

Universidade Federal de Ouro Preto

Núcleo de Pesquisa em Ciências Biológicas

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas
PPG CBIOL

Tese

Avaliação dos mecanismos associados ao efeito anti-hipertensivo de uma formulação com extrato da folha de goiabeira (*Psidium guajava* L.) em um modelo de hipertensão sódio-dependente.

Daiane Cristina de Assis Braga Silva

Ouro Preto
2023



DAIANE CRISTINA DE ASSIS BRAGA SILVA

Avaliação dos mecanismos associados ao efeito anti-hipertensivo de uma formulação com extrato da folha de goiabeira (*Psidium guajava* L.) em um modelo de hipertensão sódio-dependente.

Orientador: Prof. Dr. Leonardo Máximo Cardoso

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto, como parte integrante dos requisitos para a obtenção do título de doutora em Ciências Biológicas.

Área de concentração: Bioquímica Metabólica e Fisiológica.

Ouro Preto, Minas Gerais
2023

SISBIN - SISTEMA DE BIBLIOTECAS E INFORMAÇÃO

S586a Silva, Daiane Cristina De Assis Braga.
Avaliação dos mecanismos associados ao efeito anti-hipertensivo de uma formulação com extrato da folha de goiabeira (*Psidium guajava* L.) em um modelo de hipertensão sódio-dependente. [manuscrito] / Daiane Cristina De Assis Braga Silva. - 2023.
163 f.: il.: color., gráf., tab..

Orientador: Prof. Dr. Leonardo Máximo Cardoso.
Tese (Doutorado). Universidade Federal de Ouro Preto. Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas.
Área de Concentração: Bioquímica Metabólica e Fisiológica.

1. Sódio. 2. Hipertensão. 3. Goiabeira. I. Cardoso, Leonardo Máximo. II. Universidade Federal de Ouro Preto. III. Título.

CDU 577.12

Bibliotecário(a) Responsável: Luciana De Oliveira - SIAPE: 1.937.800



FOLHA DE APROVAÇÃO

Daiane Cristina de Assis Braga Silva

**Avaliação dos Mecanismos Associados ao Efeito Anti-Hipertensivo
de Uma Formulação com Extrato da Folha de Goiabeira (*Psidium guajava* L.)
em Um Modelo de Hipertensão Sódio-Dependente**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (PPG-CBiol) da Universidade Federal de Ouro Preto como requisito parcial para obtenção do título de doutora.

Aprovada em 10 de fevereiro de 2023.

Membros da banca

Prof. Dr. Leonardo M. Cardoso - Orientador (Universidade Federal de Ouro Preto)

Profa. Dra. Debora Simoes de Almeida Colombari - Membro externo (Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho)

Profa. Dra. Andrea Siqueira Haibara - Membro externo (Universidade Federal de Minas Gerais)

Profa. Dra. Daniela Caldeira Costa Calsavara - Membro interno (Universidade Federal de Ouro Preto)

Profa. Dra. Sílvia de Paula Gomes - Membro interno (Universidade Federal de Ouro Preto)

Prof. Dr. Leonardo M. Cardoso, orientador do trabalho, aprovou a versão final e autorizou seu depósito no Repositório Institucional da UFOP em 17/03/2023.



Documento assinado eletronicamente por **Leonardo Maximo Cardoso, PROFESSOR DE MAGISTERIO SUPERIOR**, em 17/03/2023, às 11:55, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site http://sei.ufop.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0492642** e o código CRC **48B55108**.

AGRADECIMENTO



Reitora

Prof^ª. Dr^ª. Cláudia Aparecida Marlière de Lima

Vice-Reitor

Prof. Dr. Hermínio Arias Nalini Júnior

Pró-Reitora de Pesquisa e Pós-Graduação

Prof^ª. Dr^ª. Renata Guerra, de Sá Cota

Pró-Reitor Adjunto de Pesquisa e Pós-Graduação

Prof. Dr. Thiago Cazati

Coordenador do Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas

Prof^ª. Dr^ª. Camila Carrião Machado Garcia

A Deus, sem Ele nada seria possível, meus pais,

Meus irmãos, meu esposo e meus mestres.

Agradecimento aos colaboradores

Meus agradecimentos são direcionados a Deus, pela sabedoria, paciência e discernimento durante todas as etapas do doutorado desde o processo de seleção até a finalização.

Aos meus pais Evanildo e Ana Darque por todo amor, pela compreensão nos momentos de ausência e apoio nos momentos em que mais precisei.

Aos meus irmãos Poliane e Paulo pela amizade, ajuda e por apoiarem as minhas escolhas no decorrer do caminho.

Ao meu esposo Pedro, por sempre estar ao meu lado e não me deixar titubear nos momentos mais difíceis e que pensei em desistir.

A universidade Federal de Ouro Preto por todos estes anos de aprendizado, a CAPES pelo apoio financeiro durante o doutorado e ao CBIOL/NUPEB pela oportunidade de inserção na pós-graduação.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Leonardo Máximo Cardoso, por ter me aceitado para orientação, pela paciência e ensinamentos teóricos e práticos que contribuíram para execução e finalização deste trabalho.

Aos alunos do Laboratório de Fisiologia Endócrina e Cardiovascular.

Aos integrantes dos laboratórios parceiros.

Ao Centro de Ciência Animal CCA/UFOP pelo fornecimento dos animais utilizados nesse trabalho.

Aos membros da banca examinadora, pelo interesse e disponibilidade em participar.

A todos que de forma direta ou indireta participaram da execução deste trabalho.

“O cientista não é o homem que fornece as verdadeiras respostas; é quem faz as verdadeiras perguntas”. (Claude Lévi-Strauss)

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Fisiologia Endócrina e Cardiovascular do Departamento de Ciências Biológicas, vinculado ao Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto.

Colaboradores

Dr. Vagner Roberto Antunes ¹
Dra. Lisandra Brandino, de Oliveira ²
Dra. Andreia Carvalho Alzamora ²
Dra. Carla Speroni Ceron²
Dr. Wanderson Geraldo de Lima ²
Dra. Samantha Ribeiro Béla ²
Dra. Maria Célia Lana ²
Dra. Renata Guerra de Sá Cota ²
Dr. Vasco Ariston Azevedo ³
Dra. Sandra Aparecida de Lima Moura⁴
Dr. Gustavo Henrique Bianco de Souza⁵

1 – Departamento de Fisiologia e Biofísica, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, São Paulo, Brasil.

2 – Departamento de Ciências Biológicas, Instituto de Ciências Exatas e Biológicas e Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, Minas Gerais, Brasil.

3- Departamento de Genética, Ecologia e Evolução, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.

4- Departamento de Engenharia Ambiental, Escola de Minas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, Minas Gerais, Brasil.

5- Departamento de Farmácia, Escola de Farmácia, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, Minas Gerais, Brasil.

Suporte Financeiro

Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP).

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Programa de Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG).

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Recursos próprios dos pesquisadores.

Convênio Samarco - UFOP

Laboratórios parceiros

Centro de Ciência Animal – CCA/UFOP

Laboratório de Hipertensão – ICEB/ UFOP

Laboratório de Fitotecnologia – EFAR/ UFOP

Laboratório de Microbiologia e Bioprospecção Tecnológica – ICEB/ UFOP

Laboratório de Nutrição Experimental – ENUT/ UFOP

Laboratório de Morfopatologia – ICEB/ UFOP

Laboratório de Bioquímica e biologia molecular – ICEB/UFOP

Laboratório de Genética Celular e Molecular – LGCM/UFMG

Grupo APICRIM

Resumo

A hipertensão é um importante problema de saúde pública que requer tratamento com medicamentos. No entanto, muitos pacientes são resistentes aos tratamentos convencionais. As plantas medicinais têm sido utilizadas como uma alternativa para o tratamento destes indivíduos, e a goiabeira (*Psidium guajava* L.) é uma delas, cujas propriedades anti-hipertensivas já foram descritas. O objetivo deste estudo foi verificar se o extrato de folha de goiabeira (*PsE*) é eficaz em reduzir a pressão arterial em ratos hipertensos, e se isso é resultado da sua influência sobre a atividade simpática, absorção de sódio, citocinas inflamatórias, biomarcadores do perfil redox e microbiota intestinal. Ratos foram alimentados com uma dieta com excesso de sódio e, posteriormente, receberam *PsE* ou veículo por via oral por 4 semanas. Os resultados mostraram que *PsE* atenuou a absorção de sódio, aumentou a reatividade simpática lombar e alterou a microbiota intestinal. Além disso, houve aumento de IL-10 após o tratamento com *PsE*, sem alterações em biomarcadores do perfil redox. Conclui-se que o extrato está atenuando a resposta simpatoexcitatória e absorção de sódio intestinal em ratos HS12W e parte destes efeitos podem estar associados com a alteração da família *Ruminococaceae* e processo inflamatório.

Palavras chaves: Absorção de sódio, Citocinas, Hipertensão, Microbiota, Simpático.

Abstract

Hypertension is an important public health problem that requires drug treatment. However, many patients are resistant to conventional treatments. Medicinal plants have been used as an alternative for the treatment of these individuals, and the guava tree (*Psidium guajava* L.) is one of them, whose antihypertensive properties have already been described. The aim of this study was to verify whether guava leaf extract (*PsE*) is effective in reducing blood pressure in hypertensive rats, and whether this is a result of its influence on sympathetic activity, sodium absorption, inflammatory cytokines, profile biomarkers redox and intestinal microbiota. Rats were fed an excess sodium diet and subsequently received *PsE* or vehicle orally for 4 weeks. The results appreciated that *PsE* attenuated sodium absorption, increased lumbar sympathetic reactivity and altered the intestinal microbiota. In addition, there was an increase in IL-10 after treatment with *PsE*, without changes in biomarkers of the redox profile. It is concluded that the extract is attenuating the sympathoexcitatory response and intestinal sodium absorption in HS12W rats and part of these effects may be associated with changes in the *Ruminococcaceae* family and the inflammatory process.

Keywords: Sodium absorption, Cytokines, Hypertension, Microbiota, Sympathetic.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

∫ASNL: Atividade simpática do nervo lombar integrada

ASNL: Atividade simpática do nervo lombar

CAT: Catalase

DOCA: Acetato de desoxicorticosterona

GSH: Glutationa peroxidase

ICP-IOS: *Inductively Coupled Plasma - Atomic Emission Spectrometry*

HSD: *High-salt* diet

m/z: Razão massa carga

OMS: Organização Mundial da Saúde

OVLT: Órgão vasculoso da lâmina terminal

PA: Pressão arterial

PAM: pressão arterial média

PsE: Formulação a base de extrato bruto seco de *Psidium guajava* L.

PsE 100: Formulação a base de extrato de *Psidium guajava* L. na dose de 100 mg/kg

PsE 200: Formulação a base de extrato de *Psidium guajava* L. na dose de 200 mg/kg

PSI: *Pound force per square inch* (libra força por polegada quadrada)

PVN: Núcleo paraventricular do hipotálamo

PVPP: Polivinilpolipirrolidona

RVLM: Bulbo ventrolateral rostral

SHR: *Spontaneously hypertensive rats*

SOD: Enzima superóxido dismutase

SSD: Dieta padrão

SFO: Órgão subfornical

TBE: Trisborato-EDTA

UFC: Unidade de formação de colônias

UPLC-DAD-MS: Cromatógrafo líquido do sistema Acquity acoplado a um analisador DAD-UV e a um espectrômetro de massa.

v.i.: Via intravenosa

v.o.: Via oral

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Etapas de produção do extrato bruto seco de folha de goiabeira.	22
Figura 2. Compostos e estrutura do extrato bruto seco obtida por análise UPLC-DAD-ESI-MS	28
Figura 3. Imagem representativa do modelo experimental HS12W	31
Figura 4. Conteúdo de PsE 200 no intestino delgado ao fim do experimento de registro de atividade simpática lombar. A seta em vermelho indica o local onde foi feita a incisão e a presença da PsE (substância esverdeada).	34
Figura 5. Traçados qualitativos da atividade simpática lombar em ratos HSD e SSD anestesiados com uretana, após a administração oral de PsE 200 ou veículo.	37
Figura 6. Efeito da PAM e da ASNL da administração intragástrica de uma dose única de PsE 200 ou veículo em ratos SSD e HSD anestesiados e não tratados cronicamente. Os painéis A e B mostram registros de pressão arterial e atividade simpática lombar (sinal bruto e integrado) ao longo de 110 min. As linhas tracejadas indicam o momento da administração intragástrica do PsE 200 ou administração do veículo. Alterações máximas na PAM e atividade nervosa simpática lombar (ASNL) devido a PsE 200 foram calculadas e expressas como Δ PAM (painel C) e Δ Int. ASNL (painel D), respectivamente. Para os painéis C e D, os quadrados e círculos dispersos representam valores individuais de SSD e HSD, respectivamente e as barras representam dados médios do grupo (média \pm SEM). ANOVA de duas vias seguida do teste post-hoc de Dunnett; $p < 0,05$, # diferente da linha de base (antes da administração de PsE 200. *diferente do SSD veículo.	38
Figura 7. Umidade fecal (painel A), teor de sódio fecal (painel B) e excreção de sódio fecal (painel C) de ratos Wistar sob dieta rica em sódio por 12 semanas após o desmame antes e depois da administração oral de PsE 200 (média \pm SEM). N = 12 até 16. ANOVA de duas vias seguida pelo pós-teste de Tukey; $p < 0,05$	45

Figura 8. Concentração de sódio no afluente (painel A), concentração de sódio no efluente (painel B) e concentração de sódio no plasma (Painel C) de ratos Wistar sob dieta rica em sódio por 16 semanas, submetidos ao procedimento de perfusão intestinal com PsE 200. Quadrados vermelhos (grupos HSD) e quadrados azuis (grupos SSD). N = 10. As diferenças entre pares de médias são indicadas por símbolos diferentes *diferente de SSD veículo, # diferente de HSD veículo, & diferente de HSD veículo, HSD e controle PsE. ANOVA de duas vias seguida pelo pós-teste de Dunnett $p < 0,05$47

Figura 9. Concentração de potássio no afluente (painel A), concentração de potássio no efluente (painel B) e concentração de potássio no plasma (Painel C) de ratos Wistar sob dieta rica em sódio por 16 semanas, submetidos ao procedimento de perfusão intestinal com PsE 200. Quadrados vermelhos (grupos HSD) e quadrados azuis (grupos SSD). N = 10. ANOVA de duas vias seguida pelo pós-teste de Dunnett. $p < 0,05$48

Figura 10. Volume do afluente (painel A), volume do efluente (painel B) e relação efluente/afluente (Painel C) de ratos Wistar sob dieta rica em sódio por 16 semanas, submetidos ao procedimento de perfusão intestinal com PsE 200. Quadrados e triângulos vermelhos (grupos HSD) e quadrados e triângulos azuis (grupos SSD). N = 10. ANOVA de duas vias seguida pelo pós-teste de Dunnett $p < 0,05$49

Figura 11. Contagem de unidades de formação das colônias de bactérias de fezes exteriorizadas de ratos Wistar submetidos a dieta padrão (SSD), dieta com sobrecarga de sódio (HSD) e tratados com PsE 200 ou veículo. As fezes foram coletadas na 16ª semana pós o desmame após 4 semanas de administração intragástrica de PsE 200 ou veículo (água destilada) por gavagem orogástrica. Círculos e quadrados dispersos representam valores individuais e as barras representam dados médios do grupo (média±SEM). ANOVA de uma via seguida do pós teste de Tukey; $p < 0,05$ 62

Figura 12. Eletroforese de rRNA em Gel de agarose64

Figura 13. Abundância total de bactérias (painel A) e abundância relativa da família Ruminococacea (Painel B), gêneros Firmicutes (Painel C), Bacteroidetes (Painel D) do intestino de ratos Wistar submetidos a dieta padrão (SSD), dieta com sobrecarga de sódio (HSD) e tratados com PsE 200 ou veículo. Razão Firmicutes/bacteroidetes (Painel E). Círculos e quadrados dispersos representam valores individuais e as barras representam dados médios do grupo (média±SEM). $p < 0,05$ 66

Figura 14. Heatmap da microbiota intestinal no nível de gênero em ratos SSD e HSD tratados com veículo ou PsE 200. 67

Figura 15. Altura de vilosidades do duodeno: A) Visão geral do corte histológico de duodeno de ratos SSD veículo; B) SSD PsE 200; C) HSD veículo; D) HSD PsE 200. Coloração: Hematoxilina e eosina. A seta vermelha mostra como foi realizada a aferição da altura das vilosidades. Objetiva de 40x..... 68

Figura 16. Altura de vilosidades do jejuno: A) Visão geral do corte histológico de jejuno de ratos SSD veículo; B) SSD PsE 200; C) HSD veículo; D) HSD PsE 200. Coloração: Hematoxilina e eosina. A seta vermelha mostra como foi realizada a aferição da altura das vilosidades. Objetiva de 40x..... 69

Figura 17. Altura de vilosidades do íleo: A) Visão geral do corte histológico de íleo de ratos SSD veículo; B) SSD PsE 200; C) HSD veículo; D) HSD PsE 200. Coloração: Hematoxilina e eosina. A seta vermelha mostra como foi realizada a aferição da altura das vilosidades. Objetiva de 40x..... 70

Figura 18. Espessamento da camada muscular do duodeno: A) Visão geral do corte histológico de duodeno de ratos SSD veículo; B) SSD PsE 200; C) HSD veículo; D) HSD PsE 200. Coloração: Hematoxilina e eosina. A seta vermelha mostra como foi realizada a aferição do espessamento da camada muscular. Objetiva de 40x. 71

Figura 19. Espessamento da camada muscular do jejuno: A) Visão geral do corte histológico de jejuno de ratos SSD veículo; B) SSD PsE 200; C) HSD veículo; D) HSD PsE 200. Coloração: Hematoxilina e eosina. A seta vermelha mostra como foi realizada a aferição do espessamento da camada muscular. Objetiva de 40x. 72

Figura 20. Espessamento da camada muscular do íleo: A) Visão geral do corte histológico de íleo de ratos SSD veículo; B) SSD PsE 200; C) HSD veículo; D) HSD PsE 200. Coloração: Hematoxilina e eosina. A seta vermelha mostra como foi realizada a aferição do espessamento da camada muscular. Objetiva de 40x. 73

Figura 21. Contagem de células caliciformes no duodeno: A) Visão geral do corte histológico de duodeno de ratos SSD veículo; B) SSD PsE 200; C) HSD veículo; D) HSD PsE 200. Coloração: Hematoxilina e eosina. A seta vermelha mostra a localização de células caliciformes. Objetiva de 40x. 74

Figura 22. Contagem de células caliciformes no jejuno: Células caliciformes: A) Visão geral do corte histológico de jejuno de ratos SSD veículo; B) SSD PsE 200; C) HSD veículo; D) HSD PsE 200. Coloração: Hematoxilina e eosina. A seta vermelha mostra a localização de células caliciformes. Objetiva de 40x. 75

Figura 23. Contagem de células caliciformes no íleo: A) Visão geral do corte histológico de íleo de ratos SSD veículo; B) SSD PsE 200; C) HSD veículo; D) HSD PsE 200. Coloração: Hematoxilina e eosina. A seta vermelha mostra a localização de células caliciformes. Objetiva de 40x. 76

Figura 24. Altura das vilosidades no intestino delgado: Duodeno (A), Jejunó (B) e Íleo (C) para ratos submetidos a dieta padrão (SSD), dieta com sobrecarga de sódio (HSD) e tratados com PsE 200 ou veículo. As medidas foram realizadas em amostras retiradas de ratos HSD e SSD na 16ª semana pós o desmame, após 4 semanas de administração intragástrica de PsE 200 ou veículo (água destilada) por gavagem orogástrica. Círculos e quadrados dispersos

representam valores individuais e as barras representam dados médios do grupo (média±SEM). ANOVA de uma via seguida de pós teste de Tukey; $p < 0,05$ 78

Figura 25. Área de linfonodos no intestino delgado: Duodeno (A), Jejunó (B) e Íleo (C) para ratos submetidos a dieta padrão (SSD), dieta com sobrecarga de sódio (HSD) e tratados com PsE 200 ou veículo. As medidas foram realizadas em amostras retiradas de ratos HSD e SSD na 16ª semana pós o desmame após 4 semanas de administração intragástrica de PsE 200 ou veículo (água destilada) por gavagem orogástrica. Círculos e quadrados dispersos representam valores individuais e as barras representam dados médios do grupo (média±SEM). ANOVA de uma via seguida do pós teste de Tukey; $p < 0,05$ 79

Figura 26. Espessamento da camada muscular no intestino delgado: Duodeno (A), Jejunó (B) e Íleo (C) para ratos submetidos a dieta padrão (SSD), dieta com sobrecarga de sódio (HSD) e tratados com PsE 200 ou veículo. As medidas foram realizadas em amostras retiradas de ratos HSD e SSD na 16ª semana pós o desmame após 4 semanas de administração intragástrica de PsE 200 ou veículo (água destilada) por gavagem orogástrica. Círculos e quadrados dispersos representam valores individuais e as barras representam dados médios do grupo (média±SEM). ANOVA de uma via seguida do pós teste de Tukey; $p < 0,05$ 80

