

DORINA ISABEL GOMES NATAL

**EFEITO DO NÉCTAR DE MANGA UBÁ NA MODULAÇÃO DO
ESTRESSE OXIDATIVO E DA INFLAMAÇÃO EM RATOS OBESOS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência da Nutrição, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Viçosa
MINAS GERAIS - BRASIL
2014

Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade Federal de Viçosa - Campus Viçosa

T

N271e
2014 Natal, Dorina Isabel Gomes, 1989-
Efeito do néctar de manga ubá na modulação do estresse oxidativo e da inflamação em ratos obesos / Dorina Isabel Gomes Natal. - Viçosa, MG, 2014.

xii, 48f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexo.

Orientador: Hércia Stampini Duarte Martino.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 39-46.

1. Manga. 2. Obesidade. 3. Inflamação. 4. Estresse oxidativo.

I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Nutrição e Saúde. Programa de Pós-graduação em Ciência da Nutrição. II. Título.

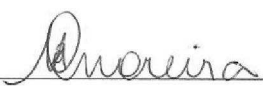
CDD 22. ed. 616.398

DORINA ISABEL GOMES NATAL

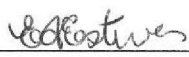
**EFEITO DO NÉCTAR DE MANGA UBÁ NA MODULAÇÃO DO ESTRESSE
OXIDATIVO E DA INFLAMAÇÃO EM RATOS OBESOS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência da Nutrição, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

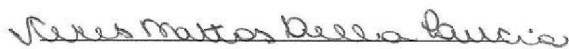
APROVADA: 12 de dezembro de 2014.



Maria Eliza de Castro Moreira



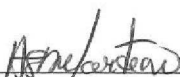
Elizabethe Adriana Esteves



Ceres Mattos Della Lucia



Laércio dos Anjos Benjamin
(Coorientador)



Hércia Stampini Duarte Martino
(Orientadora)

**À minha mãe Maria Helena, aos meus irmãos Alexandre e Edson,
e à minha professora e amiga Hércia Stampini,
que sempre foram compreensivos,
carinhosos e incentivadores nessa trajetória.
A eles todo meu amor e gratidão!**

AGRADECIMENTOS

A Deus agradeço pela vida e presença.

À minha amada mãe Maria Helena e aos meus queridos irmãos Alexandre e Edson, pelo amor incondicional, força, incentivos, ajuda e pela compreensão.

Ao meu pai José Natal (*in memorian*), pelo amor e por sempre ter desejado meu sucesso.

À minha admirável orientadora de graduação e mestrado, Prof^ª. Hércia Stampini Duarte Martino, pelos inúmeros ensinamentos, incentivo, paciência, confiança, parceria nesses anos de trabalho, amor e amizade maternos.

À Universidade Federal de Viçosa (UFV), principalmente o Departamento de Nutrição e Saúde, pela oportunidade de estudar e concluir o curso de Pós-Graduação a nível de Mestrado em Ciência da Nutrição.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pela concessão da bolsa e pelo financiamento do projeto.

À doutora Inês Dantas, pela amizade, atenção e contribuições enriquecedoras neste e nos demais trabalhos que participei.

Aos professores coorientadores desta pesquisa, Sônia Machado Rocha Ribeiro, Laércio dos Anjos Benjamin e José Humberto de Queiróz, pela amizade, dedicação e compromisso em ajudar e ensinar.

À professora Ceres Mattos Della Lucia, pela amizade e disponibilidade de participar da banca.

À professora Elizabethe Adriana Esteves, pela participação na banca.

A todos os professores que compartilharam seu conhecimento em laboratórios ou disciplinas e auxiliaram na minha formação.

Às estagiárias Mariana Milião, Núbia Moraes, Francine Santana, Kellen Rodrigues, Ana Lima, Jaqueline Maciel, Carolina Andrade, Mariana Rinaldi, Luciana Canossa, que dedicaram seu tempo em contribuir com essa pesquisa, pelo trabalho compartilhado e pela troca de experiências.

À Mimorina e Mariana Juste, pela disponibilização da matéria prima, amizade e agradável convivência.

Aos funcionários do Departamento de Nutrição e Saúde (DNS), Ricardo, Nilton, Izabel, Adilson, Rita, Sr. Toninho, Cleuza, Cristina, do Departamento de

Bioquímica, Jefferson, Carlão e Jean, e do Departamento de Veterinária, Adão e Cláudio, pelas informações, amizade, agradável convivência e ajuda nas análises.

Aos colegas e amigos de mestrado, do DNS e dos laboratórios onde trabalhei, em especial do Laboratório de Nutrição Experimental, Maria Eliza Moreira, Renata Lopes, Natália Galdino, Desirrê Moraes, Rufino Infante, Carlos Mário pelas contribuições nos trabalhos, trocas de experiências, conversas e convivência.

Aos meus amigos João Cardoso, Hudsara Paula, Mariana Abreu, Thiara Barros, Wikerley Lima, Cristina Hott, Ana Lúcia Teixeira, Camila Chagas, Nathália Silva, Penélope Ramos, Evaldo da Silva, Neila da Silva, Ana Beatriz Martino, Lívia Martino, Vivian Rodrigues, Marina Lopes e Laiza Carvalho pela força e incentivos constantes.

Enfim, agradeço a todos que involuntariamente omiti, mas que contribuíram de alguma forma para a concretização desse trabalho.

BIOGRAFIA

DORINA ISABEL GOMES NATAL, filha de José Natal Sobrinho e Maria Helena Gomes Natal, nasceu em 19 de junho de 1989, em Ponte Nova, Minas Gerais.

No ano de 1995 iniciou sua trajetória acadêmica no pré-primário nas Escolas Municipal e Estadual do município de Rio Doce, Minas Gerais, finalizando a 7ª série no ano de 2002. Em 2003 concluiu o ensino fundamental no Colégio Salesiano Dom Helvécio, Ponte Nova, Minas Gerais.

No período de fevereiro de 2004 a dezembro de 2006 cursou o Ensino Médio na Escola Salesiana Nossa Senhora Auxiliadora, Ponte Nova, Minas Gerais.

Em março de 2007 iniciou a graduação em Nutrição na Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, concluindo em novembro de 2012.

Recebeu em novembro de 2012 a Medalha de Prata Presidente Bernardes como reconhecimento de melhor desempenho no curso de graduação entre seus pares.

Nesse mesmo mês, iniciou o programa de Mestrado em Ciência da Nutrição pela Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais.

Em dezembro de 2014, submeteu-se à defesa da dissertação.

ÍNDICE

RESUMO	viii
ABSTRACT	xi
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 OBJETIVOS	3
2.1 Objetivo geral	3
2.2 Objetivos específicos	3
3 REVISÃO DE LITERATURA	4
3.1 Obesidade: inflamação e estresse oxidativo	4
3.2 Compostos bioativos antioxidantes	5
3.3 Tecidos adiposos e hepático.....	7
3.4 Caracterização da manga e dos néctares	9
4 MATERIAIS E MÉTODOS	12
4.1 Aquisição da matéria-prima.....	12
4.2 Preparo dos néctares	12
4.3 Análises físico-químicas.....	13
4.3.1 Acidez titulável (Titulometria)	13
4.3.2 pH.....	14
4.3.3 Sólidos solúveis	14
4.3.4 Água.....	14
4.3.5 Lipídios.....	14
4.3.6 Cinzas.....	14
4.3.7 Proteínas	15
4.3.8 Fibra alimentar insolúvel e solúvel	15
4.3.9 Carboidratos digeríveis.....	15
4.3.10 Conteúdo de fenólicos totais e atividade antioxidante	15

4.4 Ensaio biológico	17
4.4.1 Animais e dietas	17
4.4.2 Aspectos éticos.....	19
4.5 Teste de tolerância oral à glicose (TTOG).....	19
4.6 Medidas biométricas e de consumo alimentar.....	19
4.7 Análises bioquímicas séricas	20
4.8 Quantificação de citocinas.....	20
4.9 Capacidade antioxidante total.....	20
4.10 Análises histomorfométricas e histopatológicas	21
4.10.1 Tecido adiposo epididimal	21
4.10.2 Fígado	22
4.11 Análises estatísticas.....	22
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	23
5.1 Caracterização físico-química	23
5.2 Efeito dos néctares sobre as medidas biométricas e de consumo alimentar.....	25
5.3 Variáveis bioquímicas séricas.....	27
5.4 Citocinas pró e antiinflamatórias.....	29
5.5 Ingestão de néctares e atividade antioxidante <i>in vivo</i>	30
5.6 Histomorfometria e histopatologia.....	31
6 CONCLUSÕES.....	37
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	38
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39
9 ANEXO 1.....	47
10 MATERIAL SUPLEMENTAR.....	48

RESUMO

NATAL, Dorina Isabel Gomes, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, dezembro de 2014. **Efeito do néctar de manga Ubá na modulação do estresse oxidativo e da inflamação em ratos obesos.** Orientadora: Hércia Stampini Duarte Martino. Coorientadores: Sônia Machado Rocha Ribeiro, Laércio dos Anjos Benjamin e José Humberto de Queiróz.

A elevada prevalência da obesidade nas últimas décadas tem sido considerada um grave problema de saúde pública. Essa patologia é caracterizada por um quadro de inflamação sistêmica e estresse oxidativo, que pode ser prevenido e melhorado com uma dieta rica em compostos bioativos com atividade antioxidante, como os compostos fenólicos. A manga Ubá é uma fruta tropical encontrada na Zona da Mata Mineira que se destaca nesse contexto por conter elevado conteúdo de antioxidantes na polpa e na casca, mas que até o momento não foram utilizados em pesquisas *in vivo* para combater a obesidade. O objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito de néctares de manga Ubá com e sem adição de antioxidantes da casca na modulação do estresse oxidativo e da inflamação em ratos obesos. A manga Ubá foi coletada no município de Ubá, Minas Gerais, em fevereiro de 2013. Foram desenvolvidas duas formulações de néctar, sendo um controle com 50% de polpa + 50% de água filtrada, e outro com substituição da água pelo extrato da casca de manga. Foram realizadas análises físico químicas para caracterização dessas bebidas em diferentes condições de armazenamento. Utilizou-se 32 ratos machos da linhagem Wistar, mantidos em grupos de quatro, em caixas de polietileno, por 60 dias, consumindo ração comercial e água destilada *ad libitum*. Na fase I, os animais foram alocados em gaiolas individuais, de aço inoxidável e divididos conforme o peso corporal: o controle negativo foi mantido com dieta AIN-93M e os outros três grupos experimentais receberam dieta hiperlipídica (HFD), durante 49 dias. Após esse período, foram avaliados o índice de massa corporal (IMC), a glicemia de jejum e os triglicerídios séricos, por meio de punção da veia caudal. Conforme a diferença encontrada nesses valores e para manter a homogeneidade dentro do mesmo grupo experimental, os três grupos que receberam HFD foram realocados. Por mais 56 dias, fase II, manteve-se o grupo controle positivo (HFD) e iniciou-se dois grupos testes, um recebendo HFD e néctar de manga (MHFD) e outro com HFD e néctar adicionado

de extrato da casca de manga (HMHFD). A ingestão dos néctares foi controlada diariamente em, aproximadamente, 35mL e semanalmente monitorou-se o peso e o consumo alimentar. O teste de tolerância oral à glicose (TTOG) foi realizado utilizando solução de glicose na concentração de 200mg/kg, seguindo o mesmo protocolo descrito anteriormente. A glicemia foi mensurada nos tempos 0, 30, 60, 90 e 120 minutos. Ao final do experimento, os ratos ficaram em jejum por 12 horas, foram anestesiados e submetidos à eutanásia por punção cardíaca. Foram realizadas as medidas biométricas anteriormente citadas e calculados os índices de adiposidade e hepatossomático. Os valores bioquímicos séricos foram determinados no soro dos animais por meio de kits específicos para cada análise. Foram também quantificadas citocinas pró e antiinflamatória (TNF- α , IL-10) assim como a capacidade antioxidante total do plasma. Finalmente foram analisadas a histomorfometria e histopatologia do tecido adiposo epididimal e do fígado. A polpa e os néctares apresentaram valores médios de acidez titulável, pH e sólidos solúveis correspondentes às exigências da legislação brasileira. A composição química centesimal, a concentração de fenólicos totais e a atividade antioxidante foram superiores para o néctar enriquecido e as diferentes condições de armazenamento não alteraram as concentrações dos antioxidantes. Os grupos que receberam os néctares de manga apresentaram ganho de peso corpóreo, peso do tecido adiposo visceral, índice hepatossomático e adiposidade corpórea semelhantes ao AIN-93M. Além disso, o perímetro abdominal e o IMC confirmaram a indução da obesidade nos grupos HFD, reduzindo após a intervenção com o néctar enriquecido. Houve aumento da citocina pró-inflamatória TNF- α no grupo HFD e os néctares foram capazes de reverter o quadro inflamatório para os níveis fisiológicos normais ($p \leq 0,05$). A capacidade antioxidante total do plasma dos animais que ingeriram o néctar controle foi menor em relação aos demais ($p \leq 0,05$) e o grupo HMHFD apresentou valor semelhante ($p > 0,05$) ao HFD. A histologia dos tecidos hepático e adiposo confirmou a indução da obesidade no controle positivo e o efeito antioxidante dos néctares de manga ao reduzir a gordura e a inflamação hepáticas, assim como a hipertrofia dos adipócitos ($p \leq 0,05$). Portanto, os néctares desenvolvidos corresponderam às exigências da legislação e apresentaram elevado conteúdo de fenólicos totais e atividade antioxidante, que aumentou com a adição de casca. A

dieta hiperlipídica foi eficaz em induzir obesidade nos animais e os néctares de manga reduziram fatores de riscos metabólicos relacionados com a inflamação e com o estresse oxidativo.

ABSTRACT

NATAL, Dorina Isabel Gomes, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, December, 2014. **Effect of mango Uba juice in modulation of oxidative stress and inflammation in obese rats.** Adviser: Hércia Stampini Duarte Martino. Co-advisers: Sônia Machado Rocha Ribeiro, Laércio dos Anjos Benjamin and José Humberto de Queiróz.

