

**Keicy Sandy Silvestre de Souza**

**Perfil glicêmico, expressão de marcadores inflamatórios e metabolismo hepático de camundongos alimentados com bebida láctea fermentada adicionada de óleo essencial de *Syzygium aromaticum***

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:**

Igor Viana Brandi

Sérgio Henrique Sousa Santos

MONTES CLAROS

2019

Souza, Keicy Sandy Silvestre de.

S729p 2019 Perfil glicêmico, expressão de marcadores inflamatórios e metabolismo hepático de camundongos alimentados com bebida láctea fermentada adicionada de óleo essencial de *Syzygium aromaticum* / Keicy Sandy Silvestre de Souza. Montes Claros, 2019.  
74 f.: il.

Dissertação (Mestrado em Produção Animal) Universidade Federal de Minas Gerais / Instituto de Ciências Agrárias, 2018.

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

Banca examinadora: Viviane Aguiar Andrade, Eliane Macedo Sobrinho Santos, Valéria Mafra Cota, Igor Viana Brandi.

Referências: f: 28-32. 46-49. 63-66.

1. Citocinas. 2. Cravo da Índia. 4. Eugenol. 3. Toxicidade. I. Almeida, Anna Christina de. II. Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Minas Gerais. III. Título.

CDU: 637.1

ELABORADA POR: EDÉLZIA CRISTINA SOUSA VERSIANI CRB6 1349

BIBLIOTECA COMUNITÁRIA UNIVERSITÁRIA DO ICA/UFGM

**Keicy Sandy Silvestre de Souza**

**Perfil glicêmico, expressão de marcadores inflamatórios e metabolismo hepático de camundongos alimentados com bebida láctea fermentada adicionada de óleo essencial de *Syzygium aromaticum***

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. Valéria Mafra Cota  
IFNMG-Campus Januária

Prof. Dr. Igor Viana Brandi  
ICA/UFMG

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Anna Christina de Almeida (Orientadora) - ICA/UFMG  
Montes Claros, 17 de janeiro de 2019

## DEDICATÓRIA

Dedico essa dissertação a minha família, que me apoiou a todo instante, aos meus amigos, que acompanharam as lutas diárias e especialmente, minha orientadora e amiga Anna Christina que sempre me incentivou e acreditou no meu potencial para execução desse projeto.

## AGRADECIMENTO

Agradeço primeiramente a Deus, por iluminar a minha vida e guiar os meus passos. Se ele não estivesse presente nada disso seria possível, a ele toda honra e glória.

Agradeço aos meus pais, Marcia e Manoel, por me ensinar todos os princípios de vida que carregarei eternamente e por não medirem esforços para me auxiliar na execução do projeto em todas as etapas. Agradeço também a minha irmã, Bruna, por compreender várias vezes a minha falta de paciência e estresse.

Agradeço, Anna Christina, que desde o meu TCC, me orientou, e por ter confiado a mim a execução desse projeto. A senhora foi fundamental para o meu crescimento profissional.

Agradeço aos professores Sérgio e Igor, por aceitarem me coorientar nesse trabalho, estando sempre disponíveis para sanar as minhas dúvidas.

Agradeço aos camundongos que foram a peça chave para a execução do projeto, espero ter os tratado de acordo com os preceitos éticos.

Agradeço aos alunos do Instituto de Ciências Agrárias da ICA/UFMG, Fábio, Jennine, Laura, Nayara, Iara, João, Raquel, Samuel, aos acadêmicos do curso de Medicina-Funorte João e Pedro e aos alunos do programa de pós-graduação em ciências da saúde – PPGCS-Unimontes, Daniel, Daniela, Deborah, Janaina, Luiz Paulo e Victor, por me auxiliarem nos laboratórios e biotério.

Agradeço aos técnicos-administrativos do ICA/UFMG, Carla, Cintya, Francine, Hugo, Sandro e Sérgio, por esclarecerem as minhas dúvidas quantos a execução dos procedimentos que seriam realizados dentro de cada laboratório.

Agradeço a Stephanie, minha dupla de projeto, pela amizade, companheirismo e por ter enfrentado comigo as lutas diárias para que nosso projeto fosse executado com êxito.

Agradeço a todos os funcionários, ao grupo Sanileite e demais alunos do ICA/UFMG, que estiveram presentes em alguma etapa do meu mestrado.

Agradeço ao programa de pós-graduação em produção animal pela oportunidade e concessão da bolsa de estudo (CAPES).

Agradeço a Unimontes por ter disponibilizado o meu acesso ao biotério e ao laboratório de ciências da saúde para execução do projeto.

Agradeço aos amigos e afilhados, Bruno e Mariele, que souberam compreender o meu afastamento temporário da clínica veterinária – Dog Clean, no período em que precisei me dedicar exclusivamente ao mestrado.

Agradeço a preocupação diária de minhas amigas, afilhadas e colegas de profissão Bárbara e Camila que sempre acreditaram que eu conseguiria alcançar os meus objetivos.

Por fim, agradeço a todos os meus amigos e familiares que sempre estiveram ao meu lado, procurando saber se estava dando tudo certo e por estarem sempre dispostos a ouvirem minhas longas histórias.

## EPÍGRAFE

"A mente que se abre a uma nova ideia  
jamais voltará ao seu tamanho original."

Albert Einstein

## RESUMO

O Brasil está entre os principais produtores de Óleos Essenciais (OEs). Dentre as plantas utilizadas tem-se o *Syzygium aromaticum* (cravo-da-índia) que apresenta além de diversas funções farmacológicas, descritas na literatura, o potencial para ser utilizado como conservador de alimentos. Estudos prévios mostraram através de teste *in vivo*, que a concentração de 200 mg/kg o OE de *Syzygium aromaticum* não apresentou alterações histopatológicas em fígado, rim, cérebro, pulmão, coração, baço. Baseando na evidência apresentada nesse estudo, de não toxicidade do OE de *Syzygium aromaticum*, resolvemos avaliar *in vivo*, a capacidade de uma bebida láctea fermentada, desenvolvida anteriormente, testada apenas *in vitro*, na qual o conservante químico padrão, sorbato de potássio, foi substituído pelo OE de cravo da Índia, em ser um alimento funcional. Para isso, 24 camundongos Swiss machos foram divididos em três grupos por delineamento inteiramente casualizado e submetidos a análise de comportamento, testes de sensibilidade à insulina (TSI) e tolerância à glicose (TTG). Avaliou-se também a taxa de decaimento da glicose (Kitt), a morfologia e histopatologia do fígado e quantificou-se as citocinas pró-inflamatórias, interleucina 6 (IL6), interleucina 1 beta (IL1-β) e fator de necrose tumoral alfa (TNFα) e anti-inflamatória, interleucina 10 (IL-10), do fígado através da reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa quantitativa em tempo real (qRT-PCR), após administração diária de 2 ml da bebida láctea fermentada adicionada de 2μl/ml do óleo essencial de cravo da Índia durante 30 dias. O grupo que recebeu a bebida láctea fermentada com óleo essencial de cravo apresentou menor índice glicêmico no TTG, maior sensibilidade à insulina e maior Kitt, em relação aos demais grupos. Os animais pertencentes aos três grupos, não apresentaram alterações clínicas ou de comportamento. Os parâmetros bioquímicos, análise histopatológica do fígado e expressão das citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatória não se diferiram entre os grupos experimentais comparado com o grupo controle. Estes resultados demonstram que a bebida láctea fermentada com óleo essencial de cravo na concentração de 2 μl/ml, não induziu a toxicidade dos animais, visto que não foram encontradas alterações no comportamento sistêmico, nas análises bioquímicas e histopatológicas, que indicassem toxicidade nos camundongos durante o período experimental. Dessa forma essa bebida tem potencial funcional, para ser adicionado à dieta de indivíduos saudáveis, e o óleo essencial de cravo da Índia pode funcionar como um substituto para conservadores químicos convencionais e reduzir a glicemia.

**Palavras-chave:** Citocinas. Cravo da Índia. Eugenol. Toxicidade.

## ABSTRACT

Brazil is among the main producers of Essential Oils (EOs). Among the plants used is the *Syzygium aromaticum* (clove) which presents besides several pharmacological functions, described in the literature, the potential to be used as food preservative. Previous studies have shown by *in vivo* test that the *Syzygium aromaticum* EO concentration of 200 mg/kg showed no histopathological changes in liver, kidney, brain, lung, heart, spleen. Based on the evidence presented in this non-toxicity study of *Syzygium aromaticum* EO, we decided to evaluate *in vivo* the ability of a previously developed fermented milk drink, tested only *in vitro*, in which the standard chemical preservative, potassium sorbate, was replaced by clove EO, to be a functional food. For this, 24 male *Swiss* mice were divided into three groups by completely randomized design and submitted to behavioral analysis, insulin sensitivity test (IST) and glucose tolerance test (GTT). We also evaluated the glucose decay constant rate (Kitt), liver morphology and histopathology and we investigated the proinflammatory cytokines, interleukin 6 (IL6), interleukin 1 beta (IL1- $\beta$ ) and tumor necrosis factor-alpha (TNF $\alpha$ ) and anti-inflammatory, interleukin 10 (IL- 10), from the liver through the quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR), after administering daily 2 ml of the fermented milk drink with 2  $\mu$ l/ml clove essential oil for 30 days. The group that received the fermented milk drink with clove essential oil showed a lower glycemic level in GTT, a greater sensitivity to insulin and a greater Kitt, in relation to the other groups. The animals belonging to the three groups had no clinical or behavioral changes. The biochemical parameters, histopathological analysis of the liver and expression of proinflammatory and anti-inflammatory cytokines did not differ between the experimental groups with the control group. These results demonstrate that the fermented milk drink with clove essential oil at the concentration of 2  $\mu$ l/ml did not induce the toxicity of the animals, since no changes were found that indicated toxicity in the mice during the experimental period. In this way this drink has functional potential to be added to the diet of healthy individuals, and clove essential oil can function as a substitute for conventional chemical preservatives and reduce glycaemia.

**Keywords:** Cytokines. Clove. Eugenol. Toxicity.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### REVISÃO DE LITERATURA

Figura 1: *Syzygium aromaticum* (cravo da Índia)..... 20

### ARTIGO 1

Figura 1: Mean glucose concentration (mg/dL) per group after the intraperitoneal application of insulin (0.75 UI/kg body weight), in relation to time (min) ..... 40

Figura 2: Area under the plasma glucose curve (mg/dL) per group after the intraperitoneal application of insulin at a concentration of 0.75 UI/kg body weight, in relation to time (min) ..... 41

Figura 3: Mean glucose concentration (mg/dL) per group after the intraperitoneal application of glucose (2 g/kg body weight), in relation to time (min)..... 42

Figura 4: Area under the plasma glucose curve (mg/dL) per group after intraperitoneal application of glucose (2 g/kg body weight), in relation to time (min) ..... 43

Figura 5: Measurements of body weight of each group, from first to fourth week, according to the diet provided ..... 43

Figura 6: Energy efficiency of each group, evaluated at the end of the experiment, according to the body weight and kcal consumption provided by diets. .... 44

### ARTIGO 2

Figura 1: Efeito das diferentes dietas nos parâmetros bioquímicos que avaliam a integridade dos hepatócitos ..... 57

Figura 2: Efeito das diferentes dietas nos parâmetros bioquímicos que avaliam a funcionalidade dos hepatócitos ..... 58

Figura 3: Escore estratificado das alterações histopatológicas no fígado dos camundongos de acordo com a dieta fornecida ..... 59

Figura 4: Análise histopatológica do fígado de camundongos de acordo com as diferentes dietas ..... 60

Figura 5: Níveis de expressão do RNAm das citocinas pró-inflamatórias IL1 $\beta$ , IL6 e TNF $\alpha$  no fígado de camundongos de acordo com as diferentes dietas ..... 61

Figura 6: Nível de expressão do RNAm da citocina anti-inflamatória IL-10 no fígado de camundongos de acordo com as diferentes dietas..... 62

**LISTA DE TABELAS**

## REVISÃO DE LITERATURA

Tabela 1: Composição química do óleo essencial de <i>Syzygium aromaticum</i> isolada por hidrodestilação utilizando CG-EM .....	23
---	----

## ARTIGO 1

Table 1: The glucose decay constant rate Kitt (% per minute) during the insulin sensitivity test (Kitt, 15 minutes) and serum glucose values (mg/dl) (0, 15, 30, 60 and 120 minutes) per group .....	40
--	----

Table 2: Serum glucose (mg/dl) assessed from measurements at 0, 15, 30, 60 and 120 minutes per group after the intraperitoneal application of 2 g glucose/kg body weight.....	41
---	----

## ARTIGO 2

Table 1: Lista e sequência de primers usados no qRT-PCR.....	56
--	----

## LISTA DE ABREVIATURAS e SIGLAS

ALT	Alanino aminotransferase
ANOVA/ANAVA	Analysis of variance/ Análise da variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AST	Aspartato aminotransferase
A260nm/280nm	Razão das absorbâncias a 260 nanômetros por 280 nanômetros
BOD	Biochemical oxygen demand
C	Dependent values chosen for the statistical power and level of significance
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior Brasil
cDNA	Ácido Desoxirribonucleico complementar
CEUA/UFMG	Animal Experimentation Ethics Committee of the Minas Gerais Federal University/ Comitê de Ética em experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais
CEUA/Unimontes	Committee on Experimentation and Animal Welfare of the Montes Claros State University – Unimontes/ Comitê de Ética em experimentação Animal da Unimontes
CG-EM	Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas
CL <sub>50</sub>	Concentração letal média
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
d	Expected difference between the groups
DL <sub>50</sub>	Dose letal mediana
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazilo
EOs	Essential oils
EUA/USA	Estados Unidos da América
F	Primer Forward
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
g	Gramas
g/kg	Gramas por quilograma
g/ml	Gramas por mililitro
g/mL	Gramas por <i>mililitro</i>
G1	Grupo controle
G2	Grupo 2
G3	Grupo 3
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
glucose/kg	Glicose por quilograma
GLUTs	Glucose transportes

GRAS	Generally Recognized as Safe/Geralmente reconhecido como seguro
GTT / TTG	Glucose Tolerance Test / Teste de Tolerância a Glicose
H&E	Hematoxilina e Eosina
HDL	Lipoproteína de alta densidade
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
IL-10	Interleucina 10
IL1 $\beta$	Interleucina 1 beta
IL6	Interleucina 6
insulin/kg	Insulina por quilograma
IRC	<i>International Cancer Research (ICR)</i>
IST/TSI	Insulin Sensitivity Test / Teste de Sensibilidade a Insulina
Kcal	Quilocalorias
kcal/g	Quilocalorias por grama
Kitt	Glucose decay constant rate / Taxa de decaimento constante de glicose
MAPA	Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
mg/dL	Miligrama por decilitro
mg/kg	Miligrama por quilograma
min	Minutos
mL	Mililitro
M-MLV RT	<i>Moloney murine leukemia virus reverse</i>
n	Número de animais
ng	Nanograma
nm	Nanômetro
OE	Óleo essencial
OE/kg	Óleo essencial por quilograma
OECD	<i>Organisation for Economic Cooperation and Development</i>
OE <sub>s</sub>	Óleos essenciais
OMS	Organização Mundial da Saúde
PGC-1 $\alpha$	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha
pH	Potencial hidrogeniônico
PNPIC	Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares
qRT-PCR	Reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa quantitativa em tempo real
R	Primer Reverse

RNA	Ácido ribonucleico
RNA <sub>m</sub>	Ácido ribonucleico mensageiro
s	Coefficient of variation
<i>S. aromaticum</i>	<i>Syzygium aromaticum</i>
SGLTs	Sodium-dependent glucose cotransporters
SIRT <sub>s</sub>	Sirtuins
SUS/MG	Sistema Único de Saúde do Estado de Minas Gerais
TNF $\alpha$	Fator de necrose tumoral alfa
UHT	Temperatura ultra alta
UI	Unidade internacional
UI/kg	Unidades internacionais por quilograma
UNIMONTES	Universidade Estadual de Montes Claros
WHO	World health organization
$z\alpha$	Level of significance
$z\beta$	Statistical power
$\mu\text{g/mL}$	<i>Micrograma por mililitro</i>
$\mu\text{g/mL}^{-1}$	<i>Micrograma por mililitro</i>
$\mu\text{L}$	Microlitro
$\mu\text{l/ml}$	Microlitro por <i>mililitro</i>

**LISTA DE NOTAÇÕES OU SIMBOLOS**

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

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	16
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	18
2.1 Objetivo Geral .....	18
2.2 Objetivos Específicos .....	18
<b>3 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	19
3.1 Plantas Medicinais .....	19
3.2 Cravo da Índia .....	20
3.3 Atividade Biológica do <i>Syzygium aromaticum</i> .....	21
3.3.1 Atividade Antioxidante .....	21
3.3.2 Atividade antimicrobiana e antiparasitária .....	22
3.3.3 Atividade anti-inflamatória e antipirética .....	22
3.3.4 Atividade antinociceptiva .....	22
3.4 Óleos Essenciais .....	22
3.5 Atividades do O.E do cravo da Índia .....	23
3.6 Testes de Toxicidade <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> .....	24
3.6.1 Toxicidade do <i>Syzygium aromaticum</i> e Eugenol .....	24
3.7 Parâmetros bioquímicas no metabolismo dos animais .....	25
3.8 Citocinas hepáticas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias .....	26
3.9 Bebida Láctea Fermentada .....	26
3.10. Referências .....	28
<b>4 ARTIGOS</b> .....	33
4.1 Artigo 1 – Fermented milk drink with or without clove essential oil modulates the glycemic profile in mice. ....	33
4.2 Artigo 2 - Marcadores inflamatórios, parâmetros bioquímicos e histopatológicos em tecido hepático de camundongos alimentados com bebida láctea fermentada com adição de óleo essencial de cravo da Índia .....	50
<b>5 CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	67
<b>APÊNDICE(S)</b> .....	68
APÊNDICE A – Ficha de Identificação para as gaiolas do Grupos de Animais do Experimento .....	68
APÊNDICE B - Ficha de controle do peso individual dos animais de cada grupo por semana .	69
APÊNDICE C - Ficha de controle da quantidade de ração consumida pelos animais por semana .....	70
APÊNDICE D - Ficha de controle da quantidade de água consumida pelos animais por semana .....	71
<b>ANEXO(S)</b> .....	72
ANEXO A – Protocolo de aprovação pelo comitê de ética em experimentação animal - Unimontes .....	72
ANEXO B – Protocolo de aprovação pelo comitê de ética em experimentação animal – ICA/UFMG .....	73

## 1 INTRODUÇÃO

Os óleos essenciais (OEs) são produtos naturais extraídos de plantas por diversos métodos. Podem ser utilizados como substituto aos conservadores químicos, por apresentarem atividades farmacológicas distintas e conservar os alimentos (PEREIRA *et al.*, 2008). Entretanto, estudos *in vivo* para avaliar a toxicidade e ação no metabolismo de animais ou seres humanos que consomem subprodutos do leite como bebida láctea fermentada com adição de óleo essencial de *Syzygium aromaticum* são escassos. A realização de experimentos *in vivo* de toxicidade permite comprovar se os OEs podem ser acrescentados na alimentação e qual concentração não irá gerar efeito tóxico a saúde do consumidor (CARVALHO, 2012).

