pdf)>. Acesso em: 20 dez. 2018.

10. Andriantsitohaina, R. et al. Systems biology of antioxidants. *Clinical Science*. 2012; 123(3): 173-192. Doi: 10.1042/cs20110643.

11. Lay SL, Simard G, Martinez MC, Andriantsitohaina R. Oxidative Stress and Metabolic Pathologies: From an Adipocentric Point of View. *Oxidative Medicine And Cellular Longevity*. 2014; 2014: 1-18. doi: 10.1155/2014/908539.

12. Pérez-Jiménez, J. et al. Identificação das 100 fontes alimentares mais ricas em polifenóis: uma aplicação da base de dados Fenol-Explorer. *Revista europeia de nutrição clínica*. 2010; 64(S3): S112.

13. Dudonné, S. et al. Comparative Study of Antioxidant Properties and Total Phenolic Content of 30 Plant Extracts of Industrial Interest Using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC Assays. *Journal Of Agricultural And Food Chemistry*. 2009; 57(5): 1768-1774. Doi: 10.1021/jf803011r.

14. Gülçin, İ., Elmastaş, M.; Aboul-Enein, H. Y. Antioxidant activity of clove oil – A powerful antioxidant source. *Arabian Journal Of Chemistry*. 2014; 5(4), 489-499. Doi: 10.1016/j.arabjc.2010.09.016.

15. Cortés-Rojas DF, Souza CRF, Oliveira WP. Clove (*Syzygium aromaticum*): a precious spice. *Asian Pacific Journal Of Tropical Biomedicine*. 2014; 4(2): 90-96. doi:10.1016/S2221-1691(14)60215-X.

16. Rebhan M, Chalifa-Caspi V, Prilusky J, Lancet D, Gene Cards: integrating information about genes, proteins and diseases. *Trends in Genetics* 1997;13(4):163.

17. Szklarczyk D, Franceschini A, Kuhn M, Simonovic M, Roth A, Minguéz P, Doerks T, Stark M, Muller J, Bork P et al: The STRING database in 2011: functional interaction networks of proteins, globally integrated and scored. *Nucleic acids research* 2011, 39(Database issue):D561-568.22.

18. Szklarczyk D, Franceschini A, Wyder S, Forslund K, Heller D, Huerta Cepas J, Simonovic M, Roth A, Santos A, Tsafou KP et al: STRING v10: protein-protein interaction networks, integrated over the tree of life. *Nucleic acids research* 2015, 43(Database issue):D447-452.23.



19. Giacomelli, L.; NICOLINI, C.. Gene expression of human T lymphocytes cell cycle: Experimental and bioinformatic analysis. *Journal Of Cellular Biochemistry*. 2006; 99(5): 1326-1333. Doi: 10.1002/jcb.20991.
20. Covani, U. et al. Bioinformatic Prediction of Leader Genes in Human Periodontitis. *Journal Of Periodontology*. 2008; 79(10): 1974-1983. Doi: 10.1902/jop.2008.080062.
21. Orlando, B.; Bragazzi, N.; Nicolini, C.. Bioinformatics and systems biology analysis of genes network involved in OLP (Oral Lichen Planus) pathogenesis. *Archives Of Oral Biology*. 2013; 58(6): 664-673. Doi: 10.1016/j.archoralbio.2012.12.002.
22. Santos, E.M., Santos, H.O., Dos Santos Dias, I., Santos, S.H., Batista de Paula, A.M., Feltenberger, J.D., Sena Guimaraes, A.L., Farias, L.C.,. Bioinformatics Analysis Reveals Genes Involved in the Pathogenesis of Ameloblastoma and Keratocystic Odontogenic Tumor. *International journal of molecular and cellular medicine*. 2016; 5, 199- 219.
23. Bezerra, D. et al. The Dual Antioxidant/Prooxidant Effect of Eugenol and Its Action in Cancer Development and Treatment. *Nutrients*, 2017; 9(12): 1-15. Doi: 10.3390/nu9121367.
24. Gorrini, C; Harris, IS; Mak, TW Modulação do estresse oxidativo como estratégia antineoplásica. *Nat. Rev. Drug Discov*. 2013; 12: 931-947.
25. Gülçin, İ., Elmastaş, M.; Aboul-Enein, H. Y. Antioxidant activity of clove oil – A powerful antioxidant source. *Arabian Journal Of Chemistry*. 2012; 5(4): 489-499. Doi: 10.1016/j.arabjc.2010.09.016.
26. Engelman, J. A.; Luo, Ji; Cantley, Lewis C.. The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. *Nature Reviews Genetics*. 2006; 7(8): 606-619. Doi: 10.1038/nrg1879.
27. Thorpe, L. M.; Yuzugullu, H.; Zhao, J. J.. PI3K in cancer: divergent roles of isoforms, modes of activation and therapeutic targeting. *Nature Reviews Cancer*. 2015; 15(1): 7-24. Doi: 10.1038/nrc3860.
28. Zhou, D.; Shao, L.; Spitz, Douglas R.. Reactive Oxygen Species in Normal and Tumor Stem Cells. *Advances In Cancer Research*. 2014; 1-67. Doi: 10.1016/b978-0-12-420117-0.00001-3.
29. Vanhaesebroeck, B. et al. The emerging mechanisms of isoform-specific PI3K signalling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2010; 11(5): 329-341. Doi: 10.1038/nrm2882.

30. Ahmad, F. et al. Critical cysteines in Akt1 regulate its activity and proteasomal degradation: implications for neurodegenerative diseases. *Free Radical Biology And Medicine*. 2014; 74: 118-128. Doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2014.06.004.
31. Manning, B. D.; Cantley, L. C.. AKT/PKB Signaling: Navigating Downstream. *Cell*, 2007; 129(7): 1261-1274. Doi: 10.1016/j.cell.2007.06.009.
32. Manning, Brendan D.; Toker, Alex. AKT/PKB Signaling: Navigating the Network. *Cell*, 2017; 169(3): 381-405. Doi: 10.1016/j.cell.2017.04.001.
33. Brown, Jessica S.; Banerji, Udai. Maximising the potential of AKT inhibitors as anti-cancer treatments. *Pharmacology & Therapeutics*. 2017; 172: 101-115. Doi: 10.1016/j.pharmthera.2016.12.001.
34. Hietakangas, V.; Cohen, S. M.. Regulation of Tissue Growth through Nutrient Sensing. *Annual Review Of Genetics*. 2009; 43(1): 389-410. Doi: 10.1146/annurev-genet-102108-134815.
35. Santabábara-Ruiz, P. et al. Ask1 and Akt act synergistically to promote ROS-dependent regeneration in *Drosophila*. *Plos Genetics*. 2019; 15(1): 1-27. Doi: 10.1371/journal.pgen.1007926.
36. Wang, L. et al. Essential Roles of the PI3 Kinase/Akt Pathway in Regulating Nrf2-Dependent Antioxidant Functions in the RPE. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2008; 49(4):1671-1675. Doi: 10.1167/iovs.07-1099.
37. Dolado, I.; Nebreda, A. R.. AKT and Oxidative Stress Team Up to Kill Cancer Cells. *Cancer Cell*, 2008; 14(6): 427-429. Doi: 10.1016/j.ccr.2008.11.006.
38. Padiya, R. et al. Garlic Attenuates Cardiac Oxidative Stress via Activation of PI3K/AKT/Nrf2-Keap1 Pathway in Fructose-Fed Diabetic Rat. *Plos One*. 2014; 9(5): 94228-94229. Doi: 10.1371/journal.pone.0094228.
39. Fangjun, L.; Zhijia, Y.. Tumor suppressive roles of eugenol in human lung cancer cells. *Thoracic Cancer*. 2017; 9(1): 25-29. Doi: 10.1111/1759-7714.12508.
40. Shimizu T, Tolcher AW, Papadopoulos KP, Beeram M, Rasco DW, Smith LS, Gunn S, Smetzer L, Mays TA, Kaiser B, et al: The clinical effect of the dual-targeting strategy involving

PI3K/AKT/mTOR and RAS/MEK/ERK pathways in patients with advanced cancer. *Clin Cancer Res.* 2012; 18: 2316-2325.

41. Porta C, Paglino C and Mosca A: Targeting PI3K/Akt/mTOR signaling in cancer. *Front Oncol.* 2014; 4: 64.

42. VANI, M. G.; KUMAR, K. J.; LIAO, J. W.; CHIEN, S. C.; MAU, J. L.; CHIANG, S. S.; LIN, C. C.; KUO, Y. H.; WANG, S. Y. Antcin C from *Antrodia cinnamomea* Protects Liver Cells Against Free Radical-Induced Oxidative Stress and Apoptosis In Vitro and In Vivo through Nrf2-Dependent Mechanism. *Evidence-Based Complementary Alternative Medicine.* 2013: 296082. Doi: 10.1155/2013/296082.

43. LIU, X. M.; PEYTON, K. J.; SHEBIB, A. R.; WANG, H.; DURANTE, W. Compound C stimulates heme oxygenase-1 gene expression via the Nrf2-ARE pathway to preserve human endothelial cell survival. *Biochemical Pharmacology.* 2011; 82(4): 371-379. Doi: 10.1016/j.bcp.2011.05.016.

44. Yao, R; Cooper, G.. Requirement for phosphatidylinositol-3 kinase in the prevention of apoptosis by nerve growth factor. *Science.* 1995; 267(5206); 2003-2006. Doi: 10.1126/science.7701324

45. Lawlor, M. A.; Alessi, D. R. PKB/Akt: a key mediator of cell proliferation, survival and insulin responses?. *Journal of cell science.* 2001; 114(16): 2903-2910.

4.2 Artigo 2 – Preservation of fermented dairy beverages with addition of clove (*Syzygium aromaticum*) essential oil

Este artigo foi elaborado conforme as normas da revista *Food Science and Technology*.

1 **Work relevance and importance:** The search for new types of preservatives in the food industry has  
2 been growing and along with it the need for natural foods to meet consumer interest. This article aims  
3 at analyzing and proving by means of analysis the potential of this new product with an excellent  
4 substitutive potential for chemical preservatives and that it meets the need of the industry and the  
5 consumer.

6

7 **Preservation of fermented dairy beverages with addition of clove (*Syzygium aromaticum*)**

8

9 **Page header:** Analysis of fermented dairy beverages with essential oil

10

11

12

## Abstract

13 Objective was to use clove essential oil as a natural preservative in fermented dairy beverage,  
14 analyzing the storage capacity and the physico-chemical parameters compared to the beverage with  
15 the synthetic preservative (potassium sorbate). Two fermented dairy beverage were produced, one  
16 with a synthetic preservative (0,003 g/mL) and the other with the addition of clove essential oil (2 µl/  
17 mL) as a natural preservative. Microbiological, physico-chemical and calorimetric analyzes of the  
18 samples were carried out in the first and second weeks of each beverage production, all analyzes  
19 were performed in triplicates. The microbiological analyzes there was no statistical difference in the  
20 values obtained between the drinks tested. In the analysis of physico-chemical parameters, it was  
21 observed that the values obtained for protein and acidity met the values required by the legislation.  
22 For fat content, the two drinks fell within the quantity provided for in the legislation for partially  
23 skimmed drinks. There was no statistical difference in the values obtained in the calorimetric analyzes  
24 of the samples. It is concluded that clove essential oil is a potential substitute for the synthetic  
25 preservative in the production of the fermented dairy beverage, since it presented conservation  
26 potential and results similar to the beverage with preservative commonly used in industry.

27

28 Keywords: Antimicrobial; Acidity; Fat content; Protein;

29 Practical Application: Production of fermented dairy beverages with addition clove essential oil  
30 (*Syzygium aromaticum*), assessing physico-chemical parameters and conservation.

## 31 1 Introduction

32 In accordance with the legislation of fermented dairy beverages (FDB) with addition is given to  
33 the product that has in its composition milk fermented with synthetic or natural preservative and that  
34 do not go through heat treatment after the fermentation (Brasil, 2005).

35 The food industry uses synthetic additives to improve the properties and characteristics of foods  
36 such as antimicrobials, antioxidants, nutritional additives and for preservation (Carocho et al., 2014).  
37 Potassium sorbate (PS) is well known in the food industry because it is a safe and low toxicity  
38 preservative compared to other synthetic preservatives. However, high consumption of this  
39 preservative can lead to health problems such as diabetes, inflammation and even cancer (Dehghan  
40 et al., 2018).

41 There is a consumer demand for natural foods, that is, without the addition of synthetic chemical  
42 compounds (Caleja et al., 2016). The essential oil (EO) can reduce deterioration and prolong the shelf  
43 life of the food, so that the clove (*Syzygium aromaticum*) is a potential substitute because it is a spice  
44 that has been used for several years to conserve antimicrobial and antioxidant activity (Cortés-rojas et  
45 al., 2014). Among different essential oils, this spice has the label of generally recognized as safe  
46 (GRAS) issued by the Food and Drug Administration (FDA, 2017).

47 The objective of this study was the use of clove essential oil as a natural preservative in  
48 fermented dairy beverage, analyzing the storage capacity, evaluating the physico-chemical,  
49 microbiological and calorimetric parameters compared to the beverage with the synthetic preservative  
50 (potassium sorbate).

## 51 **2 Materials and methods**

### 52 *2.1 Production of fermented dairy beverages*

53 Fermented dairy beverages were produced at the Food Technology Laboratory of the Institute  
54 of Agrarian Sciences, Federal University of Minas Gerais. The FDB were produced every 15 days  
55 totaling four production lots, analyzes were performed in the first week of storage and in the second  
56 week, all tests were performed in triplicate.

57 The production methodology was according to EPAMIG (2010) with adaptations. For the  
58 production, two mixtures were used, the first one consisting of 44.5% UHT (Itambé) milk, 1% modified  
59 starch (Macalé) and 10% crystal sugar (Delta). The ingredients were homogenized and heated in  
60 magnetic stirrer (RH Basic 1-IKA) up to a temperature of 37 °C, measured using a digital thermometer  
61 (Instrutherm). For the second mixture, 44.5% reconstituted whey powder (Nutricom) at 15% of mineral  
62 water (Ingá) was added after the homogenization, and the mixture was added to the first mixture and  
63 subsequently heated to 42 ° C. After reaching the desired temperature, 0.1% of thermophilic DVS  
64 lactic acid culture (Christian Hansen of Brasil®) was added from and the homogenization was carried  
65 out.

66 50 mL of each FDB were transferred to falcon tubes for pH measurement with the aid of bench  
67 pH meter (Tecnozon mPA 210) shortly after the FDB were allocated in BOD (ElectroLab) at 43 ° C.  
68 The pH was measured every hour until reaching the value of 4.6, after obtaining the desired pH the  
69 drinks were placed for the cooling in refrigerator until reaching the temperature of 5 °C, where there  
70 was clot formation and later by means of homogenization was disrupted, so that addition of the  
71 preservatives occurs.

72 For the production of FDB with clove essential oil, it used 2µl / ml of the commercially obtained  
73 Ferquima® oil dose below that established by the World Health Organization (WHO) as acceptable for  
74 human consumption (maximum 2.5 mg / kg) (Gülçin et al., 2012), so that it does not interfere with  
75 health after consumption. For the FDB with the synthetic preservative potassium sorbate (Synth)  
76 0.003 g / mL was used.

77

### 78 *2.2 Microbiological analyzes*

79

80 Microbiological analyzes were performed at the Animal Health Laboratory at the Center for  
81 Research in Agricultural Sciences (CPCA) belonging to the Institute of Agrarian Sciences (ICA) of the  
82 Federal University of Minas Gerais (UFMG). Two analyzes were carried out for beverage production,

83 one in the first week of storage and the other in the second week. In order to comply with current  
84 legislation (Brasil, 2003), lactic acid counts were performed (ISO 7889, 2003), presence of total  
85 coliforms and thermotolerant coliforms (ISO 4831, 2006), absence or presence of *Salmonella* spp.  
86 (ISO 6785, 2001). All analyzes were performed in triplicate.