The high prevalence of obesity in recent decades has been considered a serious public health problem. This pathology is characterized by a systemic inflammation and oxidative stress above which can be prevented and improved with a diet rich in bioactive compounds with antioxidant activity, such as phenols. The Uba mango is a tropical fruit found in the Zona da Mata Mineira that stands out in this context because it contains high content of antioxidants in flesh and skin, but so far have not been used in in vivo research to combat obesity. The aim of this study was to evaluate the mango nectar effect Uba with and without added peel antioxidants in the modulation of oxidative stress and inflammation in obese rats. The Uba sleeve was collected in the city of Uba, Minas Gerais, in February 2013. They were developed two nectar formulations, and a control with 50% pulp and 50% of filtered water, and one with replacement of water by peel extract. Physico-chemical characterization of these tests for drinks in different storage conditions were carried out. We used 32 male Wistar rats were kept in groups of four in plastic boxes for 60 days, consuming commercial feed and distilled water ad libitum. In Phase I, animals were placed in individual cages and divided stainless steel as body weight: negative control was maintained with AIN-93M diet and the other three groups received high fat diet (HFD) for 49 days. After this period, we evaluated the body mass index (BMI), fasting plasma glucose and serum triglycerides, through puncture of the tail vein. As the difference found in these values and to maintain homogeneity within the same experimental group, the three groups that received HFD were relocated. For over 56 days, phase II, remained the positive control group (HFD) and started two tests groups, one receiving HFD and mango nectar (MHFD) and another with HFD and nectar added mango bark extract (HMHFD). The intake was monitored daily nectars in approximately 35ml monitored weekly and the weight and food consumption. The oral glucose tolerance test (OGTT) was performed using glucose solution at a

concentration of 200 mg/ kg, using the same protocol described above. Blood glucose was measured at 0, 30, 60, 90 and 120 minutes. At the end of the experiment, rats were fasted for 12 hours were anesthetized and euthanized by cardiac puncture. Biometric measures above and calculated indexes of adiposity and liver somatic were performed. Serum biochemical values were determined in the serum of animals by specific kits for each analyte. Were also quantified and pro-inflammatory cytokines (TNF- α , IL-10) as well as total plasma antioxidant capacity. Finally we analyzed the histomorphometry and histopathology of epididymal adipose tissue and liver. The pulp and nectars showed average values of titratable acidity, pH and soluble solids corresponding to the requirements of Brazilian law. The proximate chemical composition, the concentration of total phenolics and antioxidant activity were higher for the enriched nectar and different storage conditions did not affect the concentrations of antioxidants. The groups that received the mango nectar showed body weight gain, weight visceral adipose tissue, liver somatic index and body fat similar to AIN-93M. In addition, BMI and waist circumference confirmed the induction of obesity in HFD groups after intervention reducing enriched with nectar. There was an increase of TNF- α proinflammatory cytokine in the HFD group and nectars were able to reverse the inflammation to normal physiological levels ($p \leq 0.05$). The total antioxidant capacity of plasma from rats consuming nectar control was lower compared to the others ($p \leq 0.05$) and the HMHFD group showed similar value ($p > 0.05$) to HFD. The histology of the liver and adipose tissues confirmed the induction of obesity and the positive control of antioxidant effect mango nectar to reduce fat and liver inflammation and hypertrophy of the adipocytes ($p \leq 0.05$). Therefore the developed nectars corresponded to the requirements of legislation and showed a high content of phenolic compounds and antioxidant activity, which increased with the addition of bark. The fat diet was effective in inducing obesity in animals and mango nectars reduced metabolic risk factors related to inflammation and oxidative stress.

1 INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas a obesidade tem sido considerada um grave problema de saúde pública devido à sua elevada prevalência que reduz consideravelmente a qualidade de vida dos indivíduos. A alimentação inadequada e o sedentarismo são as principais causas do aumento do tecido adiposo, que leva a ocorrência das doenças crônicas não transmissíveis (WONG *et al.*, 2012; PADILLA *et al.*, 2013; WHO, 2014).

O tecido adiposo é formado por um conjunto de células metabolicamente ativas, que secretam citocinas e hormônios conhecidos como adipocinas. Na obesidade, as adipocinas pró-inflamatórias, como o TNF- α , IL-1 β , resistina e o fator quimiostático de monócitos (MCP-1), estão aumentadas em detrimento das anti-inflamatórias, como adiponectina e IL-10 (MORAES *et al.*, 2012; ZHANG *et al.*, 2012; NAIR *et al.*, 2014). Além disso, a expressão aumentada de fatores de transcrição, como PPAR e NFkB, e a intensa infiltração de macrófagos caracterizam um quadro de inflamação crônica (SEYMOUR *et al.*, 2009; NAIR *et al.*, 2014). Essa condição metabólica predispõe também à elevada formação de radicais livres, redução das enzimas antioxidantes e ao dano celular, promovendo resistência insulínica, esteatose hepática, doenças cardiovasculares, diabetes, entre outras (MORAES *et al.*, 2012; SAMPEY *et al.*, 2012; WONG *et al.*, 2012).

Contudo, as alterações provocadas pela obesidade ocorrem primeiramente a nível molecular, não sendo identificadas por medidas macroscópicas. A expressão de RNA, a histomorfometria e a histopatologia são análises fundamentais para investigar os comprometimentos celulares e confirmar possíveis lesões (SAMPEY *et al.*, 2011; MORAES *et al.*, 2012; ANDRADE *et al.*, 2013).

Os compostos bioativos com atividade antioxidante, principalmente compostos fenólicos, são alvos constantes de pesquisas relacionadas à prevenção dos danos oxidativos e da inflamação, uma vez que são substâncias que apresentam um enorme potencial para prevenir as doenças crônicas não transmissíveis (SUZUKI *et al.*, 2011; JING *et al.*, 2012; MAURAY *et al.*, 2012). Essas substâncias estão presentes em frutas e hortaliças, alimentos básicos de uma alimentação saudável e que ainda apresentam o potencial de reduzir riscos metabólicos.

A manga é uma fruta tropical que se destaca nesse contexto por conter elevado conteúdo de compostos antioxidantes, mas que até o momento não foram

utilizados em pesquisas *in vivo* no controle da obesidade (RIBEIRO *et al.*, 2007; AJILA; PRASADA RAO, 2008; RIBEIRO, 2008; SANTHIRASEGARAM; RAZALI; SOMASUNDRAM, 2013; WATTANATHORN *et al.*, 2014). Na casca da manga são encontradas quantidades de antioxidantes bastante superiores à polpa e, nesse sentido, a utilização da casca da manga implica em maior potencial antioxidante para controlar doenças. A variedade de manga Ubá, tipicamente encontrada na Zona da Mata Mineira, contém valores desses compostos pelo menos 12x maiores tanto na polpa quanto na casca (RIBEIRO *et al.*, 2008). Considerando que não há manipulação de agrotóxicos no plantio da manga Ubá, a utilização da casca de manga Ubá garante também maior segurança alimentar em relação aos contaminantes químicos encontrados nas outras variedades.

A produção e consumo de néctares ou sucos de frutas está aumentando no mercado internacional (FAOSTAT, 2014). Sabendo que os néctares são sempre menos concentrados que os sucos e para atender às exigências e expectativas dos consumidores, que buscam consistência leve e refrescância nessas bebidas, a maioria dos produtos encontrados no mercado são néctares (BRASIL, 2003).

Para ampliar as possibilidades de redução dos riscos de várias doenças crônicas, melhorar a saúde de indivíduos e, conseqüentemente, os indicadores de saúde pública, torna-se importante avaliar o efeito biológico de néctares de manga Ubá em animais obesos. Contudo, para se comprovar o potencial nutricional e funcional desses produtos é necessário avaliar seu efeito em modular riscos metabólicos presentes nas doenças crônicas não transmissíveis.

A hipótese dessa pesquisa baseia-se no fato de que os néctares de manga Ubá controle e enriquecido com antioxidantes da casca de manga terão efeito positivo no controle da inflamação e do estresse oxidativo em ratos *Wistar* obesos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito de néctares de manga Ubá, com e sem adição de antioxidantes da casca na modulação do estresse oxidativo e da inflamação em ratos obesos.

2.2 Objetivos específicos

- ✓ Determinar a acidez titulável, o pH, o teor de sólidos solúveis (°Brix) e a composição química centesimal da polpa e dos néctares;
- ✓ Avaliar a concentração de fenólicos totais e a capacidade antioxidante dos néctares em diferentes condições de armazenamento;
- ✓ Investigar o efeito da ingestão dos néctares na modulação do estresse oxidativo e da resposta inflamatória;
- ✓ Analisar a histomorfometria e a histopatologia dos tecidos adiposo epididimal e hepático dos animais experimentais.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Obesidade: inflamação e estresse oxidativo

A alimentação inadequada, com excesso de gordura saturada e açúcares simples, assim como o sedentarismo são as principais causas do excesso de peso e da obesidade. Nesses casos observa-se um desequilíbrio entre a ingestão e o gasto de energia, cujo excesso é armazenado no organismo na forma de triglicerídios. A crescente prevalência mundial de obesidade nas últimas décadas ocorre devido à transição demográfica associada à mudança do estilo de vida da população (WHO, 2014).

As principais células armazenadoras de lipídios são os adipócitos, que tornam-se maiores em número (hiperplasia) e tamanho (hipertrofia), caracterizando o aumento do tecido adiposo (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013; LU *et al.*, 2014). Essa adiposidade, principalmente a abdominal, provoca uma série de alterações incluindo dislipidemia, doenças cardiovasculares, diabetes tipo II, esteatose hepática, entre outras, que caracterizam a síndrome metabólica. Além disso, o acúmulo de gordura também pode ocorrer em outros tecidos, como o fígado e o coração, prejudicando a função normal desses órgãos (ANDRADE *et al.*, 2013; NAIR *et al.*, 2014). Acredita-se que tais alterações são desencadeadas por mecanismos envolvendo o estresse oxidativo e a inflamação, os quais devem ser usados como alvo das ações terapêuticas no combate à patogênese da doença (ZHANG *et al.*, 2014). Essa enfermidade vem sendo considerada uma das principais causas de mortalidade de adultos e de crianças em todo o mundo, totalizando mais de 4 milhões de mortes a cada ano, segundo dados da Organização Mundial da Saúde (WHO, 2014). Além disso, a obesidade também é responsável por 44% da ocorrência de diabetes, 23% de doenças isquêmicas do coração e entre 7% e 41% de determinados tipos de câncer (WHO, 2014).

Os distúrbios metabólicos identificados nestas condições clínicas tem sido considerados importantes achados para o desenvolvimento de novas opções de tratamento destas doenças, principalmente no sentido de modular a resposta inflamatória e o estresse oxidativo.

A inflamação é uma condição característica da resposta imunológica em que ocorre um acúmulo das células de defesa, inúmeras reações, produção de citocinas e imunoglobulinas, com o objetivo de recuperar a homeostase do organismo (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008). Sendo assim, a inflamação ocorre quando o organismo está em desequilíbrio, seja pela invasão de um patógeno ou pela ocorrência de doenças crônicas. Observa-se na obesidade um quadro de inflamação crônica e generalizada, com intensa infiltração de macrófagos, expressão e ativação de citocinas pró-inflamatórias, como fator de necrose tumoral- α (TNF- α), que levam à resistência insulínica e doenças cardiovasculares (SEYMOUR *et al.*, 2009; YANG *et al.*, 2011; SAMPEY *et al.*, 2012).

O estresse oxidativo é caracterizado pelo acúmulo de radicais livres de oxigênio ou nitrogênio, moléculas muito reativas que provocam um desequilíbrio nas reações redox do organismo. Nessa situação, as enzimas antioxidantes, como superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase, não são capazes de neutralizar as reações de oxidação, o que desencadeia envelhecimento precoce e desordens nas funções celulares. A alimentação inadequada é ferramenta importante no aumento da formação de radicais livres, com consequente aumento da oxidação tecidual e das comorbidades associadas à obesidade (KUMAR *et al.*, 2014; NAIR *et al.*, 2014).

Assim, a busca por estratégias efetivas para o manejo da obesidade torna-se o foco de muitas pesquisas, em que a utilização de fontes de antioxidantes naturais e a adoção de uma alimentação saudável são as melhores opções para reduzir esse problema de saúde, cuja incidência é maior a cada ano (SEYMOUR *et al.*, 2009; YANG *et al.*, 2011; NAIR *et al.*, 2014).

3.2 Compostos bioativos antioxidantes

A busca por alimentos que forneçam além de nutrientes e energia, propriedades funcionais é marcante na atualidade. Os antioxidantes dietéticos são as substâncias mais indicadas para prevenir as doenças crônicas não transmissíveis. Além disso, a utilização de alimentos mais acessíveis à população é a melhor forma de garantir os benefícios à saúde relacionados ao seu consumo.

Antioxidantes são substâncias que apresentam a capacidade de inibir a oxidação exagerada do organismo, que é denominada de estresse oxidativo. Os

critérios estruturais para a atividade de eliminação de radicais livres é definida pela estrutura química, em que o elétron desemparelhado é ligado à molécula do antioxidante (JING *et al.*, 2012).

Os antioxidantes mais abundantes em vegetais, com destaque para as frutas, são os ácidos fenólicos e os flavonóides, que englobam antocianinas e taninos, e grandes diferenças existem na concentração desses compostos entre as diversas partes da planta, com menores teores na polpa dos frutos e maiores em folhas, cascas e revestimentos de troncos e caules (BERARDINI *et al.*, 2005; RIBEIRO *et al.*, 2007; AJILA; PRASADA RAO, 2008; RIBEIRO *et al.*, 2008; JING *et al.*, 2012; SANTHIRASEGARAM; RAZALI; SOMASUNDRAM, 2013).

Os compostos fenólicos constituem um dos maiores grupos de fitoquímicos que exibem várias propriedades fisiológicas tais como antioxidante e anti-inflamatória e, em razão disso, a sua ingestão está associada à redução de riscos de doenças. É comum a presença de um anel de benzeno nas moléculas desses compostos, sendo que algumas dessas substâncias apresentam características específicas, como a pigmentação dos alimentos fontes de antocianinas ou o sabor adstringente daqueles que contém tanino (MAURAY *et al.*, 2012; SOARES *et al.*, 2012).

As pesquisas para identificação e seleção de fontes de antioxidantes naturais conduzidas indicam que a ingestão de alimentos ou extratos naturais compostos de antioxidantes reduzem a expressão de hormônios e marcadores próinflamatórios, como leptina, TNF- α , e aumentam a concentração dos antiinflamatórios e antioxidantes, como adiponectina e interleucina-10 (IL-10) (MORAES *et al.*, 2012; ZHANG *et al.*, 2012; NAIR *et al.*, 2014). Essas substâncias também são capazes de reduzir a oxidação do plasma uma vez que aumentam a concentração das enzimas antioxidantes naturalmente presentes no organismo animal (MORAES *et al.*, 2012).

JU *et al.* (2011) estudaram o efeito do extrato de batata doce rico em antocianinas em adipócitos e verificaram redução do tamanho dessas células, assim como dos níveis circulantes de leptina. O efeito do extrato de arroz negro rico em antocianinas na redução do peso corporal, na melhora do perfil de lipídios e num marcador mitocondrial do metabolismo energético (CPT-1) de ratos obesos foi comprovado por YANG *et al.* (2011).

Todavia, a atividade antioxidante dos compostos está diretamente relacionada à dose administrada e altas concentrações podem levar a efeitos inflamatórios e

oxidantes indesejáveis. Esse efeito é mais comum em extratos purificados, mas dependendo da interação entre o composto, a matriz alimentar e o tempo de exposição, pode ocorrer auto-oxidação dos antioxidantes (VIHAKAS *et al.*, 2014).

3.3 Tecidos adiposos e hepático

Todo organismo vivo é constituído por minúsculas unidades energeticamente ativas chamadas células. As células são compostas por uma complexa maquinaria química, que coordena diversas vias metabólicas a nível molecular. Algumas espécies são constituídas por uma única célula, como bactérias, fungos e leveduras, porém a maioria dos seres vivos é pluricelular, como as plantas e os animais, dando origem aos tecidos, órgãos e sistemas.