Com o avanço do mercado lácteo brasileiro e o desejo da população em consumir produtos com bases naturais, sem conservadores químicos e mais saudáveis, incentivam-se a realização de pesquisas e fabricação de subprodutos à base do soro do leite, como a bebida láctea fermentada, por ser alternativa alimentar viável, de baixo custo, fácil produção e contribui na redução do impacto ambiental causado por descarte do soro no meio ambiente (GAJO *et al.*, 2016).

O grupo de estudo em Biotecnologia (GEBIO), do Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Minas Gerais (ICA/UFMG), coordenado pelo professor Igor Brandi, desenvolveu uma bebida láctea fermentada de acordo com as normas preconizadas pela legislação brasileira vigente, para auxiliar na diminuição da subnutrição infantil e anemia. Essa bebida é composta pelo ferro e polpas de frutos do cerrado, como cajá, coquinho azedo, mangaba, tamarindo, umbu e cagaita.

Farias (2016), com o intuito de obter um produto totalmente natural e isento de aditivos químicos, utilizou a formulação da bebida láctea fermentada desenvolvida pelo GEBIO e substituiu o conservante químico, sorbato de potássio pelo óleo essencial de *Syzygium aromaticum* (cravo da Índia) em três diferentes concentrações. Foram realizadas análises da atividade antioxidante e antimicrobiana do óleo presente na bebida, durante 28 dias. Na concentração de 20 µl/mL, obteve-se um produto com poder antioxidante e antimicrobiano que pode ser funcional sem necessitar adicionar conservadores ou aditivos químicos.

Entretanto, como esse experimento foi realizado inicialmente apenas *in vitro* e na literatura não há relatos de experimentos com uso dessa bebida *in vivo*, torna-se necessário avaliar a ação dessa bebida no organismo, para ser considerada novo produto funcional, sem oferecer risco a saúde do consumidor.

Em relação ao óleo essencial de *S. aromaticum*, Liu *et al.* (2015) em um experimento com camundongos machos International Cancer Research (ICR) e ratos machos Sprague Dawley, avaliaram a toxicidade aguda e sub-crônica do óleo essencial de *S. aromaticum* e verificaram que na toxicidade aguda, a dose letal estimada foi de 4500 mg/kg e, os animais tratados com até 200 mg/kg não apresentaram alterações histopatológicas em fígado, rim, cérebro, pulmão, coração, baço. Mediante esse estudo prévio, a concentração na bebida de



200mg/kg do óleo de cravo da Índia pode ser utilizada sem ser necessário realizar previamente testes de toxicidade *in vivo* foi adotada nesse estudo.

Assim sendo, o presente estudo visa objetivar avaliar, após 30 dias, o efeito que a bebida láctea fermentada com adição adicionada de 2ul/ml do óleo essencial de cravo da Índia exerce no metabolismo organismo de camundongos, avaliando-se diversos parâmetros metabólicos relacionados com a glicemia, possível efeito de toxicidade hepática e modulação na expressão de marcadores inflamatórios.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Avaliar o comportamento sistêmico, perfil glicêmico, expressão de marcadores inflamatórios e metabolismo hepático, de camundongos alimentados com a bebida láctea fermentada com adição de óleo essencial de *Syzygium aromaticum*.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o peso dos animais e calcular a eficiência energética.
- Executar o teste de tolerância a glicose e sensibilidade a insulina.
- Realizar as análises dos parâmetros bioquímicos dos camundongos a partir da quantificação sérica da creatinina, alanino aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), albumina, colesterol total, lipoproteína de alta densidade (HDL), glicose ao fim do experimento.
- Examinar diariamente os animais quanto aos sinais de toxicidade, na locomoção, comportamento, respiração, alterações na pele e pelos, olhos, tremores, salivação, diarreia, letargia, sonolência a partir do escore de 0 a 4.
- Realizar a análise histopatológica do fígado.
- Averiguar a expressão de mRNA dos genes das citocinas pró-inflamatórias, interleucina 1 beta- IL1 $\beta$ , interleucina 6 - IL6 e fator de necrose tumoral alfa - TNF $\alpha$  e anti-inflamatória, interleucina 10 - IL-10, do fígado através do qRT-PCR.

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 Plantas Medicinais

A Organização Mundial da Saúde (OMS), define que as plantas medicinais são espécies vegetais usadas com fins terapêuticos. Entretanto há relatos quanto aos efeitos negativos à saúde. Por isso a OMS criou o manual de orientações técnicas, para plantio, colheita para que possam ser registradas e utilizadas em tratamentos de diversas enfermidades (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2003).

O Brasil detém a maior biodiversidade do mundo entre 15-20%. Possui 32.364 plantas registradas sendo endêmicas 18.932. O Cerrado é o terceiro no domínio fitogeográfico com 37%, na divisão das unidades federativas e Minas Gerais é o estado com a flora mais rica, pela forte influência das angiospermas (FORZZA *et al.*, 2010).

As plantas medicinais são matéria-prima para a fabricação dos fitoterápicos e outros produtos, sendo usadas em remédios caseiros através dos conhecimentos populares. Pelo fato do Brasil ter uma vasta diversidade cultural e étnica, a utilização é prática constante por grande parte da população. Os primeiros relatos foram feitos pelo padre José de Anchieta, que formulava receitas utilizando-as para tratar diversas enfermidades, porém as populações indígenas já usavam com fins terapêuticos (LAMEIRA; PINTO, 2008). Nesse contexto, viu-se a necessidade da criação da Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos a partir do Decreto nº 5.813, de 22 de junho de 2006, com o objetivo de garantir a todos a utilização das plantas medicinais e fitoterápicos de forma segura e racional, visando a sustentabilidade e desenvolvimento da indústria brasileira (BRASIL, 2016).

A Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC), foi aprovada em 2006, de acordo com as recomendações preconizadas pela Organização Mundial da Saúde para normalizar, adequar e implantar o uso de plantas medicinais e fitoterápicos no Sistema Único de Saúde (SUS) com o intuito de reduzir custos, aumentar as formas de terapias, preservar o meio ambiente e resgatar os conhecimentos da população de modo que os profissionais estejam preparados para a utilização.

Em 2010, foi criado o programa Farmácia Viva, responsável por todo o processamento das plantas medicinais desde o cultivo até a comercialização. Diversos municípios brasileiros estão inseridos nesse programa. A secretaria do Estado de Saúde de Minas Gerais percebeu a necessidade de conhecer as diferentes atividades praticadas para tratamentos realizados na rede pública de saúde do estado. A partir da Resolução nº 1.885, de 27 de maio de 2009 implementou estratégias preconizadas pela PNPIC no SUS/MG para que ocorra maior qualidade de vida a população, por integração multidisciplinar entre a cultura popular e a ciência.

Contudo, poucos brasileiros pesquisam o uso de fitoterápicos para utilização na saúde coletiva e os profissionais da saúde, em sua maioria, desconhecem ou encontram dificuldades

para prescrever plantas medicinais e orientar os pacientes como devem ser utilizadas (BRASIL, 2012).

### 3.2 Cravo da Índia

Dentre as plantas medicinais encontra-se o cravo da Índia (FIGURA 1), pertencente a família Myrtaceae, apresenta 76,2% dentre as espécies endêmicas no Brasil (FORZZA *et al.*, 2010). Tem nomes científicos variados, de acordo com a classificação, sendo o mais recente *Syzygium aromaticum* por Merrill et Perry, pela característica de suas flores. Entretanto, pode-se encontrar na literatura vários outros nomes tais como, *Eugenia caryophyllus* (Sprengel) Büllock et Harrison, *Caryophyllus aromaticus* L, *Eugenia caryophyllata* (Thunb) e *Eugenia aromatica* (L) Baill (MAEDA *et al.*, 1990).

**Figura 1:** *Syzygium aromaticum* (cravo da Índia)



Fonte: [goo.gl/afG95n](http://goo.gl/afG95n)

O *S. aromaticum* é originado das ilhas das Molucas, localizada entre as ilhas de Sulawesi e Nova Guiné. Possui de 12 a 15 metros de altura podendo viver por mais de 100 anos. Na Europa, era conhecido desde o século IV, na China no século III, utilizado como antisséptico bucal. Os portugueses ao perceberem o valor dessa especiaria estabeleceram o monopólio e tentaram realizar o cultivo nas colônias, porém não tinham condições climáticas favoráveis. No ano de 1770 mudas foram retiradas das ilhas Molucas e exportadas para diversos lugares, entre eles o Brasil. Por estar localizada em região tropical semelhante as ilhas Molucas as mudas do cravo da Índia se adaptaram bem ao país sobretudo a região Sul da Bahia, com a área plantada estimada em 8.000 hectares e produção de 4.000 toneladas (LUTFI; ROQUE, 2014).

Estudos relatam as propriedades medicinais que o cravo da Índia exerce como, atividades antimicrobiana (PROBST, 2012), anti-inflamatória e antipirética (TAHER *et al.*,

2015), antioxidante (SILVESTRI *et al.*, 2010), analgésica, anestésica, antisséptica, inseticida (SANTOS; OLIVEIRA; ALBUQUERQUE, 2012).

### 3.3 Atividade Biológica do *Syzygium aromaticum*

#### 3.3.1 Atividade Antioxidante

Antioxidante é a “substância que retarda o aparecimento de alteração oxidativa nos alimentos”, bloqueando os efeitos causados por radicais livres (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - ANVISA, 1961). O método 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) é o método colorimétrico, fácil rápido e econômico, sendo utilizado na determinação da capacidade antioxidante das substâncias. O DPPH é o radical livre, produz coloração violeta em etanol, quando o produto apresenta compostos antioxidantes, o DPPH é reduzido e produz solução transparente (OLIVEIRA, 2015; SILVESTRI *et al.*, 2010).

Em experimentação *in vitro* realizada por Silvestri *et al.*, (2010) com o teste DPPH para análise de atividade antioxidante frente a bactérias Gram-positivas e negativas, com oito diferentes concentrações óleo essencial(OE) de cravo da Índia variando de 150 a 10000 ( $\mu\text{g/mL}$ ). Resultados indicam que na concentração máxima do OE apresentou atividade antioxidante de 95,6%. Já Abdel-Wahhab; Aly (2005), realizaram a experimentação, com ratos alimentados com três dietas diferentes, para avaliar a capacidade do OE de *S. aromaticum* em eliminar radicais livres provenientes de dieta previamente contaminada com aflatoxinas, afim de protegê-los quanto à hepatonefrotoxicidade. Realizaram exames laboratoriais, e detectaram que os ratos que alimentaram-se das dietas com aflatoxinas tiveram alterações hematológicas e bioquímicas, entretanto quando acrescentou nessas dietas o OE de *S. Aromaticum* os parâmetros foram restabelecidos, e isso foi atribuído ao poder antioxidante do OE, demonstrando que o OE foi capaz de prevenir a hepatonefrotoxicidade e estresse oxidativo causado pelas aflatoxinas.

AL-Okbi *et al.* (2014) realizaram experimento com ratos alimentados com OE de cravo da Índia acrescido ou não a dieta, para avaliar através da análise dos parâmetros bioquímicos, a atividade desse OE na prevenção de esteatose hepática e dislipidemia nos ratos, que apresentou-se eficaz. Sendo assim, a utilização do OE de cravo da Índia na conservação de alimentos é viável uma vez que pode-se reduzir a quantidade de aditivos sintéticos (SILVESTRI *et al.*, 2010).

### 3.3.2 Atividade antimicrobiana e antiparasitária

Os compostos químicos ou princípios ativos de *S. aromaticum* apresentam diferentes atividades: antimicrobiana, com ação inibitória ao *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Salmonella spp.* (PROBST, 2012) e inseticida em teleóginas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* imersas no óleo com eficácia de 98,28% (SANTOS; OLIVEIRA; ALBUQUERQUE, 2012).

### 3.3.3 Atividade anti-inflamatória e antipirética

Taher *et al.* (2015) avaliaram a atividade anti-inflamatória e os efeitos antipiréticos, em camundongos com edema de pata induzido pela carragenina e a febre pela levedura de cerveja. Não houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ), em utilizar fármacos comerciais ou o OE de cravo da Índia para tratar a febre ou a inflamação nesses animais e a dose letal (DL50) foi superior a dose utilizada no experimento, não ocasionando risco de toxicidade quando utilizada até esse limite.

### 3.3.4 Atividade antinociceptiva

Apparecido *et al.* (2009) utilizaram camundongos machos para avaliar a atividade antinociceptiva do óleo essencial de eugenol, 30 minutos antes de induzir a constrição abdominal e muscular com solução de ácido acético aplicada por via intraperitoneal, administrou o OE em doses de 50, 75 e 100 mg/kg, por via oral, verificando que o eugenol apresenta atividade antinociceptiva periférica, de 61,6% a 88,3%.

## 3.4 Óleos Essenciais

Os óleos essenciais (OEs) foram inicialmente utilizados por Paracelsus Von Hohenheim, no século XVI, que os classificou como “quinta essencia”. São líquidos em forma de óleo e com aroma, chamados de óleos voláteis ou óleos etéreos, obtido a partir das folhas, hastes, flores, casca, raízes, sementes, de espécie vegetal (BURT, 2004).

Existem diversas metodologias para a obtenção dos OEs, como destilação por arraste de vapor, pressão a frio, extração com dióxido de carbono supercrítico e fermentação, sendo a destilação a vapor o método comercialmente mais utilizado (BURT, 2004). Este método é descrito na Farmacopeia Brasileira com a função de determinar o teor de óleos voláteis das plantas (ANVISA, 2010). A cromatografia gasosa associada a espectrometria de massas (CG-EM) é a técnica mais usada na classificação dos componentes (MONTANARI, 2010).

Os diferentes métodos para obtenção dos OEs, a altitude, latitude, temperatura, umidade relativa do ar, índice pluviométrico e solo podem influenciar a composição dos seus princípios ativos (MONTANARI, 2010).

Os OEs são compostos por hidrocarbonetos e alcoóis, solúveis em álcool e éter, lipofílicos, hidrofóbicos. Apresentam dois ou três compostos em maior quantidade, são divididos em duas classes: os terpenoides e fenilpropanoides. Os terpenoides são formados a partir de cinco unidades de carbono isoprênicas e são predominantes nos OEs. Enquanto que os fenilpropanoides estão em menor proporção e não tem ocorrência comum, quando presentes alteram as características sensoriais do óleo como é o caso do eugenol no cravo da Índia (MONTANARI, 2010).

### 3.5 Atividades do O.E do cravo da Índia

Chaieb *et al.* (2007) obtiveram 36 componentes de uma amostra de óleo essencial de *S. aromaticum* isolada por hidrodestilação utilizando a análise de CG-EM. Dentre os compostos, o eugenol apresentou maior concentração, (88,58%), seguido por o acetato de eugenol (5,62%) e  $\beta$ -cariofileno (1,39%) (TABELA 1).

**Tabela 1:** Composição química do óleo essencial de *Syzygium aromaticum* isolada por hidrodestilação utilizando CG-EM.

PRINCÍPIOS ATIVOS	CONCENTRAÇÃO (%)
Eugenol	88,58535
Acetato de eugenol	5,62086
$\beta$ -cariofileno	1,38830
2-heptanona	0,93232
Hexanoato de etila	0,66098
Humuleno	0,27527
$\alpha$ Humuleno	0,19985
Calacoreno	0,11437
Calameneno	0,10538
2-Heptanol, Octanoato de etila, 2Nonanona, Octanoato de etila, $\alpha$ -cubebene, Copaene, 2-Nonanol, Linalol, 2-Undecanona, Benzoato de metila, Benzoato de etila, Metil chavicol, $\alpha$ -amorfenol, Acetato de $\alpha$ -terpinil, $\alpha$ -Muurolene, Benzyl tiglate, Acetato de benzila, Carvona, $\gamma$ -Cadineno, Acetato de 2-fenetila, (E)-Anethole, calameneno, Álcool benzílico, Óxido de cariofileno, Metileugenol, óxido de humuleno, aldeído cinâmico, Cinamato de etila.	< 0,10000

**Fonte:** Adaptada de Chaieb *et al.* (2007).

### 3.6 Testes de Toxicidade *in vivo* e *in vitro*

Os óleos essenciais apresentam diferentes ações farmacológicas, por isso é importante verificar qual dose é tóxica quando optar por sua utilização. Diversos autores (LIU *et al.*, 2015; SOUZA, 2007; TAHER *et al.*, 2015) realizaram a avaliação da toxicidade de diferentes OEs, para posteriormente utilizá-los com finalidades terapêuticas.

