

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

SUÊNIA MARIA DO NASCIMENTO

**CARACTERIZAÇÃO E ESTUDO DO EFEITO DO EXTRATO
HIDROALCOÓLICO DO EPICARPO LIOFILIZADO DO
Syzygium cumini L. EM RATOS ESPONTANEAMENTE
HIPERTENSOS (SHR)**

JOÃO PESSOA-PB

2015

SUÊNIA MARIA DO NASCIMENTO

**CARACTERIZAÇÃO E ESTUDO DO EFEITO DO EXTRATO
HIDROALCOÓLICO DO EPICARPO LIOFILIZADO DO
Syzygium cumini L. EM RATOS ESPONTANEAMENTE
HIPERTENSOS (SHR)**

JOÃO PESSOA-PB

2015

SUÊNIA MARIA DO NASCIMENTO

**CARACTERIZAÇÃO E ESTUDO DO EFEITO DO EXTRATO
HIDROALCOÓLICO DO EPICARPO LIOFILIZADO DO
Syzygium cumini L. EM RATOS ESPONTANEAMENTE
HIPERTENSOS (SHR)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Nutrição, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba em cumprimento aos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências da Nutrição. Área de concentração em Ciências da Nutrição.

Orientador: Prof. Dr. Robson Cavalcante Veras

JOÃO PESSOA-PB

2015

N244c Nascimento, Suênia Maria do.
Caracterização e estudo do efeito do extrato hidroalcoólico do epicarpo liofilizado do *Syzygium cumini* L. em ratos espontaneamente hipertensos (SHR) / Suênia Maria do Nascimento.- João Pessoa, 2015.
129f. : il.
Orientador: Robson Cavalcante Veras
Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCS
1. Nutrição. 2. Compostos antioxidantes. 3. Hipertensão.
5.Hiperglicemia. 6. Polifenóis. 7. Reatividade vascular.

UFPB/BC

CDU: 612.3(043)

SUÊNIA MARIA DO NASCIMENTO

**CARACTERIZAÇÃO E ESTUDO DO EFEITO DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO
DO EPICARPO LIOFILIZADO DO *Syzygium cumini* L. EM RATOS
ESPONTANEAMENTE HIPERTENSOS (SHR)**

Dissertação _____ em ____ / ____ /2015.

BANCA EXAMINADORA

**Prof. Dr. Robson Cavalcante Veras – Programa de Pós-Graduação Em Ciências da
Nutrição/CCS/UFPB
Coordenador da Banca Examinadora**

**Prof. Dr. Alexandre Sérgio Silva – Programa de Pós-Graduação Em Ciências da
Nutrição/CCS/UFPB
Examinador Interno**

**Prof. Dr. Isac Almeida de Medeiros – Programa de Pós-Graduação em Produtos
Naturais e Sintéticos Bioativos/CCS/UFPB
Examinador Externo**

**Profa. Dra. Jailane de Souza Aquino – Programa de Pós-Graduação Em Ciências da
Nutrição/CCS/UFPB
Examinador Suplente Interno**

**Profa. Dra. Islânia Gisélia Albuquerque Gonçalves – Departamento de Ciên
Farmacêutica /CCS/UFPB Examinador Suplente Externo**

*À minha sobrinha Maria Luiza (in memoriam), meu anjo com quem vivi os
melhores dias e que agora está olhando por mim lá do céu.
Aos meus pais minha base de vida e
Amo vocês hoje e sempre*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus pelo dom da vida, por estar ao meu lado em todos os momentos e por permitir que eu alcance mais essa vitória. A Ele toda honra e toda glória e também a Nossa Senhora, grande intercessora em todos os momentos da minha vida.

Aos meus pais **Sérgio Mercês do Nascimento** e **Maria do Socorro Luiz do Nascimento**, por todo o esforço de uma vida para que eu pudesse ser quem sou, por me apoiar incondicionalmente, pelas horas mal dormidas e pelo carinho e amor em todos os momentos, AMO VOCÊS.

Aos meus irmãos **Cinthia Caroline** e **Serginho**, que sempre estão ao meu lado torcendo por mim e lutando nos momentos difíceis. Por dividir comigo a tarefa de ir ao laboratório diariamente, inclusive nos sábados e domingos. Esta vitória é nossa.

À minha sobrinha **Maria Luiza** (*in memoriam*), que durante sua curta passagem neste mundo me proporcionou os melhores momentos de felicidade, me mostrou um amor que até então desconhecia. E que mesmo não estando mais aqui continua a me dar forças para seguir. Te amarei para sempre minha princesa.

À toda minha família, tios, tias primos e primas, em especial meu primo **Kaio César**, que vi crescer e se tornar um rapaz vencedor e que sempre torce muito por mim. E nesses últimos dias tão intensos se tornou ainda mais importante, estando onde eu não pude estar, OBRIGADA.

Ao meu orientador **Prof. Dr. Robson Cavalcante Veras**, pelos ensinamentos, durante todo o processo de construção deste trabalho. Pela paciência, e pelo apoio nos momentos mais difíceis que enfrentei e, sem dúvida, pela compreensão de sempre.

Ao professor **Dr. Isac Almeida de Medeiros**, por ter aberto o seu laboratório tão gentilmente para a execução das nossas atividades e por seus ensinamentos. Principalmente por ter aceitado participar da minha banca de dissertação e assim, contribuir para o enriquecimento deste trabalho.

Ao professor **Dr. Alexandre Sérgio Silva**, por ter aceitado participar da banca examinadora desta dissertação e por ter contribuído tão brilhantemente com este trabalho. Agradeço também pela oportunidade de, com seus ensinamentos, adquirir mais conhecimentos durante a qualificação.

À professora Dra. **Islânia Gisélia Albuquerque Gonçalves** pelos momentos de aprendizagem e por ter contribuído tão gentilmente com esta dissertação, participando da banca examinadora.

À professora **Dra. Jailane de Souza Aquino** aceitado participar da banca examinadora e por sua contribuição com este trabalho.

À professora e amiga **Fátima de Lourdes Assunção Araújo**, pelo cuidado, pela atenção, pelo apoio em todos os momentos e carinho durante esse dois anos

À técnica e amiga **Tereza** pelo apoio e dedicação durante a minha jornada. Pelas conversas amigas em momentos difíceis e por torcer sempre para que tudo desse certo para mim

À mestrande **Rayanne Araújo Torres** que enfrentou, assim como eu, as descobertas do mundo da farmacologia. E com quem dividi muitas horas de trabalho e aprendizado.

À **Thaís Porto Ribeiro** pela colaboração em importantes experimentos na execução deste trabalho.

Aos meus companheiros de mestrado **Vanessa Luna Rezende, Janilson, Lydiane Tavares, Helena, Iara Samara de Lima Coutinho, Isa Gabriela de Medeiros Cavalcante, Vitória** pelos momentos de apoio e amizade. Foi um prazer conhecer vocês e espero que nossa amizade continue.

A todos que fazem parte do **Laboratório de Farmacologia Cardiovascular** por todo aprendizado e apoio durante o processo de elaboração desta dissertação. Em especial **Tays Amanda**, que foi a minha aluna de iniciação científica e com quem aprendi muito durante esses dois anos.

A **Hassler Cavalcante** que chegou há pouco tempo, mas com sua determinação, empenho, vontade de aprender, participar e colaborou ativamente para este trabalho.

À **Luara Monteiro, Lizandra Fernandes e Lorena Soares** pelo apoio durante toda a minha caminhada, mas principalmente por abdicar de seus momentos de lazer para me ajudar na conclusão dos meus experimentos, sempre com boa vontade e alegria.

Aos **alunos do estágio de vivência** com os quais realizei meu estágio de docência. Muito obrigada pelas trocas de ensinamentos que me fizeram crescer ainda mais. Adorei ter conhecido e convivido com vocês.

A **José Crispim Duarte e Matheus Monteiro**, pelo companheirismo, disponibilidade, paciência, sempre me ajudando com o cuidado aos animais.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Nutrição, pelo aprendizado durante esses anos de mestrado.

Ao **MCTI/CNPq/MEC/Capes** pelo apoio financeiro.

Aos **animais** que tornaram possível a realização desta pesquisa, meu respeito.

A **todos** que de alguma forma, direta ou indireta, contribuíram para a execução deste trabalho.

*"Acima de tudo, não perca seu desejo de
prosseguir."
(Kierkegaard)*

RESUMO

Hipertensão e diabetes são patologias com forte impacto na saúde pública e possuem como fatores de risco, hábitos alimentares incorretos e estresse oxidativo. Neste sentido, a ciência busca por alternativas para tratamento destas enfermidades, sendo os compostos naturais uma importante linha de pesquisa. Espécies da família Myrtaceae são reconhecidas como uma relevante fonte de compostos antioxidantes e destaca-se a *Syzygium cumini* L. por apresentar atividades biológicas, principalmente ação hipoglicemiante. Atualmente, observa-se durante o processamento desta e de outras plantas uma larga produção de resíduos (ex.: epicarpo do fruto e sementes) sem o devido aproveitamento biológico e/ou terapêutico. Este estudo objetiva identificar o teor de compostos fenólicos, atividade antioxidante do extrato hidroalcoólico do epicarpo liofilizado da *S. cumini* L. (Sc-EpHE), e investigar os efeitos da ingestão crônica deste extrato no metabolismo de ratos normotensos (WKY) e hipertensos (SHR). Para caracterização do Sc-EpHE foi realizada, por cromatografia líquida de alta eficiência, a identificação de ácido gálico como marcador de padronização, determinação de fenólicos totais e da atividade antioxidante. Durante 6 semanas os animais receberam via oral diferentes doses (150 ou 300 mg/kg) do Sc-EpHE ou salina (VEÍCULO), neste período o peso foi aferido semanalmente e a ingestão de água e ração monitoradas diariamente. Ao fim do tratamento os animais foram submetidos à medida direta da pressão arterial, coleta sanguínea e posteriormente eutanasiados para coleta de órgãos. A técnica modificada de extração gerou um produto com elevado teor de fenólicos totais (5.440,86 mg EAG/100g de amostra), presença de ácido gálico e alta atividade antioxidante ($CE_{50} = 59 \mu\text{g/mL}$) determinada por DPPH. Quanto às avaliações biológicas, não observou-se diferença significativa entre os grupos para ganho ponderal. Os níveis de pressão arterial média (PAM) no SHR VEÍCULO ($153,8 \pm 5,0 \text{ mmHg}$) foram significativamente superiores ao WKY VEÍCULO ($123,0 \pm 4,86 \text{ mmHg}$). O tratamento com 150 mg/kg do Sc-EpHE não alterou significativamente a PAM. Entretanto em ratos hipertensos 300 mg/kg do Sc-EpHE reduziu $29,77 \pm 8,12 \text{ mmHg}$ de PAM quando comparados com o veículo. A resposta contrátil induzida à fenilefrina foi significativamente superior no SHR VEÍCULO ($E_{\text{máx}} = 153,4 \pm 14,2\%$) em relação ao WKY VEÍCULO ($E_{\text{máx}} = 100,2 \pm 10,5\%$). Os SHR tratados com 300 mg/kg do Sc-EpHE ($E_{\text{máx}} = 116,7 \pm 6,7\%$) apresentaram resposta contrátil à fenilefrina reduzida em comparação com SHR VEÍCULO. O vasorelaxamento induzido pelo NPS no SHR 150 mg/kg não foi alterado, entretanto no SHR 300 mg/kg ($E_{\text{máx}} = 82,2 \pm 3,7\%$) o efeito foi reduzido quando comparado com WKY VEÍCULO ($E_{\text{máx}} = 100,0 \pm 4,7\%$). Os animais SHR 300 mg/kg apresentaram redução significativa da glicemia de jejum durante a quarta ($25,5 \pm 7,06 \text{ mg/dL}$) e quinta ($30,83 \pm 7,06 \text{ mg/dL}$) semana de tratamento. Resultados preliminares de microscopia de fluorescência sugerem que os animais SHR apresentam produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (ROS) e que o tratamento com 300 mg/kg do Sc-EpHE atenua essa produção. Portanto, nossos resultados demonstram que o Sc-EpHE apresenta elevado conteúdo de fenólicos e atividade antioxidante e sugerem que a administração oral do Sc-EpHE possui atividade anti-hipertensiva por atenuar a resposta contrátil e, possivelmente, a produção de ROS, além de reduzir os níveis glicêmicos em SHR.

PALAVRAS-CHAVE: antioxidante, frutas, hipertensão, hiperglicemia, polifenóis, reatividade vascular

ABSTRACT

Hypertension and diabetes are diseases with a strong impact on public health and have risk factors, incorrect eating habits and oxidative stress. In this sense, the science search for alternatives to the treatment of these diseases, being natural compounds an important research line. Family Myrtaceae species are recognized as a major source of antioxidant compounds and stands out *Syzygium cumini* L. to present biological activities, especially hypoglycemic. Currently, one observes during the processing of this and other plants a wide production waste (eg.: fruit epicarp and seeds) without proper biological utilization and / or therapeutic. This study aims to identify the content of phenolic compounds, antioxidant activity of the hydroalcoholic extract lyophilized epicarp of *S. cumini* L. (Sc-EPHE), and investigate the effects of chronic intake of this extract in normotensive rats metabolism (WKY) and hypertensive (SHR). To characterize the Sc-Ephesus was carried out by high-performance liquid chromatography, the identification of gallic acid as a marker of standardization, determination of total phenolic and antioxidant activity. During six weeks the animals received via different oral doses (150 or 300 mg/kg) of Sc-EpHE or saline (VEHICLE) in this period the weight was measured weekly and water intake and ration monitored daily. After treatment the animals underwent direct measurement of blood pressure, blood collection and later euthanized for collection agencies. The modified extraction technique generated a product with high content of phenolic compounds (5440.86 mg GAE/100g sample), presence of gallic acid and high antioxidant activity ($EC_{50} = 59 \mu\text{g/ mL}$) determined by DPPH. As for biological assessments, there was no significant difference between groups for weight gain. The average blood pressure levels (MAP) in SHR VEHICLE (153.8 ± 5.0 mmHg) were significantly higher than WKY VEHICLE (123.0 ± 4.86 mmHg). Treatment with 150 mg/kg Sc-EpHE did not significantly alter the MAP. However hypertensive rat 300 mg/ kg of Sc-EpHE reduced 29.77 ± 8.12 mmHg of MAP compared to vehicle. The contractile response induced to phenylephrine was significantly higher in SHR VEHICLE ($E_{\text{max}} = 153.4 \pm 14.2\%$) compared to WKY VEHICLE ($E_{\text{max}} = 100.2 \pm 10.5\%$). SHR treated with 300 mg/kg Sc-EpHE ($E_{\text{max}} = 116.7 \pm 6.7\%$) showed reduced contractile response to phenylephrine in SHR compared to vehicle. The induced vasorelaxation NPS in SHR 150 mg/kg was not changed, however the SHR 300 mg/kg ($E_{\text{max}} = 82.2 \pm 3.7\%$) the effect was reduced as compared with WKY VEHICLE ($E_{\text{max}} = 100.0 \pm 4.7\%$). The SHR 300 mg/kg showed a significant reduction in fasting blood glucose during the fourth (25.5 ± 7.06 mg/dL) and fifth (30.83 ± 7.06 mg/dL) week of treatment. Fluorescence microscopy preliminary results suggest that the SHR have excessive production of reactive oxygen species (ROS) and treatment with 300 mg/kg Sc-EpHE attenuate this production. Therefore, our results demonstrate that the Sc-EpHE has a high content of phenolics and antioxidant activity, and suggest that oral administration Sc-EpHE has antihypertensive activity for attenuating the contractile response, and possibly, the production of ROS and reduce glucose levels in SHR.

KEYWORDS: fruits, polyphenols, antioxidant, hypertension, hyperglycemia, vascular reactivity

LISTA DE FIGURAS

Dissertação

Figura 1 – Produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio.....	32
Figura 2 – Sistema de defesa antioxidante.....	35
Figura 3 – Orientações para realização da dieta DASH (do inglês, Dietary Approaches to Stop Hypertension).....	39
Figura 4 – Estrutura dos polifenóis.....	44
Figura 5 – Atuação dos polifenóis na saúde cardiovascular.....	46
Figura 6 - Esquema de atuação dos polifenóis na célula endotelial e célula muscular lisa vascular.....	48
Figura 7 – Fruto da <i>Syzygium cumini</i> L (<i>S. cumini</i> L.).....	50
Figura 8- Determinação de fenólicos totais.....	56
Figura 9 – Protocolo de execução do estudo.....	58
Figura 10 – Preparação de artéria mesentérica superior de rato.....	61
Figura 11 – Sistema de cubas e aquisição de dados de tensão isométrica para órgãos isolados.....	63
Figura 12 – Representação da verificação da viabilidade do órgão e da integridade do endotélio vascular. A) Presença do endotélio e B) Ausência do endotélio funcional.....	63

Artigo

Figure 1- HPLC-PDA chromatograms effect of hydroalcoholic extract of lyophilized epicarp of <i>Syzygium cumini</i> L. (3) – galic acid.....	111
Figure 2 – Evolution of weight gain in the treatment group to the WKY VEHICLE, WKY 150 mg/kg, WKY 300 mg/kg, SHR VEHICLE, SHR 150 mg/kg and SHR 300 mg/kg (n = 12). Analysis of the final weight after 6 weeks of treatment with Sc-EpHE (mean ± sem).....	112
Figure 3 – Representative bars of mean arterial pressure (MAP) (A). MAP normalized by the WKY VEHICLE group (B), heart rate (HR) (C); HR normalized by the WKY VEHICLE group (D) WKY and SHR treated for 6 weeks with vehicle, 150 mg/kg and 300 mg/kg Sc-EpHE (mean ± sem). Statistical	

difference assessed by <i>twoway</i> ANOVA: * P <0.05 indicates a significant difference versus SHR VEHICLE.....	114
Figure 4 – (A) Concentration-response curve to phenylephrine (Phe) (10^{-9} - 10^{-5} M) mesenteric artery rings without endothelium of WKY rats treated with vehicle or EHACS; (B) concentration-response curve to Phe in mesenteric artery rings without endothelium of groups (WKY VEHICLE; SHR VEHICLE; SHR 150 mg/kg and SHR 300 mg/kg); (C) concentration-response curve for sodium nitroprusside (SNP) (10^{-9} - 10^{-5} M) in mesenteric artery rings without endothelium pre-contracted with Phe (10 μ M) (10 μ M) of the vehicle-treated WKY and EHACS; (D) concentration-response curves to SNP in mesenteric artery rings without endothelium pre-contracted with Phe (10 μ M) of groups (WKY VEHICLE ; SHR VEHICLE, SHR 150 mg/kg and SHR 300 mg/kg). Results are expressed as mean $\pm$ standard error of the mean. Statistical difference assessed by one-way ANOVA: * P <0.05 indicates a significant difference versus WKY – VEHICLE.....	116

Dados adicionais

Figura 1 – Barras representativas de valores de glicemia capilar semanal (%) normalizada pelo dia “0” em ratos WKY veículo, WKY 300 mg/kg, SHR veículo, e SHR 300 mg/kg.....	124
Figura 2 – Secções arteriais aórticas expostas ao corante fluorescente sensível a redox de DHE, durante 30 min a 37°C. Posteriormente, a fluorescência foi determinada por microscopia confocal. (A) WKY VEÍCULO, (B) SHR VEÍCULO and (C) SHR 300 mg/kg.....	125

LISTA DE TABELAS

Dissertação

Tabela 1– Definição e classificação da pressão de acordo com a medida casual no consultório (>18 anos).....	24
Tabela 2 – Classe de polifenóis, subclasses e compostos.....	45
Tabela 3 - Composição da solução de Tyrode para artéria mesentérica.....	59

Artigo

Table 1 – Evolution weekly water and food intake in the vehicle WKY groups WKY 150 mg/kg WKY 300 mg/kg VEHICLE SHR, SHR 150 mg / kg and SHR 300 mg/kg (n = 12) for 6 weeks treatment with Sc-EpHE (mean ± sem). Statistical difference assessed by <i>twoway</i> ANOVA: * P <0.05 indicates a significant difference versus SHR VEHICLE; # P <0.05 indicates a significant difference versus SHR 300mg/kg.....	113
Table 2: Effects of Sc-EpHE treatment on maximum effect (Emax) to phenylephrine.....	119
Table 3: Effects of Sc-EpHE treatment on maximum effect (Emax) to sodium nitroprusside.....	122

Dados adicionais

Tabela 1 - Variáveis bioquímicas no soro dos ratos WKY veículo, WKY 150 mg/kg , WKY 300 mg/kg , SHR VEÍCULO, SHR 150 mg/kg e SHR 300 mg/kg (n= 12) após 6 semanas de tratamento com o EHACS (média ±epm).....	124
---	-----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DCNT -	Doenças crônicas não transmissíveis
DCV-	Doença cardiovascular
DM	Diabetes mellitus
PA-	Pressão arterial
HAS-	Hipertensão arterial sistêmica
SHR-	Rato espontaneamente hipertenso
<i>S. cumini</i> L. -	<i>Syzygium cumini</i> L.
Sc-EpHE	Extrato hidroalcoólico do epicarpo liofilizado da <i>S. Cumini</i> L.
ROS-	Espécies reativas de oxigênio
EDRFs-	Fatores de relaxamento derivados do endotélio
EDCFs-	Fatores contraturantes derivados do endotélio
PAS-	Pressão arterial sistólica
PAD-	Pressão arterial diastólica
PGI2-	Prostaciclina
EDHF-	Fator hiperpolarizante derivado de endotélio
NO-	Óxido nítrico
NOS-	Óxido nítrico sintetase
eNOS-	Óxido nítrico sintetase endotelial
H ₂ S-	Sulfeto de Hidrogênio
NADPHoxidase-	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida
O ₂ ⁻ -	Ânion superóxido
H ₂ O ₂ -	Peróxido de hidrogênio
WKY-	Ratos <i>wistar-kyoto</i>
IMC-	Índice de massa corporal
VET-	Valor energético total
DASH-	Dietary Approaches to Stop Hypertension
NFκB-	Fator nuclear kappa B
COX-	Ciclooxigenase
LOX-	Lipoxigenase
iNOS-	Óxido nítrico sintase induzível
MDA-	Malondialdeído
DAC-	Doença arterial coronária
PI3K-	Fosfatidilinositol 3-quinase
ANG II-	Angiotensina II
VSMC-	Vascular smooth muscle cell
SUS-	Sistema único de saúde
RENISUS-	Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS
PPARα-	Proliferador de peroxissoma ativado por receptor alfa
PPARγ-	Proliferadores de peroxissoma ativado por receptor gama
CEUA-	Comissão de Ética no Uso de Animais do Centro de Biotecnologia
EMPASA-	Empresa Paraibana de Abastecimento e Serviços

	Agrícolas
TPC-	Teor de fenólicos totais
DPPH-	2,2-difenil-b-picrilhidrazil
HPLC-	High-performance liquid chromatography
AAT-	Atividade antioxidante total
UFPB-	Universidade Federal da Paraíba
PAM-	Pressão arterial média
FC-	Frequência cardíaca
PAP-	Pressão Arterial Pulsátil
ALKP-	Fosfatase alcalina
FEN-	Fenilefrina
NPS-	Nitroprussiato de Sódio
ACh-	Acetilcolina

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	19
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	23
2.1 HIPERTENSÃO	23
2.1.1 Definição e epidemiologia.....	23
2.1.2 Ratos espontaneamente hipertensos.....	25
2.1.3 Fisiopatologia da Hipertensão.....	26
2.2 DIABETES.....	29
2.3 ESTRESSE OXIDATIVO E SUAS IMPLICAÇÕES PATOLÓGICAS.....	32
2.4 SISTEMA DE DEFESA ANTIOXIDANTE	34
2.5 PADRÃO ALIMENTAR COMO FONTE ALTERNATIVA DE TRATAMENTO DA HIPERTENSÃO E DIABETES.....	37
2.6 ALIMENTOS FUNCIONAIS E NUTRACÊUTICOS.....	41
2.7 COMPOSTOS FENÓLICOS.....	43
2.7.1 Definição e Estrutura química.....	43
2.7.2 Propriedades Terapêuticas.....	46
2.8 <i>Syzygium Cumini</i>	49
2.8.1 Caracterização.....	49
2.8.2 Propriedades Terapêuticas	51
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	54
3.1 TIPO DE ESTUDO.....	54
3.2 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS.....	54
3.3 CONTEÚDO FENÓLICO E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DAS AMOSTRAS.....	54
3.3.1 Obtenção e preparação do extrato hidroalcoólico do epicarpo da <i>Syzygium cumini</i> L. (Sc-EpHE).....	54
3.3.2 Determinação de fenólicos totais.....	54
3.3.3 Determinação da Atividade Antioxidante.....	56
3.3.4 Cromatografia líquida de alta eficiência – CLAE.....	56
3.4 ESTUDOS <i>IN VIVO</i>	57
3.4.1 Animais e Dietas.....	57
3.4.2 Soluções fisiológicas.....	59

3.4.3 Substâncias e Meios utilizados.....	59
3.4.4 Estudo da medida da pressão arterial.....	59
3.4.4.1 Cirurgia para implantação das cânulas	59
3.4.4.2 Medida direta da PA.....	60
3.4.5 Avaliação dos parâmetros metabólicos.....	60
3.4.6 Pesagem de órgãos.....	60
3.5 ENSAIOS <i>IN VITRO</i>.....	61
3.5.1 Preparações dos anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato.....	61
3.5.2 Avaliação do tratamento com o Sc-EpHE sobre a reatividade vascular.....	63
3.5.3 Medida de ROS por microscopia de fluorescência.....	63
3.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	64
REFERÊNCIAS.....	65
APÊNDICE	
ARTIGO.....	82
DADOS ADICIONAIS.....	123
PERSPECTIVAS.....	127
ANEXO	
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS	
CERTIDÃO.....	129

1. INTRODUÇÃO

Os maus hábitos alimentares (dietas ricas em gordura, alimentos refinados, açúcares e pobre em fibras) e o estilo de vida sedentária da população moderna, expõem o homem a diversos fatores de risco contribuindo para o desenvolvimento de doenças crônicas não transmissíveis (DCNT), promovendo uma mudança no perfil epidemiológico mundial, onde a mudança nos padrões nutricionais associadas às mudanças sociais, econômicas e demográficas tem promovido um acréscimo no número de doenças tais como a obesidade, diabetes, doenças cardiovasculares (DCV), doenças aterotrombóticas, osteoporose e cânceres (POPKIN, 1993; WONG et al., 2012).

As DCVs são as principais causas de mortes prematuras e morbidades incapacitantes em todo o mundo, afetando cerca de 30 % da população no Brasil e no mundo. Contribuindo substancialmente com o aumento dos custos de tratamento de saúde. Diante do atual cenário, estima-se que nas próximas décadas ocorra um aumento ainda mais significativo dessas doenças (OH ,GALIS, 2014; RAFTOPOULOS et al., 2014; VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão, 2010; HEALTH ,SERVICES, 2003).

Assim como as DCVs, o Diabetes mellitus (DM) tem se tornado uma doença epidêmica nos últimos anos, atingindo quase 250 milhões de pessoas no mundo em 2012 (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2013), só no Brasil aproximadamente 14 milhões de pessoas (6,9%) possuem DM (BRASIL, 2014). É uma doença metabólica complexa e grave, as alterações fisiopatológicas ocasionadas pelo DM, principalmente o desenvolvimento de complicações micro e macrovasculares tornam o DM um importante fator de risco para DCVs, como doença arterial coronária e doença vascular periférica (TAN et al., 2015)

Há muito se estima que a dieta possua importante participação na etiologia da DCV, entretanto, ainda existem lacunas sobre quais os componentes da dieta estão associados ao risco de DCV. Assim, a ciência demonstra crescente interesse em pesquisa de alimentos e/ou nutrientes que possuam fatores protetores das DCV, como os antioxidantes presentes em frutas e vegetais (NESS ,POWLES, 1997). Estudos demonstram que consumir pelo menos cinco porções diárias de frutas e vegetais é recomendado para reduzir os riscos de DCVs e câncer (HEIMENDINGER et al., 1996; KRAUSS et al., 2000). Em sua revisão Hung (2004) observa que o elevado consumo de frutas e vegetais está associado com uma modesta redução no risco de desenvolver DCNTs, entretanto, não se observa os mesmos resultados frente ao

câncer. Outros estudos, no entanto, demonstram que uma dieta rica em frutas e vegetais está relacionada com a redução na incidência de doenças cardiovasculares (BLOMHOFF, 2005; BADIMON, VILAHUR, PADRO, 2010).

Diante dessas evidências, a ciência buscou analisar as propriedades terapêuticas de diversos alimentos, surgindo assim, os conceitos de alimento funcional e nutracêutico. Qualquer alimento ou ingrediente alimentar que devido à sua composição possua benefícios à saúde, além de seus nutrientes tradicionais, são reconhecidos como alimentos funcionais (HASLER, 1998). Nutracêutico, um termo oriundo de uma fusão das ciências da nutrição e farmacêutica, diferencia-se de alimentos funcionais por ser indicado para produtos que são isolados de fitoterápicos, suplementos alimentares, dietas específicas e alimentos processados que além de ofertarem os nutrientes necessários ainda podem ser usados como medicamentos para melhorar a saúde, retardar o processo de envelhecimento, prevenir doenças, ou ainda aumentar a expectativa de vida (NASRI et al., 2014).

Assim, foi instituído no Brasil, o Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, em 2006, que incentiva a pesquisa com plantas medicinais. A partir da implantação e execução das diretrizes desse programa e da necessidade de elencar quais seriam as plantas medicinais com potencial uso para o SUS surgiu, a Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (RENISUS). Essa lista orienta pesquisas para estabelecimento da segurança, da eficácia e da qualidade de fitoterápicos obtidos das espécies listadas, afim de que obtenham aprovação da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) para comercialização.

A *Syzygium cumini* L. (família Myrtaceae) é uma árvore frutífera originária da Índia, bem adaptada aos climas tropicais e que é amplamente encontrada em algumas partes da América, bastante comum no Brasil principalmente, na região nordeste (AQIL et al., 2012). Conhecido popularmente como Jamelão – o fruto da *Syzygium cumini* Lamarck (*S. cumini* L.) – apresenta em sua composição carboidratos, minerais, vitaminas e vários metabólitos secundários, inclusive polifenóis. Entre os minerais, destacam-se manganês, zinco, ferro, cálcio, sódio e potássio (MOHAMED, ALI, EL-BAZ, 2013). Tem-se atribuído à fruta importantes propriedades terapêuticas, devido aos seus fitoconstituintes como antocianinas, isoquercetina, ácido elágico, glicosídeos, canferol, miricetina e ácido gálico (AYYANAR, SUBASH-BABU, 2012).

Estudos que utilizaram extratos realizados com as folhas da *S. cumini* L. demonstraram que esta parte da planta apresenta ação hipoglicemiante (FRANÇA, 2010), possivelmente devido à capacidade de inibir α -amilase (BHAT et al., 2011); ação anti-

hipertensiva em modelos animais (RIBEIRO et al., 2014), e ainda reduziu níveis de glicose em amostras sanguíneas de pacientes hiperglicêmicos (BOPP et al., 2009). A semente da *S. cumini* L. representa uma das partes mais estudadas, e também tem sido reconhecida eficaz na prevenção e tratamento do diabetes em modelo animal (SHARMA, BALOMAJUMDER, ROY, 2008; SHARMA et al., 2012). Além de demonstrar ação hipolipemiante (RAVI, RAJASEKARAN, SUBRAMANIAN, 2005), e inibição da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) em mioblastos cardíacos (ATALE et al., 2013). A atividade antioxidante do fruto de *S. cumini* L. tem sido bastante estudada recentemente e demonstra importante relação entre os taninos presentes e as propriedades antioxidantes (MOHAMED, ALI, EL-BAZ, 2013). Os frutos maduros da *S. cumini* L. apresentam propriedades terapêuticas, entre elas: estimulação hepática, digestiva, carminativas e hipoglicemiante (AYYANAR, SUBASH-BABU, 2012).

O epicarpo (casca/pele) da fruta e dos vegetais é uma das partes do fruto que apresenta importante conteúdo de nutrientes e fitoquímicos. Em estudo que analisou a composição dos resíduos de frutas, se observou que os teores totais de fenólicos de extratos do epicarpo eram mais elevados do que os extratos de polpa (DENG et al., 2012). Entretanto, o epicarpo é considerado um resíduo/subproduto sendo desprezado durante o processamento de frutas e vegetais (BARROS, 2011). Assim se observa, que diante do elevado conteúdo de compostos bioativos antioxidantes existente nas frutas, principalmente no epicarpo, pode-se conferir a esta desprezada parte, propriedades nutraceuticas que a tornem de interesse para consumo e para indústrias alimentar e farmacêutica (DENG et al., 2012). Pouco se sabe sobre o efeito dos frutos, principalmente do epicarpo da *S. cumini* L. na hipertensão. Herculano (2014) demonstrou que o extrato hidroalcoólico do fruto da *S. cumini* L. promoveu redução aguda da pressão arterial média (PAM).

O estresse oxidativo que é definido como um estado de desequilíbrio entre a produção de espécies reativas e os sistemas de defesa antioxidantes no corpo está intrinsecamente relacionado com a patogênese da hipertensão, as alterações causadas pelas espécies reativas de oxigênio (ROS) na parede das células vasculares podem colaborar com o mecanismo da hipertensão (GONZÁLEZ, 2014). Do mesmo modo, as ROS estão envolvidas no desenvolvimento e progressão do diabetes por meio de um ciclo em que hiperglicemia induz a geração de ROS e estas promovem uma cascata de sinalização que desencadeia complicações micro e macrovasculares do diabetes (RAINS, JAIN, 2011; KARUNAKARAN, PARK, 2013; BANERJEE, VATS, 2013).

A forte relação da produção de estresse oxidativo com o controle da pressão arterial e da glicemia pode trazer muitos malefícios à saúde. Desta forma, o combate a este excessivo metabólito é uma importante estratégia para reduzir danos causados na hipertensão e diabetes, ou mesmo, auxiliar no impedimento de sua instalação. Sabendo do elevado conteúdo de polifenóis da *S. cumini* L. e da importância do estresse oxidativo na DCNT, como HAS e DM, este estudo busca investigar uma possível relação benéfica entre a ingestão de produtos da *S. cumini* L. no curso da HAS e ainda suas implicações no metabolismo glicídico.