O tecido adiposo é formado pelos adipócitos, células que apresentam em seu citoplasma uma ou mais gotículas de gordura na forma de triglicerídeos, caracterizando-se como a principal reserva de energia do corpo. O tecido adiposo unilocular é caracterizado pela presença de uma única gotícula de gordura em suas células e pode ser denominado de branco ou amarelo, dependendo da alimentação. Esse tecido é o mais abundante nos organismos adultos e dentre suas funções destacam-se isolamento térmico, proteção de órgãos, amortecimento de impacto e preenchimento de espaços. Embora por muitos anos tenha sido enfatizado o contrário, os adipócitos são células metabolicamente ativas, cruciais no desenvolvimento ou atenuação da obesidade, da inflamação e do estresse oxidativo. Produz diversas citocinas e hormônios, denominados adipocinas, relacionados também com o controle da ingestão alimentar, como o fator de necrose tumoral α (TNF- α), as interleucinas 6, 10 (IL-6, IL-10), resistina, leptina e adiponectina (MORAES *et al.*, 2012; ZHANG *et al.*, 2012; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013). Embora na obesidade seja possível verificar hiperplasia e hipertrofia dos adipócitos, a redução desse tecido implica apenas em menor volume celular, nunca reduzindo o número de células já formadas.

Um tipo de tecido adiposo menos comum é aquele formado por muitas gotículas de gordura no citoplasma das células, sendo denominado de multilocular. A principal função desse tecido é a produção de calor devido à intensa concentração de mitocôndrias, que determina a coloração marrom ou parda característica. Está presente principalmente nos recém-nascidos e nos animais que hibernam,

identificando-se no adulto apenas pequena quantidade no externo, escápula e crista ilíaca (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

O fígado é um dos maiores e principais órgãos do corpo, que recebe grande parte do material absorvido no intestino e onde a maioria das reações metabólicas ocorrem, como gliconeogênese, desaminação e oxidação. É um órgão bastante vascularizado, formado pelas células hepáticas ou hepatócitos, sinusóides, canais biliares e alguns macrófagos, denominados células de Kupffer, que fagocitam hemácias mortas e outros corpos estranhos. Sua principal reserva energética é o glicogênio, entretanto verifica-se algumas células em formato de estrela que armazenam pequena quantidade de lipídio e as vitaminas lipossolúveis, principalmente a vitamina A. Num indivíduo obeso, os hepatócitos tornam-se hipertróficos, sendo possível visualizar o acúmulo de gordura no citoplasma dessas células. O fígado sintetiza as próprias proteínas e por isso apresenta a exclusiva capacidade de se regenerar, observando-se então a hiperplasia celular. Outra importante função desse órgão é a eliminação de toxinas pela bile, que também emulsifica as gorduras, auxiliando a atividade da lipase (ANDRADE *et al.*, 2013; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013). Sendo assim, estudar o funcionamento do fígado é de fundamental importância para entender a patogênese das doenças crônicas não transmissíveis.

As análises microscópicas das células são fundamentais para definir as alterações que desencadeiam anormalidade das funções dos organismos. Existem dois tipos de microscopia, e sua utilização está diretamente relacionada ao objetivo do trabalho. A microscopia de luz é a mais utilizada nos trabalhos e permite a análise detalhada dos tecidos, das alterações morfológicas e morfológicas das células e dos componentes teciduais (ANDRADE *et al.*, 2013; LU *et al.*, 2014). A microscopia eletrônica é uma metodologia mais específica, sensível e detalhada, utilizada para o estudo de compartimentos ou organelas celulares (PADILLA *et al.*, 2013). Além disso, a coloração dos tecidos previamente à microscopia constitui-se etapa crucial para identificação de tipos celulares ou substâncias determinadas, infiltrados nos tecidos (TINKOV *et al.*, 2012; LI *et al.*, 2014; MORI *et al.*, 2014). Dessa forma, o uso da microscopia é fundamental para identificar, investigar lesões e diagnosticar doenças.

Alterações dos tamanhos e formas das células podem ocorrer em consequência de doenças. Células e núcleos distorcidos, com alteração das organelas

e do DNA são comuns na presença de toxinas (TINKOV *et al.*, 2012; SHIN *et al.*, 2014). Na obesidade ocorre hipertrofia devido à maior concentração de lipídios nas células de todo o organismo, destacando-se aumento de adipócitos e hepatócitos (ANDRADE *et al.*, 2013; HARAZAKI *et al.*, 2014).

Adicionalmente, a compreensão do funcionamento molecular das células é fundamental para entender mais detalhadamente todas essas alterações. Apesar disso, a codificação da sequência de DNA não é capaz de descrever um organismo. Isso acontece devido à expressão maior, menor ou ao silenciamento de determinado gene, que se comporta de maneira diferente em cada tipo celular. O DNA é expresso ou transcrito em moléculas de RNA e, dessa forma, a quantificação de RNA caracteriza uma célula, seus metabólitos e as possíveis patologias a ela relacionadas (ALBERTS *et al.*, 2010).

Muitas vezes as modificações esperadas em um determinado tratamento não são confirmadas pelas análises biométricas ou bioquímicas, em função das condições metabólicas inerentes aos animais testados e do tempo de experimentação (MORAES *et al.*, 2012; NAIR *et al.*, 2014). As primeiras desordens em um organismo ocorrem a nível molecular e os sintomas não são descritos pela observação macroscópica (YANG *et al.*, 2011; TEKELESELASSIE *et al.*, 2013). Então, para confirmar as alterações promovidas pelas dietas, bebidas e demais substâncias administradas aos animais laboratoriais, é necessário proceder às análises histológica e de biologia molecular.

3.4 Caracterização da manga e dos néctares

O mercado de frutas tropicais evoluiu consideravelmente nos últimos anos e, em 2014, as projeções da FAO indicam que a demanda vai crescer ainda mais, chegando a 82 milhões de toneladas. Este aumento se deve principalmente à qualidade do produto, ao valor nutritivo e aos efeitos benéficos que as frutas trazem à saúde.

A manga (*Mangifera indica* L. Anacardiaceae) é uma fruta tropical originária do sudeste asiático, mais especificamente na Índia há, pelo menos, 4000 anos. Essa região se mantém como maior produtora e segunda maior exportadora mundial da fruta (FAOSTAT, 2014). No Brasil a manga foi introduzida na Bahia, espalhando-se

para todo o território nacional, colocando o País entre os dez maiores produtores e como terceiro maior exportador mundial de manga. As previsões da ONU para 2014 apontam o Brasil como o segundo maior produtor mundial da fruta, com 40% da colheita total (FAO, 2013).

As mangueiras são adaptadas às regiões com estações seca e chuvosa bem definidas, pois a seca impede a ocorrência de pragas no período anterior à frutificação e a chuva estimula o desenvolvimento dos frutos e impede sua queda. Em regiões secas a irrigação do solo é uma alternativa viável para o cultivo de manga, permitindo a produção durante todo o ano. Solos arenosos, argilosos e morros são propícios ao cultivo de mangueiras, porém devem ser evitadas regiões sujeitas a encharcamento assim como as pedregosas (EMBRAPA, 2014). Existem muitas variedades de manga do ponto de vista da botânica, mas o comércio distingue apenas duas categorias: as mangas vermelhas e as mangas amarelas. As mangas vermelhas são as chamadas variedades “americanas”, como Haden, Tommy Atkins, Palmer, entre outras. A produção destas mangas está concentrada na América Central, América do Sul e no Caribe, sendo que 95% do comércio internacional de mangas frescas do mundo ocidental é baseado nessas variedades. As demais são as mangas amarelas quando maduras, cujas mais famosas são as famílias da Afonso e da Totapuri, que dominam todo o mercado asiático (FERRAZ, 2005).

A maioria dessas variedades são frutos médios ou grandes, pesando de 300g a 900g, que apresentam polpa doce e suculenta. Devido à susceptibilidade ao ataque de pragas e ocorrência de várias doenças, o controle da produtividade normal da fruta é mantida pela utilização de agrotóxicos, os quais garantem a qualidade sensorial exigida pelo comércio mas limitam a qualidade nutricional fornecida pela fruta (EMBRAPA, 2014). A polpa de manga apresenta elevado conteúdo de antioxidantes, incluindo vitaminas, como o ácido ascórbico e os carotenóides, e os compostos bioativos (RIBEIRO *et al.*, 2007; SANTHIRASEGARAM; RAZALI; SOMASUNDRAM, 2013; ARAÚJO *et al.*, 2014). A casca da manga contém diferentes compostos fenólicos, tais como flavonóides, xantonas, galotaninos, derivados de benzofenona e antocianinas, em concentrações bastante superiores às encontradas na polpa (BERARDINI *et al.*, 2005; AJILA; PRASADA RAO, 2008; RIBEIRO *et al.*, 2008). Sendo assim, a casca de manga se destaca com elevado potencial para enriquecer produtos alimentícios, porém em função do maior controle higiênico-sanitário exigido e das possíveis características sensoriais desagradáveis,

existem poucas pesquisas utilizando esse componente e demonstrando seus efeitos (SILVA, 2010).

Em geral, a manga é consumida madura, em fatias, polpa ou purê, embora na Ásia seja comum o consumo da fruta verde, como componente de temperos e molhos (FERRAZ, 2005). Destaca-se também no mercado mundial a elevada produção e consumo de néctares ou sucos a partir das inúmeras variedades de manga (FAOSTAT, 2014). A legislação brasileira denomina como néctar, bebidas a base de fruta com concentrações de polpa inferiores aos sucos, mas com manutenção da qualidade nutricional e sensorial. Segundo essa norma, bebidas à base de manga com 40% a 60% de polpa são denominadas néctares, e percentuais superiores caracterizam os sucos de manga (BRASIL, 2003). Para atender às exigências e expectativas dos consumidores, que buscam consistência leve e refrescância em bebidas à base de frutas, a maioria dos produtos encontrados no mercado são néctares.

Uma variedade de manga pequena, pesando em média 150g, com polpa e casca amarelas, cuja produção ocorre principalmente na Zona da Mata Mineira sem a utilização de defensivos agrícolas é a denominada manga Ubá. Essa variedade contém cerca de 12x mais antioxidantes em relação às demais, tanto na polpa quanto na casca, que são ainda mais realçados considerando que existe maior segurança alimentar relacionada à contaminação química. Além disso, as características sensoriais inigualáveis e a disponibilidade regional tornam essa variedade um alimento potencial para ampliar o espectro de consumo da fruta (RIBEIRO *et al.*, 2008).

O néctar de manga Ubá enriquecido com antioxidantes da própria casca já foi desenvolvido anteriormente nos laboratórios do Departamento de Nutrição e Saúde da Universidade Federal de Viçosa. Esse produto contém, aproximadamente, duas vezes mais compostos bioativos em comparação com o suco de manga convencional e, mostrou ser uma formulação viável, com qualidade nutricional, sensorial e potencial funcional (SILVA, 2010). Entretanto, ainda não foi utilizado em estudos com animais experimentais ou humanos. Ressalta-se ainda que a utilização da casca apresenta também característica de sustentabilidade, uma vez que aproveita resíduos da agroindústria para enriquecer um produto já consumido pela população.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido nos Laboratórios de Análise Sensorial e Desenvolvimento de Novos Produtos e de Nutrição Experimental do Departamento de Nutrição e Saúde, nos Laboratórios de Metabolismo e Fermentações do Departamento de Bioquímica e no Laboratório de Morfologia de Peixes do Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa, MG.

4.1 Aquisição da matéria-prima

A manga Ubá foi coletada no município de Ubá, Minas Gerais, em fevereiro de 2013. Os frutos foram selecionados quanto ao grau de maturação, com base nos atributos de cor e textura característicos (OLIVEIRA *et al.*, 2012), em que consideraram-se maduros os frutos com casca lisa, brilhante, verde-amarelada e polpa intacta e firme. Após a seleção a manga foi pré-lavada em água corrente com o auxílio de esponja para retirada de sujidades, como terra e folhas, além da ação mecânica para remoção de microorganismos aderidos. Em seguida foi submetida ao choque térmico de três minutos em água fervente e resfriamento em água a 28°C para eliminação de possíveis microorganismos termossensíveis. Os frutos foram então sanitizados com cloro a 200ppm, segundo a portaria CVS-8/2008 (BRASIL, 2008), descascados manualmente e despolpados em despolpadeira industrial de aço inoxidável. As cascas foram armazenadas a -22°C em sacos de polietileno para posterior preparo do extrato. Para inativação das enzimas polifenoloxidasas e preservação das antocianinas e demais compostos fenólicos, a polpa foi tratada a 90°C/15min, resfriados em banho de gelo e armazenados em recipientes de polietileno a -22°C (MERCALI *et al.*, 2013; SANTHIRASEGARAM; RAZALI; SOMASUNDRAM, 2013).

4.2 Preparo dos néctares

A fim de decidir pela formulação mais adequada foram realizados testes preliminares com néctar e suco considerando a consistência espessa da manga, as características físicas do experimento, o elevado valor nutricional dessa fruta, os

critérios preconizados pela legislação brasileira e a qualidade sensorial exigida e pelo mercado consumidor.

Como a adição total da casca resultaria em excesso de fibra, alteração das características sensoriais do néctar e limitaria a viabilidade e a reprodutibilidade do experimento, optou-se pelo uso do extrato da casca. O extrato aquoso é composto por todos os compostos antioxidantes alvo e não interfere de forma negativa na execução do trabalho proposto (AJILA; PRASADA RAO, 2008; VAMANU; NITA, 2013).

Foram desenvolvidas duas formulações de néctar com 50% de polpa de manga, sendo uma adicionada de extrato da casca de manga. Para preparar o extrato, a casca de manga foi descongelada a 5°C de acordo com a RDC 216/04, e colocada para ferver em água filtrada na concentração de 20% durante cinco minutos. A polpa foi também descongelada a 5°C e utilizada para o preparo dos néctares após a verificação dos parâmetros preconizados por BRASIL (2003) para qualidade de polpa de manga, como acidez titulável, pH e sólidos solúveis (°Brix).

O néctar controle foi preparado com 50% de polpa adicionada a 50% de água filtrada. O néctar enriquecido com o extrato da casca de manga foi preparado com 50% de polpa e 50% do extrato pronto, obtendo um produto final com 10% de casca extraída. Para padronizar o conteúdo de partículas insolúveis na solução, ambos os néctares foram filtrados em malha de aço de 6 mm de espessura.

4.3 Análises físico-químicas

As análises físico-químicas foram realizadas em três repetições de cada amostra.

4.3.1 Acidez titulável (Titulometria)

Para determinar a acidez da polpa de manga Ubá e, posteriormente, dos néctares, foram pesados 5 g de cada amostra e adicionados 25 mL de água destilada num Erlenmeyer de 125 mL. Essa mistura foi titulada com NaOH 0,1 N até coloração rósea permanente por 30 segundos, utilizando-se 5 gotas do indicador de pH fenolftaleína (SANTHIRASEGARAM; RAZALI; SOMASUNDRAM, 2013). O percentual de acidez das amostras foi calculado com a seguinte fórmula:

$$\text{Acidez} = [V \times N \times 100]/P$$

Onde,

V = volume da solução de hidróxido de sódio gasto na titulação;

P = g ou mL da amostra usada na titulação

4.3.2 pH

O pH foi determinado pelo método potenciométrico, utilizado pHmetro Tecnal[®], modelo Tec-3MP, e as soluções padrão de pH 4,0, 7,0 e 10,0. O eletrodo era imerso nas amostras e o valor de pH indicado no visor.

4.3.3 Sólidos solúveis

Foi determinada a concentração de sólidos solúveis pelo método refratométrico, usando-se refratômetro de bancada Instrutherm[®], modelo RTD-45 (SANTHIRASEGARAM; RAZALI; SOMASUNDRAM, 2013).