Figura 27. Número de células calciformes no intestino delgado: Duodeno (A), Jejunó (B) e Íleo (C) para ratos submetidos a dieta padrão (SSD), dieta com sobrecarga de sódio (HSD) e tratados com PsE 200 ou veículo. As medidas foram realizadas em amostras retiradas de ratos HSD e SSD na 16ª semana pós o desmame após 4 semanas de administração intragástrica de PsE 200 ou veículo (água destilada) por gavagem orogástrica. Círculos e quadrados dispersos representam valores individuais e as barras representam dados médios do grupo (média±SEM). ANOVA de uma via seguida do pós teste de Tukey; $p < 0,05$ 81

Figura 28. Concentrações plasmáticas de IL-10 (A), TNF- α (B) e IL-17A (C) e razão a razão TNF- α /IL-10 (D) para SSD, HSD) e tratados com PsE 200. As medidas foram realizadas em

amostras retiradas de ratos HSD e SSD na 16ª semana após o uso, após 4 semanas de administração intragástrica de PsE 200 ou veículo (água destilada) por gavagem orogástrica. Círculos dispersos representam valores individuais e as barras representam dados médios do grupo (média±SEM). ANOVA de uma via seguida do pós teste de Tukey; $p < 0,05$ 90

Figura 29. Atividade de superóxido dismutase (SOD) (A), atividade de catalase (CAT) (B) níveis de glutathiona peroxidase (GSH) (C) e TBARS no fígado (D) para animais veículos (SSD), modelo experimental (veículo HSD) e tratados com PsE (tratados com HS). As medidas foram realizadas em amostras retiradas de ratos HSD e SSD na 16ª semana após o uso, após 4 semanas de administração intragástrica de PsE 200 ou veículo (água destilada) por gavagem orogástrica. Círculos, quadrados e triângulos dispersos representam valores individuais e as barras representam dados médios do grupo (média±SEM). ANOVA de uma via seguida do pós teste de Tukey; $p < 0,05$ 92

Figura 30. Esquema simplificado da hipótese proposta para explicar alguns dos mecanismos de cardiovasculares que podem ocasionar à hipertensão sódio-dependente em ratos HS12W e os possíveis mecanismos anti-hipertensivos da PsE. 108

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Doseamento de taninos no extrato bruto seco de <i>Psidium guajava</i> L. e PsE.....	25
Tabela 2. Análise de micronutrientes do extrato de folha de <i>Psidium guajava</i> L. avaliada por pesquisa de elementos e limite de quantificação utilizando a técnica de ICP-OES (Inductively Coupled Plasma - Atomic Emission Spectrometry).....	25
Tabela 3. Derivados de metabólitos secundários identificados no extrato bruto de <i>Psidium guajava</i> L. obtidos por análise UPLC-DAD-ESI-MS	29
Tabela 4. Dosagens de concentração de amostras em nanodrop.....	63

Sumário

1. Introdução	1
2. Referencial teórico	4
2.1. Hipertensão sódio dependente	4
2.2. Hipertensão e sistema nervoso central	6
2.3. Consumo de sódio, microbiota intestinal, estresse oxidativo e inflamação	8
2.4. Efeito antihipertensivo da <i>Psidium guajava</i> L. (goiabeira)	14
3. Justificativa	18
4. Hipótese	19
Capítulo I - Preparo do extrato de <i>Psidium guajava</i> L., formulação a base de extrato de <i>Psidium guajava</i> L. (PsE) e análises fitoquímicas	20
Preparo do extrato de <i>Psidium guajava</i> L., formulação a base de extrato de <i>Psidium guajava</i> L. (PsE) e análises fitoquímicas	20
5.1. Objetivos	20
5.2. Estratégias experimentais	20
5.3. Metodologia	21
5.3.1. Produção e caracterização fitoquímica do extrato <i>Psidium guajava</i> L.	21
5.3.1.1. Obtenção de extrato etanólico de folhas de goiabeira	21
5.3.2. Caracterização fitoquímica do extrato	22
5.3.2.1. Determinação de taninos	22
5.3.2.2. Determinação de íons pelo ICP	23
5.3.3. 3. Análise UPLC-DAD-MS	24
5.5. Análises estatísticas	25
5.4. Resultados	25
5.4.1. Dosagem dos taninos	25
5.4.2. Determinação de íons pelo ICP	25
5.4.3. Análise UPLC-DAD-MS	27
Capítulo II- Associação do efeito antihipertensivo de PsE com a atividade simpática	30
6.1. Objetivos	30
6.2. Estratégia experimental	30
6.3. Metodologia	31
6.3.1. Modelo experimental	31
6.3.2. Registro de atividade simpática lombar	32
6.3.2.1. Isolamento de nervo lombar	32
6.3.2.2. Protocolos experimentais	33
6.3.2.2.1. Avaliação da função barorreflexa sobre a atividade simpática lombar	33

6.3.2.2.2. Avaliação do efeito agudo da PsE 200 sobre a atividade simpática lombar.....	33
6.4. Coleta e registro dos dados.....	34
6.5. Análises estatísticas.....	35
6.5. Resultados	36
6.5.1. Registro de atividade simpática de nervo lombar	36
Capítulo III - Avaliação da PsE sobre a absorção de sódio intestinal	39
7.1. Objetivo	39
7.2. Estratégias experimentais	39
7.3. Metodologia	40
7.3.1. Modelo experimental.....	40
7.3.2. Administração oral de PsE	40
7.3.4.1. Instrumentação.....	41
7.3.4.2. Procedimentos.....	42
7.4. Análises estatísticas.....	43
7.5. Resultados	44
7.5.1. Determinação do teor, umidade e excreção de sódio nas fezes	44
7.5.2. Perfusão intestinal <i>in situ</i>	45
Capítulo IV- Avaliação da PsE sobre a microbiota intestinal e sobre a arquitetura tecidual do intestino delgado	50
8.1. Objetivos	50
8.2. Estratégia experimental	50
8.3. Metodologia	51
8.3.1. Modelo experimental.....	51
8.3.2. Administração oral de PsE	51
8.3.3. Contagem de unidades formadoras de colônias de bactérias.....	51
8.3.4. Ensaios de metagenômica	52
8.3.4.1. Coleta de fezes.....	52
8.3.6. Análise da arquitetura tecidual	56
8.3.6.1. Eutanásia dos animais	56
8.3.6.2. Coleta de intestino.....	57
8.3.6.3. Análise histológica para avaliação de altura de vilosidade, área de linfonodo, espessamento de camada muscular e número de células caliciformes	57
8.3.6.3.1. Processamento	57
8.3.6.3.2. Microtomia	58
8.3.6.3.3. Preparo da lâmina	58
8.3.6.3.4. Coloração em Hematoxilina e eosina	59

8.3.6.3.5. Colocação da lamínula	59
8.3.6.3.6. Fotodocumentação	59
8.3.6.3.7. Leitura de imagens	60
8.4. Análises estatísticas.....	60
8.5. Resultados	62
8.5.1. Contagem de unidades de formação de colônias das bactérias.....	62
8.5.2. Ensaios de metagenômica	63
8.5.3. Identificação taxonômica das bactérias por técnica de metagenômica.....	65
8.5.5. Análise histológica para avaliação de altura de vilosidade, área de linfonodos, número de células caliciformes e espessamento de camada muscular	67
Capítulo V- Avaliação da PsE sobre citocinas pró e anti-inflamatórias e perfil redox.....	82
9.1. Objetivos	82
9.2. Estratégia experimental	82
9.3. Metodologia	83
9.3.1. Modelo experimental.....	83
9.3.2. Administração oral de PsE	83
9.3.3. Coleta de amostras de plasma.....	83
9.3.4. Dosagem dos níveis plasmáticos de citocinas.....	84
9.3.4.1. Avaliação do perfil redox em ratos HS12W	84
9.3.4.2. Modelo experimental.....	84
9.3.4.3. Administração oral de PsE	84
9.3.4.4. Doseamento de SOD, CAT, GSH e TBARS	85
9.3.4.5. Determinação da atividade de enzima superóxido dismutase (SOD)	85
9.3.4.6. Determinação da atividade de catalase (CAT)	86
9.3.4.7. Determinação da atividade de Glutathiona (GSH).....	87
9.3.4.8. Determinação de TBARS.....	87
9.4. Análises estatísticas	88
9.5. Resultados	89
10. Discussão	93
11. Conclusão	107
Referências	109
Anexos	134

1. Introdução

A hipertensão é caracterizada pelo aumento abrupto e sustentado dos níveis de pressão arterial (MALACHIAS; SOUZA; PLAVNIK; RODRIGUES *et al.*, 2016). Muitos fatores podem estar relacionados a seu desenvolvimento. Um destes fatores é o consumo de dietas com sobrecarga de sódio, que apesar do sódio ser essencial a homeostase, pode levar a complicações metabólicas quando consumido de forma exagerada na dieta (CARRETERO; OPARIL, 2000). Ensaio clínicos e estudos experimentais já mostraram a relação entre o aumento no consumo de sódio e, conseqüente, aumento dos níveis pressóricos (CAMPAGNOLI; GONZALEZ; CRUZ, 2012; GOMES; SA; AGUIAR; PAES *et al.*, 2017). O corpo humano é capaz de se adaptar a diversas situações, todavia, estas adaptações não foram suficientes a ponto de se adequar a alterações no consumo de sódio, o qual está cerca de 12 vezes maior em relação a tempos remotos (RODRIGUES; SOUZA JUNIOR; PIMENTEL; BALDO *et al.*, 2015), levando assim ao aumento dos níveis de pressão arterial e disfunções cardiovasculares (CAPPUCCIO, 2007).

O consumo de dietas com sobrecarga de sódio pode levar também a alterações no sistema imunológico, promovendo o desenvolvimento da hipertensão, principalmente ocasionada pelo aumento das células T e de citocinas como TNF e IFN- γ (GUZIK; HOCH; BROWN; MCCANN *et al.*, 2007; RUCKER; RUDEMILLER; CROWLEY, 2018; SILVEIRA-NUNES; DURSO; JR; CUNHA *et al.*, 2020). Além de afetar o sistema imunológico, alguns trabalhos já mostraram que o consumo de dieta com alto teor de sódio são capazes de provocar mudanças significativas na diversidade de bactérias contidas no intestino, principalmente os *Lactobacillus* em ensaios experimentais e redução de Bacteroidetes em estudos clínicos (WILCK; BALOGH; MARKO; BARTOLOMAEUS *et al.*, 2019; WILCK; MATUS; KEARNEY; OLESEN *et al.*, 2017). Essa disbiose intestinal, pode proporcionar a circulação de citocinas, que vão agir no sistema nervoso central, podendo desencadear neuroinflamação,

devido a ativação de receptores cerebrais e aumentando a secreção de interleucinas (BATISTA; BRAGA; DE MOURA; DE SOUZA *et al.*, 2020; WILCK; BALOGH; MARKO; BARTOLOMAEUS *et al.*, 2019).

Apesar da ampla disponibilidade de fármacos utilizados no tratamento da hipertensão sódio dependente, muitos deles não são eficazes em reduzir os níveis de pressão arterial em indivíduos, principalmente naqueles resistentes a medicações convencionais (AVERINA; OTHMER; FINK; OSBORN, 2015). A utilização de produtos naturais, principalmente de plantas com propriedades medicinais, já vem sendo utilizada há muitos anos (NEWMAN; CRAGG, 2016). Estudos etnobotânicos e etnofarmacológicos já demonstram que as plantas podem ser um adjuvante terapêutico utilizado no tratamento de diversas doenças (CHAACHOUAY; BENKHNIGUE; FADLI; EL IBAOUI *et al.*, 2019). Contudo, é necessário que estes produtos sejam utilizados de forma correta, com dosagens e posologias adequadas.

A goiabeira (*Psidium guajava* L. Linn) é um grande arbusto que atinge até 15 m de altura (PONTIKIS, 1996). As diversas partes que a compõe, como os frutos, folhas, sementes e caule são utilizados como prevenção e tratamento de diversas doenças e condições clínicas (DASWANI; GHOLKAR; BIRDI, 2017), como a hipertensão (OJEWOLE, 2005). Alguns estudos existentes na literatura já mostraram efeito de folhas de *Psidium guajava* L. atuando na redução de pressão arterial, sem detalhes precisos de mecanismos e vias que poderiam estar atuando nesta redução dos níveis pressóricos. Ojewole (2005) apenas sugeriu envolvimento do extrato aquoso de *Psidium guajava* no sistema nervoso autônomo, já que a injeção venosa aboliu os efeitos pressóricos de noradrenalina e aboliu os efeitos depressores da acetilcolina (OJEWOLE, 2005). Além de efeito sobre o sistema nervoso, evidências científicas já mostraram que o extrato possui também efeito antimicrobiano (JAIARJ,

PRANEE; KHOOHASWAN, PARANEE; WONGKRAJANG, YUWADEE; PEUNGVICHA, PENCHOM *et al.*, 1999).

Diante ao exposto, esse trabalho buscou quantificar e qualificar, o conteúdo de micronutrientes, taninos e compostos orgânicos presentes no extrato de folhas de goiabeira, além de experimentalmente, avaliar por quais possíveis mecanismos o extrato de *Psidium guajava L.* estaria atuando como agente redutor de pressão arterial. Objetivou-se também avaliar quais os possíveis mecanismos de ação do extrato de *Psidium guajava L.* em quatro perspectivas: (i) efeitos no sistema nervoso central, (ii) efeito na absorção de sódio intestinal, (iii) sobre a microbiota intestinal e (iv) sobre as citocinas inflamatórias. Assim, a hipótese foi de que a administração de uma formulação obtida a partir do extrato etanólico de folhas de *Psidium guajava L.* (*PsE*) estaria atuando na modulação do sistema nervoso central, em vias digestivas na absorção de sódio no intestino delgado, nas citocinas séricas e também na microbiota intestinal levando a redução de pressão arterial.

2. Referencial teórico

2.1. *Hipertensão sódio dependente*

A hipertensão arterial é caracterizada pelo aumento dos níveis de pressão arterial, sendo umas das principais causas de doenças cardiovasculares e morte (MALACHIAS; SOUZA; PLAVNIK; RODRIGUES *et al.*, 2016). Sua prevalência em âmbito mundial é de 15%, o que torna um grave problema de saúde pública. No Brasil, a hipertensão atinge cerca de 30% da população, segundo dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) (WHO, 2012). Diversos fatores já foram apontados como responsáveis pela gênese da hipertensão dentre eles a idade (VIERA; NEUTZE, 2010), alcoolismo (SAUNDERS; BEEVERS; PATON, 1981), fatores genéticos (AGARWAL; WILLIAMS; FISHER, 2005) e o consumo exacerbado de sal na dieta (KARPPANEN; MERVAALA, 2006; SCHMIEDER; MESSERLI; GARAVAGLIA; NUNEZ, 1988).

A hipertensão sal-dependente é uma das doenças que mais afetam a saúde e a qualidade de vida humana (GILES; MATERSON; COHN; KOSTIS, 2009). Aproximadamente 25% da população normotensa pode ser propensa a desenvolver hipertensão devido ao aumento no consumo de sal e que 50% a 75% dos pacientes hipertensos podem manifestar resposta pressora aumentada em decorrência ao aumento no consumo de sal (WEINBERGER, 1996a; b). Muitos indivíduos ainda podem apresentar sensibilidade ao sal, levando o quadro de hipertensão. Estudo de Averina e colaboradores (2015) mostrou que a sensibilidade da pressão arterial ao sal é caracterizada quando ocorre elevação sustentada de 10 mmHg na pressão arterial média quando se tem aumento de cerca de cinco vezes da ingestão habitual de sódio (AVERINA; OTHMER; FINK; OSBORN, 2015). A relação entre o consumo de sódio e hipertensão já foi bem estabelecida. Estudos com dados experimentais foram realizados enfatizando esta relação (DAHL; LEITL; HEINE, 1972; GOMES; SA; AGUIAR; PAES *et al.*, 2017; HUANG; VAN VLIET; LEENEN, 2004). Na década de 70, alguns pesquisadores

como Dahl and colaboradores (1972) já investigavam a relação entre o consumo de sódio e pressão arterial. No estudo, Dahl e colaboradores utilizaram ratos Sprague-Dawley, que aleatoriamente, foram subdivididos entre os animais sensíveis a hipertensão (Dahl sal-sensíveis) e os ratos resistentes a hipertensão (Dahl sal-resistentes), sendo todos submetidos a dieta contendo 8% de sal. Os autores concluíram que os ratos sensíveis (Dahl sal-sensíveis) desenvolveram hipertensão devido a dano renal levando a impedimento na excreção de sódio (DAHL; LEITL; HEINE, 1972). Além deste, estudos posteriores como Huang e colaboradores (2004) também mostraram que ratos Dahl-salt submetidos a dieta contendo 8% de cloreto de sódio tiveram aumento nos níveis de pressão arterial em relação aos seus controles que receberam dieta regular para roedores (HUANG; VAN VLIET; LEENEN, 2004). Não apenas estudos experimentais, mas ensaios clínicos também reforçaram a ideia que o aumento de sal na dieta é fator precursor de hipertensão. Estudo realizado em uma amostra populacional na cidade de Vitória, Espírito Santo, Brasil, correlacionou os níveis de ingestão de sódio com elevação dos níveis de pressão arterial (RODRIGUES; SOUZA JUNIOR; PIMENTEL; BALDO *et al.*, 2015). Os resultados apresentaram correlação positiva entre o consumo de sal na dieta e aumento de pressão arterial, já que os indivíduos que consumiam maior quantidade de sal (aproximadamente $10,4 \pm 4.1$ g por dia de sal) apresentaram aumento dos níveis pressóricos em cerca de 13mmHg em relação aos indivíduos que consumiam menos que 6g por dia de sal (RODRIGUES; SOUZA JUNIOR; PIMENTEL; BALDO *et al.*, 2015), sendo o recomendado pela Organização Mundial da Saúde 5g por dia (WHO, 2016). Assim, torna-se evidente que o consumo de dietas com alta concentração de sódio é um fator importante no desenvolvimento da hipertensão.

Com a finalidade de desenvolver um modelo com a ingestão de sódio mais condizente com a realidade humana, Gomes e colaboradores (2017) desenvolveram um modelo de hipertensão sódio-dependente, no qual ratos Wistar foram submetidos a uma dieta contendo

2% de cloreto de sódio (0,9% de sódio) desde o desmame por um período de 12 semanas, sendo especulado posteriormente, os níveis de pressão arterial, o teor de sódio no líquido cérebro-espinhal (LCE) e envolvimento de receptores AT₁ no ventrículo lateral cerebral. Esta quantidade de sal na dieta corresponde a aproximadamente 3,3 vezes o recomendado para ratos (GOMES; SA; AGUIAR; PAES *et al.*, 2017), sendo próximo ao consumo humano atual, face ao recomendado pela OMS (WHO, 2016). Esse modelo torna-se translacional ao comportamento de ingestão de sódio humano, já que as crianças já são expostas ao consumo de dietas contendo sal, logo após o desmame. Como esta dieta fora ofertada a ratos desde o desmame, no período de maturação de vários sistemas homeostáticos neuro-humorais, observou-se aumento sustentado da pressão arterial na 12^a semana e aumento de sódio no LCE após o início da dieta. Apenas esta quantidade de sódio na dieta não produziria aumento na pressão arterial e de sódio no LCE em ratos adultos sem a adição de outros cofatores como Angiotensina II (Ang II) (KING; OSBORN; FINK, 2007; OSBORN, 1991; OSBORN; FINK; KUROKI, 2011). Além disso, verificou-se que a ativação dos receptores AT₁ contribuem para a elevação da pressão arterial, sugerindo que os mecanismos centrais ativados pela angiotensina II ao nível cerebral, também desempenham um papel importante na hipertensão (GOMES; SA; AGUIAR; PAES *et al.*, 2017).