O objetivo geral deste trabalho foi identificar o teor dos compostos fenólicos presentes no extrato hidroalcoólico do epicarpo liofilizado da *S. cumini* L., bem como, investigar os efeitos da ingestão deste extrato em ratos normotensos e em ratos hipertensos (SHR). E como objetivos específicos, determinar o teor de compostos fenólicos e atividade antioxidante presentes no extrato hidroalcoólico do epicarpo liofilizado da *S. cumini* L (Sc-EpHE); avaliar a ação do extrato nos parâmetros metabólicos (glicemia basal capilar, triglicerídeo plasmático, colesterol total, HDL-C, LDL-C), bem como, os efeitos do tratamento com o Sc-EpHE sobre a pressão arterial, a reatividade vascular em artéria mesentérica superior isolada e a produção de espécies reativas de oxigênio em artéria aorta de ratos normotensos e SHR.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 HIPERTENSÃO

2.1.1 Definição e Epidemiologia

As doenças cardiovasculares representam a principal causa de incapacidade e mortalidade em todo mundo. Cerca de um terço das mortes prematuras em homens e um quarto das mortes prematuras em mulheres são ocasionadas por alguma doença cardiovascular. Entre os vários fatores de risco para o desenvolvimento das DCVs tais como, hipercolesterolemia, resistência à insulina, síndrome metabólica; aumento da pressão arterial, conhecida como hipertensão, que apresenta posição de destaque (KIVIMAKI et al., 2013; RAPEPORT ,MIDDLEMOST, 2012; BERNATOVA, 2014).

Nos Estados Unidos, um a cada três adultos são afetados pela hipertensão, número que se aproxima de 78 milhões de indivíduos. A elevada prevalência da hipertensão se torna muito onerosa para a saúde pública, em 2010 estima-se que U\$ 93,5 bilhões de dólares foram gastos em serviços de saúde. Além do gasto aproximado de U\$ 215 milhões com pesquisas para descoberta de novas terapias (OH ,GALIS, 2014). Estudos na Europa apontam que entre 30-45% dos indivíduos apresentam hipertensão, e esse número aumenta consideravelmente com o envelhecimento (MANCIA et al., 2013). No Brasil, estudos revelam que a prevalência estimada de hipertensão na população adulta é de média de 32,5%, sendo superior a 50% entre 60 e 69 anos e 75% acima de 70 anos (SANTOS et al., 2013).

A hipertensão arterial sistêmica (HAS) é reconhecidamente um grave problema de saúde pública em todo o mundo. Embora tenha sido uma das primeiras condições clínicas que se tem relato, ainda desperta grande interesse por parte da comunidade científica, pois existem muitas lacunas para compreensão do mecanismo causal subjacente à hipertensão (GONZÁLEZ, 2014; MAYET ,HUGHES, 2003; BRASIL, 2006). É uma doença conceituada como uma condição clínica multifatorial, caracterizada por elevados níveis de pressão arterial e sustentação desses níveis. Para sua determinação são considerados os valores ≥ 140 mmHg da pressão arterial sistólica (PAS) e/ou ≥ 90 mmHg da pressão arterial diastólica (PAD), como disposto na Tabela 1 (VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão, 2010).

Tabela 1– Definição e classificação da pressão de acordo com a medida casual no consultório (>18 anos)

Categoria	Pressão sistólica (PAS)	Pressão diastólica (PAD)
Ótima	<120	<80
Normal	<130	<85
Limítrofe	130-139	85-89
Hipertensão estágio 1	140-159	90-99
Hipertensão estágio 2	160-179	100-109
Hipertensão estágio 3	≥ 180	≥110
Hipertensão sistólica isolada	>140	< 90

Quando as pressões sistólica e diastólica situam-se em categorias diferentes, a maior deve ser utilizada para classificação da pressão arterial

Fonte: Adaptado da VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão, 2010

A hipertensão essencial ou primária é uma síndrome poligênica decorrente de aspectos genéticos e ambientais. Entre os fatores que aumentam o risco de desenvolvimento de HAS, tem-se: (1) a etnia - indivíduos negros (32,4%) são mais propensos a desenvolverem HAS; (2) a idade - após os 65 anos há um aumento na prevalência de HAS; (3) gênero - até os 50 anos há uma maior predisposição entre os homens de desenvolver a HAS, entretanto após essa fase as mulheres possuem maior prevalência, este fato pode ser associado às mudanças causadas pela menopausa; (4) estilo de vida - o sedentarismo aumenta em 30% a incidência de hipertensão; (5) hábitos alimentares - a ingestão de sal elevada (ou moderada para indivíduos sal-sensíveis), a baixa ingestão de potássio e cálcio, independentes ou em conjunto demonstram ser fatores influentes na hipertensão; (6) etilismo - a ingestão elevada de álcool (crônica ou aguda) está associada com a maior ocorrência de HAS em algumas populações (CARRETERO ,OPARIL, 2000; VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão, 2010); (7) obesidade - o excesso de peso está associado a uma maior ocorrência de hipertensão, algumas hipóteses envolvem alteração do sistema renina-angiotensina-aldosterona, do sistema nervoso simpático e da regulação metabólica (KANG, 2013) e (8) resistência à insulina - a insulina pode aumentar a reabsorção renal de sódio, ativação do sistema nervoso simpático, alterar o transporte iônico transmembrana e ainda causar a hipertrofia dos vasos de resistência (SALVETTI et al., 1993).

As formas secundárias ocorrem quando a hipertensão se desenvolve a partir de uma causa identificável. São raras, afetando entre apenas 5 e 10 % da população e frequentemente

promovem resistência ao tratamento, e seu efeito só é revertido com a remoção do fator etiológico. A lista de condições que causam a hipertensão secundária é longa e inclui uma grande variedade, como apnéia obstrutiva do sono, doença do parênquima renal, estenose da artéria renal, aldosteronismo primário e síndrome de Cushing (RIMOLDI, SCHERRER, MESSERLI, 2014).

2.1.2 Ratos espontaneamente hipertensos

Devido à alta prevalência e os impactos causados pela hipertensão arterial, e por ser uma doença que apresenta diversos fatores causais, uma série de modelos experimentais tem sido proposto para o estudo da hipertensão em animais. O uso de modelos que mimetizem a hipertensão humana se torna útil, tanto por promover uma melhor compreensão da causa e progressão da doença, como por permitir intervenções terapêuticas experimentais. Os modelos desenvolvidos podem ser divididos em dois grandes grupos: os geneticamente modificados e os não modificados geneticamente (DORNAS, SILVA, 2011; MORENTE ESPINOSA, 2012).

Nesse sentido, Okamoto e Aoki (1963) desenvolveram a linhagem de ratos espontaneamente hipertensos (SHR) através do cruzamento de ratos *wistar-kyoto* (WKY). Este é considerado um modelo adequado para o estudo do mecanismo, fisiopatologia e tratamento da hipertensão arterial essencial ou primária, pois a hipertensão se desenvolve inicialmente sem lesões de órgãos e com alterações hemodinâmicas devido à resistência vascular periférica. E ainda apresenta serias complicações cardiovasculares com o progresso da doença, demonstrando forte semelhança com a hipertensão em humanos (YAMORI, 1977; PINTO, PAUL, GANTEN, 1998).

Os níveis elevados de pressão arterial começam a ocorrer entre a 5-6ª semana de vida e aumenta de forma progressiva até atingir valores sistólicos entre 180 e 200 mmHg por volta da 12ª semana de vida, sem intervenção fisiológica, farmacológica ou cirúrgica (PINTO, PAUL, GANTEN, 1998). A hemodinâmica da patologia mostra que a pressão se eleva a partir do aumento da resistência vascular periférica associado à diminuição do débito cardíaco e do volume sistólico, quadro semelhante à hipertensão essencial humana (MORENTE ESPINOSA, 2012). Entretanto, este modelo é influenciado por fatores ambientais, tais como: ingestão exagerada de sódio, estresse, alterações sociais e alterações do ciclo claro/escuro (TRIPPODO, FROHLICH, 1981).

Em sua revisão, Bernatova (2014) relata que os achados sobre a interferência do óxido nítrico (NO) e da disfunção endotelial no desenvolvimento da hipertensão, em SHR, ainda são muito controversos. Pois, observa-se que a disfunção endotelial em ratos SHR sofre influência de fatores como: a idade do animal, tipo de artéria analisada, e ainda os métodos usados para avaliar a função vascular; e que não pode ser afirmado que a disfunção endotelial precede a hipertensão nesse modelo animal. Entretanto, sabe-se que a presença de HAS promove danos à função endotelial e remodelamento vascular.

2.1.3 Fisiopatologia da Hipertensão

A pressão arterial é mantida por variações no débito cardíaco e na resistência vascular periférica (MAYET, 2003). Estas variáveis por sua vez, são reguladas por outros fatores como o sistema nervoso autônomo, a estrutura do sistema cardiovascular, fatores humorais, os mecanismos de controle renal de eletrólitos plasmáticos e o volume sanguíneo (CARRETERO, OPARIL, 2000; CAIN, KHALIL, 2002).

O sistema nervoso autônomo (SNA) é o mais poderoso e mais rápido sistema de controle para o bombeamento cardíaco, a resistência e a distribuição do fluxo sanguíneo. Entretanto a hipertensão relacionada com ativação simpática pode ter origem no sistema nervoso central, que promove alterações funcionais na modulação do fluxo simpático e/ou na capacidade de resposta adrenérgica exacerbada para estímulos de stress (FOLKOW, 1982). Em sua revisão Mancia e colaboradores (1999) estabelecem que o aumento na ativação do sistema nervoso autônomo simpático (SNAS) pode ser evidenciado por elevadas concentrações do neurotransmissor adrenérgico, noradrenalina (NE) presente em sujeitos com hipertensão essencial, bem como pelo um maior número de estímulos no SNAS em fibras que inervam o tecido do músculo esquelético. Carthy (2014) destaca que a hiperatividade do SNA é uma desordem relatada tanto nos estágios iniciais como na hipertensão estabelecida e que esta desordem promove alterações que reduzem a sensibilidade ao baroreflexo, provavelmente após o aumento da rigidez arterial. O funcionamento inadequado do SNAS induz aumento do débito cardíaco e da resistência vascular periférica, de modo a promover a elevação da pressão arterial (SANJULIANI, 2002). O SNA atua ainda no sistema renina angiotensina aldosterona (RAAS), promovendo o aumento na liberação da renina por ativação dos receptores beta adrenérgicos das células justaglomerulares (CARTHY, 2014).

A ativação do RAAS é um dos principais fatores da patogênese da HAS. A renina é uma enzima secretada pelas células justaglomerulares dos rins, e atua sobre o

angiotensinogênio convertendo-o em angiotensina I (Ang. I). A Ang. I é imediatamente convertida pela enzima conversora de angiotensina (ECA) em angiotensina II (Ang. II), que por sua vez atua sob os receptores de angiotensina tipo 1 (AT-1) estimulando a produção de aldosterona que promove a resistência à insulina e a remodelação vascular e influencia o desenvolvimento de aterosclerose (ATLAS, 2007; CASCELLA et al., 2010). A Ang. II estimula, também, o crescimento hipertrófico das células musculares lisas vasculares, via expressão de fatores de crescimento autócrinos, fator de crescimento de fibroblastos básico, fator de transformação do crescimento - $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) e fator de crescimento semelhante à insulina (IGF) (ITOH et al., 1993). A remodelação vascular mediada por Ang II ativa produção de NADPH oxidase via receptor AT-1a desencadeia o processo de crescimento células musculares lisas vasculares e a modificação da composição da matriz extracelular (POLLMAN et al., 1996; VASCONCELOS et al., 2007; KYOTANI et al., 2010).

A parede vascular é formada por células endoteliais, células musculares lisas, fibroblasto. O músculo liso vascular é caracterizado por um baixo potencial de membrana em repouso e permeabilidade relativamente elevada, principalmente para os íons de sódio. Esta permeabilidade é de extrema importância para o funcionamento do músculo liso vascular (na regulação da resistência vascular) e da sua participação da hipertensão essencial (FOLKOW, 1982).

A contração das células musculares lisas vasculares (VSMC, do inglês *vascular smooth muscle cells*) é desencadeada por um aumento na concentração de cálcio livre intracelular ($[Ca^{2+}]_i$), que pode ocorrer a partir da entrada de cálcio extracelular através dos canais de cálcio sensíveis à voltagem, e por liberação das reservas intracelulares no retículo sarcoplasmático. A concentração de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático e do meio extracelular é superior a concentração do citosol, de modo que a abertura dos canais de Ca^{2+} na membrana celular e na membrana do retículo sarcoplasmático promovem o transporte do Ca^{2+} para o citosol. O aumento da concentração de Ca^{2+} no citosol permite a sua ligação com a calmodulina, e formação do complexo cálcio-calmodulina (Ca^{2+} -CAM), que ativa a quinase da cadeia leve de miosina (MLKC) e provoca a fosforilação da cadeia leve de miosina (MLC). Essa fosforilação permite a interação entre a actina, miosina, e ATP formando uma forte ligação produzindo a contração muscular. De maneira análoga, a redução da $[Ca^{2+}]_i$ promove a dissociação do complexo Ca^{2+} -CAM, desativa a MLKC e a ativa a fosfatase de miosina que retira o grupamento fosfato da cadeia leve de miosina desfazendo a ligação com a actina e promovendo o relaxamento (KHALIL, VAN BREEMEN, 1995).

Vias de sinalização adicionais envolvendo a roquinase (Rho-Kinase) e proteína quinase C (PKC) podem aumentar a sensibilidade à $[Ca^{2+}]_i$ e a força dos miofilamentos, a fosforilação da MLC e, assim, manter contração vascular. A resposta positiva induzida por agonistas à receptores adrenérgicos resultam na ativação da fosfolipase C, que hidrolisa o fosfatidilinositol 4,5-bifosfato em inositol 1,4,5- trifosfato (IP_3) e de diacilglicerol (DAG). O IP_3 induz a liberação de Ca^{2+} dos estoques do retículo sarcoplasmáticos e inicia a contração induzida por agonista. O DAG participa da ativação da PKC, que por uma série de mecanismos interagem em última análise com os miofilamentos contráteis e promovem a contração das VSMCs. Em vários modelos de hipertensão tem sido identificado um aumento da expressão e da atividade da PKC (SALAMANCA ,KHALIL, 2005).

A desregulação da maquinaria contrátil nas VSMC promove o aumento o influxo de cálcio contra o efluxo, elevando a $[Ca^{2+}]_i$ e assim aumenta a capacidade de resposta do VSMC para estímulos neuro-hormonais, alterando o tônus muscular. Outra característica essencial da hipertensão é o aumento adaptativo do tecido contrátil, principalmente no ventrículo esquerdo, artérias sistêmicas e vasos de resistência pré-capilares, que promovem alteração das suas funções normais. O aumento crônico da pressão sanguínea causaria o remodelamento da estrutura do músculo liso vascular diminuindo a luz do vaso e o raio interno das arteríolas (FOLKOW, 1982).

O remodelamento vascular é uma desordem que ocorre a partir da detecção de sinais das mudanças hemodinâmicas por fatores humorais. A transmissão destes sinais entre as células adjacentes levam a produção, liberação ou ativação de substratos que influenciam o crescimento, morte e migração celular e ainda produção ou degradação da matriz extracelular, resultando na modificação da parede vascular (GIBBONS ,DZAU, 1994). A mudança estrutural na parede do vaso envolve diversos processos e se observa dois tipos principais: o remodelamento eutrófico interno e hipertrófico. No primeiro, os diâmetros externos e lúmen são reduzidos há um espessamento da camada média, entretanto a área de secção transversal da média não é alterada, assim a proporção média/lúmen é aumentada sem endurecimento do vaso. Este remodelamento é predominante no modelo animal SHR, bem como em indivíduos com hipertensão essencial. No segundo, o crescimento da camada média invade a luz do vaso, aumenta a área de secção transversal e a proporção média/lúmen (MULVANY et al., 1996). Os ratos SHR apresentam o aumento de espessura da camada medial que ocorre por três mecanismos distintos: aumento da deposição de matriz extracelular, hipertrofia das VSCM (aumento de volume, sem divisão) e hiperplasia (CUNHA ,FERREIRA, 2000).

As alterações na adesão das células às componentes fibrilares extracelulares podem alterar a fixação e a arquitetura da parede do vaso, contribuindo para a reestruturação VSMCs. A vasoconstrição crônica pode resultar em um remodelamento da camada íntima dos vasos sanguíneos, uma característica encontrada em pequenas artérias de SHR e na hipertensão essencial. Com a estrutura do vaso contraído ocorre a incorporação da matriz extracelular remodelada, promovendo ainda mais rearranjos nas células musculares, intensificando a redução do lúmen. Mecanismos inflamatórios também estão envolvidos no remodelamento vascular, sendo caracterizados por infiltração de células inflamatórias, aumentado o estresse oxidativo e pela regulação positiva de mediadores inflamatórios, tais como: a molécula de adesão celular vascular-1, molécula de adesão intercelular-1, fator nuclear (NF), fator de quimioatraente de monócitos-1, e inibidor do ativador do plasminogênio-1 (INTENGAN, SCHIFFRIN, 2001).

2.2 DIABETES

O Diabetes mellitus pode ser definido como um desequilíbrio na homeostase do metabolismo de carboidratos e lipídeos, que ocorre quando o pâncreas não produz insulina suficiente ou ainda quando o corpo não consegue utilizar eficazmente a insulina produzida, resultando no aumento dos níveis de glicose no sangue (ALBERTI, ZIMMET, 1998; BAHT, 2011). Assim como as outras DCNTs, a incidência e a prevalência de DM têm aumentado em todo o mundo. Estima-se que em 2014, 9% dos adultos com idade igual ou superior a 18 anos foram diagnosticados com diabetes e que 1,5 milhões de pessoas morreram por causa direta do diabetes em 2012 em todo o mundo (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2014). No Brasil, dados da Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico (VIGITEL), de 2013, mostram que a prevalência de diabetes autorreferida na população acima de 18 anos foi de 6,9%, sendo de 6,5% entre homens e de 7,2% entre mulheres (BRASIL, 2014).

De acordo com a Sociedade Brasileira de Diabetes (2014), atualmente, são estabelecidos três critérios para diagnósticos da (DM): glicemia casual >200 mg/dL associados a sintomas de poliúria, polidipsia, e perda de peso; glicemia de jejum ≥ 126 mg/dL (7 mmol/L), este resultado deve ser repetido para confirmação do diagnóstico e glicemia de 2 horas pós-sobrecarga de 75 g de glicose > 200 mg/dL. Alguns resultados estabelecem um estado de alerta de alteração do metabolismo glicídico, níveis de glicemia de jejum > 100 mg/dL e < 126 mg/dL considera-se um quadro de intolerância à glicose e para quando o valor

de glicemia de 2 horas após uma sobrecarga de 75 g de glicose situa-se entre 140 e 199 mg/dL é estabelecida a tolerância à glicose diminuída.

Pode também ser classificado de acordo com a sua etiologia em: diabetes insulino-dependente (Tipo 1- DM1) que é caracterizada pela deficiência de insulina devido à destruição auto-imune das células beta-pancreáticas; a diabetes não dependente de insulina (Tipo 2 – DM2), caracterizado por combinação da diminuição na secreção e da sensibilidade à insulina (resistência à ação da insulina). E ainda o diabetes gestacional, uma condição hiperglicêmica transitória que ocorre durante a gestação e a diabetes decorrente de uma condição patológica. A intolerância à glicose é um distúrbio na homeostase da glicemia e um fator preditor do diabetes (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2013)

O DM1 representa aproximadamente 5-10% dos casos de diabetes no mundo e é o resultado de uma reação auto-imune crônica causadora da destruição seletiva das células - β pancreáticas responsáveis pela produção de insulina (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2013). O primeiro fator chave para a ocorrência da DM1 é a predisposição genética, os indivíduos que carregam em si o polimorfismo no antígeno leucocitário humano (ALH) (SINGAL ,BLAJCHMAN, 1973). Entretanto, existem mecanismos que ativam os genótipos a desenvolverem a alteração da função imunitária que inicia a destruição das células β , que podem ser vírus, toxinas ou alimentos (DANEMAN, 2006). Essa ativação anormal do sistema imune mediada pelos linfócitos T CD4+ e CD8+ promove a destruição das células β , seja por contato direto (através de um processo citotóxico) ou por desencadear a liberação de diversas citocinas pró-inflamatórias. A infiltração de células *natural killers*, células dentríticas e macrófagos estão relacionados com a progressão do dano as células β pancreáticas (LI, SONG ,QIN, 2014). A destruição das células β leva a uma deficiência na secreção de insulina, o que resulta num quadro hiperglicêmico e com desordens no metabolismo glicídico, lipídico e proteico (OZOUGWU, OBIMBA ,UNAKALAMBA, 2013).

Considerada uma doença epidêmica, a DM2 atingiu em 2010, aproximadamente 248 milhões de pessoas em todo o mundo e estima-se que em 2030 essa marca se aproxime dos 430 milhões. É considerada uma doença metabólica caracterizada por hiperglicemia e alteração do metabolismo lipídico, devido à incapacidade das células β de secretar insulina em resposta ao excesso de alimentação, inatividade física, sobrepeso, obesidade e resistência à insulina (NOLAN, DAMM ,PRENTKI, 2011). A patogênese da DM2 é complexa e envolve a interação de fatores de risco genéticos e ambientais, que promovem a queda gradual da função das células- β e desenvolve a resistência à insulina nos músculos e no fígado (ADAMO, 2011).

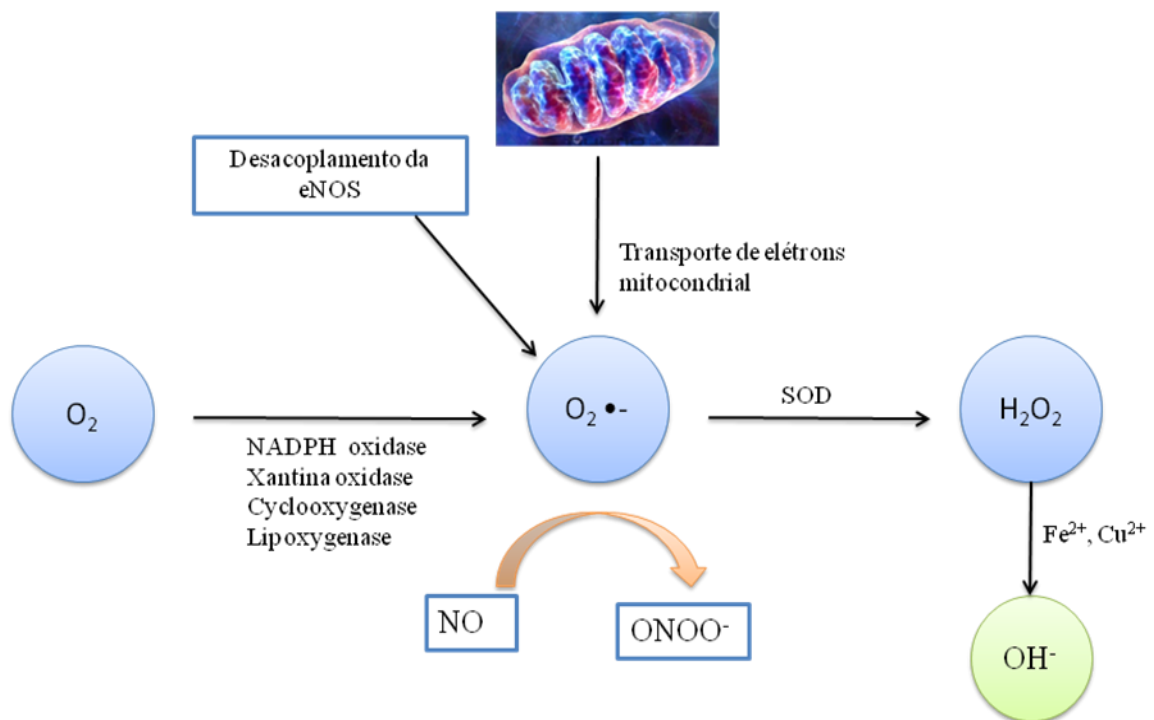
A insulina é liberada pelas células- β nos tecidos sensíveis à insulina, em resposta a estimulada pela absorção de glicose, aminoácidos e ácidos graxos. Num processo de retroalimentação os tecidos informam as células- β sobre a necessidade de insulina, este mediador ainda não foi identificado, mas pode envolver a integração dos sistemas nervoso e humoral. Em indivíduos obesos e com predisposição à diabetes, a presença da resistência à insulina promoveria o aumento compensatório na produção e liberação de insulina, entretanto a disfunção incapacita as células- β para essa tarefa, tornando os níveis plasmáticos de glicose elevados (KAHN, COOPER, DEL PRATO, 2014).

Existem diversos modelos animais que mimetizam o diabetes, os ratos NOD desenvolvem DM1 espontaneamente. Entre os modelos que desenvolvem a DM2 destaca-se os ratos Zucker ou a DM2 pode também ser induzida quimicamente por aloxano (ALX) ou estreptozotcina (STZ) (CHATZIGEORGIOU et al., 2009). A intolerância à glicose pode ser observada em outros modelos que envolvem doenças crônicas como hipertensão, Katayama et al (1997) demonstrou que os ratos SHR e seu controle WKY apresentam intolerância à glicose e resistência à insulina, a partir a 8ª semana de vida, em comparação com o rato *Wistar*.

2.3 ESTRESSE OXIDATIVO E SUAS IMPLICAÇÕES PATOLÓGICAS

Vários mecanismos possuem a capacidade de transferir elétrons entre um doador e um oxigênio molecular. Dentre estas se tem o transporte de elétrons mitocondrial – a principal produção de radical livre catalisada pela enzima citocromo p450; nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato, na forma reduzida (NADPH oxidase); xantina oxidase, além de outras enzimas. Em algumas situações, o óxido nítrico sintetase (NOS) pode promover a produção de ROS. O desacoplamento da óxido nítrico sintetase endotelial (eNOS) decorrente da oxidação da tetrahydrobiopterina (BH_4) e da L-arginina reduz a produção de NO e promove a produção de ROS. A redução do oxigênio pode produzir anião superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), a partir deste radical livre são produzidos o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), peroxinitrito (ONOO^-) e o radical $\text{OH}^\cdot$, esses compostos são altamente reativos e são reconhecidos como ROS e espécies reativas de nitrogênio (RNS) que propiciam a produção de outras ROS, como observado na Figura 1 (HARRISON et al., 2007; FRANA, 2008; LI, HORKE, FÖRSTERMANN, 2014).

Figura 1 – Produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio



Fonte: Adaptado de Harrison, 2007

O estresse oxidativo é, então, definido como um estado de desequilíbrio entre a produção de ROS e RNS e os sistemas de defesa antioxidantes no corpo. Seus efeitos estão associados ao processo de envelhecimento, assim como ao desenvolvimento de muitas doenças crônicas e degenerativas, incluindo o câncer, doenças cardíacas e doença de Alzheimer (McCORD, 1994; ATALE et al., 2013; GONZÁLEZ, 2014).

Em sua revisão González (2014) observou que o estresse oxidativo está intrinsecamente relacionado com a patogênese da hipertensão, as alterações causadas pelas ROS na parede das células vasculares podem colaborar com o mecanismo da hipertensão. O endotélio vascular é um tecido mesodérmico que apresenta papel importante na manutenção da homeostase, pois é um tecido altamente responsivo a sinais químicos e hormonais, no qual exerce ações autócrinas e parácrinas que modulam a vasodilatação, o crescimento e migração de células de músculo liso, e respostas inflamatórias. E também responde a alterações hemodinâmicas ocorridas em decorrência das modificações do fluxo sanguíneo, em resposta a liberação de mediadores que modulam a resposta das fibras da musculatura lisa vascular, das plaquetas e dos leucócitos (GUZMÁN, 2011; BADAL ,DANESH, 2012).

As ROS são geradas ubiquitariamente em todos os tipos de células, e sabe-se que estas espécies são produzidas no organismo dentro de um processo fisiológico regulamentado, que em desequilíbrio promovem efeitos deletérios como disfunção endotelial, inflamação, hipertrofia, apoptose, migração e fibrose das VSMCs. Os quais são processos importantes envolvidos no remodelamento vascular e nas alterações presentes no coração, rins, sistema nervoso, e possivelmente no sistema imunológico que ocorrem na hipertensão (TOUZY ,BRIONES, 2011). Estudos demonstram que as ROS estimulam a expressão de moléculas de adesão e quimiotáticos promovendo a absorção de células inflamatórias para a parede do vaso; aumentam a proliferação e a hipertrofia do músculo liso vascular; aumentam a expressão e a atividade de metaloproteinases da matriz extracelular, que causam o remodelamento vascular e a ruptura de placa em síndromes coronarianas agudas; amplificam a sinalização dependente de redox; atuam promovendo o dano oxidativo aos órgãos-alvo e diminuem a biodisponibilidade de NO (TOUZY ,SCHIFFRIN, 2001; WARD, 2004; HARRISON et al., 2007). Em ratos SHR, observa-se um aumento da NADPH movido pela geração de $O_2^{\cdot-}$ em vasos de resistência (mesentérica) e condutância (aorta), associado a uma superexpressão da NADPH oxidase. A geração de $O_2^{\cdot-}$ e a consequente diminuição na biodisponibilidade do NO podem contribuir para o estresse oxidativo nesse modelo experimental de hipertensão (TOUZY, 2004).

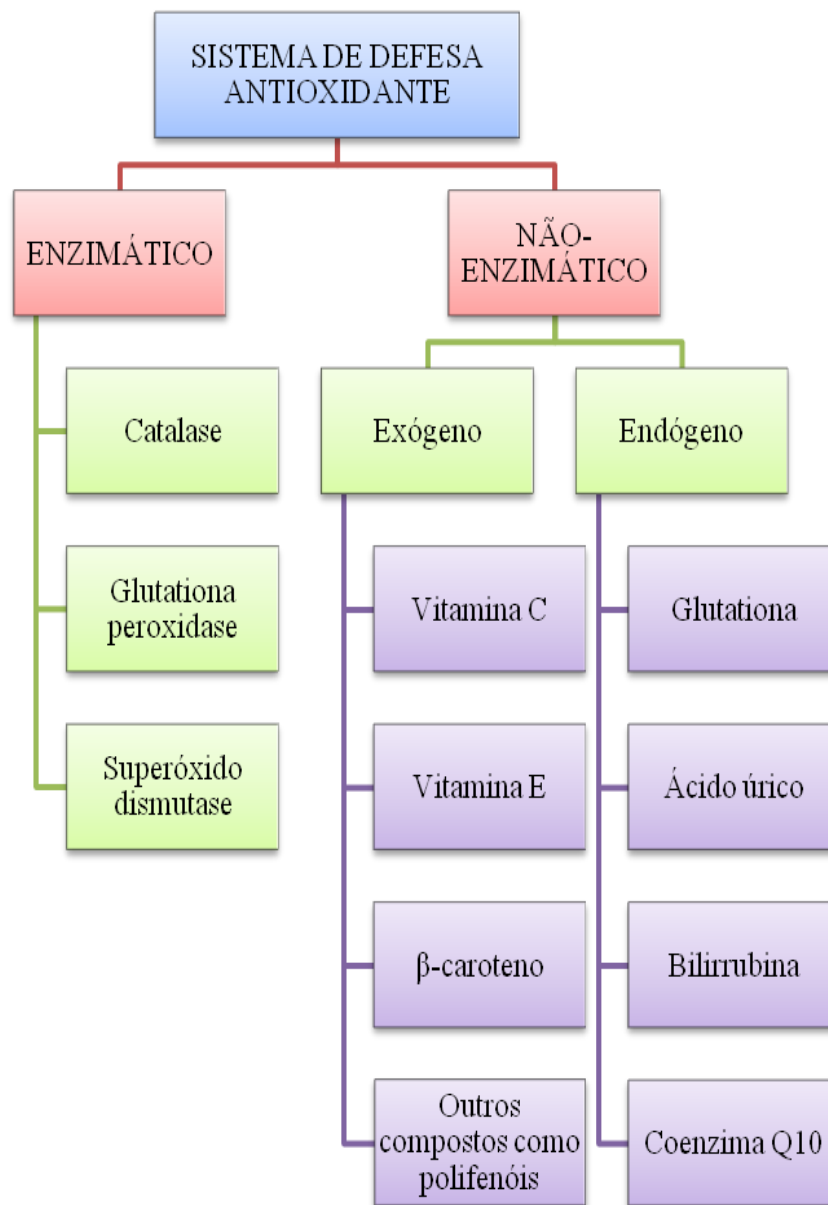
As ROS têm sido fortemente associadas à disfunção endotelial, através da modulação da ação de outros fatores derivados do endotélio. A superprodução do $O_2^{\cdot-}$ inibe a atividade do NO e ainda reage com o mesmo para formar $ONOO^-$, intermediário altamente reativo que degrada a BH_4 levando ao desacoplamento da eNOS, ao aumento na produção de $O_2^{\cdot-}$ e redução na síntese de NO (VASCONCELOS et al., 2007; MAJZUNOVA et al., 2013). O aumento da produção de $O_2^{\cdot-}$ e de H_2O_2 , redução da síntese do óxido nítrico, e a diminuição da biodisponibilidade de antioxidantes também têm sido demonstrados em cultura de células musculares lisas vasculares (VSMC, do inglês *vascular smooth muscular cells*) e em artérias isoladas de ratos hipertensos e humanos (TOUYZ, 2004).

A hiperglicemia é uma condição comum para todos os tipos de diabetes. O não controle desta situação contribui para geração de ROS, que associada aos demais fatores de risco - aumento de peso, idade avançada e excesso de ingestão calórica - constituem o meio perfeito para produção excessiva de ROS (RAINS ,JAIN, 2011). Existem várias vias metabólicas que são ativadas pela hiperglicemia para produção de ânion superóxido como: o aumento da atividade da via do poliol – que promove o desequilíbrio do sistema redox; aumento dos produtos finais de glicação avançada (AGEs, do inglês *advanced glycated end products*), esses produtos estão envolvidos num complexo mecanismo que resulta na ativação do NADPHoxidase; ativação direta ou indireta da via DAG-PKC que consequentemente ativa a produção de ROS; e aumenta quantidade de substrato para cadeia de transporte elétrons mitocondrial aumentando a produção de ROS (RAINS ,JAIN, 2011; KARUNAKARAN ,PARK, 2013). As ROS estimulam mecanismos de sinalização de estresse que resulta na migração e proliferação das VSMCs, e na alteração das células endoteliais promovem complicações micro e macrovasculares no DM2 (BANERJEE ,VATS, 2013).

2.4 SISTEMA DE DEFESA ANTIOXIDANTE:

Para manutenção do equilíbrio das atividades biológicas, o organismo conta com um complexo sistema de defesa antioxidante que neutraliza a produção de ROS. Este sistema atua de diversas maneiras: impedindo a formação dos radicais livres ou espécies não-radicais (sistema de prevenção), impedindo a ação desses (sistemas varredores) ou, ainda, favorecendo o reparo e a reconstituição das estruturas biológicas lesadas (sistemas de reparo). São divididos em enzimáticos e não enzimáticos, como disposto na Figura 2 (BARBOSA et al., 2010).