4.3.4 Água

A determinação do conteúdo de água foi realizada em liofilizador (TERRONI[®], modelo LC 1500), em que ocorre sublimação da água das amostras com auxílio de vácuo.

4.3.5 Lipídios

Os lipídios foram determinados por meio do refluxo de éter etílico nas amostras pelo método Soxhlet, segundo a AOAC (2012).

4.3.6 Cinzas

A determinação do conteúdo de cinzas das amostras foi realizada por calcinação em forno mufla a 600°C, seguindo o método da AOAC (2012).

4.3.7 Proteínas

A determinação de proteínas foi realizada segundo o método semi-micro Kjeldahl para a quantificação de nitrogênio total, de acordo com a metodologia descrita pela AOAC (2012). O percentual de proteínas foi calculado multiplicando-se o teor de nitrogênio encontrado pelo fator de conversão 6,25.

4.3.8 Fibra alimentar insolúvel e solúvel

As amostras foram hidrolisadas pelas enzimas α -amilase termoresistente, protease e amiloglicosidase, que digerem polissacarídeos, polipeptídeos, oligo e dissacarídeos. Em seguida, as amostras foram filtradas por gravimetria e os resíduos solúvel e insolúvel resultantes foram secos em estufa a 105°C. Esses resíduos foram submetidos às análises de cinzas e proteínas para descontar os resultados no cálculo final e não superestimar o percentual de fibra alimentar encontrado (AOAC, 2012). A fibra alimentar total foi calculada pela soma das frações solúveis e insolúveis.

4.3.9 Carboidratos digeríveis

O conteúdo de carboidratos digeríveis das amostras de néctar foram calculados pela diferença entre 100% da amostra e a soma dos conteúdos de água, proteínas, lipídios, cinzas e fibra alimentar total.

4.3.10 Conteúdo de fenólicos totais e da atividade antioxidante

A ingestão dos néctares pelos animais foi controlada diariamente e administrada nos bebedouros. Para garantir a estabilidade dos fenólicos totais e antioxidante dessas bebidas, as análises foram realizadas após 24 horas na temperatura da sala de experimentação (22°C $\pm$ 3°C). Além disso, com o intuito de verificar se os néctares ficariam estáveis sob refrigeração ou se seria necessário prepará-los a cada dia, as análises também foram feitas após 72 horas sob refrigeração.

Para obtenção dos extratos, 2 mL de cada néctar foi diluído em 20 mL de metanol 60%, colocados em um Erlenmeyer para agitação horizontal a 100 rpm por

20 minutos e filtrados em bomba a vácuo com auxílio de funil de vidro e papel de filtro (porosidade 3 μm).

A concentração de fenólicos totais foi determinada de acordo com a metodologia descrita por Singleton, Orthofer, Lamuela-Raventos (1999), utilizando-se o reagente de Folin-Ciocalteu. Uma alíquota de 0,1 mL dos extratos foi colocada em tubos de ensaio protegidos com papel alumínio, com acréscimo sequencial de 1 mL do reagente de Folin-Ciocalteu 0,25 N e agitação manual por dez segundos. Após três minutos foi adicionado à mistura 1 mL de carbonato de sódio (7,5%), sempre agitando manualmente. Por fim, após sete minutos foram acrescentados 5 mL de água destilada e a mistura foi novamente agitada, permanecendo em repouso durante 30 minutos, em temperatura ambiente. Para o preparo do controle, água destilada foi utilizada em substituição aos extratos. A leitura da absorvância em 726 nm foi feita em leitor de ELISA (Thermo Scientific[®], modelo Multiskan GO). Os resultados foram expressos em gramas de equivalentes de ácido gálico (gEAG), utilizando-se a equação de regressão a partir de uma curva padrão de ácido gálico com concentrações variando de 0 a 250ppm.

Para determinar a atividade antioxidante dos extratos hidroalcoólicos dos néctares para eliminar os radicais livres DPPH[•] (1,1- difenil-2-picrilhidrazil) foi utilizado o método descrito por BLOIS (1958). Em tubos de ensaio protegidos com papel alumínio foram colocados 0,1 mL de extrato e 1,5 mL da solução metanólica de DPPH 0,1 μM . Para o preparo do controle, foram utilizados 0,1 mL de água destilada em substituição aos extratos. As amostras foram agitadas manualmente por dez segundos e permaneceram em repouso por 30 minutos em temperatura ambiente. Após esse tempo, realizou-se as leituras em leitor de ELISA (Thermo Scientific[®], modelo Multiskan GO) com absorvância de 517 nm.

4.4 Ensaio biológico

4.4.1 Animais e dietas

Foram utilizados 32 ratos machos recém-desmamados com 21 dias de idade (*Rattus norvegicus*, variedade albinus, classe Rodentia), linhagem Wistar, com peso médio de 69 g, provenientes do Biotério Central do Centro de Ciências Biológicas e de Saúde da UFV. Até o 60º dia de idade, fase adulta, os animais foram mantidos em grupos de quatro, em caixas de polietileno, consumindo ração comercial (Presence/In Vivo® Nutrição Animal) e água destilada *ad libitum*. A temperatura da sala de experimentação foi controlada em $22^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$, com ciclo claro/escuro de 12 horas.

No 61º dia os animais foram alocados em gaiolas individuais, de aço inoxidável e divididos em quatro grupos (n=8) de forma aleatória, de modo que não houvesse diferença maior que 3,0 g entre as médias dos pesos dos grupos, atendendo à recomendação da AOAC (2012). O grupo controle negativo foi mantido com dieta AIN-93M (REEVES; NIELSEN; FAHEY JR., 1993), e os outros três grupos experimentais receberam dieta hiperlipídica (HFD), segundo a formulação da RESEARCH DIETS® (2006), para indução de obesidade, durante 7 semanas (SAMPEY *et al.*, 2011) (Tabela 1). Ao final desta fase I, com o intuito de verificar a indução da obesidade, os ratos foram colocados em jejum por 12 horas para realização dos testes de glicemia e triglicerídios por meio de punção da veia caudal utilizando o Accutrend® GCT e, posteriormente, das medidas biométricas.

Para iniciar a fase II e manter a homogeneidade dentro do mesmo grupo experimental, os três grupos que receberam HFD foram realocados, de forma que apresentassem as medidas biométricas semelhantes. Por mais 8 semanas, fase II, foram mantidos o grupo controle negativo (AIN-93M), o controle positivo (HFD) e iniciaram dois grupos testes, um recebendo HFD e néctar de manga (MHFD) e o outro com HFD e néctar adicionado de 50% de extrato da casca de manga (HMHFD) (BARBALHO *et al.*, 2012; YUNG *et al.*, 2013). A ingestão dos néctares foi baseada em testes prévios e controlada diariamente de acordo com a menor ingestão verificada de 35 mL/ dia, que resultou num consumo de fenólicos totais de 9,95 gEAG para o grupo MHFD e 16,48 gEAG para o grupo HMHFD: se o animal ingerisse a quantidade determinada de néctar antes de completar 24 horas, recebia

água destilada para manter sua hidratação. O peso e o consumo alimentar foram monitorados semanalmente.

Ao final do experimento, os ratos ficaram em jejum por 12 horas, foram anestesiados (com a utilização de Isoflurano 100%, Isoforine, Cristália[®], em aparelho de anestesia inalatória conforme resolução 714, de 20 de julho de 2002) e submetidos à eutanásia por punção cardíaca. O sangue foi coletado em tubos com ou sem anticoagulante (heparina) para obtenção do plasma ou do soro, após centrifugação sob refrigeração (4°C) durante dez minutos a 3000 rpm. O fígado e os tecidos adiposos abdominal e epididimal dos animais foram retirados e pesados para posteriores cálculos das medidas biométricas. Amostras dos tecidos foram fixadas em formaldeído tamponado 10% e o restante, imediatamente congelados em nitrogênio líquido e armazenados em ultrafreezer à temperatura de -80°C até o início das análises.

Tabela 1: Composição das dietas experimentais (g·100g⁻¹).

Ingredientes	AIN 93M	Calorias (kcal)	HFD	Calorias (kcal)
Caseína	14	56	19,5	78
Maltodextrina	15,5	62	10	40
Amido de Milho	46,57	186,28	5,32	21,28
Sacarose	10	40	34,1	136,4
Óleo de Soja (mL)	4	36	1	9
Banha	0	-	20	180
Celulose	5	-	5	-
Mix Mineral	3,5	-	3,5	-
Mix Vitaminico	1	-	1	-
Bitartarato de Colina	0,25	-	0,25	-
L-cistina	0,18	-	0,18	-
Colesterol	0	-	0,15	-
BHT	0,0008	-	0,004	-
Total	100	380,3	100	464,7
DC (kcal·g ⁻¹)	3,8	-	4,7	-

BHT: butylated hydroxytoluene; DC: densidade calórica.

4.4.2 Aspectos éticos

O experimento foi conduzido de acordo com os Princípios Éticos para Experimentação Animal, processo nº 34/ 2013, aprovado pela Comissão de Ética para Uso de Animais (CEUA/ UFV) da UFV, Viçosa, MG, em 26/04/2013 (ANEXO 1).

4.5 Teste de tolerância oral à glicose (TTOG)

O teste de tolerância oral à glicose foi realizado na 7ª semana da fase II do experimento, uma semana antes da eutanásia. Após 12 h de jejum, uma solução de glicose na concentração de 200 mg/kg de peso corpóreo foi administrada por gavagem aos ratos. Para medir a glicemia, realizou-se punção da veia caudal com subsequente leitura no aparelho Accutrend® GCT nos tempos 0, 30, 60, 90 e 120 minutos (WONG *et al.*, 2012; ZHANG *et al.*, 2012; NAIR *et al.*, 2014).

4.6 Medidas biométricas e de consumo alimentar

Foram obtidas medidas biométricas como marcadores de obesidade dos ratos. O perímetro abdominal foi mensurado no ponto cranial aos membros pélvicos do animal e o índice de massa corporal (IMC) foi obtido pela relação entre o peso e o quadrado do mesmo comprimento. Considerou-se obesos os animais cujos valores de perímetro abdominal foram superiores a 17 e de IMC maiores que 0,68 (NOVELLI *et al.*, 2007; REYNÉS *et al.*, 2014)

Para o cálculo do percentual de adiposidade foram somados os pesos dos tecidos adiposos abdominal e epididimal, divididos pelo peso corporal total e multiplicado por 100. O índice hepatossomático foi calculado pela relação entre o peso do fígado e o peso corporal, também multiplicado por 100.

O coeficiente de eficiência alimentar (CEA) foi calculado pela relação entre o ganho de peso e a quantidade total de dieta consumida. Para calcular o coeficiente de eficiência energética (CEE) foram relacionados o peso corpóreo dos animais com o total de calorias consumidas.

4.7 Análises bioquímicas séricas

Foram realizadas análises dos marcadores de lipidemia (colesterol total, HDL-colesterol e triglicerídios), glicemia, função hepática (alanina e aspartato aminotransferase) e função renal (ácido úrico e creatinina) no soro dos animais utilizando-se kits (Bioclin[®]) disponíveis comercialmente.

4.8 Quantificação de citocinas

A quantificação da citocina antiinflamatória, interleucina 10 (IL-10), e pró-inflamatória, fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), no plasma dos animais foi realizada por meio do Kit *Cytometric Beads Array* (CBA) da marca BD[®] (CA, USA). Seis populações de *beads* com distintas intensidades de fluorescência foram conjugadas com um anticorpo de captura específico para cada citocina, que foram misturadas para formar o CBA. As populações de *beads* foram visualizadas de acordo com as suas respectivas intensidades de fluorescência: daquela menos brilhante para a mais brilhante. No CBA, as *beads* de captura das citocinas foram misturadas com o anticorpo de detecção conjugado com o fluorocromo PE, e depois incubadas com as amostras para formar o ensaio "em sanduíche". Os tubos de ensaio utilizados na análise foram preparados com 50 μ L de amostra, 50 μ L da mistura de *beads* e 50 μ L do reagente de detecção. O mesmo procedimento foi realizado para a obtenção da curva-padrão. Os tubos foram homogeneizados e incubados por duas horas, em temperatura ambiente, no escuro e lidas no canal FL3 do citômetro de fluxo FACScalibur (BD[®]). Os resultados foram obtidos com auxílio do software CellQuest (BD[®]).

4.9 Capacidade antioxidante total

Foi avaliada a capacidade antioxidante total do plasma (CAT) por meio de método de imunensaio enzimático, utilizando um kit específico (Sigma[®]). Este representa um método indireto fundamentado na capacidade alterada dos sistemas biológicos em modular a concentração de espécies reativas. O teste compara a atividade antioxidante da amostra de interesse (plasma) com uma amostra de referência, cuja atividade antioxidante foi previamente determinada. Dessa forma, se

avalia a capacidade antioxidante total do sangue, determinando, inespecificamente, a atividade de enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase e ainda compostos com atividade antioxidante como o ácido úrico, vitaminas e proteínas. O ensaio baseia-se na capacidade dos antioxidantes presentes na amostra em inibir a oxidação do radical ABTS (2,2'-azino-bis) (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) a ABTS[•] pela metamioglobina. A quantidade de ABTS[•] produzida pode ser monitorada por meio da leitura da absorvância a 750 ou 405 nm. Nessas condições, os antioxidantes presentes provocam uma supressão na absorvância em 750 nm ou 405 nm de forma proporcional à sua concentração na amostra. A capacidade dos antioxidantes presentes na amostra para evitar a oxidação de ABTS é comparado com o Trolox, análogo hidrossolúvel da vitamina E, e foi quantificada como milimolar de equivalentes de Trolox.

4.10 Análises histomorfométricas e histopatológicas

4.10.1 Tecido adiposo epididimal

O tecido adiposo fixado em formol tamponado 10% foi incluído em parafina. Os fragmentos foram imersos em solução etanólica 90% por 30 minutos, colocados duas vezes em etanol 100% por 30 minutos e por fim imersos em duas soluções de xilol, durante 15 minutos cada. Os tecidos foram então imersos em parafina fundida a 60°C por 1 hora e 30 minutos em estufa, sendo finalmente emblocados com parafina fundida (LU *et al.*, 2014).

Foram obtidos cortes histológicos semi-seriados com 5 µm de espessura em micrótomo manual utilizando-se navalha de aço inoxidável e, posteriormente, foram submetidos à coloração pela técnica Hematoxilina/Eosina. As lâminas foram montadas com Entellan (Merck®) e analisadas em microscópio de luz (Nikon Phase Contrast 0,90 Dry, Japão). As imagens foram obtidas em câmera digital ful-DIGI-PRO 5.0M com auxílio do software Micrometrics SE Premium (Accu-Scope®) (MORI *et al.*, 2014).

As imagens das secções histológicas foram capturadas com objetiva de 20X, sendo medidos o diâmetro, o perímetro e a área dos adipócitos com auxílio do aplicativo ImagePro-Plus® versão 4.5, usando o valor médio de mil adipócitos por grupo.

4.10.2 Fígado

Os fragmentos de fígado fixados em formol tamponado 10% foram lavados em etanol 70% por quatro vezes, transferidos para solução de etanol 95% por quatro horas, imersos em solução de álcool 95% e resina glicolmetacrilato (Leica, Histoiresin[®]) na proporção de 1:1 por 24 horas, resina pura durante 24 horas e posterior inclusão em resina pura contendo endurecedor (Leica, Histoiresin[®]).