Os testes para avaliar a toxicidade *in vivo* foram relatados inicialmente por Trevan em 1927, na qual tinha o intuito de encontrar a dose letal, de medicamentos para humanos, mediante a administração aos animais de forma única, que leva-se ao óbito de metade dos animais do grupo de ensaio chamado de Dose Letal 50 (DL50). Atualmente a *Organisation for Economic Cooperation and Development* (OECD), descreve em suas diretrizes como proceder os testes de toxicidade aguda e crônica através dos *Guidelines* 420/2001, 423/2001 e 425/2008 (VALADARES, 2006).

No Brasil a ANVISA, tem o objetivo de promover e proteger a saúde da população, em 2013, publicou o Guia para Comprovação da Segurança de Alimentos e Ingredientes. Este guia contém critérios sugestivos para avaliação da segurança dos produtos alimentícios, e as metodologias que o país adota para os testes de toxicidade *in vivo* que são fundamentais para que o produto forneça margem de segurança a saúde (ANVISA, 2013).

O Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) foi criado em 2008 com o objetivo de “formular e zelar pelo cumprimento das normas relativas à utilização humanitária de animais com finalidade de ensino e pesquisa científica”. Sendo a experimentação animal regulamentada pela Lei 11.794/2008, na qual permite a utilização de animais vivos a partir de técnicas previamente estabelecidas. A Resolução Normativa Nº 18, de 24 de setembro de 2014 relata que pode-se utilizar, no Brasil, os métodos preconizados pela OECD para avaliar a toxicidade oral aguda em animais como a OECD 420/2001 e 423/2001 (CONCEA, 2016).

A realização de testes de toxicidade permite comprovar se a planta medicinal utilizada pode ser registrada para uso humano em dose que não gere efeitos tóxicos. Ensaio *in vivo* na fitoterapia que indiquem a formulação e dose terapêutica são escassos, devido ao custo elevado e dificuldade de patentear produtos à base de extratos vegetais. Entretanto a realização de exames de toxicidade vem sendo feitos para definir dose, via de administração e os efeitos colaterais (CARVALHO, 2012).

#### 3.6.1 Toxicidade do *Syzygium aromaticum* e Eugenol

Liu *et al.* (2015) realizaram um experimento com camundongos machos *International Cancer Research* e ratos machos *Sprague Dawley* e avaliaram a toxicidade aguda e crônica do OE de *S. aromaticum*. Na toxicidade aguda o OE foi administrado por gavagem nas doses de 1000 a 5.000 mg/kg em grupos compostos por sete animais. Avaliaram parâmetros clínicos, atividade motora e postura, dos animais por 24 horas, registraram as mortes para determinar a



dose letal. Na dose de 3000 mg/kg ocorreu apenas uma morte, nas doses superiores a 4.000 mg/Kg os animais apresentaram anormalidades como cianose. Já na dose de 5.000 mg/kg o óbito foi dentro das 24 horas após a administração, sendo a dose letal estimada de 4500 mg/kg. Na toxicidade sub-crônica os animais foram tratados por 21 dias com doses de 0, 100, 200 e 400 mg/kg do OE por gavagem, após esse tempo os animais foram sacrificados e avaliou-se o exame histológico do fígado, rim, cérebro, pulmão, coração, baço. Os animais tratados com doses de até 200 mg/kg não apresentaram alterações histopatológicas. As doses utilizadas, de 15 a 200 mg/kg, para avaliar a atividade antidepressiva do OE, foram inferiores a dose letal estimada nesse experimento, sendo segura para essa finalidade.

Para avaliar a toxicidade aguda do eugenol Souza (2007), utilizou três grupos compostos de seis camundongos *swiss* cada, as doses foram administradas por via oral, através da gavagem, nas concentrações de 600, 1500 e 3000 mg/kg. Após a administração os animais foram observados durante duas horas, posteriormente a cada oito horas até completar 72 horas. Foi avaliada atividades de locomoção, motora, sedativa, piloereção, dispneia, ptose, micção e morte, para determinação da DL50 que foi de 1173,33 mg/kg. Na dose de 600 mg/kg os animais não apresentaram nenhuma alteração nos parâmetros comportamentais que determinam toxicidade aguda. Essa dose é superior as doses utilizadas no experimento que variaram de 1 a 100mg/kg, para avaliar as atividade antinociceptiva, anti-edematogênica e antipirética do eugenol.

O óleo essencial do *S. aromaticum* apresenta diferentes atividades farmacológicas e seu uso na alimentação pode ser viável, visto que a dose tóxica para os camundongos é superior as doses encontradas na literatura para o uso humano (LIU *et al.*, 2015). Estudos que relacionem a toxicidade por via oral, desse óleo, quando adicionado a alimentos ainda são escassos. Por isso, é necessário realizar estudos *in vivo*, com o óleo essencial do *S. aromaticum* para verificar a sua funcionalidade na alimentação.

### 3.7 Parâmetros bioquímicas no metabolismo dos animais

O fígado é responsável pelo metabolismo do corpo a partir do processamento dos micronutrientes provenientes da alimentação, remoção de toxinas e síntese de proteínas plasmáticas. Para avaliar a integridade das células, nos hepatócitos, são realizados exames bioquímicos séricos ou plasmáticos para verificar a concentração das enzimas hepatocelulares como aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT), sendo esta última a mais sensível para detectar dano hepático,. Já para verificar as funções dos hepatócitos, realiza-se a análise da concentração da albumina (ABBAS; KUMAR; FAUSTO, 2005).

### 3.8 Citocinas hepáticas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias

As citocinas são moléculas sinalizadoras produzidas pela série leucocitária, sendo constituintes importantes no desencadeamento e progressão da inflamação (citocinas pró-inflamatórias) ou remissão das injúrias (citocinas anti-inflamatórias) (DINARELLO 2000, ILANGUMARAN *et al.*, 2018).

As citocinas pró-inflamatórias, como, Interleucina 1 beta (IL1 $\beta$ ), Interleucina 6 (IL6) e fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), são liberadas na corrente sanguínea tanto do fígado como dos locais distais durante a lesão hepática (LACOUR *et al.*, 2005).

O TNF $\alpha$  é um dos biomarcadores que permite avaliar a disfunção hepática. Quando este se encontra em níveis elevados a infiltração de células inflamatórias torna-se crônica e a fibrose no fígado é instaurada (OSAWA *et al.*, 2013).

Após a liberação da TNF $\alpha$  e da IL1- $\beta$  na fase aguda da inflamação, o fígado libera também a IL6, que além de induzir a resposta inflamatória atua na defesa da lesão hepática. Quando a injúria hepática não é controlada, a sinalização da IL6 torna-se persistente e prejudica a regeneração dos hepatócitos, podendo até desenvolver tumores hepáticos (NIEDERREITER; TILG, 2018; SCHMIDT-ARRAS; ROSE-JOHN, 2016).

Em contrapartida, as citocinas pró-inflamatórias, a Interleucina 10 (IL10) destaca-se por apresentar elevada atividade anti-inflamatória. Na lesão hepática aguda e crônica, IL10 pode modular a proliferação dos danos gerados nos hepatócitos e modular a fibrose hepática instaurada (LOUIS *et al.*, 2003).

### 3.9 Bebida Láctea Fermentada

Bebida láctea fermentada com adição, é um produto na qual adiciona-se ao leite fermentado, conservante natural ou químico, e que não recebe tratamento térmico após ser fermentado, constituída por pelo menos 51% de produto lácteo com a quantidade de bactérias lácticas aceitas pela legislação vigente presentes durante toda a sua validade (BRASIL, 2005).

Os produtos lácteos fermentados apresentam teor nutricional similar ao do leite. E as diferenças que podem existir, em alguns de seus constituintes, ocorre devido ao processo adotado para a fermentação (GRANDI; ROSSI, 2010).

O soro do leite, no Brasil é um dos principais subprodutos utilizados para a fabricação de produtos como bebida láctea fermentada, sendo um complemento alimentar alternativo (GUEDES *et al.*, 2013). A obtenção desses subprodutos possui custo baixo e o processamento é viável, podendo utilizar equipamentos já disponíveis na indústria ou até mesmo realizar a fabricação caseira (PINTADO *et al.*, 2001). O soro do leite é composto de proteínas, carboidratos, minerais e vitaminas. A quantidade de proteína presentes nas bebidas lácteas sofre variação inversamente proporcional mediante a concentração de soro de leite utilizada (GRANDI; ROSSI, 2010).

O soro do leite pode ser utilizado *in natura* ou ser beneficiado por tratamento térmico e transformado em soro modificado, concentrado ou em pó. O soro do leite em pó apresenta maior tempo de prateleira o que auxilia na sua comercialização, por não ser necessário ser refrigerado, ser armazenado em menor volume e apresentar concentração de micronutrientes padronizada (GAJO *et al.*, 2016).

Para conservação das bebidas lácteas fermentadas podem ser utilizados como conservadores, ácido sórbico, sorbato de sódio, sorbato de potássio e sorbato de cálcio (BRASIL, 2005).

Com o avanço do mercado lácteo brasileiro e o desejo da população em consumir produtos com bases naturais, sem conservadores químicos e mais saudáveis, incentivam-se a realização de pesquisas e fabricação de subprodutos à base do soro do leite, como a bebida láctea fermentada, por ser alternativa alimentar viável, de baixo custo, fácil produção e contribui na redução do impacto ambiental causado por descarte do soro no meio ambiente (GAJO *et al.*, 2016).

Em um estudo elaborou-se bebidas lácteas fermentadas com adição de três diferentes óleos essenciais, *Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf, *Lippia alba* (Mill.) NE Brown. e *S. aromaticum*. como conservadores, substituindo o conservador padrão, sorbato de potássio, de acordo com os padrões preconizados pela legislação vigente. Dentre esses, o óleo essencial de *S. aromaticum* destacou-se por apresentar forte poder antioxidante e antimicrobiano (FARIAS, 2016).

Foram feitas análises da atividade antioxidante e antimicrobiana do OE de *S. Aromaticum* presente na bebida, para determinar as qualidades físicoquímicas e microbiológicas. Esse OE, durante 28 dias foi capaz de conservar a bebida frente as bactérias patogênicas e não interferiu nas concentração das bactérias lácticas. Na concentração de 10, 20 e 30  $\mu\text{L/mL}$  obteve-se um produto que pode ser funcional sem necessitar adicionar conservadores ou aditivos químicos (FARIAS, 2016).

Como esse experimento foi realizado inicialmente *in vitro* e na literatura não há relatos de experimentos com uso dessa bebida *in vivo*, torna-se necessário avaliar a ação dessa bebida no organismo, para ser considerada novo produto funcional, sem oferecer riscos a saúde do consumidor.

### 3.10. Referências

ABBAS, A. K.; KUMAR, V.; FAUSTO, N.. **Robbins & Cotran: Bases Patológicas Das Doenças**. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.

ABDEL-WAHHAB, M. A.; ALY, S. E. Antioxidant property of *Nigella sativa* (black cumin) and *Syzygium aromaticum* (clove) in rats during aflatoxicosis. **Journal of applied toxicology**, v.25, n. 3, p. 218-223, 2005. Disponível em: <goo.gl/WXYbwy>. Acesso em: 30 dez. 2018.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Decreto nº 50.040, de 24 de janeiro de 1961. **Normas Técnicas Especiais Reguladoras do emprêgo de aditivos químicos a alimentos**. Brasília, DF, 24 jan. 1961. Disponível em: <goo.gl/g4Qedn>. Acesso em: 30 dez. 2018.

\_\_\_\_\_. **Farmacopeia brasileira**. 5. ed. Brasília: ANVISA, 2010. v. 1 Disponível em: <goo.gl/cpXiFN>. Acesso em: 30 dez. 2018.

\_\_\_\_\_. **Guia para comprovação da segurança de alimentos e ingredientes**. Brasília: ANVISA, 2013. Disponível em: <goo.gl/1UBMtb>. Acesso em: 30 dez. 2018.

AL-OKBI, S. Y. *et al.* Protective effect of clove oil and eugenol microemulsions on fatty liver and dyslipidemia as components of metabolic syndrome. **Journal of medicinal food**, v. 17, n. 7, p.764-771, 2014. Disponível em: <goo.gl/vgGSDa>. Acesso em: 30 dez. 2018.

APPARECIDO, D. N. *et al.* Anti-inflammatory and antinociceptive activities of eugenol essential oil in experimental animal models. **Revista brasileira de farmacognosia**, v. 19, n. 1, p. 212-217, 2009. Disponível em: <goo.gl/qz8DrK>. Acesso em: 30 dez. 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: <goo.gl/8qJBDG>. Acesso em: 30 dez. 2018.

\_\_\_\_\_. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Práticas integrativas e complementares: plantas medicinais e fitoterapia na atenção básica**. Brasília: Ministério da Saúde, 2012. n.31. Disponível em: <goo.gl/kIJZaB>. Acesso em: 30 dez. 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. **Política e Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos**. Brasília: MS, 2016. Disponível em: <goo.gl/gmxVR7>. Acesso em: 30 dez. 2018.

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: <goo.gl/TzQhuJ>. Acesso em: 30 dez. 2018.

CARVALHO, J. C. T. Fitoterápicos e fitoterapia. In: \_\_\_\_\_. **Formulário médico e farmacêutico de fitoterapia**. 3. ed. São Paulo: Pharmabooks, 2012. cap. 1. p. 1-9. Disponível em: <goo.gl/WknceH>. Acesso em: 21 mar. 2017.

CHAIEB, K. *et al.* The chemical composition and biological activity of clove essential oil, *Eugenia caryophyllata* (*Syzygium aromaticum* L. Myrtaceae): a short review. **Phytotherapy research**, v. 21, n. 6, p. 501-506, 2007. Disponível em: <goo.gl/fUknEY>. Acesso em: 30 dez. 2018.

CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL. Ministério da ciência, tecnologia e inovação. **Normativas do CONCEA para produção, manutenção ou utilização de animais em atividades de ensino ou pesquisa científica**. Lei, Decreto, Portarias, Resoluções Normativas, Orientações Técnicas. 3. ed. Brasília: CONCEA, 26 set. 2016. Disponível em: <goo.gl/Gi1EBn>. Acesso em: 30 dez. 2018.

DINARELLO, C. A.. Proinflammatory Cytokines. **Chest**, v. 118, n. 2, p.503-508. 2000. Disponível em: <goo.gl/VwPzrg>. Acesso em: 30 dez. 2018.

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.

FORZZA, R. C. *et al.* **Catálogo de plantas e fungos do Brasil**. Rio de Janeiro: Andrea Jakobsson Estúdio; Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2010. v.1. Disponível em: <goo.gl/uy6P5X>. Acesso em: 30 dez. 2018.

GAJO, F. F. S. *et al.* Diagnóstico da destinação do soro de leite na mesorregião do campo das vertentes – Minas Gerais. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 71, n. 1, p.26-37, 2016. Disponível em: <goo.gl/5uHyHO>. Acesso em: 30 dez. 2018.

GRANDI, A Z D; A ROSSI, D. Avaliação dos itens obrigatórios na rotulagem nutricional de produtos lácteos fermentados. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, S, v. 69, n. 1, p.62-68, 2010. Disponível em: <goo.gl/dThPSE>. Acesso em: 30 dez. 2018.

GUEDES, A. F. L. M. *et al.* Aproveitamento de soro lácteo na formulação de bebidas com frutas e hortaliças. **Arquivo brasileiro de medicina veterinária e zootecnia**, v. 65, n. 4, p.1231-1238, 2013. Disponível em: <goo.gl/FNJLhh>. Acesso em: 30 dez. 2018.

ILANGUMARAN, S; MORIGGL, R; KALVAKOLANU, D V. Editorial: Cytokines in liver diseases. **Cytokine**, p.1-3. 2018. Disponível em: <goo.gl/V5w79Q>. Acesso em: 30 dez. 2018.

LACOUR, S *et al.* Cytokines as potential biomarkers of liver toxicity. **Cancer biomarkers**, v. 1, n. 1, p.29-39, 2005. Disponível em: <goo.gl/nB5iYZ>. Acesso em: 30 dez. 2018.

LAMEIRA, O. A.; PINTO, J. E. B. P. História e Importância das Plantas Medicinais. In: LAMEIRA, O A.; PINTO, J. E. B. P. **Plantas medicinais: do cultivo, manipulação e uso à recomendação popular**. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, cap. 1. p. 10-13, 2008.

LIU, B-B *et al.* Essential Oil of *Syzygium aromaticum* reverses the deficits of stress-induced behaviors and hippocampal p-ERK/p-CREB/Brain-Derived neurotrophic factor expression. **Planta medica**, v. 81, n. 03, p. 185-192, 2015. Disponível em: <goo.gl/Eu9psR>. Acesso em: 30 dez. 2018.

LOUIS, H *et al.* Modulation of liver injury by interleukin-10. **Acta gastroenterol belg**, v. 66, n. 1, p.7-14, 2003. Disponível em: <goo.gl/F1MZeL>. Acesso em: 30 dez. 2018.

LUTFI, M.; ROQUE, N. F. Histórias de Eugênicas. **Química nova na escola**, v. 36, n. 4, p. 252-260, 2014. Disponível em: <goo.gl/3hL3kq>. Acesso em: 30 dez. 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: <goo.gl/bPRuxm>. Acesso em: 30 dez. 2018.

MONTANARI, R. M. **Composição química e atividades biológicas dos óleos essenciais de espécies de Anacardiaceae, Siparunaceae e Verbenaceae**. 2010. 159 f. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2010. Disponível em: <goo.gl/BYVaZP>. Acesso em: 30 dez. 2018.