2.2. Hipertensão e sistema nervoso central

No decorrer dos anos, pesquisadores tornaram-se intrigados com relação as causas da hipertensão sal-dependente. Assim, diversos estudos foram efetuados e surgiram duas teorias que poderiam estar relacionadas as causas deste tipo de hipertensão. A primeira causa voltada para relação renal, em que Guyton e colaboradores (1972) propuseram mostrando que o aumento da pressão arterial pelo consumo de sódio pode-se desenvolver como consequência da expansão de volume e aumento do débito cardíaco (GUYTON, 1989; GUYTON;

COLEMAN; COWLEY; SCHEEL *et al.*, 1972). Assim, ocorreria aumento na excreção de sódio urinário decorrente ao aumento da filtração glomerular e do fluxo renal (GUYTON, 1989; GUYTON; COLEMAN; COWLEY; SCHEEL *et al.*, 1972). A segunda teoria é embasada na modulação autonômica dos elementos cruciais determinantes da pressão arterial: o débito cardíaco e a resistência periférica total (PARK; FRASER; HOWE; JONES *et al.*, 2018). Um emaranhado neuronal bastante complexo, envolve as redes neuronais bulbares e hipotalâmicas (STOCKER; MADDEN; SVED, 2010; TONEY; CHEN; CATO; STOCKER, 2003). Elevadas concentrações de sódio podem desencadear alterações no sistema nervoso simpático, alterando a excitabilidade das redes neurais (ADAMS; MCCARTHY; STOCKER, 2008; STOCKER; OSBORN; CARMICHAEL, 2008). Isso ocorre, pelo fato de que algumas áreas encefálicas, principalmente os órgãos circumventriculares, como órgão vascular da lamina terminal (OVLT) e órgão subfornical (SFO) detectam alterações mínimas na concentração de sódio extracelular por possuírem capilares fenestrados e barreira hematoencefálica com maior permeabilidade a íons, como principalmente, o sódio (BOURQUE, 2008; KINSMAN; SIMMONDS; BROWNING; STOCKER, 2017; STOCKER; OSBORN; CARMICHAEL, 2008). Com a ativação das vias neurais, os sinais progridem para OVLT que é estimulado por estímulos osmóticos, sendo classificado como osmorreceptores centrais (KINSMAN; SIMMONDS; BROWNING; STOCKER, 2017; STOCKER; OSBORN; CARMICHAEL, 2008). Além disso, esses sinais procedem para o SFO que é altamente sensível a detecção de sódio, sendo inclusive local onde possuem importantes sensores de sódio (NODA; HIYAMA, 2015) e passam por núcleos hipotalâmicos com o núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) (STOCKER; CUNNINGHAM; TONEY, 2004; STOCKER; HUNWICK; TONEY, 2005). O PVN está envolvido na manutenção da homeostase corporal (STERN, 2015). Esses sinais descendem até o bulbo, especialmente o bulbo ventrolateral rostral (RVLM), o qual possui a maioria dos neurônios pré-motores

simpáticos do sistema nervoso central (GUYENET; STORNETTA; SOUZA; ABBOTT *et al.*, 2020; GUYENET, 2006). O RVLM, por sua vez é uma região extremamente importante no contexto da modulação simpática, controlando os níveis pressóricos (GUYENET, 2006).

2.3. Consumo de sódio, microbiota intestinal, estresse oxidativo e inflamação

A partir das vilosidades intestinais, principalmente no duodeno e parte proximal do jejuno que ocorre absorção do sal, sendo esta absorção em maior quantidade principalmente quando oriunda de dietas com sobrecarga de sódio (FORDTRAN; RECTOR; CARTER, 1968). Populações bacterianas colônicas, como os *Lactobacillus* estão presentes no intestino atuando como agente protetor contra infecções de outros tipos bacterianos e alguns tipos de doenças (REID; BURTON, 2002). O consumo exacerbado de sódio pode estar relacionado a disbiose no intestino. Estudos de Wilck e colaboradores (2017) mostraram que uma dieta de NaCl a 4% (8 a 10 vezes a recomendada para roedores) por 14 dias causou uma redução na população de *Lactobacillus murinus* na microbiota intestinal de camundongos (WILCK; MATUS; KEARNEY; OLESEN *et al.*, 2017). Essa mudança na microbiota intestinal de camundongos alimentados com dieta rica em sal, foi acompanhada por níveis aumentados de pressão arterial e população aumentada de células pró-inflamatórias CD4⁺ T_H17 (WILCK; MATUS; KEARNEY; OLESEN *et al.*, 2017). Quando colocado sob uma dieta regular de sal, a população intestinal de *Lactobacillus murinus* voltou aos níveis normais, indicando claramente que uma dieta rica em sal pode influenciar a população bacteriana presente no intestino (WILCK; MATUS; KEARNEY; OLESEN *et al.*, 2017). Ensaios *in vitro* confirmaram que a alta concentração de sódio no meio inibe o crescimento de *Lactobacillus murinus* (WILCK; MATUS; KEARNEY; OLESEN *et al.*, 2017). A suplementação com *Lactobacillus murinus* gavagem por três semanas, sobreposta à dieta rica em sal, reverteu o efeito da dieta sobre os níveis de pressão arterial sistólica (WILCK; MATUS; KEARNEY;

OLESEN *et al.*, 2017). Além da redução de bactérias benéficas a saúde humana, o consumo de sódio em grandes quantidades pode estar relacionado ao aumento de bactérias patogênicas e a desenvolvimento da hipertensão. Estudo realizado por Yang e colaboradores (2015) analisaram a composição microbiana de ratos espontaneamente hipertensos (SHR) e normotensos (Wistar) e em humanos hipertensos e não hipertensos a partir da análise no DNA 16S ribossomal nas fezes (YANG; SANTISTEBAN; RODRIGUEZ; LI *et al.*, 2015). Neste estudo, verificaram que os animais e humanos hipertensos tiveram aumento da razão entre bactérias intestinais do gênero Firmicutes e Bacteroidetes (YANG; SANTISTEBAN; RODRIGUEZ; LI *et al.*, 2015). A partir destes achados, os autores mostram claramente o papel da microbiota intestinal na fisiopatologia da hipertensão humana e animal, já que humanos e animais hipertensos possuem desequilíbrio nesta carga bacteriana intestinal.

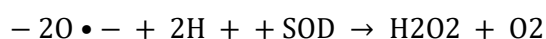
O aumento de citocinas inflamatórias como IL-17 e TNF- α pode estar relacionado ao consumo de dietas com sobrecarga de sódio. O aumento da citocina IL-17, decorrente do consumo de sódio excessivo na dieta, já foi demonstrado em alguns trabalhos previamente publicados na literatura. Aguiar e colaboradores (2018), avaliaram os efeitos de uma dieta suplementada com NaCl na mucosa colônica em estado de equilíbrio e durante a inflamação. Foram utilizados camundongos selvagens e IL-17^{-/-} *knockout* recebendo dieta contendo 4% de NaCl por 21 dias e foi avaliado a presença de IL-17 no cólon destes animais (AGUIAR; MIRANDA; GUIMARÃES; SANTIAGO *et al.*, 2018). Os resultados demonstraram que os animais *knockout* não apresentaram presença de citocina IL-17 no cólon, ao passo que os animais selvagens apresentaram, sugerindo que o mecanismo dependente da produção de IL-17 provavelmente por células Th17 (AGUIAR; MIRANDA; GUIMARÃES; SANTIAGO *et al.*, 2018). Outros estudos da literatura já mostraram aumento na expressão da citocina IL-1 β , que também foi aumentada em ratos com consumo excessivo de sal na dieta (QI; ZHAO; YU; YI *et al.*, 2016). Qi e colaboradores avaliaram a presença da citocina pró-inflamatória IL-1 β

no PVN de ratos Dahl sensíveis, consumindo dieta com 8% de NaCl por 6 semanas. Os dados obtidos neste estudo mostraram que o consumo de dieta com excesso de NaCl levou ao aumento nos níveis de IL-1 β em relação ao controle. Além destas citocinas, os níveis de TNF- α plasmático e renal podem estar aumentados (SINGH; STEPHENSON; CASTILLO; MAJID, 2021). Estes dados foram mostrados no trabalho de Singh e colaboradores em que camundongos *knockout* e selvagens foram alimentados com dieta contendo 4% de NaCl por duas semanas. Findado o período de dieta, foram avaliados os níveis de TNF- α no tecido renal (SINGH; STEPHENSON; CASTILLO; MAJID, 2021). Como resultado, foi observado aumento nos níveis plasmáticos de TNF- α nos animais submetidos a dieta com sobrecarga de sódio. A concentração de TNF- α sérico foi maior nos animais selvagens em relação aos animais *knockout* que ingeriram dieta com sobrecarga de sódio. Por outro lado, TNF- α no tecido renal foi maior nos camundongos *knockout* do que nos camundongos selvagens (SINGH; STEPHENSON; CASTILLO; MAJID, 2021). Contraditoriamente, a citocina IL-10, é classificada como uma citocina anti-inflamatória. Lima e colaboradores (2016) realizaram um ensaio experimental na qual camundongos machos *knockout* para IL-10 $^{-/-}$ e selvagens receberam infusão de angiotensina II por 14 dias (LIMA; ZEMSE; CHIAO; BOMFIM *et al.*, 2016). Como esperado, os animais *knockout* apresentaram maior aumento nos níveis pressóricos após infusão de angiotensina II quando comparado com camundongos selvagens (LIMA; ZEMSE; CHIAO; BOMFIM *et al.*, 2016). Posteriormente, foi realizada a infusão subcutânea de IL-10 nos animais e foi verificada a atenuação dos níveis de pressão arterial, mesmo os animais ainda recebendo angiotensina II central (LIMA; ZEMSE; CHIAO; BOMFIM *et al.*, 2016). Diante destes resultados, os autores sugerem que a IL-10 proporciona vasodilatação, por induzir a produção de óxido nítrico, reduzindo assim, a pressão arterial dos animais (ZHOU; SCHMIDTKE; ZEPP; MEYER *et al.*, 2005).

Apesar do consumo de sódio ser primordial para homeostase corporal (KIRKENDALL; CONNOR; ABBOUD; RASTOGI *et al.*, 1976) seu consumo excessivo, além de promover disfunções cardiovasculares, pode comprometer a arquitetura tecidual do intestino (MIRANDA; DE PALMA; SERKIS; LU *et al.*, 2018; WANG; LI; FANG; YANG *et al.*, 2018). No estudo realizado por Wang e colaboradores, ratos Sprague–Dawley receberam dieta contendo 4% de NaCl por um período de 28 dias e avaliaram a histomorfologia dos três compartimentos do intestino delgado. Os resultados obtidos mostraram que o consumo de dieta contendo 4% de NaCl reduziu a altura das vilosidades intestinais das três porções intestino delgado (duodeno, jejuno e íleo). Outro dado importante neste estudo, foi que houve redução da profundidade de cripta no duodeno e no íleo (WANG; LI; FANG; YANG *et al.*, 2018). Nesta mesma perspectiva, esta hipótese de alteração tecidual foi demonstrada por Miranda e colaboradores (MIRANDA; DE PALMA; SERKIS; LU *et al.*, 2018). Os autores avaliaram o efeito de uma dieta contendo 4% de NaCl acrescido de 1% de NaCl na água de beber, por quatro semanas, em camundongos. Como resultado, foi observado aumento da sensibilidade à inflamação em camundongos com sobrecarga de sódio (MIRANDA; DE PALMA; SERKIS; LU *et al.*, 2018). Além disso, este mesmo grupo de camundongos apresentaram maior quantidade de úlceras de tamanho maior, quando comparados aos camundongos da dieta controle. Estes animais desenvolveram úlceras que afetaram toda a parede colônica, até a serosa com grandes aglomerados de infiltrados celulares e, em alguns casos, perda total da camada epitelial (MIRANDA; DE PALMA; SERKIS; LU *et al.*, 2018).

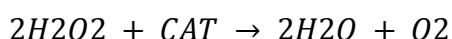
As células cancerosas podem de fato produzir maiores quantidades de espécies reativas de oxigênio (ROS) do que as células saudáveis. Essas espécies reativas de oxigênio, que incluem radicais livres como superóxido e peróxido de hidrogênio, podem danificar as células, incluindo o DNA, proteínas e lipídios. No entanto, as células normais também produzem ROS como subproduto da respiração celular e outros processos metabólicos,

principalmente quando ocorre desequilíbrio entre a produção e eliminação de espécies reativas de oxigênio ou nitrogênio associado a dano celular, sendo este evento denominado estresse oxidativo, que pode proporcionar diversos tipos de lesões e até mesmo morte das células (PISOSCHI; POP, 2015). Inúmeros fatores externos como baixo consumo de fibras, tabagismo, dietas com sobrecarga de gordura, açúcar, sal, alcoolismo, sedentarismo, consumo de determinados tipos de fármacos e radiação levam ao aumento excessivo na produção de espécies reativas (SAHA; LEE; WON; CHOI *et al.*, 2017). O metabolismo oxidativo é uma fonte contínua e importante de produção de espécies reativas de oxigênio endogenamente. As mitocôndrias são organelas responsáveis por diversos processos bioquímicos que envolvem principalmente a produção de ATP e superóxido (PIKE; SMIFT; CROTEAU; FERRICK *et al.*, 2011). Os antioxidantes são capazes de atenuar ou inibir o estresse oxidativo (DE VASCONCELOS; CARDOSO; JOSINO; MACENA *et al.*, 2014) podendo atuar por meio de enzimas ou não. Entre os antioxidantes não-enzimáticos, são obtidos a partir da alimentação, como por exemplo, os polifenóis, carotenoides e vitamina E (MANSOR; MAHMOOD, 2009). Dentre o grupo enzimático, podemos destacar a superóxido dismutase (SOD), a glutathione peroxidase (GSH) e a catalase (CAT) (DJORDJEVIC; SPASIC; JOVANOVIC-GALOVIC; DJORDJEVIC *et al.*, 2004). A superóxido dismutase é a primeira linha do sistema de defesa enzimático, estando presente em todas as células do organismo. Além disso, sua principal função é catalisar a reação do ânion superóxido em peróxido de hidrogênio (DOROSHOW; DAVIES, 1986), conforme a equação:

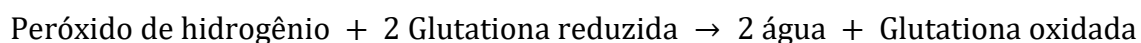


A catalase (CAT) é outra enzima extremamente importante no processo oxidativo. É uma proteína homotetramérica contendo heme, que não necessita de um redutor, sendo sua maior concentração nos peroxissomos e mitocôndrias de células hepáticas e hemácias, encontrada em bactérias, animais e plantas (ERSHOVA; BAIROVA; KOLESNIKOV;

KALYUZHAYAYA *et al.*, 2016). Sua principal função seria de converter peróxido de hidrogênio (H₂O₂) à água e oxigênio molecular. Dados na literatura já mostraram que uma molécula de catalase pode converter seis milhões de moléculas de peróxido de hidrogênio a cada minuto (SCHOONEN; HARRINGTON; LAFFERS; STRONGIN, 2010), conforme demonstrado na fórmula posteriormente:



A Glutathione tem sua capacidade redutora determinada pelo grupamento sulfidril, que está presente na cisteína. Pode ser considerada um antioxidante endógeno e exógeno, já que geralmente é sintetizada pelo fígado e pode ser absorvida no intestino, podendo ser sintetizada de novo (KIDD, 1997). Dentre o grupo da glutathione, encontra-se a glutathione peroxidase (GSH) é uma proteína tetramérica e requer que quatro átomos de selênio sejam vinculados como porções seleno-cisteína que conferem a atividade catalítica. Tem a função de redução do peróxido de hidrogênio a água, levando a oxidação de glutathione (COHEN; HOCHSTEIN, 1963). Para que o funcionamento adequado do sistema, glutathione oxidada é reduzida em glutathione reduzida, conforme mostrado na fórmula (HUBER; ALMEIDA; FÁTIMA, 2008).



Em grandes concentrações de H₂O₂, a catalase torna-se mais eficaz, ao passo que, em baixas concentrações deste composto, ocorre ação da glutathione (HALLIWELL, 1974)). As substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) são formadas de um subproduto da peroxidação lipídica (VREMAN; WONG; SANESI; DENNERY *et al.*, 1998). A ativação de vias como NADPH oxidase pode ocorrer por fatores como alimentação e parte do oxigênio consumido pode ser direcionado para a produção de espécies reativas de oxigênio, que se decompõem e formam substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), como

malondialdeído que são considerados biomarcadores prévios de estresse oxidativo (AMARAL; SILVA; LANNES, 2018).

Os extratos vegetais possuem elevada atividade antioxidante por conter elevados teores de compostos bioativos, dentre eles, os compostos fenólicos e flavonoides (VIJAYAKUMAR; MANIKANDAN, 2015). Os seus efeitos fisiológicos podem estar atrelados, principalmente a sua atividade antioxidante, podendo ser usado no tratamento de diversas doenças, como cardiovasculares que podem estar envolvidos no aumento de estresse oxidativo.

2.4. Efeito antihipertensivo da *Psidium guajava* L. (goiabeira)

Psidium guajava L. (Goiabeira) é um arbusto nativo da América do Sul. Entretanto, já pode ser encontrada em diversos países do mundo (NTOUMBA; MEVA; EKOKO; FOKO *et al.*, 2020). A goiabeira pertence à família Myrtaceae e ao gênero *Psidium*, possuindo cerca de 70 gêneros e 2.800 espécies (ZIETEMANN; ROBERTO, 2007). Suas diversas partes podem ser utilizadas para diversas finalidades, dentre elas terapêuticas (MITTAL; GUPTA; KAUR; GARG *et al.*, 2010). Já foi mostrada a utilização de suas folhas em situações de consumo medicamentoso (MITTAL; GUPTA; KAUR; GARG *et al.*, 2010). Tradicionalmente, dados etnobotânicos já mostraram que a utilização de *Psidium guajava* L. foi realizada em diversas complicações fisiológicas como no tratamento de diarreia (ALMEIDA; KARNIKOWSKI; FOLETO; BALDISSEROTTO, 1995), irritações e dores na garganta (JAIARJ, P.; KHOOHASWAN, P.; WONGKRAJANG, Y.; PEUNGVICHA, P. *et al.*, 1999) e conjuntivite (GUTIÉRREZ; MITCHELL; SOLIS, 2008). No desígnio de determinar as doses, toxicidade e possíveis efeitos colaterais da utilização não prescrita desta planta, foram desenvolvidos estudos farmacológicos que mostraram os efeitos contra diarreia (OJEWOLE; AWE; CHIWORORO, 2008), efeito hipoglicêmico (OJEWOLE, 2005), hipotensor (OJEWOLE,

2005), efeito espasmolítico (CHIWORORO; OJEWOLE, 2008) e efeito anti-inflamatório (OJEWOLE, 2006).

Todos os efeitos apresentados pela utilização de *Psidium guajava* L. podem estar relacionados a presença de compostos bioativos que ela possui (BEGUM; HASSAN; ALI; SIDDIQUI, 2004; DIAZ-DE-CERIO; VERARDO; GOMEZ-CARAVACA; FERNANDEZ-GUTIERREZ *et al.*, 2017). Dentre esses componentes podem-se destacar quercetina, ácido gálico, rutina e miricetina (SIMAO; MARQUES; MARCUSSI; CORREA, 2017); (DÍAZ-DE-CERIO; GÓMEZ-CARAVACA; VERARDO; FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ *et al.*, 2016). Esses compostos podem atuar sobre a vasculatura, o sistema nervoso autônomo ou na atividade renal, apresentando efeito diurético (CHOI; RYU; PARK; JUN *et al.*, 2016). A quercetina foi utilizada em um estudo no qual ratos com hipertensão renal (modelo 2 rins 1 clipe) tiveram anéis aórticos retirados e preparados para serem submetidos a teste de reatividade da vasculatura (CHOI; RYU; PARK; JUN *et al.*, 2016). Foi utilizado fenilefrina no intuito de obter-se uma resposta vascular contrátil (CHOI; RYU; PARK; JUN *et al.*, 2016). A quercetina aumentou o relaxamento induzido pela acetilcolina em ratos clipados, além de inibir a contratilidade ocasionada pela fenilefrina (CHOI; RYU; PARK; JUN *et al.*, 2016). Assim, a partir deste estudo, os autores concluíram que a quercetina melhora o relaxamento dependente do endotélio e inibe a resposta contrátil desencadeada pela fenilefrina, mostrando assim os efeitos vasculares benéficos da quercetina na hipertensão. Além do efeito vascular, a quercetina mostrou-se eficaz em melhorar a sensibilidade barorreflexa. Monteiro e colaboradores (2012) avaliaram o efeito da quercetina na pressão arterial, frequência cardíaca e sensibilidade barorreflexa em ratos espontaneamente hipertensos e ratos Wistar após os animais receberem tratamento por via oral de quercetina (2, 10 ou 25 mg/kg) ou solução salina por sete dias (MONTEIRO; FRANÇA-SILVA; ALVES; PORPINO *et al.*, 2012). Após este período os animais foram submetidos a registro de pressão arterial, frequência cardíaca e

sensibilidade barorreflexa com fenilefrina (8 µg/kg) e nitroprussiato de sódio (25 µg/kg) por injeção intravenosa (MONTEIRO; FRANÇA-SILVA; ALVES; PORPINO *et al.*, 2012). Doses maiores de quercetina (10 ou 25 µg/kg) reduziram os níveis pressóricos e a frequência cardíaca e aumentou a sensibilidade do componente parassimpático do barorreflexo (MONTEIRO; FRANÇA-SILVA; ALVES; PORPINO *et al.*, 2012). Assim, o tratamento com quercetina reduz a hipertensão e melhorou a sensibilidade barorreflexa em ratos espontaneamente hipertensos (MONTEIRO; FRANÇA-SILVA; ALVES; PORPINO *et al.*, 2012). O ácido gálico foi utilizado em ratos espontaneamente hipertensos da 8ª a 24ª semana por via oral no estudo de Jin e colaboradores (2017) (JIN; PIAO; SUN; LIU *et al.*, 2017). Estes animais foram submetidos a eletrocardiograma e a aorta foi retirada para análises de imunohistoquímica, histologia e proteína C reativa (JIN; PIAO; SUN; LIU *et al.*, 2017). Os autores verificaram que o tratamento com ácido gálico reduziu a pressão arterial em ratos espontaneamente hipertensos, por meio da inibição da contratilidade vascular, reduzindo também a espessura da parede aórtica, sugerindo assim uma possível estratégia terapêutica no tratamento da hipertensão (JIN; PIAO; SUN; LIU *et al.*). Outro efeito biológico importante associado ao ácido gálico foi o efeito diurético (KATEEL; RAI; KUMAR, 2014). Ratos Wistar receberam tratamento agudo com ácido gálico nas doses de 25 mg/kg ou 50 mg/kg por via oral, receberam posteriormente 2,5 mL/kg de solução salina e foram alocados em gaiolas metabólicas para aferição do volume urinário por 24 horas (KATEEL; RAI; KUMAR, 2014). Após este período, houve aumento no volume urinário, na excreção urinária de sódio, indicando que o ácido gálico possui efeito diurético quando administrado por via oral nas doses de 25 mg/kg ou 50 mg/kg (KATEEL; RAI; KUMAR, 2014). O extrato aquoso de folhas de *Psidium guajava L.* contendo todos estes componentes apresentou efeito hipotensor, sendo abordado no trabalho de Ojewole (2005), em que ratos Dahl-salt sensíveis anestesiados receberam tratamento administrado intravenosamente em doses de 50 a 800 mg/kg

(OJEWOLE, 2005). Ainda são exíguos os estudos que mostram os efeitos de *Psidium guajava* L. atuando nos níveis de pressão arterial de modelos experimentais, e ainda, por quais possíveis mecanismos o extrato de *Psidium guajava* L. estaria atuando na redução dos níveis de pressão arterial. Provavelmente, este efeito ocorreu pela combinação dos efeitos dos diversos componentes bioativos do extrato. Além dos efeitos cardiovasculares, o extrato de *Psidium guajava* também pode apresentar efeito antimicrobiano, como redução dos gêneros estafilococos e enterococos (SANCHES; GARCIA CORTEZ; SCHIAVINI; NAKAMURA *et al.*, 2005), *S. cerevisiae*, *A. niger* e *Escherichia coli* (WANG; WU; XIE; WU *et al.*, 2018), *S.mutans* e *S.mitis* (MEHTA; RAJESH; RAO; SHENOY *et al.*, 2014). Esta redução da população de algumas cepas bacterianas pode ser um fator que está levando a atenuação dos níveis de pressão arterial.