Foram obtidos cortes histológicos semi-seriados com 3 µm de espessura em micrótomo automático (Leica[®]) utilizando-se navalha de vidro, que foram submetidos à coloração pela técnica Hematoxilina/Eosina. As lâminas foram montadas com Entellan (Merck[®]) e analisadas em microscópio de luz (Nikon Phase Contrast 0,90 Dry, Japão). As imagens foram obtidas em câmera digital ful-DIGI-PRO 5.0M com auxílio do software Micrometrics SE Premium (Accu-Scope[®]).

As imagens das secções histológicas foram capturadas com objetiva de 40X e os diâmetros dos hepatócitos e dos respectivos núcleos foram medidos com auxílio do aplicativo ImagePro-Plus[®] versão 4.5. Para visualização e quantificação das prováveis áreas de esteatose e de inflamação hepática, foi realizada contagem manual de pontos sobre o tecido, utilizando-se dez campos por animal.

4.11 Análises estatísticas

As análises foram conduzidas segundo o delineamento inteiramente casualizado. Para as análises químicas, os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e quando esta não foi conclusiva, realizou-se o teste de médias de Tukey, a 5% de probabilidade. Os dados dos tratamentos com animais foram submetidos à ANOVA, teste *post hoc* Duncan com nível de significância de 5%. Em seguida foi realizado o teste Dunnet para verificar a diferença dos grupos testes em relação ao controle negativo. Todas as análises estatísticas foram realizadas pelo programa SPSS Statistics, versão 20.0, 2011. Os gráficos foram confeccionados com auxílio do programa estatístico Sigma Plot, versão 11.0, 2008.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização físico-química

A polpa e os néctares apresentaram valores médios de acidez titulável, pH e sólidos solúveis correspondentes às exigências da legislação (acidez mínima de 0,2; pH 3,3-4,5; sólidos solúveis mínimo de 10) (Tabela 2). Sendo assim, os produtos utilizados neste trabalho atenderam aos padrões de qualidade exigidos.

Tabela 2: Acidez titulável, pH e sólidos solúveis da polpa e dos néctares de manga.

Produto	Acidez (%)	pH	Sólidos solúveis (°Brix)
Polpa	0,47 ^a ± 0,01	4,3 ^a ± 0,06	18 ^a ± 0,10
Néctar controle (NC)	0,24 ^c ± 0,01	4,4 ^a ± 0,06	11 ^c ± 0,15
Néctar com extrato (NE)	0,27 ^b ± 0,01	4,3 ^a ± 0,00	12 ^b ± 0,21

Médias seguidas pela mesma letra na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A manga Ubá apresentou elevada concentração de fenólicos totais e atividade antioxidante, o que indica o seu potencial protetor às doenças crônicas não transmissíveis (Figura 1). O acréscimo do extrato da casca de manga ao néctar aumentou ($p \leq 0,05$) a atividade antioxidante e o conteúdo de fenólicos totais em 32,4% ou mais. As concentrações de fenólicos totais encontradas foram pelo menos 18x superiores a outras variedades de manga analisadas por RIBEIRO *et al.* (2007) e 21x maior que os achados de SANTHIRASEGARAM; RAZALI; SOMAZUNDRAM (2013).

Os néctares expostos à temperatura da sala de experimentação e sob refrigeração não reduziram sua capacidade antioxidante ($p > 0,05$) (Figura 1). A estabilidade do néctar na sala de experimentação foi importante, pois os néctares foram oferecidos uma vez por dia aos animais e ficavam expostos à temperatura ambiente ($22^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$) por até 24 horas.

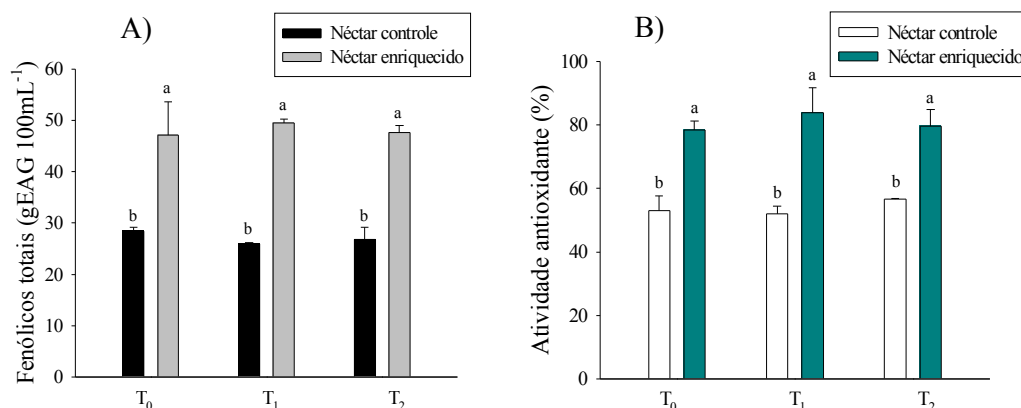


Figura 1: Concentração de fenólicos totais (A) e atividade antioxidante (B) dos néctares de manga logo após o preparo (T₀), armazenados 24h em temperatura ambiente (T₁) e 72h sob refrigeração (T₂).

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A polpa da manga Ubá estudada apresentou 2x menos água e proporcionalmente maior concentração de todos os demais nutrientes avaliados em relação aos valores encontrados no trabalho de MARQUES *et al.* (2010) e na tabela de composição de alimentos do United States Department of Agriculture (USDA, 2014) para outras variedades da fruta. Os resultados encontrados foram semelhantes aos achados de SILVA (2010) para manga Ubá. A adição do extrato da casca de manga ao néctar aumentou ($p \leq 0,05$) os conteúdos de lipídios, fibra alimentar solúvel, carboidratos digeríveis e calorias (Tabela 3). Embora o conteúdo de fibra alimentar total do néctar adicionado de extrato de casca de manga tenha apresentado apenas uma tendência de aumento ($p = 0,094$), foi 13,8% mais concentrado em relação ao néctar controle, indicando que algumas frações de fibra da casca foram também extraídas. Além disso, o valor calórico da porção usualmente consumida foi, no máximo, 90kcal/ 200mL (BRASIL, 2003). Ao contrário dos produtos desenvolvidos, os néctares encontrados no mercado não apresentam fibra alimentar e o conteúdo de carboidratos, principalmente açúcares, é bastante elevado, o que contribui para o aumento das calorias na porção.

Tabela 3: Composição química centesimal da polpa e dos néctares de manga ($\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$).

Compostos	Polpa	Néctar controle	Néctar com extrato
Água	$38,7^c \pm 0,23$	$88,7^{a*} \pm 0,23$	$87,9^b \pm 0,33$
Lipídios	$0,50^a \pm 0,04$	$0,09^b \pm 0,01$	$0,12^{b*} \pm 0,01$
Cinzas	$1,16^a \pm 0,05$	$0,21^b \pm 0,01$	$0,24^b \pm 0,01$
Proteínas	$1,50^a \pm 0,15$	$0,27^b \pm 0,02$	$0,28^b \pm 0,02$
FAI	$1,88^a \pm 0,17$	$0,34^b \pm 0,04$	$0,39^b \pm 0,08$
FAS	$1,64^a \pm 0,03$	$0,30^b \pm 0,00$	$0,35^{b*} \pm 0,01$
FAT	$3,52^a \pm 0,05$	$0,64^b \pm 0,04$	$0,74^b \pm 0,09$
CHO digeríveis	$54,6^a \pm 0,50$	$10,0^b \pm 0,26$	$10,7^{b*} \pm 0,30$
Kcal	$229^a \pm 1,33$	$42,1^c \pm 0,95$	$45,0^{b*} \pm 1,09$

Médias seguidas pela mesma letra na mesma linha não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

Médias dos néctares seguidas por asterisco na mesma linha diferem entre si por ANOVA a 5% de probabilidade.

FAI: fibra alimentar insolúvel; FAS: fibra alimentar solúvel; FAT: Fibra alimentar total; CHO: carboidratos.

5.2 Efeito dos néctares sobre as medidas biométricas e de consumo alimentar

O peso corporal dos ratos alimentados com a dieta hiperlipídica (HFD) antes do tratamento foi maior ($p \leq 0,05$) em relação à dieta controle negativo (AIN-93M), confirmando a indução da obesidade (Tabela S1). Os néctares controle e enriquecido apresentaram efeito positivo no controle do ganho de peso dos animais. Ressalta-se que o néctar controle foi mais efetivo, pois apresentou ganho de peso semelhante ($p > 0,05$) ao AIN-93M e inferior ($p \leq 0,05$) ao HFD (Tabela 4).

O grupo que recebeu a dieta AIN-93M apresentou maior consumo alimentar ($p \leq 0,05$) e menor ganho de peso ($p \leq 0,05$) em relação ao HFD antes e após a intervenção com os néctares. Além disso, o grupo HFD apresentou também maior coeficiente de eficiência alimentar (CEA) ($p \leq 0,05$), confirmando sua densidade calórica superior e eficácia em promover o ganho de peso dos animais (Tabelas 4 e S1). Após os tratamentos com os néctares nos grupos HFD a ingestão calórica por grama de peso corpóreo (CEE) foi semelhante ($p > 0,05$) ao AIN-93M (Tabela 4). Portanto, a ingestão calórica dos néctares foi adequada e não influenciou os resultados.

As medidas de perímetro abdominal e IMC indicaram a obesidade dos grupos HFD, de acordo com os pontos de cortes estabelecidos por NOVELLI *et al.* (2007) e

REYNÉS *et al.* (2014) (Tabela S1). Após a intervenção com os néctares não houve diferença estatística nessas medidas, entretanto os fitoquímicos encontrados nessas bebidas podem ser capazes de reduzir tanto o IMC quanto o perímetro abdominal, de acordo com o tempo de experimento e doses administradas (WANG *et al.*, 2010; YANG *et al.*, 2012)(Tabela 4).

O peso do fígado, do tecido adiposo visceral assim como dos índices que relacionam o peso desses órgãos com o peso dos animais foi maior ($p \leq 0,05$) para os animais alimentados com a dieta HFD (Tabela S1). O mesmo foi observado por LI *et al.* (2014) e ZHANG *et al.* (2012), em que o peso do fígado e o índice de adiposidade de ratos alimentados com dieta hiperlipídica foi maior em relação ao controle, indicando a obesidade dos animais. Após as intervenções com os néctares a gordura visceral, o índice hepatossomático e a adiposidade corpórea foram semelhantes ($p > 0,05$) ao AIN-93M (Tabela 4).

Tabela 4: Média e desvio padrão do consumo alimentar e medidas biométricas dos animais experimentais após os tratamentos com os néctares, durante 8 semanas.

Medidas	Grupos			
	AIN-93M	HFD	MHFD	HMHFD
Peso (g)	430 ^b ± 16,7	501 ^{a*} ± 38	472 ^{ab} ± 41	489 ^{a*} ± 54
Ganho de peso (g)	60 ^b ± 18,1	97 ^{a*} ± 16	65 ^b ± 25	83 ^{ab} ± 32
Consumo alimentar (g)	153 ^a ± 11	123 ^{b*} ± 7,5	112 ^{c*} ± 7,8	111 ^{c*} ± 11
CEA (g)	0,06 ^b ± 0,02	0,11 ^{a*} ± 0,02	0,08 ^{ab} ± 0,03	0,11 ^{a*} ± 0,04
CEE (kcal g ⁻¹)	9,5 ^a ± 0,64	8,0 ^{b*} ± 0,69	9,2 ^a ± 0,82	9,0 ^a ± 0,71
PA (cm)	18 ^b ± 0,89	20 ^{a*} ± 0,95	20 ^{a*} ± 1,3	19 ^a ± 1,3
IMC (g cm ⁻²)	0,62 ^a ± 0,09	0,70 ^a ± 0,04	0,64 ^a ± 0,07	0,65 ^a ± 0,11
Peso do Fígado (g)	13 ^b ± 1,0	19 ^{a*} ± 3,2	16 ^{a*} ± 2,3	17 ^{a*} ± 2,7
IHS	2,9 ^b ± 0,28	3,7 ^{a*} ± 0,42	3,4 ^a ± 0,38	3,5 ^a ± 0,55
Gordura visceral (g)	18 ^b ± 6,0	46 ^{a*} ± 15	32 ^a ± 12	41 ^{a*} ± 14
Adiposidade (%)	4,3 ^b ± 1,4	9,0 ^{a*} ± 2,3	6,9 ^a ± 2,6	8,2 ^{a*} ± 2,5

Médias seguidas pela mesma letra na mesma linha não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade.

Médias seguidas por asterisco na mesma linha diferem do controle negativo (AIN-93M) pelo teste de Dunnett a 5% de probabilidade.

AIN-93M: grupo controle negativo; HFD: grupo controle positivo; MHFD: grupo teste com néctar controle; HMHFD: grupo teste com néctar enriquecido com extrato da casca de manga; CEA: coeficiente de eficiência alimentar; CEE: coeficiente de eficiência energética; PA: perímetro abdominal; IMC: índice de massa corpórea; IHS: índice hepatossomático.

5.3 Variáveis bioquímicas séricas

Após a indução da obesidade, não houve diferença estatística da glicemia de jejum e dos triglicerídios séricos no grupo alimentado com a dieta hiperlipídica (HFD) em relação ao grupo que ingeriu a dieta controle negativo (AIN-93M). Entretanto, os valores médios encontrados indicam a alteração biológica prevista nesses grupos: AIN-93M com 110mg dL^{-1} de glicose e 137mg dL^{-1} de triglicerídeos e HFD com 120mg dL^{-1} e 150mg dL^{-1} , respectivamente.

O teste de tolerância oral à glicose não demonstrou alteração ($p>0,05$) entre os grupos experimentais. Entretanto, observou-se tendência no grupo HFD, de maior glicemia no tempo 60 minutos ($p=0,188$), o que indica uma possível resistência insulínica, que não foi verificada nos grupos que ingeriram os néctares. Assim como neste trabalho, ZHANG et al. (2012) também observaram maior tendência na concentração de glicose sérica nos ratos com dieta hiperlipídica e confirmaram a resistência à insulina pelo teste de sensibilidade a esse hormônio.

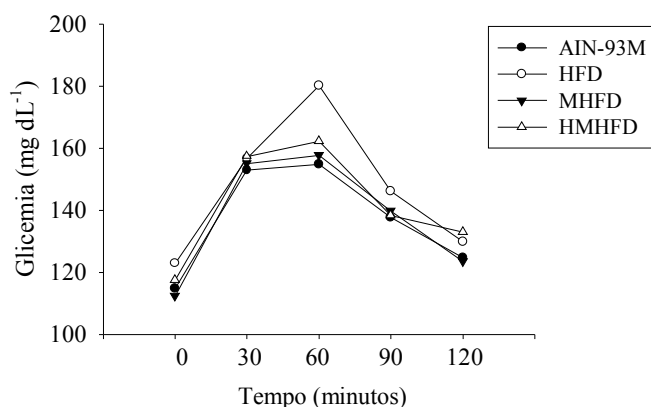


Figura 2: Valores de glicemia nos diferentes tempos do teste de tolerância oral à glicose (TTOG) após o tratamento com os néctares, por 8 semanas.

As médias não diferiram entre si pelos testes de Duncan e Dunnet a 5% de probabilidade.

AIN-93M: grupo controle negativo; HFD: grupo controle positivo; MHFD: grupo teste com néctar controle; HMHFD: grupo teste com néctar enriquecido com extrato da casca de manga.