Figura 2 – Sistema de defesa antioxidante



Fonte: Autor, 2015

O sistema enzimático é composto pelas enzimas catalase (CAT), glutathiona peroxidase (GPx) e superóxido dismutase (SOD). A CAT é uma enzima que contém subunidades ligadas a grupamentos heme, amplamente localizadas no interior da célula em organelas, tais como os peroxissomas e catalisa a conversão de H_2O_2 em água e oxigênio (YOUNG, WOODSIDE, 2001). A GPx está presente no citoplasma e na matriz mitocondrial, e realiza a remoção do H_2O_2 em uma reação que envolve o ciclo redox da própria glutathiona, por meio do controle da relação entre a glutathiona reduzida (GSH) e a oxidada (GSSG). Outros peróxidos, como os hidroxiperóxidos dos ácidos graxos, também podem ser reduzidos por essa enzima. Esta

enzima possui um sítio ativo dependente de selênio, portanto este é um importante co-fator para proteção do meio da peroxidação lipídica (LIMÓN-PACHECO, GONSEBATT, 2009; BARBOSA et al., 2010). A SOD é constituída por proteínas contendo metais e catalisa a dismutação do $O_2^{\cdot -}$ em H_2O_2 e O_2 . Existem três isoformas de SOD em humanos: a SOD1 é uma isoforma dependente de cobre e zinco e está presente no citoplasma, SOD2 é uma isoforma que possui o manganês como co-fator e está localizada principalmente na mitocôndria e, por último, a isoforma SOD3 localizada extracelularmente. A desregulação das vias de sinalização das SODs leva à disfunção endotelial, remodelamento vascular, aumento da permeabilidade vascular e da agregação plaquetária, o que contribui para gênese de doenças como hipertensão (FUKAI, USHIO-FUKAI, 2011)

O mecanismo antioxidante não-enzimático pode ser subdividido em endógeno que inclui biomoléculas e exógeno composto por micronutrientes dietéticos. O sistema não-enzimático endógeno é composto pela glutatona, ácido úrico, bilirrubina, coenzima Q10 entre outros. A glutatona é o mais importante antioxidante não enzimático do organismo, é em sua natureza um tripeptídeo (γ -L-glutamil-L-cisteinilglicina) que pode reagir diretamente com as ROS sequestrando radicais hidroxilas e oxigênio singlete, ou ainda doar elétrons de redução de peróxidos na reação catalisada pela GPx. O ácido úrico também pode exercer atividade antioxidante, sequestrando radicais hidroxilas e oxigênio singlete e quelando íons pro-oxidantes como cobre e ferro. Devido às suas baixas concentrações nos tecidos, a bilirrubina apresenta baixa atividade antioxidante. Entretanto, acredita-se que a associação da bilirrubina-albumina seja um importante mecanismo no combate à oxidação. E, por fim, a coenzima Q10 atua na regeneração das vitaminas C e E no interior da célula, além de reagir sobre radicais peróxil (CRUZAT, TIRAPEGUI, 2013).

O sistema antioxidante exógeno, ou dietético, é composto pela Vitamina C que é um potente antioxidante hidrossolúvel e atua no sequestro de radicais livres em meio aquoso, enquanto que as formas ativas da Vitamina E (tocoferol e/ou tocotrienóis) e o β -caroteno, compostos lipossolúveis atuam no combate aos radicais livres em meio lipídico (MONTEZANO, TOUYZ, 2012). Estudos demonstram uma relação inversa entre o consumo de ácido ascórbico e a pressão arterial (RODRIGO et al., 2007), e que o tratamento antioxidante, realizado com as vitaminas C e E isoladas ou em associação, pode melhorar a função vascular e reduzir a pressão arterial em modelos animais (GONZÁLEZ, 2014) e na hipertensão humana (RODRIGO et al., 2008; JURASCHEK et al., 2012). Outros componentes como os micronutrientes, selênio, cobre, zinco e manganês também são importantes fontes alimentares para o sistema antioxidante de defesa, pois atuam como co-

fator das enzimas antioxidantes (LIMÓN-PACHECO ,GONSEBATT, 2009). Os polifenóis também atuam como potentes antioxidantes com capacidade de sequestrar ROS e podem melhorar a função endotelial por inibir a produção de NADPH e xantina oxidase (GONZÁLEZ, 2014)

2.5 PADRÃO ALIMENTAR COMO FONTE ALTERNATIVA DE TRATAMENTO DA HIPERTENSÃO E DIABETES

Após uma série de estudos na década de 40, Kempner (1948) demonstrou que a alimentação apresenta influencia em pacientes com hipertensão. Em seu estudo, hipertensos foram submetidos a uma dieta conhecida como “dieta do arroz”, a qual apresentava 2000 calorias (5 g de gordura e 20 g de proteína) e continha entre 250 e 350 gramas de arroz, diariamente, poderiam ainda ser consumidas frutas e quantidade controlada de açúcar, além de excluir sal, leite e gorduras. Entre os 500 indivíduos estudados, Kempner (1948) observou uma redução significativa em aproximadamente 60% dos pacientes (com ou sem envolvimento renal).

Em seguida, Contratto e Rogers (1948) estabeleceram que a “dieta do arroz” poderia atuar como uma intervenção adjuvante no tratamento da hipertensão, ao estudar os efeitos benéficos desta dieta em pacientes hipertensos não hospitalizados. A partir de então, a ciência buscou elucidar a participação da alimentação no desenvolvimento e/ou tratamento da hipertensão. Estudos posteriores observaram que a redução dos níveis pressóricos obtidos pela adesão à “dieta do arroz” estava relacionada com o baixo teor de sódio contido na dieta. Assim, a redução de sódio da dieta passou a ser relatada como um procedimento terapêutico eficaz na redução da pressão arterial elevada (UCKO, 1950; DOLE et al., 1951).

Em seguida, muitas dietas se tornaram objeto de estudo por influenciar no estado de saúde da população. A dieta mediterrânea, por exemplo, é baseada em padrões alimentares típicos da ilha de Creta, maior parte do resto da Grécia, e no sul da Itália, no início dos anos 1960. É caracterizada pela ingestão elevada de alimentos vegetais (como frutas, legumes, pães integrais, grãos integrais, nozes e sementes), de gorduras monoinsaturadas e baixa ingestão de gordura saturada (sendo o azeite a sua principal fonte de gordura). Há também na dieta a presença de peixes, aves, produtos lácteos e ovos consumidos moderadamente, enquanto a carne vermelha deve ser consumida em pequenas quantidades (WILLETT et al., 1995). Diversos estudos têm comprovado o potencial cardioprotetor desta dieta, podendo reduzir a pressão arterial, lipídios séricos, disfunção endotelial, glicemia, índice de massa corporal

(IMC) e circunferência da cintura, bem como, fornecendo o aumento da biodisponibilidade de alguns nutrientes, propriedades antioxidantes e efeitos anti-inflamatórios. A adesão a dieta mediterrânea foi capaz de reduzir a incidência de eventos cardiovasculares sérios (WIDMER et al., 2014; EILAT-ADAR et al., 2013).

Outros padrões dietéticos, como a dieta *Low-fat* e *Low-carb*, também têm sido estudados quanto a sua influência nas DCV. A dieta *Low-fat* consiste no consumo reduzido de gordura alimentar, principalmente da gordura saturada, promovendo melhoria da qualidade de vida de pacientes com sobrepeso, diabetes e hipertensão. A dieta *Low-carb* é determinada pelo consumo entre 30-130 g de carboidratos por dia ou no máximo 45 % do valor energético total (VET) advindo do carboidrato. Dados da literatura demonstram que a adesão a este padrão alimentar pode reduzir peso corporal, níveis pressóricos e parâmetros bioquímicos, entretanto ainda se faz necessário mais estudos para determinar os efeitos da dieta a longo prazo (EILAT-ADAR et al., 2013).

Sem dúvidas, a dieta com maior influência sobre as DCVs estudada é a dieta DASH (do inglês, Dietary Approaches to Stop Hypertension). A denominação dieta DASH surgiu a partir de um estudo multicêntrico randomizado realizado por cientistas norte-americanos, com o apoio do *National Heart, Lung, and Blood Institute* (NHLBI), que demonstrou redução da pressão arterial a partir da adesão a um plano alimentar composto de baixo teor de gordura saturada, colesterol e gordura total, rico em frutas, verduras e produtos livres de gordura ou leite desnatado. propôs um guia para realização das mudanças propostas na alimentação pela dieta DASH, ver Figura 3 (NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH, 2006). Estudos comprovam que a adesão à dieta DASH reduz a PAS significativamente em hipertensos (SACKS et al., 1999), pode reduzir significativamente o risco das DCV, doença coronariana, acidente vascular cerebral e insuficiência cardíaca em 20%, 21%, 19% e 29%, respectivamente (SALEHI-ABARGOUEI et al., 2013) e reduz significativamente a PAS, PAD e o colesterol sendo, portanto, uma eficaz estratégia nutricional na prevenção de DCVs (SIERVO et al., 2014).

Figura 3 – Orientações para realização da dieta DASH (do inglês, Dietary Approaches to Stop Hypertension)



Fonte: Adaptado de *National Institute of Health* (2006)

O manejo nutricional é parte fundamental no tratamento do diabetes, a Sociedade Brasileira de Diabetes (2014) preconiza que a intervenção nutricional deve ser estabelecida a partir de concentrações adequadas de macro e micronutrientes, respeitando a individualidade e baseada nos objetivos do tratamento. Para os portadores de DM1, deve ainda se ajustar a terapia insulínica, integrando o medicamento, a dieta e atividade física. Entretanto, não há um padrão alimentar para os diabéticos, a educação nutricional deve orientar para o controle da ingestão de alimentos fonte carboidratos especialmente aquele que contém adição de gorduras, açúcares e sódio; o consumo de fibras (14 g/1000 kcal) pode auxiliar no controle glicêmico, inclusive em indivíduos saudáveis com alto risco de DM2; o adequado aporte de proteínas na alimentação parece aumentar a resposta à insulina sem elevar a glicemia; e embora as diretrizes permitam a recomendação de alimentos fonte de ácidos graxos Ômega-3

e Ômega- 6, a suplementação não é aconselhada (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2015).

Observa-se que as principais mudanças dietéticas com benefícios na saúde cardiovascular estão relacionadas com o aumento na ingestão de frutas e vegetais. Pesquisas observaram que vegetarianos apresentam menores níveis pressóricos em relação à população total. Assim como o consumo elevado de frutas e vegetais promove um efeito protetor de DCV e redução da PA (BERKOW ,BARNARD, 2005; JOSHIPURA et al., 2001; KIM et al., 2014). O aumento do consumo de frutas e vegetais foi estabelecido como uma “evidência convincente” para redução do risco de hipertensão, doença cardíaca coronária e acidente vascular cerebral, além de ser uma “evidência possível” para outras doenças como, artrite, asma e osteoporose. Entretanto, não existem evidências que comprovem a associação direta com desenvolvimento de diabetes, porém o consumo de frutas e legumes pode influenciar indiretamente a prevenção da DM2 (BOEING et al., 2012).

De acordo com o estudo de John (2002), a população que consumiu no mínimo 5 porções/dia mostrou uma redução na PAS e PAD. Frutas e vegetais contribuem para a saúde cardiovascular através de uma variedade de fitonutrientes, como potássio e fibras. Recomenda-se um consumo diário entre 400 e 500 g de frutas e legumes frescos (incluindo frutas, folhas verdes e legumes crucíferos e leguminosas), para reduzir o risco de doença coronariana, acidente vascular cerebral e HAS (REDDY ,KATAN, 2004).

Diante disto, muitos nutrientes têm sido pesquisados para a prevenção e/ou tratamento da hipertensão, como os ácidos graxos (HOOPER et al., 2011), vitamina D (VIMALESWARAN et al., 2014), cálcio (CARBONE et al., 2014), flavonóides (DE JESUS ROMERO-PRADO et al., 2014). Dentre os fitoconstituintes, os polifenóis que são frequentes em frutas e verduras, têm se destacado devido ao elevado potencial antioxidante e sua influência sobre as DCVs (DEL RIO et al., 2013; QUINONES, MIGUEL ,ALEIXANDRE, 2013) e DM2 (BORRIELLO et al., 2010)

2.6 ALIMENTOS FUNCIONAIS E NUTRACÊUTICOS

Primeiramente, deve-se deixar claro que todos os alimentos são funcionais, uma vez que ofertam nutrientes e proporcionam ainda sabor e aroma. Entretanto, nas últimas décadas, o termo “alimento funcional” está atribuído a alimentos que além de satisfazer as necessidades nutricionais e organolépticas básicas, proporcionam ainda benefícios ao organismo (HASLER, 1998). Este termo começou a ser descrito pela primeira vez na década de 80 no Japão, para se referir a alimentos processados que auxiliam funções específicas do corpo, além de serem nutritivos. Mais tarde em 1991, foi estabelecido o termo “Alimentos para uso específico de saúde” (FOSHU do inglês, *Foods for Specified Health Use*) que deveria abranger os alimentos que tem efeito específico à saúde, devido a sua composição química, mas que não expõem a risco de saúde ou higiênico (MORAES ,COLLA, 2006). Em 1999, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária por meio da portaria nº 398, de 30 de abril de 1999 define “alimento funcional” como sendo aquele alimento ou ingrediente que apresenta além de funções nutricionais básicas, efeitos metabólicos e/ou fisiológicos e/ou efeitos benéficos à saúde, sendo seguro para consumo sem supervisão médica.

Outro termo disseminado entre as ciências da saúde em geral, é o nutracêutico, que pode ser aplicado às substâncias isoladas de produtos fitoterápicos, suplementos alimentares (nutrientes), dietas específicas e alimentos processados como sopas, cereais e bebidas, que fornecem prevenção e/ou tratamento para o desenvolvimento de doenças, além de sua nutrição normal (KALRA, 2003; BADIMON, VILAHUR ,PADRO, 2010; MCCLEMENTS, 2015). O gabinete de Proteção do Ministério da Saúde do Canadá estabelece uma definição mais restrita na qual os nutracêuticos são produtos produzidos a partir de alimentos, entretanto, comercializados em pílulas, pós ou outras formas farmacêuticas que demonstram efeitos benéficos fisiológicos ou promovem proteção contra doenças como, hipertensão e diabetes (BALHARA ,VERMA, 2012).

Diversos alimentos têm sido estudados por suas propriedades funcionais ou por fornecer compostos que possuem atividade biológica, podendo ser dispostos em probióticos e prebióticos; alimentos sulfurados e nitrogenados (vegetais crucíferos como repolho, brócolis, rabanete e palmito); vitaminas (β -caroteno, tocoferol e ácido ascórbico); ácidos graxos poliinsaturados (ω -3 e ω -6); fibras dietéticas e compostos fenólicos (MORAES ,COLLA, 2006). Entre as indicações mais comuns para o uso de probióticos tem-se a prevenção e/ou tratamento agudo de distúrbios gastrointestinais e algumas cepas podem ser indicadas para auxiliar sistema imune (GUARNER, REQUENA ,MARCOS, 2010). A fermentação dos

prebióticos pela microflora intestinal propicia efeitos benéficos à saúde como, aumento da absorção de cálcio, aumento do bolo fecal, redução do tempo transito intestinal e, possivelmente, dos níveis de lipídeos séricos (ANANDHARAJ, SIVASANKARI, PARVEEN RANI, 2014).

Os alimentos sulfurados e nitrogenados como, brócolis, couve-flor e repolho, são estudados por sua possível capacidade de inibição da mutação do DNA, que promove proteção contra a carcinogênese e a mutagênese (MORAES, 2006). As vitaminas antioxidantes A, C e E apresentam elevado potencial antioxidante. Estudos comprovam a associação inversa entre a ingestão de alimentos contendo as vitaminas e a redução de risco metabólico, entretanto, são necessários mais estudos que indiquem o uso de suplementos vitamínicos na terapia de DCVs (CATANIA, BARROS, FERREIRA, 2009). A ingestão dietética de ω -3 e ω -6 demonstra efeitos benéficos à saúde cardiovascular, mediados pelo aumento da resistência à agressão dos radicais livres e da peroxidação lipídica, redução da velocidade de agregação e da concentração de lipídeos plasmáticos em ratos SHR (FRENOUX et al., 2001). Um estudo que analisou a dieta e a saúde de 388.113 indivíduos, realizado pelo Instituto Nacional de Saúde (NIH) – AARP, observou que ingestão de fibra alimentar apresentou uma significativa associação inversa com o risco de morte total e morte por DCV, doenças infecciosas e doenças respiratórias (PARK et al., 2011). Os compostos fenólicos são fitoconstituintes amplamente encontrados em frutas e vegetais. A ingestão destes alimentos ricos em compostos fenólicos tem sido fortemente associada à redução do risco de doenças cardiovasculares (KRIS-ETHERTON et al., 2002)

A fabricação de bebidas e alimentos processados a partir de frutas e vegetais gera uma grande quantidade de resíduos que é frequentemente desprezado durante o processamento. Contudo, os resíduos apresentam grandes quantidades de compostos bioativos e polímeros, o seu descarte representa uma considerável perda nutricional (FERREIRA et al., 2015). O epicarpo é considerado um resíduo ou subproduto de frutas e verduras e por isso é desprezado durante o processamento destes alimentos (BARROS, 2011). Em estudo que analisou a composição dos resíduos de frutas, se observou que os teores totais de fenólicos de extratos do epicarpo eram mais elevados do que os extratos de polpa. Assim, pode-se conferir a esta desprezada parte da fruta propriedades nutraceuticas que a tornem de interesse para consumo e para indústrias alimentar e farmacêutica (DENG et al., 2012).

Estudos têm comprovado que o epicarpo de diversas frutas apresenta propriedades terapêuticas. O epicarpo liofilizado da jabuticaba apresenta grande quantidade de antiocininas e sua ingestão crônica pode exercer um papel protetor contra a resistência à insulina associada

à obesidade (DRAGANO et al., 2013). O extrato do epicarpo da romã (*Punica granatum* L.) possui alta capacidade antioxidante e apresenta diversas propriedades nutraceuticas como: cardioprotetor, antialérgico, anti-inflamatória, prevenção de alguns tipos de carcinomas humanos (ISMAIL, SESTILI, AKHTAR, 2012). O extrato do epicarpo do maracujá (*Passiflora edulis*) administrado via oral na dose de 50 mg/kg diminuiu os parâmetros hemodinâmicos em ratos SHR (LEWIS et al., 2013). Moo-Huchin (2015) analisou o epicarpo liofilizado da maçã, do caju vermelho e do caju amarelo e observou que o epicarpo dessas frutas continham vitamina C, antocianinas, compostos fenólicos, flavonóides, carotenóides e que apresentaram boa atividade antioxidante utilizando dois métodos de análises, ABTS e DPPH. E propõe que o epicarpo, uma importante fonte de compostos antioxidantes, possa ser explorado pelas indústrias alimentícias e farmacêuticas para desenvolvimento e formulação de ingredientes de produtos alimentares funcionais e/ou nutraceuticos.

2.7 COMPOSTOS FENÓLICOS E SUA AÇÃO ANTIOXIDANTE

2.7.1 Definição e Estrutura química

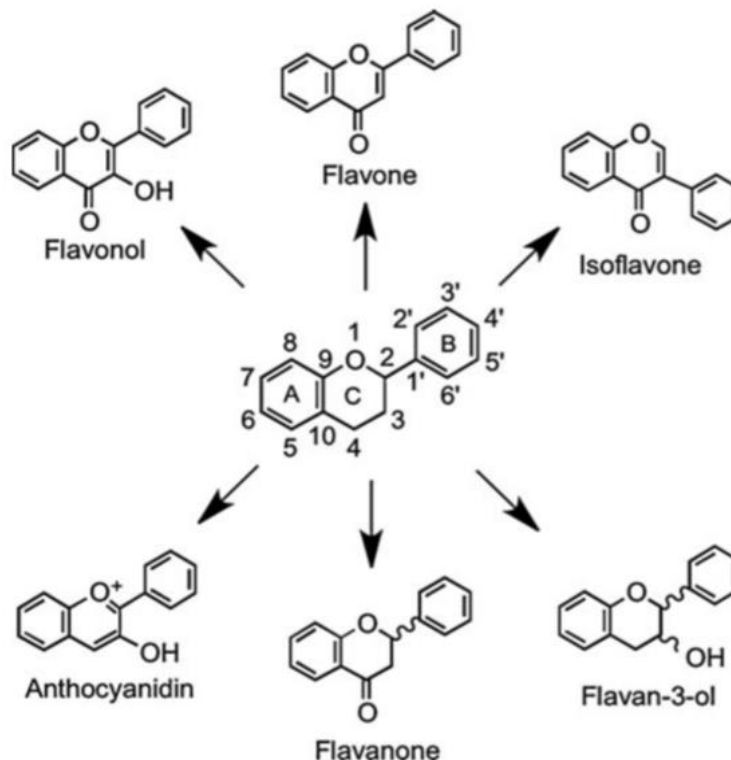
Os compostos fenólicos, ou polifenóis, são constituintes ubiqüitários no reino vegetal, porém sua maior concentração está nas frutas, hortaliças e em seus derivados. Fornecem cor e sabor aos alimentos, enquanto possui várias funções como proteção contra o patógenos, infecções microbianas, radiação UV e danos físicos. Englobam desde moléculas simples até àquelas com elevado grau de polimerização e estão presentes nos vegetais nas formas livres e complexados com açúcares e proteínas (BORGUINI, 2006; BIESALSKI, 2007; ANDRIANTSITOHAINA et al., 2012).

São compostos secundários do metabolismo vegetal e quimicamente são caracterizados pela presença de um anel aromático contendo um ou mais grupos hidroxila (ver Figura 4). Estudos relatam que entre 6000 e 8000 estruturas de polifenóis sejam reconhecidas (STRACK; WRAY, 1992 apud HARBORNE, 1993; SOUSA, MORAIS, LIMA, 2011; MARTÍNEZ- VALVERDE, PERIAGO, ROS, 2000; LEE et al., 2005).

A diversidade estrutural dos polifenóis se deve a grande variedade de combinações que ocorre na natureza e podem ser classificados como os flavonóides e não flavonóides ou em outras classes flavonóides: lignanas, ácidos fenólicos, e estilbenos. Entre esses compostos, os mais estudados são flavonóides (ver Figura 4), que compreendem 15 átomos de carbono com dois anéis aromáticos ligados por uma ponte de três carbonos, dispostos em estrutura

fenilbenzopirona (C6 -C3- C6) (SOARES, 2002;GARCIA-VILLALBA et al., 2010; TANGNEY ,RASMUSSEN, 2013; DEL RIO et al., 2013).

Figura 4 – Estrutura dos polifenóis



Fonte: Adaptado de Del Rio et al.,2013

As principais subclasses dos flavonóides são as flavonas , flavonóis , flavan -3- óis , isoflavonas, flavanonas e antocianidinas (DEL RIO et al., 2013). Os flavonóis como kaempferol, miricetina e quercetina (ver Tabela 2), ocorrem amplamente em todo reino vegetal, principalmente, nos alimentos e são mais conconcentrado em especiarias, frutas e cacau. As flavonas tem como compostos principais a naringenina e hesperetina e são encontrados em frutas cítricas. Os Flavan -3- ols que incluem epicatequina, galocatequina, epigalocatequina, epicatequinagalato, epigalocatequinagalato e procianidina, estão presentes em grandes quantidades nos chás verdes e preto. As antocianinas consistem principalmente de antocianina e antocianidina, os conjugados formados com os açúcares e os ácidos orgânicos geram uma multiplicidade de antocianinas de diferentes cores, de laranja e vermelho para azul e roxo, e, como consequência, conferem cor a flores e frutas (TANGNEY ,RASMUSSEN, 2013).

Tabela 2– Classe de polifenóis, subclasses e compostos

Classe de polifenóis	Subclasses de polifenóis	Exemplos de compostos
Flavonóides	Flavonóis	Camferol, Mirecetina, Quercetina
	Flavononas	Naringenina e Hesperetina
	Flavan-3-ols	epicatequina, epigallocatequina, epicatequinagalato, e procianidina
	Flavonas	Apigenina, Luteolina
	Antocianinas	Antocianidina, Antocianina
	Isoflavonas	Diazeína, Genisteína
Lignanas	Lignanas	Lariciresinol, Secoisolariciresinol
Ácidos fenólicos	ácidos hidroxibenzóicos	ácidos gálico, p-cumárico e cafeico, ácido
	ácidos hidroxicinâmico	elágico
Estilbenos	Estilbenos	Resveratrol,
		Resveratrol – 3 – O – glicosídeo

Fonte: Adaptado de Tangney; Rasmussen, 2013

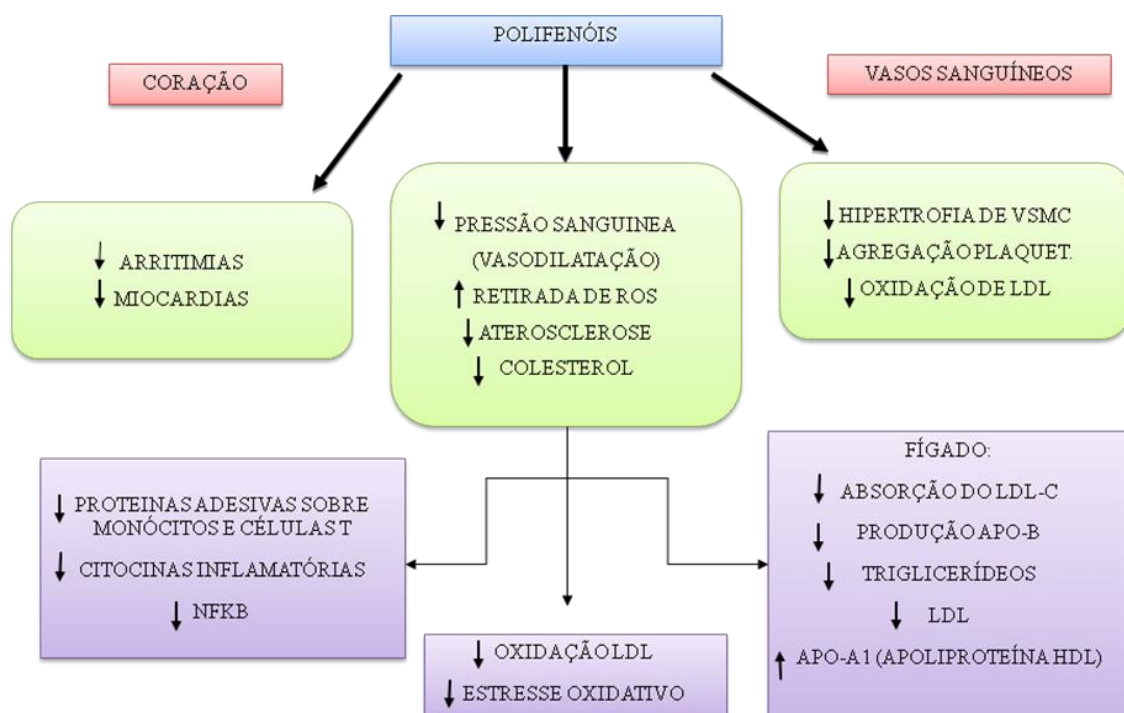
As isoflavonas são os únicos que se assemelham ao estrogênio na estrutura e, portanto, são classificados como fitoestrógenos. Esses alimentos são encontrados em produtos de soja, como tofu, grãos de soja torrados e missô. As lignanas, que são caracterizadas pela sua estrutura 1,4 - diarilbutano, encontram-se em concentração mais elevada em sementes, tais como fibras de linho. E por último, os ácidos fenólicos que são divididos em ácidos hidroxibenzóicos (C6-C1) e ácidos hidroxicinâmico (C6-C3), dos quais derivam outros compostos fenólicos como os ácidos gálico, p-cumárico e caféico. (SOARES, 2002; TANGNEY, RASMUSSEN, 2013).

Após a ingestão, os polifenóis glicosídeos (polifenóis conjugados com uma molécula de glicose) são clivados pela enzima *lactase phoridzin hydrolase* (LPH), as agliconas são então liberadas na borda em escova das células epiteliais do intestino delgado. Quando ingeridos na forma livre, os ácidos fenólicos são rapidamente absorvidos pelo intestino delgado (DEL RIO et al., 2013; HELENO et al., 2015). As formas circulantes dos polifenóis são derivados conjugados e estes metabólitos apresentam forte atividade antioxidante que podem estar relacionado com o aumento da atividade antioxidante no plasma após a ingestão de alimentos ricos em ácidos fenólicos (HELENO et al., 2015).

2.7.2 Propriedades Terapêuticas

Estudos relevantes têm demonstrado uma associação inversa entre o consumo de alimentos contendo polifenóis e a mortalidade por DCV. Entre as propriedades dos polifenóis (ver Figura 5), alguns estudos relatam que estes compostos apresentam efeitos antiateroscleróticos nas fases iniciais de desenvolvimento da aterosclerose, melhorada função endotelial e aumento na liberação de óxido nítrico, modulação da inflamação - por inibir os fatores de transcrição inflamatórias, fator nuclear kappa B (NF- κ B) e proteína ativadora - 1 (AP-1) (RAHMAN ,ADCOCK, 2006). Além de modulação do metabolismo lipídico e melhora do estado antioxidante, protegendo contra episódios ateroscleróticos, cancerígenos e diabetes (BADIMON, VILAHUR ,PADRO, 2010). De acordo com Pietta (2000), os compostos fenólicos demonstraram ainda atividade antiviral, antibacteriana, antifúngica, antitumoral, anti-hemorragica e antialérgica.

Figura 5 – Atuação dos polifenóis na saúde cardiovascular



Fonte: Adaptado de Badimon; Vilahur; Padrol, 2010

Alguns autores corroboram com a ideia de que a grande chave para os efeitos benéficos causados pela ingestão de polifenóis está na sua capacidade antioxidante, que pode ser atribuída a sua ação redutora frente às ROS e RNS reduzindo a atividade pró-inflamatória

de enzimas como: ciclooxigenase (COX), lipoxigenase (LOX) e óxido nítrico sintase induzível (iNOS) (STEFFEN et al., 2008; SOUSA, MORAIS, LIMA, 2011). Há outros fatores como: a capacidade de juntarem-se a enzimas, hormônios, transportadores e DNA; quelato de metal íons transientes, tais como ferro, cobre, zinco; catalisar o transporte de elétrons; depurar radicais livres, protegendo os tecidos do corpo contra o estresse oxidativo e as patologias associadas a essa condição (BIESALSKI, 2007; TSAO, 2010).

Observa-se que as propriedades físico-químicas destes compostos os permitem participar de diversos processos de oxi-redução, e assim, atuar frente à atividade de diversas enzimas e também nos mecanismos de sinalização celulares, promovendo efeitos benéficos a diversas patologias. Na DVCs a ingestão de polifenóis tem sido associada a efeitos vasodilatadores, melhora do perfil lipídico (por atenuar a oxidação da LDL), ação anti-inflamatória e ainda por modular os processos apoptóticos no endotélio vascular (QUINONES, MIGUEL, ALEIXANDRE, 2013). Evidências demonstram, por exemplo, que o resveratrol, o estilbeno encontrados no vinho tinto protegem o LDL contra a oxidação mediada pelo peroxinitrito (BORRIELLO et al., 2010). Ahsan e colaboradores (2009) relataram que o resveratrol protege contra o estresse oxidativo não apenas por causa de uma capacidade antioxidante direta, mas também, por ativação outras vias antioxidantes endógenas. Flavonóides, como a fisetina e quercetina, modulam macrófagos estimulados pela oxidação de LDL, possivelmente através da inibição da geração de hidroperóxidos de lípidos, interferindo assim no processo inflamatório; as protocianidinas foram relatadas com potencial superior as vitaminas C, E e ao resveratrol, por apresentar habilidade de eliminação de radicais livres dependente da concentração (AL-AWWADI et al., 2005).

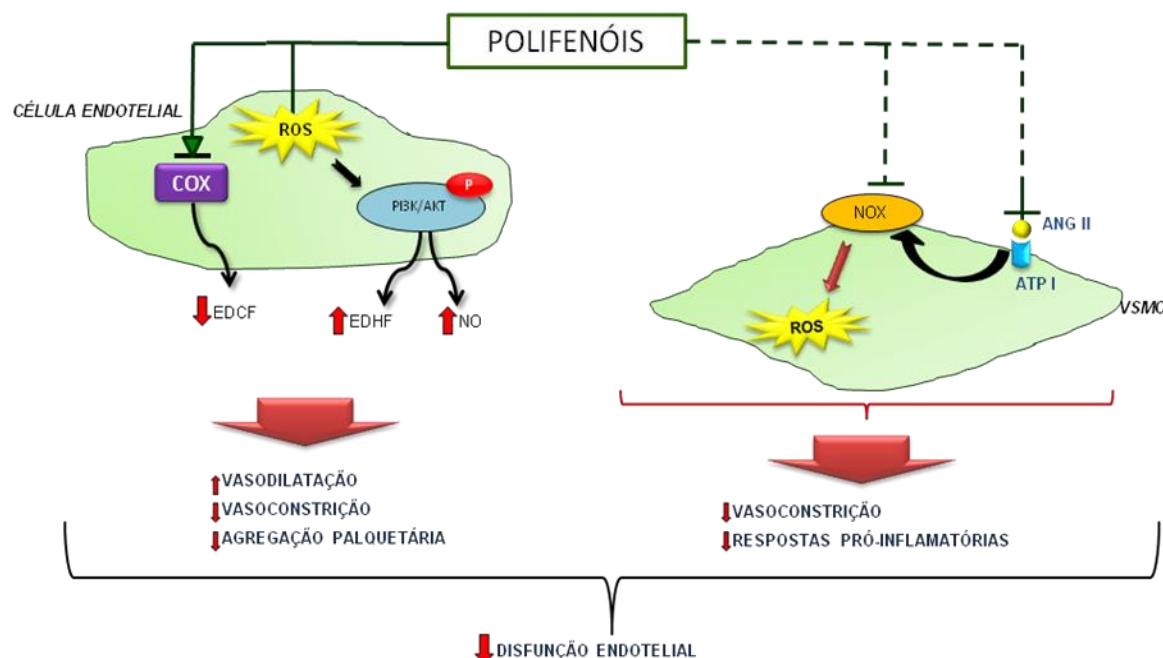
Os flavonóides possuem a capacidade de captar diretamente ROS, pois atuam como tampões eliminando os radicais livres para gerar o radical flavina, que é muito menos reativo, pois os seus elétrons desemparelhados são mais deslocados. Estudos experimentais demonstraram que os polifenóis possuem a capacidade de diminuir as ROS e o malondialdeído (MDA), um reconhecido marcador de estresse oxidativo em ensaios em animais e humanos (CIOCIOIU et al., 2013; FENERCIOGLU et al., 2010). Outro estudo demonstrou também, que os polifenóis podem potencializar os sistemas de desintoxicação de células, tais como a superóxido dismutase, a catalase ou glutationaperoxidase e inibir as enzimas geradoras de ROS, como oxidase de xantina e NADPH oxidase (NOX) (QUINONES, MIGUEL, ALEIXANDRE, 2013).

Os polifenóis dietéticos podem agir em ambos os processos (na inflamação e na disfunção endotelial) implicada no desenvolvimento de doenças cardiovasculares, em parte,

alterando o recrutamento de células inflamatórias a partir da circulação e reduzindo a regulação da produção de moléculas de adesão pelo endotélio, e assim, impedir a migração celular para o espaço subendotelial e reduzindo a formação de placa aterosclerótica (TANGNEY ,RASMUSSEN, 2013).