### 87 *2.3 Physico-chemical and calorimetric analyzes*

88

89 The physico-chemical analyzes were carried out in the Laboratory of Bromatology of the ICA /  
90 UFMG, were carried out in accordance with the Normative Instruction n° 68 of the Ministry of  
91 Agriculture, Livestock, and Supply. The Kjeldahl method was used to analyze the protein content, the  
92 acidity by titratable total acidity (% lactic acid) (Brasil, 2006) and the quantification of fat content was  
93 carried out by the Mojonnier method (AOAC, 1997), at the Laboratory of Technology of Dairy Products  
94 at the Veterinary School of UFMG, Pampulha campus. All analyzes were performed in triplicate.

95 Calorie quantification of each beverage was analyzed using adiabatic calorimetric pump (IKA  
96 C5000®), using methodology described by Souza et al. (2018), obtaining the result of calories amount  
97 per drinks gram.

98

### 99 *2.4 Statistical analysis*

100

101 Analysis of variance (ANOVA) with randomized block design was used for the statistical  
102 analysis at a significance level of 5% ( $p < 0,05$ ) was performed to evaluate the results obtained in  
103 fermented dairy beverages. When there was statistical difference, the Tukey mean test was  
104 performed. The data were tabulated and analyzed in the Rstudio® software.

105

## 106 **3 Results and discussion**

107 In the microbiological analyzes it was observed absence of *Salmonella* spp. and counting of  
108 total and thermotolerant coliforms in all FDB samples, in the different storage weeks and in the four  
109 beverage productions. This result complies with the current legislation, where it aims at the absence of  
110 *Salmonella* spp. and a maximum number of 100 NMP / mL for total coliforms and 10 NMP / mL for  
111 thermotolerant coliforms (Brasil, 2007). The control in relation to these microorganisms is related to  
112 the concern of sanitary surveillance organs such as Agência Nacional de Vigilância Sanitária  
113 (ANVISA), in relation to public health and hygienic sanitary control of marketed products (Brasil,  
114 2001).

115 The same result was found by Andrade et al. (2015) evaluating fermented dairy beverages from  
116 commercial brands and by Saljooghi et al. (2017) who evaluated the microbiological quality of  
117 fermented probiotic drink produced from camel's milk. The hygienic sanitary quality from the



118 processing to the storage of the product, and indicate safety because these are pathogenic bacteria  
119 that can cause toxinfection (Andrade et al., 2015).

120 One of the factors that may explain the absence of these microorganisms is that polyphenols  
121 have a strong antioxidant activity, and may remain even when added to foods, contributing to the  
122 reduction of deterioration, oxidation and bacterial contamination (Carocho et al., 2014). Potassium  
123 sorbate has high antimicrobial activity and is therefore a product widely used in foods to prevent the  
124 growth of pathogenic microorganisms (Dehghan et al., 2018).

125 The results obtained from the dairy drinks with clove essential oil allowed to conclude this  
126 exerted preservative activity in the beverage, as well as the synthetic preservative (potassium  
127 sorbate), and inhibited the growth of pathogenic bacteria. Some studies report the antimicrobial  
128 activity of clove EO (Cortés-rojas et al., 2014; Hassan et al., 2014; Tajkarimi et al., 2010). According to  
129 Carocho et al. (2014) are called preservatives products with antioxidant potential, antimicrobial and  
130 that prevents the darkening of food. As antimicrobials are intended to control and / or prevent  
131 contamination by microorganisms and to control food deterioration (Tajkarimi et al., 2010).

132 For the counting of lactic bacteria it was verified that there was no statistical difference ( $p < 0,05$ )  
133 between the beverages with essential oil and the synthetic preservative (potassium sorbate) and there  
134 was no change in the amount of lactic acid bacteria in the storage period (Table 1). According to the  
135 current legislation, the minimum number of viable lactic bacteria counts is  $10^{-6}$  UFC/mL during the  
136 entire shelf life (Brasil, 2005), thus, the beverages produced met the microbiological requirements  
137 required for commercialization. These results demonstrate that the use of clove essential oil did not  
138 inhibit the growth of lactic acid bacteria. In this way it can be affirmed that the natural preservative did  
139 not influence the fermentation stage of the product. According to Cortés-Rojas et al. (2014) the  
140 conservation of these microorganisms in the fermented dairy beverage is related to the type of  
141 preservation additive that was used. One could say that clove-based natural preservative preserved  
142 FDB by inhibiting the growth of desired pathogenic microorganisms.

143 Lactic acid bacteria contribute to pH reduction, texture improvement, increased digestibility and  
144 preservation, improved sensorial profile, thus promoting a better texture and flavor improvement in the  
145 final product, besides contributing to the conservation of foods and possible health benefits (Niel &  
146 Aslim, 2010; Pescuma et al., 2010).

147 **Table 1.** Microbiological analyzes of the different productions of the fermented dairy beverages added with the clove essential oil and the fermented dairy  
148 beverages added with potassium sorbate when evaluated the first and the second week of conservation.

149 BO - Fermented dairy beverages with the addition of clove essential oil; BSO - Fermented dairy beverages with potassium sorbate.

150 Values expressed by mean and standard deviation

	PRODUCTION		PRODUCTION		PRODUCTION		PRODUCTION	
	01		02		03		04	
	1° week	2° week	1° week	2° week	1° week	2° week	1° week	2° week
BO	2,13 <sup>Aa</sup> ± 0,5	2,20 <sup>Aa</sup> ± 0,3	3,00 <sup>Aa</sup> ± 0,46	1,97 <sup>Aa</sup> ± 0,10	3,17 <sup>Aa</sup> ± 0,29	4,20 <sup>Aa</sup> ± 0,61	3,37 <sup>Aa</sup> ± 1,5	2,67 <sup>Aa</sup> ± 0,99
BSO	2,27 <sup>Aa</sup> ± 0,6	1,99 <sup>Aa</sup> ± 0,08	2,07 <sup>Aa</sup> ± 1,00	1,70 <sup>Aa</sup> ± 0,36	3,46 <sup>Aa</sup> ± 0,45	4,77 <sup>Aa</sup> ± 0,51	3,2 <sup>Aa</sup> ± 2,46	2,60 <sup>Aa</sup> ± 0,53

151 By the Tukey test in the comparison enters the BO and BSO averages followed by the same capital letter in the column do not differ from each other ( $p < 0,05$ ).

152 By the Tukey test in the comparison of average of each drink of each beverage production, averages followed by the same lowercase letter in the line did not  
153 differ among each other ( $p < 0,05$ ).

154 In the physical-chemical evaluations, it was verified that for both protein and acidity there was  
155 no significant difference ( $p < 0,05$ ) when compared to the beverages with the natural preservative and  
156 the synthetic preservative (Table 2). The same result is seen when comparing the two weeks of  
157 storage of the drinks. According to the current legislation, for products to be considered as fermented  
158 dairy drinks, a minimum of 1,7g of protein / 100g of product must be used. The values found in this  
159 study are within the recommended values (Table 2). For acidity it should be between 0.6 and 2.0%  
160 (Brasil, 2005), thus the values obtained in the present study were in compliance with the current  
161 legislation (Table 2). In a study by Imbachí-narváez et al (2018) evaluating the effect of cassava starch  
162 modified as a dairy drink prepared with whey obtained acid values between 0.6 and 0.72% w / v of  
163 lactic acid, thus being lower than that found in the present study, the authors correlated this result with  
164 the amount of solids present in the beverages and in the activity of the lactic bacteria that contribute to  
165 the production of lactic acid. Results similar to the present study were found in the work of Andrade et  
166 al. (2015), evaluating different brands of commercially purchased fermented dairy drinks. De Carli et  
167 al. (2015), evaluating milk drinks added with peppermint essential oil, found similar values of protein to  
168 that of the present study.

169 Low acidity and higher protein levels than those required by legislation in beverages made in  
170 the present study may lead to good acceptability and good nutritional value. The use of whey in the  
171 production of dairy drinks has been gaining space, since it has several functional properties and high  
172 nutritional value with presence of B complex proteins, calcium, minerals, essential amino acids,  
173 among others, and it has a low cost. Another factor attributed to whey is low energy density,  
174 contributing to weight control and having an adequate protein profile with high digestibility proteins  
175 (Baldissera et al., 2011). Acidity adds attributes related to the quality of dairy products, collaborating  
176 for better consumer acceptance (Thamer & Penna, 2006).

177 When the values obtained in the fat content analysis were evaluated, it was verified that there  
178 was no statistical difference between the drinks and the weeks of storage (Table 2). Thus, the  
179 fermented dairy beverage with the addition of clove and the fermented dairy beverage with potassium  
180 sorbate met the current legislation for partially skimmed milk drink with values of 0.6 to 2.9 g / 100g fat  
181 (Brasil, 2007) similar results were found by Andrade et al. (2015). According to Thamer & Penna  
182 (2006) there is a variation in the amount of fat in the production of fermented dairy drinks that can  
183 range from 0.1% to 10% and that commercially available dairy drinks have low fat values. Consumers  
184 are currently looking for foods with lower fat levels (Andrade et al., 2015), and this factor may  
185 contribute to greater consumer acceptability of the product.

186 **Table 2.** Results obtained in the physical-chemical analyzes of the different productions of fermented dairy beverage added with clove essential oil and  
 187 fermented dairy beverage added with potassium sorbate when evaluated the first and second week of storage.

Fermented dairy beverage	Storage week	Production	Protein (g/100g of product)	Acidity (%)	Fat content (g/100g of product)
BO	First week	1 <sup>o</sup>	2,06 <sup>Aa</sup> ± 0,10	0,84 <sup>Aa</sup> ± 0,02	1,48% <sup>Aa</sup> ± 0,0
		2 <sup>o</sup>	2,14 <sup>Aa</sup> ± 0,05	0,81 <sup>Aa</sup> ± 0,06	2,01% <sup>Aa</sup> ± 0,0
		3 <sup>o</sup>	2,24 <sup>Aa</sup> ± 0,05	0,81 <sup>Aa</sup> ± 0,06	1,03% <sup>Aa</sup> ± 0,0
		4 <sup>o</sup>	2,11 <sup>Aa</sup> ± 0,06	0,85 <sup>Aa</sup> ± 0,03	0,93% <sup>Aa</sup> ± 0,0
	Second week	1 <sup>o</sup>	2,27 <sup>Aa</sup> ± 0,02	0,88 <sup>Aa</sup> ± 0,03	1,40% <sup>Aa</sup> ± 0,0
		2 <sup>o</sup>	2,11 <sup>Aa</sup> ± 0,11	0,76 <sup>Aa</sup> ± 0,02	2,16% <sup>Aa</sup> ± 0,0
		3 <sup>o</sup>	2,21 <sup>Aa</sup> ± 0,12	0,82 <sup>Aa</sup> ± 0,04	1,23% <sup>Aa</sup> ± 0,0
		4 <sup>o</sup>	2,10 <sup>Aa</sup> ± 0,02	0,83 <sup>Aa</sup> ± 0,01	1,06% <sup>Aa</sup> ± 0,0
BSO	First week	1 <sup>o</sup>	2,14 <sup>Aa</sup> ± 0,06	0,83 <sup>Aa</sup> ± 0,01	1,40 <sup>Aa</sup> ± 0,0
		2 <sup>o</sup>	2,11 <sup>Aa</sup> ± 0,15	0,80 <sup>Aa</sup> ± 0,04	2,12% <sup>Aa</sup> ± 0,0
		3 <sup>o</sup>	2,29 <sup>Aa</sup> ± 0,04	0,80 <sup>Aa</sup> ± 0,04	1,05% <sup>Aa</sup> ± 0,0
		4 <sup>o</sup>	2,10 <sup>Aa</sup> ± 0,16	0,85 <sup>Aa</sup> ± 0,01	0,90% <sup>Aa</sup> ± 0,0
	Second week	1 <sup>o</sup>	2,10 <sup>Aa</sup> ± 0,02	0,82 <sup>Aa</sup> ± 0,06	1,41% <sup>Aa</sup> ± 0,0
		2 <sup>o</sup>	2,13 <sup>Aa</sup> ± 0,15	0,75 <sup>Aa</sup> ± 0,0	2,20% <sup>Aa</sup> ± 0,0
		3 <sup>o</sup>	2,36 <sup>Aa</sup> ± 0,32	0,80 <sup>Aa</sup> ± 0,04	1,16% <sup>Aa</sup> ± 0,0
		4 <sup>o</sup>	2,22 <sup>Aa</sup> ± 0,08	0,84 <sup>Aa</sup> ± 0,02	0,84% <sup>Aa</sup> ± 0,0

188 BO - Fermented dairy drink with the addition of clove essential oil; BSO - Fermented dairy drink with potassium sorbate.

189 Recommended values in the legislation: protein - 1.7g of protein / 100g of product; acidity - 0.6 to 2.0%; - semi-skimmed milk drink with values from 0,6 to 2,9  
 190 g / 100g fat content.

191 Values expressed by mean and standard deviation

192 By the Tukey test in the comparison enters the BO and BSO averages followed by the same capital letter in the column do not differ from each other (p  
 193 <0.05).

194 By the Tukey test in the comparison of average of each drink of each beverage production, averages followed by the same lowercase letter in the line did not  
 195 differ among each other (p <0.05).

196 When the calorimetry of the formulated beverages was evaluated, it was observed that  
 197 there was no significant difference ( $p < 0.05$ ) in the different productions of each beverage  
 198 (Table 3), the evaluation by total solids is of great importance to quantify the calories in the  
 199 beverage food. According to Grandi & Rossi (2010) in FDB there may be variations in the  
 200 amount of energy available and this factor may be associated with the amount of serum used or  
 201 other components, thus, the use of clove essential oil does not interfered in the amount of FDB  
 202 calories.

203 **Table 3.** Results obtained in the calorimetric analyzes of the different productions of the  
 204 fermented dairy beverages added with the clove essential oil and the fermented dairy  
 205 beverages added with potassium sorbate.

Productions of fermented dairy beverages	Values in Kcal/mL	
	B.O	BSO
Productions 1	0.74 <sup>Aa</sup>	0.72 <sup>Aa</sup>
Productions 2	0.72 <sup>Aa</sup>	0.69 <sup>Aa</sup>
Productions 3	0.73 <sup>Aa</sup>	0.71 <sup>Aa</sup>
Productions 4	0.70 <sup>Aa</sup>	0.68 <sup>Aa</sup>

206 BO - Fermented dairy beverages with the addition of clove essential oil; BSO - Fermented dairy  
 207 beverages with potassium sorbate.

208 Values expressed by mean and standard deviation

209 By means of the Tukey test in the comparison of average of each drink of each beverage  
 210 production, averages followed by the same capital letter in the column do not differ from each  
 211 other and averages followed by the same lowercase letter in the row do not differ from each  
 212 other ( $p < 0.05$ ).

213

214 In spite of the similar conservation, physicochemical and calorimetric results found  
 215 between the clove essential oil fermented milk beverage and the potassium sorbate drink, it is  
 216 found that there is functional potential in the oil drink. Functional foods are those that provide  
 217 nutritional sources and health benefits through mechanisms not provided in conventional  
 218 nutrition, thus becoming a food allied to health. In the dairy industry there is a high demand for  
 219 this type of product and prebiotics are widely used to obtain them (BECKER, 2009; SANTOS et  
 220 al., 2011). Thus, the use of a natural preservative with functional potential may be the solution  
 221 to reduce the use of synthetic preservatives and meet the industry demand.

222

223

## 224 4 Conclusion

225 The fermented dairy beverage with the addition of clove essential oil presented similar  
226 results in the microbiological, physicochemical and calorimetric analyzes of the results found in  
227 the dairy beverage with synthetic preservative (potassium sorbate), which is then a potential  
228 substitute for the preservative synthetic. In addition, the use of clove essential oil as a natural  
229 preservative may add value to the fermented dairy beverage by having desired biological  
230 activities and may bring to the market a new functional product. In vivo studies are required to  
231 verify the action of this beverage with clove essential oil in the organism.