WIEDERREITER, L; TILG, H. Cytokines and fatty liver diseases. **Liver Research**, v. 2, n. 1, p.14-20, 2018. Disponível em: <goo.gl/u1N97h>. Acesso em: 30 dez. 2018. OLIVEIRA, G. L. S. Determinação da capacidade antioxidante de produtos naturais in vitro pelo método do DPPH: estudo de revisão. **Revista brasileira de plantas medicinais**, v. 17, n. 1, p. 36-44, 2015. Disponível em: <goo.gl/St5uD2>. Acesso em: 30 dez. 2018.

ORGANISATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). **Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD 420**. Acute Oral Toxicity-Fixed Dose Procedure. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris, 2001. Disponível em: <goo.gl/qZNX4d>. Acesso em: 30 dez. 2018.

ORGANISATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). **Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD 423**. Acute Oral Toxicity-Acute Toxic Class Method. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris, 2001. Disponível em: <goo.gl/y3BU1H>. Acesso em: 30 dez. 2018.

ORGANISATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). **Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD 425**. Acute Oral Toxicity-Modified Up and Down Procedure. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris, 2001. Disponível em: <goo.gl/VVJZnH>. Acesso em: 30 dez. 2018.

OSAWA Y. *et al.* Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  Promotes Cholestasis-Induced Liver Fibrosis in the Mouse through Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-1 Production in Hepatic Stellate Cells. **Plos one**. Disponível em: <goo.gl/VVJZnH>. Acesso em: 30 dez. 2018.

PEREIRA, A. D. A. *et al.* 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>. Acesso em: 30 dez. 2018.

PINTADO M. E., *et al.* Review: technology, chemistry and microbiology of whey cheeses. **Food science and technology**, v. 7, p. 105-116, 2001. Disponível em: <goo.gl/898MWk>. Acesso em: 30 dez. 2018.

PROBST, I. D. S.. **Atividade antibacteriana de óleos essenciais e avaliação de potencial sinérgico**. 2012. 102 f. Tese (Doutorado) – Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu, 2012. Disponível em: <goo.gl/2vMFyi>. Acesso em: 30 dez. 2018.

SANTOS, A. V.; OLIVEIRA, R. A. D.; ALBUQUERQUE, G. R. Efeito *in vitro* do extrato de Nim (*Azadirachta indica*) e óleo essencial de cravo (*Syzygium aromaticum*) sobre *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Revista brasileira de medicina veterinária**, v. 34, n. 2, p. 111-115, 2012. Disponível em: <goo.gl/WUDVb6>. Acesso em: 30 dez. 2018.

SCHMIDT-ARRAS D, ROSE-JOHN S. 2016. IL-6 pathway in the liver: From physiopathology to therapy. *J Hepatology* doi:10.1016/j.jhep.2016.02.004.

SILVESTRI, J. D. F. *et al.* Perfil da composição química e atividades antibacteriana e antioxidante do óleo essencial do cravo-da-índia (*Eugenia caryophyllata* Thunb.). **Revista ceres**, v. 57, n. 5, p. 589-594, 2010. Disponível em: <goo.gl/5FRIsY>. Acesso em: 30 dez. 2018.

SOUZA, T. F. S. N. N. D. **Efeito antinociceptivo e antiedematogênico do eugenol**. 2007. 84 f. Dissertação (Mestrado Acadêmico em Ciências Fisiológicas) – Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2007. Disponível em <goo.gl/x8ec7J>. Acesso em: 30 dez. 2018.

TAHER, Y. A. *et al.* Experimental evaluation of anti-inflammatory, antinociceptive and antipyretic activities of clove oil in mice. **Libyan journal of medicine**, v. 10, n. 1, p.1-7, 2015. Disponível em: <goo.gl/bFPKax>. Acesso em: 30 dez. 2018.

TREVAN, J W. **The error of determination of toxicity**. p.483-514, 26 mar. 1927. Disponível em: <goo.gl/5TPG6r>. Acesso em: 30 dez. 2018.

VALADARES, M. C. Avaliação de toxicidade aguda: estratégias após a “era do teste DL50”. **Revista eletrônica de farmácia**, v. 3, n. 2, p. 93-98, 2006. Disponível em: <goo.gl/JXdx5>. Acesso em: 30 dez. 2018.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO guidelines on good agricultural and collection practices (GACP) for medicinal plants**. Geneva: WHO, 2003. Disponível em: <goo.gl/2zuxGT>. Acesso em: 30 dez. 2018.



## 4 ARTIGOS

4.1 Artigo 1 – Fermented milk drink with or without clove essential oil modulates the glyceimic profile in mice.

Este artigo foi elaborado conforme as normas da revista *Plos one*, na qual já foi submetido.



## 25 **Abstract**

26

27 Fermented milk drink is produced from cheese whey for human and animal nutrition as an  
28 alternative to industry by-products that are often discarded. With the objective of producing an  
29 alternative food with functional properties but without chemical preservatives, we added clove  
30 essential oil to the fermented milk drink (2  $\mu\text{l/ml}$ ). Then, we evaluated the effects of oil  
31 supplementation on the glycemic profile. To this end, twenty-four male Swiss mice were divided  
32 into three groups by completely randomized design and submitted to insulin sensitivity (IST) and  
33 glucose tolerance (GTT) testing. Analysis of Variance (ANOVA) was used as an assessment  
34 tool, with  $p < 0.05$  on the *Tukey* test as the level of significance to evaluate the effects of the oil  
35 on the glycemic profile. The glucose decay constant rate (Kitt) in the IST was measured by  
36 linear regression. The group that received the fermented milk drink with clove essential oil  
37 showed a lower glycemic level in GTT, a greater sensitivity to insulin and a greater Kitt, in  
38 relation to the other groups. These results demonstrate that the fermented milk drink with clove  
39 essential oil at a concentration of 2  $\mu\text{l/ml}$  has functional potential, perhaps to be added to the  
40 diet of healthy individuals, and that it can function as a substitute for conventional chemical  
41 preservatives and reduce glycemic levels.

42

43 **Keywords:** *Syzygium aromaticum*. Swiss. Glucose Tolerance Test. Insulin Sensitivity Test.  
44 Natural preservative.

45

46

## 47 **Introduction**

48

49 Medicinal plants with broad therapeutic spectra are used to prevent and cure various  
50 pathologies [1]. The clove (*Syzygium aromaticum*) stands out as one of the traditional spices  
51 used in food preservation and has potent antioxidant and antimicrobial activities. Its benefits are  
52 linked to its phytoconstituents, including its essential oils (EOs) [2].

53

54 Natural products and chemical-free consumptions are being increasingly valued. Among  
55 them, the fermented milk drink produced from whey is a viable food alternative, as it reduces  
56 the environmental impact caused by the discarded whey. It thus has low cost and a high  
57 nutritional value. When it is supplemented with clove essential oil as a natural preservative, it  
58 can be considered a functional food, because the clove essential oil can modify gastrointestinal  
59 tract physiology, alter biochemical parameters and reduce and minimize the effects of some  
60 pathologies [3].

61

62 The *Food and Drug Administration* (FDA) recognizes clove essential oil as Generally  
63 Recognized as Safe (GRAS) under prescribed conditions and when it is included in the food for  
64 which it is intended [4]. For clove EO to gain approval for addition to fermented milk and be  
65 classified as a functional product, *in vivo* toxicity studies must be carried out to evaluate the EO

64 pharmacological activities exerted on the organism and to determine if this concentration will  
65 produce any toxic effects [4, 5].

66 The small intestine is responsible for absorbing dietary nutrients [6]. Glucose tolerance  
67 and insulin sensitivity tests *in vivo* aim to assess carbohydrate metabolism and determine if the  
68 diet provided generates metabolic changes, such as glucose intolerance or insulin resistance  
69 [7].

70 In the literature, although previous studies have evaluated the *Syzygium aromaticum*  
71 essential oil used in different pharmacological activities in mice [8, 9], to date, no *in vivo*  
72 experiments have reported using it as a preservative in fermented milk drink.

73 Therefore, the objective of the present study was to evaluate whether the fermented milk  
74 drink with clove essential oil compared to the control diet and with the diet composed by  
75 fermented milk drink without essential clove oil was able to modulate the glycemic profile of  
76 male Swiss mice.

77

## 78 **Materials and methods**

79

### 80 **Animals**

81

82 This study was approved by the Animal Experimentation Ethics Committee of the Minas  
83 Gerais Federal University - CEUA/UFMG, under protocol number 231/2017 and by the Ethics  
84 Committee on Experimentation and Animal Welfare of the Montes Claros State University -  
85 Unimontes, under process number 149/2017.

86 The number of animals per group was defined through calculation:  $n = 1 + [2C \cdot (s/d)^2]$ .  $C =$   
87  $(z\alpha + z\beta)^2$ ,  $C$  is dependent on the values chosen for the statistical power and level of  
88 significance,  $z\alpha$  at 5% is equal to 1,96,  $z\beta$ , o statistical power, in the health area is used 90%,  
89 being equal to 1,282 [10].  $C = (1,96 + 1,282)^2$ .  $C = 10,51$ ,  $s$  is the coefficient of variation, and  $d$  is  
90 the expected difference between the groups, to obtain  $p < 0,05$ . Considering a maximum  
91 deviation of 28%, since the liver is the organ with the highest biological variability [11] and a  
92 percent difference between groups of 50%, substituting the values of formula  $n = 1 +$   
93  $[2 \times 10,51 \cdot (0,28/0,50)^2]$ , the  $n$  is equal to 7,59. Thus rounding this value we have eight animals  
94 per group.

95 The animal experimentation used 24 four-week-old male *Swiss* mice from the Animal  
96 Experimentation Center of the Montes Claros State University - Unimontes, where the study  
97 was carried out.

98 The eight animals of each group were housed in one cage with maximum capacity of ten  
99 animals, with iron covers and partitions for a water fountain and a feeder, with solid floors and  
100 sawdust bedding changed daily. Mice were identified with Violet Gentian Solution 1%. The  
101 ambient light was controlled in a 12-hour light/dark cycle with a temperature of 22 °C, controlled  
102 by exhaust fans and air conditioning. The relative humidity was set at 45-65%. The same  
103 environmental conditions and water supply *ad libitum* were maintained during the entire

104 experiment. The animals went through a seven-day adaptation period, were fed ad libitum with  
105 a standard diet based on a labina® ration containing 23.3% proteins, 55.6% carbohydrates and  
106 2.6% lipids, and 4.0 kcal/g total energy. Water was supplied ad libitum.

107

### 108 **Division of Groups**

109

110 At four weeks of age, the animals were divided into three groups (n = 8 each), completely  
111 randomized design and fed the respective experimental diets for four weeks. In order for the  
112 diets to be isocaloric and the three groups would consume the same amount of Kcal daily, the  
113 feed was given to each group in a controlled manner and the water was supplied *ad libitum*. The  
114 diets were adjusted weekly according to the average body weight of the animals in each group,  
115 measured once a week.

116 In the control group (G1), the animals were fed only with their ration. In group two (G2),  
117 the animals were given their ration plus the fermented milk drink. In group three (G3), the  
118 animals were given their ration plus the fermented milk drink with the addition of clove essential  
119 oil.

120 From the body weight of the animals, it was possible to calculate the average weekly  
121 energy efficiency of each group, given by the division of the weight gain (g), by the total  
122 consumption (Kcal) of the diets [12].

123

### 124 **Preparation, caloric determination, and physico-chemical analyses of the fermented milk 125 drink**

126

127 The fermented milk drink and the fermented milk drink with *Syzygium aromaticum*  
128 essential oil were prepared weekly in triplicate at the Food Technology Laboratory (Agrarian  
129 Sciences Institute - Minas Gerais Federal University ICA/UFMG), in the proportions provided in  
130 the legislation [13, 14].

131 Both drinks contained 44.5% whole milk UHT, 44.5% reconstituted whey powder (15%),  
132 10% crystal sugar, 1% modified starch, and 0.1% thermophilic DVS lactic culture. For the  
133 fermented milk drink control, the chemical preservative potassium sorbato (0.003 g/mL) was  
134 added. In the test group, clove essential oil (2 µl/ml) was added to the fermented milk drink  
135 instead.

136 To make each drink, two blends were produced. The first was composed of UHT milk,  
137 modified starch and sugar, which was homogenized with to the magnetic stirrer and heated until  
138 the temperature reached 37 °C, as checked with a digital thermometer. The second mixture,  
139 containing previously homogenized reconstituted whey powder and mineral water, was added  
140 to the first mixture and heated to precisely 42 °C, then the lactic culture was added and  
141 homogenized. 50 mL of each drink was transferred to falcon tubes for pH measurement on a  
142 benchtop pH metre, and stored in the BOD incubator at 43 °C. The pH was measured every  
143 hour and when it reached 4.6, the drinks were cooled in a refrigerator until reaching 5 °C. The

144 formed clot was agitated and undone. Then, 2 µl/mL *S. aromaticum* essential oil or 0.003 g/mL  
145 potassium sorbate used as a preservative was added to the fermented milk drink. The drinks  
146 were agitated so that the oil and the chemical preservative were homogeneously distributed and  
147 stored in sterile vials in quantity for daily use at 5 °C.

148 In previous studies [9], drinks with clove essential oil at 2 µl/mL were used, because this  
149 concentration does not present acute or chronic toxic effects or cause histopathological  
150 changes in the liver, kidney, brain, lung, heart, or spleen.

151 The physico-chemical analyses were carried out in the Bromatology Laboratory (Agrarian  
152 Sciences Institute - Minas Gerais Federal University ICA/UFMG in Montes Claros). They were  
153 quantified by titulometry, titratable acidity, and the protein content by the *Kjeldahl* method, and  
154 the lipid contents were assessed by the *Mojonnier* method, according to Normative Instruction  
155 no. 68 of the Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento - MAPA [15]. The  
156 microbiological analyses were performed at the Animal Sanity Laboratory of the Center for  
157 Agrarian Sciences Research-CPCA. To investigate the *Salmonella sp.* presence, the total and  
158 thermotolerant coliforms and milk bacteria counts were assessed according to the  
159 methodologies described in the MAPA Normative Instructions no. 62/2003 [16], 68/2006 [15] e  
160 46/2007 [14]. Both analyses were completed before the drinks were released for animal  
161 consumption.

162 The caloric value of the drinks was determined through calorimetric analysis in the  
163 Bromatology Laboratory (Agrarian Sciences Institute - Minas Gerais Federal University  
164 ICA/UFMG in Montes Claros). Ten mL of each drink were placed in petri dishes and stored in a  
165 forced circulation oven at 65 °C for 24-48 hours until a constant weight was obtained in order to  
166 remove excess moisture and obtain the total solids according to an adapted methodology [15].  
167 The total solids were transferred to a crucible and placed in the adiabatic calorimetric pump *IKA*  
168 *C5000®* in order to obtain the calories amount per drinks gram. The drinks were standardized  
169 so that the diets were isocaloric.

170

#### 171 **Administration of fermented milk drinks**

172

173 The G2 animals received 2 mL fermented milk drink by gavage and the G3 animals  
174 received 2 mL fermented milk drink with the *S. aromaticum* essential oil by gavage, daily at  
175 07:00 AM for 30 days.

176

#### 177 **Metabolic tests**

178

179 The glycemic profile was performed on the 21st and 23rd experiment days at the capillary  
180 glycaemia level. To evaluate the insulin resistance and glucose intolerance, insulin sensitivity  
181 (IST) and glucose tolerance (GTT) tests were performed.

182 The IST was done in the morning of the 21st experiment day with animals in the fed  
183 state, by the intraperitoneal application 0.75 UI of insulin/kg body weight [7]. The glucose decay

184 constant rate (Kitt) was calculated using the formula  $0.693/t_{1/2}$ , in which the serum glucose was  
185 obtained by the analysis of the slope of the linear regression obtained by the linear constant  
186 from 0 to 15 minutes after insulin administration [17].

187 The GTT was performed on the 23rd experiment day in animals that had fasted for 12  
188 hours, through the intraperitoneal application 2 g of glucose/kg body weight [18].

189 Both measurements of blood glucose were performed using the portable glucometer and  
190 the glycemic strips of the Alere G2® according to the manufacturer's specifications. Blood drops  
191 were collected from a small cut at the tail, and these samples were used to check the glycaemia  
192 before the application time, at time 0, and at 15, 30, 60 and 120 minutes after the application.

193 All 24 mice complete the study, at the end of the experiment, the animals were  
194 euthanized by guillotine decapitation after 12 hours of fasting.

195

196

### 197 **Statistical analysis**

198

199 Analysis of variance (ANOVA) testing was performed. To evaluate the glucose  
200 concentration in the GTT and IST, *two-way* ANOVA was used. The area-under-curve of the  
201 GTT and IST were calculated by the trapezoidal method [19]. When there were differences  
202 between groups at significance levels of 5% ( $p < 0.05$ ), the Tukey test was performed. For the  
203 glucose decay constant rate evaluation (Kitt) in the IST, linear regression analysis was  
204 completed by obtaining the constant value of the slope from 0 to 15 minutes using the formula  
205  $0.693/t_{1/2}$ . All analyses used the program *GraphPad Prism software* (Version 7.0©, San Diego,  
206 California, USA).

207

### 208 **Results**

209

210 In the glucose decay constant rate per minute evaluation (Kitt) of group three, animals  
211 were fed a normal ration with the addition of the fermented milk drink with *S. aromaticum*  
212 essential oil. Importantly, these animals presented with a higher Kitt of 11.4% (Table 1),  
213 compared to the other groups.