A glicemia de jejum avaliada ao final do experimento não determinou diferença estatística entre os grupos e ficou dentro da faixa padrão para ratos Wistar (Tabela 5). Os níveis de ácido úrico do grupo que recebeu o néctar controle (MHFD)

não diferiam ($p>0,05$) do AIN-93M, demonstrando a eficácia do alimento teste em melhorar a função renal. Os compostos fenólicos são substâncias que tem a capacidade de melhorar o perfil de lipídios, reduzindo o colesterol total, os triglicerídios e elevando a concentração de HDL (LEIHERER; MÜNDLEIN; DREXEL, 2013; YUNG *et al.*, 2013; KUMAR *et al.*, 2014). A fração HDL colesterol foi maior ($p\leq 0,05$) no grupo com néctar enriquecido (HMHFD). Além disso a relação colesterol total/ HDL foi semelhante ($p>0,05$) entre os animais teste e o AIN-93M, indicando o potencial efeito da manga em retornar aos níveis fisiológicos normais.

Tabela 5: Valores bioquímicos séricos dos animais experimentais após o tratamento com os néctares de manga, durante 8 semanas ($\text{mg}\cdot\text{dL}^{-1}$).

Variáveis	AIN-93M	HFD	MHFD	HMHFD	Padrão*
Glicemia de jejum	114 ^a ± 16	123 ^a ± 18	112 ^a ± 15	118 ^a ± 21	79-144
Colesterol total	68 ^a ± 8,4	71 ^a ± 12	63 ^a ± 3,9	66 ^a ± 4,1	55-79
HDL colesterol	23 ^{ab} ± 1,3	22 ^b ± 4,6	24 ^{ab} ± 2,3	26 ^a ± 1,9	16-54 [#]
CT/HDL	2,8 ^b ± 0,19	3,3 ^a ± 0,39	2,7 ^b ± 0,38	2,6 ^b ± 0,23	-
Triglicerídios	64 ^b ± 9,8	74 ^b ± 22	73 ^b ± 18	205 ^{a*} ± 36	42-160
Creatinina	0,58 ^a ± 0,10	0,61 ^a ± 0,08	0,65 ^a ± 0,05	0,65 ^a ± 0,04	0,44-0,64
Ácido úrico	1,5 ^b ± 0,40	2,5 ^a ± 0,23	2,2 ^{ab} ± 0,93	2,5 ^a ± 0,59	0,9-2,0
ALT ($\text{U}\cdot\text{L}^{-1}$)	48 ^b ± 7,4	225 ^{a*} ± 79	50 ^b ± 23	53 ^b ± 17	36-58
AST ($\text{U}\cdot\text{L}^{-1}$)	150 ^a ± 47	158 ^a ± 52	163 ^a ± 20	152 ^a ± 24	81-180

Médias seguidas pela mesma letra na mesma linha não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade.

Médias seguidas por asterisco na mesma linha diferem do controle negativo (AIN-93M) pelo teste de Dunnet a 5% de probabilidade.

*MELO *et al.* (2012)

[#]SPINELLI *et al.* (2014)

AIN-93M: grupo controle negativo; HFD: grupo controle positivo; MHFD: grupo teste com néctar controle; HMHFD: grupo teste com néctar enriquecido com extrato da casca de manga; CT: colesterol total; HDL: high density lipoprotein; ALT: alanina aminotransferase; AST: aspartato aminotransferase.

A alanina aminotransferase (ALT) e a aspartato aminotransferase (AST), estão envolvidas de forma importante na gliconeogênese promovendo a transferência dos grupos amino da alanina e aspartato para o alfacetoglutarato, que se transforma em glutamato e piruvato. Alterações nos níveis dessas enzimas geralmente estão relacionadas com lesões hepáticas, órgão responsável pela maior parte das reações

metabólicas do organismo. Entretanto, a AST é um marcador menos sensível de lesão em relação à ALT, pois apresenta uma vida-média de apenas 12h, e, consequentemente, normalização mais rápida dos níveis séricos. Além disso, a atividade hepática mais intensa da ALT e a localização estritamente citosólica, principalmente em ratos, evidenciam a maior concentração dessa enzima para o dano hepático moderado (RAMAIAH, 2007). No presente estudo foram observadas concentrações de AST correspondentes ao padrão de roedores em todos os grupos experimentais e aumento nos níveis séricos de ALT para o grupo HFD, indicando lesão hepática causada pela dieta hiperlipídica, posteriormente normalizada pelos dois néctares ($p \leq 0,05$).

5.4 Citocinas pró e antiinflamatórias

As citocinas pró e antiinflamatórias são fatores de risco importantes observados na obesidade (JU *et al.*, 2011; MORAES *et al.*, 2012). Neste sentido, é importante realizar essas análises para identificar o estágio inicial da doença e evitar sua progressão.

A manga, principalmente da variedade Ubá, é uma fruta que contém quantidade expressiva de compostos antioxidantes tanto na polpa quanto na casca (BERARDINI *et al.*, 2005; RIBEIRO *et al.*, 2008; ARAÚJO *et al.*, 2014). Esses compostos estão relacionados com a redução dos marcadores inflamatórios presentes na obesidade, como TNF- α , IL-6, MCP-1, e elevação da expressão de moléculas antiinflamatórias, como IL-10 e adiponectina (SEYMOUR *et al.*, 2009; LUVIZOTTO *et al.*, 2015).

As concentrações da interleucina IL-10 foram semelhantes entre os grupos ($p > 0,05$), porém houve tendência ($p = 0,159$) de maior valor para o grupo alimentado com o néctar controle (MHFD). Observou-se também que os níveis de TNF- α foram maiores ($p \leq 0,05$) no controle positivo (HFD) em relação aos outros grupos, indicando que a manga reverteu o efeito inflamatório causado pela dieta hiperlipídica nos dois grupos testes.

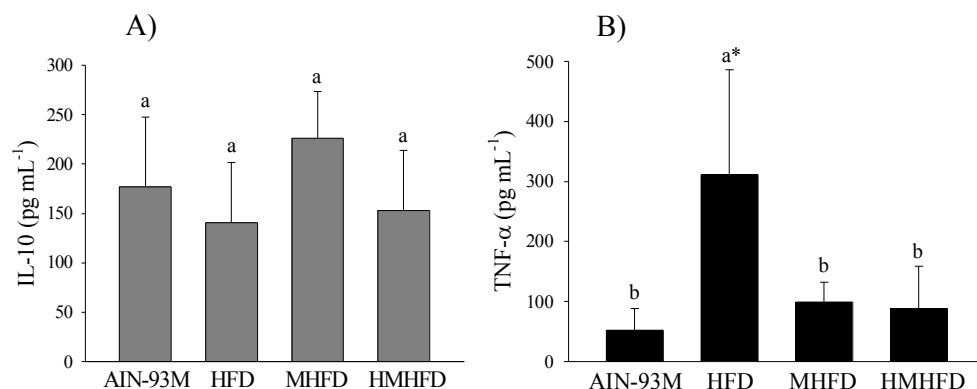


Figura 3: Efeito do néctar controle de manga e néctar enriquecido com extrato da casca de manga na expressão de citocinas, anti-inflamantória, (IL-10) (A) e, pró-inflamatória, Fator de Necrose Tumoral (TNF-alfa) (B), no plasma dos animais experimentais.

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade.

Médias seguidas por asterisco diferem do controle negativo (AIN-93M) pelo teste de Dunnet a 5% de probabilidade.

AIN-93M: grupo controle negativo; HFD: grupo controle positivo; MHFD: grupo teste com néctar controle; HMHFD: grupo teste com néctar enriquecido com extrato da casca de manga.

5.5 Ingestão de néctares e atividade antioxidante *in vivo*

De acordo com a concentração de fenólicos totais e a atividade antioxidante avaliados nas bebidas, calculou-se a ingestão desses compostos pelos animais. Os animais que receberam o néctar de manga controle (MHFD) apresentaram menor ingestão ($p \leq 0,05$) de fenólicos totais e antioxidantes assim como maior capacidade antioxidante total do plasma (CAT) em relação aos demais grupos experimentais (Figura 4). Porém a CAT do plasma dos animais que ingeriram o néctar enriquecido com extrato da casca de manga foi semelhante ($p > 0,05$) aos controles.

Segundo RIBEIRO et al. (2008), a casca de manga contém muitos flavonóides e xantonas, como mangiferina, quercetina e kemferol, valores de 32 a 404x superiores aos encontrados para a polpa. Assim, pode ter ocorrido uma superdosagem de antioxidantes aos animais do grupo que recebeu o néctar enriquecido com o extrato da casca de manga, suficiente para inverter o efeito antioxidante e promover a oxidação (VIHAKAS et al., 2014).

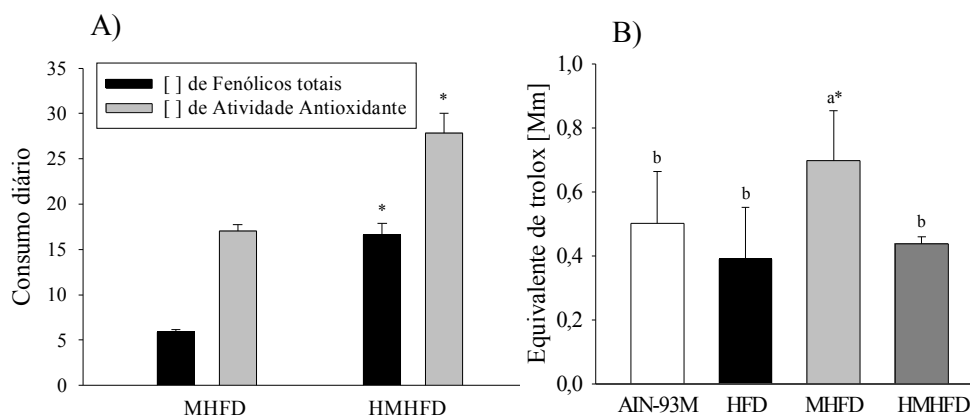


Figura 4: A) Contribuição dos néctares de manga no consumo de fenólicos totais e na capacidade antioxidante. B) Efeito do néctar de manga controle e néctar enriquecido com extrato da casca de manga na capacidade antioxidante total do plasma (CAT).

Médias da análise de fenólicos totais e antioxidantes seguidas por asterisco diferem entre si por ANOVA a 5% de probabilidade.

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade.

Médias da análise de CAT seguidas por asterisco diferem do controle negativo (AIN-93M) pelo teste de Dunnet a 5% de probabilidade.

AIN-93M: grupo controle negativo; HFD: grupo controle positivo; MHFD: grupo teste com néctar controle; HMHFD: grupo teste com néctar enriquecido com extrato da casca de manga.

5.6 Histomorfometria e histopatologia

A determinação das medidas celulares são procedimentos fundamentais para identificação de atrofia, hipertrofia e outras alterações celulares, com consequente associação de patologias (SAMPEY *et al.*, 2011; ANDRADE *et al.*, 2013). Por muitos anos tem sido apontado que a dieta hiperlipídica purificada é adequada para induzir obesidade em animais experimentais, refletindo a obesidade humana que ocorre devido à alimentação rica em gordura saturada e açúcares simples (YANG *et al.*, 2011; TEKELESELASSIE *et al.*, 2013; TINKOV *et al.*, 2015).

Nas quatro fotomicrografias seguintes é possível observar a hipertrofia das células adiposas no grupo alimentado com a dieta hiperlipídica (HFD) em comparação ao controle negativo (AIN-93M) e redução desse tamanho após a intervenção com os néctares de manga (Figura 5).

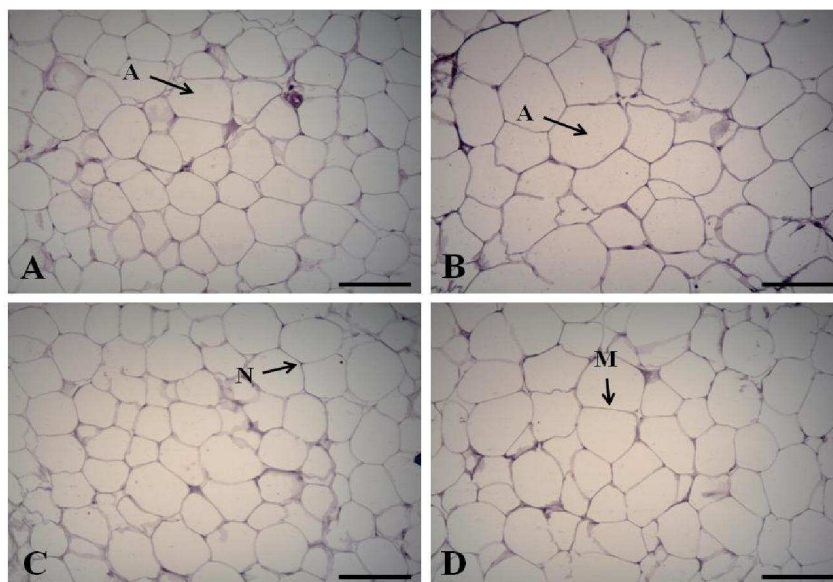


Figura 5: Fotomicrografias dos tecidos adiposos epididimais dos diferentes grupos experimentais.

A: adipócito; N: núcleo do adipócito; M: membrana do adipócito. Coloração HE. Barra de 100 μ m

A - AIN-93M: grupo controle negativo; B - HFD: grupo controle positivo; C - MHFD: grupo teste com néctar controle; D - HMHFD: grupo teste com néctar enriquecido com extrato da casca de manga.

Os maiores valores de diâmetro, perímetro e da área dos adipócitos foram encontrados no grupo HFD ($p \leq 0,05$), confirmando a obesidade induzida pela dieta hiperlipídica observada anteriormente (Tabela 6).

As medidas dos adipócitos foram menores ($p \leq 0,05$) após o tratamento com os néctares de manga, confirmando a efetividade protetora desses alimentos contra a obesidade (Tabela 6). Assim como outras pesquisas, foi demonstrada nesse estudo a capacidade dos compostos antioxidantes em controlar a obesidade e reduzir a hipertrofia das principais células armazenadoras de lipídios (YANG *et al.*, 2008; JU *et al.*, 2011; SHEN *et al.*, 2012).

Tabela 6: Medidas das células do tecido adiposo epididimal dos animais dos diferentes grupos experimentais (μm).

Grupos	Diâmetro	Perímetro	Área
AIN-93M	67,2 ^b $\pm$ 17	275 ^c $\pm$ 40	4439 ^d $\pm$ 1370
HFD	83,5 ^{a*} $\pm$ 19	331 ^{a*} $\pm$ 55	6133 ^{a*} $\pm$ 2249
MHFD	68,0 ^b $\pm$ 23	314 ^{b*} $\pm$ 51	5296 ^{b*} $\pm$ 1679
HMHFD	67,3 ^b $\pm$ 23	315 ^{b*} $\pm$ 55	5042 ^{c*} $\pm$ 1716

Médias seguidas pela mesma letra na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade.

Médias seguidas por asterisco na mesma coluna diferem do controle negativo (AIN-93M) pelo teste de Dunnet a 5% de probabilidade.

AIN-93M: grupo controle negativo; HFD: grupo controle positivo; MHFD: grupo teste com néctar controle; HMHFD: grupo teste com néctar enriquecido com extrato da casca de manga.