232

## 233 Acknowledgements

234

235 We thanks the CAPES, FAPEMIG, CNPq, Pró Reitoria de Pesquisa da UFMG e Pró Reitoria  
236 de Extensão da UFMG.

237

## 238 References

239 Andrade, E.H.P.; Silva, N.M.A.; Resende, M.F.S.; Souza, M.R; Fonseca, L.M.; Cerqueira,  
240 M.M.O.P.; Penna, C.F.A.M.; Leite, M.O. (2015). Microbiological and physical-chemical  
241 characteristics of fermented milk beverages. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e*  
242 *Zootecnia*, 67(6), 1735-1742. <http://dx.doi.org/10.1590/1678-4162-8066>.

243 Baldissera, A.C.; Betta, F.D.; Penna, A.L.B.; Lindner, J.D. (2011). Functional Foods: a new  
244 frontier for developing whey based protein beverages. *Semina: Ciências Agrárias*, 32(4), 1497-  
245 1526. <http://dx.doi.org/10.5433/1679-0359.2011v32n4p1497>.

246 Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. (2005, August 23). Instrução  
247 Normativa nº 16, de 23 de agosto de 2005. Regulamento técnico de identidade e qualidade de  
248 bebida láctea. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*. Retrieved from:  
249 <http://www.cda.sp.gov.br/www/legislacoes/popup.php?action=view& idleg=702>.

250 Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. (2003, August 26). Oficializa os  
251 Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem  
252 Animal e Água (Instrução normativa nº 62, de 26 de agosto de 2003). *Diário Oficial [da]*  
253 *República Federativa do Brasil*. Retrieved from: <http://www.hidrolabor.com.br/IN62.pdf>.

254 Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. (2007, October 21). Regulamento  
255 Técnico de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados (Instrução Normativa nº 46 de  
256 23/10/2007). *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*. Retrieved from:  
257 [http://www.posalim.ufpr.br/ArqDisponiv/leitesfermentados\\_2009.pdf](http://www.posalim.ufpr.br/ArqDisponiv/leitesfermentados_2009.pdf).

258 Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. (2006, December 14). Oficializa os  
259 Métodos Analíticos Oficiais Físico-Químicos, para Controle de Leite e Produtos Lácteos

260 determinando que sejam utilizados nos Laboratórios Nacionais Agropecuários (Instrução  
261 Normativa nº 68, de 12 de dezembro de 2006). *Diário Oficial [da] República Federativa do*  
262 *Brasil*. Retrieved from <https://www.legisweb.com.br/legislacao/?id=76819>.

263 Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. (2001, January 10). Aprova o  
264 Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos (Resolução RDC nº 12, de  
265 02 de instrução normativa nº 16, de 23 de agosto de 2005). *Diário Oficial [da] República*  
266 *Federativa do Brasil*. Retrieved from [http://portal.](http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/a47bab8047458b909541d53fbc4c6735/RDC_12_2001.pdf?MOD=AJPERES)  
267 [anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/a47bab8047458b909541d53fbc4](http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/a47bab8047458b909541d53fbc4c6735/RDC_12_2001.pdf?MOD=AJPERES)  
268 [c6735/R](http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/a47bab8047458b909541d53fbc4c6735/RDC_12_2001.pdf?MOD=AJPERES)  
[DC\\_12\\_2001.pdf?MOD=AJPERES](http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/a47bab8047458b909541d53fbc4c6735/RDC_12_2001.pdf?MOD=AJPERES)

269 Caleja, C., Barros, L., Antonio, A. L., Carocho, M., Oliveira, M. B. P., & Ferreira, I. C. (2016).  
270 Fortification of yogurts with different antioxidant preservatives: A comparative study between  
271 natural and synthetic additives. *Food Chemistry*, 210, 262-268.  
272 <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.04.114>.

273 Carocho, M., Barreiro, MF, Morales, P., & Ferreira, I.C (2014). Adding Molecules to Food, Pros  
274 and Cons: A Review on Synthetic and Natural Food Additives. *Comprehensive Reviews In Food*  
275 *Science And Food Safety*, 13(4), 377-399. <http://dx.doi.org/10.1111/1541-4337.12065>.

276 Cortés-Rojas, D. F., de Souza, C. R. F., & Oliveira, W. P. (2014). Clove (*Syzygium*  
277 *aromaticum*): a precious spice. *Asian Pacific Journal Of Tropical Biomedicine*, 4(2), 90-96.  
278 [http://dx.doi.org/10.1016/s2221-1691\(14\)60215-x](http://dx.doi.org/10.1016/s2221-1691(14)60215-x)

279 De Carli, E. M., Zoz, M., & Bállico, B. (2015). Elaboração de bebida láctea de chocolate com  
280 menta. *Unoesc & ciência-ACET*, p. 45-52. Retrieved from:  
281 <https://portalperiodicos.unoesc.edu.br/acet/article/view/6873>

282 Dehghan, P., Mohammadi, A., Mohammadzadeh-Aghdash, H., e Dolatabadi, JEN (2018).  
283 Pharmacokinetic and toxicological aspects of potassium sorbate food additive and its  
284 constituents. *Trends In Food Science & Technology*, 80, 123-130.  
285 <http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2018.07.012>.

286 Empresa de pesquisa agropecuária de minas gerais (EPAMIG) (2010). Tecnologia de  
287 fabricação de bebida láctea fermentada e não fermentada. 1(1):1-20. Retrieved from:  
288 [http://www.epamig.br/download/cartilha-tecnologia-de-fabricacao-de-bebida-lactea-fermentada-](http://www.epamig.br/download/cartilha-tecnologia-de-fabricacao-de-bebida-lactea-fermentada-e-nao-fermentada/)  
289 [e-nao-fermentada/](http://www.epamig.br/download/cartilha-tecnologia-de-fabricacao-de-bebida-lactea-fermentada-e-nao-fermentada/)

290 Food and Drug Administration FDA (2017). U.S Department of Health & Human Service. Code  
291 of Federal Regulations: Title 21- food and drugs. Chapter - I food and drug administration.  
292 Department of health and human services. Subchapter B - food for human consumption  
293 (continued). Part 184 - direct food substances affirmed as generally recognized as safe. USA:  
294 FDA.

295 Grandi, A Z D; A Rossi, D. (2010). Avaliação dos itens obrigatórios na rotulagem nutricional de  
296 produtos lácteos fermentados. *Revista do Instituto Adolfo Lutz (Impresso)*, 69(1), 62-68.  
297 Retrieved from: [goo.gl/dThPSE](http://goo.gl/dThPSE).

- 298 Gülçin, İ., Elmastaş, M.; Aboul-Enein, H. Y. (2012). Antioxidant activity of clove oil – A powerful  
299 antioxidant source. *Arabian Journal Of Chemistry*, 5(4), 489-499.  
300 <http://dx.doi.org/10.1016/j.arabjc.2010.09.016>.
- 301 HASSAN, A. H.; IBRAHIM, S. A. & RAGHAD, H. A. (2014). Antibacterial activities of *Cinnamon*  
302 *zelanicumand*, *Syzygium aromaticum* essential oil. *International Journal of Pharmacy and*  
303 *Pharmaceutical Sciences*, 6(5), 0975-1491.
- 304 Imbachí-Narváez, P. C., Sepúlveda-Valencia, J. U., & Rodriguez-Sandoval, E. (2018). Effect of  
305 modified cassava starch on the rheological and quality properties of a dairy beverage prepared  
306 with sweet whey. *Food Science and Technology*, 39(1), 134-142. [http://dx.doi.org/10.1590 /](http://dx.doi.org/10.1590/1678-457x.28017)  
307 [1678-457x.28017](http://dx.doi.org/10.1590/1678-457x.28017).
- 308 ISO 4831. (2006). Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the  
309 detection and enumeration of coliforms — Most probable number technique. International  
310 Standard Organization, Geneva, Switzerland, 2006. Retrieved from:  
311 [https://law.resource.org/pub/eac/ibr/ eas.217.4.2008.pdf](https://law.resource.org/pub/eac/ibr/eas.217.4.2008.pdf).
- 312 ISO 6785. (2001). Milk and milk products — Detection of *Salmonella* spp. International  
313 Standard Organization, Geneva, Switzerland, 2001. Retrieved from:  
314 <https://shop.standards.ie/nsai/Details.aspx?ProductID=335783>.
- 315 ISO 7889. (2003). Yogurt - Enumeration of characteristics microorganisms - Colony count  
316 technique at 37 °C. International Standard Organization, Geneva, Switzerland, 2003. Retrieved  
317 from: <https://www.evs.ee/products/iso-7889-2003>.
- 318 AOAC- Association of official analytical chemists. (1997). Official methods of analysis (16. ed.),  
319 3ª revisão, v. 2. *Food Composition; Additives; Natural Contaminants*, Seção 33. Washington:  
320 AOAC.
- 321 Pescuma, M.; Hebert, E.M.; Mozzi, F.; Valdez, G.F. (2010). Functional fermented whey-based  
322 beverage using lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 141(1-2), 73-81.  
323 <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.04.011>.
- 324 Saljooghi, S., Mansouri-Najand, L., Ebrahimnejad, H., Doostan, F., & Askari, N. (2017).  
325 Microbiological, biochemical and organoleptic properties of fermented-probiotic drink produced  
326 from camel milk. *Veterinary Research Forum*, 8(4), 313-317. Retrieved from:  
327 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5756251>.
- 328 Souza, K. S. S., Oliveira, S. P., Duarte, S. M., Brandi, I. V., Santos, S. H. S. S., Santos, E. M. S.  
329 S., Farias, P. K. S., Santos, H. O., Almeida, A. C. (2018). Standardization of the methodology  
330 for calorimetric analysis of a fermented milk drink. *Caderno De Ciências Agrárias- Agrarian*  
331 *Sciences Journal*, 10(2), 61-63. Retrieved from:  
332 <https://periodicos.ufmg.br/index.php/ccaufmg/article/view/3038/1850>.
- 333 Tajkarimi, M. M., Ibrahim, S. A., & Cliver, D. O. (2010). Antimicrobial herb and spice  
334 compounds in food. *Food Control*, 21(9), 1199-1218.  
335 <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2010.02.003>.



336 Thamer, K. G & Penna, A. L. B. (2006). Caracterização de bebidas lácteas funcionais  
337 fermentadas por probióticos e acrescidas de prebiótico. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*,  
338 26(3), 589-595. Retrieved from: <http://www.scielo.br/pdf/cta/v26n3/31761>

4.3 Artigo 3 - Avaliação da atividade antioxidante de bebida láctea fermentada com adição de óleo essencial de cravo-da-índia *in vitro* e *in vivo*

Este artigo foi elaborado conforme as normas da revista *Plos one*.

1 **Avaliação da atividade antioxidante de bebida láctea fermentada com adição de óleo**  
2 **essencial de cravo-da-índia *in vitro* e *in vivo***

3  
4 **Evaluation of the antioxidant activity of fermented dairy beverages with addition of clove**  
5 **essential oil *in vitro* and *in vivo***

6  
7  
8 **Resumo**

9 Objetivou avaliar a atividade antioxidante da bebida láctea fermentada com adição de óleo  
10 essencial de cravo-da-índia (BO) *in vitro* e *in vivo*. Foram realizadas análises de sequestro de  
11 radicais livres pelo método do DPPH, concentração efetiva mínima (CE<sub>50</sub>), avaliou a  
12 composição do óleo por cromatografia gasosa e identificou os compostos por análise de  
13 *headspace*. Para análises *in vivo* utilizou-se 24 camundongos machos da linhagem *swiss*,  
14 divididos em três grupos experimentais. Realizou análise histopatológica do tecido adiposo  
15 visceral, avaliou e quantificou as enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase  
16 (CAT) e Glutathione Peroxidase (GP<sub>x</sub>). A BO obteve melhores resultados da porcentagem de  
17 sequestro de radicais livres pelo método do DPPH em relação à bebida láctea com o  
18 conservante sintético (BSO) e a bebida sem conservantes (BP), esse potencial foi comprovado  
19 na análise de CE<sub>50</sub> em que a BO necessitou de menor concentração para reduzir a 50% o  
20 radical DPPH, do que o hidroxitolueno butilado (BHT). Foi detectado o eugenol (79,4%) como  
21 componente majoritário do óleo essencial (OE), sendo componente identificado na análise de  
22 *headspace* tanto no OE quanto na BO. No histopatológico não foram identificadas alterações  
23 ou sinais de inflamações. A área do tecido adiposo foi significativamente inferior ( $p < 0,05$ ) no  
24 grupo alimentado com BO (G3) do que os grupos de animais alimentados com BSO (G2) e o  
25 controle (G1). Na avaliação das enzimas envolvidas na atividade antioxidante verificou que o  
26 grupo G3 apresentou menor quantidade das enzimas avaliadas em relação aos outros grupos  
27 experimentais. Conclui-se que a bebida láctea com o óleo essencial de cravo-da-índia  
28 apresentou atividade antioxidante *in vitro* e *in vivo*.

29  
30 **Palavras-chave:** Estresse oxidativo. Sequestro de radicais livres. Tecido adiposo. *Syzygium*  
31 *aromaticum*. *Swiss*.

32  
33 **Introdução**

34  
35 O óleo essencial (OE) de *Syzygium aromaticum* apresenta diferentes atividades  
36 biológicas comprovadas entre elas a atividade antioxidante e antimicrobiana. Possui a  
37 capacidade de conservar os alimentos, podendo ser um potencial substituto a conservantes  
38 sintéticos [1, 2]

39 Os antioxidantes em alimentos atuam no retardo de alterações oxidativas, fazendo  
40 com que o alimento não deteriore ao contato com o ar [3]. *In vivo* essa ação está relacionada  
41 com o controle dos níveis de Espécies reativas ao oxigênio (EROs) no organismo por meio de  
42 enzimas endógenas sendo estas: superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione  
43 peroxidase (GPx) como as principais envolvidas e exógenas que são aquelas adquiridas por  
44 alimento [4, 5]

45 Alterações envolvendo essas enzimas antioxidante, ou a baixa produção junto ao  
46 aumento da produção de EROs, podem alterar o equilíbrio no organismo e ocasionar o  
47 estresse oxidativo [4]. Sendo esta uma consequência do desequilíbrio entre a produção de  
48 oxidantes e as enzimas antioxidantes, promovendo o aumento de EROs que são consideradas  
49 prejudiciais a saúde e está associada a doenças como câncer, diabetes, aterosclerose, entre  
50 outras [6].

51 O presente estudo objetivou avaliar a atividade antioxidante de bebida láctea  
52 fermentada com adição de cravo-da-índia utilizando métodos *in vitro* e *in vivo*.

53

## 54 **Materiais e métodos**

55

### 56 **Produção das bebidas lácteas fermentadas**

57

58 As bebidas lácteas fermentadas (BLF) foram produzidas no Laboratório de  
59 Tecnologia de Alimentos (Instituto de Ciências Agrárias (ICA) na Universidade Federal de  
60 Minas Gerais (UFMG), atendendo a legislação vigente [7].

61 Para a produção da bebida láctea fermentada com o conservante sintético foi  
62 adicionado 0,003 g / mL de sorbato de potássio e para a bebida láctea fermentada com cravo-  
63 da-índia foi adicionado 2 µl / ml do óleo essencial (OE).

64

### 65 **Caracterização das bebidas lácteas elaboradas**

66

67 Foram realizadas análises microbiológicas de contagem de bactérias lácticas,  
68 presença de coliformes totais e coliformes termotolerantes, ausência ou presença de  
69 *Salmonella sp.* visando atender a legislação [8].