3. Justificativa

A realização deste trabalho justifica-se pelo fato que dados prévios do Laboratório de Fisiologia Endócrina e Cardiovascular mostraram que a formulação produzida a partir de extrato etanólico de folhas de *Psidium guajava* L., administrada por via oral durante 4 semanas, apresentou efeito anti-hipertensivo em animais não anestesiados (BRAGA; GOMES; BATISTA; DE SOUZA *et al.*, 2022). Além disso, Ojewole (2005) também mostrou que a administração endovenosa aguda de extrato aquoso de *Psidium guajava* L. em ratos Dahl salt reduziu pressão arterial de animais anestesiados, sugerindo que o efeito anti-hipertensivo do extrato poderia ser a partir da modulação autonômica (OJEWOLE, 2005). Porém, não foram realizados outros experimentos confirmando esta hipótese. De acordo com os experimentos complementares realizados no Laboratório de Fisiologia Endócrina e Cardiovascular, a administração de *PsE* não apresentou efeito diurético, e ainda associado a este dado, houve redução na excreção de sódio renal. Estes achados tornam-se conflitantes pois terapias medicamentosas para hipertensão baseadas na utilização de plantas, são geralmente associadas à função diurética. Assim, é necessário aventar quais os possíveis mecanismos desencadeados pela ação do extrato de *Psidium guajava* L. são responsáveis em reduzir os níveis de pressão arterial, sendo o tratamento com *Psidium guajava* L. uma possível alternativa terapêutica para o tratamento de hipertensão.

4. Hipótese

A hipótese subjacente a este trabalho sugere que há uma relação entre o aumento da pressão arterial e o aumento da atividade simpática. Por outro lado, é observado que o extrato de folha de goiabeira apresenta influência sobre a atividade simpática, a microbiota intestinal e a inflamação. Dessa forma, é possível que esses fatores contribuam para o efeito anti-hipertensivo do referido extrato.

Capítulo I

Preparo do extrato de *Psidium guajava* L., formulação a base de extrato de *Psidium guajava* L. (PsE) e análises fitoquímicas

5.1. Objetivos

- 1) Realizar a caracterização do extrato de *Psidium guajava* L. quanto a presença de componentes fotoquímicos.
- 2) Avaliar a contaminação do extrato de *Psidium guajava* L com metais pesados dada a natureza da região onde foram coletadas as folhas.

5.2. Estratégias experimentais

- Quantificar a concentração de taninos e íons presentes no extrato de *Psidium guajava* L. e na PsE
- Identificar os compostos presentes no extrato de *Psidium guajava* L. por cromatografia líquida associada a espectrometria de massas.
- Avaliar quantitativamente e qualitativamente a composição elementar na amostra de extrato de *Psidium guajava* L. por técnica de ICP-IOIS.

5.3. Metodologia

5.3.1. Produção e caracterização fitoquímica do extrato *Psidium guajava* L.

5.3.1.1. Obtenção de extrato etanólico de folhas de goiabeira

As folhas de *Psidium guajava* L. foram coletadas no município de São Bartolomeu, distrito de Ouro Preto, Minas Gerais, Brasil (Latitude: 20° 17' 15" S e Longitude: 43° 30' 29" O), no mês de Janeiro de 2019, nas proximidades do rio São Bartolomeu, área de baixada, remanescente de Mata Atlântica, cuja produção de frutos é nativa, sem domesticação, de acordo com permissão do Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen AEB4F09). Exsicata de material propagativo foi encaminhada a identificação no Herbário José Badini da Universidade Federal de Ouro Preto e registrada sob o número OUPR27242. Na pós-colheita, as folhas íntegras, totalmente expandidas, foram selecionadas, lavadas com água corrente e secas em papel absorvente. Após esse processo, pesou-se em balança semi-analítica e transferiu-se as folhas para vaso sifonado onde foram imersas em etanol 95° INPM (Chemicals) na proporção 2:3, as quais foram extraídas por maceração sucessiva, sendo trocado o álcool por três vezes, sendo cada troca realizada após 10 dias da troca realizada anteriormente. O extrato obtido foi sifonado, filtrado em papel de filtro quantitativo e evaporado em evaporador rotativo (Fisatom, modelo 804) em pressão reduzida (80 mBar) e temperatura aproximada de 40°C. O extrato residual obtido foi mantido em banho-maria a 40°C por aproximadamente 10 dias, obtendo-se assim o extrato bruto seco. As etapas de preparo do extrato bruto seco de folha de goiabeira estão demonstradas na Figura 1. Etapas de produção do extrato bruto seco de folha de goiabeira.



Figura 1. Etapas de produção do extrato bruto seco de folha de goiabeira.

Fonte: Própria autora

Preparo da formulação a base de extrato de Psidium guajava L. (PsE)

Para o preparo formulação a base de extrato de *Psidium guajava* L. (PsE) foi utilizado extrato bruto seco, veiculado em uma formulação conforme descrito na patente depositada sob o registro BR10201900148.

5.3.2. Caracterização fitoquímica do extrato

5.3.2.1. Determinação de taninos

O doseamento de taninos foi analisado segundo a metodologia descrita por Makkar e colaboradores (MAKKAR; BECKER, 1993). Para isto, 1 mg de extrato bruto seco e de PsE foram diluídos em metanol adicionado a 1% de solução de vanilina e 8% de HCl, deixados em abrigo de luz durante 20 minutos e depois lidos em espectrômetro a 520 nm. Para a construção da curva padrão utilizou-se catequina e os resultados foram expressos em mg de tanino por massa fresca ou extrato. Aliquotas de 100 µL foram adicionadas a 1000 µL de

vanilina (1%) e 1000 µL de ácido clorídrico a 8%, homogeneizadas e deixadas em abrigo de luz e ao calor por 30 minutos. Na *PsE*, os taninos foram quantificados da mesma forma em uma concentração de 200 mg/g de princípios ativos. A absorvância foi avaliada em espectrofotômetro a 520 nm usando metanol como branco. A curva padrão foi feita a partir de 10 mg de catequina em 10 mL de etanol PA, constituindo a solução padrão. Alíquotas de 1000 µL foram adicionadas a 1.000 µL de vanilina (1%) e 1000 µL de ácido clorídrico a 8%, homogeneizadas e deixadas em abrigo da luz e do calor por 30 minutos e medidas em espectrofotometria a 720 nm utilizando metanol branco. Os valores foram expressos como equivalentes de catequina.

5.3.2.2. Determinação de íons pelo ICP

Para determinação de íons contidos no extrato bruto seco de *Psidium guajava L.* foi utilizado o equipamento ICP-OES. Para isto, foram utilizados cerca de 100 mg da amostra de extrato bruto seco que foram pesados e digeridos quimicamente com uma mistura de peróxido de hidrogênio a 30% (20% v/v) e ácido nítrico a 70% (80% v/v) por 24 horas a 150°C. O volume residual límpido foi diluído em água ultra-pura (volume final 10,0 mL no balão volumétrico), filtrado em uma membrana de 0,22 µm Durapore de baixa ligação às proteínas (PVDF) e amostrado pelo ICP-OES para análise. A composição de micronutrientes do extrato foi avaliada por meio da determinação das concentrações de elementos maiores, menores e vestígios usando o Espectrômetro de Emissão Ótica de Plasma Acoplado Indutivamente Agilent 725 (ICP-OES) (plasma axial) no Laboratório de Geoquímica da Universidade Federal de Ouro Preto, Brasil. O limite de quantificação (LoQ) foi calculado usando a seguinte equação (SHRIVASTAVA; GUPTA, 2011): $LOQ = X + 10s$, em que X significa valores dos espaços em branco e significa o desvio padrão dos espaços em branco. O ICP-OES foi utilizado para quantificação de Al, Ba, Be, Ca, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, P, Sr, Zn,

As, Ba, Cd, Co, Mo, Ni, Pb , V e Y. Uma curva de calibração em branco e cinco pontos foi gerada para cada elemento usando seus respectivos padrões (SpecSol e High-Purity Standards). O padrão internacional NIST 1515 (folhas de maçã) foi analisado para monitorar o desempenho instrumental.

5.3.3. 3. *Análise UPLC-DAD-MS*

Foi realizada análise UPLC-DAD-MS. Para isto, foi utilizada uma amostra do extrato bruto seco (10 mg/mL) que foi ressuspensa em metanol e, em seguida, filtrada por meio de um filtro de seringa de 0,2 µm. Para as análises foram realizadas em cromatografia líquida UPLC Acquity Waters® acoplada a espectrômetro de massa de captura de elétrons (Agilent®) e ionizador químico de pressão atmosférica. As separações cromatográficas foram realizadas usando o sistema cromatográfico Acquity UPLC (Waters, Millford, MA) equipado com um sistema de bomba binária, bem como uma coluna Acquity BEH C18 (1,7 mm × 50 mm, 2 µm d.i.), também da Waters Corporation. O sistema UPLC foi acoplado a um espectrômetro de massa (MS) usando uma fonte de ionização por eletro pulverização Z-spray. Como fase móvel foram utilizadas em água com acetonitrila (A) e ácido fórmico (B) com protocolo de eluição de 0-11 minutos em gradiente linear B de 5-95%. As condições da fonte de ionização foram as seguintes: tensão capilar de 5 kV, temperatura da fonte de 320°C, corrente elétrica de 5 mA, gás de arraste nitrogênio e pressão de 27 *psi*. O processamento dos dados foi realizado usando o software MassLynx v4.1. A identificação dos compostos no software MassLynx foi realizada de acordo com o tempo de retenção. Além disso, a massa e a carga dos íons presentes e esses valores foram comparados com compostos anteriores já identificados na literatura pela mesma técnica.

5.5. Análises estatísticas

Os dados foram expressos em média e erro padrão da média. Os dados foram analisados estatisticamente utilizando o GraphPad Prism 8.0 para Windows (GraphPad Software, San Diego Califórnia, EUA).

5.4. Resultados

5.4.1. Dosagem dos taninos

No intuito de determinar os fatores antinutricionais do extrato bruto seco de *Psidium guajava* L. e PsE, foram realizados doseamentos da concentração de taninos. Os resultados do conteúdo de taninos no extrato bruto seco e PsE estão expressos na Tabela 1.

Tabela 1. Doseamento de taninos no extrato bruto seco de *Psidium guajava* L. e PsE.

Amostra	Extrato bruto seco	PsE
Conteúdo (mg de catequinas)	0,204 ± 0,007	0,084 ± 0,002

Fonte: Própria autora

5.4.2. Determinação de íons pelo ICP

Amostras de extrato bruto seco de *Psidium guajava* L. foram tratadas para análise de elementos em um aparelho ICP-OES. Os resultados mostraram a presença de Al, Ba, Be, Ca, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, P, Sr, Zn, As, Ba, Cd, Co, Mo, Ni, Pb, V e Y e seus respectivos conteúdos são apresentados na Tabela 2. Alguns componentes foram inferiores a limite de quantificação (LoQ) e, portanto, os conteúdos reais no extrato não puderam ser determinados como mostrado na Tabela 2.

Tabela 2. Análise de micronutrientes do extrato de folha de *Psidium guajava* L. avaliada por pesquisa de elementos e limite de quantificação utilizando a técnica de ICP-OES (*Inductively Coupled Plasma - Atomic Emission Spectrometry*).

Elemento (mg/kg)	Extrato	LQ	(%) LQ
--------------------------	----------------	-----------	---------------

<i>Al</i>	100.360	3.674	2732
<i>Ba</i>	1.362	0.071	1910
<i>Be</i>	0.123	0.043	283
<i>Ca</i>	218.744	4.360	5017
<i>Cu</i>	10.269	0.896	1146
<i>Fe</i>	22.760	3.067	742
<i>K</i>	13422.485	40.148	33432
<i>Mg</i>	429.587	14.167	3032
<i>Mn</i>	2.259	0.382	592
<i>Na</i>	390.782	158.334	247
<i>P</i>	1333.577	23.138	5764
<i>Sr</i>	0.378	0.022	1742
<i>Zn</i>	39.450	0.634	6224
<i>As</i>	<LoQ	13.377	-
<i>Ba</i>	<LoQ	0.071	-
<i>Cd</i>	<LoQ	0.651	-
<i>Cr</i>	<LoQ	0.844	-
<i>Co</i>	<LoQ	2.320	-
<i>Mo</i>	<LoQ	3.325	-
<i>Ni</i>	<LoQ	5.167	-
<i>Pb</i>	<LoQ	13.043	-
<i>V</i>	<LoQ	1.263	-

Y	<LoQ	0.358	-
---	------	-------	---

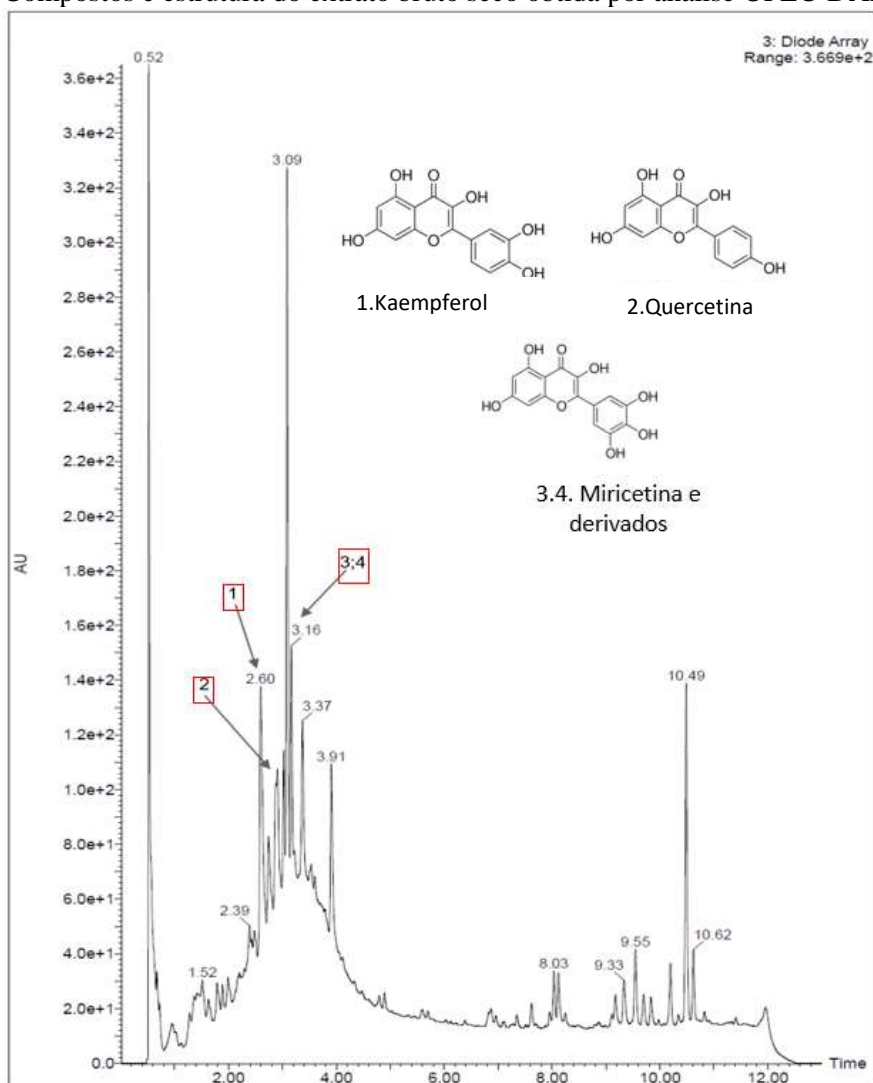
* Os valores apresentados como <LoQ são inferiores ao limite de quantificação do equipamento.

Fonte: Própria autora

5.4.3. Análise UPLC-DAD-MS

Uma amostra do extrato bruto seco de *Psidium guajava* L. foi analisada em um cromatógrafo líquido do sistema Acquity (UPLC) acoplado a um analisador DAD-UV e a um espectrômetro de massa. Os resultados dessas análises são mostrados na **Erro! Fonte de referência não encontrada.** e Tabela 3. A análise UPLC-DAD resultou no cromatograma, em que vários picos de absorvância na região de UV foram registrados. Alguns desses picos foram selecionados para análise de espectros de massa e os resultados combinados do cromatograma UPLC-DAD e espectros de massa foram tomados em conjunto para proposição de compostos apresentados no extrato com base em análises anteriores já descritas na literatura.

Figura 2. Compostos e estrutura do extrato bruto seco obtida por análise UPLC-DAD-ESI-MS



Fonte: Própria autora

Tabela 3. Derivados de metabólitos secundários identificados no extrato bruto de *Psidium guajava* L. obtidos por análise UPLC-DAD-ESI-MS

Pico	Composto	RT (min)	UV (nm)	LC-MS [M - H] ⁻ (m/z)	LC-MS [M + H] ⁺ (m/z)	Referência
1	Kaempferol	2.60	255; 351	286	288	(LIANG; QIAN; YAO, 2005)
2	Quercetina	3.01	255; 353	301	303	(DÍAZ-DE-CERIO; GÓMEZ-CARAVACA; VERARDO; FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ <i>et al.</i> , 2016)
3	Miricetina	3.16	265; 346	317	319	(DÍAZ-DE-CERIO; GÓMEZ-CARAVACA; VERARDO; FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ <i>et al.</i> , 2016)
4	Derivados de Miricetina	3.17	265; 346	317	319	(WANG, LU; WU, YANAN; BEI, QI; SHI, KAN <i>et al.</i> , 2017)

Fonte: Própria autora

Capítulo II

Associação do efeito antihipertensivo de PsE com a atividade simpática

6.1. Objetivos

- 1) Avaliar se a administração oral aguda da *PsE* influencia a atividade simpática eferente de forma direta.

6.2. Estratégia experimental

- Verificar se ocorre alteração na atividade simpática sobre o leito lombar em animais submetidos ao tratamento agudo com *PsE*.

6.3. Metodologia

6.3.1. Modelo experimental

Para realização dos experimentos, foram utilizados ratos da linhagem Wistar machos recém-desmamados com 21 dias de idade, pesando aproximadamente 50g. Após o período de amamentação, os filhotes foram divididos aleatoriamente em dois grupos: o primeiro grupo recebeu dieta com sobrecarga de sódio (0,9% Na⁺) por 12 semanas após o desmame, o qual foi denominado grupo HSD. O segundo grupo recebeu dieta Nuvilab® (0,27% Na⁺) por 12 semanas, grupo dieta padrão para roedores, o qual foi denominado grupo SSD. Este modelo foi previamente caracterizado pelo Laboratório de Fisiologia Endócrina e Cardiovascular e foi denominado HS12W (GOMES; SA; AGUIAR; PAES *et al.*, 2017), conforme demonstrado na Figura 3.