A seguir visualiza-se a presença de gordura no citoplasma dos hepatócitos dos grupos alimentados com a dieta hiperlipídica (Figura 6). Essa característica evidencia e esteatose hepática provocada após a indução da obesidade nos animais, sendo condizente com os resultados encontrados por LI *et al.* (2014).

Observa-se também que o tratamento com os néctares foi eficaz em reduzir a concentração de gordura no citoplasma das células hepáticas e a ação antioxidante dos fitoquímicos presentes nessas bebidas foi eficaz em reparar esse quadro (Figura 6).

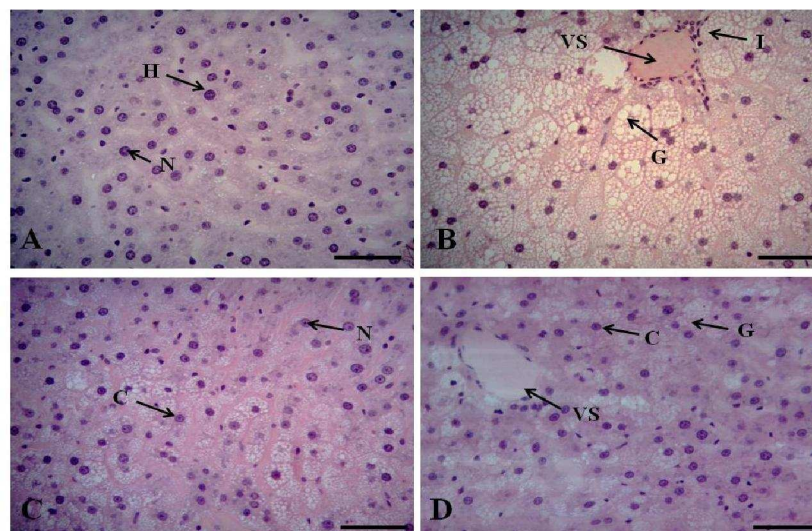


Figura 6: Fotomicrografias dos fígados dos diferentes grupos experimentais.

H: hepatócito; N: núcleo do hepatócito; C: citoplasma do hepatócito; G: gotícula de gordura; I: infiltrado inflamatório; VS: vaso sanguíneo. Coloração HE. Barra de 50 μ m.

A - AIN-93M: grupo controle negativo; B - HFD: grupo controle positivo; C - MHFD: grupo teste com néctar controle; D - HMHFD: grupo teste com néctar enriquecido com extrato da casca de manga.

O grupo alimentado com a dieta HFD apresentou diâmetro dos hepatócitos maior ($p \leq 0,05$) em relação ao AIN-93M e semelhante ao grupo que ingeriu o néctar controle, indicando hipertrofia celular resultante da ingestão da dieta hiperlipídica. Já no grupo que ingeriu o néctar enriquecido (HMHFD), o diâmetro dessas células foi inferior ($p \leq 0,05$) ao AIN-93M, demonstrando que o enriquecimento com o extrato de casca de manga foi eficaz em reverter o estado obesogênico, reduzindo o volume celular (Figura 7).

As medidas do diâmetro do núcleo dos hepatócitos, confirmaram a hipertrofia ($p \leq 0,05$) causada pela dieta hiperlipídica no grupo HFD, e a efetividade de ambos os néctares em retornar ao padrão fisiológico ($p \leq 0,05$) (Figura 7).

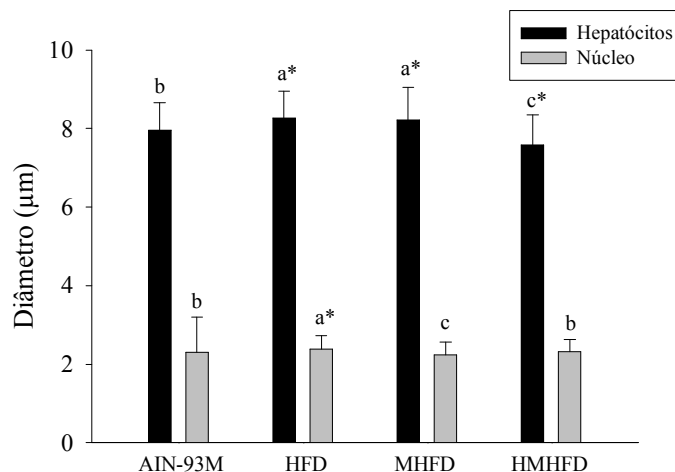


Figura 7: Diâmetro do citoplasma e do núcleo dos hepatócitos dos animais dos diferentes grupos experimentais (µm).

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade.

Médias seguidas por asterisco na mesma coluna diferem do controle negativo (AIN-93M) pelo teste de Dunnett a 5% de probabilidade.

AIN-93M: grupo controle negativo; HFD: grupo controle positivo; MHFD: grupo teste com néctar controle; HMHFD: grupo teste com néctar enriquecido com extrato da casca de manga.

Assim como LI *et al.* (2014), foi encontrado aumento da adiposidade e da inflamação nas células hepáticas ($p \leq 0,05$), apontando novamente a eficácia da dieta hiperlipídica na indução da obesidade (Tabela 7).

O néctar controle foi capaz de reduzir essas alterações no fígado dos animais, aumentando o percentual de células, reduzindo a gordura e o infiltrado inflamatório ($p \leq 0,05$) (Tabela 7). O néctar enriquecido também reduziu a gordura e a inflamação ($p \leq 0,05$), porém apresentou percentual de hepatócitos semelhante ($p > 0,05$) ao grupo HFD. Sendo assim, a atividade antioxidante dos compostos bioativos dos néctares foi eficiente no controle das alterações hepáticas provocadas pela dieta hiperlipídica utilizada.

Tabela 7: Níveis percentuais dos componentes estruturais do fígado dos animais dos diferentes grupos experimentais.

Estruturas	AIN-93M	HFD	MHFD	HMHFD
Citoplasma	10,8 ^{ab} ± 1,3	8,7 ^b ± 2,1	12,2 ^a ± 2,7	8,4 ^b ± 1,8
Núcleo	1,1 ^{ab} ± 0,32	0,90 ^b ± 0,26	1,3 ^a ± 0,20	1,0 ^{ab} ± 0,16
Gordura	1,5 ^c ± 0,51	33,6 ^{a*} ± 9,3	14,0 ^{b*} ± 7,3	13,0 ^{b*} ± 9,0
Vasos sanguíneos	17,5 ^{ab} ± 3,9	12,0 ^{c*} ± 4,1	14,2 ^{bc} ± 2,2	20,4 ^a ± 2,6
Infiltrado inflamatório	2,1 ^b ± 0,63	3,1 ^{a*} ± 0,54	1,9 ^b ± 0,58	1,7 ^b ± 0,58
Tecido conjuntivo	67,0 ^a ± 4,8	41,7 ^{c*} ± 6,4	56,4 ^{b*} ± 4,3	55,5 ^{b*} ± 5,6

Médias seguidas pela mesma letra na mesma linha não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade.

Médias seguidas por asterisco na mesma linha diferem do controle negativo (AIN-93M) pelo teste de Dunnet a 5% de probabilidade.

AIN-93M: grupo controle negativo; HFD: grupo controle positivo; MHFD: grupo teste com néctar controle; HMHFD: grupo teste com néctar enriquecido com extrato da casca de manga.

6 CONCLUSÕES

A polpa e os néctares controle e enriquecido com o extrato da casca de manga apresentaram as características de acidez titulável, pH e sólidos solúveis adequadas ao estabelecido pela legislação brasileira. A composição química centesimal, a concentração de fenólicos totais e a atividade antioxidante foram superiores para o néctar enriquecido.

A ingestão dos néctares de manga controle e enriquecido com extrato da casca apresentou efeito anti-inflamatório e anti-obesogênico, pois reduziu a citocina pró-inflamatória TNF- α , a hipertrofia dos adipócitos, a esteatose e a inflamação hepática e, conseqüentemente, as medidas biométricas dos animais.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O efeito antioxidante foi observado pela ação do néctar controle, enquanto o néctar enriquecido apresentou efeito um pró-oxidante inesperado. Sugere-se que novos testes sejam conduzidos em outros tecidos ou com a utilização de menor quantidade de casca no extrato, para manter a atividade antioxidante biológica elevada.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia Celular e Molecular**. Elsevier: São Paulo, 2008. 504p.

AJILA, C. M.; PRASADA RAO, U. J. S. Protection against hydrogen peroxide induced oxidative damage in rat erythrocytes by *Mangifera indica* L. peel extract. **Food and Chemical Toxicology**, v.46, n.1, p.303-309, 2008.

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Biologia Molecular da Célula**. 5ª Ed. Artmed: Porto Alegre, 2010. 1396p.

ANDRADE, G.; ALMEIDA, C.; ESPESCHIT, A.; DANTAS, M. I.; BENJAMIN, L.; RIBEIRO, S.; MARTINO, H. The addition of whole soy flour to cafeteria diet reduces metabolic risk markers in wistar rats. **Lipids in Health and Disease**, v.12, n.1, p.145, 2013.

AOAC. **Official Methods of Analysis**. Washington (D.C.): Association of Official Analytical Chemists, 2012.

ARAÚJO, K.; MAGNANI, M.; NASCIMENTO, J.; SOUZA, A.; EPAMINONDAS, P.; SOUZA, A.; QUEIROZ, N.; SOUZA, A. Antioxidant Activity of Co-Products from Guava, Mango and Barbados Cherry Produced in the Brazilian Northeast. **Molecules**, v.19, n.3, p.3110-3119, 2014.

BARBALHO, S. M.; SOARES DE SOUZA, M. D. S.; BUENO, P. C. D. S.; GUIGUER, É. L.; FARINAZZI-MACHADO, F. M. V.; ARAÚJO, A. C.; MENEGUIM, C. O.; PASCOAL SILVEIRA, E.; DE SOUZA OLIVEIRA, N.; DA SILVA, B. C.; BARBOSA, S. D. S.; MENDES, C. G.; GONÇALVES, P. R. *Annona montana* Fruit and Leaves Improve the Glycemic and Lipid Profiles of Wistar Rats. **Journal of Medicinal Food**, v.15, n.10, p.917-922, 2012.

BERARDINI, N.; KNÖDLER, M.; SCHIEBER, A.; CARLE, R. Utilization of mango peels as a source of pectin and polyphenolics. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v.6, n.4, p.442-452, 2005.

BLOIS, M. S. Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical. **Nature**, v.181, n.4617, print, p.1199-1200, 1958.

BRASIL. Regulamento Técnico sobre Rotulagem Nutricional de Alimentos Embalados. **Resolução RDC nº 359 de 23 de dezembro de 2003**. Brasília, DF: Diário Oficial União, 2003.

_____. Regulamento técnico sobre os parâmetros e critérios para o controle higiênico-sanitário em estabelecimentos de alimentos. **Portaria CVS nº 18 de 09 de setembro de 2008**. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Brasília, DF: Diário Oficial da União, 2008.

EMBRAPA. Mandioca e Fruticultura. **A cultura da manga**. Disponível em <http://www.cnpmf.embrapa.br/index.php?p=pesquisa-culturas_pesquisadas-manga.php>. Acesso em 05 de dez. de 2014.

FAO. Food and Agriculture Organization. **Agronoticias: América Latina e o Caribe**. Disponível em: <<http://www.abanorte.com.br/noticias/noticias-da-pagina-inicial/a-producao-mundial-de-frutas-tropicais-atingira-82-milhoes-de-toneladas-em-2014/>>. Acesso em 20 de ago. de 2013.

FAOSTAT. Food and Agriculture Organization of the United Nations. **FAO statistical databases agriculture**. Disponível em: <<http://faostat3.fao.org>>. Acesso em 28 de nov. de 2014.

FERRAZ, M. S. **Perspectivas de mercado - Produção e consumo de manga**. I Simpósio de Manga do Vale do São Francisco, 2005.

HARAZAKI, T.; INOUE, S.; IMAI, C.; MOCHIZUKI, K.; GODA, T. Resistant starch improves insulin resistance and reduces adipose tissue weight and CD11c expression in rat OLETF adipose tissue. **Nutrition**, v.30, n.5, p.590-595, 2014.

JING, P.; ZHAO, S.-J.; JIAN, W.-J.; QIAN, B.-J.; DONG, Y.; PANG, J. Quantitative Studies on Structure-DPPH• Scavenging Activity Relationships of Food Phenolic Acids. **Molecules**, v.17, n.11, p.12910-12924, 2012.

JU, J.-H.; YOON, H.-S.; PARK, H.-J.; KIM, M.-Y.; SHIN, H.-K.; PARK, K.-Y.; YANG, J.-O.; SOHN, M.-S.; DO, M.-S. Anti-Obesity and Antioxidative Effects of Purple Sweet Potato Extract in 3T3-L1 Adipocytes In Vitro. **Journal of Medicinal Food**, v.14, n.10, p.1097-1106, 2011.

JUNQUEIRA, L. C. U.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 12^a Ed. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 2013. 556p.

KUMAR, V.; ANWAR, F.; AHMED, D.; VERMA, A.; AHMED, A.; DAMANHOURI, Z.; MISHRA, V.; RAMTEKE, P.; BHATT, P. C.; MUJEEB, M. Paederia foetida Linn. leaf extract: an antihyperlipidemic, antihyperglycaemic and antioxidant activity. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v.14, n.1, p.76, 2014.

LEIHERER, A.; MÜNDLEIN, A.; DREXEL, H. Phytochemicals and their impact on adipose tissue inflammation and diabetes. **Vascular Pharmacology**, v.58, n.1-2, p.3-20, 2013.

LI, S.; MENG, F.; LIAO, X.; WANG, Y.; SUN, Z.; GUO, F.; LI, X.; MENG, M.; LI, Y.; SUN, C. Therapeutic Role of Ursolic Acid on Ameliorating Hepatic Steatosis and Improving Metabolic Disorders in High-Fat Diet-Induced Non-Alcoholic Fatty Liver Disease Rats. **PLoS ONE**, v.9, n.1, p.1-13, 2014.

LU, K.; XIE, S.; HAN, S.; ZHANG, J.; CHANG, X.; CHAO, J.; HUANG, Q.; YUAN, Q.; LIN, H.; XU, L.; SHEN, C.; TAN, M.; QU, S.; WANG, C.; SONG, X. Preparation of a nano emodin transfersome and study on its anti-obesity mechanism in adipose tissue of diet-induced obese rats. **Journal of Translational Medicine**, v.12, n.1, p.1-14, 2014.

LUVIZOTTO, R.; NASCIMENTO, A.; MIRANDA, N.; WANG, X.-D.; FERREIRA, A. Lycopene-rich tomato oleoresin modulates plasma adiponectin concentration and mRNA levels of adiponectin, SIRT1, and FoxO1 in adipose tissue of obese rats. **Human & Experimental Toxicology**, 2015.

MARQUES, A.; CHICAYBAM, G.; ARAUJO, M. T.; MANHÃES, L. R. T.; SABAA-SRUR, A. U. O. Composição centesimal e de minerais de casca e polpa de manga (*Mangifera indica* L.) cv. Tommy Atkins. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.32, p.1206-1210, 2010.

MAURAY, A.; FELGINES, C.; MORAND, C.; MAZUR, A.; SCALBERT, A.; MILENKOVIC, D. Bilberry anthocyanin-rich extract alters expression of genes related to atherosclerosis development in aorta of apo E-deficient mice. **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases**, v.22, n.1, p.72-80, 2012.