Atuam contra a natureza adesiva das células imune, anulando ou limitando a disfunção endotelial, pois ativam as vias de sinalização intracelular fosfatidilinositol 3-quinase /Akt (PI3K/AKT) que levam ao aumento da produção do NO e do fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF, do inglês *endothelium-derived hyperpolarizing factor*) e inibem a via da COX e reduz a produção de agentes contraturantes como os fatores contraturantes derivados do endotélio (EDCF, do inglês *endothelium-derived factors contraturants*) (SCHINI-KERTH et al., 2010). Podem melhorar o funcionamento das VSMCs pela diminuição da expressão da NOX (uma importante fonte do aniôn superóxido) e redução da atividade da Ang. II (forte ativador da NOX). Promovendo a redução do estresse oxidativo vascular diminuindo a vasoconstrição e a resposta inflamatória ver Figura 6 (ANDRIANTSITOHAINA et al., 2012).

Figura 6 - Esquema de atuação dos polifenóis na célula endotelial e célula muscular lisa vascular



Fonte: Adaptado de Andriantsitohaina (2012)

Onde: ROS: espécies reativas de oxigênio; Cox: ciclooxigenases; PI3K: fosfatidilinositol 3-quinase; EDCF: fatores de contração derivado do endotélio; EDHF: fator hiperpolarizante derivado do endotélio; NO: óxido nítrico; ANG II: angiotensina II; VSMC: célula muscular lisa vascular

alimentos. Ainda de acordo com o mesmo estudo, foi estimado que o consumo médio de polifenóis pela população americana é estimado entre 20 e 25 mg/dia. Todavia, um estudo de coorte realizado na Espanha identificou que a média de ingestão de polifenóis total foi de 820 mg/dia, dentre os quais 443 mg/dia era de flavonóides, 304 /mgdia de ácidos fenólicos e 73 mg/dia dos demais compostos fenólicos (TRESSERRA-RIMBAU et al., 2013).

Diante disto, observou-se que o consumo de polifenóis apresenta importantes ações na saúde cardiovascular. Estudos comprovaram que pacientes que sofrem de doença arterial coronária (DAC) mostraram uma melhora na função endotelial e na microcirculação coronariana com a ingestão de alimentos contendo polifenóis.(HOZUMI et al., 2006; PEREZ-JIMENEZ ,SAURA-CALIXTO, 2008). A presença desses metabólitos na dieta propicia uma melhora significativa na saúde, além de diminuir a incidência de DCNT, devido ao potencial antioxidante proporcionado por essas estruturas (DEL RIO et al., 2013;QUINONES, MIGUEL ,ALEIXANDRE, 2013).

Os polifenóis também têm demonstrado atividade antidiabética, possivelmente por melhorar a sensibilidade à insulina, melhorar a expressão do transportador de glicose dependente de insulina (GLUT4), inibir o transporte de glicose intestinal, aumentar a expressão de enzimas hepáticas de glicogênio e retardar o desenvolvimento da resistência à insulina (RODRIGO et al., 2014).

2.8 *Syzygium cumini* L.

Syzygium cumini Lamarck (*S. cumini*. L.), um membro da família Myrtaceae é uma árvore pereneoriginária da Índia, distribuída por todo osubcontinente indiano, sudeste Asiático e África oriental, que se adaptou aos climas tropicais, podendo ser amplamente encontrada em algumas partes da América. Possui desenvolvimento em diversos tipos de solo, mas apresenta preferência por climas quentes e úmidos. No Brasil o período de frutificação vai de janeiro a maio. O fruto da *S. cumini* L. pode ser vulgarmente poder serconhecido como jamun ou jambul na Índia e como ameixa preta ou blackberry indiana em inglês (SHARMA et al., 2006;AQIL et al., 2012;SRIVASTAVA ,CHANDRA, 2013).

Ainda sobre as sinonímias, o fruto da *S. cumini* L. é também reportado como *Syzygium cumini* (Lam.) D.C., *Eugenia jambolana* Lam., *Eugenia cumini* (L.) Druce, *Myrtuscumini* L. e *Calyptanthus oneillii* Lundel; aqui no Brasil, pode ser chamado vulgarmente de jambolão, oliveira, cereja, azeitona, jamelão, jalão, jambol, jambu, jambul, azeitona–do–nordeste, murta e ameixa roxa, ver Figura 7 (LORENZI ,DE ABREU MATOS, 2002).

Figura7 – Fruto da *Syzygium cumini* L (*S. cumini* L.)



Fonte: Autor, 2015

2.8.1 Caracterização

Os frutos do *S. cumini* L. são bagas carnosas, oblíquas, de cor profundamente roxa ou azulada com polpa rosada - quando maduros e apresentam semente única. Possuem sabor, um pouco adstringente, mas ainda assim é agradável ao paladar, o que os fazem ser amplamente consumidos como uma fruta (SILVA E SÁ, 2008; FARIA, MARQUES, MERCADANTE, 2011). O fruto apresenta cor roxa devido à presença de cianidinadi-glicosídeos. Possui conteúdo importante de carboidrato, vitaminas e minerais, entre os quais, destacam-se manganês, zinco, ferro, cálcio, sódio e potássio (CSIR, 1982; AQIL et al., 2012; MOHAMED, ALI, EL-BAZ, 2013). Uma análise de composição centesimal de frutos da *S. cumini* L. realizada no Brasil, demonstrou que o jambolão apresenta 41 kcal/100g, 0,5% de proteína, 0,1% de lipídios, 10,6% de carboidrato, 1,8% de fibra, 27,1 mg/100g de vitamina C e 394 mg/100g de potássio (TACO, 2011)

Além do conteúdo de macro e micronutrientes, as frutas possuem considerável teor de fitoconstituíntes, como antocianinas, isoquercetina, ácido elágico, glicosídeos, canferol, miricetina, ácido málico, ácido oxálico, ácido gálico e taninos que conferem adstringência à fruta (AYYANAR, SUBASH-BABU, 2012). Shrikanta et al (2015) analisou a capacidade antioxidante, o conteúdo de compostos fenólicos e de resveratrol na pele, polpa e semente do fruto da *S. cumini* L. e observou que dentre os polifenóis analisados (ácido gálico; ácido

caféico; (+)- catequina; (-)-epicatequina; ácido p-cumarico) o ácido gálico é o maior constituinte do fruto da *S. cumini* L..

Alguns estudos avaliaram o conteúdo de compostos fenólicos com a semente, a folha e o fruto da *S. cumini* L. e obtiveram amplo conteúdo de fenólicos, 44.700 ± 150 , 14.300 ± 210 , $185 \pm 3,8$ mg EAG/100g amostra, respectivamente (PEIXOTO ,FREITAS, 2013; ESHWARAPPA et al., 2014; RUFINO et al., 2010).

A composição química e a atividade antioxidante do fruto de *S. cumini* L. têm sido bastante estudadas recentemente, demonstrando importante relação entre os compostos presentes e as propriedades antioxidantes. Os frutos maduros da *S. cumini* L. apresentam propriedades terapêuticas entre as quais: estimulação hepática, digestiva, carminativas e hipoglicemiante (MOHAMED, ALI ,EL-BAZ, 2013).

2.8.2 Propriedades Terapêuticas

Devido ao seu importante conteúdo de fitoquímicos, os quais são responsáveis pelo efeito farmacológico, tanto o consumo da fruta como a utilização de chás, infusões, xaropes e extratos das demais partes da planta, têm sido fonte de importantes pesquisas (MIGLIATO et al., 2006). Em seu estudo de revisão, Srivastava e Chandra (2013) relataram que o *S.cumini* L. é conhecido por apresentar efeitos farmacológicos importantes tais como: antidiabético, antioxidante, antihiperlipidêmico, antiulcerativo, atividades hepatoprotetora, antialérgicos, anti-inflamatórios, anti-artríticos, antibacterianas e radioprotetora.

Outros estudos apontam que um extrato rico em flavonóides preparado a partir de sementes de *S. cumini* L. estimula tanto o proliferador de peroxissoma ativado por receptor alfa (PPAR α) como os proliferadores de peroxissoma ativado por receptor gama (PPAR γ) em ensaios in vitro e atenua o diabetes induzida pela estreptozotocina em ratos (SHARMA, BALOMAJUMDER ,ROY, 2008). A eficácia do *S. cumini* L. foi comparada a metformina, uma droga hipoglicemiante considerada padrão na sensibilização à insulina e é eficaz tanto como monoterapia como em combinação com quase todas as outras terapia para diabetes tipo 2. Esse efeito teve eficácia superior ou equivalente na redução da glicemia, quando comparado a outros agentes orais utilizados para tratar à diabetes (INZUCCHI, 2002; MONAMI et al., 2008; SHARMA et al., 2012).

A administração oral do extrato de semente *Eugenia jambolona* (sinonímia para *S. cumini* L.) reduziu os níveis de lipoproteína de baixa densidade (LDL) e lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL) e aumentou os níveis de lipoproteína de alta densidade (HDL) em

ratos diabéticos, devido ao controle na hidrólise de lipoproteínas e da absorção e metabolismo no fígado e no rim (RAVI, RAJASEKARAN, SUBRAMANIAN, 2005). No estudo de Pari e Saravanan (2002), o extrato aquoso da polpa de *S. cumini* L. apresentou uma redução dose-dependente nos níveis de colesterol total, LDL-C e triglicerídeos, e aumento dos níveis de HDL-C e fosfolipídeos em ratos que tiveram seu perfil lipídico alterado com a indução ao diabetes por estreptozotocina. França (2010) avaliou o efeito do extrato hidroalcoólico das folhas de *S. cumini* L. em ratos hiperlipidêmicos e obesos e observou que o extrato apresentou ações hipolipemiantes e hipoglicemiantes. Outro estudo utilizou um extrato da casca do caule da *S. cumini* L. para avaliar o potencial anti-inflamatório e a toxicidade em ratos Wistar, e observou que o extrato possui ação anti-inflamatória sem apresentar qualquer efeito sobre a mucosa gástrica (MURUGANANDAN et al., 2001).

Poucos estudos têm demonstrado os efeitos da *S. cumini* L. no sistema cardiovascular. Atale (2013) analisou o efeito cardioprotetor de um extrato metanólico, elaborado com sementes de *S. cumini* L. em mioblastos cardíacos submetido ao estresse oxidativo induzido pelo conteúdo excessivo de glicose, para mimetizar células cardíacas de pacientes diabéticos. E observou que a semente de *S. cumini* L. suprimiu a produção de ROS, interferiu no metabolismo de enzimas antioxidantes e promoveu a proteção das células cardíacas ao estresse induzido por glicose.

Mais recentemente alguns estudos discutiram sobre a intervenção do consumo de *S. cumini* L. na hipertensão. O extrato hidroalcoólico da folha de *S. cumini* L. foi testado quanto ao seu potencial anti-hipertensivo em rato normotensos e hipertensos após o tratamento de 8 semanas com o extrato. Foi observado que o extrato promoveu uma redução 62% da pressão arterial média de ratos SHR e que a infusão do extrato em ratos anestesiados promoveu a redução da pressão, porém na presença do bloqueador de acetilcolina este efeito foi reduzido significativamente (RIBEIRO et al., 2014). Herculano (2014) observou que o extrato hidroalcoólico da fruta da *S. cumini* L. promoveu hipotensão em ratos hipertensos (SHR), demonstrada com a redução da PAM após 4 -6 horas da administração de 200 mg/kg do extrato via oral.

As propriedades terapêuticas de *S. cumini* L. são atribuídas, principalmente, à presença de vários flavonóides e alcalóides em diferentes partes da planta. Estes compostos são prontamente absorvidos pelos seres humanos. Entretanto, estudos mais sistemáticos são necessários para descrever detalhes do mecanismo e mostrar seus efeitos sobre a maquinaria enzimática direta ou indiretamente envolvidos na defesa antioxidante, modificando suas estruturas ou regulando a expressão dessas enzimas através de proteínas de transdução de

sinal de celular ou outros mecanismos possíveis. Outros estudos publicados que descrevem os efeitos benéficos de *S. cumini* L. foram realizados com extratos de plantas, que contém predominantemente flavonóides e fenólicos. Diante disto, especula-se que os efeitos benéficos de *S. cumini* L. relatado em roedores precisa ser explorado em seres humanos para trazer benefícios à saúde da população (SRIVASTAVA, CHANDRA, 2013).

De Bona e colaboradores (2010) demonstraram que extrato aquoso das folhas da *S. cumini* L. atua sob parâmetros de estresse oxidativo em plaquetas de pacientes com diabetes mellitus tipo 2, com a capacidade de remover espécies oxidantes, modular a atividade da adenosina-desaminase (ADA) e promover uma resposta compensatória na função plaquetária. A ADA, é uma enzima envolvida no metabolismo das purinas e que se apresenta em concentrações elevadas em estados de hiperglicemia, como nos DM 1 e DM 2. A manutenção dos níveis de adenosina contribui para a vasodilatação e inibição da agregação de plaquetas, além das propriedades antioxidantes conhecidas que desempenham um papel importante na prevenção de várias doenças cardiovasculares. Outro estudo avaliou a atuação de um extrato aquoso das folhas da *S. cumini* L. na atividade da ADA em eritrócitos humanos expostos à elevadas concentrações de glicose (30 mM, que corresponde a 540 mg/dL) em ensaio *in vitro*. Assim este estudo observou que o extrato alterou a atividade da ADA em condições hiperglicêmicas, pela presença de compostos fenólicos – como rutina, ácido gálico e ácido clorogênico – mas também através da inibição da fosfodiesterase, colaborando com a melhora da disfunção endotelial e das propriedades antioxidantes, anti-inflamatória, e propriedades antitrombóticas deste nucleósideo (DE BONA et al., 2014).

Em 2008, o governo brasileiro aprovou através da Portaria Interministerial nº 2.960 a criação do Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos com o objetivo de inserir, com segurança, fitoterápicos e serviços relacionados à fitoterapia no Sistema Único de Saúde (SUS). A partir deste programa, foi desenvolvida a Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (RENISUS) em 2009 que dispõe 71 plantas com potencial ação medicinal, dentre estas a *S. cumini* L. está listada na 64ª colocação, entretanto, ainda se faz necessária uma melhor identificação da espécie, do cultivo e da indicação de uso

3. MATERIAIS E METODOS

3.1 TIPO DE ESTUDO

Trata-se de um estudo experimental que envolveu a execução de ensaios farmacológicos e moleculares utilizando técnicas *in vitro* e *in vivo*. Estes experimentos foram realizados no Centro de Biotecnologia no Laboratório de Farmacologia Cardiovascular.

3.2 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Para operacionalização da pesquisa, o projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Centro de Biotecnologia (CEUA-CBiotec) da Universidade Federal da Paraíba, sob protocolo nº 0906/13

3.3 MEDIDA DO CONTEÚDO FENÓLICO E DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DAS AMOSTRAS

3.3.1 Obtenção e preparação do extrato hidroalcoólico do epicarpo liofilizado do *Syzygium cumini* L. (Sc-EpHE)

Foram adquiridos 30 quilogramas de frutos da *S. cumini* L. provenientes da Empresa Paraibana de Abastecimento e Serviços Agrícolas (EMPASA), com sede do município de João Pessoa – PB. As frutas passaram por um processo de seleção, onde foram descartadas as que apresentaram danos físicos, presença visível de sujidades, doenças fúngicas macroscópicas e foram selecionadas as que se apresentavam no mesmo grau de maturação. Após esta seleção foram submetidas a um processo de lavagem e sanitização, de acordo com a legislação vigente (BRASIL, 2004).

Inicialmente, as cascas das frutas foram separadas manualmente do restante da fruta, acondicionadas em depósito de vidro devidamente protegido da luz com papel alumínio e conservadas em freezer - 22° C. As sementes e a polpa foram descartadas e as cascas foram processadas. Para o processo de secagem as cascas foram previamente congeladas em Freezer a - 80°C por no mínimo 24h. Em seguida, foram submetidas ao processo de liofilização sob

pressão de vácuo de 0,024 mBar e temperatura de -40°C em liofilizador Free Zone® Liter Benchtop Freeze Dry Systems LABCONCO® por 24 h, em seguida congeladas a -20°C até o dia do experimento. (DE TORRES et al., 2010).

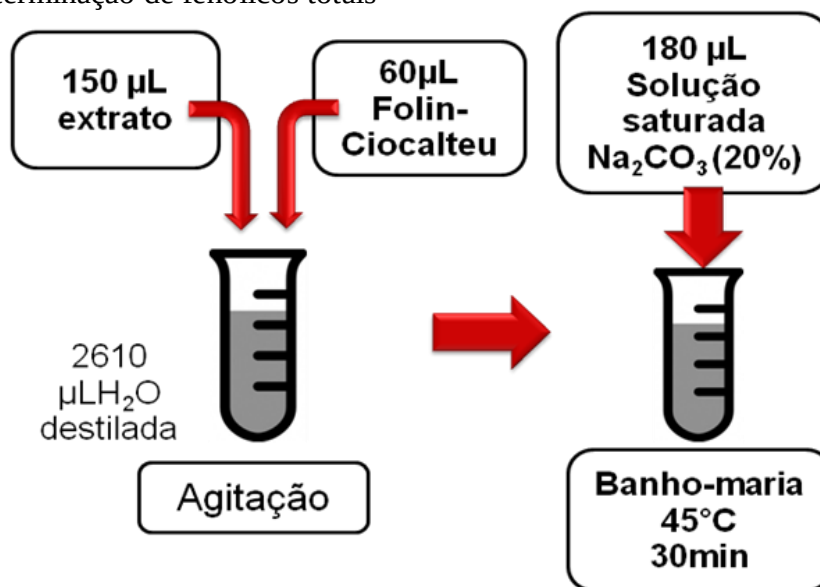
Nos produtos liofilizados foi realizado um processo de trituração, utilizando inicialmente um “mixer” comercial, seguido de trituração em gral de porcelana, obtendo assim, um tamanho de partículas homogeneizado abaixo de 0,35 mm em Tamis. Com o material homogeneizado a amostra foi levada à extração, usando como solvente uma mistura de etanol-água (50:50) em ultrasson com frequência de 42 kHz por 16 minutos, a proporção de pó seco em relação ao volume de solvente foi de 5% (m:v) (SHI et al., 2003; CARRERA et al., 2012). Após o período de extração, o material foi filtrado à vácuo em papel de filtro comum para retirada do material particulado restando o extrato solubilizado no solvente extrator.

Para a obtenção do extrato seco, a solução extrativa foi levada à rotaevaporação para a evaporação do etanol a 45°C até que o volume fosse reduzido a metade do volume inicial da mistura de extração. Em seguida, o extrato livre de etanol, denominado extrato hidroalcoólico do epicarpo liofilizado do *Syzygium cumini* L. (Sc-EpHE) foi levado ao congelamento em freezer -80°C por 24 horas e posteriormente liofilizado a 0,024 mBar por 24 horas, sendo o extrato seco obtido conservado em freezer comum à -22°C até a utilização nos experimentos.

3.3.2 Determinação de fenólicos totais

O teor de fenólicos totais foi medido (TPC) de acordo com Slinkard e Singleton (1977) com modificações. Uma alíquota de 150 μL do extrato (5 $\mu\text{g/mL}$) foi misturada com 60 μL do reagente Folin-Ciocalteu e 2.610 μL de água destilada. A mistura foi agitada durante 1 minuto, em seguida 180 μL de solução saturada de carbonato de sódio a 15 % (Na_2CO_3) foi adicionada a mistura. O conteúdo da mistura foram agitados e em seguida mantidos no escuro durante 30 minutos em estufa a 45°C . A absorbância foi medida a 760 nm num espectrofotômetro de UV-Vis (Shimadzu UV-2550, Kyoto, Japão. O teor de compostos fenólicos totais foi determinado por interpolação da absorbância da amostra versus uma curva de calibração construída com os padrões de ácido gálico (0,001 – 0,020 mg/mL, em etanol) e expressa como miligramas de equivalentes de ácido gálico, por 100 grama de amostra (mg EAG/100 g) (ver Figura 8).

Figura 8 – Determinação de fenólicos totais



Fonte: Elaborado pelo autor, 2015

3.3.3 Identificação dos compostos fenólicos do Sc-EpHE por Cromatografia líquida de alta eficiência com um detector de arranjo de fotodiodos – CLAE – PDA

As análises de HPLC foram realizadas em um cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE) da marca Thermo Scientific®, modelo Surveyor® com injetor automático de modelo Thermo Scientific Surveyor Autosampler Plus®, utilizando um Alliance 2695 250 × 4,6 mm Phenomenex (Torrence, CA, EUA) C18 Aqua e monitorizado com um dispositivo de varredura de arranjo de diodos de modelo ThermoScientific® PDA Plus. Para a análise cromatográfica, a concentração do Sc-EpHE foi de 5 mg/mL em solução de água e ácido fórmico (99:1), e o padrão foi diluído em MeOH/ácido fórmico (9:1), na concentração de 0,85 mg/mL. A análise por CLAE-PDA foi realizada utilizando um sistema de gradiente de solvente de 1% de ácido fórmico (A) e acetonitrila (B) como se segue: 90 % a 75 % de A ao longo de 30 min; 75 % a 40 % de A 30-45 min a uma velocidade de fluxo de 1 mL/min (REYNERTSON et al., 2008). Os resultados foram monitorizados 210-600 nm. A área do pico de cada composto quantificado nas amostras de teste foi integrado a partir do cromatograma de CLAE-PDA em 254 nm, utilizando o software ChromQuest® versão 5.0. A área do pico foi utilizada para cálculo da concentração do padrão na amostra.

3.3.4 Determinação da Atividade Antioxidante

O ensaio de DPPH foi realizado de acordo com a metodologia descrita por Brand-Williams e colaboradores. (1995), com algumas modificações. A atividade de eliminação do

radical livre 2,2-difenil-b-picrilhidrazil (DPPH) – é um dos métodos mais utilizados para a avaliação da capacidade antioxidante. Este radical é estável, com absorção na extensão de 515-520 nm, o que facilmente sofre redução na presença de antioxidantes, com a correspondente diminuição da absorção. O percentual da atividade antioxidante total (AAT %), ou a atividade de eliminação de radicais livres, corresponde à quantidade de DPPH consumida pelo antioxidante. Com base em um estudo preliminar, quantidades apropriadas da solução de DPPH • (23,6 µg/mL de EtOH) foram adicionados às soluções aquosas dos diferentes Sc-EpHE, com o objetivo de se obter concentração final de 200 µg/mL do extrato. Em triplicata, as alíquotas (separadamente) foram misturadas com etanol e 2.700 µL da solução de DPPH •. Após 30 minutos, a leitura foi realizada a 517 nm num espectrofotômetro Shimadzu modelo 2550- UV-UV-vis. As leituras permitiram determinar a porcentagem de atividade antioxidante AAT% (Eq 1.) e a EC₅₀ do Sc-EpHE, através da equação obtida na reta.

$$\%AAT = 100 \times \left(\frac{Abs_{control} - Abs_{amostra}}{Abs_{control}} \right) \quad (Eq. 1)$$

Em que, Abs_{control} é a absorvância da solução de etanol DPPH • radical e Abs_{amostra} é a absorção da amostra, na presença do radical DPPH •.

3.4 ESTUDOS *IN VIVO*

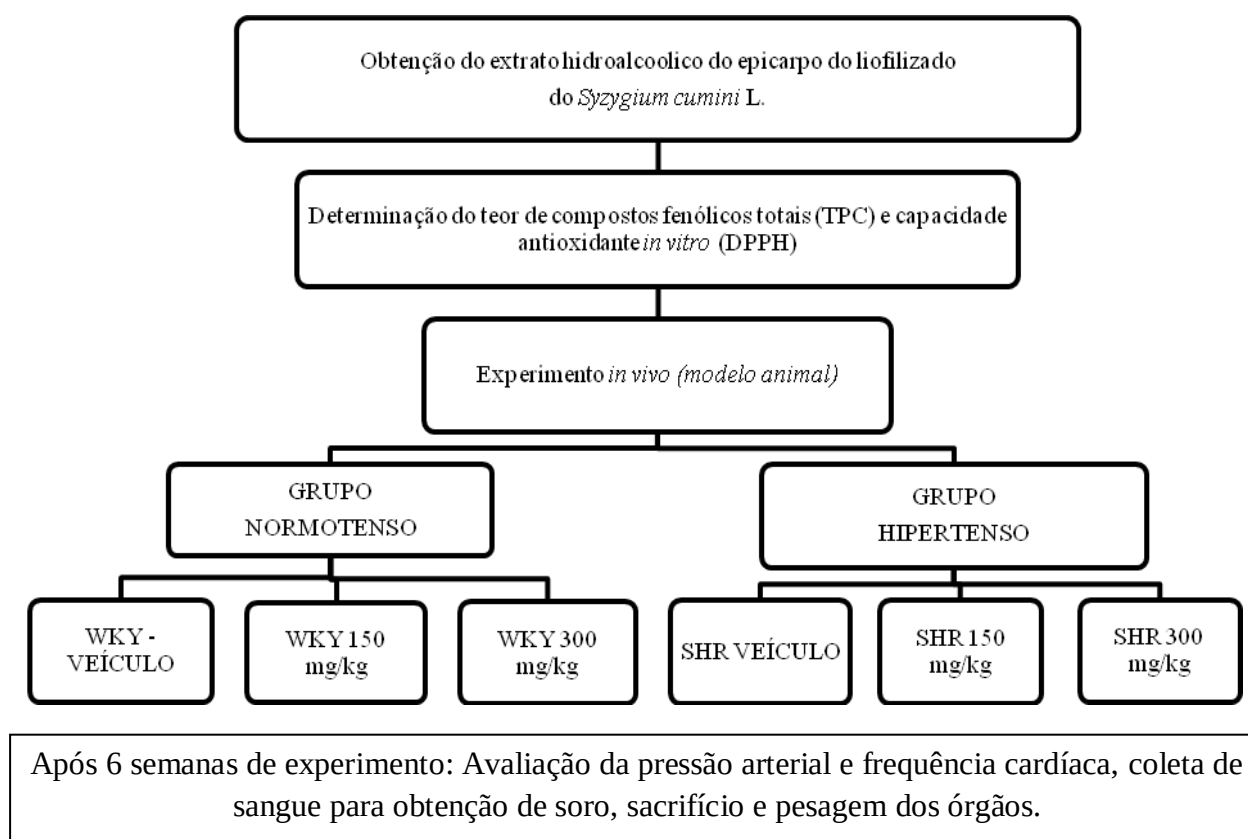
Para o desenvolvimento dos experimentos foram utilizadas, apenas, amostras que apresentaram conteúdo fenólico acima de 5363.76 mg EAG/ 100 g, e atividade antioxidante mínima de 59 µg/ml , além disso, todas as amostras apresentavam 67,35 mg/100 g de Sc-EpHE de ácido gálico

3.4.1 Animais e Dietas

Foram utilizados na pesquisa ratos espontaneamente hipertensos (SHR) e ratos da linhagem Wistar–Kyoto (WKY), pesando entre 250 – 300g provenientes do Biotério Prof. George Thomas, da Universidade Federal da Paraíba (UFPB), que foram mantidos sob condições controle de temperatura (21 ± 1° C), ciclo claro-escuro de 12 horas (6 - 18 horas) e tendo livre acesso à água e alimentação – dieta padrão (ração-Purina®). Na 10ª semana de vida, os grupos WKY e SHR foram divididos em três subgrupos. Os subgrupo WKY,

receberam doses de 150 mg/kg – WKY 150 mg/kg (n=12), ou 300 mg/kg– WKY 300 mg/kg (n=12) do Sc-EpHE, e um outro grupo normotenso recebeu solução salina, como placebo – WKY-VEÍCULO (n=12). O grupo SHR recebeu as mesmas doses do Sc-EpHE e de salina e foram subdivididos em SHR-VEÍCULO (n=12), SHR 150 mg/kg (n=12) e SHR 300 mg/kg (n=12). Durante as 6 semanas de tratamento os animais SHR e WKY foram tratados diariamente por gavagem. Para determinação do volume administrado determinou-se, a partir de estudos prévios, que para cada 1 kg de peso do rato se administraria 5 mL da solução escolhida. Como descrito na Figura 9. Os animais foram monitorados semanalmente através das aferições do peso corpóreo. A ingestão de água e consumo de ração foram monitorados diariamente.

Figura 9 - Protocolo de execução do estudo.



Onde: WKY-VEÍCULO: grupo normotenso-controle; WKY 150 mg/kg: grupo normotenso + 150 mg/kg do Sc-EpHE; WKY 300 mg/kg: grupo normotenso + 300 mg/kg do Sc-EpHE; SHR-VEÍCULO: grupo hipertenso-controle; SHR 150 mg/kg: grupo hipertenso + 150 mg/kg do Sc-EpHE; SHR 300 mg/kg: grupo hipertenso + 300 mg/kg do Sc-EpHE.

3.4.2 Soluções fisiológicas

Para a preparação da solução nutritiva Tyrode para artéria mesentérica foram utilizadas as seguintes substâncias: cloreto de sódio (NaCl), cloreto de potássio (KCl), cloreto de cálcio di-hidratado ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), cloreto de magnésio hexa-hidratado ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), glicose ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$) bicarbonato de sódio (NaHCO_3) e fosfato de sódio mono-hidratado ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$), como disposto na Tabela 3. (TANAKA et al., 1999). Todos estes sais foram obtidos da VETEC – São Paulo, Brasil. Todas as substâncias foram dissolvidas em água destilada e mantidas a 0°C.

Tabela 3 - Composição da solução de Tyrode para artéria mesentérica

SAIS	CONCENTRAÇÃO (mM)
NaCl	158,3
KCl	4,0
CaCl ₂ .	2,0
MgCl ₂ .6	1,05
NaHCO ₃	10,0
NaH ₂ PO ₄ .	0,42
Glicose	5,6

Fonte: TANAKA et al., 1999

3.4.3 Substâncias e Meios utilizados

Durante a realização dos experimentos foram utilizadas as seguintes substâncias: cloridrato de L (-) fenilefrina (FEN); nitroprussiato de sódio (NPS) e cloridrato de acetilcolina (ACh). Todos foram obtidos da Sigma-Aldrich Brasil Ltda (São Paulo-SP, Brasil).

3.4.4 Estudos de medida da pressão arterial (PA)

3.4.4.1 Cirurgia para implantação das cânulas

Os animais foram anestesiados com tiopental sódico (45 mg/kg, i.p.) ou com uma solução de cetamina e xilazina (75 mg/kg de cetamina: 10 mg/kg de xilazina i.p.) (FLECKNELL, 2009). E cateteres de polietileno (PE), um segmento de PE-10 (diâmetro interno e externo de 0,28 e 0,61 mm, respectivamente), soldado a um segmento de PE-50

(diâmetro interno e externo de 0,58 e 0,96 mm, respectivamente), preenchidos com salina heparinizada (0,9% NaCl; 10% heparina sódica) foram implantados no interior da aorta abdominal através da artéria femoral, para o registro da pressão arterial média (PAM) e da frequência cardíaca (FC). Após a inserção e fixação, os cateteres foram tunelizados subcutaneamente e exteriorizados, na região dorsal do animal. Após a cirurgia, os animais foram mantidos em gaiolas individuais recebendo ração padrão e água *ad libitum*. Os animais foram utilizados em até 24 horas após a cirurgia.

3.4.4.2 Medida direta da PA e FC

O registro da pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) foram realizados 24h após o dia da implantação dos cateteres, tempo suficiente para o retorno dos efeitos causados pela anestesia. A cânula arterial, previamente heparinizada, foi conectada a um transdutor de pressão pré-calibrado (MLT0380/D, ADInstruments, Austrália) acoplado a um sistema de aquisição de sinais biológicos (Mikro-tipBloodpressure system, ADInstruments, Austrália) com um programa de aquisição (LabChart versão 7.0, ADInstruments, Austrália). Esse equipamento de aquisição permite o registro simultâneo da Pressão Arterial Pulsátil (PAP), PAM e FC.

3.4.5 Pesagem dos órgãos

Após a eutanásia dos animais, os órgãos – rim, fígado e coração – foram removidos intactos e colocados sob papel absorvente para retirada do excesso de solução nutritiva e pesados (n=6). Em seguida foram retiradas as artérias aorta (n=6) e renal esquerda (n=6) para análise de microscopia de fluorescência.

3.4.6 Avaliação dos parâmetros metabólicos

Os animais foram submetidos a jejum noturno máximo de 12 horas (PANCHAL et al., 2011). Uma alíquota de sangue arterial foi coletada da artéria femoral para determinação das concentrações séricas de glicose, colesterol total, triglicerídeos, HDL-C, LDL-C, por meio de leituras espectroscópicas automatizadas com o uso de Kits comerciais (Labtest, Brasil). A glicemia de jejum também foi determinada semanalmente através de glicosímetro (Trueread, FL, USA), após um jejum de 12 horas.

3.5 ENSAIOS *IN VITRO*

3.5.1 Preparações dos anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato

Os animais submetidos a avaliação dos parâmetros metabólicos e pesagem de órgãos foram utilizados nesta sequência de experimentos. Após uma laparotomia, a artéria mesentérica superior foi identificada, retirada, dissecada e seccionada em anéis de 1 - 2 mm. Os anéis livres de tecido conectivo e adiposo foram mantidos em cubas contendo 10 mL de solução de Tyrode (TANAKA et al., 1999), a 37 °C e gaseificada com uma mistura carbogênica (95 % de O₂ e 5 % de CO₂). Os anéis foram suspensos por linhas de algodão fixadas a um transdutor de força (MLT020, ADInstruments, Austrália), acoplado a um sistema de aquisição (ML870/P com LabChart versão 7.0, ADInstruments, Austrália) para o registro das tensões isométricas. Cada anel foi submetido a uma tensão constante de 0,75g por um período de estabilização de 60 minutos (ver Figura 10 e Figura 11). Durante este tempo, o meio nutritivo foi trocado a cada 15 minutos para prevenir a interferência de metabólitos indesejáveis (ALTURA ,ALTURA, 1970).