Figura 3. Imagem representativa do modelo experimental HS12W



Fonte: própria autora

A dieta do grupo HSD foi fabricada no Laboratório de Fisiologia Endócrina e Cardiovascular, pela adição de NaCl (Dinâmica Reagentes Analíticos, São Paulo, Brasil) à ração comercial, de forma a se obter uma ração com conteúdo final de 0,9% de Na⁺. Para esse fim, a ração comercial foi moída, de forma a facilitar a incorporação do cloreto de sódio. Para equiparar as condições físicas das dietas ofertadas aos grupos controle de HSD, a dieta ofertada ao grupo SSD também foi moída. Durante todo período, antes de serem

submetidos a quaisquer procedimentos, os animais foram gerados e mantidos em racks ventiladas no Centro de Ciência Animal da Universidade Federal de Ouro Preto, com 25 trocas/hora de ar, ração e água (de torneira) *ad libitum*, ciclo claro-escuro de 12h e temperatura média de $24\pm 1^{\circ}\text{C}$. Todos os procedimentos que foram realizados utilizando os animais, foram conduzidos de acordo com as diretrizes do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) tiveram aprovação prévia da Comissão de Ética em Uso Animal da Universidade Federal de Ouro Preto, sob protocolo de nº, 8880090719.

6.3.2. Registro de atividade simpática lombar

6.3.2.1. Isolamento de nervo lombar

Na 16ª semana foi realizado o registro de atividade simpática no leito lombar dos animais, pelas quais permaneceram em jejum de ração por 12 horas, sem restrição hídrica. Sob anestesia com isoflurano (Di-morf® Cristália Prod. Quím. Farm. Ltda, Itapira, São Paulo, Brasil) (3% para indução e de 2% para manutenção) juntamente com O_2 100%, os ratos foram submetidos a procedimento cirúrgico para implante de cânulas de polietileno (PE-20 soldado a PE-10, Clay Adams, Parsippany, NJ, EUA) na artéria e veia femorais para obtenção do registro da pressão arterial e administração de drogas, respectivamente. A anestesia foi induzida e mantida com uretana (Sigma-Aldrich, Alemanha) (1400 mg/kg) intravenosamente. Uma vez estabelecida anestesia, uma cânula de aço inoxidável foi implantada na traquéia do animal para posterior ventilação artificial. A seguir, foi realizada a dissecação do nervo lombar. Para isolar o nervo lombar, foi realizada uma laparotomia lateral, removendo tecidos adjacentes e isolando o feixe de nervos simpáticos. Um eletrodo bipolar construído com dois fios de aço inoxidável (0,127 mm, A-M Systems Inc., Carlsborg, WA; EUA) foi posicionado imediatamente acima dos feixes-alvo, ao qual o eletrodo foi fixado. Com o auxílio da cureta de vidro, os feixes foram então assentados

perpendicularmente sobre as duas alças previamente dobradas na porção terminal dos eletrodos e cuidadosamente suspensos da superfície do tecido apenas o suficiente para livrá-los do fluido tecidual sem causar-lhes estiramento excessivo. O fluido que envolve os nervos e os eletrodos foi drenado com cotonetes e uma resina de silicone polivinilsiloxane autopolimerizável (Arrowhead Forensics, Lenexa, KS; EUA) foi rapidamente aplicada nos locais de forma a envolver e isolar os conjuntos de nervos-eletrodos do restante dos tecidos e fluidos extracelulares. Depois de constatada a polimerização da resina (enrijecimento), o micro-manipulador foi desprendido dos eletrodos, seguindo-se a remoção dos afastadores.

6.3.2.2. Protocolos experimentais

6.3.2.2.1. Avaliação da função barorreflexa sobre a atividade simpática lombar

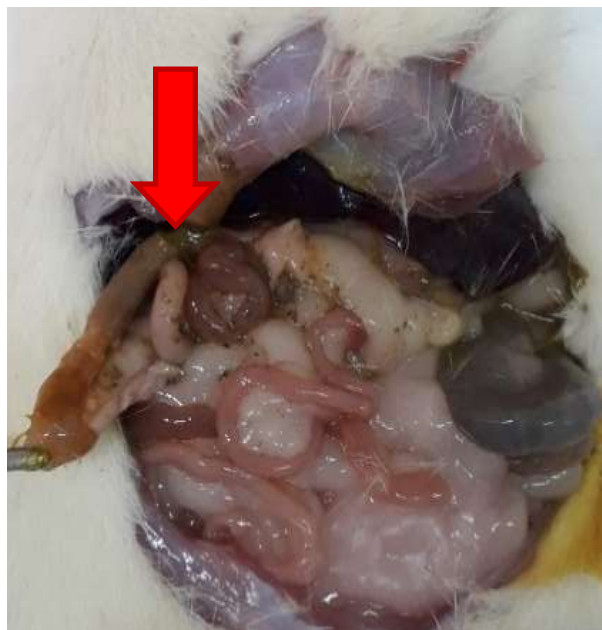
Após a finalização da instrumentação dos animais, foram gravados 2 minutos no intuito de avaliar os parâmetros basais. Findado o período basal, foram injetados em *bolus* fenilefrina (Sigma-Aldrich, Alemanha) na concentração de 15 µg/mL, dose de 25 µg/kg e nitroprussiato de sódio (Sigma-Aldrich, Alemanha) na concentração de 100 µg/mL, dose de 50 µg/kg para avaliar a sensibilidade do barorreflexo dos ratos.

6.3.2.2.2. Avaliação do efeito agudo da PsE 200 sobre a atividade simpática lombar

Após esse período de avaliação barorreflexa, foi coletado outro período de basal de 20 minutos e a partir daí administrado agudamente, por gavagem orogástrica (1mL em aproximadamente 1 minuto) PsE 200 ou veículo (água destilada) por meio de uma sonda inserida previamente no estômago do animal e observado mudanças nos níveis pressóricos e na atividade simpática no leito lombar. A dose de 200 mg/kg do extrato contido na formulação foi empregada devido à sua capacidade de produzir efeito biológico de redução

da pressão arterial em ratos (BRAGA; GOMES; BATISTA; DE SOUZA *et al.*, 2022). Após a eutanásia do animal, foi realizada a necropsia para confirmação se *PsE* 200 realmente passou da câmara do estômago para o intestino delgado, conforme mostrado pela seta vermelha, na Figura 4.

Figura 4. Conteúdo de *PsE* 200 no intestino delgado ao fim do experimento de registro de atividade simpática lombar. A seta em vermelho indica o local onde foi feita a incisão e a presença da *PsE* (substância esverdeada).



Fonte: Própria autora

6.4. Coleta e registro dos dados

Para coleta dos dados de atividade simpática do nervo lombar (ASNL), o sinal captado pelo eletrodo foi filtrado, registrado na banda de 100 a 1000 Hz e amplificado 10.000 vezes por um amplificador diferencial DP-311 (Warner Instruments, EUA). O sinal analógico filtrado e amplificado foi convertido em sinal digital por um conversor analógico/digital PowerLab 8/35 (ADInstruments, EUA) e processado pelo software Lab Chart 8.1 para Windows de forma a criar os registros temporais das variáveis adquiridas.

Nesse software, o sinal foi digitalizado a 3.000 Hz, em uma janela de digitalização de 1 Volt, processado para remover o *offset*, simultaneamente retificado e convertido em ASNL integrada (∫ASNL). As variáveis de pressão arterial, atividade simpática lombar bruta e integrada foram coletadas e apresentadas simultaneamente no programa. Ao final do experimento, foi injetada uma dose intravenosa de brometo de Vecurônio (Cristália Prod. Quím. Farm. Ltda, Itapira, São Paulo, Brasil) (2 mg/mL / 0,02 mg/kg) e retirado oxigênio com objetivo de verificar a atividade simpática máxima e, após este processo, o animal foi eutanasiado com sobredose de uretana (Sigma-Aldrich, Alemanha). Ainda permanecendo o conjunto nervo e eletrodo foi realizado o registro do sinal resultante, denominado ruído de fundo, por mais 5 minutos, o qual foi subtraído do valor total da ∫ASNL. A linha de base da ∫ASNL foi estabelecida em 100% e as respostas simpáticas aos estímulos com *PsE* 200 foram expressas como alterações percentuais em relação à linha de base.

Os dados então foram computados e a confecção dos gráficos foram feitos com a utilização do software Prisma 8.0 para Windows (GraphPad Software, San Diego Califórnia, EUA). Os registros de atividade simpática integrada foram analisados na constante de tempo de integração de 0,1 segundo na construção dos dados quantitativos. Já para os dados qualitativos a análise foi realizada na constante de tempo de integração de 0,01 segundos da atividade simpática lombar integrada.

6.5. Análises estatísticas

Os dados foram expressos em média e erro padrão da média. As comparações entre os grupos foram realizadas por análise de variância de duas vias (ANOVA) para medidas repetidas. O pós-teste de Tukey foi utilizado para comparações múltiplas entre pares de médias após a ANOVA detectar diferença nas variâncias entre os grupos. Já o pós-teste de Dunnett foi utilizado para comparações múltiplas entre pares de médias após a ANOVA

detectar diferença nas variâncias entre os grupos no decorrer do tempo. Todos os dados foram analisados estatisticamente utilizando o software GraphPad Prism 8.0 para Windows (GraphPad Software, San Diego Califórnia, EUA). As diferenças entre pares de médias foram consideradas significantes quando a probabilidade de erro de tipo I foi menor que 5% ($p < 0,05$).

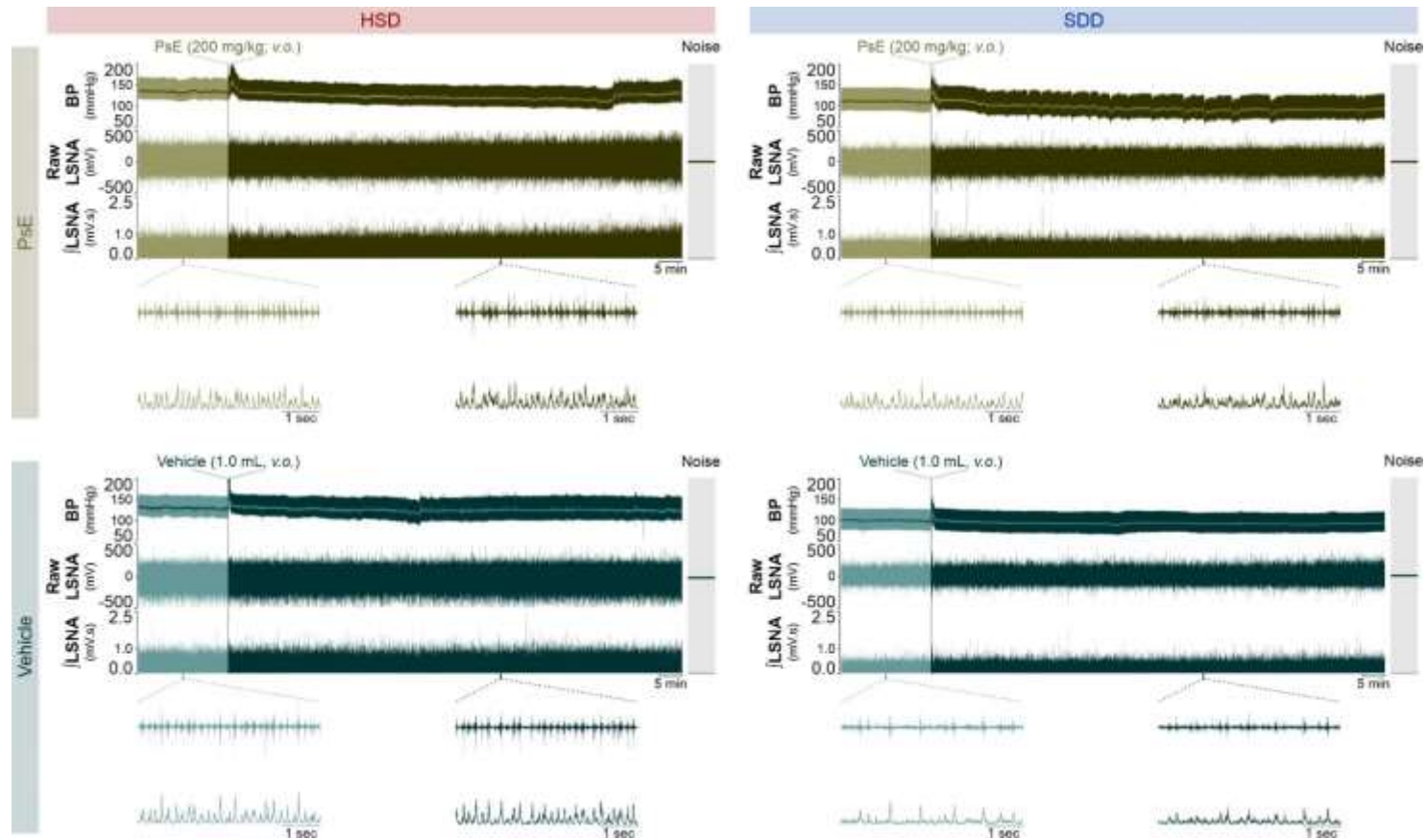
6.5. Resultados

6.5.1. Registro de atividade simpática de nervo lombar

A avaliação do índice de reatividade barorreflexa mostrou que HSD por 16 semanas não foi eficaz em alterar o controle barorreflexo de quando o barorreflexo foi testado com fenilefrina (SSD: $-0,04 \pm 0,005\%/mmHg$; HSD: $-0,04 \pm 0,007\%/mmHg$) ou nitroprussiato de sódio (SSD: $-0,97 \pm 0,19\%/mmHg$; HSD: $-1,05 \pm 0,18\%/mmHg$).

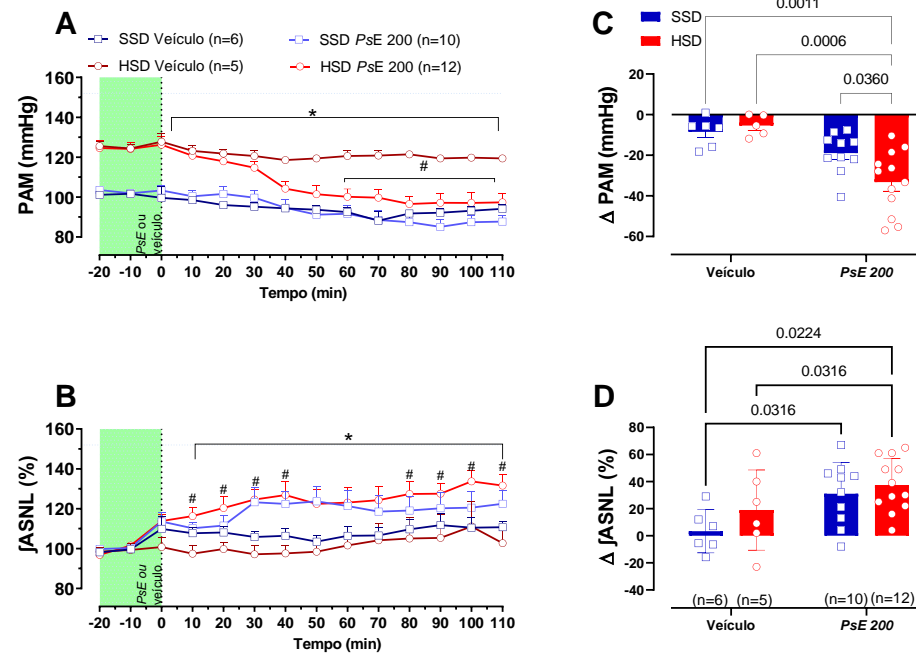
A administração aguda de PsE 200 através de uma sonda orogástrica provocou uma queda de longa duração na pressão arterial acompanhada por um aumento na atividade simpática lombar de ratos anestesiados com uretana HSD e SSD (Figura 5). A queda da pressão arterial foi maior nos ratos HSD quando comparados aos ratos SSD (SSD PsE 200: $-18,9 \pm 3,1$ mmHg vs. HSD PsE 200: $-33,1 \pm 4,4$ mmHg; ANOVA de duas vias; $p < 0,05$) (Figura 6, painéis A e C. A queda da pressão arterial induzida pela PsE 200 foi acompanhada por um aumento na reatividade simpática lombar que não foi diferente entre os grupos (SSD PsE 200: 31 ± 7 % vs. HSD PsE 200: 37 ± 6 %; ANOVA de duas vias; $p > 0,05$) como mostrado na Figura 66, painéis B e D.

Figura 5. Traçados qualitativos da atividade simpática lombar em ratos HSD e SSD anestesiados com uretana, após a administração oral de PsE 200 ou veículo.



Fonte: Própria autora

Figura 6. Efeito da PAM e da ASNL da administração intragástrica de uma dose única de *PsE* 200 ou veículo em ratos SSD e HSD anestesiados e não tratados cronicamente. Os painéis A e B mostram registros de pressão arterial e atividade simpática lombar (sinal bruto e integrado) ao longo de 110 min. As linhas tracejadas indicam o momento da administração intragástrica do *PsE* 200 ou administração do veículo. Alterações máximas na PAM e atividade nervosa simpática lombar (ASNL) devido a *PsE* 200 foram calculadas e expressas como Δ PAM (painel C) e Δ Int. ASNL (painel D), respectivamente. Para os painéis C e D, os quadrados e círculos dispersos representam valores individuais de SSD e HSD, respectivamente e as barras representam dados médios do grupo (média \pm SEM). ANOVA de duas vias seguida do teste post-hoc de Dunnett; $p < 0,05$, # diferente da linha de base (antes da administração de *PsE* 200. *diferente do SSD veículo.



Fonte: própria autora

Capítulo III

Avaliação da PsE sobre a absorção de sódio intestinal

7.1. Objetivo

- 1) Analisar se a administração oral com PsE produz alterações na absorção de sódio intestinal.

7.2. Estratégias experimentais

- Mensurar a umidade e a concentração de sódio nas fezes de ratos HS12W submetidos ou não ao tratamento crônico com PsE 200.
- Verificar se a PsE 200 altera mecanismo de absorção de sódio, a partir de ensaios de perfusão intestinal *in situ* em ratos HS12W tanto com tratamento agudo, quanto com tratamento crônico.

7.3. Metodologia

7.3.1. Modelo experimental

O modelo experimental, acomodação dos ratos antes do início dos protocolos experimentais e a preparação da ração com sobrecarga de sódio está descrito com detalhes no Capítulo II. Todos os procedimentos que foram realizados utilizando os animais, foram conduzidos de acordo com as diretrizes do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) tiveram aprovação prévia da Comissão de Ética em Uso Animal da Universidade Federal de Ouro Preto, sob protocolo de nº 1420100719.

7.3.2. Administração oral de PsE

A administração oral de *PsE* foi realizada por um período de quatro semanas, sendo então, denominado de tratamento crônico. Este tratamento foi realizado ao final das 12 semanas após o desmame, nas quais os animais dos grupos de dieta SSD e HSD passaram a receber a administração oral de placebo (água destilada) ou *PsE* 200 (formulação preparada contendo 200 mg/kg de extrato bruto seco). As administrações crônicas de *PsE* foram feitas por gavagem orogástrica, no volume de 1 mL e com as concentrações das suspensões administradas diariamente corrigidas pela massa corporal dos animais de forma a manter-se a dosagem constante. No caso dos experimentos envolvendo a perfusão intestinal *in situ*, foi realizado o tratamento agudo também, já que os ratos receberam durante o ensaio *PsE* 200 ou veículo.

7.3.3. Ensaio de avaliação da absorção de sódio intestinal

Determinação do teor, umidade e excreção de sódio nas fezes

Na 12^a (antes da administração oral de *PsE*) e 16^a semanas após o desmame (depois da administração oral de *PsE*), foram coletadas amostras de fezes exteriorizadas e,

posteriormente, foram pesadas. A umidade fecal foi determinada usando aproximadamente 110 mg de fezes úmidas. Para isso, o conteúdo de fezes foi pesado em placas de Petri, previamente seco em estufa (Nova instruments®) por 24 horas a 105°C. Após o período, as fezes secas foram pesadas e a umidade foi determinada pela seguinte equação:

$$\text{Umidade (\%)} = 100 \times \frac{(\text{Peso inicial das fezes} - \text{Peso final das fezes})}{(\text{Peso da amostra})}$$

O conteúdo de sódio e potássio das fezes foi obtido com o peso das placas contendo as amostras e digerido quimicamente com uma mistura de peróxido de hidrogênio a 30% (20% v / v) e ácido nítrico a 70% (80% v/v) por 24 horas a 150°C. O volume residual límpido foi diluído em água ultrapura (volume final 10,0 mL no balão volumétrico), filtrado em uma membrana de 0,22 µm Durapore (Hidrofil, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil) de baixa ligação às proteínas e lido em fotômetro de chama (Tecnal 3®).