MELO, M. G. D.; DORIA, G. A. A.; SERAFINI, M. R.; ARAUJO, A. A. S. Valores de referência Hematológicos e Bioquímicos de Ratos (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar) provenientes do biotério central da Universidade Federal de Sergipe. **Scientia Plena**, v.8, n.9, p.1-6, 2012.

MERCALI, G. D.; JAESCHKE, D. P.; TESSARO, I. C.; MARCZAK, L. D. F. Degradation kinetics of anthocyanins in acerola pulp: Comparison between ohmic and conventional heat treatment. **Food Chemistry**, v.136, n.2, p.853-857, 2013.

MORAES, É. A.; NATAL, D. I. G.; QUEIROZ, V. A. V.; SCHAFFERT, R. E.; CECON, P. R.; DE PAULA, S. O.; BENJAMIM, L. D. A.; RIBEIRO, S. M. R.; MARTINO, H. S. D. Sorghum genotype may reduce low-grade inflammatory response and oxidative stress and maintains jejunum morphology of rats fed a hyperlipidic diet. **Food Research International**, v.49, n.1, p.553-559, 2012.

MORI, S.; KIUCHI, S.; OUCHI, A.; HASE, T.; MURASE, T. Characteristic Expression of Extracellular Matrix in Subcutaneous Adipose Tissue Development and Adipogenesis; Comparison with Visceral Adipose Tissue. **International Journal of Biological Sciences**, v.10, n.8, p.825-833, 2014.

NAIR, A. R.; ELKS, C. M.; VILA, J.; DEL PIERO, F.; PAULSEN, D. B.; FRANCIS, J. A Blueberry-Enriched Diet Improves Renal Function and Reduces Oxidative Stress in Metabolic Syndrome Animals: Potential Mechanism of TLR4-MAPK Signaling Pathway. **PLoS ONE**, v.9, n.11, p.1-12, 2014.

NOVELLI, E. L. B.; DINIZ, Y. S.; GALHARDI, C. M.; EBAID, G. M. X.; RODRIGUES, H. G.; MANI, F.; FERNANDES, A. A. H.; CICOGNA, A. C.; NOVELLI FILHO, J. L. V. B. Anthropometrical parameters and markers of obesity in rats. **Laboratory Animals**, v.41, n.1, p.111-119, 2007.

OLIVEIRA, L. D. S.; MOURA, C. F. H.; DE BRITO, E. S.; MAMEDE, R. V. S.; DE MIRANDA, M. R. A. Antioxidant Metabolism during Fruit Development of Different Acerola (*Malpighia emarginata* D.C) Clones. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.60, n.32, p.7957-7964, 2012.

PADILLA, J.; JENKINS, N. T.; VIEIRA-POTTER, V. J.; LAUGHLIN, M. H. Divergent phenotype of rat thoracic and abdominal perivascular adipose tissues. **American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v.304, n.7, p.R543-R552, 2013.

RAMAIAH, S. K. A toxicologist guide to the diagnostic interpretation of hepatic biochemical parameters. **Food and Chemical Toxicology**, v.45, n.9, p.1551-1557, 2007.

REEVES, P. G.; NIELSEN, F. H.; FAHEY JR., G. C. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of nutrition ad hoc Writing Committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. **Journal of Nutrition**, v.123, p.1939-1951, 1993.

REYNÉS, B.; GARCÍA-RUIZ, E.; DÍAZ-RÚA, R.; PALOU, A.; OLIVER, P. Reversion to a control balanced diet is able to restore body weight and to recover altered metabolic parameters in adult rats long-term fed on a cafeteria diet. **Food Research International**, v.64, p.839-848, 2014.

RESEARCH DIETS®. **Open formula purified diets for lab animals - D12079B**. OPEN SOURCE DIETS, 2006.

RIBEIRO, S. M. R.; QUEIROZ, J. H.; QUEIROZ, M. E. L. R. D.; CAMPOS, F. M.; SANT'ANA, H. M. P. Antioxidant in Mango (*Mangifera indica* L.) Pulp. **Plant Foods for Human Nutrition**, v.62, n.1, p.13-17, 2007.

RIBEIRO, S. M. R.; BARBOSA, L. C. A.; QUEIROZ, J. H.; KNÖDLER, M.; SCHIEBER, A. Phenolic compounds and antioxidant capacity of Brazilian mango (*Mangifera indica* L.) varieties. **Food Chemistry**, v.110, n.3, p.620-626, 2008.

SAMPEY, B.; VANHOOSE, A.; WINFIELD, H.; FREEMERMAN, A.; MUEHLBAUER, M.; FUEGER, P.; NEWGARD, C.; MAKOWSKI, L. Cafeteria diet is a robust model of human metabolic syndrome with liver and adipose inflammation: comparison to high-fat diet. **Obesity**, v.19, n.6, p.1109 - 1117, 2011.

SAMPEY, B. P.; FREEMERMAN, A. J.; ZHANG, J.; KUAN, P.-F.; GALANKO, J. A.; O'CONNELL, T. M.; ILKAYEVA, O. R.; MUEHLBAUER, M. J.; STEVENS, R. D.; NEWGARD, C. B.; BRAUER, H. A.; TROESTER, M. A.; MAKOWSKI, L. Metabolomic Profiling Reveals Mitochondrial-Derived Lipid Biomarkers That Drive Obesity-Associated Inflammation. **PLoS ONE**, v.7, n.6, p.1-10, 2012.

SANTHIRASEGARAM, V.; RAZALI, Z.; SOMASUNDRAM, C. Effects of thermal treatment and sonication on quality attributes of Chokanan mango (*Mangifera indica* L.) juice. **Ultrasonics Sonochemistry**, v.20, n.5, p.1276-1282, 2013.

SEYMOUR, E. M.; LEWIS, S. K.; URCUYO-LLANES, D. E.; TANONE, I. I.; KIRAKOSYAN, A.; KAUFMAN, P. B.; BOLLING, S. F. Regular Tart Cherry Intake Alters Abdominal Adiposity, Adipose Gene Transcription, and Inflammation in Obesity-Prone Rats Fed a High Fat Diet. **Journal of Medicinal Food**, v.12, n.5, p.935-942, 2009.

SHEN, C.-L.; CAO, J. J.; DAGDA, R. Y.; CHANJAPLAMMOOTIL, S.; LU, C.; CHYU, M.-C.; GAO, W.; WANG, J.-S.; YEH, J. K. Green tea polyphenols benefits body composition and improves bone quality in long-term high-fat diet-induced obese rats. **Nutrition Research**, v.32, n.6, p.448-457, 2012.

SHIN, J. H.; LEE, C. W.; OH, S. J.; YUN, J.; KANG, M. R.; HAN, S.-B.; PARK, H.; JUNG, J. C.; CHUNG, Y. H.; KANG, J. S. Hepatoprotective Effect of Aged Black Garlic Extract in Rodents. **Toxicological Research**, v.30, n.1, p.49-54, 2014.

SILVA, B. **Desenvolvimento de suco de manga enriquecido com extrato obtido da casca de manga Ubá - Parceria Departamento de Nutrição e Saúde/UFV/ e Agrofruit Internacional do Brasil Ltda (Visconde do Rio Branco, MG).** 32f.

Relatório de Iniciação Científica (Graduação em Nutrição) - Universidade federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2010.

SINGLETON, V.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTOS, R. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. **Methods Enzymol**, v.299, p.152 - 178, 1999.

SOARES, S.; SOUSA, A.; MATEUS, N.; DE FREITAS, V. Effect of Condensed Tannins Addition on the Astringency of Red Wines. **Chemical Senses**, v.37, n.2, p.191-198, 2012.

SPINELLI, M. O.; CRUZ, R. J.; GODOY, C. M. S. C.; MOTTA, M. C.; DAMY, S. B. Estudo da variação sazonal dos parâmetros bioquímicos de roedores e lagomorfos do Biotério da Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v.36, n.2, p.219-225, 2014.

SUZUKI, R.; TANAKA, M.; TAKANASHI, M.; HUSSAIN, A.; YUAN, B.; TOYODA, H.; KURODA, M. Anthocyanidins-enriched bilberry extracts inhibit 3T3-L1 adipocyte differentiation via the insulin pathway. **Nutrition & Metabolism**, v.8, p.1-9, 2011.

TEKELESELASSIE, A. W.; GOH, Y. M.; RAJION, M. A.; MOTSHAKERI, M.; EBRAHIMI, M. A High-Fat Diet Enriched with Low Omega-6 to Omega-3 Fatty Acid Ratio Reduced Fat Cellularity and Plasma Leptin Concentration in Sprague-Dawley Rats. **The Scientific World Journal**, p.1-7, 2013.

TINKOV, A. A.; AJSUVAKOVA, O. P.; SHEHTMAN, A. M.; BOEV, V. M.; NIKONOROV, A. A. Influence of iron and copper consumption on weight gain and oxidative stress in adipose tissue of Wistar rats. **Interdisciplinary Toxicology**, v.5, n.3, p.127-132, 2012.

TINKOV, A. A.; POPOVA, E. V.; POLYAKOVA, V. S.; KWAN, O. V.; SKALNY, A. V.; NIKONOROV, A. A. Adipose tissue chromium and vanadium disbalance in high-fat fed Wistar rats. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v.29, p.176-181, 2015.

USDA. **National Nutrient Database for Standard Reference**. Disponível em: <<http://ndb.nal.usda.gov/ndb/foods/list>>. Acesso em 12 de fev. de 2014.

VAMANU, E.; NITA, S. Antioxidant Capacity and the Correlation with Major Phenolic Compounds, Anthocyanin, and Tocopherol Content in Various Extracts from the Wild Edible Boletus edulis Mushroom. **BioMed Research International**, p.1-11, 2013.

VIHAKAS, M.; PÄLIJÄRVI, M.; KARONEN, M.; ROININEN, H.; SALMINEN, J.-P. Rapid estimation of the oxidative activities of individual phenolics in crude plant extracts. **Phytochemistry**, v.103, p.76-84, 2014.

WANG, H.; WEN, Y.; DU, Y.; YAN, X.; GUO, H.; RYCROFT, J. A.; BOON, N.; KOVACS, E. M. R.; MELA, D. J. Effects of Catechin Enriched Green Tea on Body Composition. **Obesity**, v.18, n.4, p.773-779, 2010.

WATTANATHORN, J.; MUCHIMAPURA, S.; THUKHAM-MEE, W.; INKANINAN, K.; WITTAYA-AREEKUL, S. *Mangifera indica* Fruit Extract Improves Memory Impairment, Cholinergic Dysfunction, and Oxidative Stress Damage in Animal Model of Mild Cognitive Impairment. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, p.1-7, 2014.

WHO. Obesidade e excesso de peso. **World Health Organization**. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>>. Acesso em 03 de out. de 2014.

WONG, W.-Y.; POUDYAL, H.; WARD, L. C.; BROWN, L. Tocotrienols Reverse Cardiovascular, Metabolic and Liver Changes in High Carbohydrate, High Fat Diet-Fed Rats. **Nutrients**, v.4, n.10, p.1527-1541; 2012.

YANG, H.-Y.; YANG, S.-C.; CHAO, J. C.-J.; CHEN, J.-R. Beneficial effects of catechin-rich green tea and inulin on the body composition of overweight adults. **British Journal of Nutrition**, v.107, n.5, p.749-754, 2012.

YANG, J.-Y.; DELLA-FERA, M. A.; RAYALAM, S.; AMBATI, S.; HARTZELL, D. L.; PARK, H. J.; BAILE, C. A. Enhanced inhibition of adipogenesis and induction of apoptosis in 3T3-L1 adipocytes with combinations of resveratrol and quercetin. **Life Sciences**, v.82, n.19-20, p.1032-1039, 2008.

YANG, Y.; ANDREWS, M. C.; HU, Y.; WANG, D.; QIN, Y.; ZHU, Y.; NI, H.; LING, W. Anthocyanin Extract from Black Rice Significantly Ameliorates Platelet Hyperactivity and Hypertriglyceridemia in Dyslipidemic Rats Induced by High Fat Diets. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.59, n.12, p.6759-6764, 2011.

YUNG, L.-M.; TIAN, X.; WONG, W.; LEUNG, F.; YUNG, L.; CHEN, Z.; LAU, C.; VANHOUTTE, P.; YAO, X.; HUANG, Y. Chronic cranberry juice consumption restores cholesterol profiles and improves endothelial function in ovariectomized rats. **European Journal of Nutrition**, v.52, n.3, p.1145-1155, 2013.

ZHANG, X.; ZHAO, Y.; ZHANG, M.; PANG, X.; XU, J.; KANG, C.; LI, M.; ZHANG, C.; ZHANG, Z.; ZHANG, Y.; LI, X.; NING, G.; ZHAO, L. Structural Changes of Gut Microbiota during Berberine-Mediated Prevention of Obesity and Insulin Resistance in High-Fat Diet-Fed Rats. **PLoS ONE**, v.7, n.8, p.1-12, 2012.

ZHANG, Y.; LIU, J.; YAO, J.; JI, G.; QIAN, L.; WANG, J.; ZHANG, G.; TIAN, J.; NIE, Y.; ZHANG, Y.; GOLD, M.; LIU, Y. Obesity: Pathophysiology and Intervention. **Nutrients**, v.6, n.11, p.5153-5183, 2014.

CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA/UFV certifica que o processo n.º 34/2013, intitulado “*Potencial da folha, casca e do néctar de manga Ubá na modulação do estresse oxidativo e da inflamação em ratos com síndrome metabólica*”, coordenado pela professora Hercia Stampini Duarte Martino, do Departamento de Nutrição e Saúde, está de acordo com o Código de Ética Profissional do Médico Veterinário, com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL), e com a legislação vigente, tendo sido aprovado por esta Comissão em 24/06/2013, com validade de 12 meses.

CERTIFICATE

The Ethic Committee in Animal Use/UFV certify that the process number 34/2013, named “*Potential of leaf, bark and mango nectar Uba in the modulation of oxidative stress and inflammation in rats with metabolic syndrome*” is in agreement with the Medical Veterinary Professional Ethics Code, with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian Society of Science in Laboratory Animals (SBCAL) and with actual Brazilian legislation. This Institutional Commission on June 24, 2013 approved this process. This certificate expires in 12 months.



Prof. Cláudio César Fonseca
Coordenador

Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA/UFV

10 MATERIAL SUPLEMENTAR

Tabela S1: Medidas biométricas e de consumo alimentar dos animais experimentais anterior ao tratamento com os néctares, após a indução de obesidade, durante 7 semanas.

Medidas	Grupos	
	AIN-93M	HFD
Peso (g)	370 ± 21,6	406* ± 30
Ganho de peso (g)	68 ± 12,1	101* ± 33
Consumo alimentar (g)	143* ± 8,3	120 ± 9,4
CEA (g)	0,07 ± 0,01	0,12* ± 0,04
CEE (kcal g ⁻¹)	10,3* ± 0,57	9,5 ± 0,40
PA (cm)	17 ± 0,82	18 ± 1,1
IMC (g cm ⁻²)	0,66 ± 0,09	0,68 ± 0,04

Médias seguidas por asterisco na mesma linha diferem entre si por ANOVA a 5% de probabilidade.

AIN-93M: grupo controle negativo; HFD: grupo controle positivo; CEA: coeficiente de eficiência alimentar; CEE: coeficiente de eficiência energética; PA: perímetro abdominal; IMC: índice de massa corpórea.