Figura 10 – Preparação de artéria mesentérica superior de rato

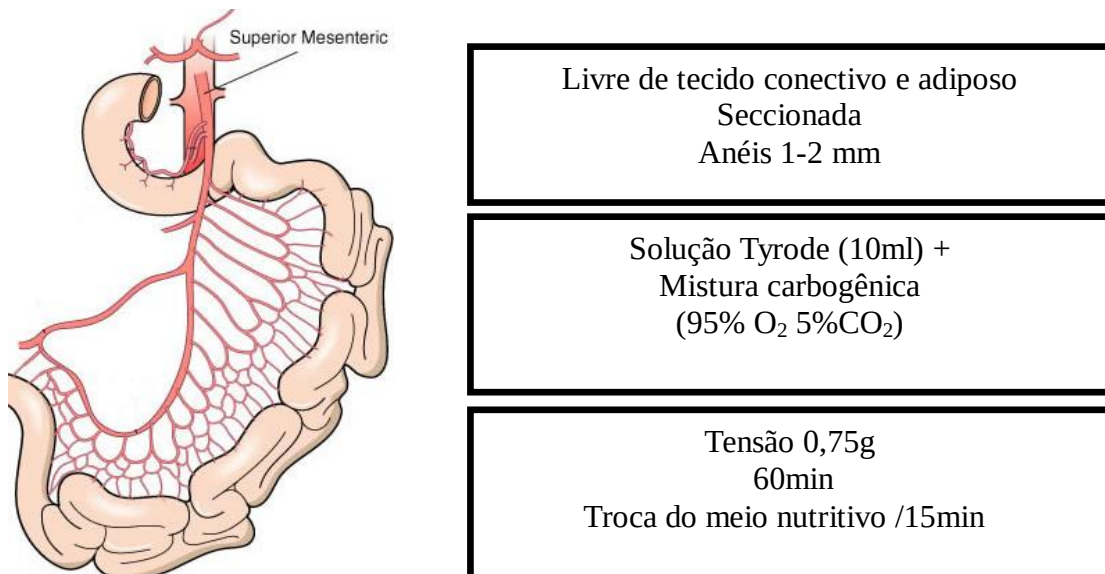


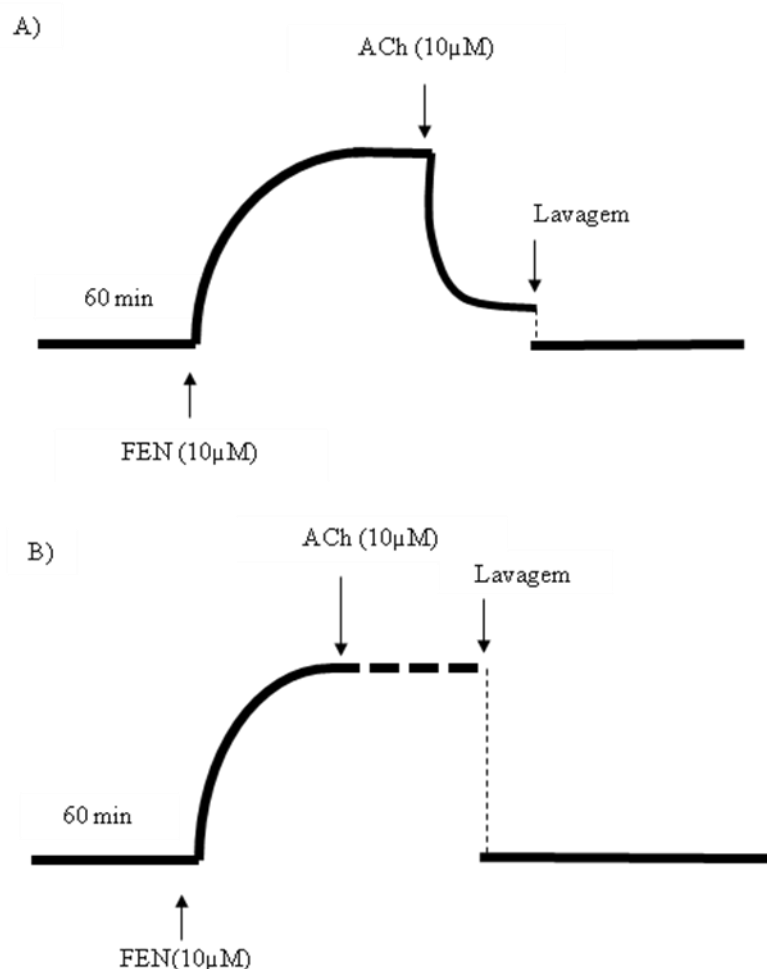
Figura 11 – Sistema de cubas e aquisição de dados de tensão isométrica para órgãos isolados



Fonte: Elaborado pelo autor, 2015

Em todos os protocolos experimentais, após o período de estabilização de 60 minutos, a viabilidade do tecido e a integridade do endotélio foram verificadas através de uma pré-contração do tecido com fenilefrina (FEN) 10 μ M, um agonista dos receptores α_1 -adrenérgicos (BYLUND, 1992; BUSCHER et al., 1999). No componente tônico desta contração, foi adicionado um agonista não seletivo dos receptores muscarínicos, acetilcolina (ACh) 10 μ M com o intuito de avaliar a integridade do endotélio vascular (FURCHGOTT, ZAWADZKI, 1980). Os tecidos nos quais a ACh reverteu o tônus induzido pela FEN por mais que 70% foram designados com endotélio funcional (Figura 11A) e nos tecidos no qual a ACh causar reversão menor que 10% foram designados com endotélio desnudo (Figura 11B) (BROCHET; LANGTON, 2006). Os anéis sem endotélio foram obtidos mecanicamente por meio do atrito entre as paredes internas do vaso com uma haste de metal. Os anéis com relaxamentos entre 10 e 90% foram descartados.

Figura 12 – Representação da verificação da viabilidade do órgão e da integridade do endotélio vascular. A) Presença do endotélio e B) Ausência do endotélio funcional



Fonte: Elaborado pelo autor, 2013

3.5.2 Avaliação do tratamento com o Sc-EpHE sobre a reatividade vascular

Após a verificação da integridade do órgão e da funcionalidade endotelial, como descrito no item acima, foram obtidas curvas concentração-resposta para FEN (1nM a 1 µM) e para NPS (1 µM a 100mM). A resposta foi expressa como porcentagem de relaxamento em relação à contração produzida pela FEN. A potência e eficácia da vasoconstrição e do vasorrelaxamento dos compostos foram avaliadas por meio dos valores de pD_2 ($-\log EC_{50}$) e $E_{m\acute{a}x}$ (efeito máximo em porcentagem de relaxamento e contração), respectivamente.

3.5.3 Medida de ROS por microscopia de fluorescência

Pequenos segmentos de artérias aorta foram removidos, incorporado em composto *Optimal cutting temperature*-OCT (Tissue-Tek, Sakura Finetek), e congeladas em nitrogênio

líquido. As artérias congeladas foram crio-seccionada em 10 μm e no dia do experimento, preparou-se uma solução de dihidroetídio (DHE) (2,5 μM), uma sonda de fluorescência para detecção de espécies reativas de oxigênio, em solução PBS (10 mL). Adicionou-se 1 mL de solução de DHE para cada lâmina, as quais foram incubadas durante 30 min a 37°C em estufa. Após a incubação, as lâminas foram lavadas com PBS a 37°C, três vezes por 2 minutos. Em seguida, foi realizada a observação por microscopia de fluorescência, utilizando um microscópio (Nikon Inverted Microscope Eclipse Ti-E), no comprimento de onda de 530nm para excitação. A intensidade de fluorescência foi realizada utilizando o software Nikon DSU3 (EUA).

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM). Para a análise dos subgrupos SHR e WKY foi utilizado ANOVA *one way* ou *two way*, dependendo do caráter experimental, seguido do pós-teste TuKey para verificar se há diferença significativa entre os grupos. Nos experimentos com vasos isolados foram utilizadas regressões não-lineares para construção de curvas concentração-reposta e determinação dos valores de $E_{\text{máx}}$. Os valores foram considerados significantes quando $p < 0.05$. Para as análises foi utilizado o programa estatístico GraphPad Prism[®] versão 5.0.

REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. PORTARIA Nº 398, DE 30 de abril de 1999. . Regulamento técnico que estabelece as diretrizes básicas para análise e comprovação de

propriedades funcionais e ou de saúde alegadas em rotulagem de alimentos. Brasília: Diário Oficial da União 1999.

AHSAN, M. K. et al. Redox Regulation of Cell Survival by the Thioredoxin Superfamily: An Implication of Redox Gene Therapy in the Heart. **Antioxidant & Redox Signaling**, v. 11, n. 11, p. 2741-2758, 2009.

AL-AWWADI, N. A. et al. Extracts enriched in different polyphenolic families normalize increased cardiac NADPH oxidase expression while having differential effects on insulin resistance, hypertension, and cardiac hypertrophy in high-fructose-fed rats. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 1, p. 151-7, Jan 12 2005.

ALBERTI, K. G.; ZIMMET, P. Z. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. **Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association**, v. 15, n. 7, p. 539-53, Jul 1998.

ALTURA, B. M.; ALTURA, B. T. Differential effects of substrate depletion on drug-induced contractions of rabbit aorta. **American Journal of Physiology** v. 219, n. 6, p. 1698-705, Dec 1970.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. (4) Foundations of care: education, nutrition, physical activity, smoking cessation, psychosocial care, and immunization. **Diabetes Care**, v. 38 Suppl, p. S20-30, Jan 2015.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, A. **Diagnosis and classification of diabetes mellitus**. Jan, p.S67-74. 2013. (1935-5548 (Electronic)

0149-5992 (Linking))

ANANDHARAJ, M.; SIVASANKARI, B.; PARVEEN RANI, R. Effects of Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics on Hypercholesterolemia: A Review. **Chinese Journal of Biology**, v. 2014, p. 1-7, 2014.

ANDRIANTSITOHAINA, R. et al. Molecular mechanisms of the cardiovascular protective effects of polyphenols. **British Journal of Nutrition**, v. 108, n. 9, p. 1532-49, Nov 14 2012.

AQIL, F. et al. Antioxidant and antiproliferative activities of anthocyanin/ellagitannin-enriched extracts from *Syzygium cumini* L. (Jamun, the Indian Blackberry). **Nutrition and Cancer**, v. 64, n. 3, p. 428-38, Apr 2012.

ATALE, N. et al. Cardioprotective role of *Syzygium cumini* against glucose-induced oxidative stress in H9C2 cardiac myocytes. **Cardiovascular Toxicology**, v. 13, n. 3, p. 278-89, Sep 2013.

ATLAS, S. A. The renin-angiotensin aldosterone system: pathophysiological role and pharmacologic inhibition. **Journal of Managed Care Pharmacy**, v. 13, n. 8 Suppl B, p. 9-20, Oct 2007.

AYYANAR, M.; SUBASH-BABU, P. *Syzygium cumini* (L.) Skeels: A review of its phytochemical constituents and traditional uses. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, p. 240-246, 2012.

BADAL, S. S.; DANESH, F. R. Strategies to reverse endothelial dysfunction in diabetic nephropathy. **Kidney International**, v. 82, n. 11, p. 1151-4, Dec 2012.

BADIMON, L.; VILAHUR, G.; PADRO, T. Nutraceuticals and atherosclerosis: human trials. **Cardiovascular Therapeutics**, v. 28, n. 4, p. 202-15, Aug 2010.

BALHARA, Y.; VERMA, R. Psychoactive nutraceuticals. **Journal of Medical Nutrition and Nutraceuticals**, v. 1, n. 1, p. 27-36, January 1, 2012 2012.

BANERJEE, M.; VATS, P. Reactive metabolites and antioxidant gene polymorphisms in Type 2 diabetes mellitus. **Redox Biology**, v. 2C, p. 170-177, Dec 11 2013.

BARBOSA, K. B. F. et al. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, v. 23, n. 4, p. 14, 2010.

BARROS, Z. M. P. **Cascas de frutas tropicais como fonte de antioxidantes para enriquecimento de suco pronto**. 2011. 84 (Mestrado). Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba.

BERKOW, S. E.; BARNARD, N. D. Blood pressure regulation and vegetarian diets. **Nutrition Reviews**, v. 63, n. 1, p. 1-8, Jan 2005.

BERNATOVA, I. Endothelial dysfunction in experimental models of arterial hypertension: cause or consequence? **BioMed Research International**, v. 2014, p. 598271, 2014.

BHAT, M. et al. Antidiabetic Indian plants: a good source of potent amylase inhibitors. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2011, p. 810207, 2011.

BIESALSKI, H. K. Polyphenols and inflammation: basic interactions. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, v. 10, n. 6, p. 724-8, Nov 2007.

BLOMHOFF, R. Dietary antioxidants and cardiovascular disease. **Current Opinion in Lipidology**, v. 16, n. 1, p. 47-54, Feb 2005.

BOEING, H. et al. Critical review: vegetables and fruit in the prevention of chronic diseases. **European Journal of Nutrition**, v. 51, n. 6, p. 637-663, 2012.

BOPP, A. et al. Syzygium cumini inhibits adenosine deaminase activity and reduces glucose levels in hyperglycemic patients. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v. 23, n. 4, p. 501-7, Aug 2009.

BORGUINI, R. G. **Avaliação do potencial antioxidante e de algumas características físico-químicas do tomate (Lycopersicon esculentum) orgânico em comparação ao convencional**. 2006. 178 (Doutorado). Programa de Pós-Graduação em Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo.

BORRIELLO, A. et al. Dietary polyphenols: focus on resveratrol, a promising agent in the prevention of cardiovascular diseases and control of glucose homeostasis. **Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases**, v. 20, n. 8, p. 618-25, Oct 2010.

BRASIL. RDC N° 216 de 15 de setembro de 2004. Resolução de Diretoria Colegiada n° 216 de 15 de setembro de 2004. Dispõe sobre Regulamento Técnico de Boas Práticas para Serviços de Alimentação: Diário Oficial da União 2004.

_____. Hipertensão arterial sistêmica para o Sistema Único de Saúde. BÁSICA., M. D. S. S. D. A. A. S. D. D. A. Brasília - Distrito Federal: Ministério da Saúde. 16: 58 p. 2006.

_____. Vigitel Brasil 2013. Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas Não Transmissíveis por meio de Inquérito Telefônico. SAÚDE, M. D. Brasília: Secretaria de Vigilância em Saúde: 120 p. 2014.

BRASIL; MINISTÉRIO DA SAÚDE. Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. Brasília: 60 p. 2006.

BUSCHER, R. et al. Variability in phenylephrine response and essential hypertension: a search for human alpha(1B)-adrenergic receptor polymorphisms. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 291, n. 2, p. 793-8, Nov 1999.

BYLUND, D. B. Subtypes of alpha 1- and alpha 2-adrenergic receptors. **FASEB Journal**, v. 6, n. 3, p. 832-9, Feb 1 1992.

CAIN, A. E.; KHALIL, R. A. Pathophysiology of essential hypertension: role of the pump, the vessel, and the kidney. **Seminars in Nephrology**, v. 22, n. 1, p. 3-16, Jan 2002.

CARBONE, F. et al. Potential pathophysiological role for the vitamin D deficiency in essential hypertension. **World Journal of Cardiology**, v. 6, n. 5, p. 260-76, May 26 2014.

CARRERA, C. et al. Ultrasound assisted extraction of phenolic compounds from grapes. **Analytica Chimica Acta**, v. 732, p. 100-104, Jun 30 2012.

CARRETERO, O. A.; OPARIL, S. Essential Hypertension : Part I: Definition and Etiology. **Circulation**, v. 101, n. 3, p. 329-335, 2000.

CARTHY, E. R. Autonomic dysfunction in essential hypertension: A systematic review. **Annals of Medicine and Surgery**, v. 3, n. 1, p. 2-7, 2014.

CASCELLA, T. et al. Aldosterone Enhances IGF-I-Mediated Signaling and Biological Function in Vascular Smooth Muscle Cells. **Endocrinology**, v. 151, n. 12, p. 5851-5864, 2010.

CATANIA, A. S.; BARROS, C. R. D.; FERREIRA, S. R. G. Vitaminas e minerais com propriedades antioxidantes e risco cardiometabólico: controvérsias e perspectivas. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 53, p. 550-559, 2009.

CHATZIGEORGIOU, A. et al. The use of animal models in the study of diabetes mellitus. **In Vivo**, v. 23, n. 2, p. 245-58, Mar-Apr 2009.

CIOCOIU, M. et al. The involvement of a polyphenol-rich extract of black chokeberry in oxidative stress on experimental arterial hypertension. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, p. 912769, 2013.

CONTRATTO, A. W.; ROGERS, M. B. The Use of the Rice Diet in the Treatment of Hypertension in Nonhospitalized Patients. **New England Journal of Medicine**, v. 239, n. 15, p. 531-536, 1948.

CRUZAT, V. F.; TIRAPEGUI, J. Estresse oxidativo e alimentação. In: TIRAPEGUI, J. (Ed.). **Nutrição Fundamentos e Aspectos Atuais**. São Paulo: Atheneu, v.3, 2013. cap. 13, p.219-254.

CUNHA, R. D. S.; FERREIRA, A. V. L. Sistema renina-angiotensina-aldosterona e lesão vascular hipertensiva. **Revista Brasileira de Hipertensão**, v. 3, p. 10, 2000.

DANEMAN, D. Type 1 diabetes. **The Lancet**, v. 367, n. 9513, p. 847-858, // 2006.

DE BONA, K. et al. Syzygium cumini is more effective in preventing the increase of erythrocytic ADA activity than phenolic compounds under hyperglycemic conditions in vitro. **Journal of Physiology and Biochemistry**, v. 70, n. 2, p. 321-330, 2014/06/01 2014.

DE BONA, K. S. et al. Syzygium cumini Extract Decrease Adenosine Deaminase, 5'Nucleotidase Activities and Oxidative Damage in Platelets of Diabetic Patients. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 26, p. 729-738, 2010.

DE JESUS ROMERO-PRADO, M. M. et al. Dietary Flavonoids Added to Pharmacological Antihypertensive Therapy are Effective in Improving Blood Pressure. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, Dec 1 2014.

DE TORRES, C. et al. Effect of freeze-drying and oven-drying on volatiles and phenolics composition of grape skin. **Analytica Chimica Acta**, v. 660, n. 1-2, p. 177-182, Feb 15 2010.

DEL RIO, D. et al. Dietary (poly)phenolics in human health: structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases. **Antioxidant & Redox Signaling**, v. 18, n. 14, p. 1818-92, May 10 2013.

DENG, G. F. et al. Potential of fruit wastes as natural resources of bioactive compounds. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, n. 7, p. 8308-23, 2012.

DOLE, V. P. et al. Dietary treatment of hypertension. II. Sodium depletion as related to the therapeutic effect. **Journal of Clinical Investigation**, v. 30, n. 6, p. 584, 1951.

DORNAS, W. C.; SILVA, M. E. Animal models for the study of arterial hypertension. **Journal of Biosciences**, v. 36, n. 4, p. 731-737, 2011.

DRAGANO, N. R. V. et al. Freeze-dried jaboticaba peel powder improves insulin sensitivity in high-fat-fed mice. **British Journal of Nutrition**, v. 110, n. 03, p. 447-455, 2013.

EILAT-ADAR, S. et al. Nutritional recommendations for cardiovascular disease prevention. **Nutrients**, v. 5, n. 9, p. 3646-83, Sep 2013.

ESHWARAPPA, R. S. et al. Antioxidant activity of Syzygium cumini leaf gall extracts. **Bioimpacts**, v. 4, n. 2, p. 101-7, 2014.

FARIA, A. F.; MARQUES, M. C.; MERCADANTE, A. Z. Identification of bioactive compounds from jambolão (*Syzygium cumini*) and antioxidant capacity evaluation in different pH conditions. **Food Chemistry**, v. 126, n. 4, p. 1571-1578, 2011.

FENERCIOGLU, A. K. et al. The effects of polyphenol-containing antioxidants on oxidative stress and lipid peroxidation in Type 2 diabetes mellitus without complications. **Journal of Endocrinological Investigation**, v. 33, n. 2, p. 118-124, 2010/02/01 2010.

FERREIRA, M. S. et al. Formulation and characterization of functional foods based on fruit and vegetable residue flour. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, n. 2, p. 822-30, Feb 2015.

FLECKNELL, P. A. Appendix 3 - Examples of Dilutions of Anaesthetic Mixtures for Small Rodents. In: FLECKNELL, P. A. (Ed.). **Laboratory Animal Anaesthesia (Third Edition)**. San Diego: Academic Press, 2009. p.282-285. ISBN 978-0-12-369376-1.

FOLKOW, B. Physiological aspects of primary hypertension. **Physiological Reviews**, v. 62, n. 2, p. 347-504, Apr 1982.

FRANÇA, L. M. **Avaliação pré-clínica de *Syzygium cumini* (L.) Skeels no tratamento da obesidade e dislipidemia**. 2010. 61 (Mestrado). PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE, UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO

FRENOUX, J. M. et al. A polyunsaturated fatty acid diet lowers blood pressure and improves antioxidant status in spontaneously hypertensive rats. **The Journal of Nutrition**, v. 131, n. 1, p. 39-45, Jan 2001.

FUKAI, T.; USHIO-FUKAI, M. Superoxide dismutases: role in redox signaling, vascular function, and diseases. **Antioxidant & Redox Signaling** v. 15, n. 6, p. 1583-606, Sep 15 2011.

FURCHGOTT, R. F.; ZAWADZKI, J. V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature**, v. 288, n. 5789, p. 373-6, Nov 27 1980.

GARCIA-VILLALBA, R. et al. Exploratory analysis of human urine by LC-ESI-TOF MS after high intake of olive oil: understanding the metabolism of polyphenols. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 398, n. 1, p. 463-75, Sep 2010.

GIBBONS, G. H.; DZAU, V. J. The Emerging Concept of Vascular Remodeling. **New England Journal of Medicine**, v. 330, n. 20, p. 1431-1438, 1994.

GONZÁLEZ, J. Essential hypertension and oxidative stress: New insights. **World Journal of Cardiology**, v. 6, n. 6, p. 353, 2014.

GUARNER, F.; REQUENA, T.; MARCOS, A. Consensus statements from the Workshop" Probiotics and Health: Scientific evidence. **Nutricion Hospitalaria**, v. 25, n. 5, p. 700-704, 2010.

HARBORNE, J. B. **The Flavonoids Advances in Research Since 1986**. Taylor & Francis, 1993. ISBN 9780412480706. Disponível em: < <https://books.google.com.br/books?id=SEZdLxbep4IC> >.

HARRISON, D. G. et al. Oxidative stress and hypertension. **Journal of the American Society of Hypertension**, v. 1, n. 1, p. 30-44, Jan-Feb 2007.

HASLER, C. M. Functional foods: their role in disease prevention and health promotion. **FOOD TECHNOLOGY-CHAMPAIGN THEN CHICAGO-**, v. 52, p. 63-147, 1998.

HEALTH, U. D. O.; SERVICES, H. A public health action plan to prevent heart disease and stroke. **Atlanta, GA: US Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention**, v. 13, 2003.

HEIMENDINGER, J. et al. The national 5 A Day for Better Health Program: a large-scale nutrition intervention. **Journal of Public Health Management and Practice**, v. 2, n. 2, p. 27-35, 1996.

HELENO, S. A. et al. Bioactivity of phenolic acids: Metabolites versus parent compounds: A review. **Food Chemistry**, v. 173, n. 0, p. 501-513, 4/15/ 2015.

HERCULANO, E. et al. Evaluation of cardiovascular effects of edible fruits of *Syzygium cumini* Myrtaceae (L) skeels in rats. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 13, n. 11, p. 1853-1861, 2014.

HOOPEL, L. et al. Reduced or modified dietary fat for preventing cardiovascular disease. **Cochrane Database Systematic Reviews**, n. 7, p. CD002137, 2011.

HOZUMI, T. et al. Beneficial effect of short term intake of red wine polyphenols on coronary microcirculation in patients with coronary artery disease. **Heart**, v. 92, n. 5, p. 681-2, May 2006.

HUNG, H. C. et al. Fruit and vegetable intake and risk of major chronic disease. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 96, n. 21, p. 1577-84, Nov 3 2004.

INTENGAN, H. D.; SCHIFFRIN, E. L. Vascular remodeling in hypertension: roles of apoptosis, inflammation, and fibrosis. **Hypertension**, v. 38, n. 3 Pt 2, p. 581-7, Sep 2001.

INZUCCHI, S. E. Oral antihyperglycemic therapy for type 2 diabetes: scientific review. **JAMA**, v. 287, n. 3, p. 360-72, Jan 16 2002.

ISMAIL, T.; SESTILI, P.; AKHTAR, S. Pomegranate peel and fruit extracts: a review of potential anti-inflammatory and anti-infective effects. **Journal of Ethnopharmacology** v. 143, n. 2, p. 397-405, Sep 28 2012.

ITOH, H. et al. Multiple autocrine growth factors modulate vascular smooth muscle cell growth response to angiotensin II. **Journal of Clinical Investigation**, v. 91, n. 5, p. 2268-2274, 1993.

JOHN, J. H. et al. Effects of fruit and vegetable consumption on plasma antioxidant concentrations and blood pressure: a randomised controlled trial. **The Lancet**, v. 359, n. 9322, p. 1969-74, Jun 8 2002.

JOSHUPURA, K. J. et al. The effect of fruit and vegetable intake on risk for coronary heart disease. **Annals of Internal Medicine**, v. 134, n. 12, p. 1106-14, Jun 19 2001.

JURASCHEK, S. P. et al. Effects of vitamin C supplementation on blood pressure: a meta-analysis of randomized controlled trials. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 95, n. 5, p. 1079-88, May 2012.

KAHN, S. E.; COOPER, M. E.; DEL PRATO, S. Pathophysiology and treatment of type 2 diabetes: perspectives on the past, present, and future. **The Lancet**, v. 383, n. 9922, p. 1068-1083, 2014.

KALRA, E. K. Nutraceutical-definition and introduction. **American Association of Pharmaceutical Scientists**, v. 5, n. 3, p. 27-28, 2003.

KANG, Y. S. Obesity Associated Hypertension: New Insights into Mechanism. **Electrolyte Blood Press**, v. 11, n. 2, p. 46-52, Dec 2013.

KARUNAKARAN, U.; PARK, K. G. A systematic review of oxidative stress and safety of antioxidants in diabetes: focus on islets and their defense. **Diabetes & Metabolism Journal**, v. 37, n. 2, p. 106-12, Apr 2013.

KATAYAMA, S. et al. Glucose Intolerance in Spontaneously Hypertensive and Wistar-Kyoto Rats: Enhanced Gene Expression and Synthesis of Skeletal Muscle Glucose Transporter 4. **Hypertension Research**, v. 20, n. 4, p. 279-286, 1997.

KEMPNER, W. Treatment of hypertensive vascular disease with rice diet. **The American Journal of Medicine**, v. 4, n. 4, p. 545-577, 4// 1948.

KHALIL, R. A.; VAN BREEMEN, C. Mechanisms of calcium mobilization and homeostasis in vascular smooth muscle and their relevance to hypertension. In: LARAGH JH, B. B., EDS. (Ed.). **Hypertension: Pathophysiology, Diagnosis and Management**,. New York, NY: Raven Press Publishers, 1995. p.523-40.

KIM, M. K. et al. The relationship of dietary sodium, potassium, fruits, and vegetables intake with blood pressure among Korean adults aged 40 and older. **Nutrition Research and Practice**, v. 8, n. 4, p. 453-62, Aug 2014.

KIVIMAKI, A. S. et al. Lingonberry juice lowers blood pressure of spontaneously hypertensive rats (SHR). **Journal of functional foods**, v. 5, p. 8, 2013.

KRAUSS, R. M. et al. AHA Dietary Guidelines: revision 2000: A statement for healthcare professionals from the Nutrition Committee of the American Heart Association. **Circulation**, v. 102, n. 18, p. 2284-99, Oct 31 2000.

KYOTANI, Y. et al. Olmesartan inhibits angiotensin II-Induced migration of vascular smooth muscle cells through Src and mitogen-activated protein kinase pathways. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 113, n. 2, p. 161-8, 2010.

LEE, S.-J. et al. Identification of volatile components in basil (*Ocimum basilicum* L.) and thyme leaves (*Thymus vulgaris* L.) and their antioxidant properties. **Food Chemistry**, v. 91, n. 1, p. 131-137, 6// 2005.

LEWIS, B. J. et al. Antihypertensive effect of passion fruit peel extract and its major bioactive components following acute supplementation in spontaneously hypertensive rats. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 24, n. 7, p. 1359-66, Jul 2013.

LI, H.; HORKE, S.; FÖRSTERMANN, U. Vascular oxidative stress, nitric oxide and atherosclerosis. **Atherosclerosis**, v. 237, n. 1, p. 208-219, 11// 2014.

LI, M.; SONG, L.-J.; QIN, X.-Y. Advances in the cellular immunological pathogenesis of type 1 diabetes. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 18, n. 5, p. 749-758, 2014.

LIMÓN-PACHECO, J.; GONSEBATT, M. E. The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 674, n. 1-2, p. 137-147, 3/31/ 2009.

LORENZI, H.; DE ABREU MATOS, F. J. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2002. ISBN 8586714186.

MAJZUNOVA, M. et al. Redox signaling in pathophysiology of hypertension. **Journal of Biomedical Science**, v. 20, n. 1, p. 69, 2013.

MANCIA, G. et al. Task Force Members. 2013 ESH/ESC Guidelines for the management of arterial hypertension: the Task Force for the management of arterial hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC). **Journal of Hypertension**, v. 31, n. 7, p. 1281-1357, 2013.

MANCIA, G. et al. Sympathetic activation in the pathogenesis of hypertension and progression of organ damage. **Hypertension**, v. 34, n. 4 Pt 2, p. 724-8, Oct 1999.

MARTÍNEZ- VALVERDE, I.; PERIAGO, M. J.; ROS, G. Significado nutricional de los compuestos fenólicos de la dieta. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v. 50, p. 5-18, 2000.

MAYET, J.; HUGHES, A. Cardiac and Vascular Pathophysiology in Hypertension. **Heart**, v. 89, n. Hypertension, p. 1104-1109, 2003.

MCCLEMENTS, D. J. Enhancing nutraceutical bioavailability through food matrix design. **Current Opinion in Food Science**, v. 4, n. 0, p. 1-6, 8// 2015.

MIGLIATO, K. F. et al. Ação Farmacológica de *Syzygium cumini* (L.) Skeels. **Acta Farmacêutica Bonaerense**, v. 25, n. 2, p. 310-314, 2006.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Portaria Interministerial nº2960, de 9 de dezembro de 2008. Aprova o Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e cria o Comitê Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. Diário Oficial da União. Brasília -DF: 10 dez. 2008. 240 2008.

MOHAMED, A. A.; ALI, S. I.; EL-BAZ, F. K. Antioxidant and antibacterial activities of crude extracts and essential oils of *Syzygium cumini* leaves. **PLoS One**, v. 8, n. 4, p. e60269, 2013.

MONAMI, M. et al. Comparison of different drugs as add-on treatments to metformin in type 2 diabetes: A meta-analysis. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 79, n. 2, p. 196-203, 2// 2008.

MONTEZANO, A.; TOUYZ, R. Reactive oxygen species and endothelial function-role of nitric oxide synthase uncoupling and Nox family nicotinamide adenine dinucleotide

phosphate oxidases. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 110, p. 87 - 94, 2012.

MOO-HUCHIN, V. M. et al. Antioxidant compounds, antioxidant activity and phenolic content in peel from three tropical fruits from Yucatan, Mexico. **Food Chemistry** v. 166, p. 17-22, Jan 1 2015.

MORAES, F. P.; COLLA, L. M. Alimentos Funcionais e Nutracêuticos: definições, legislação e benefícios à saúde. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 3, p. 109-122, 2006.

MORENTE ESPINOSA, M. D. M. "**Efecto de Apocinina sobre el Remodelado Vascular y la Presión Arterial en dos Modelos Ovariectomizados de Hipertensión Experimental: DOCA-sal y SHR**". 2012. 168 (Doutorado). DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA, UNIVERSIDAD DE MURCIA, Murcia.

MULVANY, M. J. et al. Vascular remodeling. **Hypertension**, v. 28, n. 3, p. 505-6, Sep 1996.

MURUGANANDAN, S. et al. Anti-inflammatory activity of Syzygium cumini bark. **Fitoterapia**, v. 72, p. 369-375, 2001.

NASRI, H. et al. New Concepts in Nutraceuticals as Alternative for Pharmaceuticals. **International Journal of Preventive Medicine**, v. 5, n. 12, p. 1487-1499, 2014.

NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH. **Your guide to lowering your blood pressure with DASH**. Smashbooks, 2006.

NESS, A. R.; POWLES, J. W. Fruit and vegetables, and cardiovascular disease: a review. **International Journal of Epidemiology**, v. 26, n. 1, p. 1-13, Feb 1997.

NOLAN, C. J.; DAMM, P.; PRENTKI, M. Type 2 diabetes across generations: from pathophysiology to prevention and management. **The Lancet**, v. 378, n. 9786, p. 169-181, // 2011.

OH, Y. S.; GALIS, Z. S. Anatomy of success: the top 100 cited scientific reports focused on hypertension research. **Hypertension**, v. 63, n. 4, p. 641-7, Apr 2014.

OKAMOTO, K.; AOKI, K. Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. **Japanese Circulation Journal** v. 27, p. 282-93, Mar 1963.

OZOUGWU, J.; OBIMBA, K.; UNAKALAMBA, C. The pathogenesis and pathophysiology of type 1 and type 2 diabetes mellitus. **Journal of Physiology and Pathophysiology**, v. 4, n. 4, p. 11, 2013.

PANCHAL, S. K. et al. High-carbohydrate high-fat diet-induced metabolic syndrome and cardiovascular remodeling in rats. **Journal of Cardiovascular Pharmacology** v. 57, n. 1, p. 51-64, Jan 2011.

PARI, L.; SARAVANAN, G. Antidiabetic effect of Cogent db, a herbal drug in alloxan-induced diabetes mellitus. **Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & pharmacology : CBP**, v. 131, n. 1, p. 19-25, Jan 2002.

PARK, Y. et al. Dietary fiber intake and mortality in the NIH-AARP Diet and Health Study. **Archives of internal medicine**, v. 171, n. 12, p. 1061-1068, 02/14 2011.

PEIXOTO, M. P. G.; FREITAS, L. A. P. Spray-dried extracts from *Syzygium cumini* seeds: physicochemical and biological evaluation. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 23, n. 1, p. 145-152, 2013.

PEREZ-JIMENEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. Grape products and cardiovascular disease risk factors. **Nutrition Research Reviews**, v. 21, n. 2, p. 158-73, Dec 2008.

PIETTA, P. G. Flavonoids as antioxidants. **Journal of Natural Products**, v. 63, n. 7, p. 1035-42, Jul 2000.

PINTO, Y. M.; PAUL, M.; GANTEN, D. Lessons from rat models of hypertension: from Goldblatt to genetic engineering. **Cardiovascular Research**, v. 39, n. 1, p. 77-88, Jul 1998.

POLLMAN, M. J. et al. Vasoactive substances regulate vascular smooth muscle cell apoptosis. Countervailing influences of nitric oxide and angiotensin II. **Circulation Research** v. 79, n. 4, p. 748-56, Oct 1996.

POPKIN, B. M. Nutritional patterns and transitions. **Population and Development Review**, p. 138-157, 1993.

QUINONES, M.; MIGUEL, M.; ALEIXANDRE, A. Beneficial effects of polyphenols on cardiovascular disease. **Pharmacological Research**, v. 68, n. 1, p. 125-31, Feb 2013.

RAFTOPOULOS, L. et al. Epigenetics, the missing link in hypertension. **Life Sciences**, Aug 13 2014.

RAHMAN, I.; ADCOCK, I. M. Oxidative stress and redox regulation of lung inflammation in COPD. **European Respiratory Journal**, v. 28, n. 1, p. 219-42, Jul 2006.

RAINS, J. L.; JAIN, S. K. Oxidative stress, insulin signaling, and diabetes. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 50, n. 5, p. 567-75, Mar 1 2011.

RAPEPORT, N.; MIDDLEMOST, S. Expert report on the 22nd European meeting on hypertension and cardiovascular protection, London, 26-29 April 2012 : conference report. 23: 232-234 p. 2012.