70 Para as avaliações físico-químicas foram realizadas as análises de quantificação  
71 de matéria gorda láctea realizada pelo método de Mojonnier [9], análises de teores de proteína  
72 pelo método *Kjeldahl* e acidez pelo método da acidez total titulável (% ácido láctico), conforme a  
73 Instrução Normativa n. 68 do Ministério da Agricultura e Abastecimento – MAPA [10]. Todas as  
74 análises foram realizadas em triplicata e semanalmente, depois de concluídas foram liberadas  
75 para o consumo dos animais.

76 Para obter a dieta isocalórica dos animais foram realizadas análises calorimétrica,  
77 de acordo com metodologia descrita por Souza *et al.*, (2018) [11], obtendo resultado de calorias  
78 por grama de bebida.

79 As bebidas elaboradas apresentaram-se dentro dos padrões estabelecidos pelas  
80 legislações vigentes, obtendo resultado de 0,70 a 0,74 Kcal/mL para bebida láctea fermentada  
81 com adição de óleo essencial de cravo-da-índia e 0,68 a 0,72 Kcal/mL para bebida láctea  
82 fermentada com sorbato de potássio. A obtenção da composição química do óleo essencial de  
83 cravo-da-índia foi realizada por cromatografia gasosa, em estudo prévio realizado por Farias *et*  
84 *al.* (2019), onde foi encontrado o eugenol (79,4%) como componente majoritário e em menores  
85 proporções o (*E*)-cariofileno, humuleno, Óxido de cariofileno e  $\delta$ -cadineno respectivamente  
86 [12].

87

### 88 **Análise de headspace**

89

90 Para a realização da análise *de headspace* foi utilizado a metodologia de Aguiar *et*  
91 *al.* (2014) [16]. Foi adicionado 1 mL das bebidas em frascos de headspace, posteriormente  
92 estes frascos foram colocados em amostrador automático (HS combi-PAL) para a devida  
93 homogeneização (500 rpm), logo após os mesmos foram incubados a 75°C por cinco minutos,  
94 onde as substâncias voláteis foram extraídas por *headspace* estático. Para o aquecimento da  
95 seringa foi utilizada a temperatura de 75°C e o volume de injeção de 1000  $\mu$ L

96 A identificação das substâncias voláteis ocorreu por meio do Agilent Technologies  
97 (7890A) acoplado ao espectrômetro de massas (MS 5975C), foi utilizada temperatura de foi de  
98 60 °C a 240 °C, com um incremento de 3 °C $\cdot$ min<sup>-1</sup>. Todo o procedimento foi operado no modo  
99 scan (monitoramento) com impacto eletrônico a 70 eV, em uma faixa de 45 a 550 (m/z).

100 Os dados obtidos foram analisados pelo software MSD Chemstation e com a biblioteca  
101 da *National Institute of Standards and Technology* [17].

102

### 103 **Otimização do método de análise da antioxidante com DPPH para bebida láctea** 104 **fermentada**

105

106 As análises de atividade antioxidante foram realizadas utilizando o método de  
107 sequestro de radicais livres DPPH (2,2-difenil-1-picrihidrazil, Sigma-Aldrich), em metodologia  
108 adaptada de Najgebauer-Lejko *et al.* (2011) [13]. Para as análises foram utilizadas três tipos de  
109 BLF (com óleo essencial de cravo-da-índia (BO), sorbato de potássio (BSO) e sem  
110 conservantes (BP).

111 As bebidas foram diluídas em metanol na proporção de 1:0,5 posteriormente  
112 alíquotas de 0,1 mL desta diluição foram transferidos para tubos cônicos transparentes de  
113 propileno devidamente identificados. Logo após, foram adicionados 3,9 mL do reagente DPPH  
114 e colocados em sala escura por 30 minutos. Após este período as amostras foram

115 centrifugadas (Centribio) a 4000 rpm por 10 minutos. O consumo de sequestro do radical  
 116 DPPH foi mensurado por meio do sobrenadante utilizando espectrofotômetro (Micronal B-582),  
 117 com comprimento de onda de 515 nm. Soluções contendo 3,9mL de DPPH (0,277g/mL) e 100  
 118 µl de metanol foram utilizados como controle negativo. Utilizou-se o metanol como branco.  
 119 Para a porcentagem de sequestro de radicais livres (SRL), foi utilizada a seguinte equação de  
 120 [14].

121

$$122 \quad \%SRL = ((\text{Abs. controle negativo} - \text{Abs. da mistura reacionária}) / \text{Abs. controle negativo}) \times 100$$

123

124 Onde:

125 SRL: sequestro de radicais livres.

126 Abs. controle negativo: absorvância da solução de DPPH

127 Abs. da mistura reacionária: absorvância da reação DPPH com 0,1mL das amostras

128

129 Para determinar os valores de  $CE_{50}$ , que consiste na concentração mínima  
 130 necessária para que a BLF reduza a 50% o radical DPPH. Para formular a curva de redução  
 131 foram escolhidas as concentrações de 0,05, 0,25, 0,5, 0,75, 1,0 e 1,25 µL/mL de BO. Foi  
 132 utilizado o hidroxitolueno butilado (BHT) como controle positivo, utilizado nas concentrações de  
 133 0,000125, 0,00025, 0,0005, 0,001 e 0,002 g/mL. Para verificar o potencial antioxidante das  
 134 amostras foi utilizada a fórmula proposta por [15]. Que classifica como: baixa atividade  
 135 antioxidante ( $AAI < 0,5$ ), moderada ( $0,5 < AAI < 1,0$ ), forte ( $1,0 < AAI < 2,0$ ) e muito forte ( $AAI >$   
 136  $2,0$ )

137

$$AAI = \frac{CDPPH}{CE_{50}}$$

138

 $CE_{50}$ 

139

140

#### 141 Amostra experimental *in vivo*

142

143 A pesquisa foi aprovada sob o número de protocolo 231/2017 pelo Comitê de  
 144 Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais - CEUA / UFMG e  
 145 por Comitê de Ética em Experimentação e Bem-Estar Animal da Universidade Estadual de  
 146 Montes Claros - Unimontes, sob processo número 149 / 2017.

147

148 Para obter o número de animais por grupo, foi realizado o cálculo:  $n = 1 + [2C * (s$   
 149  $/ d) 2]$ .  $C = (z\alpha + z\beta) 2$ ,  $C$  é dependente dos valores escolhidos para o poder ou a força do teste  
 150 e do nível de significância,  $z\alpha$  em nível de significância a 5%, sendo este igual á 1,96.  $z\beta$ , é o  
 151 poder estatístico do teste, na área da saúde utiliza-se 90%, sendo igual a 1.282 [18, 19].  $C =$   
 152  $(1,96 + 1,282)^2$ .  $C = 10,51$ ,  $s$  é o coeficiente de variação, e  $d$  é a diferença esperada entre os  
 grupos, para obter  $p < 0,05$ . Considerando um desvio máximo de 28%, já que o fígado é o

153 órgão com maior variabilidade biológica e uma diferença esperada entre os grupos de 50%,  
154 substituindo estes valores da fórmula:  $n = 1 + [2 \times 10,51 * (0,28 / 0,50) ^2]$ , o n é igual a 7,59.  
155 Após arredondamento do valor obtido temos um total de oito animais por grupo experimental.

156 Sendo assim, utilizou-se 24 camundongos machos da linhagem Swiss com quatro  
157 semanas de idade. O estudo foi realizado no Biotério do Centro de Experimentação Animal da  
158 Universidade Estadual de Montes Claros – Unimontes.

159 Os animais foram mantidos em gaiolas de policarbonato com tampa de ferro e  
160 divisória para o comedouro e bebedouro, com capacidade máxima para dez animais, todas as  
161 gaiolas foram devidamente identificados por meio de etiquetas e os animais foram identificados  
162 com solução violeta de genciana 1%.

163 Para iniciar o período experimental os animais tiveram um período de adaptação  
164 por sete dias, sendo fornecida a ração comercial labina® contendo 23,3% de proteína, 2,6% de  
165 lipídios, 55,6% de carboidratos e 4,0 kcal / g de energia total e água *ad libitum*.

166

167

#### 168 **Análise da atividade antioxidante *in vivo***

169

170 Após as quatro semanas de vida, os animais foram divididos de forma aleatória  
171 em três grupos após o período de adaptação, utilizando o delineamento inteiramente  
172 casualizado, utilizando o peso como parâmetro de divisão para obter amostras homogêneas  
173 entre os grupos. A divisão ocorreu de acordo com a alimentação oferecida, sendo: grupo  
174 controle (G1), alimentados apenas com a ração, grupo dois (G2) com fornecimento de ração  
175 mais 2 mL de bebida láctea fermentada com conservante sintético (sorbato de potássio) e o  
176 grupo três (G3) que receberam ração e 2mL da bebida láctea fermentada com adição de óleo  
177 essencial de cravo-da-índia.

178 A dieta fornecida foi isocalórica, ou seja, cada grupo recebeu de forma restrita a  
179 ração para que todos os animais do experimento recebessem a mesma quantidade de Kcal por  
180 dia. Sendo assim, as dietas foram ajustadas semanalmente de acordo com o peso médio dos  
181 animais pertencentes a cada grupo. Os animais foram pesados semanalmente.

182 Os animais pertencentes ao grupo G2 receberam 2 mL de BSO e os animais do  
183 grupo G3 receberam 2 mL de BO, por meio de gavagem ofertadas diariamente durante um  
184 período de 30 dias.

185 A iluminação foi controlada por um timer de doze horas escuro/claro, com  
186 temperatura ambiente de 22°C controlado por ar condicionado e exaustores de ar, a umidade  
187 relativa do ar foi ajustada para 45-65%, estas condições ambientais ocorreram durante todo o  
188 período experimental [20, 21]. O manejo higiênico sanitário foi realizado diariamente,  
189 realizando a higienização dos bebedouros, gaiolas e troca das camas a base de maravalha.

190 Os animais foram eutanasiados após período de 12 horas de jejum. O tecido  
 191 adiposo visceral coletado foi dividido e armazenados em tubos *ependorfs* distintos para  
 192 posterior análises de PCR em tempo real (qRT-PCR) e análises histológicas.

193

194

#### 195 **Análise histopatológica do tecido adiposo visceral**

196

197 Para a realização da análise histopatológica do tecido adiposo visceral, o mesmo  
 198 foi imerso em formol a 10%. Posteriormente foi realizada a desidratação do tecido em uma  
 199 série alcoólica crescente (70%, 80%, 90%, absoluto), em seguida as amostras foram colocadas  
 200 em xilol e impregnação em parafina e as lâminas foram coradas com Hematoxilina e Eosina  
 201 [22]. Foram utilizados cinco campos diferentes em cada lâmina contendo 100 adipócitos para  
 202 avaliação e as imagens de cada animal foram capturadas. Foi utilizado o microscópio Olympus  
 203 FSX 100 e o software Image Pro-Plus (Media Cybernetics, EUA). Para calcular a área média de  
 204 adipócitos ( $\mu\text{m}^2$ ) utilizou-se o software Image J (Instituto Nacional de Saúde, Bethesda,  
 205 Maryland, EUA) [23].

206

#### 207 **Avaliação da atividade de enzimas antioxidantes no tecido adiposo visceral**

208 Para a análise da atividade das enzimas antioxidantes foram avaliadas as enzimas  
 209 Catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD). Foram retiradas 100 mg das amostras do  
 210 tecido adiposo visceral separadamente para fazer o homogenato de cada análise.

211 Para determinar a atividade da catalase utilizou-se a metodologia descrita por [24],  
 212 utilizando os tempos de leitura de 0, 20, 40,60 e 90 segundos em um comprimento de onda de  
 213 340 nm. Para a atividade da superóxido dismutase, utilizou-se metodologia semelhante à  
 214 descrita por [25] utilizando os tempos de 0, 1, 2, 3, 4 e 5 minutos para leitura, em um  
 215 comprimento de onda de 420 nm, foi utilizado o espectrofotômetro Amersham bioscience  
 216 ultrospec 1100 pro, os resultados foram expressos como atividade enzimática por mg de  
 217 proteína. Os valores obtidos foram de acordo com a fórmula:

218

219 
$$\text{Enzima antioxidante (U/mg de proteína)} = \frac{\text{Soma dos resultados obtidos } ((\text{Abs final.} - \text{Abs. inicial}) / 2) \times V}{\text{Soma dos resultados obtidos}}$$

220

221 Onde:

222 Abs. final: Resultado da última leitura de absorbância da solução.

223 Abs. inicial: Resultado da primeira leitura de absorbância da solução.

224 V: volume da amostra (mL).

225



226 **Reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa quantitativa em tempo real**  
 227 **(qRT-PCR)**

228

229 A extração de RNA do tecido adiposo visceral foi realizada através da  
 230 homogeneização do tecido em Trizol, conforme especificação do fabricante. A quantificação do  
 231 RNA das amostras e a pureza foram realizadas em NanoDrop (Thermo Scientific®). Após a  
 232 quantificação das amostras, as mesmas foram tratadas com Dnase, e transcritas reversamente  
 233 com *moloney murine leukemia virus reverse* (M-MLV RT) (Ludwig Biotec®) e OligodT.

234 O cDNA obtido foi utilizado para a execução do qRT-PCR. O gliceraldeído-3-  
 235 fosfato desidrogenase (GAPDH) foi utilizado como primer endógeno para normalizar a  
 236 expressão do gene de RNAm. As reações foram feitas utilizando o Master Mix do SYBR Green  
 237 na PlusOne platform (Applied Biosystems™ QuantStudio™ 6 Flex Real-Time PCR System®)  
 238 [26].

239 Os primers utilizados para quantificar as enzimas antioxidantes foram: Superóxido  
 240 dismutase (SOD), Catalase (CAT) e Glutathione Peroxidase (GPx) (Tabela 1). As expressões  
 241 foram mensuradas pelo método de comparação relativa por CT, usando a equação  $2^{-\Delta\Delta CT}$   
 242 [27].

243

244 Tabela 1 - Sequência de primers oligonucleotídicos específicos usados no qRT-PCR.

Genes	Sequência primers	Referências
GAPDH	F: 5' AAGAAGGTGGTGAAGCAGGCATC 3' R: 5' CGAAGGTGGAAGAGTGGGAGTTG 3'	[28]
SOD1	F:5' CATTCCATCATTGGCCGT 3' R: 5' TCAGACCACACAGGGAAT 3'	[29]
CAT	F:5' TGAGAAGCCTAAGAACGCAATTC 3' R: 5' CCCTTCGCAGCCATGTG 3'	[29]
GPx-1	F:5'TTACATTGTTTGAGAAGTGCGA 3' R: 5' CAAAGTTCCAGGCAATGTC 3'	[29]

245

246

247 **Análise estatística**

248

249 Foi utilizado o teste de análise de variância (ANOVA) *one-way*, submetidos a  
 250 testes específicos com confiança estatística de 95% ( $p < 0,05$ ). A significância estatística das  
 251 diferenças nos valores médios entre os grupos de camundongos foi avaliada pelo teste Tukey.  
 252 Os resultados das análises de avaliação da atividade de enzimas antioxidantes no tecido  
 253 adiposo visceral e o diâmetro dos adipócitos foram submetidos ao teste de comparação  
 254 múltipla bonferroni para avaliar a significância estatística das diferenças. Todas as análises  
 255 utilizaram o programa GraphPad Prism (versão 7.0 ©, San Diego, Califórnia, EUA). Para os

256 valores obtidos no CE<sub>50</sub> utilizou-se Microsoft® Office Excel, para a realização da análise de  
257 regressão.