214

215

216 **Table 1. The glucose decay constant rate Kitt (% per minute) during the insulin sensitivity**  
 217 **test (Kitt, 15 minutes) and serum glucose values (mg/dl) (0, 15, 30, 60 and 120**  
 218 **minutes) per group.**

Group	Kitt (0-15 min)	Serum Glucose mg/dl				
		0 min.	15 min.	30 min.	60 min.	120 min.
G1	8.2%	152.5 <sup>a</sup> ± 3.5	139.3 <sup>a</sup> ± 5.9	121 <sup>a</sup> ± 5.7	117.5 <sup>a</sup> ± 4.9	124.8 <sup>a</sup> ± 5.7
G2	9.7%	116.3 <sup>b</sup> ± 6.6	101.3 <sup>b</sup> ± 2.9	92 <sup>b</sup> ± 3	108.8 <sup>ab</sup> ± 6.8	117.8 <sup>a</sup> ± 6.1
G3	11.4%	127 <sup>b</sup> ± 3.5	105.3 <sup>b</sup> ± 6.8	85 <sup>b</sup> ± 2.9	105.3 <sup>b</sup> ± 6.9	117.7 <sup>a</sup> ± 8.6

219 G1, Group nourished - control: diet with only ration; G2, isocaloric nourished group to G1: diet  
 220 with ration + fermented milk drink; G3, isocaloric nourished group to G1: diet with ration +  
 221 fermented milk drink with clove essential oil.

222 Values expressed by group as the mean ± standard deviation.

223 Based on the Tukey test ( $p < 0.05$ ), the averages followed by the same letter in the same  
 224 column did not differ from each other.

225

226 The glucose concentration in the first 15 minutes declined linearly. After 120  
 227 minutes of insulin application, the glucose concentration in each group was close to the glucose  
 228 level measured at the initial time (Table 1). Therefore, the animals in the groups did not present  
 229 resistance to insulin once glycaemia began after 60 minutes (Fig. 1).

230

231 **Figure 1. Mean glucose concentration (mg/dL) per group after the intraperitoneal**  
 232 **application of insulin (0.75 UI/kg body weight), in relation to time (min).**

233

234

235

236

237

238

239

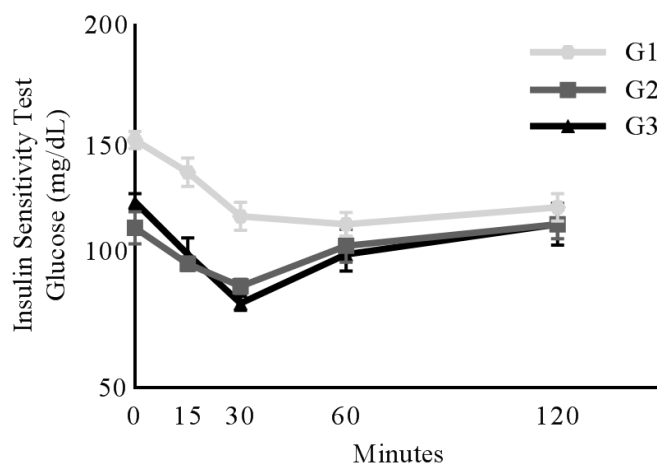
240

241

242

243

244



245 G1, Group nourished - control: diet with only ration; G2, isocaloric nourished group to G1: diet  
 246 with ration + fermented milk drink; G3, isocaloric nourished group to G1: diet with ration +  
 247 fermented milk drink with clove essential oil.

248



249 The groups fed with milk drinks (G2 and G3) presented a smaller area under curve  
 250 ( $p < 0.05$ ) when compared with the control group (Fig. 2). G3 presented a smaller area,  
 251 demonstrating that the drink with clove essential oil can regulate the glucose level of the cells.

252

253 **Figure 2. Area under the plasma glucose curve (mg/dL) per group after the intraperitoneal**  
 254 **application of insulin at a concentration of 0.75 UI/kg body weight, in relation to time**  
 255 **(min).**

256

257

258

259

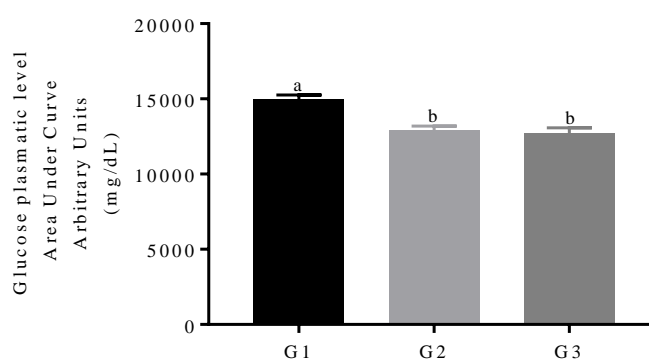
260

261

262

263

264



265

266

267

268

269

270

271

272

273

274

275

276

277

G1, Group nourished - control: diet with only ration; G2, isocaloric nourished group to G1: diet with ration + fermented milk drink; G3, isocaloric nourished group to G1: diet with ration + fermented milk drink with clove essential oil.

According to the results of the Tukey test ( $p < 0.05$ ), averages followed by the same letter did not differ from each other.

In the glucose tolerance test, the groups presented  $p > 0.05$  at the times 0 and 120 minutes. Each group serum glucose (mg/dl), at 120 minutes, was close to baseline time 0, indicating that the animals presented with normal glucose tolerance (Table 2).

**Table 2. Serum glucose (mg/dl) assessed from measurements at 0, 15, 30, 60 and 120 minutes per group after the intraperitoneal application of 2 g glucose/kg body weight**

Group	Serum Glucose mg/dl				
	0 min.	15 min.	30 min.	60 min.	120 min.
G1	94.5 <sup>a</sup> ± 2.6	284.3 <sup>a</sup> ± 11.5	339.8 <sup>a</sup> ± 15.1	204.0 <sup>a</sup> ± 8.3	102.3 <sup>a</sup> ± 13.7
G2	89.3 <sup>a</sup> ± 5.6	259.8 <sup>a</sup> ± 1.7	243.3 <sup>b</sup> ± 22.5	164.8 <sup>b</sup> ± 12.4	92.0 <sup>a</sup> ± 3.6
G3	88.2 <sup>a</sup> ± 8.5	228.3 <sup>b</sup> ± 21.9	235.8 <sup>b</sup> ± 5.9	124 <sup>c</sup> ± 18.2	92.5 <sup>a</sup> ± 13.2

278

279

280

281

282

283

G1, Group nourished - control: diet with only ration; G2, isocaloric nourished group to G1: diet with ration + fermented milk drink; G3, isocaloric nourished group to G1: diet with ration + fermented milk drink with clove essential oil.

Values expressed by group as the mean ± standard deviation.

By the Tukey test ( $p < 0.05$ ), averages followed by the same letter in the same column did not differ from each other.

284

285 Fig. 3 represents the groups glycemic curve as a function of time (minutes). The glucose  
 286 maximum peak of groups G1 and G3 was at 30 minutes while that of group G2 was at 15  
 287 minutes (Table 2). In the area-under-curve analysis (Fig. 4), G3 presented  $p < 0.05$  when  
 288 compared to groups G2 and G3. This may be because this group was given the fermented milk  
 289 drink with clove essential oil, which may have added in the glycemic control after the  
 290 administration of intraperitoneal glucose.

291

292 **Figure 3. Mean glucose concentration (mg/dL) per group after the intraperitoneal**  
 293 **application of glucose (2 g/kg body weight), in relation to time (min).**

294

295

296

297

298

299

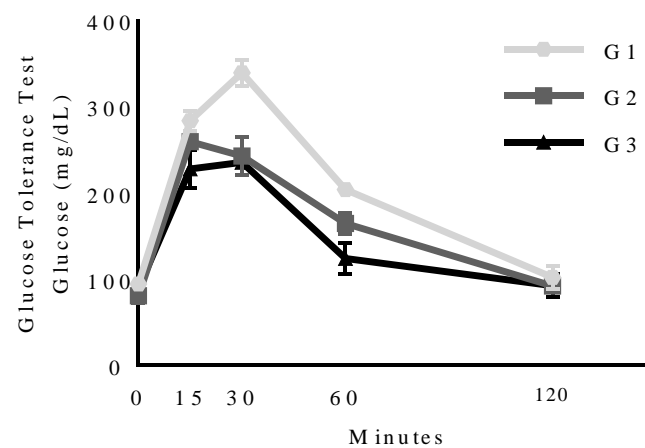
300

301

302

303

304



305

306

307

308

309

310

G1, Group nourished - control: diet with only ration; G2, isocaloric nourished group to G1: diet with ration + fermented milk drink; G3, isocaloric nourished group to G1: diet with ration + fermented milk drink with clove essential oil.

Based on the Tukey test ( $p < 0.05$ ), averages followed by the same letter did not differ from each other.

311 **Figure 4. Area under the plasma glucose curve (mg/dL) per group after intraperitoneal**  
 312 **application of glucose (2 g/kg body weight), in relation to time (min).**

313

314

315

316

317

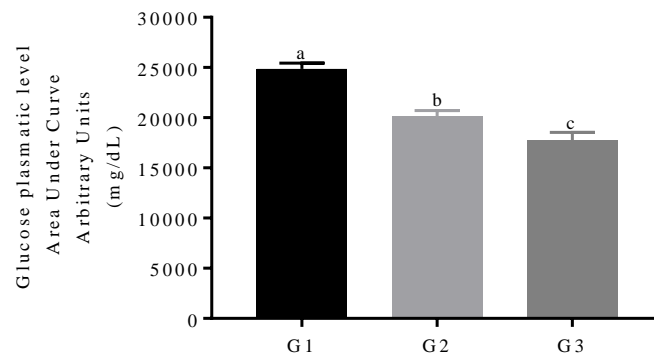
318

319

320

321

322



323 G1, Group nourished - control: diet with only ration; G2, isocaloric nourished group to G1: diet  
 324 with ration + fermented milk drink; G3, isocaloric nourished group to G1: diet with ration +  
 325 fermented milk drink with clove essential oil.

326 Based on the Tukey test ( $p < 0.05$ ), averages followed by the same letter did not differ from each  
 327 other.

328 Although group 3 presented lower body weight in the third week compared to control  
 329 group 1 (Fig. 5), energy efficiency was calculated to exclude the possibility of body weight  
 330 affecting the outcome of the tests IST e GTT, since this group presented a smaller area under  
 331 curve ( $p < 0.05$ ) when compared with the control group as shown in figures 2 and 4.

332

333 **Figure 5. Measurements of body weight of each group, from first to fourth week,**  
 334 **according to the diet provided.**

335

336

337

338

339

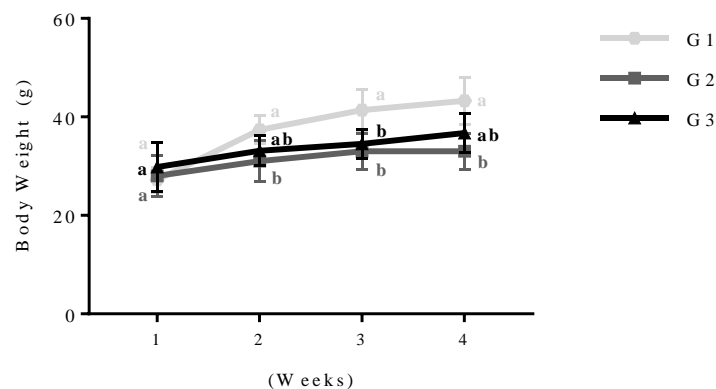
340

341

342

343

344



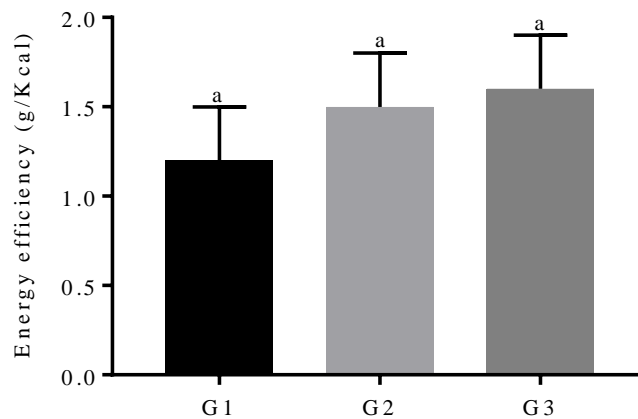
345 G1, Group nourished - control: diet with only ration; G2, isocaloric nourished group to G1: diet  
 346 with ration + fermented milk drink; G3, isocaloric nourished group to G1: diet with ration +  
 347 fermented milk drink with clove essential oil.

348 By the Tukey test ( $p < 0.05$ ), averages followed by the same letter in the same week did not  
 349 differ from each other.

350

351 According to the data obtained, energy efficiency did not differ between groups at  
 352 the end of the experiment ( $p > 0.05$ ), thus the three groups were able to convert the nutrients  
 353 provided by each diet into weight gain equally (Fig.6).

354  
 355 **Figure 6. Energy efficiency of each group, evaluated at the end of the experiment,**  
 356 **according to the body weight and kcal consumption provided by diets.**



367  
 368 G1, Group nourished - control: diet with only ration; G2, isocaloric nourished group to G1: diet  
 369 with ration + fermented milk drink; G3, isocaloric nourished group to G1: diet with ration +  
 370 fermented milk drink with clove essential oil.

371 Based on the Tukey test ( $p < 0.05$ ), averages followed by the same letter did not differ from each  
 372 other.

### 373 374 **Discussion**

375  
 376 The glucose decay constant rate (Kitt) varies according to the stimulus produced in the  
 377 cells by insulin, to capture circulating glucose and inhibit the production of hepatic glucose [21].

378 This higher rate found in the G3 groups may have occurred because the clove EO exerts  
 379 insulin-like activity in cells. The observed result was similar to those obtained by previous  
 380 authors [21], who evaluated the ability of *S. aromaticum* to regulate glucose consumption by  
 381 C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> myocytes. It was observed that clove and metformin were able to consume greater  
 382 amounts of glucose from muscle cells when compared to the control group, and both can  
 383 regulate energetic metabolism from changes in the gene expression of Sirtuins (SIRTs) and  
 384 PGC-1  $\alpha$  [21].

385 In the insulin sensitivity test, the three groups evaluated presented with similar  
 386 behaviours, and the serum glucose (mg/dl) declined linearly in the first 15 minutes, before being  
 387 reestablished to the value measured at time 0 in each group within 120 minutes. This result was  
 388 similar to that obtained in a study in which mice were induced to hypoglycaemia by insulin. In  
 389 the first 60 minutes after insulin application, their blood glucose declined, but it subsequently  
 390 recovered after between 120 and 300 minutes [22].

391 The fall in glycaemia induced by the intraperitoneal application of insulin occurs because  
392 the cells are stimulated to pick up the circulating glucose 15 to 20 minutes after the application  
393 and inhibit the glucose release by the liver. The counter-regulatory hormone, glucagon, is then  
394 secreted in the next 120 minutes to reestablish glycaemia [17, 23].

395 None of the groups studied showed insulin resistance, once the groups reestablished the  
396 glycaemia after 120 minutes. This resistance can occur by multiple factors. For example, when  
397 the body has a low body weight, it adapts to the restricted supply of calories provided by the diet  
398 and reduces the secretion of insulin so that it has greater availability of glucose for the cells to  
399 perform their vital functions [25].

400 In obese individuals, excessive glucose consumption causes the glucose absorption by  
401 the tissues, which is stimulated by insulin. This makes cells resistant, which reduces the *in vivo*  
402 plasma glucose elimination [26].

403 The pancreatic  $\beta$  cells within the insulin resistance course begin to show changes in the  
404 secretion of this hormone. In the presence of glucose in the bloodstream, they do not signal  
405 their presence to the glucose transporter proteins SGLTs and GLUTs, and the body becomes  
406 glucose intolerant [26].

407 Following intraperitoneal glucose application in the glucose tolerance test, the glucose  
408 will reach its maximum peak 15-30 minutes after it is applied. The same phenomenon is  
409 observed after normal ingestion. In the digestive tract, the food undergoes the digestion  
410 processes and absorption, with carbohydrates being the main nutrients responsible for  
411 providing energy to the cells in the glucose form [27].

412 When the blood glucose level increases, it activates the release of insulin by the  $\beta$  cells,  
413 which then bind to the cells of the body to activate the signalling cascade. The passive  
414 facilitative glucose transporters (GLUTs) and the secondary active sodium-coupled glucose  
415 transporters (SGLTs) present in all cells then open their channels so that glucose can enter the  
416 cells and either be stored as glycogen or generate energy in the form of ATP [28].

417 The individual may present insulin resistance and/or glucose tolerance, obesity, diabetes,  
418 hyperglycaemia, dyslipidaemia, hepatic steatosis, or hypertension. Since diabetes engages  
419 metabolic diseases, it will generate hyperglycaemia, resulting from insulin resistance, secretion  
420 and action, and/or glucose intolerance [29].

421 The glucose tolerance and insulin resistance tests in mice are critical to perform, as new  
422 foods increased in the human diet can lead to metabolic disorders throughout the lifespan [7]  
423 and the genetic glucose transport proteins expression of SGLTs and GLUTs may also undergo  
424 modifications [6].

425 The energy efficiency allows to estimate the weight gain that the animal is obtaining from  
426 the calories provided by the diets, it is given by dividing the weight gain (g) by the total  
427 consumption (Kcal) of the diets [12].

428 A diet that included the clove essential oil attenuated a change in glucose concentration  
429 on the GTT compared to control diets with and without a fermented milk drink. This represents

430 the first work evaluating how this drink functions in animal organisms. Importantly, this work  
431 verified that this drink has a promising functional potential.

432 As the clove essential oil present similar effect the insulin new studies that evaluate for  
433 example the genetic expression of glucose transporter proteins SGLTs and GLUTs, responsible  
434 for absorbing glucose through the intestine, are recommended to be performed to elucidate the  
435 effect of this fermented milk drink and to exclude the possibility of defective gastrointestinal  
436 absorption-related mechanisms.

437

#### 438 **Conclusion**

439

440 The results obtained in the insulin sensitivity and glucose tolerance tests suggest that the  
441 fermented milk drink with the *S. aromaticum* essential oil reduced plasma glucose levels when  
442 compared to the other diets. This may indicate the functionality of the drink and that it is  
443 possible to add it to the diet of healthy individuals.