RAVI, K.; RAJASEKARAN, S.; SUBRAMANIAN, S. Antihyperlipidemic effect of *Eugenia jambolana* seed kernel on streptozotocin-induced diabetes in rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 43, n. 9, p. 1433-9, Sep 2005.

REDDY, K. S.; KATAN, M. B. Diet, nutrition and the prevention of hypertension and cardiovascular diseases. **Public health nutrition**, v. 7, n. 1a, p. 167-186, 2004.

REYNERTSON, K. A. et al. Quantitative analysis of antiradical phenolic constituents from fourteen edible Myrtaceae fruits. **Food Chemistry**, v. 109, n. 4, p. 883-890, Aug 15 2008.

RIBEIRO, R. M. et al. Antihypertensive Effect of *Syzygium cumini* in Spontaneously Hypertensive Rats. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2014, 2014.

RIMOLDI, S. F.; SCHERRER, U.; MESSERLI, F. H. Secondary arterial hypertension: when, who, and how to screen? **European Heart Journal**, v. 35, n. 19, p. 1245-1254, 2014-05-14 00:00:00 2014.

RODRIGO, R. et al. Polyphenols in disease: from diet to supplements. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 15, n. 4, p. 304-17, 2014.

RODRIGO, R. et al. Decrease in oxidative stress through supplementation of vitamins C and E is associated with a reduction in blood pressure in patients with essential hypertension. **Clinical Science**, v. 114, p. 625-634, 2008.

RODRIGO, R. et al. Relationship between Oxidative Stress and Essential Hypertension. **Hypertension Research**, v. 30, n. 12, p. 1159-1167, 12/print 2007.

RUFINO, M. D. S. M. et al. Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. **Food Chemistry**, v. 121, n. 4, p. 996-1002, 2010.

SACKS, F. M. et al. A dietary approach to prevent hypertension: a review of the Dietary Approaches to Stop Hypertension (DASH) Study. **Clin Cardiol**, v. 22, n. 7 Suppl, p. III6-10, Jul 1999.

SALAMANCA, D. A.; KHALIL, R. A. Protein Kinase C Isoforms as Specific Targets for Modulation of Vascular Smooth Muscle Function in Hypertension. **Biochemical pharmacology**, v. 70, n. 11, p. 1537-1547, 09/01 2005.

SALEHI-ABARGOUEI, A. et al. Effects of Dietary Approaches to Stop Hypertension (DASH)-style diet on fatal or nonfatal cardiovascular diseases--incidence: a systematic review and meta-analysis on observational prospective studies. **Nutrition**, v. 29, n. 4, p. 611-8, Apr 2013.

SALVETTI, A. et al. The inter-relationship between insulin resistance and hypertension. **Drugs**, v. 46 Suppl 2, p. 149-59, 1993.

SANTOS, R. D. et al. I Diretriz sobre o consumo de gorduras e saúde cardiovascular. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 100, p. 1-40, 2013.

SCHINI-KERTH, V. B. et al. Nutritional improvement of the endothelial control of vascular tone by polyphenols: role of NO and EDHF. **Pflügers Archiv - European Journal of Physiology**, v. 459, n. 6, p. 853-62, May 2010.

SHARMA, A. K. et al. Syzygium cumini Ameliorates Insulin Resistance and β -Cell Dysfunction via Modulation of PPAR γ , Dyslipidemia, Oxidative Stress, and TNF- α in Type 2 Diabetic Rats. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 119, n. 3, p. 205-213, 2012.

SHARMA, B.; BALOMAJUMDER, C.; ROY, P. Hypoglycemic and hypolipidemic effects of flavonoid rich extract from Eugenia jambolana seeds on streptozotocin induced diabetic rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 7, p. 2376-83, Jul 2008.

SHARMA, S. B. et al. Antihyperglycemic effect of the fruit-pulp of Eugenia jambolana in experimental diabetes mellitus. **J Ethnopharmacol**, v. 104, n. 3, p. 367-73, Apr 6 2006.

SHI, J. et al. Optimization of the extraction of polyphenols from grape seed meal by aqueous ethanol solution. **Journal of Food Agriculture & Environment**, v. 1, n. 2, p. 42-47, Apr 2003.

SHRIKANTA, A.; KUMAR, A.; GOVINDASWAMY, V. Resveratrol content and antioxidant properties of underutilized fruits. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, n. 1, p. 383-390, 2015/01/01 2015.

SIERVO, M. et al. Effects of the Dietary Approach to Stop Hypertension (DASH) diet on cardiovascular risk factors: a systematic review and meta-analysis. **British Journal of Nutrition**, p. 1-15, Nov 28 2014.

SILVA E SÁ, A. P. C. D. **Potencial antioxidante e aspectos químicos e físicos das frações comestíveis (polpa e cascas) e sementes de Jamelão (Syzygium cumini, L. Skeels)**. 2008. 72 (Mestrado). Instituto de Tecnologia., Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Serópedica, Rio de Janeiro.

SINGAL, D. P.; BLAJCHMAN, M. A. Histocompatibility (HL-A) antigens, lymphocytotoxic antibodies and tissue antibodies in patients with diabetes mellitus. **Diabetes**, v. 22, n. 6, p. 429-32, Jun 1973.

SLINKARD, K.; SINGLETON, V. L. Total Phenol Analysis: Automation and Comparison with Manual Methods. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 28, n. 1, p. 49-55, January 1, 1977 1977.

SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de Nutrição**, v. 15, p. 71-81, 2002.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. **Diretriz da Sociedade Brasileira de Diabetes 2013-2014**. São Paulo: AC Farmacêutica, 2014.

SOUSA, M. S. B.; MORAIS, L. V.; LIMA, A. D. Fenólicos totais e capacidade antioxidante in vitro de resíduos de polpas de frutas tropicais. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 14, n. 03, p. 202-210, 2011.

SRIVASTAVA, S.; CHANDRA, D. Pharmacological potentials of Syzygium cumini: a review. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 93, n. 9, p. 2084-93, Jul 2013.

STEFFEN, Y. et al. Mono-O-methylated flavanols and other flavonoids as inhibitors of endothelial NADPH oxidase. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 469, n. 2, p. 209-219, 1/15/ 2008.

TACO. Tabela brasileira de composição de alimentos. UNICAMP, N. D. E. E. P. E. A. N. U. E. D. C. Campinas- SP: 161 p. 2011.

TAN, M. C. et al. Dietary Compliance, Dietary Supplementation and Traditional Remedy Usage of Type 2 Diabetic Patients With and Without Cardiovascular Disease. **Clinical Nutrition Research**, v. 4, n. 1, p. 18-31, 2015.

TANAKA, Y. et al. Significant role of neuronal non-N-type calcium channels in the sympathetic neurogenic contraction of rat mesenteric artery. **British Journal of Pharmacology**, v. 128, n. 7, p. 1602-1608, 1999.

TANGNEY, C. C.; RASMUSSEN, H. E. Polyphenols, inflammation, and cardiovascular disease. **Current Atherosclerosis Reports**, v. 15, n. 5, p. 324, May 2013.

TOUYZ, R.; BRIONES, A. Reactive oxygen species and vascular biology: implications in human hypertension. **Hypertension Research**, v. 34, p. 5 - 14, 2011.

TOUYZ, R. M. Reactive oxygen species, vascular oxidative stress, and redox signaling in hypertension: what is the clinical significance? **Hypertension**, v. 44, n. 3, p. 248-52, Sep 2004.

TOUYZ, R. M.; SCHIFFRIN, E. L. Increased generation of superoxide by angiotensin II in smooth muscle cells from resistance arteries of hypertensive patients: role of phospholipase D-dependent NAD(P)H oxidase-sensitive pathways. **Journal of Hypertension**, v. 19, n. 7, 2001.

TRESSERRA-RIMBAU, A. et al. Dietary intake and major food sources of polyphenols in a Spanish population at high cardiovascular risk: the PREDIMED study. **Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases**, v. 23, n. 10, p. 953-9, Oct 2013.

TRIPPODO, N. C.; FROHLICH, E. D. Similarities of genetic (spontaneous) hypertension. Man and rat. **Circulation Research**, v. 48, n. 3, p. 309-19, Mar 1981.

TSAO, R. Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. **Nutrients**, v. 2, n. 12, p. 1231-46, Dec 2010.

UCKO, H. Dietary treatment of hypertension. **British medical journal**, v. 2, n. 4671, p. 144, 1950.

VASCONCELOS, S. M. L. et al. Hipótese oxidativa da hipertensão arterial: uma minirrevisão. **Revista Brasileira de Hipertensão**, v. 14, n. 4, p. 269-274,, 2007.

VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 95, p. I-III, 2010.

VIMALESWARAN, K. S. et al. Association of vitamin D status with arterial blood pressure and hypertension risk: a mendelian randomisation study. **Lancet Diabetes Endocrinol**, v. 2, n. 9, p. 719-29, Sep 2014.

WARD, N. Oxidative stress in human hypertension: association with antihypertensive treatment, gender, nutrition, and lifestyle. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 36, n. 2, p. 226-232, 2004.

WIDMER, R. J. et al. "The Mediterranean Diet, its Components, and Cardiovascular Disease". **The American Journal of Medicine**, Oct 15 2014.

WILLETT, W. C. et al. Mediterranean diet pyramid: a cultural model for healthy eating. **The American journal of clinical nutrition**, v. 61, n. 6, p. 1402S-1406S, 1995.

WONG, W. Y. et al. Tocotrienols reverse cardiovascular, metabolic and liver changes in high carbohydrate, high fat diet-fed rats. **Nutrients**, v. 4, n. 10, p. 1527-41, Oct 2012.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global status report on noncommunicable diseases 2014**. Geneva: 2014. 302 ISBN ISBN 978 92 4 156485 4.

YAMORI, Y. Pathogenesis of spontaneous hypertension as a model for essential hypertension. **Japanese Circulation Journal** v. 41, n. 3, p. 259-66, Mar 1977.

YOUNG, I.; WOODSIDE, J. Antioxidants in health and disease. **Journal of clinical pathology**, v. 54, n. 3, p. 176-186, 2001.

APÊNDICE

ARTIGO

Antihypertensive effect of hydroalcoholic extract of lyophilized epicarp of
Syzygium cumini in spontaneously hypertensive rats

Periódico: NUTRITION RESEARCH

ISSN: 0271-5317

FI: 2,585

QUALIS: B1 na área de Nutrição
(ANO-BASE 2013)

Elsevier Editorial System(tm) for Nutrition Research

Manuscript Draft

Manuscript Number: NR-15-177

Title: Antihypertensive effect of hydroalcoholic extract of lyophilized epicarp of *Syzygium cumini* in spontaneously hypertensive rats

Article Type: Research Article

Keywords: fruits, hypertension, polyphenols, SHR, vascular reactivity,

Corresponding Author: Ms. Suênia Maria do Nascimento, Master Student

Corresponding Author's Institution: Federal University of Paraíba

First Author: Suênia Maria do Nascimento, Master Student

Order of Authors: Suênia Maria do Nascimento, Master Student; Rayanne A Torres; Tays Amanda F Silva; Hassler C Calvacante; Ricardo C Ramalho; José George F Albuquerque; Fátima de Lourdes A Araújo; Thais P Ribeiro; Fábio S Souza; Islania Giselia A Gonçalves, Doctor; Isac A Medeiros; Robson C Veras, Doctor

Abstract: Regular intake of antioxidants compounds may contribute to impair the development of chronic diseases, like hypertension. *Syzygium cumini* L., has a high content of phytochemicals compounds, especially polyphenols. The study provides an evaluation of the hydroalcoholic extract of lyophilized epicarp of *S. cumini* L. (Sc-EpHE) on the cardiovascular system of normotensive and hypertensive rats. The sonication and double-lyophilization during Sc-EpHE production generate a rich polyphenol source (5440.86 mg GAE/100 g) with high antioxidant activity ($EC_{50} = 59 \mu\text{g/ml}$). The treatment with 300 mg/kg; v.o. for 6 weeks with spontaneously hypertensive rats (SHR) produce a significant reduction in MAP of 29.77 ± 8.12 mmHg of hypertensive animals and normalize the vasocontractile response to Phe (E_{max} reduction = $36.7 \pm 7.5\%$). Therefore, Sc-EpHE has a high polyphenol content and antioxidant activity, and oral administration of Sc-EpHE has antihypertensive activity for attenuating the vasocontractile response in SHR.

Title: Antihypertensive effect of hydroalcoholic extract of lyophilized epicarp of *Syzygium cumini* in spontaneously hypertensive rats

AUTHORS

Suênia Maria do Nascimento^{a*}, Rayanne de Araújo Torres^a, Tays Amanda Felisberto da Silva^b, Hassler Clementino Cavalcante^d, Ricardo Cartaxo Ramalho^c, José George F. Albuquerque^b, Fátima de Lourdes Assunção Araújo^b, Thaís Porto Ribeiro^b, Fábio Santos de Souza^b, Islânia Gisélia Albuquerque Gonçalves^b, Isac Almeida de Medeiros^b, Robson Cavalcante Veras^a

a Post-Graduate Program in Nutritional Sciences, Center for Health Sciences, Federal University of Paraíba (UFPB), Campus I, Castelo Branco, Joao Pessoa - Paraíba 58059-900, Brazil

b Post-Graduate Program in Natural and Synthetic Products Bioactive, Center for Health Sciences, Federal University of Paraíba (UFPB), Campus I, , Castelo Branco, Joao Pessoa - Paraíba 58059-900, Brazil

c Department of Pharmaceutical Sciences, Health Sciences Center, Federal University of Paraíba (UFPB), Campus I, , Castelo Branco, Joao Pessoa - Paraíba 58059-900, Brazil

d Department of Nutrition, Health Sciences Center, Federal University of Paraíba (UFPB), Campus I, Castelo Branco, Joao Pessoa - Paraíba 58059-900, Brazil

* Author correspondent:

Federal University of Paraíba - Campus I, 58059-900

Center for Health Sciences

Post-Graduate in Nutritional Sciences

Joao Pessoa, Paraíba, Brazil

Tel.: +55 (83) 3216-7417

E-mail: suenia_nutri@hotmail.com

List of Abbreviations

Sc-EpHE; Hydroalcoholic extract of lyophilized epicarp *S. cumini* L.

NCDs; Non-communicable chronic diseases

BMI; body mass index

ROS; reactive oxygen species

MAP; mean arterial pressure

SHR; spontaneously hypertensive rats

EMPASA; Paraibana Company Supply and Agricultural Services

HPLC – PDA; High performance liquid chromatograph with a photodiode array detector

DPPH; 2,2-b-picrylhydrazyl

WKY; Wistar-Kyoto rats

UFPB; Federal University of Paraiba

CEUA-CBiotec; Ethics Committee on the use of Biotechnology Center of Animals

E_{max}; maximal effect

HR; heart rate

Phe; phenylephrine

Ach; acetylcholine

SNP; sodium nitroprusside

VSMCs; vascular smooth muscle

NOX; NADPHoxidase

Ang. II; Angiotensin II

Abstract:

Regular intake of antioxidants compounds may contribute to impair the development of chronic diseases, like hypertension. *Syzygium cumini* L., has a high content of phytochemicals compounds, especially polyphenols. The study provides an evaluation of the hydroalcoholic extract of lyophilized epicarp of *S. cumini* L. (Sc-EpHE) on the cardiovascular system of normotensive and hypertensive rats. The sonication and double-lyophilization during Sc-EpHE production generate a rich polyphenol source (5440.86 mg GAE/100 g) with high antioxidant activity ($EC_{50} = 59 \mu\text{g/ml}$). The treatment with 300 mg/kg; v.o. for 6 weeks with spontaneously hypertensive rats (SHR) produce a significant reduction in MAP of 29.77 ± 8.12 mmHg of hypertensive animals and normalize the vasocontractile response to Phe (E_{max} reduction = $36.7 \pm 7.5\%$). Therefore, Sc-EpHE has a high polyphenol content and antioxidant activity, and oral administration of Sc-EpHE has antihypertensive activity for attenuating the vasocontractile response in SHR.

.Keywords: fruits, hypertension, polyphenols, SHR, vascular reactivity

1. INTRODUCTION

1. Non-communicable chronic diseases (NCDs) are the leading causes of deaths and
2. disabling morbidity worldwide. Data from the World Health Organization (1) estimate
3. that cardiovascular diseases accounting for 17.5 million deaths worldwide.
4. Epidemiological studies have shown the cardioprotective potential of diets rich in
5. fruits and vegetables. The antioxidant properties of these foods are strongly associated
6. with anti-inflammatory effects, lowering blood pressure, serum lipids, endothelial
7. dysfunction, blood glucose, body mass index (BMI) and waist circumference (2-4).

8. In general, due to the consumption and industrial processing of the edible parts of
9. fruit, fruit wastes are generated in large quantities in big cities, without proper use
10. One of the most beneficial approaches is to recover the bioactive constituents,
11. especially the phenolic compounds, making full use of them in the food,
12. pharmaceutical or cosmetics industry. Thus, utilization of the fruit wastes as sources
13. of bioactive compounds may be of considerable economic benefits and has become
14. increasingly attractive (5)

15. Phenolic compounds or polyphenols are secondary compounds of plant metabolism,
16. chemically characterized by the presence of an aromatic ring containing one or more
17. hydroxyl groups (6-9).

18. *Syzygium cumini* L. one Myrtaceae family member is an evergreen tree from India,

19. which has adapted to tropical climate and can be widely found in some parts of,
20. America including the northeast of Brazil, where is commonly known as jabolão, or
21. oliveira. In English country, its common name is jamun, jambul or indian blackberry
22. (10-12). Several studies reviewed by Srivastava & Chandra (12) showed that
23. *S. cumini* L. is known to have various pharmacological effects, including antidiabetic,
24. antioxidant, antihyperlipidaemic, antiulcer, hepatoprotective, antiallergic, anti
25. inflammatory, antiarthritic, antibacterial and radioprotective activities.

26. The leaves of *S. cumini* L. showed hypoglycemic activity (13), possibly due to the
27. ability to inhibit α amylase (14); and further reduced glucose levels in blood samples
28. of hyperglycemic patients (15) antihypertensive action in spontaneously hypertensive
29. rats (SHR) with 12-week-old (16).

30. The seeds of *S. cumini* L. also shown to be effective in the prevention and treatment of
31. diabetes in a rodent model (17) and were still able to inhibit reactive oxygen species
32. (ROS) production in cardiac myoblast (18).

33. The fruit of *S. cumini* L. has demonstrated antioxidant properties (19), presence of
34. malic acid, gallic acid and tanins as well as cyanidindiglycosides that generate its
35. purple color (12). Some therapeutic actions are liver stimulation, digestive,
36. carminative and hypoglycemic(20). Although many studies researching the
37. therapeutic properties of the fruit of *S. cumini* L has little knowledge about the effects

38. of fruit on the cardiovascular system. In this regard it is noted that Herculano et al
39. (2014) demonstrated that after 4 and 6 h acute oral administration (200 mg/kg) of
40. alcoholic extract of the fruit of *S. cumini* L. promoted reduction in mean arterial
41. pressure (MAP) in non-anesthetized SHR.

42. Furthermore, is very important identify the beneficiaries of *S. cumini* L. consumption,
43. mainly using the epicarp, one co-product negligencied in industrial production of
44. juices. In this way, the purpose of present study was to identify the content of total
45. polyphenolics compounds and antioxidant activity of the hydroalcoholic extract of
46. lyophilized epicarp of *S. cumini* L. and investigate the effect of repeated doses on
47. arterial pressure and vascular reativity of normotensive and SHR.

2. METODOLOGY

2.1 Preparation of the sample

48. The fruits of *S. cumini* L. were obtained in Paraibana Company Supply and
49. Agricultural Services (EMPASA) located in the city of João Pessoa – PB. The
50. fruit then went through a selection process of washing and sanitization in
51. accordance with current legislation – RDC n°216, September 15, 2004. The
52. epicarp (peel/skin) has been separated from the rest of the fruit and then subjected to

53. freeze drying under vacuum of 0.024 mbar and temperature of -40°C in the
54. lyophilizer Free Zone® Liter Benchtop Freeze Dry Systems (LABCONCO®) for
55. 24 h. After grinding the lyophilized product was passed in Tamis 0.35 mm thereby
56. obtaining a homogenate particle size. Then, the extraction was carried using as
57. solvent a mixture of ethanol-water (50:50) in ultrasson with frequency of 16 kHz,
58. 42 minutes at a rate of dry powder relative to the solvent volume of 5% (m: v) and
59. then filtered in vacuo filter paper and the remaining solvent extractor to extract
60. solubilized. To obtain the dry extract, extractive solution was rota-evaporated to 45°C.
61. Then the ethanol-free extract, named for this study hydroalcoholic extract of
62. lyophilized epicarp *S. cumini* L. (Sc-EpHE) was taken in a freezer freezing - 80 °C for
63. 24 hours, followed by lyophilization new 0.024 mbar for 24 hours, and the dry extract
64. obtained conserved at - 20 °C until use in experiments.

2.2 Determination of total phenolics

65. The total phenolics content was measured using the Folin-Ciocalteu reagent according
66. to Slinkard and Singleton (22) with changes, in spectrophotometer UV-Vis (Shimadzu
67. UV-63. 2550, Kyoto, Japão). The content of phenolic compounds was determined by
68. interpolating the absorbance measured at 760 nm, sample lines a calibration curve
69. constructed with gallic acid standards (from 0.001 to 0.020 mg/ml in ethanol) and
70. expressed as milligrams of equivalent gallic acid per hundred grams of the sample
71. (mg EAG/100 g).

2.3 Identification of phenolic compounds by high performance liquid chromatograph liquid with a photodiode array detector - HPLC - PDA

72. HPLC analyzes were performed on a high performance liquid chromatography liquid
73. in chromatograph Surveyor®, Thermo Scientific®, with automatic injector Thermo
74. Scientific Surveyor Autosampler Plus®, using a 250 × 4.6 mm Phenomenex
75. (Torrence, CA, USA) C18 Aqua column and monitored with a photodiode array
76. scanning device, ThermoScientific® PDA Plus. For chromatographic analysis, Sc
77. -EpHE concentration was 5 mg/mL in water and formic acid solution (99: 1), and the
78. standard was diluted with . MeOH/formic acid (9:1) at concentration 0,85 mg/mL.
79. HPLC-PDA analysis was performed using a gradient solvent system of 1% formic
80. acid (A) and acetonitrile (B) as follows: 90% to 75% A over 30 min; 75% to 40% A
81. 30 to 45 min at a flow rate of 1 ml/min (23). Results were monitored 210 to 600 nm.
82. Peak area of each compound quantified in the test samples was integrated from the
83. PDA-HPLC chromatogram at 254 nm using ChromQuest® software version 5.0.
84. Peak area was used to calculate the standard concentration in the sample.

2.4 Determination of antioxidant activity

85. Antioxidant activity was measured by the DPPH radical scavenging capacity of of Sc-
86. EpHE according to the methodology described by Brand-Williams, Cuvelier (24),

87. with some modifications Briefly, triplicate Sc-EpHE different concentrations (30, 50,
88. 70 and 100 ug/ml) were separately mixed with ethanol and 2,700 uL of DPPH. The
89. solution . was read at 517 nm after 30 minutes, 2550- Shimadzu model UV-UV-vis a
90. percentage. The results demonstrate the capacity of elimination of free radicals
91. corresponding to the amount of 2,2-b-picrylhydrazyl (DPPH) consumed by the
92. antioxidant. The readings were used to determine the percentage of antioxidant
93. activity AAT% and the EC₅₀ of Sc- EpHE through the equation obtained in the
94. straight.

2.5 Animals and ethics

95. In this study, we used SHR and Wistar-Kyoto rats (WKY) as the normotensive
96. control, weighing between 200 – 250 g and 10 week-old male, from the biotherium
97. Prof. George. Thomas, the Federal University of Paraíba (UFPB). The animals were
98. maintained conditions controlled temperature (21±1° C), light-dark cycle of 12 hours
99. (6-18 hours) and were given water and standard diet *ad libitum* (Purina®, São Paulo,
100. Brazil). The experimental protocols were approved by Ethics Committee on the use of
101. Biotechnology Center of Animals (CEUA-CBiotec) of Federal University of
102. Paraíba, under number 0906/13.

2.6 Experimental protocol

103. Male 10-week-old normotensive WKY and SHR were divided into the control groups
104. (VEHICLE) and groups treated with two doses of Sc-EpHE 150 mg/kg and 300
105. g/kg for 6 week (n= 12 each group). Sc-EpHE was dissolved in water and
106. administered by gavage, between 9 and 10 a.m. Saline (0,9%) was vehicle used
107. as control. For the treatment were used, only Sc-EpHE with phenolic content above
108. 5363.75 mg EAG/100 g, with the presence of gallic acid and antioxidant activity
109. minimum of 59 µg/ml. The volume administered by gavage was 5 mL, with adjust in
110. concentration of the solution relative to the weight of the animal. Body weight, water
111. intake and diet were monitored daily.

2.7 Organ weights

112. After euthanasia of animals, kidney, liver, heart were removed intact, washed and
113. placed under absorbent paper to remove excess nutrient solution and weighed (n = 6).
114. All organ weights were normalised relative to weight corporal.

2.8 Direct Measurement of Blood Pressure

115. The animals were subjected to overnight fasting, where they were deprived of food
116. for 12 hours (25) then anesthetized with a solution of ketamine and xylazine

117. (75 mg/kg ketamine 10 mg/kg xylazine ip). For the measurement of arterial blood
 118. pressure it was used a technique described previously by Machado et al (2014). Briefly,
 119. the lower abdominal aorta and inferior vena cava were cannulated via left femoral
 120. artery and vein using polyethylene catheters. Thereafter, catheters were filled with
 121. heparinized saline solution and tunneled under the skin to emerge between the
 122. scapulae. Arterial pressure was measured 24 h after surgery by connecting the arterial
 123. catheter to a pre-calibrated pressure transducer (MLT0380/AD Instruments, Australia)
 124. attached to a biological signal acquisition system (Mikro-tip Blood pressure system,
 125. AD Instruments, Australia) with an acquisition program (Lab Chart version 7.0, AD
 126. Instruments, Australia). The data were sampled at 2000 Hz. For each pulse pressure,
 127. the computer calculated MAP and heart rate (HR). The animal remained connected to
 128. the system for a minimum period of 30 minutes to stabilize the pressure signal. Then
 129. the record was held for 15 min, from which the scores of blood pressure of the animal
 130. levels.

2.9 Preparations of superior mesenteric artery isolated rat rings

131. After laparotomy, the superior mesenteric artery was removed and cleaned from
 132. connective tissue and fat. Isolated superior mesenteric artery rings (1–2 mm) were
 133. obtained and placed in physiological Tyrode's solution, maintained at 37 °C, gassed
 134. with carbogenic mixture (95% O₂ and 5% CO₂), and maintained at pH 7.4 (26). The
 135. rings were suspended to a force transducer (MLT020, AD Instruments, Australia),
 136. coupled to a data acquisition system (ML870 / P with Lab Chart version 7.0, AD

137. Instruments, Australia) for recording isometric tension. The preparations were
138. stabilized with a resting tension of 0.75 g for one hour. During stabilization period,
139. the solution was replaced every 15 min to prevent the accumulation of metabolites.

140. In all experimental protocols, after the 60 minute stabilization period, the viability of
141. the tissue and endothelial integrity was verified by a pre-contraction with
142. phenylephrine (Phe, 10 μ M), an agonist of α 1-adrenergic receptor (27). In tonic
143. contraction component of this was added a non-selective muscarinic receptor agonist,
144. acetylcholine (ACh, 10 μ M) in order to evaluate the responsiveness of the vascular
145. endothelium (28). Only was used rings without endothelium, rings with ACh-induced
146. relaxant effects less than 10% (29).

2.10 Evaluation of Sc-EpHE effect on vascular reactivity

147. Initially cumulative concentration–response curves were obtained for Phe (10^{-3} to 10
148. μ M) and in the tonic component, a concentration–response curves were obtained for
149. sodium nitroprusside (SNP) (10^{-3} to 10 μ M). The efficacy of vasoconstriction and
150. vasorelaxation of the drugs were evaluated using the values of $E_{\text{máx}}$.

2.11 Statistical Analysis

151. Values were expressed as mean $\pm$ S.E.M.. For the analysis of SHR and WKY
152. sub-groups we used ANOVA *one way* or *two way*, depending on the experimental
153. character, followed by Tukey's post-test to check for significant differences between
154. the groups GraphPad Prism® software, version 5.0 (GraphPad Software Inc., La Jolla,
155. CA, USA) was using for determination of difference statistical. The maximal
156. relaxation corresponds to the maximal effect ($E_{\max}$) of the highest concentration used.
157. $p < 0.05$ were considered statistically significant.

3. RESULTS

3.1 Characterization of Sc-EpHE

162. The average content of total polyphenolics was 5440.86 ± 77.10 mg GAE/100 g
163. sample. Doses used for treatment, 150 mg/kg and 300 mg/kg, offered a polyphenol
164. content of 8.16 and 16.32 mg GAE, respectively. Analysis for identification of
165. phenolic compounds present in Sc-EpHE by HPLC showed the presence of gallic
166. acid (peak 3) at a concentration of 67.35 mg/L in the sample (see Figure 1). The
167. result of the antioxidant activity was obtained by Sc-EpHE analysis at different
168. concentrations (30, 50, 70, 100 μ g/mL), which had 31.53; 49.26; 62.78 and 83.43% of
169. antioxidant activity, respectively. From these results, was obtained the EC_{50} value of
170. 59 μ g/mL of Sc-EpHE.

3.2 Weight of animals, weight of organs, water and food intake

171. Although it was observed weight gain over a six-week treatment in all animals in this
172. study, failed to show significant changes in weight between the groups. The weights
173. of organs of the animals after 6 weeks of treatment no differ between the groups. The
174. feed intake also showed no difference between groups. However, water intake was
175. significantly higher in SHR animals treated with the dose of 150 mg/kg during the
176. first 4 weeks of treatment. In the last two weeks, the water consumption was similar to
177. the rest of the groups (see Figure 2 and Table 1).

3.3 Hypotensive Effect Induced by Sc-EpHE

178. Mean arterial pressure (MAP) at the 16^a life in SHR VEHICLE (153.8 ± 5.0 mmHg)
179. was significantly higher than the normotensive WKY VEHICLE animals ($123.0 \pm$
180. 4.86 mmHg, $p < 0,05$). The treatment of SHR rats with the dose of 150 mg/kg had no
181. effect on MAP, but the treatment for 6 weeks with a dose 300 mg/kg was capable of
182. reduced the MAP (29.77 ± 8.12 mmHg, $p < 0,05$) when compared to the vehicle-treated
183. SHR. WKY animals treated with doses of 150 and 300 mg/kg not showed significant
184. difference of blood pressure when compared the vehicle (see Figure 3A and 3B). The
185. heart rate values were not different between any groups of WKY and SHR (see Figure

186. 3C and 3D).

3.4 Effect of treatment with Sc-EpHE on vascular reactivity

187. In mesenteric artery rings without endothelium of WKY and SHR rats, Phe (10^{-3} to 10
188. μ M) induced concentration-dependent contraction. The $E_{\max}$ was significantly higher
189. in SHR VEHICLE (153.4 ± 14.2 %, $n=12$) when compared with WKY VEHICLE
190. (100 ± 10.2 %, $n=12$, $p < 0.05$). The treatment with 150 mg/kg in SHR animals not
191. modified the $E_{\max}$ induced by Phe. However, the $E_{\max}$ of Phe in rings of SHR animals
192. treated with 300mg/kg (116.7 ± 6.7 %, $n=12$) returns to similar values when compared
193. to WKY VEHICLE (100.8 ± 10.2 %, $n=12$, $p > 0.05$). WKY animals treated with 150
194. mg/kg or 300mg/kg no showing significant difference between its $E_{\max}$
195. induced by Phe, when compared to WKY VEHICLE see figures 4 A, 4B and table 2.

196. SNP (10^{-3} to 10 μ M) induced concentration-dependent vasorelaxation, in superior
197. mesenteric artery rings isolated in rats pre-contracted with Phe in the absence of
198. functional endothelium, WKY ($E_{\max} = 100.0 \pm 4.7$ %, $n=12$) and SHR ($E_{\max} = 90.3 \pm 3.5$
199. %, $n=12$). In WKY and SHR, the treatment with 150 mg/kg not modified the $E_{\max}$
200. induced by SNP. However, the treatment with 300 mg/kg reduced the $E_{\max}$ induced by
201. SNP in WKY ($E_{\max} = 87.0 \pm 3.0$ %, $n=12$) and SHR ($E_{\max} = 82.2 \pm 3.7$ %, $n=12$) when
202. compared with WKY VEHICLE ($E_{\max} = 100.0 \pm 4.7$ %, $n=12$, $p < 0,05$) see figures 4 C,
203. 4D and table 3.

4. DISCUSSION

204. This study showed that the ingestion of Sc-EpHE with high content of phenolic totals
 205. and antioxidant activity had a significant benefic effect on arterial pressure and
 206. vascular reactivity of SHR when treated with repeated doses for 6 weeks. Animals
 207. treated with 300 mg/kg/day for 6 weeks showed the significant reduction of MAP and
 208. contractile response to Phe when compared with SHR control group and reaching
 209. levels similar to obtained with negative controls animals (WKY). These results
 210. demonstrate that Sc- EpHE is a natural alternative to restore the adrenergic sensibility
 211. and normalize the arterial pressure in SHR.

212. *Syzygium cumini* is known to several biological effects, but mainly directed to
 213. antidiabetes, antioxidant and antihyperlipidaemic (12). These effects are
 214. associated to presence of phenolic compounds and consequent reduction on
 215. stress oxidative. This plant shows a significant content of anthocyanins, isoquercetin,
 216. ellagic acid glycosides, kaempferol, myricetin, malic acid, oxalic acid, tannins and
 217. gallic acid (20) in general compounds with intrinsic antioxidant action, that justified
 218. the stress oxidation reduction.

219. Parts of *S. cumini* L. as seed (aqueous extract) (30) and leaf (aqueous extract)
 220. (31) showed a total polyphenolic content of 44.700 ± 150 and 14.300 ± 210

221. mg/EAG/100g, respectively. The methanolic extract of *S. cumini* L. fruit had
222. 185 ± 3.8 mg EAG/100g (32) and the hydroalcoholic extract of epicarp of *S.*
223. *cumini* L. had 2920 ± 195 mgEAG/100g (33). In the present study, the total
224. polyphenolics content obtained with Sc-EpHE was 5440.86 mg GAE/100g,
225. approximately 1.86 times higher than that found to Srikanta et al (2015).

226. Despite having numerous studies showing the phytochemical composition in the different
227. extracts, it is worth noting that amounts and the presence of each compound are
228. influenced in accordance to edaphic conditions and prudence is necessary when
229. compare these different studies with different climatic conditions. But these results
230. together showed the importance to explore the epicarp from *S. cumini* L., a co-product
231. so neglected for industrial juices process, both pharmacological context as well as
232. economic.