258

259

## 260 **Resultados**

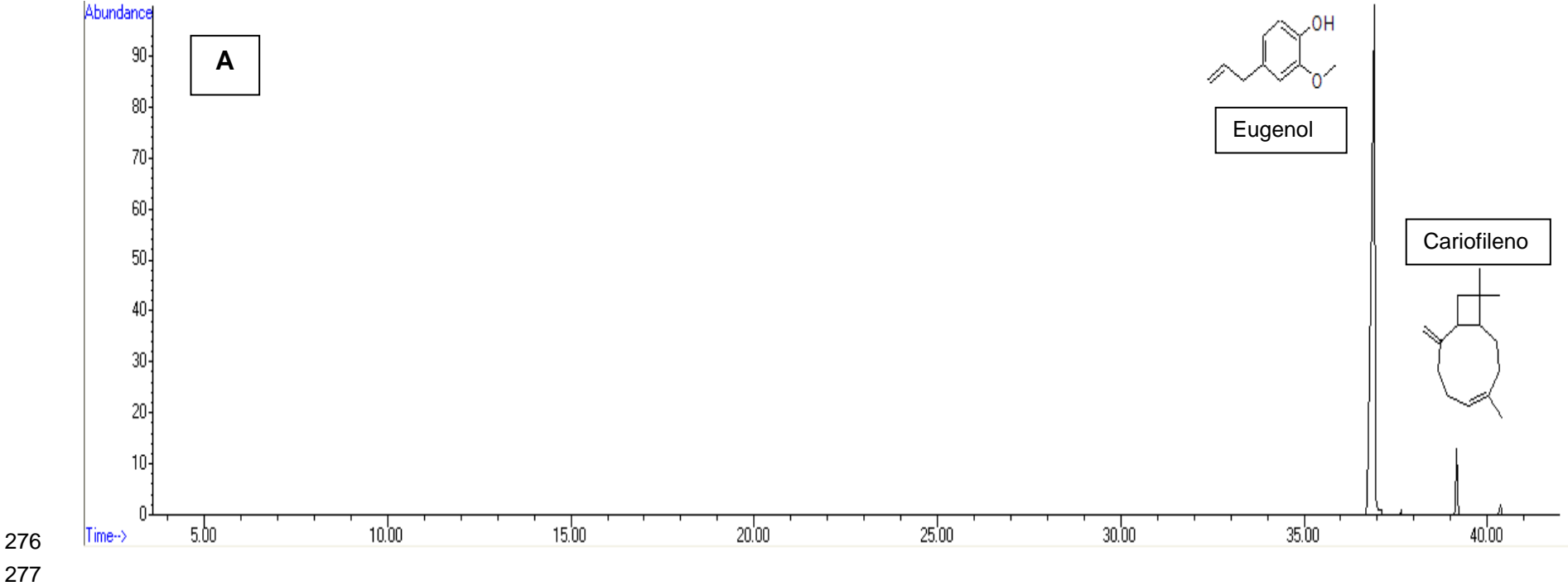
261

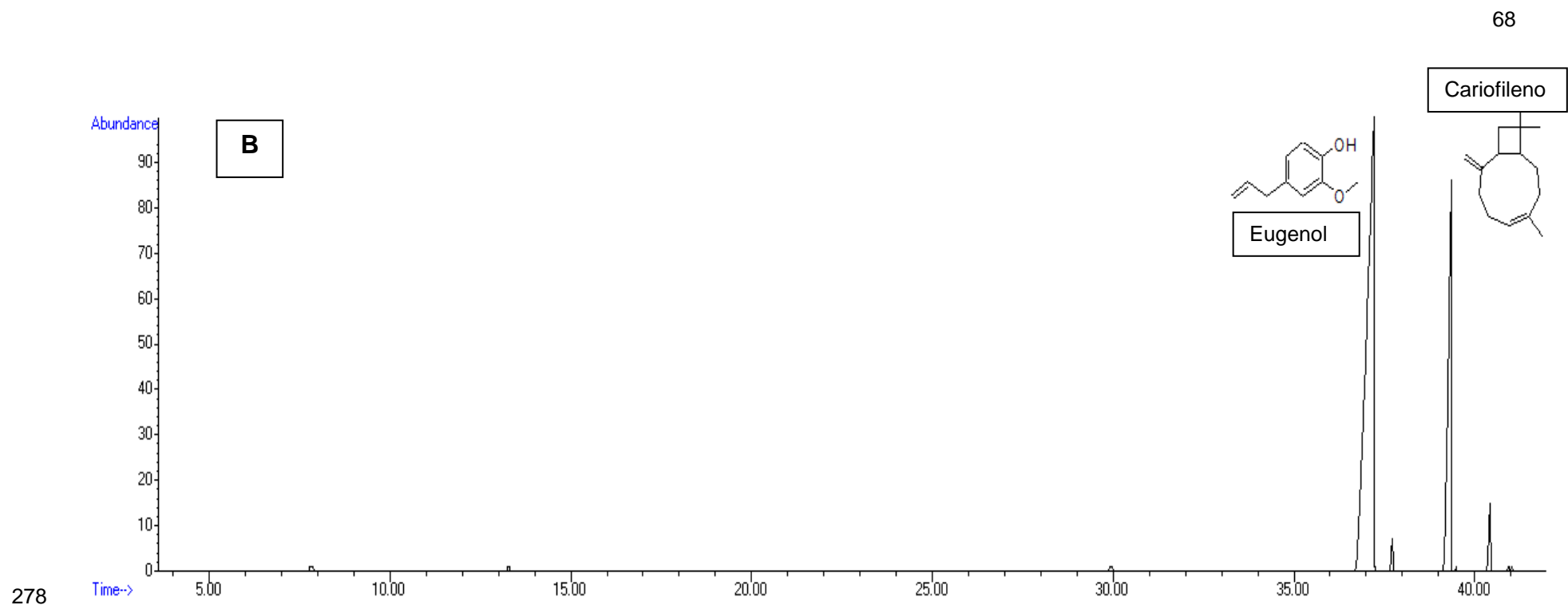
262 A análise da composição química do óleo essencial de cravo-da-índia mostrou que  
263 o componente majoritário é o eugenol (79,4%), e em menores concentrações o (*E*)-Cariofileno,  
264 Humuleno, Óxido de cariofileno e  $\delta$ -Cadineno respectivamente [12].

265 Nas análises de *headspace* não foram detectados e identificados compostos que  
266 poderiam apresentar atividade antioxidante nas amostras de BP e BSO (Fig. 1)

267 As amostras de BO (Fig. 1A) apresentaram resultados semelhantes aos  
268 encontrados no óleo puro (Fig. 1B), sendo que foram identificados os compostos Eugenol,  
269 Cariofileno e  $\alpha$ -humuleno em ambas as amostras. Sendo assim, é possível notar que não  
270 houve alteração da composição do óleo, mesmo após ser adicionada a matriz láctea. Os  
271 resultados obtidos nas análises de *headspace* são semelhantes ao encontrado na análise da  
272 composição química do OE, onde se observa maior pico de abundância do eugenol e a  
273 identificação dos compostos Cariofileno e  $\alpha$ -humuleno nas amostras.

274 **Figura 1. Resultados da análise de *headspace* da bebida láctea fermentada com óleo essencial de cravo-da-índia (A) e do óleo essencial de**  
275 **cravo-da-índia puro (B).**





279 A bebida láctea contendo o OE de cravo-da-india apresentou atividade  
280 antioxidante superior a BSO e BP ( $p < 0,05$ ) com capacidade de sequestro de radicais livres com  
281 valores superiores a 80% (Tabela 2).

282 A atividade antioxidante observada nas bebidas manteve-se inalteradas durante o  
283 período de estocagem por 14 dias ( $p > 0,05$ ).

284 Ao avaliar os resultados obtidos, nota-se que BO, obteve maior porcentagem de  
285 sequestro de radicais livres pelo método do DPPH. Estes resultados indicam maior capacidade  
286 da BO em seqüestrar os radicais livres em relação à BSO e a BP.

287 **Tabela 2. Resultados obtidos nas análises antioxidantes pelo método do DPPH das bebidas lácteas fermentadas.**

288

	PRODUÇÃO 01		PRODUÇÃO 02		PRODUÇÃO 03		PRODUÇÃO 04	
	1° Sem.	2° Sem.	1° Sem.	2° Sem.	1° Sem.	2° Sem.	1° Sem.	2° Sem.
BO	92,0% <sup>Aa</sup> ± 5,11	86,6% <sup>Aa</sup> ± 7,59	93,4% <sup>Aa</sup> ± 4,37	90,3% <sup>Aa</sup> ± 3,87	91,3% <sup>Aa</sup> ± 1,91	82,7% <sup>Aa</sup> ± 3,30	92,2 <sup>Aa</sup> ± 1,1	86,5 <sup>Aa</sup> ± 3,8
BSO	44,8% <sup>Ba</sup> ± 12,09	12,7% <sup>Ab</sup> ± 1,63	37,14% <sup>Ca</sup> ± 13,6	5,72% <sup>Bb</sup> ± 2,02	45,1% <sup>Ca</sup> ± 14,6	5,60% <sup>Bb</sup> ± 4,74	42,3 <sup>Ba</sup> ± 4,5	8,9 <sup>Bb</sup> ± 4,6
BP	42,3% <sup>Ba</sup> ± 1,71	8,75% <sup>Ab</sup> ± 1,31	52,5% <sup>Ba</sup> ± 3,47	4,86% <sup>Bb</sup> ± 0,07	61,1% <sup>Ba</sup> ± 11,38	15,1% <sup>Bb</sup> ± 5,44	52,0 <sup>Ba</sup> ± 9,4	10,4 <sup>Bb</sup> ± 6,0

BO - Bebida láctea fermentada com adição de óleo essencial de cravo da índia; BSO - Bebida láctea fermentada com sorbato de potássio; BP- Bebida láctea fermentada sem conservante.

Valores expressos por bebida láctea fermentada como média e desvio padrão.

Pelo teste Tukey a 5% de significância, médias seguidas por mesma letra maiúscula na mesma coluna na linha não se diferem.

289 Quando avaliado a capacidade da BO em reduzir a 50% o radical DPPH,  
 290 utilizando uma concentração mínima, verificamos que a concentração de 0,25 µL/mL obteve  
 291 valor de 58,64% SRL na amostra (Tabela 3). Em relação ao BHT utilizando a concentração de  
 292 2 µg/mL, sendo esta proporcional a adição do OE na bebida, observou-se que não houve  
 293 sequestro de radicais livres. Além desta concentração foram testadas as concentrações de  
 294 0,02 g de BHT/100 mL de metanol) e 0,0002 g/ mL, que assim como a anterior não obteve  
 295 sequestro de radicais livres. Somente na concentração de 0,002 g/mL que o controle positivo  
 296 BHT apresentou sequestro de radicais livres (Tabela 3).

297

298 **Tabela 3. Resultados da relação entre a concentração dos antioxidantes em estudo com**  
 299 **a porcentagem do sequestro de radicais livres**

Amostras	Concentração	%SRL
BO	1,25 µL/mL	86,98030635
BO	1 µL/mL	80,96280088
BO	0,75 µL/mL	76,80525164
BO	0,5 µL/mL	66,84901532
BO	0,25 µL/mL	58,64332604
BO	0,05 µL/mL	35,2297593
BHT	0,002 g/mL	85,33916849
BHT	0,0005 g/mL	71,5536105
BHT	0,00025 g/mL	57,9868709
BHT	0,000125 g/mL	40,15317287

300 BO: Bebida láctea fermentada com adição de óleo essencial de cravo da Índia; BHT:  
 301 Hidroxitolueno butilado; %SRL: porcentagem de sequestro de radicais livres.

302

303

304 Quando analisado a  $CE_{50}$  obteve-se valores de 0,1831 para BO e 179,0 para BHT  
 305 (Fig. 2). Devido a estes resultados, torna-se inaplicável a fórmula proposta por Scherer &  
 306 Godoy (2009) [15], pois os valores obtidos foram discrepantes.

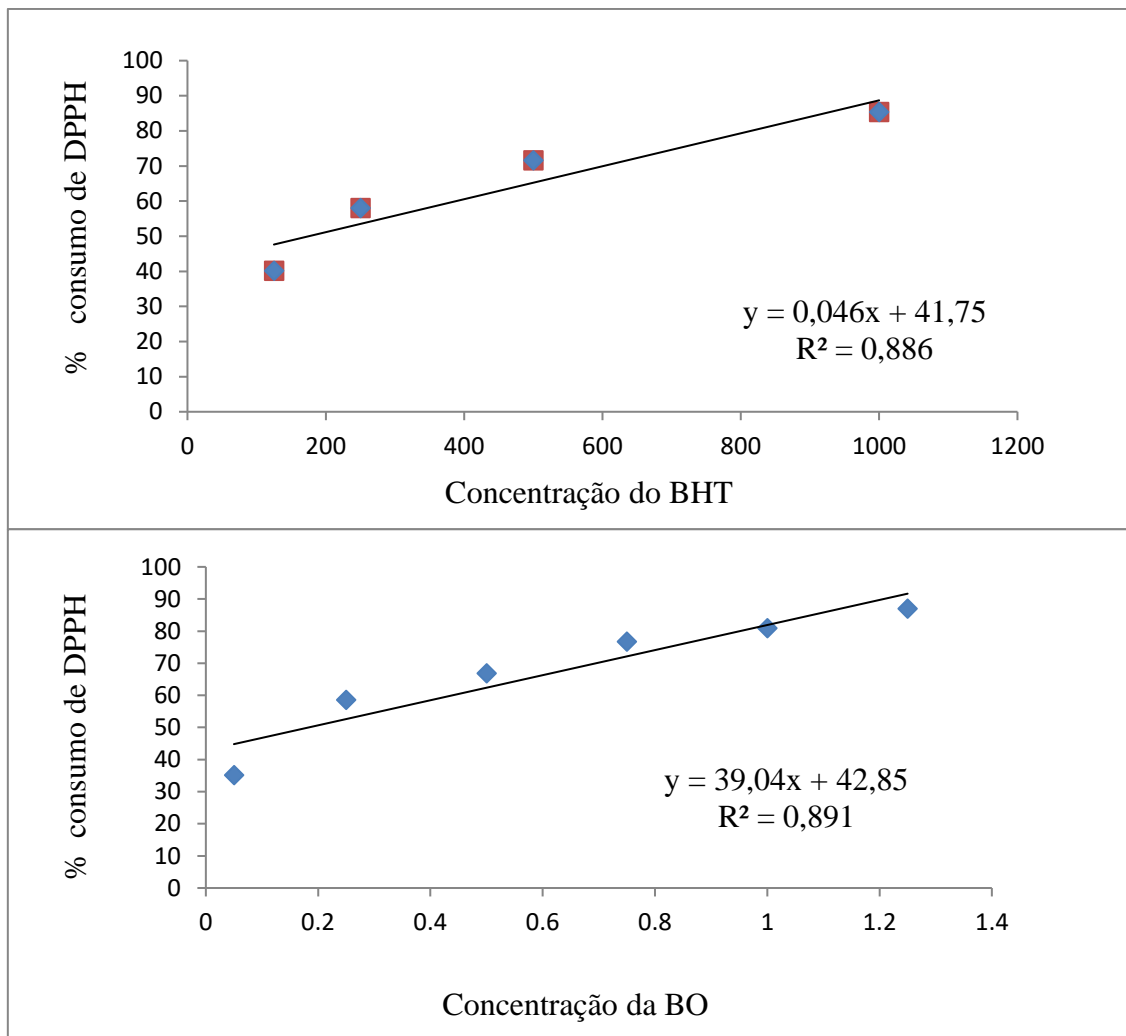
307

308

309

310 **Figura 2. Resultados da análise de regressão da relação do consumo de DPPH com a**  
 311 **concentração das amostras e CE<sub>50</sub> obtida.**

312



314

315

316 Nas análises *in vivo* foi possível verificar redução no tamanho da área média de  
 317 adipócitos ( $\mu\text{m}^2$ ) entre os grupos que receberam as bebidas lácteas fermentadas (G2 e G3) em  
 318 relação ao grupo controle (G1) que teve o fornecimento apenas de ração e água *ad libitum*,  
 319 ( $p < 0,05$ ) sendo que o G3 apresentou adipócitos com menor área em relação ao G2 (Fig. 3).