7.3.4. *Quantificação da absorção de sódio intestinal por técnica de perfusão intestinal in situ*

7.3.4.1. *Instrumentação*

Ao final da 16ª semana pós desmame, após a administração oral de veículo ou PsE 200 por 4 semanas, foi mensurado o transporte intestinal de sódio por meio da técnica *ex vivo* de perfusão intestinal. Para tanto, os animais permaneceram em jejum de ração por 36 horas para total esvaziamento gástrico, sem restrição hídrica. Após este período, os animais foram anestesiados com tiopental sódico (Thiopentax, Cristália Prod. Quím. Farm. Ltda, Itapira, São Paulo, Brasil) na dose de 60mg/kg, por via intraperitoneal. Para coleta de

sangue durante o procedimento, os animais foram submetidos ao processo cirúrgico de canulação na artéria femoral. Cânulas foram produzidas a partir da soldagem de polietileno PE-10 e PE-20, sendo o tamanho das mesmas ajustados aos tamanhos dos animais utilizados. Os animais foram colocados em posição de decúbito dorsal e tricotomizados na região da pata traseira direita, sendo exposta e dissecada a artéria femoral. A cânula foi preenchida com solução isotônica de cloreto de sódio e fosfatos (PBS) e a extremidade do PE-20 fechada com pino de aço níquel. A parte de PE-10 foi introduzida no interior da artéria femoral e a parte de PE-20 exteriorizada para permitir a retirada de sangue. Após este processo, foi realizada laparotomia na linha média do abdômen para exposição da cavidade abdominal e intestinos. O piloro foi localizado e uma incisão transversal feita imediatamente abaixo dele, no duodeno, para inserção de um adaptador Luer-Lock (33 mm) ligado a um tubo de silicone. O cécum foi então localizado e uma incisão transversal feita imediatamente acima da válvula ileocecal para inserção de outro adaptador Luer-Lock ligado a um tubo de silicone. O primeiro tubo foi conectado a uma proveta graduada contendo solução isotônica e o segundo (segmento terminal do intestino delgado) foi posicionado em uma proveta graduada para medir o volume do efluente.

7.3.4.2. Procedimentos

Inicialmente, o processo de lavagem do intestino foi realizado com uma solução isotônica de NaCl (0,9%) tamponada com NaHCO₃ (Sigma-Aldrich, EUA) (pH 8,0) a 37°C perfundida em fluxo de 1 mL por minuto utilizando bomba peristáltica (Gilson®) durante aproximadamente 30 minutos. Após este processo, uma amostra de *PsE* 200 a 37°C foi introduzida no sistema de perfusão por uma bomba de infusão para seringa (Hazel® 06906) ajustada para um fluxo de 1 mL por minuto. Nesse momento, enquanto o volume de suspensão foi administrado, a bomba peristáltica foi desligada. Concluída a

administração da PsE 200, a bomba de infusão foi desligada e a bomba peristáltica foi religada, mantendo-se a perfusão até 120 minutos a 1 mL por min e 37°C. Durante a execução do protocolo experimental, foram retiradas amostras de sangue por meio do acesso arterial previamente feito. Amostras de 700 µL de sangue foram retiradas nos tempos 30, 60, 90 e 120 minutos após o início da perfusão com salina tamponada pH 8,0. As amostras foram armazenadas sob refrigeração a -80°C até análise. O volume de perfusato no final deste período serviu como indicador de taxa de absorção de água e amostras da solução de perfusão antes e após passar pelo intestino foram coletadas nos tempos 60, 90, 120 e 120 minutos foram analisados quanto ao teor de sódio e para determinar taxa de absorção de sódio através do intestino delgado.

7.4. Análises estatísticas

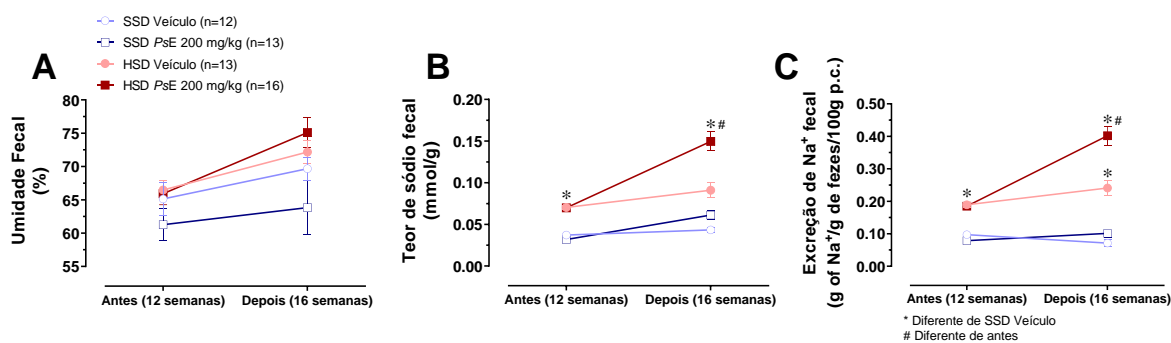
Os dados foram expressos em média e erro padrão da média. As comparações entre os grupos foram realizadas por análise de variância de duas vias (ANOVA) para medidas repetidas. O pós-teste de Tukey foi utilizado para comparações múltiplas entre pares de médias após a ANOVA detectar diferença nas variâncias entre os grupos. Já o pós-teste de Dunnett foi utilizado para comparações múltiplas entre pares de médias após a ANOVA detectar diferença nas variâncias entre os grupos no decorrer do tempo. Todos os dados foram analisados estatisticamente utilizando o software GraphPad Prism 8.0 para Windows (GraphPad Software, San Diego Califórnia, EUA). As diferenças entre pares de médias foram consideradas significantes quando a probabilidade de erro de tipo I foi menor que 5% ($p < 0,05$).

7.5. Resultados

7.5.1. Determinação do teor, umidade e excreção de sódio nas fezes

Os resultados referentes aos índices de umidade, teor de sódio fecal e excreção de sódio fecal foram apresentados na figura 7, distribuídos nos painéis A, B e C. De acordo com as análises realizadas, não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos quanto aos índices de umidade nas fezes. Contudo, verificou-se que o teor de sódio fecal era maior nos ratos que receberam a dieta HSD veículo em comparação aos ratos que receberam a dieta SSD veículo (SSD veículo: $0,037 \pm 0,002$ mmol/g e HSD veículo: $0,070 \pm 0,002$ mmol/g, ANOVA de duas vias, $p < 0,05$). Além disso, foi constatado que após o tratamento com PsE, houve um aumento ainda maior no teor de sódio fecal no grupo HSD, sendo este superior ao grupo SSD (SSD PsE: $0,061 \pm 0,006$ mmol/g e HSD PsE: $0,150 \pm 0,011$ mmol/g, ANOVA de duas vias, $p < 0,05$). Já em relação à excreção de sódio fecal, observou-se que esta também era maior no grupo HSD veículo, quando comparado ao grupo SSD veículo antes do tratamento (SSD veículo: $0,097 \pm 0,007$ g de Na^+ /g de fezes e HSD veículo: $0,189 \pm 0,008$ g de Na^+ /g de fezes, ANOVA de duas vias, $p < 0,05$), e que tal índice aumentou significativamente após o tratamento com PsE (SSD PsE: $0,101 \pm 0,012$ g de Na^+ /g de fezes e HSD PsE: $0,402 \pm 0,030$ g de Na^+ /g de fezes, ANOVA de duas vias, $p < 0,05$).

Figura 7. Umidade fecal (painel A), teor de sódio fecal (painel B) e excreção de sódio fecal (painel C) de ratos Wistar sob dieta rica em sódio por 12 semanas após o desmame antes e depois da administração oral de *PsE* 200 (média \pm SEM). N = 12 até 16. ANOVA de duas vias seguida pelo pós-teste de Tukey; $p < 0,05$.



Fonte: Própria autora

7.5.2. Perfusão intestinal *in situ*

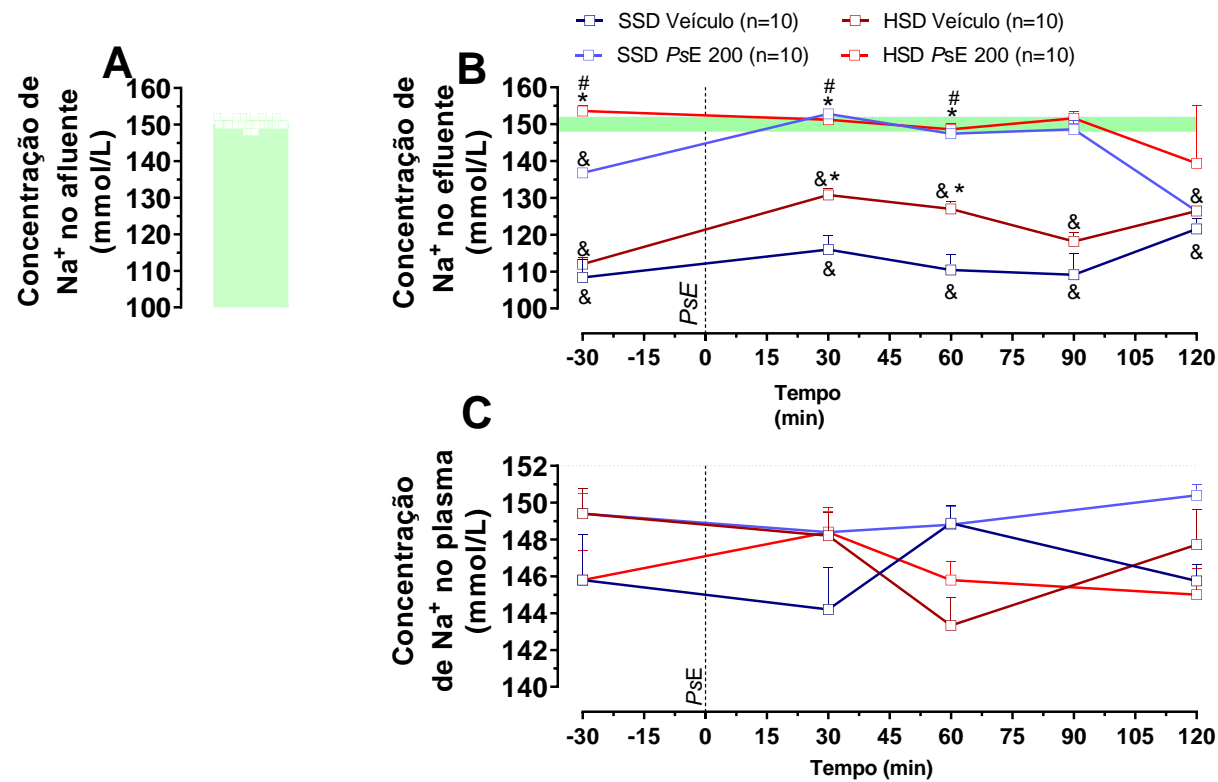
Os experimentos de perfusão intestinal *in situ* foram realizados no intuito de verificar a absorção intestinal dos animais, com o objetivo determinar a absorção de sódio e potássio em todo o intestino em ratos sob administração oral aguda e crônica de *PsE* 200. Na figura 8, painel A são representados as concentrações de sódio nos afluentes. Está representado no painel B, a concentração de Na⁺ no efluente no decorrer do tempo de experimento (120 minutos). Como observado, houve redução na concentração de sódio no efluente em relação ao afluente nos 30 minutos iniciais após a administração do *PsE* 200, indicando o intestino está absorvendo sódio a partir da solução afluente (Tempo 30: SSD veículo: 116 mmol/L, HSD veículo: 130,8 mmol/L, ANOVA de duas vias; $p > 0,05$). A administração oral de *PsE* 200 crônico por 4 semanas também foi fator determinante neste ensaio, pois a absorção de sódio foi menor nos ratos que receberam veículo que nos ratos que receberam com *PsE* 200, indicando que a administração oral de *PsE* 200 reduz

absorção basal de sódio nesse ensaio (Basal: SSD *PsE* 200: 108,4 mmol/L e HSD *PsE* 200: 112 mmol/L, ANOVA de duas vias; $p > 0,05$). Quando os animais foram submetidos a administração aguda, ou seja, a administração de *PsE* 200 durante o experimento, houve redução na absorção de sódio pelo intestino entre os animais HSD e SSD que receberam *PsE* 200 e HSD veículo em relação aos ratos SSD veículo. O painel C da Figura 8 representa a concentração de sódio no plasma dos ratos SSD e HSD, que receberam veículo ou *PsE* 200 de forma aguda ou crônica. Como observado, não houve alteração da concentração de sódio sérico entre os grupos.

A Figura 9 representa a concentração de K^+ no afluente, efluente e plasma dos ratos durante o procedimento de perfusão intestinal. No painel A está representado a concentração de K^+ nas soluções afluentes. A concentração de K^+ no efluente está demonstrado no painel B da Figura 9. Como pode-se verificar, não houve diferença nas concentrações de K^+ no decorrer do experimento de perfusão intestinal no efluente. Também não houve diferença na concentração de K^+ plasmático dos ratos de ambas as dietas e tratamentos (Figura 9C).

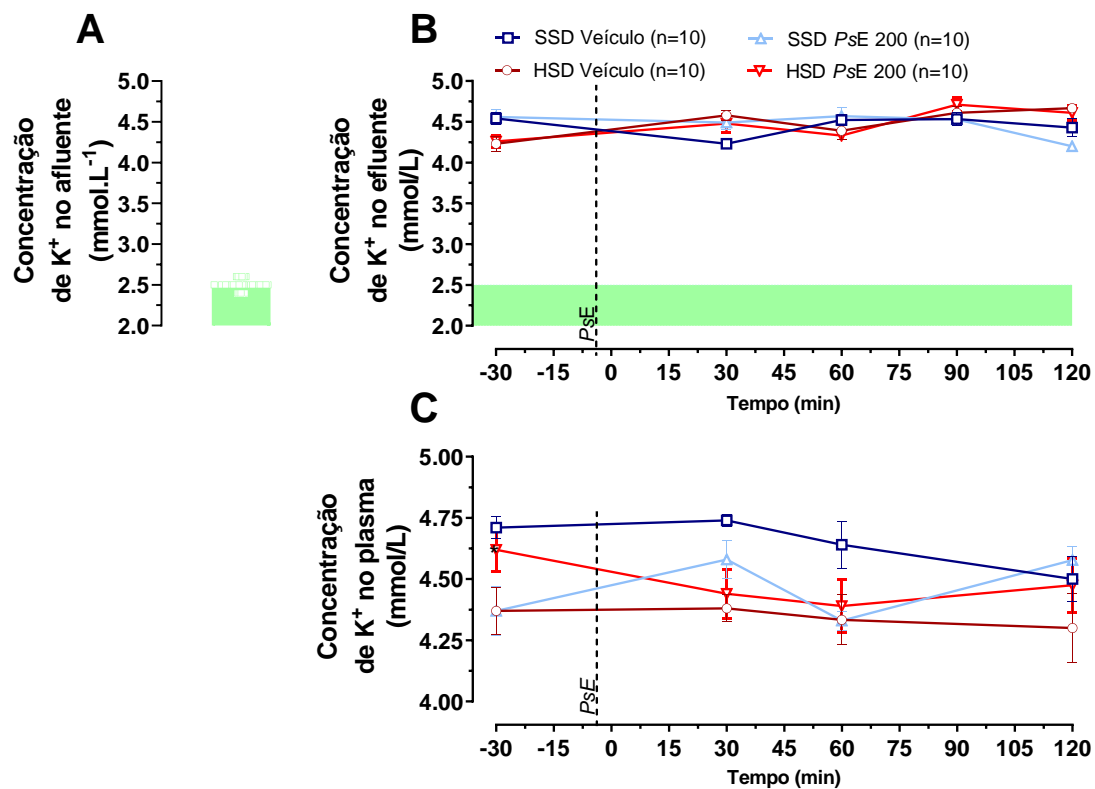
Na Figura 10 estão representados os volumes dos afluentes (painel A), volume dos efluentes (painel B) e relação efluente /afluente (painel C). De acordo com os dados obtidos, não houveram alterações nos volumes dos afluentes, efluentes e a relação entre efluente /afluente. De acordo com estes dados pode-se inferir que nos animais que receberam a administração oral de *PsE* 200 tiveram a absorção isotônica de volume, sem alterações na concentração de sódio e volume no decorrer do experimento. Este fator pode ser explicado pela utilização de solução salina isotônica durante o experimento de perfusão intestinal *in situ*, que não proporcionou grandes alterações no transporte do lúmen intestinal de água e sódio.

Figura 8. Concentração de sódio no afluente (painel A), concentração de sódio no efluente (painel B) e concentração de sódio no plasma (Painel C) de ratos Wistar sob dieta rica em sódio por 16 semanas, submetidos ao procedimento de perfusão intestinal com *PsE* 200. Quadrados vermelhos (grupos HSD) e quadrados azuis (grupos SSD). N = 10. As diferenças entre pares de médias são indicadas por símbolos diferentes *diferente de SSD veículo, # diferente de HSD veículo, & diferente de HSD veículo, HSD e controle *PsE*. ANOVA de duas vias seguida pelo pós-teste de Dunnett $p < 0,05$.



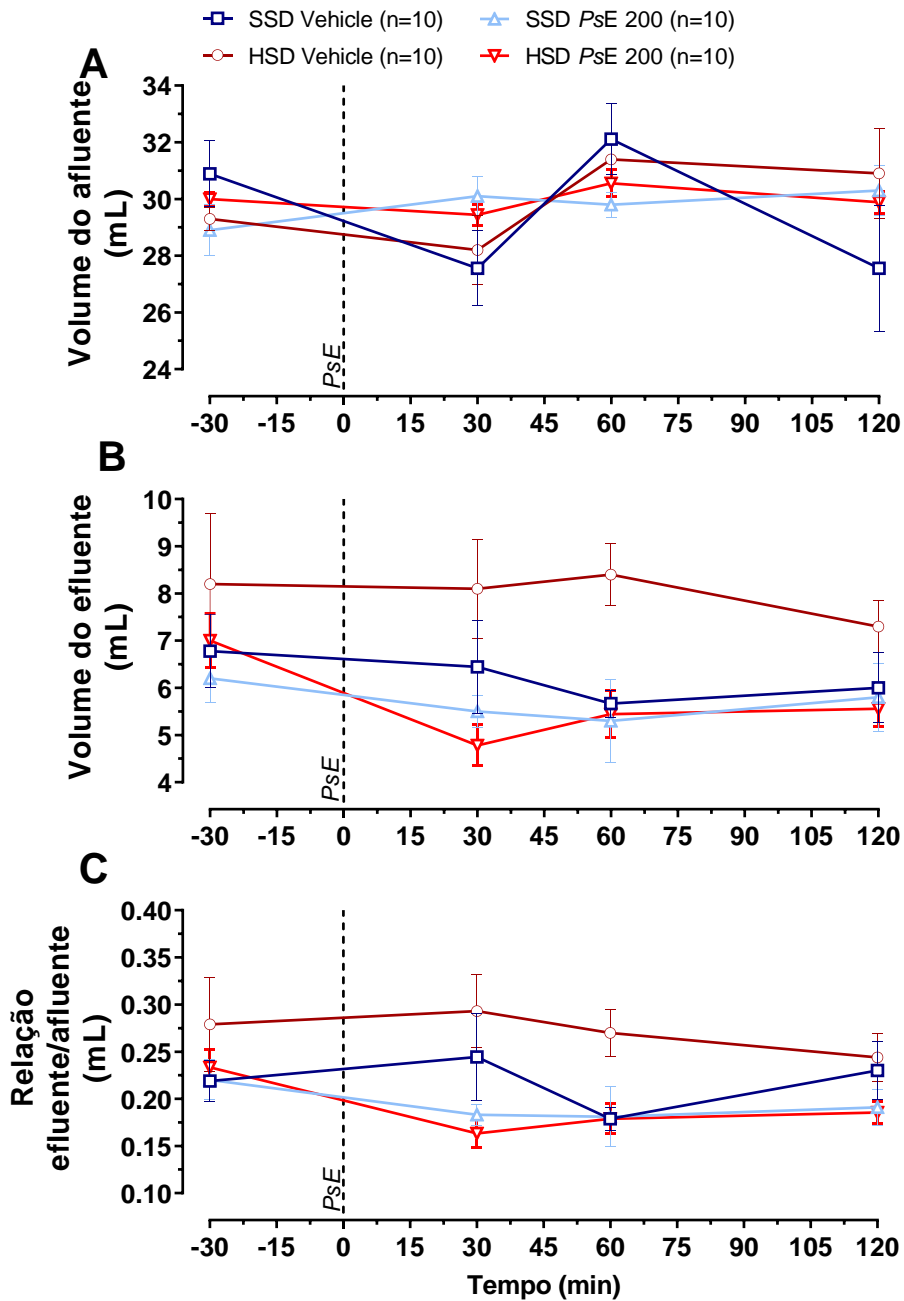
Fonte: Própria autora

Figura 9. Concentração de potássio no afluente (painel A), concentração de potássio no efluente (painel B) e concentração de potássio no plasma (Painel C) de ratos Wistar sob dieta rica em sódio por 16 semanas, submetidos ao procedimento de perfusão intestinal com *PsE* 200. Quadrados vermelhos (grupos HSD) e quadrados azuis (grupos SSD). N = 10. ANOVA de duas vias seguida pelo pós-teste de Dunnett. $p < 0,05$.