233. The scavenging power of DPPH radical method used to evaluate the antioxidant
234. capacity of the sample, the Sc-EpHE ($EC_{50} = 59$ μ g/mL) was superior to that obtained
235. by Shrikanta (2015) wherein the $EC_{50} = 410$ μ g/mL. Similarly, Benherlal and
236. Arumughan (34) and Aqil (10) when analyzing the antioxidant activity of pulp *S.*
237. *cumini*, obtained higher values EC_{50} (158 μ g/mL e 79-90 μ g/mL) found in the
238. present study, respectively.

239. The high total polyphenolic content and antioxidant activity of Sc-EpHE can be
240. attributed to the quality of the fruit used that have been rigorously selected and the

241. methodologies involved in extract production as the use of sonication and freeze-
242. drying techniques (35). The first increases the penetration of the solvent and the
243. release of intracellular material which provides a high content of total polyphenolic
244. compounds released (36), and second ensures a reduction of free water content in the
245. sample and thus provides greater stability not only favoring preservation, but the
246. antioxidant activity and in some cases the content of bioactive compounds (37).

247. In chromatographic analysis the extract showed the significant presence of gallic acid,
248. used as control in serial extract production. The extracts were used when gallic acid
249. quantity was about 67.35 µg/mL. Other phytochemical studies have identified the
250. presence of quinic acid and dihydroquercetin (38, 39). Phytochemical study by
251. Shrikanta, Kumar (33), analyzed the phytochemicals present in the epicarp, the pulp
252. and seed of *S. cumini*. L. and observed that among the major components of the
253. epicarp *S. cumini*, gallic acid showed higher concentration among the studied
254. phytochemicals, followed by (+) epicatechin. Patel and Goyal (40) demonstrated that
255. administration of gallic acid (25, 50, or 100 mg/kg) for 8 weeks prevented
256. hyperlipidemic, hypertension, bradycardia, structural alterations in cardiac tissue such
257. as increase in force of contraction, left ventricular and reduction metabolism glucose
258. Further, treatment also produced reduction in lipid peroxidation and increase in
259. antioxidant parameters in heart of diabetic rats.

260. Sc-EpHE was supplied at doses of 150 mg/kg and 300 mg/kg for 6 weeks to WKY
261. and SHR rats. During this period, the different groups showed no significant
262. difference in feed intake. However, it was observed a higher consumption of water for

263. the animals in the SHR 150 mg/kg compared to groups SHR VEHICLE and SHR 300
264. mg/kg.

265. During treatment, all groups obtained weight gain, but at end of the sixth week of
266. treatment was no significant difference the weight gain between the groups. Therefore
267. appears that treatment with Sc-EpHE had no influence on the normal growth pattern
268. of these animals. The weight of the organs (kidney, liver and heart) also no differ
269. statistical between the groups. Corroborating this study, data in literature related that
270. hydroalcoholic extract of leaves of *S. cumini* L. does not exert acute or chronic toxic
271. effects by oral administration (41) and both peel and fruit appear to offer protection to
272. rat of hepatocytes (42)

273. In relation to cardiovascular system, the treatment of SHR with 300mg/kg caused a
274. significant reduction of MAP when compared to SHR VEHICLE group, resembling
275. the blood pressure of normotensive (WKY VEHICLE) and demonstrating a
276. preventive effect on the blood pressure of SHR rats. Other studies have also
277. observed a reduction in MAP after acute and chronic ingestion of the extracts of
278. *S.cumini*. L. Herculano, da Costa (43) evaluated the acute effect of intake of
279. hydroalcoholic extract of the fruit of *S. cumini* L. in rats, where the intake of 200
280. mg/kg induced a reduction of 15% of PAM levels after 4 and 6 hours compared to the
281. group treated with salt, but the dose of 500mg/kg increased significantly the MAP at
282. the first hour after administration and not returning to baseline after 6 hours of
283. experiment. Ribeiro et al (16), analyzed the effect of oral-administration of 500 mg/kg

284. of leaves hydroalcoholic extract of *S. cumini* L. and showed a reduction of 25% and
285. 62% in PAM after 4 and 8 weeks of treatment in SHR, respectively. The preliminary
286. hypothesis is that the antihypertensive effect obtained by Sc-EpHE would be
287. associated with a reduction of systemic oxidant stress mainly due to its high content
288. of polyphenols and potent antioxidant activity, but additional studies are necessary to
289. confirm.

290. The vascular contractility is an important regulatory mechanism in the control of
291. arterial pressure. Scientific literature demonstrates that oxidative stress promotes the
292. impairment of modulating vascular tone. High ROS production leads to increased
293. production of vasoconstrictors substances contributing to the change in vascular tone
294. of characteristic hypertension (44). SHR animals exhibit an increase in contractile
295. response of vascular smooth muscle (VSMCs) by different factors (45-51).

296. Studies demonstrate that role of polyphenols in the blood pressure mechanisms can be
297. attributed, among other factors: decreased expression of NADPHoxidase (NOX)
298. (a major source of superoxide anion), reduction of Ang.II activity (strong activator of
299. NOX), reduction the vascular oxidative stress and improvement the functioning of
300. VSMCs and decrease the vasoconstriction and inflammatory response (52).

301. In our study, arteries from hypertensive animals treated with 300mg/kg of Sc-EpHE,
302. every day during 6 weeks, demonstrated a similar contractile efficacy induced by Phe

303. when compared to arteries from normotensive rats. The response observed was
304. significantly less than hypertensive rats treated with placebo (saline).
305. Ribeiro et al (16) demonstrated that a treatment with hydroalcoholic extract from
306. leaves (500mg/kg) of *S. cumini* L. for 8 weeks produce a reduction in the response to
307. norepinephrine. Our results suggest that Sc-EPHE has constituents which modify the
308. responsiveness of the VSMC by still unknown mechanism and is associated with
309. reduction of MAP.

310. In accordance with other studies with polyphenols and vasoactivity
311. (53, 54), NPS exhibit reduced relaxation in hypertensive rats compared to
312. normotensive rats and the treatment with Sc-EpHE not produce ameliorate in vascular
313. response. Although the results show a decrease of the relaxation capacity, blood
314. pressure levels were significantly reduced with treatment. Therefore we suggest that
315. the reduction in MAP is not associated with the vasorelaxant capacity, but other
316. mechanisms that need to be investigated

317. In summary, in this study emphasizes its antioxidant potential and beneficial action
318. on cardiovascular system of *S. cumini* L. and demonstrating another way for process
319. of exploitation of the epicarp with high antioxidant capacity. This is one neglected
320. co-product, eliminated by industry and that can be availed in pharmaceutical,
321. nutritional areas due to its high potential therapeutic.

5. CONCLUSION

319. Sc-EpHE demonstrated that epicarp is a part of fruit with elevated content total
320. polyphenolics, mainly gallic acid and possess high antioxidant activity. The treatment
321. for 6 weeks with 300 mg/kg/day the extract reduce blood pressure in spontaneously
322. hypertensive rats with attenuation of the contractile response, with obtained values
323. similar to normotensive animals. These results provide data that aggregates
324. nutraceutical and pharmacological importance to epicarp of *S. cumini* L. at
325. therapeutical the hypertension and for studies futures aimed the mechanisms
326. understanding involved in reduced blood pressure and contractile response from
327. epicarp *S. cumini* L. And then finally result in new sources the prevention and
328. treatment de NCDs.

6. ACKNOWLEDGMENTS

329. The authors thank the Brazilian funding agencies CAPES and CNPq for financial
support and Federal University of Paraíba.

7. REFERENCIAS

- [1]. World Health Organization. Global status report on noncommunicable diseases 2014. Geneva 2014. 302 p.
- [2]. Willett WC, Sacks F, Trichopoulos A, Drescher G, Ferro-Luzzi A, Helsing E, et al. Mediterranean diet pyramid: a cultural model for healthy eating. *The American journal of clinical nutrition*. 1995;61(6):1402S-6S.
- [3]. Widmer RJ, Flammer AJ, Lerman LO, Lerman A. "The Mediterranean Diet, its Components, and Cardiovascular Disease". *The American journal of medicine*. 2014 Oct 15. PubMed PMID: 25447615. Epub 2014/12/03. Eng.
- [4]. Eilat-Adar S, Sinai T, Yosefy C, Henkin Y. Nutritional recommendations for cardiovascular disease prevention. *Nutrients*. 2013 Sep;5(9):3646-83. PubMed PMID: 24067391. Pubmed Central PMCID: PMC3798927. Epub 2013/09/27. eng.
- [5]. Deng GF, Shen C, Xu XR, Kuang RD, Guo YJ, Zeng LS, et al. Potential of fruit wastes as natural resources of bioactive compounds. *International journal of molecular sciences*. 2012;13(7):8308-23. PubMed PMID: 22942704. Pubmed Central PMCID: 3430235.
- [6]. Harborne JB. *The Flavonoids Advances in Research Since 1986*: Taylor & Francis; 1993.
- [7]. Sousa MSB, Morais LV, Lima Ad. Fenólicos totais e capacidade antioxidante in vitro de resíduos de polpas de frutas tropicais. *Brazilian Journal of Food Technology*. 2011;14(03):202-10.
- [8]. Martínez- Valverde I, Periago MJ, Ros G. Significado nutricional de los compuestos fenólicos de la dieta. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*. 2000;50:5-18.
- [9]. Lee S-J, Umano K, Shibamoto T, Lee K-G. Identification of volatile components in basil (*Ocimum basilicum* L.) and thyme leaves (*Thymus vulgaris* L.) and their antioxidant properties. *Food Chemistry*. 2005 6//;91(1):131-7.
- [10]. Aqil F, Gupta A, Munagala R, Jeyabalan J, Kausar H, Sharma RJ, et al. Antioxidant and antiproliferative activities of anthocyanin/ellagitannin-enriched extracts from *Syzygium cumini* L. (Jamun, the Indian Blackberry). *Nutrition and cancer*. 2012 Apr;64(3):428-38. PubMed PMID: 22420901. Pubmed Central PMCID: 3351850.
- [11]. Sharma AK, Bharti S, Kumar R, Krishnamurthy B, Bhatia J, Kumari S, et al. *Syzygium cumini* Ameliorates Insulin Resistance and α -Cell Dysfunction via Modulation of PPAR γ , Dyslipidemia, Oxidative Stress, and TNF- α in Type 2 Diabetic Rats. *Journal of Pharmacological Sciences*. 2012;119(3):205-13.
- [12]. Srivastava S, Chandra D. Pharmacological potentials of *Syzygium cumini*: a review. *Journal of the science of food and agriculture*. 2013 Jul;93(9):2084-93. PubMed PMID: 23460190.
- [13]. França LM. Avaliação pré-clínica de *Syzygium cumini* (L.) Skeels no tratamento da obesidade e dislipidemia: UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO; 2010.
- [14]. Bhat M, Zinjarde SS, Bhargava SY, Kumar AR, Joshi BN. Antidiabetic Indian plants: a good source of potent amylase inhibitors. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2011;2011:810207. PubMed PMID: 18955350. Pubmed Central PMCID: PMC3137644. Epub 2008/10/29. eng.
- [15]. Bopp A, De Bona KS, Belle LP, Moresco RN, Moretto MB. *Syzygium cumini* inhibits adenosine deaminase activity and reduces glucose levels in hyperglycemic patients. *Fundamental & clinical pharmacology*. 2009 Aug;23(4):501-7. PubMed PMID: 19709327.

- [16]. Ribeiro RM, Pinheiro Neto VF, Ribeiro KS, Vieira DA, Abreu IC, Silva SdN, et al. Antihypertensive Effect of *Syzygium cumini* in Spontaneously Hypertensive Rats. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. 2014;2014.
- [17]. Sharma B, Balomajumder C, Roy P. Hypoglycemic and hypolipidemic effects of flavonoid rich extract from *Eugenia jambolana* seeds on streptozotocin induced diabetic rats. Food and Chemical Toxicology. 2008 Jul;46(7):2376-83. PubMed PMID: 18474411. Epub 2008/05/14. eng.
- [18]. Atale N, Chakraborty M, Mohanty S, Bhattacharya S, Nigam D, Sharma M, et al. Cardioprotective role of *Syzygium cumini* against glucose-induced oxidative stress in H9C2 cardiac myocytes. Cardiovascular toxicology. 2013 Sep;13(3):278-89. PubMed PMID: 23512199.
- [19]. Mohamed AA, Ali SI, El-Baz FK. Antioxidant and antibacterial activities of crude extracts and essential oils of *Syzygium cumini* leaves. PloS one. 2013;8(4):e60269. PubMed PMID: 23593183. Pubmed Central PMCID: 3625181.
- [20]. Ayyanar M, Subash-Babu P. *Syzygium cumini* (L.) Skeels: A review of its phytochemical constituents and traditional uses. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine. 2012;240-6.
- [21]. RDC N° 216 de 15 de setembro de 2004, (2004).
- [22]. Slinkard K, Singleton VL. Total Phenol Analysis: Automation and Comparison with Manual Methods. American Journal of Enology and Viticulture. 1977 January 1, 1977;28(1):49-55.
- [23]. Reynertson KA, Yang H, Jiang B, Basile MJ, Kennelly EJ. Quantitative analysis of antiradical phenolic constituents from fourteen edible Myrtaceae fruits. Food Chem. 2008 Aug 15;109(4):883-90. PubMed PMID: 21340048. Pubmed Central PMCID: 3040238.
- [24]. Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. LWT - Food Science and Technology. 1995 //;28(1):25-30.
- [25]. Panchal SK, Poudyal H, Iyer A, Nazer R, Alam A, Diwan V, et al. High-carbohydrate high-fat diet-induced metabolic syndrome and cardiovascular remodeling in rats. Journal of cardiovascular pharmacology. 2011 Jan;57(1):51-64. PubMed PMID: 20966763. Epub 2010/10/23. eng.
- [26]. Machado NT, Maciel PM, Alustau MC, Queiroz TM, Furtado FF, Assis VL, et al. Nitric oxide as a target for the hypotensive and vasorelaxing effects induced by (Z)-ethyl 12-nitrooxy-octadec-9-enoate in rats. European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences. 2014 Jun 22;62c:317-25. PubMed PMID: 24964291. Epub 2014/06/26. Eng.
- [27]. Buscher R, Herrmann V, Ring KM, Kailasam MT, O'Connor DT, Parmer RJ, et al. Variability in phenylephrine response and essential hypertension: a search for human alpha(1B)-adrenergic receptor polymorphisms. The Journal of pharmacology and experimental therapeutics. 1999 Nov;291(2):793-8. PubMed PMID: 10525102. Epub 1999/10/19. eng.
- [28]. Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. Nature. 1980 Nov 27;288(5789):373-6. PubMed PMID: 6253831. Epub 1980/11/27. eng.
- [29]. Veras RC, Rodrigues KG, Alustau MdC, Araújo IGA, de Barros ALB, Alves RJ, et al. Participation of Nitric Oxide Pathway in the Relaxation Response Induced by E-cinnamaldehyde Oxime in Superior Mesenteric Artery Isolated From Rats. Journal of Cardiovascular Pharmacology. 2013;62(1):58-66 10.1097/FJC.0b013e31829013ff.
- [30]. Peixoto MPG, Freitas LAP. Spray-dried extracts from *Syzygium cumini* seeds: physicochemical and biological evaluation. Revista Brasileira de Farmacognosia. 2013;23(1):145-52.

- [31]. Eshwarappa RS, Iyer RS, Subbaramaiah SR, Richard SA, Dhananjaya BL. Antioxidant activity of *Syzygium cumini* leaf gall extracts. *BioImpacts* : BI. 2014;4(2):101-7. PubMed PMID: 25035854. Pubmed Central PMCID: 4097971.
- [32]. Rufino MdSM, Alves RE, de Brito ES, Pérez-Jiménez J, Saura-Calixto F, Mancini-Filho J. Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. *Food Chemistry*. 2010;121(4):996-1002.
- [33]. Shrikanta A, Kumar A, Govindaswamy V. Resveratrol content and antioxidant properties of underutilized fruits. *J Food Sci Technol*. 2015 2015/01/01;52(1):383-90. English.
- [34]. Benherlal PS, Arumughan C. Chemical composition and in vitro antioxidant studies on *Syzygium cumini* fruit. *Journal of the science of food and agriculture*. 2007 Nov;87(14):2560-9. PubMed PMID: 20836162.
- [35]. Liu FF, Ang CYW, Springer D. Optimization of Extraction Conditions for Active Components in *Hypericum perforatum* Using Response Surface Methodology. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2000 2000/08/01;48(8):3364-71.
- [36]. Prasad KN, Yang B, Zhao M, Wei X, Jiang Y, Chen F. High pressure extraction of corilagin from longan (*Dimocarpus longan* Lour.) fruit pericarp. *Sep Purif Technol*. 2009 11/19;70(1):41-5.
- [37]. Dorta E, Lobo MG, González M. Using drying treatments to stabilise mango peel and seed: Effect on antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*. 2012 3//;45(2):261-8.
- [38]. Maran JP, Priya B, Manikandan S. Modeling and optimization of supercritical fluid extraction of anthocyanin and phenolic compounds from *Syzygium cumini* fruit pulp. *Journal of Food Science Technology*. 2014 Sep;51(9):1938-46. PubMed PMID: 25190849. Pubmed Central PMCID: 4152520.
- [39]. Faria AF, Marques MC, Mercadante AZ. Identification of bioactive compounds from jambolão (*Syzygium cumini*) and antioxidant capacity evaluation in different pH conditions. *Food Chemistry*. 2011;126(4):1571-8.
- [40]. Patel SS, Goyal RK. Cardioprotective effects of gallic acid in diabetes-induced myocardial dysfunction in rats. *Pharmacognosy research*. 2011 Oct;3(4):239-45. PubMed PMID: 22224046. Pubmed Central PMCID: 3249782.
- [41]. Silva SdN, Abreu IC, Silva GFC, Ribeiro RM, Lopes AdS, Cartágenes MdSdS, et al. The toxicity evaluation of *Syzygium cumini* leaves in rodents. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 2012;22:102-8.
- [42]. Veigas JM, Shrivasthava R, Neelwarne B. Efficient amelioration of carbon tetrachloride induced toxicity in isolated rat hepatocytes by *Syzygium cumini* Skeels extract. *Toxicology in Vitro*. 2008 9//;22(6):1440-6.
- [43]. Herculano E, da Costa C, Rodrigues A, Araújo-Júnior JX, Santana E, França PH, et al. Evaluation of cardiovascular effects of edible fruits of *Syzygium cumini* Myrtaceae (L) skeels in rats. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. 2014;13(11):1853-61.
- [44]. Rodrigo R, Libuy M, Feliu F, Hasson D. Polyphenols in disease: from diet to supplements. *Current pharmaceutical biotechnology*. 2014;15(4):304-17. PubMed PMID: 25312616. Epub 2014/10/15. eng.
- [45]. Behuliak M, Pintérová M, Bencze M, Petrová M, Lišková S, Karen P, et al. Ca²⁺ sensitization and Ca²⁺ entry in the control of blood pressure and adrenergic vasoconstriction in conscious Wistar–Kyoto and spontaneously hypertensive rats. *Journal of hypertension*. 2013;31(10):2025-35.
- [46]. Zicha J, Behuliak M, Pintérová M, Bencze M, Kuneš J, Vaněčková I. The interaction of calcium entry and calcium sensitization in the control of vascular tone and blood pressure of normotensive and hypertensive rats. 2014.

- [47]. Khalil RA. Protein Kinase C Inhibitors as Modulators of Vascular Function and their Application in Vascular Disease. *Pharmaceuticals*. 2013;6(3):407-39. PubMed PMID: 23580870. Pubmed Central PMCID: 3619439.
- [48]. Touyz RM. Reactive oxygen species, vascular oxidative stress, and redox signaling in hypertension: what is the clinical significance? *Hypertension*. 2004 Sep;44(3):248-52. PubMed PMID: 15262903.
- [49]. Pollman MJ, Yamada T, Horiuchi M, Gibbons GH. Vasoactive substances regulate vascular smooth muscle cell apoptosis. Countervailing influences of nitric oxide and angiotensin II. *Circulation research*. 1996 Oct;79(4):748-56. PubMed PMID: 8831498. Epub 1996/10/01. eng.
- [50]. Vasconcelos SML, Goulart MOF, Gomes ACM, Silva MAMd. Hipótese oxidativa da hipertensão arterial: uma minirrevisão. *Revista Brasileira de Hipertensão*. 2007;14(4):269-74,.
- [51]. Kyotani Y, Zhao J, Tomita S, Nakayama H, Isosaki M, Uno M, et al. Olmesartan inhibits angiotensin II-Induced migration of vascular smooth muscle cells through Src and mitogen-activated protein kinase pathways. *Journal of Pharmacological Sciences*. 2010;113(2):161-8. PubMed PMID: 20508392. Epub 2010/05/29. eng.
- [52]. Andriantsitohaina R, Auger C, Chataigneau T, Etienne-Selloum N, Li H, Martinez MC, et al. Molecular mechanisms of the cardiovascular protective effects of polyphenols. *The British journal of nutrition*. 2012 Nov 14;108(9):1532-49. PubMed PMID: 22935143.
- [53]. Balis P, Puzserova A, Slezak P, Sestakova N, Pechanova O, Bernatova I. Short-term administration of alibernet red wine extract failed to affect blood pressure and to improve endothelial function in young normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Physiological Research* 2013 Dec 20;62(6):631-41. PubMed PMID: 23869886. Epub 2013/07/23. eng.
- [54]. Galleano M, Bernatova I, Puzserova A, Balis P, Sestakova N, Pechanova O, et al. (-)-Epicatechin reduces blood pressure and improves vasorelaxation in spontaneously hypertensive rats by NO-mediated mechanism. *IUBMB life*. 2013 Aug;65(8):710-5. PubMed PMID: 23847022.

Subtitles of figures and tables

Figure 1- HPLC-PDA chromatograms effect of hydroalcoholic extract of lyophilized epicarp of *Syzygium cumini* L. (3) – galic acid

Figure 2 – Evolution of weight gain in the treatment group to the WKY VEHICLE, WKY 150 mg/kg, WKY 300 mg/kg, SHR VEHICLE, SHR 150 mg/kg and SHR 300 mg/kg (n = 12). Analysis of the final weight after 6 weeks of treatment with Sc-EpHE (mean ± sem).

Table 1 – Evolution weekly water and food intake in the WKY VEHICLE, WKY 150 mg/kg, WKY 300 mg/kg, SHR VEHICLE, SHR 150 mg/kg and SHR 300 mg/kg (n = 12) groups for 6 weeks treatment with Sc-EpHE (mean ± sem). Statistical difference assessed by *twoway* ANOVA: * P <0.05 indicates a significant difference versus SHR VEHICLE; # P <0.05 indicates a significant difference versus SHR 300mg/kg.

Figure 3 – Representative bars of mean arterial pressure (MAP) (A). MAP normalized by the WKY VEHICLE group (B), heart rate (HR) (C); HR normalized by the WKY VEHICLE group (D) WKY and SHR treated for 6 weeks with vehicle, 150 mg/kg and 300 mg/kg Sc-EpHE (mean ± sem). Statistical difference assessed by *twoway* ANOVA: * P <0.05 indicates a significant difference versus SHR VEHICLE.

Figure 4 – (A) Concentration-response curve to phenylephrine (Phe) (10^{-9} - 10^{-5} M) mesenteric artery rings without endothelium of WKY rats treated with vehicle or Sc-EpHE; (B) concentration-response curve to Phe in mesenteric artery rings without endothelium of groups (WKY VEHICLE; SHR VEHICLE; SHR 150 mg/kg and SHR 300 mg/kg); (C) concentration-response curve for sodium nitroprusside (SNP) (10^{-9} - 10^{-5} M) in mesenteric

artery rings without endothelium pre-contracted with Phe (10 μ M) of the vehicle-treated WKY and Sc-EpHE ; (D) concentration-response curves to SNP in mesenteric artery rings without endothelium pre-contracted with Phe (10 μ M) of groups (WKY VEHICLE ; SHR VEHICLE, SHR 150 mg/kg and SHR 300 mg/kg). Results are expressed as mean $\pm$ standard error of the mean. Statistical difference assessed by one-way ANOVA: * P <0.05 indicates a significant difference versus WKY VEHICLE; or two-way ANOVA: # P <0.05 indicates a significant difference versus SHR VEHICLE

Figure 1

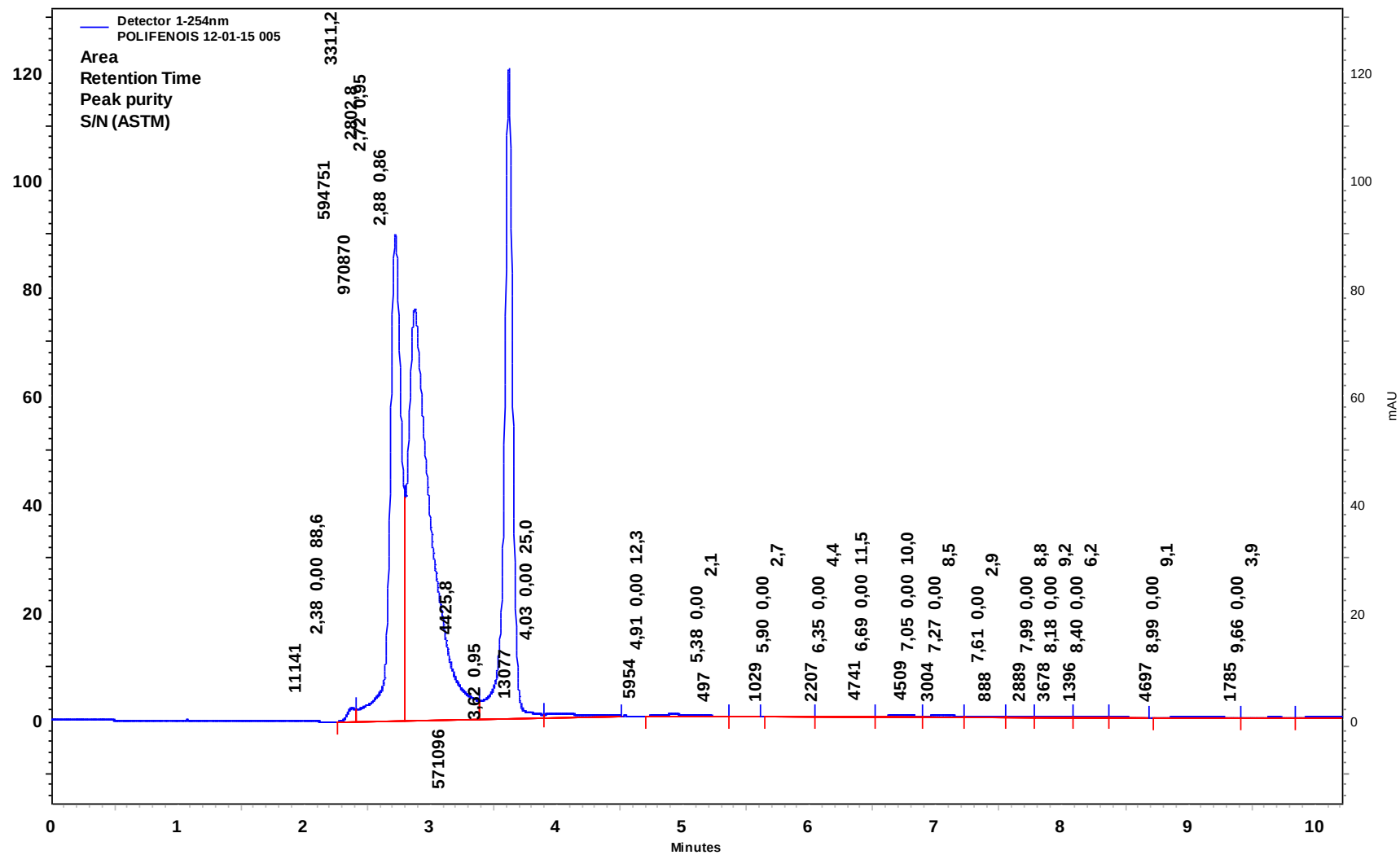


Figure 2

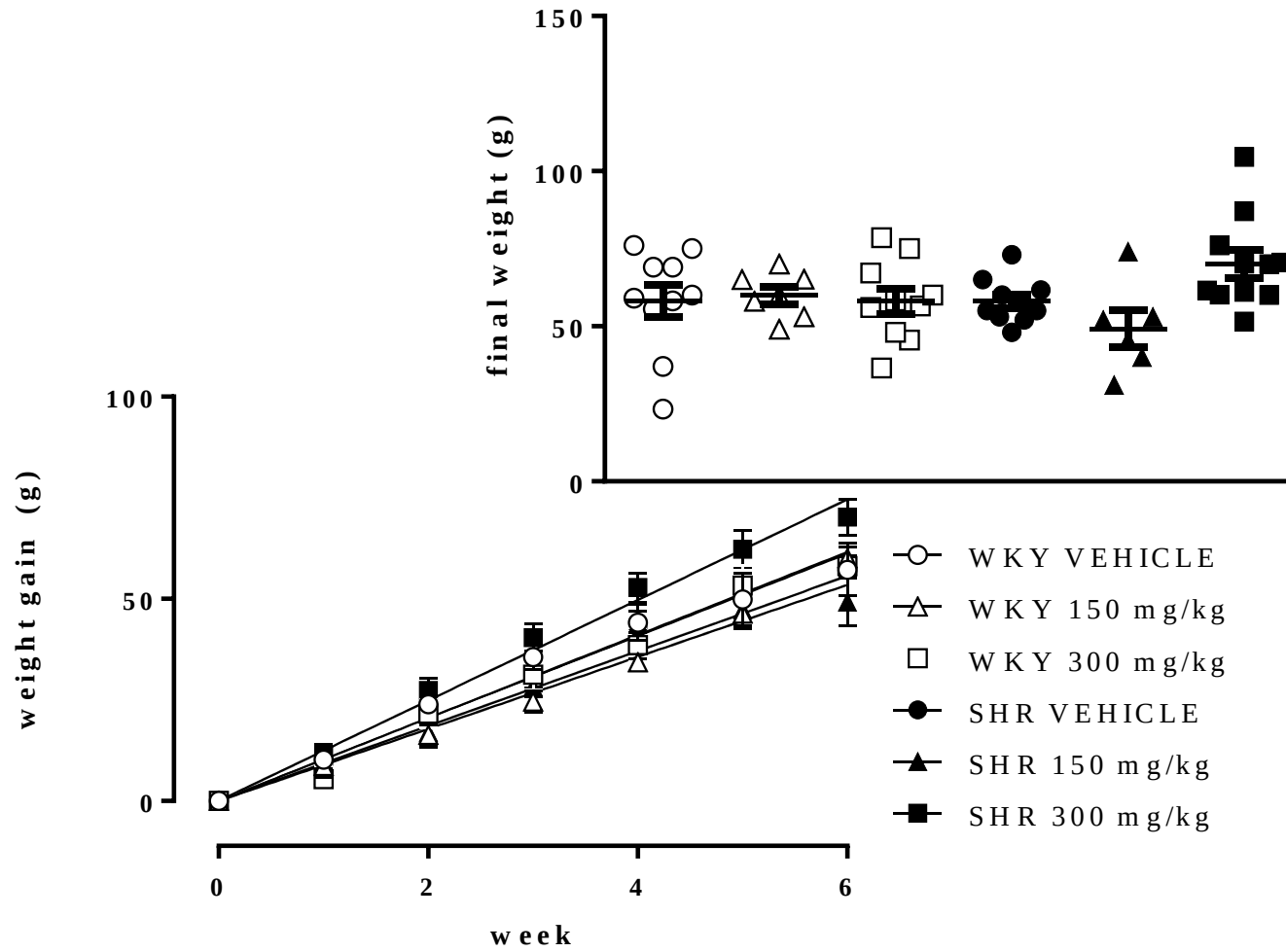


Table 1

	WEEK 01		WEEK 02		WEEK 03		WEEK 04		WEEK 05		WEEK 06	
	WATER (mL)	FOOD (g)	WATER (mL)	FOOD (g)	WATER (mL)	FOOD (g)	WATER (mL)	FOOD (g)	WATER (mL)	FOOD (g)	WATER (mL)	FOOD (g)
WKY	30,72 ±	27,29 ±	29,76 ±	26,61 ±	29,15 ±	25,26 ±	28,14 ±	25,51 ±	28,71 ±	25,36 ±	32,00 ±	27,14 ±
VEHICLE	2,29	3,09	2,05	2,31	1,91	2,04	1,30	2,39	2,55	2,01	3,18	2,24
WKY	31,49 ±	21,05 ±	32,81 ±	19,55 ±	29,86 ±	18,25 ±	29,40 ±	19,46 ±	33,44 ±	19,69 ±	32,42 ±	19,02 ±
150 mg/kg	0,66	0,69	0,53	0,36	1,12	0,44	1,89	0,33	0,93	0,38	1,61	0,43
WKY	33,57 ±	32,31 ±	30,20 ±	29,13 ±	29,61 ±	28,48 ±	28,58 ±	24,90 ±	27,23 ±	27,59 ±	29,05 ±	27,01 ±
300 mg/kg	3,34	3,42	2,18	2,94	2,09	4,16	2,00	2,53	1,84	3,94	2,03	3,67
SHR	26,52 ±	26,89 ±	25,52 ±	24,09 ±	25,05 ±	26,94 ±	26,33 ±	27,26 ±	26,69 ±	27,84 ±	28,51 ±	28,15 ±
VEHICLE	1,10	2,56	0,75	2,11	1,27	3,02	1,59	2,95	2,57	2,95	2,67	2,95
SHR	41,00 ±	23,09 ±	36,64 ±	21,99 ±	34,08 ±	20,70 ±	35,79 ±	21,23 ±	33,98 ±	20,35 ±	33,96 ±	21,68 ±
150 mg/kg	3,17* [#]	1,43	0,94*	0,54	0,32* [#]	0,56	1,26* [#]	0,70	1,54	0,79	1,73	0,79
SHR	25,93 ±	28,12 ±	25,28 ±	27,29 ±	25,47 ±	29,91 ±	25,63 ±	28,46 ±	25,26 ±	28,14 ±	24,93 ±	27,83 ±
300 mg/kg	1,62	2,25	1,73	1,72	1,69	2,47	1,95	2,81	2,33	1,80	1,97	2,10