320

321

322

323

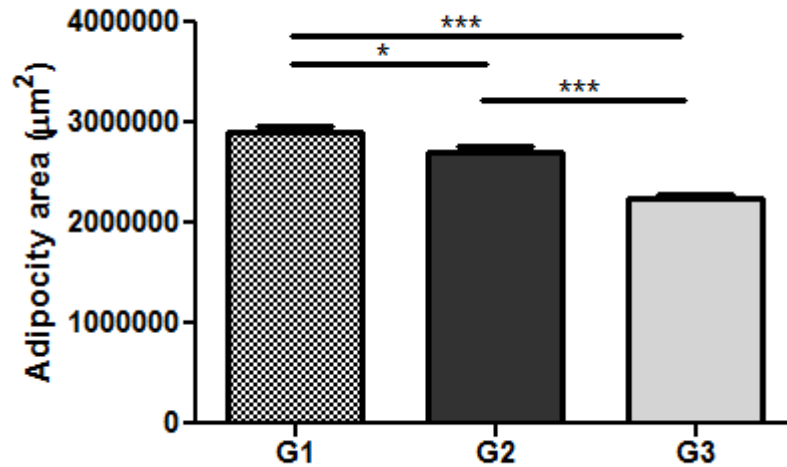
324

325

326



327 **Figura 3. Avaliação da área dos adipócitos no tecido adiposo visceral, de camundongos**  
328 **após a ingestão das dietas avaliadas**



329

330 Fonte: Dos autores, (2019).

331 G1 - Controle: dieta com apenas ração; G2 - grupo isocalórico ao G1: dieta: ração + bebida  
332 láctea fermentada com conservante sintético (sorbato de potássio); G3 - grupo isocalórico ao  
333 G1: dieta: ração + bebida láctea fermentada com óleo essencial de cravo da Índia. Os valores  
334 foram considerados significativos para \*  $p < 0.05$ .

335

336

337 Na avaliação das lâminas histológicas não foi observada alteração nos tecidos dos  
338 animais (Fig. 4).

339

340

341

342

343

344

345

346

347

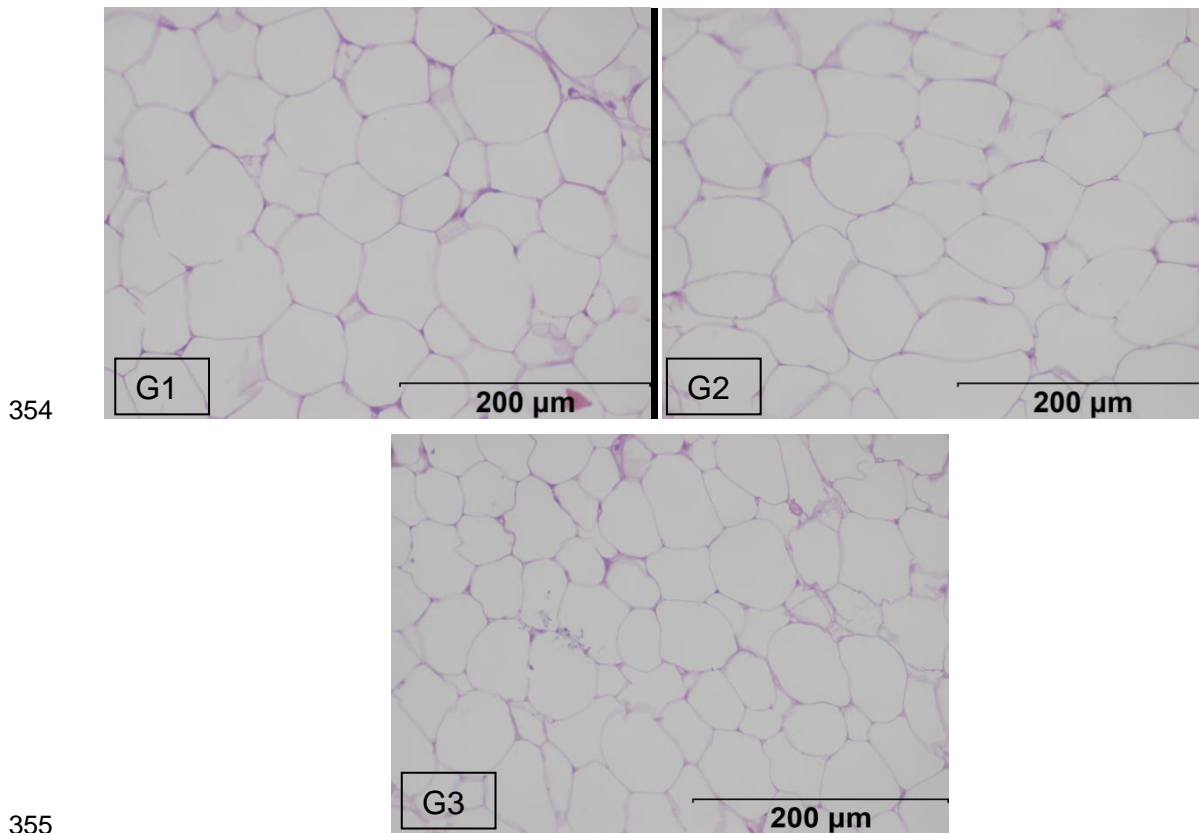
348

349

350

351

352 **Figura 4. Avaliação histopatológica do tecido adiposo visceral de camundongos machos**  
353 **swiss de acordo com as diferentes dietas ofertadas.**

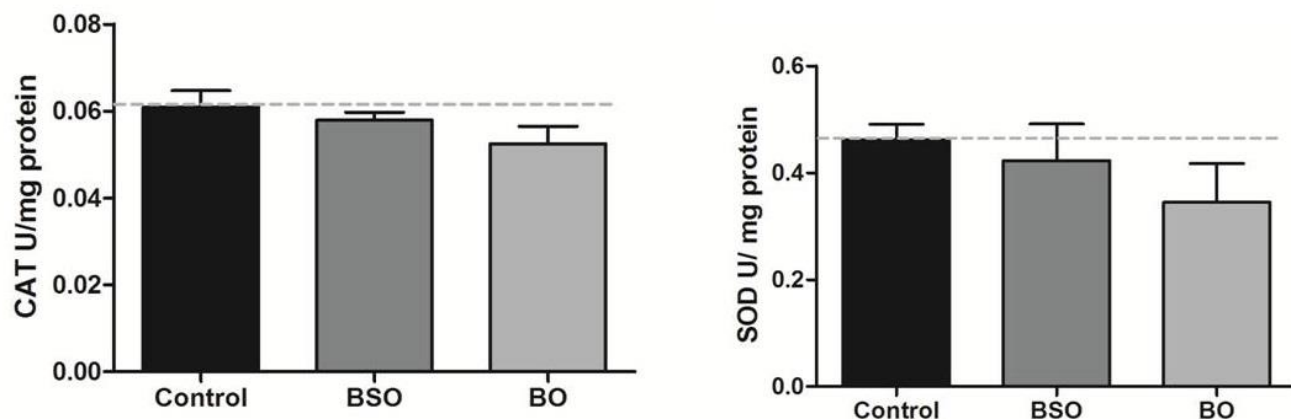


Fonte: Dos autores, (2019).

G1 - Controle: dieta com apenas ração; G2 - grupo isocalórico ao G1: dieta: ração + bebida láctea fermentada com conservante sintético (sorbato de potássio); G3 - grupo isocalórico ao G1: dieta: ração + bebida láctea fermentada com óleo essencial de cravo da Índia.

A atividade de enzimas antioxidantes catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD) no tecido adiposo (Fig. 5), foi semelhante entre os grupos ( $p > 0,05$ ).

373 **Figura 5. Avaliação da atividade das enzimas antioxidante em tecido adiposo visceral de**  
 374 **camundongos do grupo controle e dos que receberam dieta elaborada.**  
 375



376  
 377

Fonte: Dos autores, (2019).

378 Control (G1): dieta com apenas ração; BSO (G2) - grupo isocalórico ao G1: dieta: ração +  
 379 bebida láctea fermentada com conservante sintético (sorbato de potássio); BO (G3) - grupo  
 380 isocalórico ao G1: dieta: ração + bebida láctea fermentada com óleo essencial de cravo da  
 381 Índia.

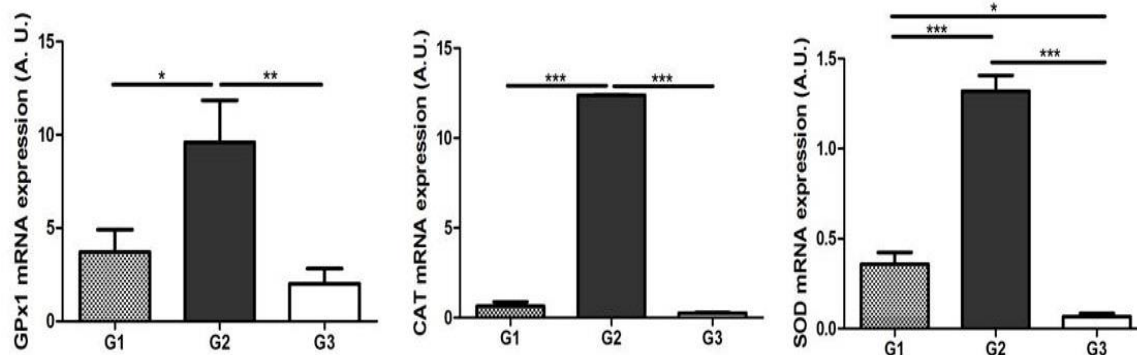
382  
 383  
 384

385 Ao quantificar as enzimas antioxidantes presentes por meio de análise qRT-PCR,  
 386 verificou-se que as enzimas Glutathione Peroxidase (GPx1) e Catalase (CAT) apresentaram  
 387 diferença estatística ( $p < 0,05$ ) do G2 em relação aos grupos G1 e G3, sendo que estes não  
 388 apresentaram diferença estatística entre si ( $p > 0,05$ ) (Figura 6).

389 Para Superóxido dismutase (SOD) o grupo G2 demonstrou maior expressão  
 390 ( $p < 0,05$ ) em relação aos grupos G1 e G3, sendo que estes grupos apresentaram diferença  
 391 estatística ( $p < 0,05$ ) entre si (Fig. 6).

392  
 393  
 394  
 395  
 396  
 397  
 398  
 399  
 400  
 401

402 **Figura 6. Quantificação da expressão de mRNA das enzimas antioxidantes em tecido**  
 403 **adiposo visceral de camundongos machos swiss**  
 404



405

406 Fonte: Dos autores, (2019).

407 G1 - Controle: dieta com apenas ração; G2 - grupo isocalórico ao G1: dieta: ração + bebida  
 408 láctea fermentada com conservante sintético (sorbato de potássio); G3 - grupo isocalórico ao  
 409 G1: dieta: ração + bebida láctea fermentada com óleo essencial de cravo da índia.

410

411

## 412 **Discussão**

413

414 A bebida láctea fermentada acrescida de óleo essencial de cravo-da-índia  
 415 apresentou maior potencial antioxidante *in vitro* em relação às bebidas lácteas com sorbato de  
 416 potássio e sem conservante. Além disso, apresentou menor expressão das enzimas  
 417 antioxidantes e menor tamanho dos adipócitos nas análises *in vivo*.

418

419 Pesquisas apontam o eugenol como componente majoritário do óleo essencial de  
 420 cravo-da-índia [1, 30, 31], resultado este encontrado também no presente estudo. O eugenol  
 421 está correlacionado as atividades biológicas do óleo, sendo considerado um dos principais  
 422 responsáveis pela atividade antioxidante presente na espécie *Syzygium aromaticum* [1, 30, 32,  
 423 31].

423

424 A análise de *headspace* verificou a presença do eugenol no OE e na BO não  
 425 alterando a composição do óleo mesmo após a adição na matéria orgânica presente na matriz  
 426 alimentar. Estudos indicam que este composto é encontrado em maior quantidade no OE de  
 427 cravo-da-índia [1, 30, 32, 31]. Devido à escassez de trabalhos utilizando este óleo essencial em  
 428 bebida láctea fermentada, mostra-se a necessidade de novas análises para melhor  
 429 entendimento do comportamento do óleo em matriz láctea.

429

430 A BO apresentou maior porcentagem de SRL do que BP e BSO, porém nota-se  
 431 que essas bebidas apresentaram também potencial antioxidante. Os antioxidantes são  
 importantes para combater o estresse oxidativo que podem causar diferentes danos a saúde

432 [1]. Em trabalho realizado por Gülçin (2011) [30], avaliando a atividade antioxidante do cravo-  
433 da-índia em diferentes métodos, verificou o óleo possui atividade antioxidante e mostrou que o  
434 mesmo pode ser utilizado para prevenir a oxidação lipídica, pode manter a qualidade  
435 nutricional dos alimentos e prolongar a vida de prateleira.

436 A atividade antioxidante presente nas bebidas com o conservante sintético e a  
437 bebida sem conservante, podem ter ocorrido devido à utilização do soro para a produção da  
438 bebida. [33], citam que uma das funcionalidades do soro do leite é sua atividade antioxidante.  
439 Essa atividade pode estar associada às proteínas encontradas no soro do leite como a caseína  
440 e a albumina [34].

441 Ao otimizar a técnica de análise antioxidante pelo método do DPPH descrita por  
442 [13], foi possível reduzir o volume de metanol utilizado e o tempo reacional, mostrando-se um  
443 método mais econômico e rápido para realizar. Os resultados obtidos na análise de  $CE_{50}$   
444 indicam que BO apresentou melhor resultado em relação ao composto sintético BHT.

445 Avaliando a atividade antioxidante do óleo de cravo em comparação com outros  
446 antioxidantes utilizando o método do DPPH, verificaram em estudo que o óleo obteve resultado  
447 superior ao BHT, alfatocoferol, hidroxianisol butilado e trolox. Neste mesmo trabalho notou-se  
448 maior eficiência e melhores resultados de atividade antioxidante do óleo essencial de cravo  
449 comparado aos compostos citados anteriormente. Com isso, pode-se dizer que a utilização do  
450 óleo essencial do cravo-da-índia aumentou consideravelmente o potencial antioxidante da  
451 bebida no presente trabalho [30].

452 Diante dos resultados obtidos, pode-se dizer que é necessária menor  
453 concentração do óleo essencial de *Syzygium aromaticum* para reduzir a 50% o radical DPPH  
454 em relação à concentração necessária para obter este resultado utilizando o BHT. Com isso a  
455 bebida láctea fermentada com cravo-da-índia apresentou melhor resultado do que o composto  
456 sintético BHT comumente utilizado na indústria ao avaliar os resultados obtidos na análise de  
457  $CE_{50}$ .

458 Os polifenóis possuem a capacidade de captar oxigênio, doar hidrogênio e atuam  
459 como agentes redutores, o eugenol possui a capacidade de permitir que ocorra doação de um  
460 átomo de hidrogênio, fazendo com que o radical fenoxil fique estabilizado, conseqüentemente  
461 são formados compostos estáveis que tem como benefício à capacidade de não propagar ou  
462 iniciar a oxidação [1].

463 Os resultados obtidos na avaliação da área dos adipócitos demonstram que o  
464 grupo G3 que recebia a dieta da BLF com *Syzygium aromaticum* apresentou menor área dos  
465 adipócitos em relação aos animais do grupo G1 e G2. Em trabalho realizado por [35]  
466 fornecendo a suplementação de extrato de *Syzygium aromaticum* a camundongos obesos,  
467 verificou que o extrato possui a capacidade de exercer efeito anti-obesidade, pois este reduz o  
468 peso corporal dos animais. O *Syzygium aromaticum* regula uma via genes relacionados ao  
469 metabolismo lipídico em tecido adiposo branco e no fígado, resultando na redução do acúmulo  
470 de lipídios, contribuindo para a regulação do peso corporal e inibiu o aumento de tecido

471 adiposo branco em camundongos alimentados com dieta hiperlipídica. Podendo estes fatores  
472 contribuir para o resultado de menor área de adipócito, pois de acordo com os autores a  
473 suplementação com o extrato de *Syzygium aromaticum* reduziu a adipogênese, provocando a  
474 perda e reduzindo o acúmulo de lipídios [35].