Fonte: Própria autora

Figura 10. Volume do afluente (painel A), volume do efluente (painel B) e relação efluente/afluente (Painel C) de ratos Wistar sob dieta rica em sódio por 16 semanas, submetidos ao procedimento de perfusão intestinal com *PsE* 200. Quadrados e triângulos vermelhos (grupos HSD) e quadrados e triângulos azuis (grupos SSD). N = 10. ANOVA de duas vias seguida pelo pós-teste de Dunnett $p < 0,05$.



Fonte:
Própria
autora

Capítulo IV

Avaliação da *PsE* sobre a microbiota intestinal e sobre a arquitetura tecidual do intestino delgado

8.1. Objetivos

- 1) Avaliar o impacto do tratamento com extrato de *Psidium guajava* L sobre a quantidade e a diversidade da microbiota intestinal.
- 2) Analisar se o consumo de sódio na dieta e o tratamento com *PsE* está envolvido com alterações na arquitetura da mucosa intestinal.
- 3) Identificar possíveis alterações na arquitetura intestinal desencadeadas pela dieta (HSD ou SSD) ou tratamento (*PsE* 200 ou veículo)

8.2. Estratégia experimental

- Quantificar as unidades de formação de colônias de bactérias em animais submetidos as dietas HSD e SSD, e ainda, que receberam com *PsE* 200 ou veículo.
- Identificar por técnica de metagenômica os principais gêneros e espécies de bactérias contidos no intestino delgado dos animais.
- Avaliar a arquitetura tecidual da mucosa do intestino delgado de animais HS12W submetidos ou não ao tratamento crônico com *PsE* 200 a partir de altura de vilosidades, espessamento de camada muscular, presença de linfonodos e contagem de células caliciformes.

8.3. Metodologia

8.3.1. Modelo experimental

O modelo experimental, acomodação dos ratos antes do início dos protocolos experimentais e a preparação da ração com sobrecarga de sódio está descrito com detalhes no Capítulo II. Todos os procedimentos que foram realizados utilizando os animais, foram conduzidos de acordo com as diretrizes do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) tiveram aprovação prévia da Comissão de Ética em Uso Animal da Universidade Federal de Ouro Preto, sob protocolo de nº 8880090719.

8.3.2. Administração oral de PsE

A administração oral de PsE foi realizada por um período de quatro semanas, sendo então, denominado de tratamento crônico. Este tratamento foi realizado ao final das 12 semanas após o desmame, nas quais os animais dos grupos de dieta SSD e HSD passaram a receber a administração oral de placebo (água destilada) ou PsE 200 (formulação preparada contendo 200 mg/kg de extrato bruto seco). As administrações crônicas de PsE foram feitas por gavagem orogástrica, no volume de 1 mL e com as concentrações das suspensões administradas diariamente corrigidas pela massa corporal dos animais de forma a manter-se a dosagem constante.

8.3.3. Contagem de unidades formadoras de colônias de bactérias

No intuito de contabilizar as unidades de formação de colônias das bactérias dos ratos SSD e HSD e, ainda, os animais que receberam a administração oral de PsE, foi utilizada técnica de *pour plate*, conforme descrito por Lechevallier e colaboradores (1980) (LECHEVALLIER; SEIDLER; EVANS, 1980). Para realização deste experimento, foram

coletadas amostras de fezes (200mg) em ambiente previamente esterilizado e limpo com cloro e álcool dos animais de 16 semanas pós desmame. As amostras foram armazenadas em tubo Falcon estéril e o volume completo para 5 ml com solução salina tamponada (PBS). As amostras foram completamente homogeneizadas e deixadas em repouso (15 minutos). Findado este tempo, o conteúdo foi transferido para um tubo de ensaio, filtrando-o com auxílio de uma gaze estéril, denominada solução estoque. Foram pipetados 10 mL de solução salina nos tubos de ensaio que serão utilizados para a diluição e posteriormente serão tirados 1000µL através de pipetador automático, totalizando 9 ml em cada tubo de ensaio. Da solução estoque, foi pipetado 1000µL para o primeiro tubo (10^{-1}). Posteriormente, será transferido 1000µL do primeiro tubo para o segundo tubo, sucessivamente até a diluição (10^{-5}). Com a finalização das diluições nos tubos de ensaio, 1000µL de cada tubo foi transferido para uma placa de Petri, identificada com sua respectiva diluição. Foi preparado o ágar nutriente e este colocado em cada placa em temperatura de 45°C, mantido em banho Maria, deixando-o solidificar e atingir a cor amarelo opaco. As placas então foram colocadas de maneira invertida em estufa a 37°C durante 24 horas. Após este período, foram realizadas as leituras das placas. A contagem foi realizada pela análise de um quadrante e multiplicada por 4. Ademais, foi multiplicado pelo inverso do fator de diluição. O resultado foi expresso em contagem de unidades de formação de colônias (UFC) por gramas de fezes.

8.3.4. Ensaios de metagenômica

8.3.4.1. Coleta de fezes

Para verificar a diversidade microbiana no intestino dos animais que foram submetidos ou não a dieta com sobrecarga de sódio e tratados ou não com *PsE* 200, no final da 16ª semana, os animais foram eutanasiados com sobredose de anestesia Cetamina (Syntec do

Brasil Ltda, Hortolândia, SP) e xilasina (Syntec do Brasil Ltda, Hortolândia, SP). Em ambiente estéril, foi realizada laparotomia e amostras de fezes foram extraídas a partir de um orifício no cólon. As amostras de fezes foram inicialmente congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80 °C até análises.

8.3.4.2. *Extração do rRNA bacteriano*

Para a realização da extração do rRNA foi utilizado o protocolo H da IHMS, que consistiu nas seguintes etapas: No primeiro dia, 15 µg de fezes foram pesadas e colocadas em tubo eppendorf de 2mL. Depois, foi adicionado 250µL de tiocianato de guanidina (Sigma-Aldrich) a cada tubo e adicionado 40µL de N-lauroil sarcosina 10% (Sigma-Aldrich). Em seguida, 500µL de N-lauroil sarcosina 5% (Sigma-Aldrich) foi adicionado e agitado em vortex (Kasvi®). Foi feita a incubação a 70 °C em banho seco por 1 hora. No final da incubação, foi adicionado 750mg de “beads” de vidro (0,1 mm) em cada tubo e agitado em vortex vigorosamente. Foi adicionado 15mg de polivinilpirrolidona (PVPP, Merck, Alemanha) em forma de pó por amostra e agitado em vortex vigorosamente, centrifugado a 14.000 rpm (18.000 g) durante 5 min, 4°C. O sobrenadante foi recuperado em um tubo estéril graduado de 2mL e reservado. Foi adicionado 500µL de TENP e agitado em vortex vigorosamente, centrifugado a 14.000 rpm (18.000 g) durante 5 min, 4°C, recuperado o sobrenadante e acrescentado ao primeiro. A operação de lavagem do pellet com TENP foi repetida por mais duas vezes. Foi adicionado 1 mL de isopropanol (Sigma Aldrich, 99.8%) em todos os tubos e misturado delicadamente por inversão, sendo mantido por 15 minutos em temperatura ambiente e centrifugue a 14.000 rpm (18.000 g) por 10 minutos, 4°C. O sobrenadante foi removido e o tubo invertido cuidadosamente sobre uma toalha de papel. Foi adicionado 450µL de tampão fosfato e 50µL de acetato de potássio em uma das duplicatas, e transferida toda a solução para a segunda duplicata.

Após o processo, os eppendorf ficaram imersos 1h30' no gelo e centrifugados a 14.000 rpm (18.000 g) durante 30 min, 4°C. O sobrenadante contendo o DNA em um tubo Eppendorf de 2 mL e adicionados 2µL de RNase (10mg/ml), incubado por 30 min a 37°C. Posteriormente foi adicionado 50µL de acetato de sódio, 1 mL de etanol 100% fresco (armazenado a -20°C) e deixado durante a noite a -20°C.

No segundo dia de procedimentos, as amostras foram centrifugadas a 14.000 rpm (18.000 g) por 30 min, 4°C e removido o etanol. Foi realizada lavagem com 1mL de etanol 70%, centrifugação a 14.000 rpm (18.000 g) por 5 min, 4°C e remoção do etanol a 70%, uma segunda lavagem com 500µL de etanol 70% e uma centrifugação a 14.000 rpm (18.000 g) por 5 min, 4°C, com remoção do etanol. Os pellet de DNA foram secos por 10 minutos em uma capela de fluxo laminar. Os pellets foram dissolvidos com 200µL de água estéril. Após este processo, as amostras foram liofilizadas em Speed Vac (ThermoSavant, ISS110).

Após a finalização, a concentração das amostras foi alisada no equipamento Nanodrop (Lite, Termo Scientif). Para isto, 1 µL do pellet de DNA diluído em água estéril foi utilizada e as mensurações feitas em triplicata.

8.3.4.3. Eletroforese de agarose 6%

Como controle de qualidade e integridade do DNA, foi utilizado eletroforese em gel de agarose a 6%. Para isto, foi dissolvida 0,36g de agarose, em 60 ml de tampão de eletroforese. Neste trabalho, o tampão utilizado foi TBE (Trisborato-EDTA). A solução foi aquecida em microondas, até que se obteve um conteúdo homogêneo e transparente. Posteriormente, foi aguardado a redução da temperatura em até aproximadamente 50°C e armazenado em uma forma. Com a solução morna, foi colocado o pente com uma tira de

teflon denteada que ficará a 1 mm acima do fundo da forma que serviu de molde para produção de poços no gel. Foi adicionado o tampão TBE para fundir a agarose e o gel ficou totalmente imerso. Depois que o gel ficou firme, foi retirado cuidadosamente o pente. A amostra de DNA foi preparada misturada ao TBE e um corante azul de bromofenol e adicionada aos poços feitos com pente e iniciada a corrida de eletroforese foi realizada em uma voltagem de 80 V em alimentador de força eletrophoresis (Life Technologies). Findada a corrida, um software capaz de transformar em imagem a intensidade relativa de fluorescência emitida pelas bandas de DNA captadas por uma câmera fotográfica digital. Após a visualização os resultados, estes foram foto documentados sob luz ultravioleta.

8.3.4.4. Identificação de microorganismos

8.3.4.4.1. Extração de rRNA fecal

Até o procedimento de extração, as fezes foram armazenadas congeladas a -80°C. A extração de rRNA Fecal em Padrões Internacionais de Microbioma Humano (IHMS) - Protocolo H (<http://www.microbiome-standards.org/>) foi seguida para conduzir o experimento de extração de DNA. No entanto, este procedimento foi modificado antes da etapa 16: Clorofórmio (1:1) foi adicionado aos sobrenadantes, misturado por 5 min e depois centrifugado a 12.000 rpm por 10 min. Os poluentes da camada intermediária não estavam presentes quando o sobrenadante foi coletado. Todas as etapas subsequentes foram realizadas exatamente conforme descrito no protocolo IHMS após este. O fluorômetro Qubit 3.0 foi usado para medir a quantidade de DNA (Thermofisher Scientific). Usando nanodrope (Thermofisher Scientific), a razão A260/A280 foi usada para avaliar a contaminação da proteína, e 0,6% de eletroforese em gel de agarose foi usada para avaliar a integridade do DNA.

8.3.4.4.2. Sequenciamento e análise do gene do RNA ribossômico 16S

O sequenciamento do gene procariótico 16S ribossomal (rRNA) do DNA recuperado das fezes, a composição do microbioma intestinal foi avaliada. De acordo com as instruções do fabricante, 16S rRNA Illumina, a região V4 do gene foi amplificada usando o primer direto 515 (GTGCCAGCMGCCGCTAA) e o primer reverso 806 (TAATCTWTGGGVHCCATCAGG). Nextera® DNA Library foi usada para criar uma biblioteca paired-end, e Illumina MiSeq, kit V2 500 Cycle foi usado para realizar sequenciamento de alto rendimento (STEEMERS; GUNDERSON1, 2005). O laboratório Neopropecta usou amplificação de alto desempenho e primers específicos para as regiões V3/V4 do gene 16S rRNA para identificar bactérias. O sequenciamento foi feito de acordo com o uso da tecnologia da Neopropecta Microbiome Technologies na plataforma Illumina MiSeq com o protocolo "Paired-end" (kit de 300 ciclos V2), single-end e sem padronização de biblioteca. O processo usado para rotear sequências de DNA bacteriano era de propriedade da Neopropecta Microbiome Technologies no Brasil (CHRISTOFF; SEREIA; BOBERG; MORAES *et al.*, 2017), e apenas sequências com pelo menos 99% de identidade com o banco de dados de dados foram usadas. A fórmula abaixo foi usada para determinar a abundância de microrganismos: A abundância é calculada como:

$$\frac{\text{Leituras de reads específicas reconhecidas em um determinado nível taxonômico}}{\text{reads total}} \times 100$$

8.3.6. Análise da arquitetura tecidual

8.3.6.1. Eutanásia dos animais

Para a avaliação da arquitetura tecidual foram utilizados ratos dos grupos SSD e HSD com 16 semanas pós desmame, após terem recebido por 4 semanas PsE 200 ou

veículo. A eutanásia dos ratos foi realizada após injeção intraperitoneal de uma sobredose (três vezes a dose terapêutica) de anestésico Cetamina (Ketalex, Dechra, Londrina, PR) e xilasina (Syntec do Brasil Ltda, Hortolândia, SP).

8.3.6.2. Coleta de intestino

Após a confirmação do óbito dos ratos, foi realizada a perfusão cardíaca através de uma cânula com utilização de metanol (Neon, Suzano, SP) e dimetilsulfóxido (Syntec do Brasil Ltda, Hortolândia, SP), nas proporções (80% v/ 20% v) até a completa remoção de quaisquer resquícios de sangue de órgãos e tecidos. Além disso, foi realizada laparotomia e localização do intestino delgado, sendo este compreendido entre a porção do piloro e do cécum. Após autópsia, o intestino foi colocado sobre superfície limpa, sendo removido o tecido adiposo remanescente e as fezes. Findado este processo, o intestino delgado foi dividido em três partes (duodeno, jejuno e íleo), sendo estas partes separadas, identificadas, enroladas, imersas na solução de metanol com dimetilsulfóxido e armazenadas em temperatura (-4°C) até o processamento. Durante os três dias posteriores, a solução metanol e dimetilsulfóxido foi trocada e as amostras de intestino delgado mantiveram sobre refrigeração até os procedimentos futuros.

8.3.6.3. Análise histológica para avaliação de altura de vilosidade, área de linfonodo, espessamento de camada muscular e número de células caliciformes

8.3.6.3.1. Processamento

As amostras de intestino foram selecionadas, cortadas e posteriormente colocadas em cacetes histológicos devidamente identificados e imersas na solução metanol e dimetilsulfóxido por 24 horas. Após esse período, foram processados pelas seguintes etapas:

- 1) Desidratação: Imersas por 40 minutos utilizando os álcoois de concentração 70%, 80%, 90% e 100% absoluto I e II (Neon, Suzano, SP).
- 2) Clarificação: Imersas em duas concentrações distintas de xilol I e II (Neon, Suzano, SP) por cerca de 30 minutos

Logo após, o material foi imerso em parafina líquida e mantidos por 12 horas dentro da estufa de secagem a 60° C. Para a criação dos blocos de parafina foram utilizadas formas de aço inox para emblocar o material sendo necessários aproximadamente 1 minuto para endurecimento.

8.3.6.3.2. Microtomia

O corte do material foi realizado no micrótomo (Jung Histocut 820, Leica, Nussloch, Alemanha).

8.3.6.3.3. Preparo da lâmina

Para fixação do material na lâmina para microscopia (26x76 mm, K5-7105, Kasvi), utilizou-se uma solução de albumina e glicerina (1:1), feita a partir de 50 ml de clara de ovo “batida em neve” e 50ml de glicerina, filtrada em papel-filtro e com adição de cristais de timol como conservante. Em seguida, com auxílio de uma pinça, os cortes foram inseridos na superfície de um recipiente plástico com água em temperatura ambiente, para que, dessa forma, o corte pudesse ficar o mais limpo possível, sem a presença de grumos de parafina advindos de ranhuras no dente da lâmina utilizada. Em seguida, com a lâmina já identificada e com um movimento na vertical, fixou-se o corte na lâmina e o transferiu ao equipamento de banho-maria (Easy Path modelo EP-31-2015) com temperatura entre 40 a 50° C, visando não causar danos ao tecido a ser estudado. Os cortes foram inseridos novamente na superfície da água para posteriormente, fixá-lo de forma definitiva e por fim,

colocar as lâminas preparadas em um suporte de poliacrilamida para serem encaminhadas a estufa de secagem (DeLeo, Brazil) a 60° C para retirada do excesso de parafina restante no tecido.

8.3.6.3.4. *Coloração em Hematoxilina e eosina*

Para a coloração do tecido, as lâminas foram submetidas aos seguintes processos:

- 1) Hidratação do material com 2 banhos em xilol I e II (Neon, Suzano, SP) por cerca de 30 minutos cada;
- 2) Imersão do em álcoois (Neon, Suzano, SP) nas concentrações 100% absoluto I e II, 90%, 80%, 70% por 5 minutos;
- 3) Imersão em água por 5 minutos;
- 4) Imersão em hematoxilina previamente filtrada por 1 minuto e 30 segundos;
- 5) Banho em água corrente por 30 minutos para retirada do excesso de reagente;
- 6) Imersão em eosina entre 40 segundos a 1 minuto;
- 7) Lavagem em água corrente para retirada de excesso do segundo reagente, por aproximadamente 10 segundos.

Finalmente, as lâminas foram secas em temperatura ambiente por cerca de 24h.

8.3.6.3.5. *Colocação da lamínula*

Para fixação da lamínula de vidro K5-2450 24x40mm) foi utilizado o meio de montagem sintético, Enthelan (EasyPath. Modelo: EP-51-05041).

8.3.6.3.6. *Fotodocumentação*

No laboratório Multiusuário de Microscopia de Campo Claro/ Fotodocumentação e morfometria do NUPEB/UFOP, foi realizada a documentação de imagens. As imagens

foram obtidas através do microscópio ótico digital semi-automatizado (Leica DM5000B[®]), com calibração automática, nas objetivas de 20x e 40x. A primeira possui calibração 0,671; lentes objetivas (Plan 10x/0,15) e condensador semi-automatizado 0,12. Já a segunda 0,168, lentes objetivas (N-Plan 20x/0.40) e condensador semi-automatizado 0,75. A captura de imagens ficou a cargo da câmera (Leica MC 170HD, CCD). Todas as imagens foram escalonadas utilizando o software Leica Application Suite (Versão para Windows).

8.3.6.3.7. Leitura de imagens

Visando analisar as imagens obtidas na foto documentação, foi feito o uso de uma plataforma de código aberto para análise de imagens biológicas denominada Image J (Versão 1.53f51), onde foram analisadas a altura de vilosidades, contagem de células caliciformes, espessamento de camada muscular e a presença de linfonodos.

8.4. Análises estatísticas

Os dados foram expressos em média e erro padrão da média. As comparações entre os grupos foram realizadas por análise de variância uma via ou duas vias (ANOVA) para medidas repetidas quando aplicável. O pós-teste de Tukey foi utilizado para comparações múltiplas entre pares de médias após a ANOVA detectar diferença nas variâncias entre os grupos. Já o pós-teste de Dunnett foi utilizado para comparações múltiplas entre pares de médias após a ANOVA detectar diferença nas variâncias entre os grupos no decorrer do tempo. Todos os dados foram analisados estatisticamente utilizando o software GraphPad Prism 8.0 para Windows (GraphPad Software, San Diego Califórnia, EUA). As diferenças entre pares de médias foram consideradas significantes quando a probabilidade de erro de tipo I foi menor que 5% ($p < 0,05$).