444

#### 445 **Acknowledgements**

446

447 We thank the UNIMONTES, Pró Reitoria de Extensão da UFMG and Pró Reitoria de  
448 Pesquisa da UFMG.

449

#### 450 **Funding**

451

452 This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de  
453 Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001.

454

#### 455 **References**

456

- 457 1. Dhama K, Karthik K, Khandia R, Munjal A, Tiwari R, Rana R, et al. Medicinal and therapeutic  
458 potential of herbs and plant metabolites / extracts countering viral pathogens – current  
459 knowledge and future prospects. *Curr Drug Metab.* 2018; 19: 1-28.  
460 doi:10.2174/1389200219666180129145252.
- 461 2. Cortés-Rojas DF, Souza CRF, Oliveira WP. Clove (*Syzygium aromaticum*): a precious spice.  
462 *Asian Pac J Trop Biomed.* 2014; 4(2): 90-96. doi:10.1016/S2221-1691(14)60215-X.
- 463 3. Di Cerbo A, Morales-Medina JC, Palmieri B, Pezzuto F, Cocco R, Flores G, et al. Functional  
464 foods in pet nutrition: Focus on dogs and cats. *Res Vet Sci.* 2017; 112: 161-166.  
465 doi:10.1016/j.rvsc.2017.03.020.

466

- 467 4. Food and Drug Administration FDA. U.S Department of Health & Human Service. Code of  
468 Federal Regulations: Title 21- food and drugs. Chapter - I food and drug administration.  
469 Department of health and human services. Subchapter B - food for human consumption  
470 (continued). Part 184 -direct food substances affirmed as generally recognized as safe. USA:  
471 FDA, [cited 2017 Apr 1]. Available from:  
472 <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfCFR/CFRSearch.cfm?fr=170.30>.
- 473 5. Agência Nacional de Vigilância Sanitária Anvisa 2015. Guia de Procedimentos para Pedidos  
474 de Inclusão e Extensão de Uso de Aditivos Alimentares e Coadjuvantes de Tecnologia de  
475 Fabricação na Legislação Brasileira. Brasília: 2015. [cited 2017 Aug 1]. Available from:  
476 <http://portal.anvisa.gov.br/alimentos/aditivos-alimentares>.
- 477 6. Sampaio IC, Medeiros PHQS, Rodrigues FAP, Cavalcante PA, Ribeiro SA, Oliveira JS, et al.  
478 Impact of acute undernutrition on growth, ileal morphology and nutrient transport in a murine  
479 model. Braz J Med Biol Res. 2016; 49(10): 1-10. doi:10.1590/1414-431X20165340.
- 480 7. Vinué Á, González-Navarro H. Glucose and insulin tolerance tests in the mouse. Methods  
481 Mol Biol. 2015; 1339: 247-254. doi:10.1007/978-1-4939-2929-0\_17.
- 482 8. Al-Okbi SY, Mohamed DA, Hamed TE, Edris AE. Protective effect of clove oil and eugenol  
483 microemulsions on fatty liver and dyslipidemia as components of metabolic syndrome. J Med  
484 Food. 2014; 17(7): 764-771. doi:10.1089/jmf.2013.0033.
- 485 9. Liu BB, Luo L, Liu XL, Geng D, Li CF, Chen SM, et al. Essential oil of *Syzygium aromaticum*  
486 reverses the deficits of stress-induced behaviors and hippocampal p-ERK/p-CREB/Brain-  
487 Derived neurotrophic factor expression. Planta Med. 2015; 81(03): 185-192. doi:10.1055/s-  
488 0034-1396150.
- 489 10. Eng, J.. Sample size estimation: how many individuals should be studied?. Radiology, v.  
490 227, n. 2, p.309-313, 2003. doi:10.1148/radiol.2272012051
- 491 11. Resende, MFD. Atividade antioxidante in vitro e in vivo de análogos sintéticos da curcumina  
492 e compostos heterocíclicos. Dissertation, Universidade Federal de Minas Gerais 2015.  
493 Available from: <http://hdl.handle.net/1843/BUBD-A5GLNS>.
- 494 12. White PAS, Cercato LM, Araújo JMD, Souza LA, Soares AD, Barbosa APO, et al. Modelo  
495 de obesidade induzida por dieta hiperlipídica e associada à resistência à ação da insulina e  
496 intolerância à glicose. Arq Bras Endocrinol Metabol. 2013; 57(5): 339-345.  
497 doi:10.1590/S0004-27302013000500002.
- 498 13. Brasil. Ministério de Estado da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa  
499 n.º 16, de 23 de agosto de 2005. Aprova o regulamento Técnico de Identidade e Qualidade  
500 de Bebidas Lácteas. 2005. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, Seção  
501 1, p. 7. 24 ago. 2005. Available from:  
502 <https://www2.cead.ufv.br/sgal/files/apoio/legislacao/legislacao6.pdf>.

- 503 14. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 46, de  
504 23 de outubro de 2007. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leites  
505 Fermentados. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, Seção 1, p. 4. out.  
506 2007. Available from: [http://www.posalim.ufpr.br/ArqDisponiv/leitesfermentados\\_2009.pdf](http://www.posalim.ufpr.br/ArqDisponiv/leitesfermentados_2009.pdf).
- 507 15. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 68 de  
508 12 de dezembro de 2006. Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais Físico-Químicos, para  
509 Controle de Leite e Produtos Lácteos, em conformidade com o anexo desta Instrução  
510 Normativa, determinando que sejam utilizados nos Laboratórios Nacionais Agropecuários.  
511 Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, Seção 1, p. 8.14 dez. 2006.  
512 Available from: [https://www.diariodasleis.com.br/busca/exibelink.php?numlink=1-77-23-](https://www.diariodasleis.com.br/busca/exibelink.php?numlink=1-77-23-2006-12-12-68)  
513 [2006-12-12-68](https://www.diariodasleis.com.br/busca/exibelink.php?numlink=1-77-23-2006-12-12-68).
- 514 16. Brasil. Ministério da Agricultura Pecuária e abastecimento. Secretaria de Defesa  
515 Agropecuária. Instrução Normativa nº 62, de 26 de agosto de 2003. Oficializa os Métodos  
516 Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem  
517 Animal e Água. 2003. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, Seção 1,  
518 p. 14. 26 ago. 2003. Available from: [http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-](http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=2851)  
519 [consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=2851](http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=2851).
- 520 17. Bonora E, Moghetti P, Zancanaro C, Cigolini M, Querena M, Cacciatori V, et al. Estimates of  
521 *in vivo* insulin action in man: comparison of insulin tolerance tests with euglycemic and  
522 hyperglycemic glucose clamp studies\*. J Clin Endocrinol Metab. 1989; 68(2): 374-378.  
523 doi:10.1210/jcem-68-2-374.
- 524 18. Jørgensen MS, Tornqvist KS, Hvid H. Calculation of glucose dose for intraperitoneal  
525 glucose tolerance tests in lean and obese mice. J Am Assoc Lab Anim Sci. 2017; 56(1): 95-  
526 97. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28905722>.
- 527 19. Matthews JN, Altman DG, Campbell MJ, Royston P. Analysis of serial measurements in  
528 medical research. BMJ. 1990;300(6719):230-5. doi:10.1136/bmj.300.6719.230.
- 529 20. Rines AK, Sharabi K, Tavares CDJ, Puigserver P. Targeting hepatic glucose output in the  
530 treatment of type 2 diabetes. Nat Rev Drug Discov. 2016; 15: 786-804.  
531 doi:10.1038/nrd.2016.151.



- 532 21. Tu Z, Moss-Pierce T, Ford P, Jiang TA. *Syzygium aromaticum* L. (clove) extract regulates  
533 energy metabolism in myocytes. *J Med Food*. 2014; 17(9): 1003-1010.  
534 doi:10.1089/jmf.2013.0175.
- 535 22. Kwiatkowski RP, Antunes MD, Pedrosa MMD. Efeito da administração dos hormônios  
536 contrarreguladores sobre o perfil glicêmico de camundongos submetidos à hipoglicemia  
537 induzida por insulina. *Braz J Surg Clin Res*. 2017; 17(1): 68-73. Available from:  
538 <https://www.mastereditora.com.br/download-1818>.
- 539 23. Wajchenberg BL, Santomauro ATMG, Nery M, Santos RF, Silva MELR, Ursich MJM, et al.  
540 Resistência à insulina: métodos diagnósticos e fatores que influenciam a ação da insulina.  
541 *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 1999; 43(2): 76-85. doi:10.1590/S0004-27301999000200003.
- 542 24. Smith SR, Edgar PJ, Pozefsky T, Chhetri MK, Prout TE. Insulin secretion and glucose  
543 tolerance in adults with protein-calorie malnutrition. *Metab*. 1975; 24(9): 1073-1084.  
544 doi:10.1016/0026-0495(75)90101-8.
- 545 25. Dohm GL, Tapscott EB, Pories WJ, Dabbs DJ, Flickinger EG, Meelheim D, et al. An in vitro  
546 human muscle preparation suitable for metabolic studies. Decreased insulin stimulation of  
547 glucose transport in muscle from morbidly obese and diabetic subjects. *J Clin Investig*.  
548 1988; 82(2): 486-494. doi:10.1172/JCI113622.
- 549 26. Fatani S, Abubakari AR, Itua I, Wong C, Thomas C, Naderali EK. Effects of diet-induced  
550 obesity on protein expression in insulin signaling pathways of skeletal muscle in male wistar  
551 rats. *Int J Gen Med*. 2012; 5: 573-582. doi:10.2147/IJGM.S31819.
- 552 27. Araújo JR, Martel F. Regulação da absorção intestinal de glicose: uma breve revisão. *Arq*  
553 *Med*. 2009; 23(2): 35-43. Available from:  
554 [http://www.scielo.mec.pt/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S087134132009000200002&lng](http://www.scielo.mec.pt/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S087134132009000200002&lng=pt)  
555 [=pt](#).
- 556 28. Machado UF. Transportadores de glicose. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 1998; 42(6): 413-  
557 421. doi:10.1590/S0004-27301998000600003.
- 558 29. American Diabetes Association. 2. Classification and Diagnosis of Diabetes. *Diabetes Care*.  
559 2016; 39 (Supplement 1): 13-22. doi:10.2337/dc16-S005.

4.2 Artigo 2 - Marcadores inflamatórios, parâmetros bioquímicos e histopatológicos em tecido hepático de camundongos alimentados com bebida láctea fermentada com adição de óleo essencial de cravo da Índia

Este artigo foi elaborado conforme as normas da revista *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*

**Marcadores inflamatórios, parâmetros bioquímicos e histopatológicos em tecido hepático de camundongos alimentados com bebida láctea fermentada com adição de óleo essencial de cravo da índia**

Keicy Sandy Silvestre de Souza<sup>1</sup>, Stephanie Pedrosa de Oliveira<sup>1</sup>, Igor Viana Brandi<sup>2</sup>, Sérgio Henrique Sousa Santos<sup>2,3</sup>, Daniela Fernanda de Freitas<sup>3</sup>, Deborah de Farias Lelis<sup>3</sup>, Anna Christina de Almeida<sup>1\*#</sup>

<sup>1</sup>Department of Animal Production – Agrarian Sciences Institute - Minas Gerais Federal University (ICA/UFMG), Montes Claros, Minas Gerais, Brazil.

<sup>2</sup>Department of Food Engineering – Agrarian Sciences Institute - Minas Gerais Federal University (ICA/UFMG), Montes Claros, Minas Gerais, Brazil.

<sup>3</sup>Department of Program in Health Sciences, PPGCS – Montes Claros State University (Unimontes), Montes Claros, Minas Gerais, Brazil.

\* Corresponding author: E-mail: [aca2006@ica.ufmg.br](mailto:aca2006@ica.ufmg.br) (ACA).

#Current address: Department of Postgraduate Program in Animal Production - Agrarian Sciences Institute - Minas Gerais Federal University (ICA/UFMG), Avenida Universitária, 1.000 – Bairro Universitário, 39.404-547, Montes Claros, Minas Gerais, Brazil.

## RESUMO

O óleo essencial de cravo da Índia possui diversas funções. Entretanto, o seu principal composto o eugenol possui alguns efeitos adversos sendo tóxico em concentrações elevadas. Dessa forma, o objetivo desse estudo foi avaliar o comportamento sistêmico, os parâmetros bioquímicos hepáticos, a análise histopatológica e a quantificação da expressão de citocinas anti-inflamatória e pró-inflamatórias do fígado. Os animais deste estudo foram alimentados com dieta padrão e 2 ml da bebida láctea fermentada com adição de 2ul/ml do óleo essencial de cravo da Índia durante 30 dias. As análises estatísticas foram realizadas no programa *GraphPad Prism software*, a partir análise da variância (ANOVA), *one-way*, seguidas pelo teste *Tukey* ( $p < 0.05$ ). Na análise dos resultados não foram encontradas alterações que indicassem toxicidade nos camundongos durante o período experimental. Os parâmetros bioquímicos, análise histopatológica e expressão das citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatória do fígado não se diferiram entre os grupos experimentais com o grupo controle. Sendo assim, essa dose pode ser usada nessa bebida mas o consumo humano deve ser cauteloso para que a dose ingerida não ultrapasse os limites diários de consumo.

**Palavras-chave:** citocinas – hepatotoxicidade - *Syzygium aromaticum*

## INTRODUÇÃO

Os alimentos funcionais são responsáveis por atuar na melhoria da saúde de quem os consome, como modulação e equilíbrio da flora intestinal, imunidade, prevenção do diabetes e câncer, controle dos parâmetros bioquímicos e aumento da biorregulação do estresse. Na lista desses alimentos são incluídos os produtos lácteos fermentados a partir de bactérias lácteas ou bactérias lácteas e leveduras (Mitsuoka, 2014).

Mesmo em alimentos funcionais, os consumidores atuais almejam produtos seguros e na maioria das vezes isentos de aditivos químicos. A indústria alimentícia então, busca aditivos naturais que exerça atividades farmacológicas favoráveis ao organismo além do poder de conservar o alimento (Hintz et al. 2015, Santos-Sánchez et al. 2017, Sharif et al. 2017).

A *Food and Drug Administration* (FDA) regulamenta o uso de derivados de plantas medicinais em concentrações adequadas nos alimentos, definindo-as como alimentos geralmente reconhecidos como seguro (GRAS). Como exemplo, têm-se o óleo essencial de cravo da Índia, *Syzygium aromaticum*, composto secundário obtido do botão floral da planta (FDA 2011, Hyldgaard et al. 2012, Cortés-Rojas et al. 2014).

Esse óleo apresenta atividades anti-inflamatória, antinociceptiva, antipirética (Taher et al. 2015), anticonvulsante, ansiolítica, hipnótica, (Galal & Abdellatief, 2015), antineoplásica, (Kubatka et al. 2017) hipoglicêmica, hipolipidêmica (Tu et al. 2014) antibacteriana, antifúngica (Puškárová et al. 2017), antioxidante (Bakour et al. 2018, Elkomy et al. 2018) hepatoprotetora (El-Hadary & Hassanien, 2015) além de ser um conservante de alimentos (Ju et al. 2018).

Entretanto, o óleo essencial de cravo da Índia, em doses elevadas apresenta efeito tóxico devido seu principal composto eugenol (Abd El Motteleb et al. 2014, Liu et al. 2015), o que torna necessário estudos sobre possível toxicidade, uma vez que o fígado é um dos órgãos principais que detectam as injúrias causadas por substâncias ou alimentos ingeridos (Pizzo et al. 2015).

Dessa forma, o presente estudo teve o objetivo de avaliar através dos parâmetros comportamentais, bioquímicos, análise histopatológica e quantificação da expressão de marcadores pró e anti-inflamatórios do fígado de camundongos machos Swiss, se o óleo essencial de *S. aromaticum* adicionado a bebida láctea fermentada gera hepatotoxicidade

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Animais

Foram utilizados 24 camundongos machos Swiss, com quatro semanas de idade, provenientes do Biotério de Experimentação Animal da Universidade Estadual de Montes Claros – Unimontes, foram utilizados. Esse estudo foi aprovado pelos Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais – CEUA/UFMG sob número

de protocolo 231/2017 e Comitê de Ética em Experimentação e Bem-Estar Animal da Universidade Estadual de Montes Claros - CEEBEA/Unimontes, sob o número do processo 149/2017, local onde foi conduzido o experimento.

Os animais foram alojados em ambiente com ar condicionado e temperatura de  $22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , humidade relativa de 45-65%, com ciclo claro e escuro de 12 h. Anteriormente ao período experimental de 30 dias, os animais passaram por uma adaptação de sete dias alimentados *ad libitum* com dieta padrão à base de ração labina® contendo 23,3% de proteínas, 55,6% de carboidratos e 2,6% de lipídios e  $4,0\text{ kcal g}^{-1}$  energia total e água *ad libitum*.

### **Desenho experimental**

Os animais foram divididos em três grupos, inteiramente ao acaso, após o período de adaptação de sete dias, a partir do peso, para que não houvesse diferença entre os grupos.

As bebidas lácteas fermentadas foram fornecidas, por gavagem, diariamente as 07:00 horas, durante 30 dias, aos camundongos dos grupos experimentais, G2 e G3.

Grupo controle (G1) (n=8): Os camundongos foram alimentados com dieta composta por ração.

Grupo 2 (G2), isocalórico ao G1 (n=8): Os camundongos foram alimentados com dieta composta pela ração mais 2 ml da bebida láctea fermentada.

Grupo 3 (G3), isocalórico ao G1 (n=8): Os camundongos foram alimentados com dieta composta pela ração mais 2ml da bebida láctea fermentada com adição do óleo essencial de cravo da Índia.