475 De acordo com Lay *et al.*(2014)[6] o estresse oxidativo causa distúrbios  
476 metabólicos, sendo estes a resistência a insulina, esteatose hepática, hiperlipidemia e aumento  
477 do tamanho dos adipócitos. Sendo que, o aumento do tamanho dos adipócitos, pode está  
478 relacionado com o armazenamento de EROs. De acordo com os resultados obtidos no  
479 presente estudo o grupo G3, que apresentou menor área do tamanho dos adipócitos, pode ser  
480 o grupo com menores níveis de estresse oxidativo.

481 Não houve alterações no tecido adiposo visceral nas análises histológicas. De  
482 acordo com [36] esta concentração não provoca efeitos tóxicos, sendo assim não apresenta  
483 alterações histopatológicas. Os adipócitos desempenham papel importante no organismo,  
484 estão envolvidas na homeostase, na regulação de energia e possuem atividade endócrina, que  
485 quando não funcionam perfeitamente podem provocar síndrome metabólica [37, 38]. Quando  
486 ocorre elevada ingestão de nutrientes, pode provocar na expansão dos adipócito, essa  
487 alteração na conformação e no aumento da quantidade de tecido adiposo presente no  
488 organismo, somada a estresses celulares, podem contribuir para o aumento de células  
489 inflamatórias e provocar inflamações, disfunções metabólicas e estresse endoplasmático.  
490 Essas complicações estão associadas à resistência a insulina, obesidade e ao estresse  
491 oxidativo [6].

492 O estresse oxidativo pode ser avaliado pelos níveis de enzimas antioxidantes, que  
493 são produzidas no organismo com função de evitar danos causados pelos radicais livres. As  
494 enzimas antioxidantes têm como função eliminar as espécies reativas ao oxigênio (EROs) [6].  
495 Os animais pertencentes ao grupo G2 e G3 foram submetidos à gavagem diariamente,  
496 podendo este fator ocasionar estresse dos animais e conseqüentemente provocarem estresse  
497 oxidativo.

498 As enzimas antioxidantes CAT e SOD apresentaram concentrações semelhantes  
499 no tecido adiposo visceral dos grupos G1, G2 e G3. A CAT é responsável pela conversão das  
500 moléculas de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que são produzidas quando ocorre estresse em água e oxigênio, diminuindo  
501 os impactos do estresse, protegendo as células de possíveis danos causados pelo estresse  
502 oxidativo [6, 39]. A SOD tem a capacidade de converter radicais superóxido em H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>  
503 protegendo as células dos danos causados pelo estresse oxidativo [40]. Sendo assim, quando  
504 ocorre produção da enzima SOD, espera-se que tenha a produção da CAT, para que ocorra a  
505 conversão e neutralização das espécies reativas em água e oxigênio [39].

506 As enzimas GPx1, CAT, SOD do presente estudo, apresentou maior expressão de  
507 mRNA no grupo de G2 do que nos outros grupos experimentais, sendo que o grupo G3 foi o  
508 que obteve menor concentração ( $p < 0,05$ ) de SOD e resultado semelhante ( $p > 0,05$ ) ao grupo  
509 controle (G1) quanto a GP<sub>x</sub> e CAT.

510 O sistema de defesa antioxidante fica ativo em células de gordura, onde pode  
511 ocorrer concentração dessas enzimas e limitação da biodisponibilidade [6]. Podendo este fator  
512 contribuir para os níveis superiores de SOD e CAT nos grupos G1 e G2 em relação ao G3.  
513 Outro fator é que estas duas enzimas são a primeira linha de defesa contra o estresse  
514 oxidativo [41], sendo este fator uma das possíveis causas do aumento dos níveis de SOD e  
515 CAT nestes grupos experimentais.

516 O grupo G3 apresentou menor expressão das enzimas antioxidantes, este fato  
517 pode estar relacionado com a ingestão da BO, pois pode ter ocorrido redução das EROs,  
518 diminuindo a necessidade do aumento da produção das enzimas antioxidantes, tornando os  
519 níveis obtidos próximo ao do grupo G1 ou menor. Estudos comprovam que compostos  
520 fenólicos possuem a capacidade de aumentar a eficiência das enzimas antioxidante, sendo um  
521 forte candidato em prevenir e/ou tratar doenças [42, 43, 44]. E os polifenóis possuem a  
522 capacidade de reduzir os níveis de EROs e podem alterar a massa do tecido adiposo, fazendo  
523 isso por diferentes vias metabólicas [6].

524 Essa ação por diferentes vias metabólicas podem explicar a diferença dos  
525 resultados obtidos quando avaliado o transcrito na análise de RT-PCR e da proteína obtida na  
526 análise das enzimas SOD e CAT. Pois, parece ocorrer um mecanismo de regulação pós-  
527 transducional que deve ser investigado por meio de outras análises.

528 Assim como no presente estudo onde o grupo G3, pode ter sofrido estresse  
529 devido à gavagem obteve menor expressão das enzimas antioxidantes estudadas, podendo  
530 estar relacionado à atividade antioxidante da BO comprovada por análises *in vitro* no presente  
531 estudo.

532

533

534

535

536

## 537 **Conclusão**

538

539 Conclui-se que a bebida láctea com o óleo essencial de cravo-da-índia apresentou elevada  
540 atividade antioxidante *in vitro* e os compostos antioxidantes presentes no óleo foram  
541 observados também na bebida láctea fermentada produzida.

542 A bebida com o óleo essencial de cravo-da-índia foi capaz de reduzir o tamanho da área dos  
543 adipócitos e potencializar as enzimas antioxidantes envolvidas no estresse oxidativo. Diante  
544 do potencial antioxidante desta bebida láctea formulada existe a possibilidade da capacidade  
545 funcional desta bebida, gerando assim um novo produto com conservante natural e com  
546 potencial funcional ao mercado.

547

548

549 **Agradecimentos**

550

551 A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES),  
 552 Conselho Nacional de Desenvolvimento científico e tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo  
 553 à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), Universidade Estadual de Minas Gerais  
 554 (UNIMONTES), Pró Reitoria de Extensão da UFMG e Pró Reitoria de Pesquisa da UFMG.

555

556 **Financiamento**

557

558 Este trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de  
 559 Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

560

561 **Referências**

562 1. Cortés-Rojas DF, Souza CRF, Oliveira WP. Clove (*Syzygium aromaticum*): a precious spice.  
 563 Asian Pacific Journal Of Tropical Biomedicine. 2014; 4(2): 90-96. doi:10.1016/S2221-  
 564 1691(14)60215-X.

565 2. Prakash B, Kedia A, Mishra PK, Dubey NK. Plant essential oils as food preservatives to  
 566 control moulds, mycotoxin contamination and oxidative deterioration of agri-food commodities –  
 567 Potentials and challenges. Food Control. 2015; 47: 381-391. doi:  
 568 [10.1016/j.foodcont.2014.07.023](https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.07.023).

569 3. Carvalho PR. Aditivos dos Alimentos. Revista Logos. 2005; 12: 57-69. Retrieved from:  
 570 [encurtador.com.br/abnAB](http://encurtador.com.br/abnAB).

571 4. Lushchak VI. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification.  
 572 Chemico-Biological Interactions. 2014; 224: 164-175. doi: [10.1016/j.cbi.2014.10.016](https://doi.org/10.1016/j.cbi.2014.10.016).

573 5. Zheng W, Wang SY. Antioxidant Activity and Phenolic Compounds in Selected  
 574 Herbs. Journal Of Agricultural And Food Chemistry. 2001; 49(11): 5165-5170. doi:  
 575 [10.1021/jf010697n](https://doi.org/10.1021/jf010697n).

576 6. Lay SL, Simard G, Martinez MC, Andriantsitohaina R. Oxidative Stress and Metabolic  
 577 Pathologies: From an Adipocentric Point of View. Oxidative Medicine And Cellular Longevity.  
 578 2014; 2014: 1-18. doi: [10.1155/2014/908539](https://doi.org/10.1155/2014/908539).

579 7. Brasil. Ministério de Estado da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa  
 580 n.º 16, de 23 de agosto de 2005. Aprova o regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de  
 581 Bebidas Láctea. 2005. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, Seção 1, p. 7.  
 582 24 ago. 2005. Available from:  
 583 <https://www2.cead.ufv.br/sgal/files/apoio/legislacao/legislacao6.pdf>.



- 584 8. Brasil. Ministério da Agricultura Pecuária e abastecimento. Secretaria de Defesa  
585 Agropecuária. Instrução Normativa nº 62, de 26 de agosto de 2003. Oficializa os Métodos  
586 Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal  
587 e Água. 2003. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, Seção 1, p. 14. 26  
588 ago. 2003. Available from: [http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-  
589 consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=2851](http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=2851).
- 590 9. AOAC (Association of Official Analytical Chemist). Official methods of analysis. 16<sup>a</sup> ed. 3<sup>a</sup>  
591 revisão, v. 2. Food Composition; Additives; Natural Contaminants, Seção 33. Washington:  
592 AOAC, 1997.
- 593 10. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 68 de  
594 12 de dezembro de 2006. Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais Físico-Químicos, para  
595 Controle de Leite e Produtos Lácteos, em conformidade com o anexo desta Instrução  
596 Normativa, determinando que sejam utilizados nos Laboratórios Nacionais Agropecuários.  
597 Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, Seção 1, p. 8.14 dez. 2006.  
598 Available from: [https://www.diariodasleis.com.br/busca/exibmlink.php?numlink=1-77-23-2006-  
599 12-12-68](https://www.diariodasleis.com.br/busca/exibmlink.php?numlink=1-77-23-2006-12-12-68).
- 600 11. Souza KSS, Oliveira SP, Duarte SM, Brandi IV, Santos SHSS, Santos EMSS, Farias PKS,  
601 Santos HO, Almeida AC. Standardization of the methodology for calorimetric analysis of a  
602 fermented milk drink. Caderno De Ciências Agrárias - Agrarian Sciences Journal. 2018; 10(2):  
603 61-63. Retrieved from: <https://periodicos.ufmg.br/index.php/ccaufmg/article/view/3038/1850>.
- 604 12. Farias PKS, Silva JCRL, Souza CND, Fonseca FSAD, Brandi IV, Martins ER, Azevedo AM,  
605 Almeida ACD. Antioxidant activity of essential oils from condiment plants and their effect on  
606 lactic cultures and pathogenic bacteria. Ciência Rural. 2019; 49(2): 1-12. doi: [10.1590/0103-  
607 8478cr20180140](https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20180140).
- 608 13. Najgebauer-Lejko D, Sady M, Grega T, Walczycka M. The impact of tea supplementation on  
609 microflora, pH and antioxidant capacity of yoghurt. International Dairy Journal. 2011; 21(8): 568-  
610 574. doi: <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2011.03.003>.
- 611 14. Teixeira B, Marques A, Ramos C, Serrano C, Matos O, Neng NR, Nunes ML. Chemical  
612 composition and bioactivity of different oregano (*Origanum vulgare*) extracts and essential oil.  
613 Journal Of The Science Of Food And Agriculture. 2013; 93(11): 2707-2714. doi:  
614 [10.1002/jsfa.6089](https://doi.org/10.1002/jsfa.6089).
- 615 15. Scherer R, Godoy HT. Antioxidant activity index (AAI) by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl  
616 method. Food Chemistry. 2009; 112(3): 654-658. doi: [10.1016/j.foodchem.2008.06.026](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.06.026).

- 617 16. Aguiar MCS, Silvério FO, Pinho GP, Lopes PSN, Fidêncio PH, Ventura SJ. Volatile  
618 compounds from fruits of *Butia capitata* at different stages of maturity and storage. Food  
619 Research International. 2014; 62(1):1095-1099. doi: 10.1016/j.foodres.2014.05.039.
- 620 17. NIST. Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia. Departamento de Comércio dos EUA,  
621 Gaithersburg, MD. SRM 1649b Urban Dust, 2009.
- 622 18. Eng J. Sample size estimation: how many individuals should be studied?. Radiology. 2003;  
623 227(2): 309-313. doi:10.1148/radiol.2272012051.
- 624 19. Guimarães PRB. Métodos Quantitativos Estatísticos. 245 p. Curitiba: IESDE Brasil S.A.,  
625 2008.
- 626 20. Neves SMP, Mancini Filho J, Menezes EW. Manual de cuidados e procedimentos com  
627 animais de laboratório do biotério de produção e experimentação da FCF-IQ/USP. São Paulo;  
628 2013.
- 629 21. Paraíso AF, Andrade JMO. Manual de Cuidados e Procedimentos com Animais de  
630 Laboratório do Biotério de Produção e Experimentação da Unimontes. Universidade Estadual  
631 de Montes Claros. Programa de Pós graduação em Ciências da Saúde. Sala de  
632 experimentação e controle de animais. Montes Claros, 2014.
- 633 22. Martins LB, Oliveira MC, Menezes-Garcia Z, Rodrigues DF, Lana JP, Vieira LQ, Teixeira  
634 MM, Ferreira AVM. Paradoxical role of tumor necrosis factor on metabolic dysfunction and  
635 adipose tissue expansion in mice. Nutrition. 2018; 50: 1-7. doi: 10.1016/j.nut.2017.07.006.
- 636 23. Zicker MC, Silveira ALM, Lacerda DR, Rodrigues DF, Oliveira CT, Cordeiro LMS, Lima LCF,  
637 Santos SHSS, Teixeira MM, Ferreira, AVM. Virgin coconut oil is effective to treat metabolic and  
638 inflammatory dysfunction induced by high refined carbohydrate-containing diet in mice. The  
639 Journal Of Nutritional Biochemistry. 2019; 63: 117-128. doi: 10.1016/j.jnutbio.2018.08.013.
- 640 24. Aebi H. Catalase *in vitro*. Methods In Enzymology. 1984; 121-126. doi: 10.1016/s0076-  
641 6879(84)05016-3.
- 642 25. Bannister JV, Calabrese L. Assays for superoxide dismutase. Methods of Biochemical  
643 Analysis. 1987; 279-312. doi: [10.1002/9780470110539.ch5](https://doi.org/10.1002/9780470110539.ch5).
- 644 26. Andrade JMO, Barcala-Jorge AS, Batista-Jorge GC, Paraíso AF, Freitas KM, Farias LD,  
645 Guimarães ALS, Paula AMB, Santos SHS. Effect of resveratrol on expression of genes involved  
646 thermogenesis in mice and humans. Biomedicine & Pharmacotherapy. 2019; 112: 1-9. doi:  
647 [10.1016/j.biopha.2019.108634](https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.108634).