Figure 3A and 3B

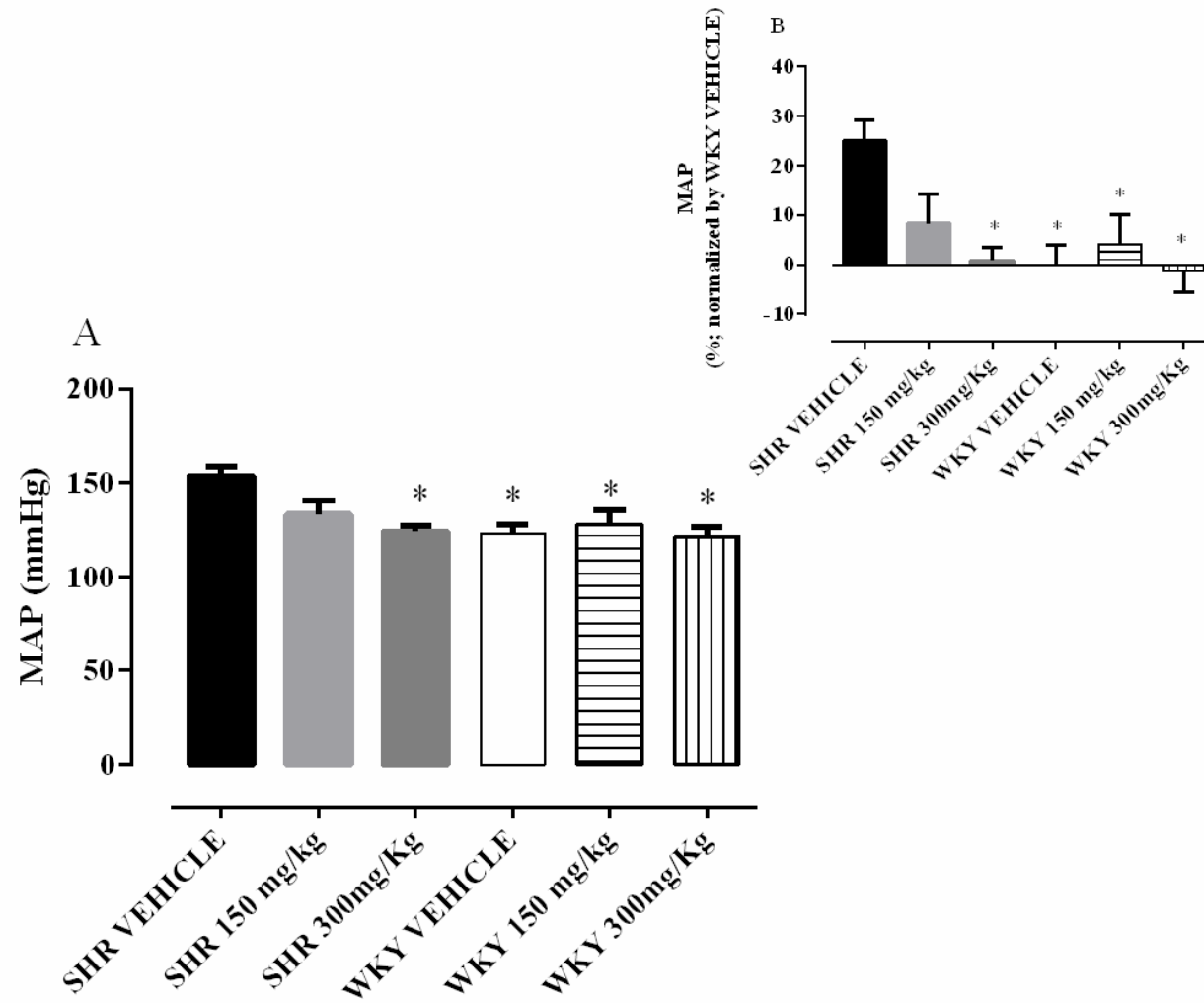


Figure 3C and 3D

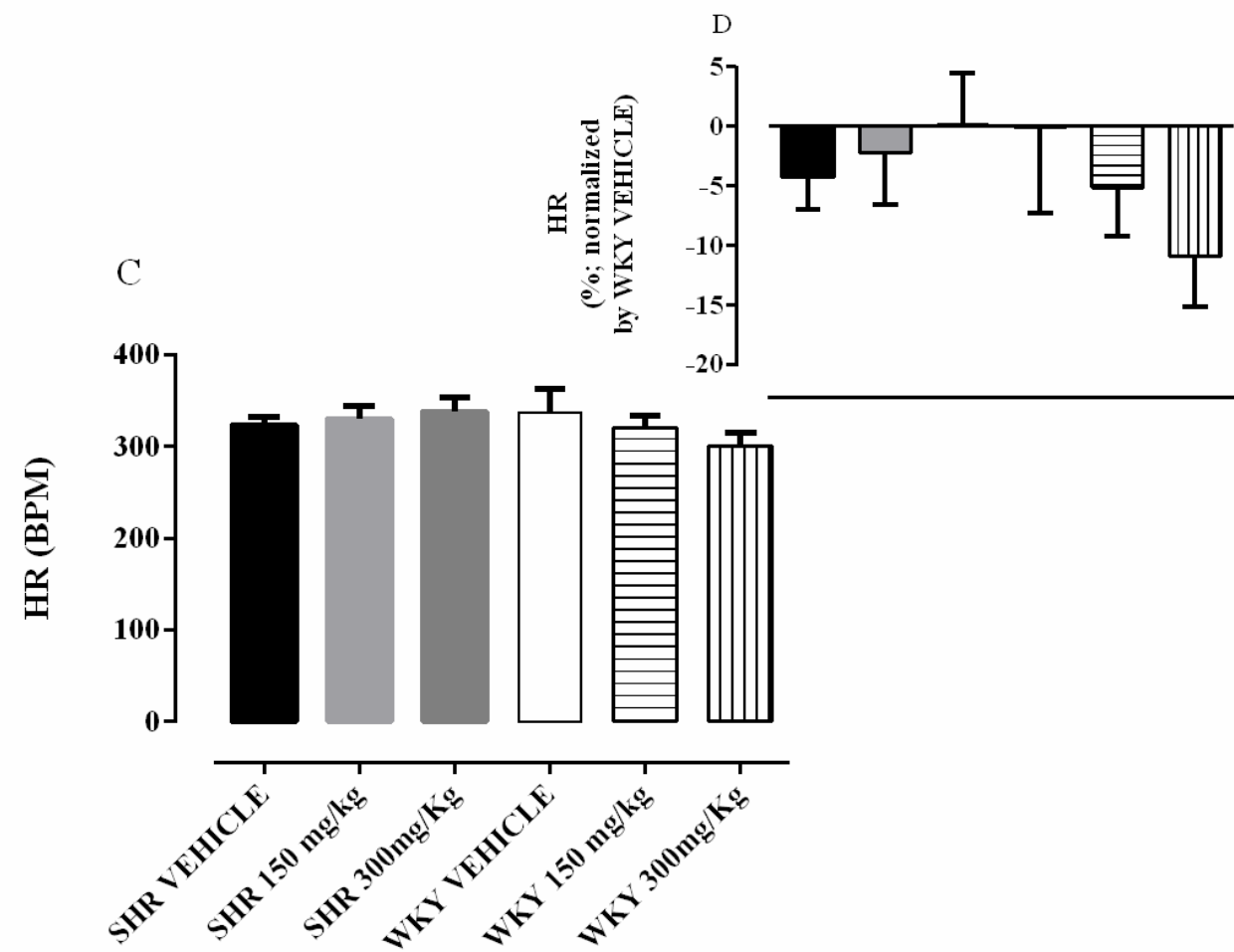


Figure 4 A

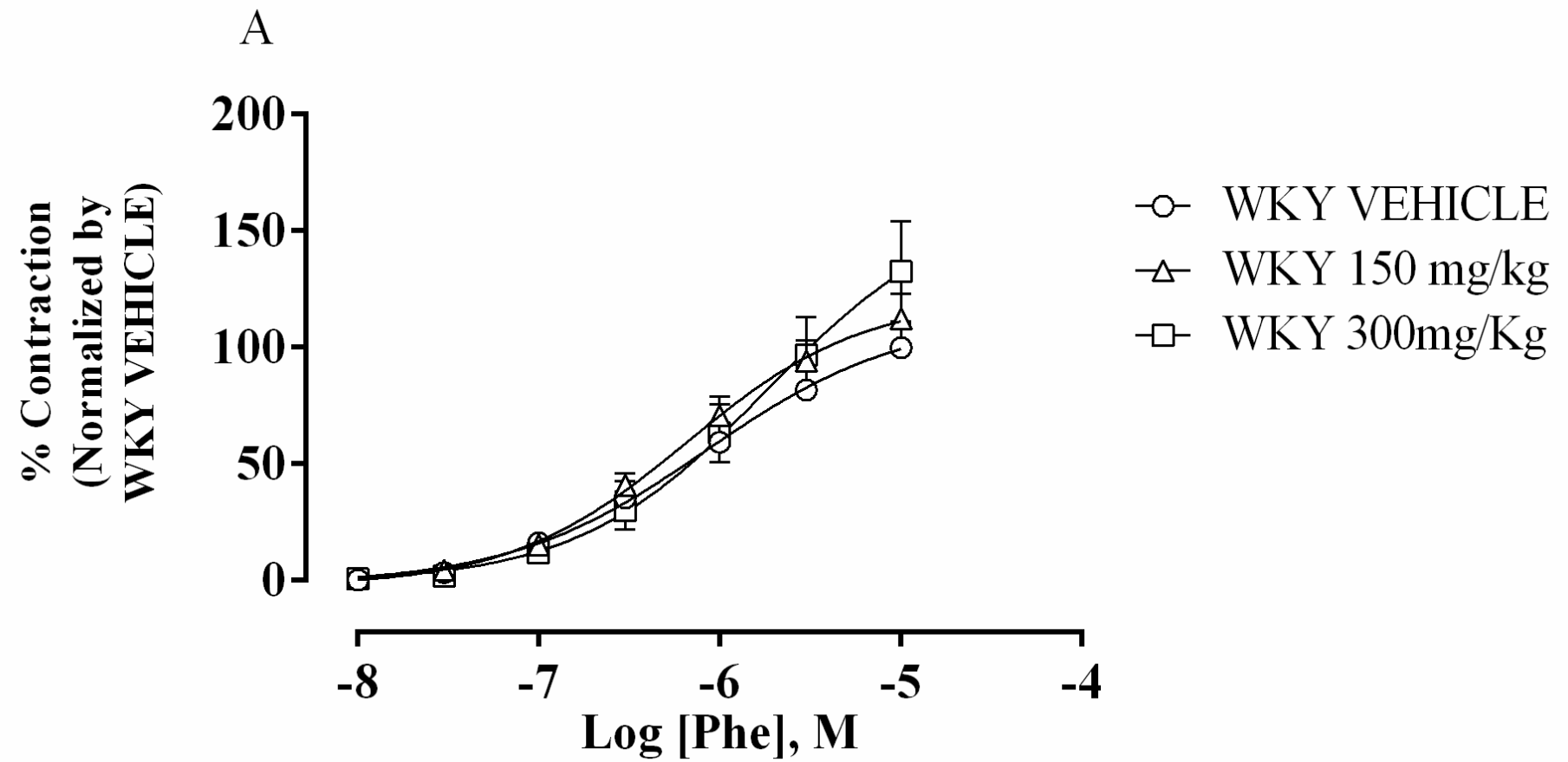


Figure 4 B

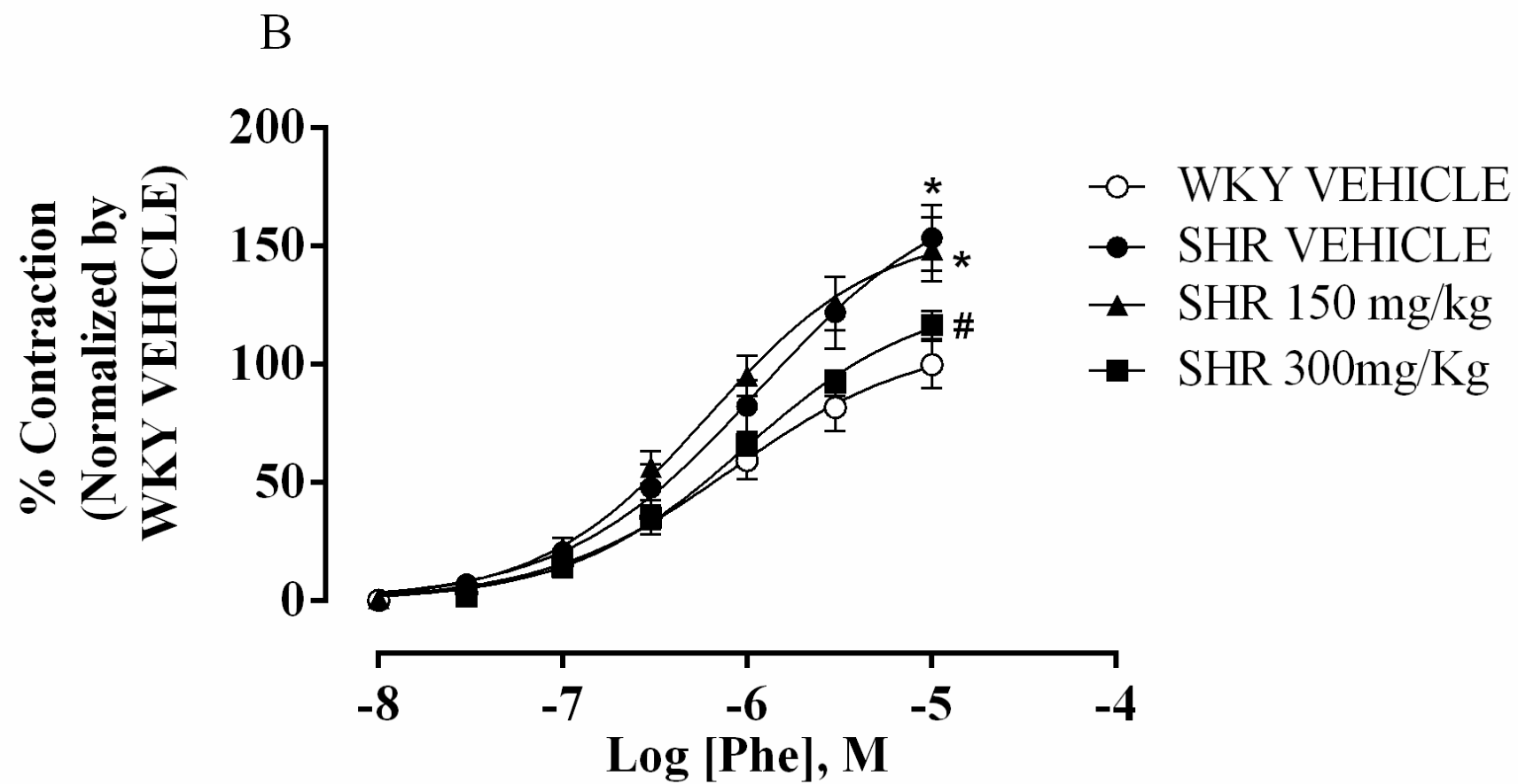


Table 2: Effects of Sc-EpHE treatment on maximum effect (Emax) to phenylephrine

Groups	Emax $\pm$ epm	N
WKY – VEHICLE	100,0 $\pm$ 10,2	12
WKY – 150mg/kg	112,0 $\pm$ 10,6	12
WKY – 300mg/kg	132,5 $\pm$ 21,0	12
SHR – VEHICLE	153,4 $\pm$ 14,0*	12
SHR – 150mg/kg	148,6 $\pm$ 13,6*	12
SHR – 300mg/kg	116,7 $\pm$ 6,0 [#]	12

Parameters of maximum effect (Emax) of the concentration-response curves to phenylephrine in mesenteric arteries (WKY VEHICLE, WKY 150 mg/kg e WKY 300 mg/kg SHR VEHICLE, SHR 150 mg/kg e SHR 300 mg/kg). Results are expressed as mean $\pm$ SEM. Emax, maximum effect (expressed as a percentage of maximal response induced by 10 μ M of Phe). ANOVA one-way test: *P <0,05 compared to the corresponding com WKY VEHICLE; ANOVA two-way test: [#]P <0,05 compared to the corresponding com SHR VEHICLE.

Figure 4 C

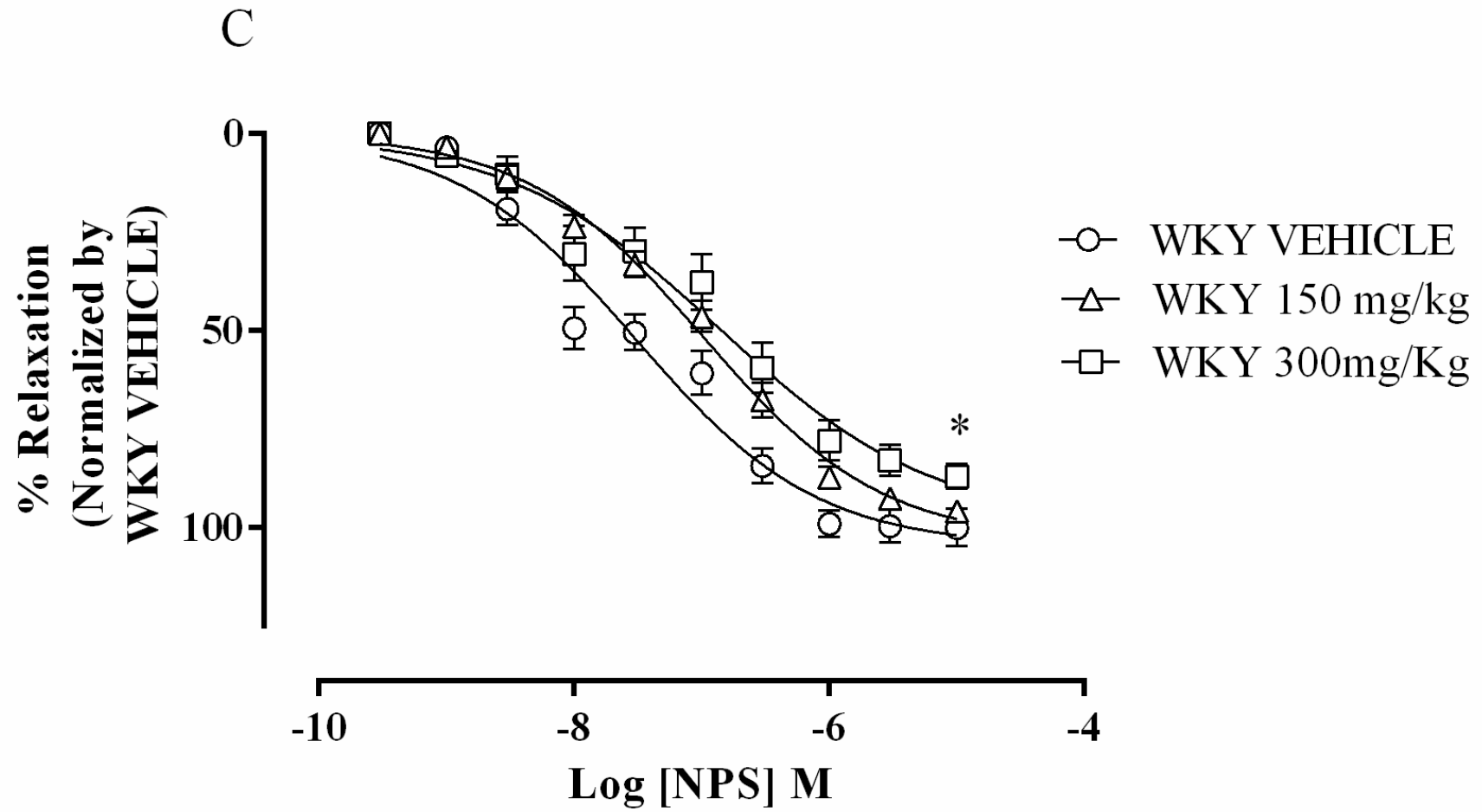


Figure 4 D

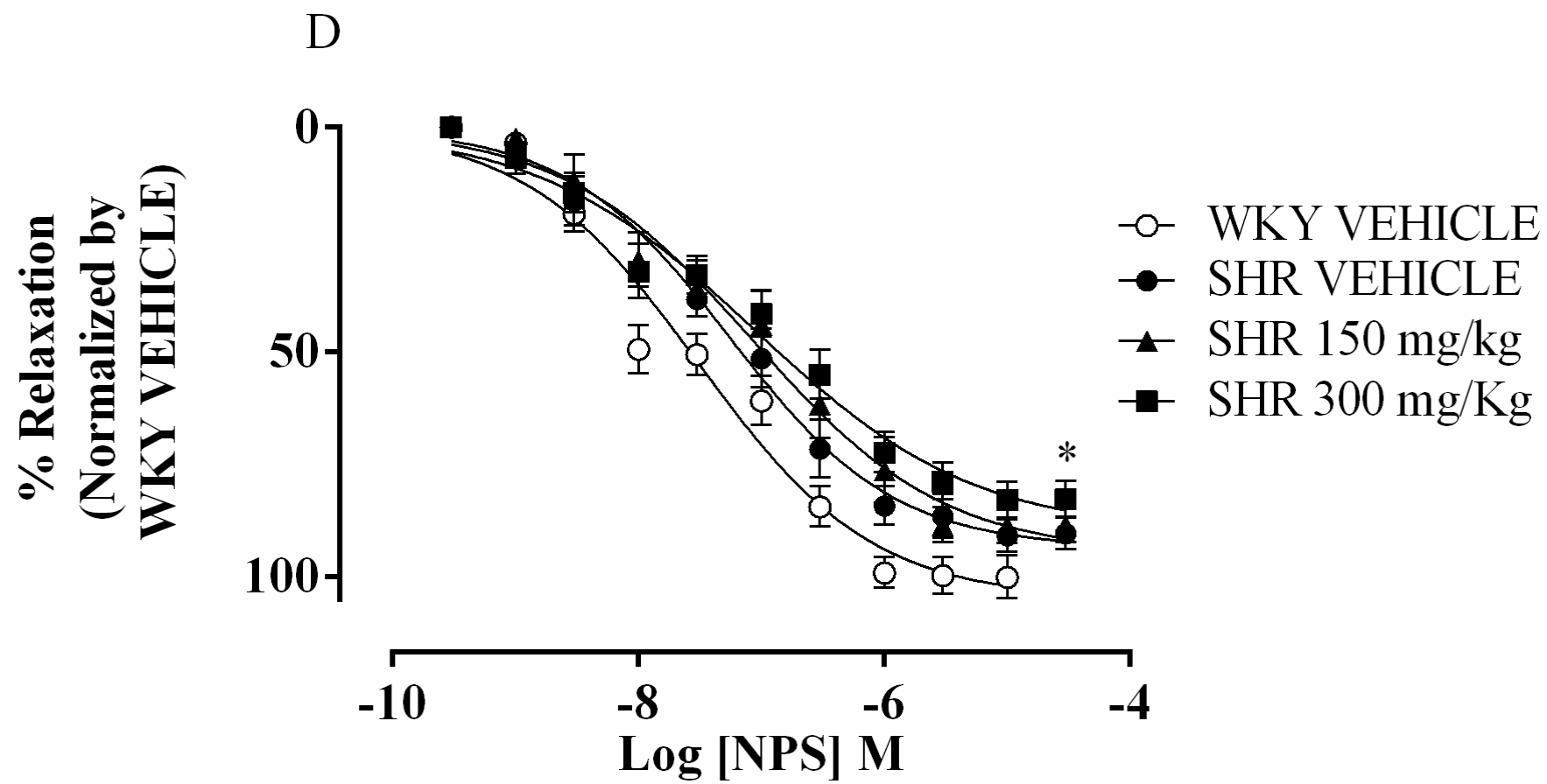


Table 3: Effects of Sc-EpHE treatment on maximum effect (Emax) to sodium nitroprusside

Grupos	Emax $\pm$ epm	N
WKY – VEHICLE	100,0 $\pm$ 4,7	12
WKY – 150mg/kg	95,7 $\pm$ 2,3	12
WKY – 300mg/kg	87,0 $\pm$ 3,0*	12
SHR – VEHICLE	90,3 $\pm$ 3,5	12
SHR – 150mg/kg	88,4 $\pm$ 3,8	12
SHR – 300mg/kg	82,2 $\pm$ 3,7*	12

Parameters of maximum effect (Emax) of the concentration-response curves to sodium nitroprusside in mesenteric arteries (WKY VEHICLE, WKY 150 mg/kg e WKY 300 mg/kg SHR VEHICLE, SHR 150 mg/kg e SHR 300 mg/kg). Results are expressed as mean $\pm$ SEM. Emax, maximum effect (expressed as a percentage of maximal response induced by 10 μ M of NPS). ANOVA *oneway* test: *P <0,05 compared to the corresponding com WKY VEHICLE; #P <0,05 compared to the corresponding com SHR VEHICLE.

DADOS ADICIONAIS

Tabela 1 - Variáveis bioquímicas no soro dos ratos WKY veículo, WKY 150 mg/kg , WKY 300 mg/kg , SHR VEÍCULO, SHR 150 mg/kg e SHR 300 mg/kg (n= 12) após 6 semanas de tratamento com o Sc-EpHE (média $\pm$ epm). Teste ANOVA *one way*, pós teste Tukey. * P < 0,05 quando comparado ao SHR VEÍCULO.

GRUPO	WKY VEÍCULO	WKY 150 mg/Kg	WKY 300 mg/kg	SHR VEÍCULO	SHR 150 mg/Kg	SHR 300 mg/kg
COLESTEROL TOTAL (mmol/L)	1,00 $\pm$ 0,27	1,6 $\pm$ 0,30	1,25 $\pm$ 0,19	1,15 $\pm$ 0,093	1,28 $\pm$ 0,12	1,37 $\pm$ 0,07
COLESTEROL LDL (mmol/L)	0,21 $\pm$ 0,13	0,38 $\pm$ 0,32	0,28 $\pm$ 0,15	0,15 $\pm$ 0,05	0,03 $\pm$ 0,12	0,28 $\pm$ 0,05
COLESTEROL HDL (mmol/L)	0,77 $\pm$ 0,13	0,83 $\pm$ 0,14	0,76 $\pm$ 0,10	0,80 $\pm$ 0,06	0,85 $\pm$ 0,05	0,82 $\pm$ 0,10
TRIGLICERIDEOS (mmol/L)	0,47 $\pm$ 0,05	0,67 $\pm$ 0,18	0,42 $\pm$ 0,17	0,42 $\pm$ 0,034	0,87 $\pm$ 0,14*	0,41 $\pm$ 0,03

Figura 1 - Barras representativas de valores de glicemia capilar semanal (mg/dL) normalizada pelo dia “0” em ratos WKY veículo, WKY 300 mg/kg, SHR veículo, e SHR 300 mg/kg. Diferença estatística avaliada por ANOVA *twoway*: * $P < 0,05$ quando comparado ao dia “0”

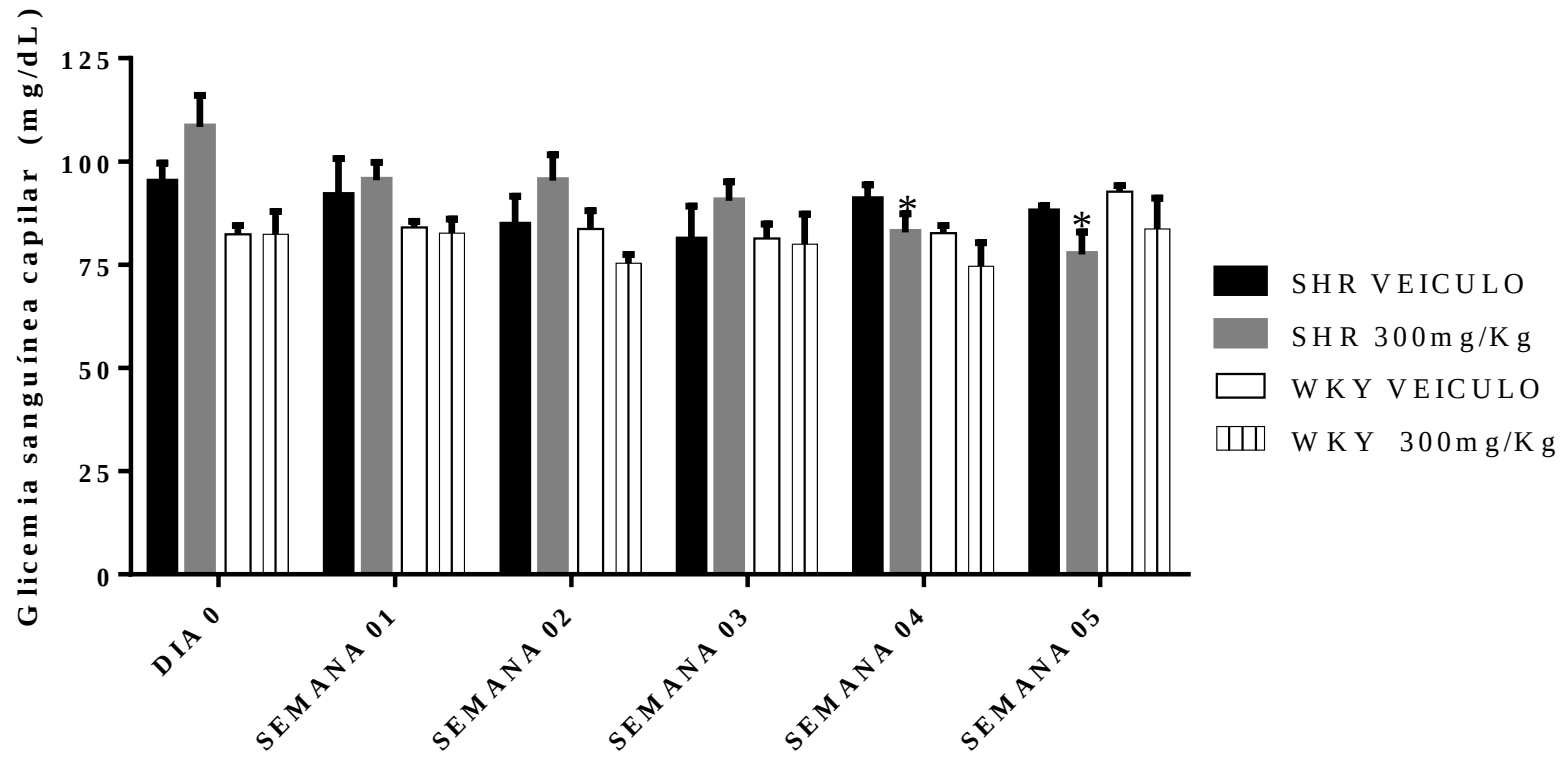
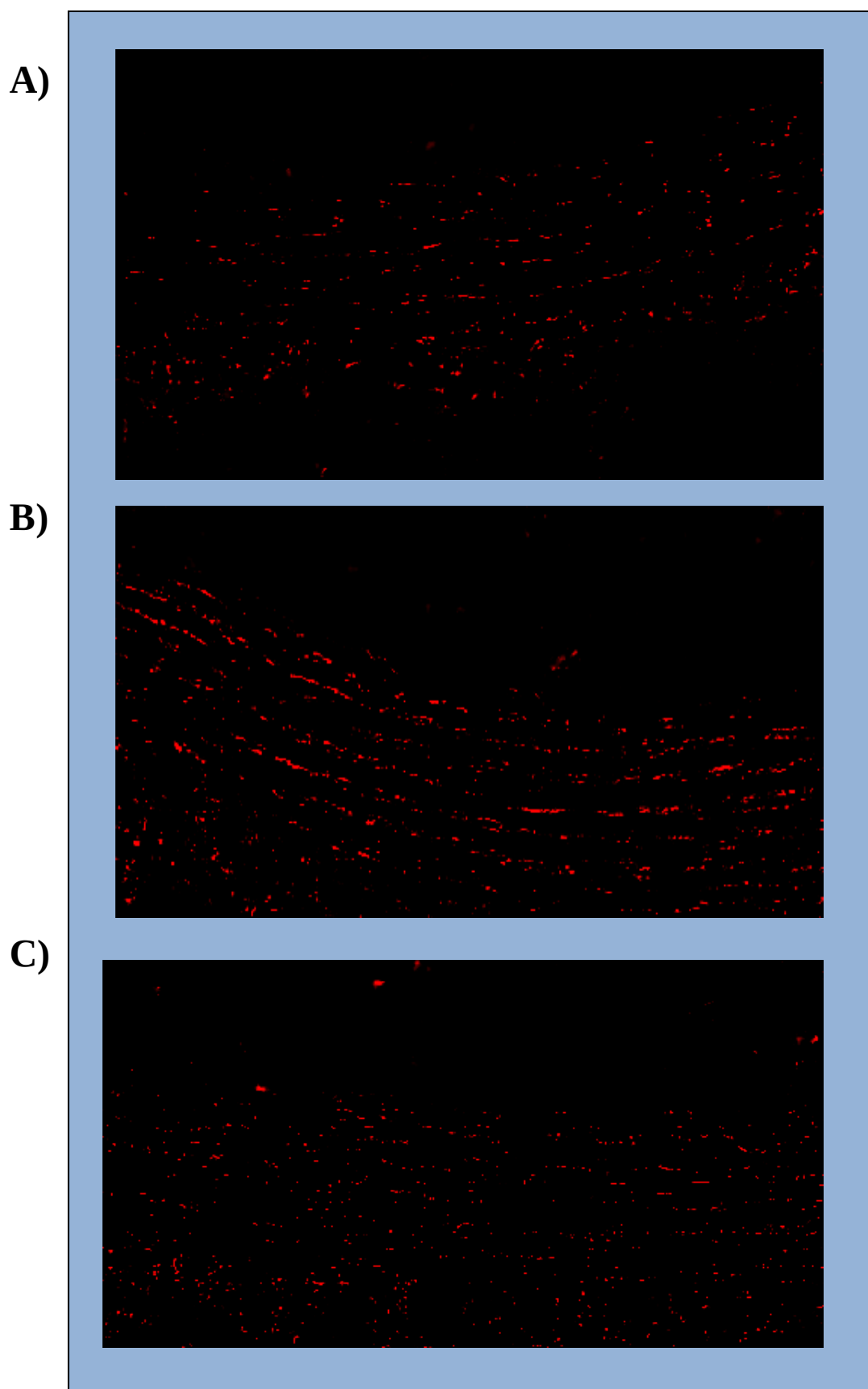


Figura 2 – Secções arteriais aórticas expostas ao corante fluorescente sensível a redox de DHE, durante 30 min a 37°C. Posteriormente, a fluorescência foi determinada por microscopia confocal. (A) WKY VEÍCULO (B) SHR VEÍCULO (C) SHR 300 mg/kg



PERSPECTIVAS

- Conclusão dos protocolos de medidas de ROS por microscopia de fluorescência em artéria aorta
- Análise dos marcadores bioquímicos de atividade antioxidante Superóxido Dismutase, Catalase, Glutathione Peroxidase, LDL – oxidado
- Medidas de Baroreflexo em animais tratados com doses de 150 e 300 mg/kg do SC-EpHE

ANEXO



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIDÃO

João Pessoa, 16 de julho de 2013.

CEUA Nº 0906/13

Ilmo(a). **Prof. Dr. Isac Almeida de Medeiros**

Departamento Ciências Farmacêuticas - CCS - UFPB

Orientando(a): **Suênia Maria do Nascimento, (Mestrado)**

A Comissão de Ética no Uso de Animais do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba em sua reunião ordinária de 15/07/13 analisou e **APROVOU** a execução do projeto **Estudo do efeito dos liofilizados da casca e do sumo de Syzygium cumini L. sobre ratos normotensos e espontaneamente hipertensos (SHR).**

Com previsão de empregar **38 Ratos KIOTO; 38 machos Ratos SHR;**

ANIMAIS PROVÊM DO BIOTÉRIO Prof. Thomas George.

Para serem utilizados no período de **29/05/2013 a 28/02/2015**

Atenciosamente,

Prof. Dr. Luis Cezar Rodrigues
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animal do CBiotec/UFPB