Ao final do experimento, os animais foram eutanasiados por decapitação em guilhotina, após jejum. O sangue foi coletado do tronco do corpo dos animais, em tubos, sem anticoagulante, centrifugadas a 3000rpm;  $4^{\circ}\text{C}$ ; 10min, para obtenção do soro, e foram armazenados congeladas a  $-20^{\circ}\text{C}$ , até execução das análises bioquímicas. O fígado após ser pesado foi dividido em tubos eppendorfs, uma parte foi congelada em nitrogênio líquido e armazenado a  $-80^{\circ}\text{C}$  em um ultrafreezer para análises subseqüente da reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa quantitativa em tempo real (qRT-PCR) e outra foi armazenada em formol a 10% para análises histológicas.

### **Dietas**

A bebida láctea fermentada e a bebida láctea fermentada com adição do óleo essencial de cravo da Índia foram preparadas e analisadas semanalmente, obedecendo as legislações brasileiras para preparação de bebidas lácteas, antes da liberação para o consumo dos animais do experimento (Brasil 2003, Brasil 2006, Brasil 2005, Brasil 2007). A calorimetria das bebidas lácteas foram medidas, segundo a metodologia descrita por Souza *et al* (2018) afim de

determinar a quantidade de calorias por ml das bebidas a serem fornecidas aos camundongos para que as dietas dos grupos fossem isocalóricas.

#### **Análises de comportamento sistêmico**

Diariamente todos os animais foram observados para verificar se apresentavam sinais de toxicidade como locomoção, comportamento, respiração, alterações na pele e pelos, olhos, tremores, salivação, diarreia, letargia, sonolência, e classificados em escores de 0 a 4. Sendo 0: ausente, 1: raro, 2: pouco, 3: moderado, 4 intenso (Malone & Robichaud, 1962).

#### **Análises bioquímicas**

A determinação da creatinina, Alanino aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), albumina, colesterol total, lipoproteína de alta densidade (HDL), glicose, foi executada, no aparelho Wiener BT-3000 Plus Chemistry Analyzer (Wiener, Argentina®), de acordo com as recomendações fornecidas pelo fabricante dos kits enzimáticos (Wiener, Argentina®),

#### **Análise histopatológica do Fígado**

O lobo direito do fígado, imerso em formol a 10%, foi utilizado, para confecção das lâminas histológicas coradas com Hematoxilina e a Eosina (H&E). Cinco campos diferentes em cada lâmina contendo 100 hepatócitos foram avaliadas, sob o microscópio de luz convencional usando um microscópio Olympus FSX 100, com aumento de 40x (Tóquio, Japão). Foi considerado sem nenhuma alteração quando todos hepatócitos apresentaram núcleo íntegro centralizado e evidente e classificados de 0 a 3 a partir de alterações como esteatose hepática, inflamação e fibrose de acordo com metodologia adaptada de Brunt et al. (1999).

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

A extração de RNA total do fígado foi realizada através da homogeneização deste órgão em presença de TRIZOL (Invitrogen Corp. ®, USA), conforme especificação do fabricante. A pureza, feita pela razão das absorbâncias 260 nm/280nm (A260/280), e a quantificação do RNA das amostras foram realizadas no aparelho (Thermo Scientific- NanoDrop 2000®, USA). Após a quantificação as amostras foram tratadas com Dnase, e transcritas reversamente com *moloney murine leukemia virus reverse* (M-MLV RT) (Ludwig Biotec®, Brazil) e OligodT, utilizando iniciadores aleatórios.

O cDNA foi utilizado para reação qRT-PCR, o primer endógeno gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), foi usado para normalizar a expressão do gene de RNAm dos

primers: fator de necrose tumoral alfa (TNF $\alpha$ ) interleucina 6 (IL6), interleucina 10 (IL10) e interleucina 1 beta (IL1- $\beta$ ) (Tabela 1). As reações de PCR quantitativo foram feitas utilizando o Master Mix do SYBR Green na PlusOne platform (Applied Biosystems™ QuantStudio™ 6 Flex Real-Time PCR System®, USA). A expressão do transcrito foi mensurada pelo método de comparação relativa por CT, usando a equação  $2^{-\Delta\Delta CT}$  (Livak & Schmittgen, 2001).

Tabela 1 - Lista e sequência de primers usados no qRT-PCR

Genes	Sequência primers	Referências
GAPDH	F: 5' AAGAAGGTGGTGAAGCAGGCATC3' R: 5' CGAAGGTGGAAGAGTGGGAGTTG3'	(Li et al. 2016)
TNF $\alpha$	F:5'CATCTTCTCAAAATTCGAGTGACAA3' R: 5'TGGGAGTAGACAAGGTACAACCC3'	(Sechhi et al 2017)
IL10	F:5'TGAGGCGCTGTCGTCATCGATTTCTCCC3' R: 5' ACCTGCTCCACTGCCTTGCT 3'	(Li et al. 2011)
IL1- $\beta$	F:5'ATGGCAACTGTCCCTGAACTCAACT3' R: 5'CAGGACAGGTATAGATTCAACCCCT 3'	(Rong et al. 2018)
IL 6	F:5'GAGGATACCACTCCCAACAGACC3' R:5'AAGTGCATCATCGTTGTTTCATACA3'	(Sechhi et al. 2017)

### Análises estatísticas

Os dados foram avaliados a partir análise da variância (ANOVA), one-way, seguidas pelo teste *Tukey*, quando houve diferença entre os grupos, a nível de significância ( $p < 0.05$ ), utilizando o programa *GraphPad Prism software* (Version 7.0©, San Diego, California, USA).

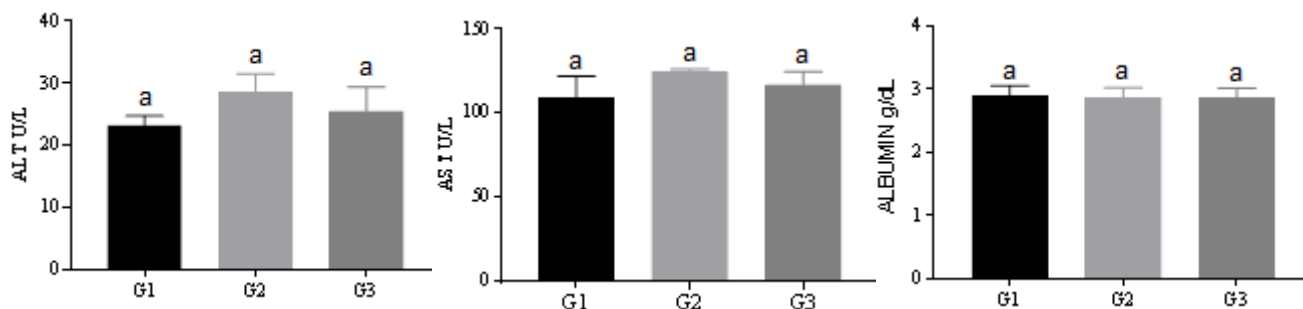
### RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os animais pertencentes aos três grupos, não apresentaram alterações clínicas ou de comportamento, como temperatura, respiração, neurológicas, frequência cardíaca e respiratória, durante o período experimental de acordo com a metodologia descrita por Malone & Robichaud (1962) que indicasse toxicidade.

A integridade e função dos hepatócitos, foi avaliada por dosagem sérica de alanino aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST), albumina, colesterol total, lipoproteína de alta densidade (HDL) e triglicérides (Fig. 1, 2). Os resultados indicam que o grupo que recebeu a dieta composta pela ração e a bebida láctea fermentada com adição do óleo essencial de cravo da Índia não apresentou alterações significativas nos níveis ALT, AST, albumina, quando comparados ao grupo controle (Fig. 1).



**FIGURA 01:** Efeito das diferentes dietas nos parâmetros bioquímicos que avaliam a integridade dos hepatócitos



Fonte: Do autor, (2018).

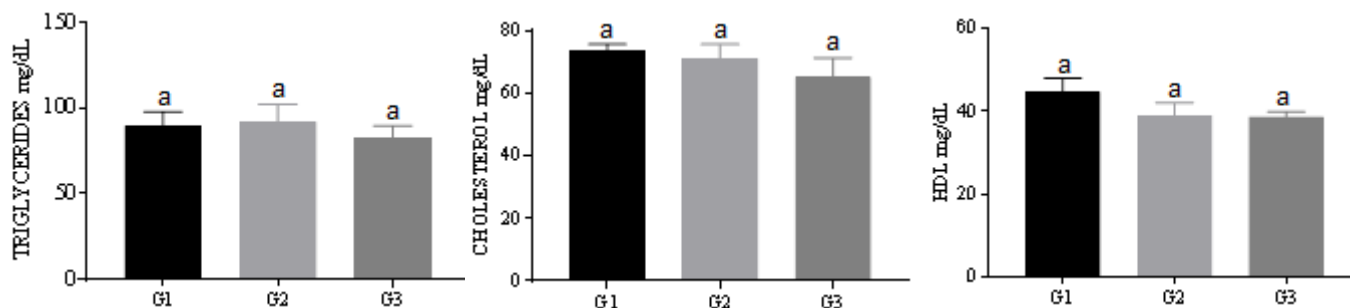
Legenda: G1 - Grupo controle: dieta composta por ração. G2 - Grupo 2: isocalórico ao G1 dieta composta pela ração mais 2 ml da bebida láctea fermentada. G3 - Grupo 3: isocalórico dieta composta pela ração mais 2ml da bebida láctea fermentada com adição do óleo essencial de cravo da Índia. Os dados são relatados com média e Desvio Padrão (n=8),  $p > 0,05$  (teste Tukey).

Esse resultado foi similar ao obtido por Elkomy et al. (2018) no qual ratos tratados com 200mg/kg de peso corporal com o óleo essencial de cravo da Índia, também não apresentaram diferença significativa ( $p < 0.05$ ), nesses parâmetros bioquímicos.

Em quadro de toxicidade a ALT e AST são liberadas e aumentam no plasma três vezes mais que o nível basal (Xu et al. 2015).

A análise bioquímica dos triglicerídeos, colesterol total e HDL, do grupo G3 não se diferiu significativamente ( $p < 0,05$ ), dos grupos G1 e G2 (Fig. 2). Esses resultados corroboram os achados descritos por (Al-Attar & Zari 2007) que avaliaram os efeitos moduladores do óleo essencial de cravo da Índia a 5% nas respostas fisiológicas em ratos *Wistar* não diabéticos, na qual os parâmetros bioquímicos não apresentaram diferença com o grupo controle.

**FIGURA 02:** Efeito das diferentes dietas nos parâmetros bioquímicos que avaliam a funcionalidade dos hepatócitos



Fonte: Do autor, (2018).

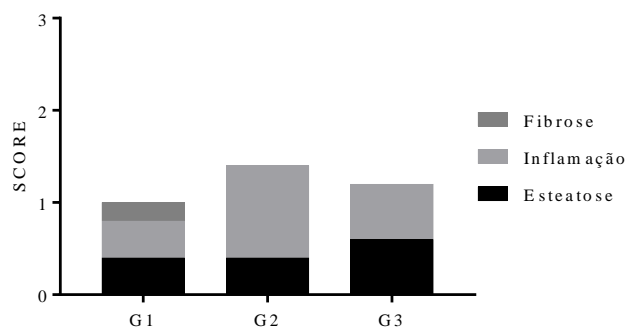
Legenda: G1 - Grupo controle: dieta composta por ração. G2 - Grupo 2: isocalórico ao G1 dieta composta pela ração mais 2 ml da bebida láctea fermentada. G3 - Grupo 3: isocalórico dieta composta pela ração mais 2ml da bebida láctea fermentada com adição do óleo essencial de cravo da Índia. Os dados são relatados com média e Desvio Padrão (n=8),  $p > 0,05$  (teste Tukey).

Em ratos em que a hepatotoxicidade foi induzida com tetracloreto de carbono, o óleo essencial de cravo da Índia exerceu efeito hepatoprotetor nas concentrações de 100 e 200 mg/kg, demonstrando o efeito benéfico desse óleo, em doses adequadas (El-Hadary & Hassanien, 2015), não induzindo lesões hepáticas.

A ausência de lesões no tecido hepático observada neste estudo pode ser afirmada pela normalidade dos parâmetros bioquímicos, pois quando o alimento gera injúria hepática, ao ser metabolizado no fígado, a integridade e função dos hepatócitos ficam comprometidos. A integridade hepática é avaliada a partir das enzimas albumina, ALT e AST (Hall & Cash 2012, Xu et al. 2015), e a funcionalidade pela HDL, colesterol e triglicéridos.

A análise histopatológica do fígado foi realizada através do escore geral estratificado para análise morfológica do tecido hepático, quanto aos parâmetros de inflamação, esteatose e fibrose (Figura 03). Não houve alterações histopatológicas significativas ( $p > 0,05$ ) ao avaliar os grupos experimentais (Figura 04). Dessa forma a bebida não produziu lesões nos hepatócitos, complementando os achados bioquímicos que avaliaram função e integridade do fígado.

**FIGURA 03:** Escore estratificado das alterações histopatológicas no fígado dos camundongos de acordo com a dieta fornecida

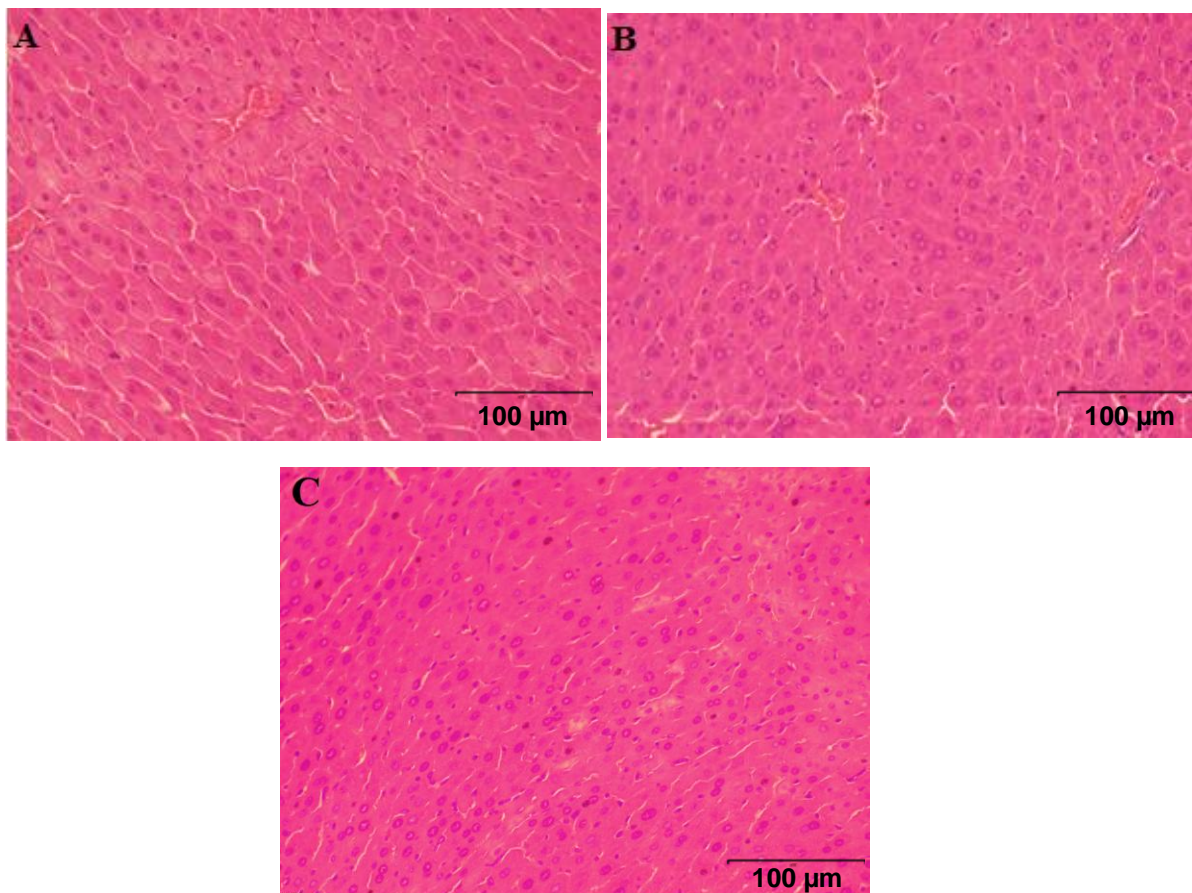


Fonte: Do autor, (2018).

Legenda: Média dos Escores 0 Ausente de alterações 0,1 - 1,9 alterações discretas 2 - 2,9 alterações moderadas  $\geq 3$  alterações acentuadas

G1 - Grupo controle: dieta composta por ração. G2 - Grupo 2: isocalórico ao G1 dieta composta pela ração mais 2 ml da bebida láctea fermentada. G3 - Grupo 3: isocalórico dieta composta pela ração mais 2ml da bebida láctea fermentada com adição do óleo essencial de cravo da Índia.

**FIGURA 04:** Análise histopatológica do fígado de camundongos de acordo com as diferentes dietas.



Coloração (H&E) do tecido hepático, fotos com aumento 40x.

Fonte: Do autor, (2018).

Legenda: A - G1 (Grupo controle): dieta composta por ração. B - G2 (Grupo 2): isocalórico ao G1 dieta composta pela ração mais 2 ml da bebida láctea fermentada. C - G3 (Grupo 3): isocalórico dieta composta pela ração mais 2ml da bebida láctea fermentada com adição do óleo essencial de cravo da índia.

Na avaliação histopatológica a dosagem de 2 µl/ml o óleo essencial de cravo da índia adicionado a bebida láctea fermentada, não apresentou evidências de alteração quanto a inflamação, esteatose e fibrose que fosse indicativo de toxicidade ocasionada por sua administração (Fig. 3 e 4).