- 648 27. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using Real-Time  
649 Quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  Method. *Methods*. 2001; 25(4): 402-408 doi:  
650 10.1006/meth.2001.1262.
- 651 28. Li KK, Liu CL, Shiu HT, Wong HL, Siu WS, Zhang C, Han XQ, Ye CX, Leung PC, Ko CH  
652 2016. Cocoa tea (*Camellia ptilophylla*) water extract inhibits adipocyte differentiation in mouse  
653 3T3-L1 preadipocytes. *Sci Rep*. doi: 10.1038/srep20172.
- 654 29. Ohyama T, Sato K, Kishimoto K, Yamazaki Y, Horiguchi N, Ichikawa T, Kakizaki S, Takagi  
655 H, Izumi T, Mori M. Azelnidipine is a calcium blocker that attenuates liver fibrosis and may  
656 increase antioxidant defence. *British Journal Of Pharmacology*. 2012; 165(4): 1173-1187. doi:  
657 10.1111/j.1476-5381.2011.01599.x.
- 658 30. Gülçin İ. Antioxidant Activity of Eugenol: A Structure–Activity Relationship Study. *Journal Of*  
659 *Medicinal Food*. 2011; 14(9): 975-985. doi: 10.1089/jmf.2010.0197.
- 660 31. Xie Y, Yang Z, Cao D, Rong F, Ding H, Zhang S. Antitermitic and antifungal activities of  
661 eugenol and its congeners from the flower buds of *Syzygium aromaticum* (clove). *Industrial*  
662 *Crops And Products*. 2015; 77: 780-786. doi: 10.1016/j.indcrop.2015.09.044.
- 663 32. Tiwar P, Verma R, Ahirwar D, Chandy A, Dwivedi S. Evaluation of anxiolytic effect of  
664 *Syzygium aromaticum*: a traditional herb of India. *Asian Pacific Journal Of Tropical Disease*.  
665 2014; 4:77-80. doi: [10.1016/s2222-1808\(14\)60418-7](https://doi.org/10.1016/s2222-1808(14)60418-7).
- 666 33. Baldissera AC, Betta FD, Penna ALB, Lindner JDD. Alimentos funcionais: uma nova  
667 fronteira para o desenvolvimento de bebidas protéicas a base de soro de leite. *Semina:*  
668 *Ciências Agrárias*. 2011; 32(4): 1497-1512. doi: 10.5433/1679-0359.2011v32n4p1497.
- 669 34. Fardet A, Rock E. *In vitro* and *in vivo* antioxidant potential of milks, yoghurts, fermented  
670 milks and cheeses: a narrative review of evidence. *Nutrition Research Reviews*. 2017; 31(1):  
671 52-70. doi: 10.1017/s0954422417000191.
- 672 35. Jung CH, Ahn J, Jeon TI, Kim TW, Ha TY. *Syzygium aromaticum* ethanol extract reduces  
673 high-fat diet-induced obesity in mice through downregulation of adipogenic and lipogenic gene  
674 expression. *Experimental And Therapeutic Medicine*. 2012; 4(3): 409-414. doi:  
675 10.3892/etm.2012.609.
- 676 36. Liu BB, Luo L, Liu XL, Geng D, Li CF, Chen SM, Chen XM, Yi LT, Liu Q. Essential oil of  
677 *Syzygium aromaticum* reverses the deficits of stress-induced behaviors and hippocampal p-  
678 ERK/p-CREB/Brain-Derived neurotrophic factor expression. *Planta Medica*. 2015; 81(03): 185-  
679 192. doi:10.1055/s-0034-1396150.

- 680 37. Hermsdorff HHM, Monteiro JBR. Gordura visceral, subcutânea ou intramuscular: onde está  
681 o problema?. Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia. 2004; 48(6): 803-811. doi:  
682 10.1590/s0004-27302004000600005.
- 683 38. Kuroda M, Mimaki Y, Ohtomo T, Yamada J, Nishiyama T, Mae T, Kishida H, Kawada T.  
684 Hypoglycemic effects of clove (*Syzygium aromaticum* flower buds) on genetically diabetic KK-  
685 Ay mice and identification of the active ingredients. Journal Of Natural Medicines. 2011; 66(2):  
686 394-399. doi: 10.1007/s11418-011-0593-z.
- 687 39. Avelar TM, Storch AS, Castro LA, Azevedo GV, Ferraz L, Lopes PF. Oxidative stress in the  
688 pathophysiology of metabolic syndrome: which mechanisms are involved?. Jornal Brasileiro de  
689 Patologia e Medicina Laboratorial. 2015; 51(4): 231-239. doi: 10.5935/1676-2444.20150039.
- 690 40. Pisoschi Am, Pop A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review.  
691 European Journal Of Medicinal Chemistry. 2015; 97: 55-74. doi: 10.1016/j.ejmech.2015.04.040.
- 692 41. Kim J, Wilson Jm, Lee S. Dietary implications on mechanisms of sarcopenia: roles of  
693 protein, amino acids and antioxidants. The Journal Of Nutritional Biochemistry. 2010; 21(1): 1-  
694 13. doi: 10.1016/j.jnutbio.2009.06.014.
- 695 42. Mansouri MT, Farbood Y, Sameri MJ, Sarkaki A, Naghizadeh B, Rafeirad M.  
696 Neuroprotective effects of oral gallic acid against oxidative stress induced by 6-  
697 hydroxydopamine in rats. Food Chemistry. 2013; 138(2-3): 1028-1033. doi:  
698 10.1016/j.foodchem.2012.11.022.
- 699 43. Guerra JF, Magalhães CLB, Costa DC, Silva ME, Pedrosa ML. Dietary açai modulates ROS  
700 production by neutrophils and gene expression of liver antioxidant enzymes in rats. Journal Of  
701 Clinical Biochemistry And Nutrition. 2011; 49(3): 188-194. doi: 10.3164/jcfn.11-02.
- 702 44. Kalender Y, Kaya S, Durak D, Uzun FG, Demir F. Protective effects of catechin and  
703 quercetin on antioxidant status, lipid peroxidation and testis-histoarchitecture induced by  
704 chlorpyrifos in male rats. Environmental Toxicology And Pharmacology. 2012; 33(2): 141-148.  
705 doi: 10.1016/j.etap.2011.12.008.

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Esse trabalho apresenta resultados novos e inovadores, devido à escassez de estudos utilizando bebida láctea fermentada com adição de óleo essencial de cravo-da-índia. As análises *in silico* demonstrou as vias e a atuação óleo essencial em estudo no organismo a nível molecular. Nas análises *in vitro* foram verificados parâmetros exigidos na legislação como análises microbiológicas, físico-químicas e calorimétricas. Além disso, verificou-se o potencial antioxidante da bebida láctea fermentada acrescida de óleo essencial de *Syzygium aromaticum* (2 ul/ml) *in vitro* e *in vivo*, comprovando o potencial antioxidante do óleo na matriz láctea durante o período de estocagem (14 dias) por meio do método do DPPH e a identificação dos compostos majoritários existentes no óleo essencial por meio da análise de *headspace*. Nas análises *in vivo* avaliando as enzimas antioxidantes envolvidas no processo de defesa oxidante, verificou-se redução da expressão dessas enzimas no grupo experimental alimentado da bebida com óleo em relação aos outros grupos experimentais, podendo este fator está associado à ingestão da bebida, funcionando como um antioxidante exógeno. Outro fator evidenciado foi à redução do tamanho da área dos adipócitos, podendo ser este um dos fatores de funcionalidade da bebida, além do potencial antioxidante aqui comprovado.

Portanto, concluímos que o *Syzygium aromaticum* possui ação molecular para prevenir os danos causados pelo estresse oxidativo, podendo ser uma alternativa sustentável para a terapia natural. Além de ser um potencial substituto ao conservante sintético sorbato de potássio e apresenta atividade antioxidante comprovada, podendo ser um alimento funcional. A bebida formulada no presente estudo pode ser considerada segura, utilizando a concentração de *Syzygium aromaticum* descrita.

Estudos futuros são necessários para avaliar a funcionalidade da bebida elaborada e possível ação na prevenção da obesidade.

**APÊNDICE(S)**

APÊNDICE A – Ficha de Identificação para as gaiolas dos Grupos de Animais do Experimento

<b>Título do Projeto:</b> Metabolismo de camundongos alimentados com bebida láctea fermentada adicionada com óleo essencial de <i>Syzygium aromaticum</i>	
<b>IDENTIFICAÇÃO DO GRUPO:</b>	<b>IDENTIFICAÇÃO DO ANIMAL POR MARCAÇÃO</b>
<b>DATA DE NASCIMENTO:</b> /	1: Cauda
<b>DATA DE INÍCIO DO EXPERIMENTO:</b>	2: Membro torácico esquerdo
<b>QUANTIDADE DE ANIMAIS:</b> 8	3: Membro torácico direito
<b>SEXO:</b> Macho	4: Região dorsal torácica
<b>ESPÉCIE/LINHAGEM:</b> Camundongos    Machos	5: Membro pélvico esquerdo
Swiss	6: Membro pélvico direito
<b>DISCENTES RESPONSÁVEIS:</b>	7: Cabeça
Stephanie Pedrosa e Keicy Sandy	8: Região dorsal abdominal
<b>CONTATO:</b> (31) 9 9197-7984 / (38) 9 84043233	9: sem marcação

## APÊNDICE B - Ficha de controle do peso individual dos animais de cada grupo por semana

<b>IDENTIFICAÇÃO DO GRUPO:</b>							
<b>DATA:</b> /   /   a   /   /							
<b>Identificação do animal por marcação</b>	<b>Peso (g)</b>	<b>Peso (g)</b>	<b>Peso (g)</b>	<b>Peso (g)</b>	<b>Peso (g)</b>	<b>Peso (g)</b>	<b>Peso (g)</b>
1: Cauda							
2: Membro torácico esquerdo							
3: Membro torácico direito							
4: Região dorsal torácica							
5: Membro pélvico esquerdo							
6: Membro pélvico direito							
7: Cabeça							
8: Região dorsal abdominal							

APÊNDICE C - Ficha de controle da quantidade de ração consumida pelos animais por semana

<b>IDENTIFICAÇÃO DO GRUPO:</b>			
<b>DATA: / / a / /</b>	<b>Peso inicial (g)</b>	<b>Peso final (g)</b>	<b>Ração Consumida (g)</b>
/ /			
/ /			
/ /			
/ /			
/ /			
/ /			
/ /			
<b>Total ração consumida (g)</b>			
<b>Média de consumo diário do grupo (g)</b>			
<b>Média de consumo diário/animal (g)</b>			





## APÊNDICE D - Ficha de controle da quantidade de água consumida pelos animais por semana

<b>IDENTIFICAÇÃO DO GRUPO:</b>				<b>Volume inicial (mL)</b>	<b>Volume final (mL)</b>	<b>Volume Consumido (mL)</b>
<b>DATA:</b>	<b>/</b>	<b>/</b>	<b>a</b>	<b>/</b>	<b>/</b>	
	/		/			
	/		/			
	/		/			
	/		/			
	/		/			
	/		/			
	/		/			
<b>Total de água Consumida (mL)</b>						
<b>Média de consumo diário do grupo (mL)</b>						
<b>Média de consumo diário/animal (mL)</b>						

**ANEXO(S)**

ANEXO A – Protocolo de aprovação pelo comitê de ética em experimentação animal - Unimontes

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MONTES CLAROS**  
**COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO E BEM-ESTAR ANIMAL**

**PARECER CONSUBSTANCIADO**

Montes Claros, 17 de outubro de 2017.

Processo N.º 149  
Título do Projeto: **METABOLISMO DE CAMUNDONGOS ALIMENTADOS COM BEBIDA LÁCTEA FERMENTADA ADICIONADA DE ÓLEO ESSENCIAL DE *Syzygium aromaticum***

Pesquisador responsável: Dr. Sérgio Henrique Sousa Santos e Dra. Anna Christina de Almeida

**Histórico**

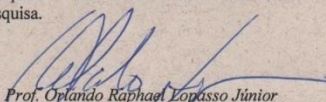
O Brasil está entre os principais produtores de Óleos Essenciais (OE), dentre as plantas utilizadas tem-se o Cravo da Índia, apresenta diversas funções farmacológicas além de ser considerado conservante de alimentos, pode ser utilizado pela população e profissionais da saúde para prevenir e curar patologias, como a desnutrição, decorrente da alteração fisiológica por déficit de carboidratos, lipídeos, proteínas, energias, vitaminas, minerais e outros nutrientes. As crianças e idosos são os mais propensos a desnutrição, fornecê-los dieta adequada e balanceada pode promover renutrição alimentar e evitar recaídas. Essa dieta é formulada de acordo com a faixa etária e as necessidades nutricionais exigidas por cada indivíduo para realização das funções vitais. Com o avanço do mercado lácteo, o aumento da disponibilidade de subprodutos, soro do leite, e o desejo da população em consumir alimentos funcionais sem aditivos ou conservantes químicos, criou-se a bebida láctea fermentada adicionada de óleo essencial de *Syzygium aromaticum*, para ser alimento alternativo no combate à desnutrição por apresentar fácil processamento, baixo custo e com nutrientes similares ao do leite.

**Mérito**

O projeto visa avaliar o efeito da bebida láctea fermentada no metabolismo de camundongos machos *swiss* desnutridos. Para isto, serão induzidos a desnutrição 48 camundongos machos *swiss* e posteriormente a dieta será readaptada com a bebida láctea fermentada adicionada de óleo essencial de cravo da Índia (200mg/kg), fornecida por gavagem, para verificar a eficácia dessa bebida através das análises dos parâmetros bioquímicos, histopatológicos e a expressão de mRNA dos genes das proteínas transportadora ativa de glicose dependente do sódio (SGLT1), transportadora de glicose independente do sódio (GLUT2) e transportadora de peptídeos 1 (PEPT1), provenientes do jejuno, conteúdo fecal e microbiota intestinal, por meio da reação em cadeia da polimerase em tempo real (q-PCR).

**Parecer**

A Comissão de Ética em Experimentação e Bem-Estar Animal da Unimontes analisou o processo 149, e entende que o mesmo está completo e dentro das normas deste comitê. Sendo assim, somos pela APROVAÇÃO do projeto de pesquisa.

  
Prof. Orlando Raphael Lopes Junior  
Presidente da Comissão de Ética em Experimentação e Bem-Estar Animal da UNIMONTES

ANEXO B – Protocolo de aprovação pelo comitê de ética em experimentação animal – ICA/UFMG



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

**CERTIFICADO**

Certificamos que o projeto intitulado "Metabolismo de camundongos alimentados com bebida láctea fermentada adicionada com óleo essencial de *Syzygium aromaticum*", protocolo do CEUA: 231/2017 sob a responsabilidade de Anna Christina de Almeida que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS, em reunião de 13/11/2017.

Vigência da Autorização	13/11/2017 a 12/11/2022
Finalidade	Pesquisa
<b>*Espécie/linhagem</b>	Camundongo heterogênico / Swiss
Nº de animais	8
Peso/Idade	30g / 4(semanas)
Sexo	masculino
Origem	Biotério de Experimentação Animal da Universidade Estadual de Montes Claros – UNIMONTES
<b>*Espécie/linhagem</b>	Camundongo heterogênico / Swiss
Nº de animais	8
Peso/Idade	30g / 4(semanas)
Sexo	masculino

Origem	Biotério de Experimentação Animal da Universidade Estadual de Montes Claros – UNIMONTES
<b>*Espécie/linhagem</b>	Camundongo heterogênico / Swiss
Nº de animais	8
Peso/Idade	30g / 4(semanas)
Sexo	masculino
Origem	Biotério de Experimentação Animal da Universidade Estadual de Montes Claros – UNIMONTES
<b>*Espécie/linhagem</b>	Camundongo heterogênico / Swiss
Nº de animais	8
Peso/Idade	30g / 4(semanas)
Sexo	masculino
Origem	Biotério de Experimentação Animal da Universidade Estadual de Montes Claros – UNIMONTES
<b>*Espécie/linhagem</b>	Camundongo heterogênico / Swiss
Nº de animais	8
Peso/Idade	30g / 4(semanas)
Sexo	masculino

Origem	Biotério de Experimentação Animal da Universidade Estadual de Montes Claros – UNIMONTES
<b>*Espécie/linhagem</b>	Camundongo heterogênico / Swiss
Nº de animais	8
Peso/Idade	30g / 4(semanas)
Sexo	masculino

Origem	Biotério de Experimentação Animal da Universidade Estadual de Montes Claros – UNIMONTES
--------	---

Considerações posteriores:

13/11/2017	Aprovado na reunião do dia 13/11/2017. Validade: 13/11/2017 à 12/11/2022
------------	--

Belo Horizonte, 23/11/2017.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG

[https://aplicativos.ufmg.br/solicite\\_ceua/](https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/)

Universidade Federal de Minas Gerais  
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha  
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005  
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil  
Telefone: (31) 3409-4516  
[www.ufmg.br/bioetica/ceua](http://www.ufmg.br/bioetica/ceua) - [cetea@prpq.ufmg.br](mailto:cetea@prpq.ufmg.br)