Liu et al. (2015), em seus estudos, verificaram que a administração de 200 mg/kg de óleo essencial de cravo da índia por via oral durante 21 dias a ratos não resultou em alterações histopatológicas no fígado. Do mesmo modo, em outro estudo utilizando essa mesma dose de 200 mg/kg, por mesmo período de tratamento, administrada por gavagem, os animais não apresentaram alterações hepáticas na análise histopatológica (Elkomy et al. 2018).

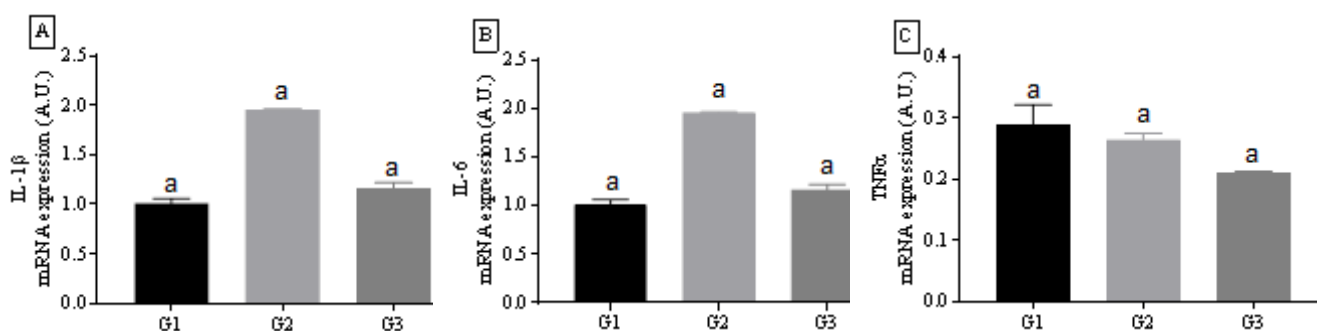
Conforme descrito por Abd El Motteleb et al. (2014), o eugenol, maior componente do óleo essencial de cravo da Índia em doses elevadas pode levar a efeitos hepatotóxicos. A análise da expressão dos genes de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias do fígado foi importante para avaliação da dose em estudo.

Os resultados permitiram inferir que a concentração de 2 µl/ml do óleo essencial de cravo da Índia adicionado a bebida láctea fermentada não induziu lesões nos hepatócitos, visto que a concentração das citocinas pró-inflamatórias, IL1 $\beta$ , IL6 e TNF $\alpha$ , (Fig. 5) e anti-inflamatória, IL-10, (Fig. 6) não se diferiram entre os grupos avaliados.

Em um estudo em que avaliou-se o efeito protetor do óleo essencial de cravo da Índia, formulado em microemulsão, na concentração de 40 mg/kg, sobre o TNF $\alpha$ , de ratos alimentados com dieta com alto teor de frutose, observou-se que a TNF $\alpha$  dos animais em que foi administrado o OE, foi menor quando comparada aos animais do grupo controle. Demonstrando o efeito hepatoprotetor do óleo essencial de cravo da Índia (Al-Okbi et al 2014).

A importância da pesquisa destas citocinas está relacionada com a resposta inflamatória no fígado que é mediada principalmente por TNF $\alpha$ , IL1 $\beta$ , IL6 que aumentam suas concentrações no organismo (Khalil et al. 2018). Para que ocorra o funcionamento adequado do organismo é necessário haver homeostasia entre as citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias, pois o desequilíbrio entre elas pode acarretar distúrbios irreversíveis (Medzhitov 2008).

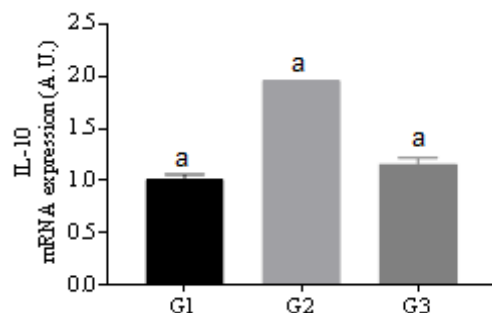
**FIGURA 05:** Níveis de expressão dos RNAm das citocinas pró-inflamatórias IL1 $\beta$ , IL6 e TNF $\alpha$  no fígado de camundongos de acordo com as diferentes dietas



Fonte: Do autor, (2018).

Legenda: A: interleucina 1  $\beta$  B: interleucina 6 C: fator de necrose tumoral  $\alpha$ . G1 - Grupo controle: dieta composta por ração. G2 - Grupo 2: isocalórico ao G1 dieta composta pela ração mais 2 ml da bebida láctea fermentada. G3 - Grupo 3: isocalórico dieta composta pela ração mais 2ml da bebida láctea fermentada com adição do óleo essencial de cravo da Índia. A expressão do RNAm das citocinas foram normalizados com o GAPDH. Os dados são relatados com média e Desvio Padrão (n=8), p>0,05 (teste Tukey).

**FIGURA 06:** Nível de expressão do RNAm da citocina anti-inflamatória IL-10 no fígado de camundongos de acordo com as diferentes dietas



Fonte: Do autor, (2018).

Legenda: G1 - Grupo controle: dieta composta por ração. G2 - Grupo 2: isocalórico ao G1 dieta composta pela ração mais 2 ml da bebida láctea fermentada. G3 - Grupo 3: isocalórico dieta composta pela ração mais 2ml da bebida láctea fermentada com adição do óleo essencial de cravo da Índia. A expressão do RNAm da citocina foi normalizado com o GAPDH. Os dados são relatados com média e Desvio Padrão (n=8),  $p > 0,05$  (teste *Tukey*).

## CONCLUSÃO

No presente trabalho, a dose de 2  $\mu$ l/ml do óleo essencial de cravo da Índia adicionada a bebida láctea fermentada não induziu toxicidade aos camundongos durante o período experimental.

Observou-se integridade hepática dos camundongos avaliada por parâmetros bioquímicos, análises histopatológicas e expressão das citocinas pró-inflamatórias (IL1 $\beta$ , IL6 e TNF $\alpha$ ) e anti-inflamatória (IL-10).

## Agradecimentos

Agradecemos a UNIMONTES, Pró Reitoria de Extensão da UFMG e Pró Reitoria de Pesquisa da UFMG, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG).

## Financiamento

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

**REFERÊNCIAS:**

Abd El Motteleb DM, Selim SA, Mohamed AM 2014. Differential effects of eugenol against hepatic inflammation and overall damage induced by ischemia/re-perfusion injury. *J Immunotoxicol* doi: 10.3109/1547691X.2013.832444.

Al-Attar AM, Zari TA 2007. Modulatory effects of ginger and clove oils on physiological responses in streptozotocin-induced diabetic rats. *Int J Pharmacol* doi: 10.3923/ijp.2007.34.40.

Al-Okbi SY, Mohamed DA, Hamed TE, Edris AE 2014. *J Med Food*. doi: 10.1089/jmf.2013.0033.

Bakour M, Soulo N, Hammas N, El-Fatemi H, Aboulghazi A, Taroq A, Abdellaoui A, Al-Waili N Lyoussi B. 2018. The Antioxidant content and protective effect of *Argan* oil and *Syzygium aromaticum* essential oil in hydrogen peroxide-induced biochemical and histological changes. *Int J mol sci* doi: 10.3390/ijms19020610.

Brasil. Ministério da Agricultura Pecuária e abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa nº 62, de 26 de agosto de 2003. Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água. 2003. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, Seção 1, p. 14. 26 ago. 2003. Available from: <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=2851>.

Brasil. Ministério de Estado da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n.º 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. Available from: <https://www2.cead.ufv.br/sgal/files/apoio/legislacao/legislacao6.pdf>.

Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 68 de 12 de dezembro de 2006. Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais Físico-Químicos, para Controle de Leite e Produtos Lácteos, em conformidade com o anexo desta Instrução Normativa, determinando que sejam utilizados nos Laboratórios Nacionais Agropecuários. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, Seção 1, p. 8. 14 dez. 2006. Available from: <https://www.diariodasleis.com.br/busca/exibelinck.php?numlink=1-77-23-2006-12-12-68>.

Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 46, de 23 de outubro de 2007. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, Seção 1, p. 4. out. 2007. Available from: [http://www.posalim.ufpr.br/ArqDisponiv/leitesfermentados\\_2009.pdf](http://www.posalim.ufpr.br/ArqDisponiv/leitesfermentados_2009.pdf).

Brunt EM, Janney CG, Bisceglie AM, Neuschwander-Tetri, BA, Bacon BR 1999. Nonalcoholic steatohepatitis: a proposal for grading and staging the histological lesions. *Am J Gastroenterol* doi: 10.1111/j.1572-0241.1999.01377.x.

Cortés-rojas DF, Souza CRF, Oliveira WP 2014. Clove (*Syzygium aromaticum*): a precious spice. *Asian Pac J Trop Biomed* doi: 10.1016/S2221-1691(14)60215-X.

El-Hadary AE, Hassanien, MFR 2015. Hepatoprotective effect of cold-pressed *Syzygium aromaticum* oil against carbon tetrachloride (CCl<sub>4</sub>)-induced hepatotoxicity in rats. *Pharm Biol* doi: 10.3109/13880209.2015.1078381.

Elkomy A, Aboubark M, Ibrahim S, Abdelhamid Y 2018. Protective effects of *Syzygium aromaticum* oil (Clove) against acrylamide induced hepatic, renal, and testicular toxicity in rats. *Int J Pharmacol Toxicol* doi: 10.14419/ijpt.v6i1.10972.

Food and Drug Administration FDA. U.S Department of Health & Human Service. Code of Federal Regulations: Title 21- food and drugs. Chapter - I food and drug administration. Department of health and human services. Subchapter B - food for human consumption (continued). Part 184.1257 -direct food substances affirmed as generally recognized as safe. USA: FDA, 2011.

Galal AAA, Abdellatief SA 2015. Neuropharmacological studies on *Syzygium aromaticum* (clove) essential oil. *Int J Pharm Sci* 5: 1013-1018.

Hall P, Cash J 2012. What is the real function of the liver 'function' tests? *Ulster Med J* 81: 30-36.

Hintz T, Matthews KK, Di R 2015. The use of plant antimicrobial compounds for food preservation *Biomed Res Int* doi: 10.1155/2015/246264.

Hyltdgaard M, Mygind T, Meyer RL 2012. Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. *Front. Microbiol* doi: 10.3389/fmicb.2012.00012.



Ju J, Xu X, Xie Y, Guo Y, Cheng Y, Qian H, Yao W 2018. Inhibitory effects of cinnamon and clove essential oils on mold growth on baked foods. *Food Chem* doi: 10.1016/j.foodchem.2017.07.120.

Khalil A, Omran H, Alsheikh F, 2018. Balance of pro- and anti-inflammatory cytokines in livers of high fat diet rats exposed to fractionated gamma irradiation. *BMC Res Notes* doi: 10.1186/s13104-018-3851-2.

Kubatka P, Uramova S, Kello M, Kajo K, Kruzliak P, Mojzis J, Vybohova D, Adamkov M, Jasek K, Lasabova Z, Zubor P, Fialova S, Dokupilova S, Solar P, Pec M, Adamicova K, Danko J, Adamek M, Busselberg D 2017. Antineoplastic effects of clove buds (*Syzygium aromaticum* L.) in the model of breast carcinoma. *J Cell Mol Med* doi: 10.1111/jcmm.13197.

Li Y, Cai L, Wang H, Wu P, Gu W, Chen Y, Hao H, Tang T, Yi P, Liu M, Miao S, Ye D. 2011. Pleiotropic regulation of macrophage polarization and tumorigenesis by formyl peptide receptor-2. *Oncogene*. doi: 10.1038/onc.2011.112.

Li KK, Liu CL, Shiu HT, Wong HL, Siu WS, Zhang C, Han XQ, Ye CX, Leung PC, Ko CH 2016. Cocoa tea (*Camellia ptilophylla*) water extract inhibits adipocyte differentiation in mouse 3T3-L1 preadipocytes. *Sci Rep*. doi: 10.1038/srep20172.

Liu B-B, Luo L, Liu X-L, Geng D, Li C-F, Chen S-M, Chen X-M, Yi L-T, Liu Q 2015. Essential oil of *Syzygium aromaticum* reverses the deficits of stress-induced behaviors and hippocampal p-ERK/p-CREB/Brain-Derived neurotrophic factor expression. *Planta Med*. doi: 10.1055/s-0034-1396150.

Livak, KJ, Schmittgen, TD 2001. Analysis of relative gene expression data using Real-Time Quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  Method. *Methods* doi: 10.1006/meth.2001.1262.

Malone MH & Robichaud RC 1962. A hippocratic screen for pure or crude drug materials. *Lloydia* 25: 320-332.

Medzhitov R 2008. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*. doi: 10.1038/nature07201.

Mitsuoka T 2014. Development of functional foods. *Biosci Microbiota Food Health* doi: 10.12938/bmfh.33.117.

Pizzo F, Gadaleta D, Lombardo A, Nicolotti O, Benfenati E 2015. Identification of structural alerts for liver and kidney toxicity using repeated dose toxicity data. *Chem central J* doi: 10.1186/s13065-015-0139-7.

Pušárová A, Bučková M, Kraková, L, Pangallo D, Kozics K 2017. The antibacterial and antifungal activity of six essential oils and their cyto/genotoxicity to human HEL 12469 cells. *Sci Rep*, doi: 10.1038/s41598-017-08673-9.

Rong SL, Wang XL, Wang YC, Huan WU , Zhou XD, Wang ZK, Wang YC , Xue C, Li B, Gao DL. 2018. Anti-inflammatory activities of hepatocyte growth factor in post-ischemic heart failure. *Acta Pharmacologica Sinica*. doi: 10.1038/aps.2018.14.

Santos-Sánchez NF, Salas-Coronado R, Valadez-Blanco R, Hernández-Carlos B, Guadarrama-Mendoza PC 2017. Natural antioxidant extracts as food preservatives. *Acta Sci Pol Technol Aliment* doi: 10.17306/J.AFS.0530.

Sechhi MF, Crescenzi M, Masola V, Russo FP, Floreani A, Onisto M. 2017. Heparanase and macrophage interplay in the onset of liver fibrosis. *Scientific Reports*. doi 10.1038/s41598-017-14946-0.

Sharif Z, Mustapha F, Jai J, Yusof NM, Zaki N. 2017. Review on methods for preservation and natural preservatives for extending the food longevity. *Chem Eng Res Bull* doi: 10.3329/ceerb.v19i0.33809.

Souza KSS, Oliveira SP, Duarte SM, Brandi IV, Santos SHS, Santos EMS, Farias PKS, Santos HO, Almeida AC 2018. Standardization of the methodology for calorimetric analysis of a fermented milk drink. *Caderno de Ciências Agrárias 10*: 61-63. Available from: <https://seer.ufmg.br/index.php/ccaufmg/article/view/11856>.

Taher YA, Samud AM., El-Taher FE, Ben-Hussin G, Elmezogi JS, Al-Mehdawi BF, Salem HA 2015. Experimental evaluation of anti-inflammatory, antinociceptive and antipyretic activities of clove oil in mice. *Libyan J Med* doi: 10.3402/ljm.v10.28685.

Tu Z, Moss-Pierce T, Ford P, Jiang TA 2014. *Syzygium aromaticum* L. (Clove) Extract regulates energy metabolism in myocytes. *J Med Food* doi: 10.1089/jmf.2013.0175.

Xu Q, Higgins T, Cembrowski GS 2015. Limiting the testing of AST. *Am J Clin Pathol* doi: 10.1309/ajcpo47vawyridhg.


## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Esse é o primeiro trabalho que avalia como a bebida láctea fermentada com adição de 2ul/ml do óleo essencial de *S. aromaticum* funciona no organismo de animais. Vale ressaltar que este trabalho verificou que essa bebida tem um potencial funcional promissor, pois os animais apresentaram menor nível glicêmico na área sobre a curva do TSI e TTG. Os parâmetros bioquímicos, as análises histopatológicas do fígado e expressão das citocinas pró-inflamatórias (IL1 $\beta$ , IL6 e TNF $\alpha$ ) e anti-inflamatória (IL-10), não se diferiram em nenhum dos grupos.

Dessa forma, concluímos que essa bebida pode ser considerada segura para uso com cautela, desde que a dose do óleo essencial de cravo não ultrapasse os limites diários que os humanos possam consumir por dia do óleo essencial de cravo da Índia.

**APÊNDICE(S)**

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

	<b>Título do Projeto:</b> Metabolismo de camundongos alimentados com bebida láctea fermentada adicionada de óleo essencial de <i>Syzygium aromaticum</i> ICA/UFMG	<b>IDENTIFICAÇÃO DO ANIMAL POR MARCAÇÃO</b>
	<b>IDENTIFICAÇÃO DO GRUPO:</b>  <b>DATA DE NASCIMENTO:</b> /        / <b>DATA DE INÍCIO DO EXPERIMENTO:</b> /        /	<b>QUANTIDADE DE ANIMAIS:</b> 8 <b>SEXO:</b> Macho <b>ESPÉCIE/LINHAGEM:</b> Camundongos Machos <i>Swiss</i>
		<b>DISCENTES RESPONSÁVEIS:</b> Keicy Sandy e Stephanie Pedrosa <b>CONTATO:</b> (38) 9 84043233

## 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>DATA:</b> / / a / /	<b>Volume inicial (mL)</b>	<b>Volume final (mL)</b>	<b>Volume Consumido (mL)</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**

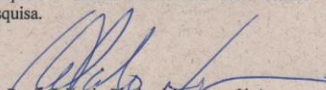
O Brasil está entre os principais produtores de Óleos Essenciais (OE), dentre as plantas utilizadas tem-se o Cravo da Índia, apresenta diversas funções farmacológicas além de ser considerado conservante de alimentos, pode ser utilizado pela população e profissionais da saúde para prevenir e curar patologias, 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)