Para os dados de metagenômica, a relação entre a diversidade de espécies do microbioma, a sua abundância total e a sua abundância relativa (variáveis Y) para a dieta (SSD e HSD) e o tratamento (*PsE* ou veículo) foi avaliada através da aplicação de modelos lineares generalizados, com erros distribuídos segundo Poisson ou distribuição binomial, de acordo com o método proposto por Hilbe (HILBE, 2014). As comparações entre os táxons mais diversos ou abundantes foram realizadas individualmente, utilizando modelos lineares generalizados com distribuições de erros binomiais negativos, segundo o procedimento "glm.nb". O modelo linear generalizado foi ajustado por meio de um processo de seleção inversa de termos, no qual a significância dos termos era avaliada pela análise da estatística χ^2 associada à sua remoção. O modelo completo incluía termos relacionados à dieta e ao tratamento, bem como suas respectivas interações. O modelo mínimo adequado, obtido após a exclusão de termos insignificantes, foi utilizado para plotar gráficos quando necessário. Para ajustar a superdispersão no modelo QuasiPoisson, foi utilizado o teste F, ao invés do teste Qui-quadrado, de acordo com os métodos propostos por Faraway (FARAWAY, 2002). Uma análise de comparação entre todos os pares (teste de Tukey) foi realizada para detectar diferenças entre os níveis de tratamento, por meio do procedimento "glht" no pacote multcomp. As análises foram acompanhadas por avaliações de resíduos, para garantir o cumprimento das premissas dos modelos. Para avaliar a mudança na composição bacteriana entre e dentro dos grupos de dieta e *PsE*, foi utilizada uma matriz de dissimilaridade (distância de Bray-Curtis) para realizar biplots de escalonamento multidimensional não métrico (NMDS) e analisar a alteração da composição bacteriana por meio de uma análise de variância multivariada permutacional bidirecional (PERMANOVA). Além disso, foram realizadas análises de táxons indicadores bacterianos para identificar bactérias que se associam aos grupos de tratamento, por meio do pacote "indicspecies"

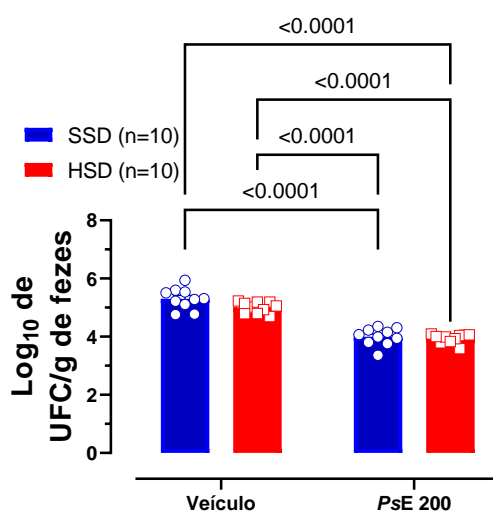
8.5. Resultados

8.5.1. Contagem de unidades de formação de colônias das bactérias

A

Figura 111 representa o log da contagem de unidades de formação de colônias das bactérias por gramas de fezes. Não houve alterações da contagem de formação de colônias das bactérias de ratos HSD veículo (SSD veículo: $5,302 \pm 0,116 \text{ Log}_{10}$ de UFC/g de fezes e HSD veículo: $5,003 \pm 0,061 \text{ Log}_{10}$ de UFC/g de fezes, ANOVA de duas vias, $p < 0,05$). Após a administração oral de PsE 200, houve redução na contagem de formação de colônias das bactérias de ratos (SSD PsE 200: $3,99 \pm 0,09 \text{ Log}_{10}$ de UFC/g de fezes e HSD PsE 200: $3,93 \pm 0,05 \text{ Log}_{10}$ de UFC/g de fezes, ANOVA de duas vias, $p < 0,05$).

Figura 11. Contagem de unidades de formação das colônias de bactérias de fezes exteriorizadas de ratos Wistar submetidos a dieta padrão (SSD), dieta com sobrecarga de sódio (HSD) e tratados com PsE 200 ou veículo. As fezes foram coletadas na 16ª semana pós o desmame após 4 semanas de administração intragástrica de PsE 200 ou veículo (água destilada) por gavagem orogástrica. Círculos e quadrados dispersos representam valores individuais e as barras representam dados médios do grupo (média±SEM). ANOVA de uma via seguida do pós teste de Tukey; $p < 0,05$.



Fonte: Própria autora

8.5.2. Ensaios de metagenômica

Após a extração do rRNA feitos no Nanodrop, em triplicata, as amostras tiveram as seguintes concentrações, conforme descrito na Tabela 4. Além disso, para verificação da integridade foi executada a técnica de gel de agarose. Conforme mostrada na Figura 122, na eletroforese em gel de agarose todas as amostras tiveram seu rRNA integro após todo o processo de extração.

Tabela 4. Dosagens de concentração de amostras em nanodrop

Amostra	T1	T2	T3	Razão 1	Razão 2	Razão 3
	(ng/μL)	(ng/μL)	(ng/μL)	260/280	260/280	260/280
1	50.2	50.0	50.3	1.85	1.80	1.82
2	24.1	25.7	25.2	1.84	1.81	1.84
3	32.3	32.6	33.3	1.80	1.79	1.81
4	33.9	34.0	34.4	1.80	1.79	1.81
5	29.6	27.0	27.8	1.86	1.88	1.90
6	22.1	25.7	25.3	2.60	1.60	1.79
7	30.3	31.2	32.1	1.78	1.78	1.84
8	12.2	15.2	15.5	1.66	1.66	1.69
9	29.3	28.2	29.7	1.76	1.71	1.74
10	32.8	34.5	35.0	1.65	1.67	1.91
11	19.1	19.5	19.1	1.55	1.60	1.56
12	33.9	33.9	35.7	1.61	1.67	1.65
13	18.7	17.9	19.5	1.58	1.63	1.46
14	13.3	13.3	14.2	1.62	1.56	1.94
15	26.9	27.7	26.1	1.70	1.74	1.46
16	57.4	57.8	57.1	1.76	1.80	1.80
17	27.5	28.3	27.9	1.70	1.70	1.70
18	23.5	23.7	25.4	1.70	1.76	1.65
19	14.9	15.1	15.5	1.47	1.58	1.70
20	24.9	24.7	24.3	3.92	1.79	1.81
21	21.1	21.9	14.8	1.74	1.79	1.76

22	15.9	16.0	17.7	1.78	1.77	1.74
23	16.6	19.8	18.1	1.68	1.67	1.82
24	32.1	31.4	31.7	1.72	1.71	1.80
25	30.4	32.5	32.3	1.78	1.74	1.76
26	24.0	24.8	25.9	1.85	1.84	1.86
27	35.8	32.2	31.4	2.00	1.75	1.85
28	21.8	23.2	23.1	1.77	1.77	1.70
29	30.4	32.4	32.8	1.74	1.75	1.15
30	53.6	57.6	57.2	1.78	1.81	1.82
31	30.6	32.2	30.8	1.78	1.80	2.05
32	28.9	29.2	29.5	2.36	1.75	1.75
33	53.0	52.5	53.0	1.79	1.80	1.85
34	24.9	26.3	26.4	1.71	1.73	1.85
35	48.7	49.1	49.6	1.80	1.86	1.83
36	33.4	33.8	33.7	1.81	1.80	1.78
37	9.5	9.2	10.4	1.56	1.52	1.43
38	46.6	47.4	47.8	1.84	1.84	1.82
39	13.2	14.8	12.6	1.56	1.59	1.50
40	32.1	33.3	33.0	1.72	1.55	1.75

Fonte: Própria autora

Figura 12. Eletroforese de rRNA em Gel de agarose



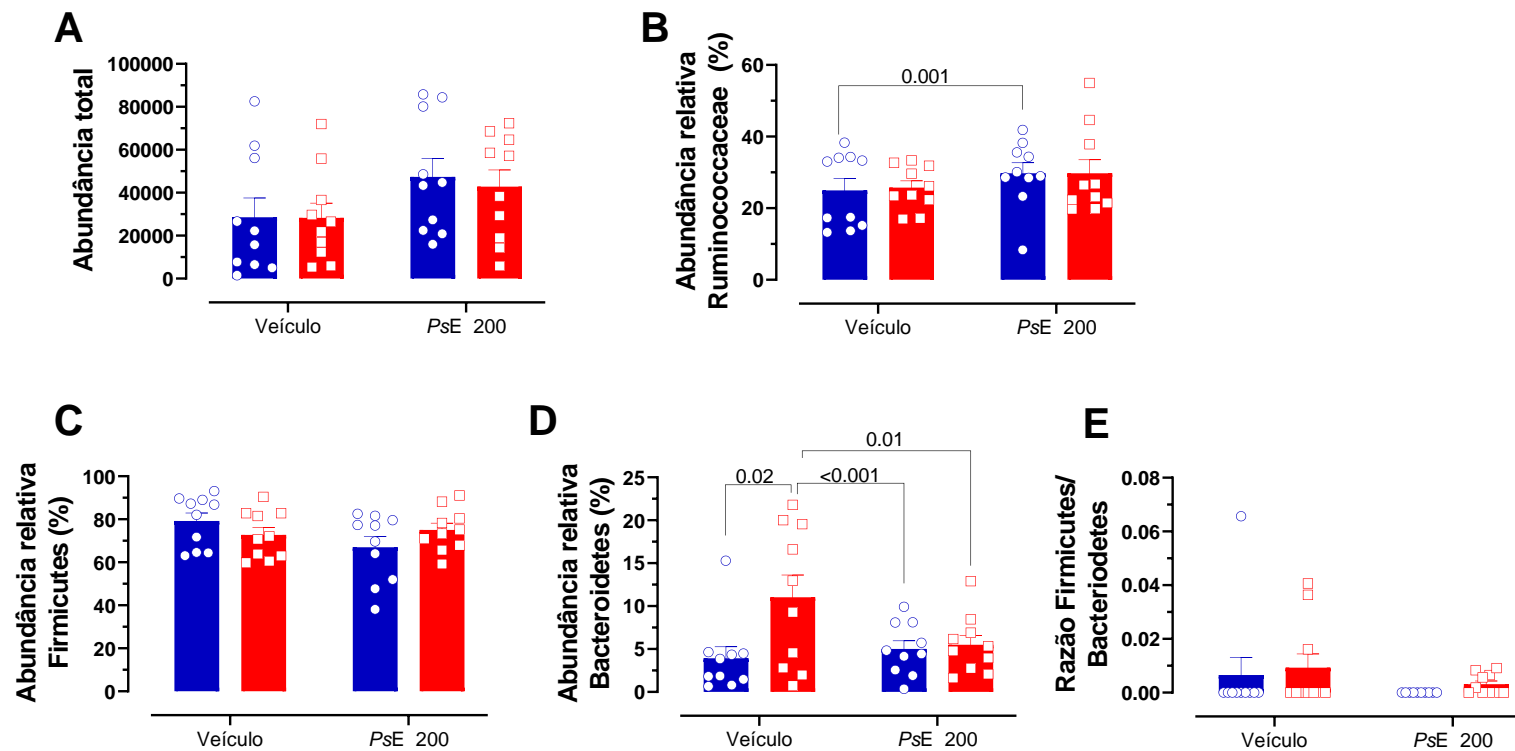
Fonte: Própria autora

8.5.3. Identificação taxonômica das bactérias por técnica de metagenômica

A abundância total das bactérias não foi diferente independente da dieta ou tratamento, assim como a abundância relativa de firmicutes conforme descrito na figura 13. Por outro lado, houve aumento da abundância relativa da família *Ruminococcaceae* nos ratos SSD após a administração oral com *PsE*. Além disso, a dieta com sobrecarga de sódio foi capaz de aumentar a abundância relativa dos Bacteroidetes e o tratamento com *PsE* reduzir tal abundância (Figura 13).

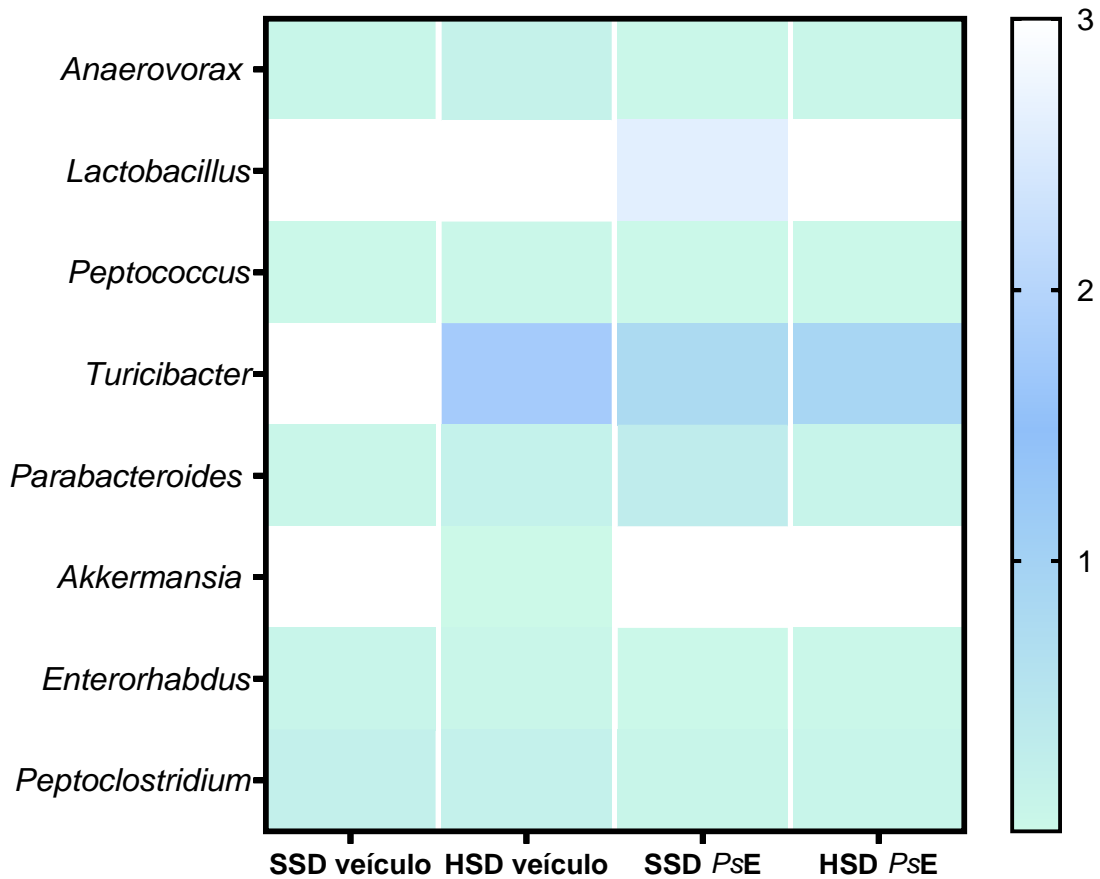
Na figura 14 está representado o heatmap contendo os principais gêneros bacterianos relacionados ao consumo de sódio na dieta e ao tratamento com extrato de folha de *Psidium guajava* L. No caso deste trabalho, não foram encontradas diferenças entre tais espécies bacterianas.

Figura 13. Abundância total de bactérias (painel A) e abundância relativa da família *Ruminococcaceae* (Painel B), gêneros Firmicutes (Painel C), Bacteroidetes (Painel D) do intestino de ratos Wistar submetidos a dieta padrão (SSD), dieta com sobrecarga de sódio (HSD) e tratados com PsE 200 ou veículo. Razão Firmicutes/bacteroidetes (Painel E). Círculos e quadrados dispersos representam valores individuais e as barras representam dados médios do grupo (média±SEM). $p < 0,05$.



Fonte: Própria autora

Figura 14. *Heatmap* da microbiota intestinal no nível de gênero em ratos SSD e HSD tratados com veículo ou PsE 200.



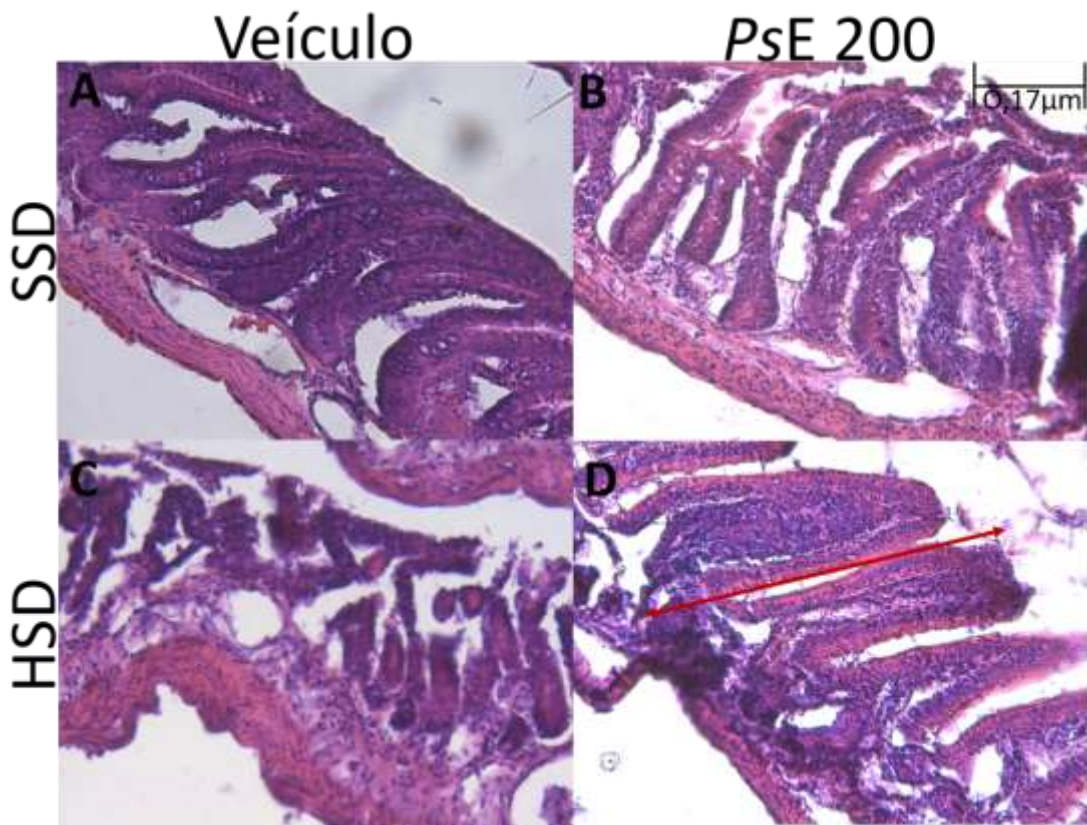
Fonte: Própria autora

8.5.5. *Análise histológica para avaliação de altura de vilosidade, área de linfonodos, número de células caliciformes e espessamento de camada muscular*

As imagens a seguir representam as pranchas histológicas representando a altura das vilosidades (Figura 1515,

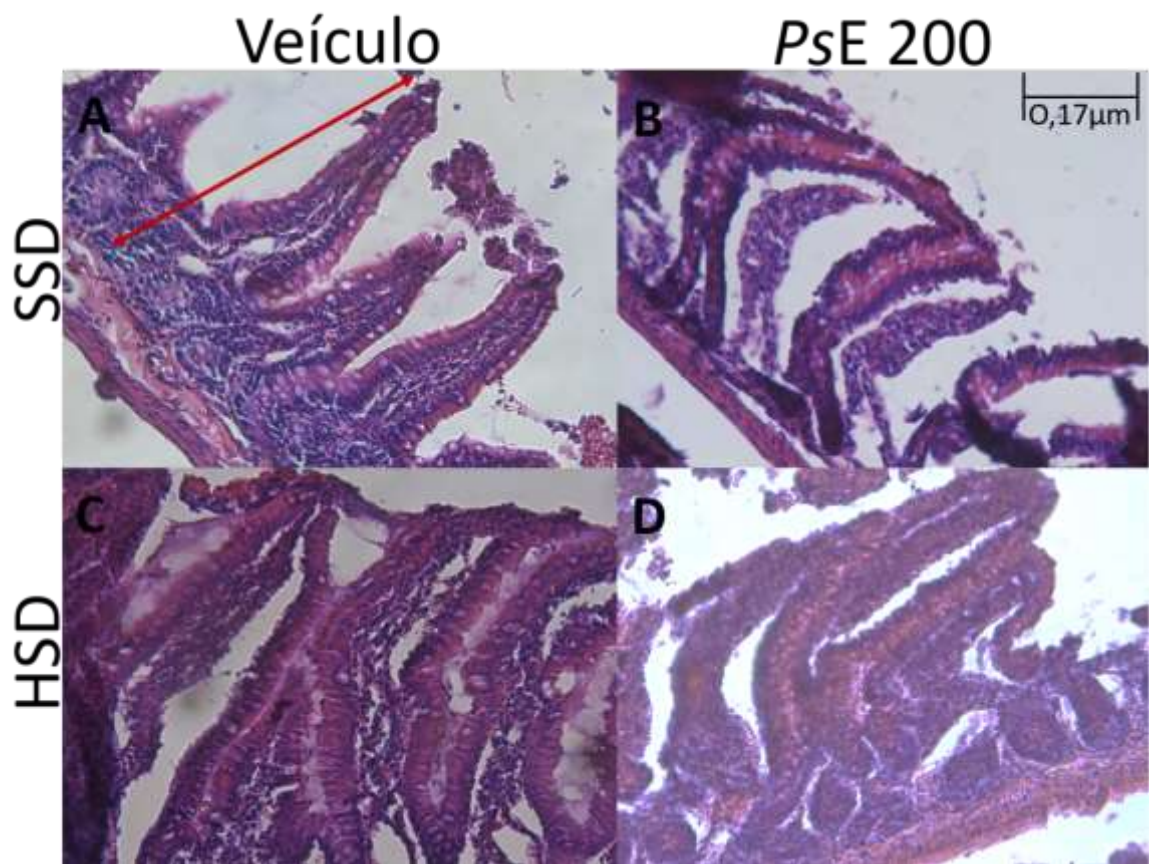
Figura 166 e Figura 1717), espessamento da camada muscular (Figura 18, Figura 19 e Figura 20) e células caliciformes (Figura 21, Figura 22, Figura 23) dos cortes de intestino delgado dos ratos SSD veículo, SD *PsE* 200, HSD veículo, HSD *PsE* 200.

Figura 15. Altura de vilosidades do duodeno: A) Visão geral do corte histológico de duodeno de ratos SSD veículo; B) SSD *PsE* 200; C) HSD veículo; D) HSD *PsE* 200. Coloração: Hematoxilina e eosina. A seta vermelha mostra como foi realizada a aferição da altura das vilosidades. Objetiva de 40x.



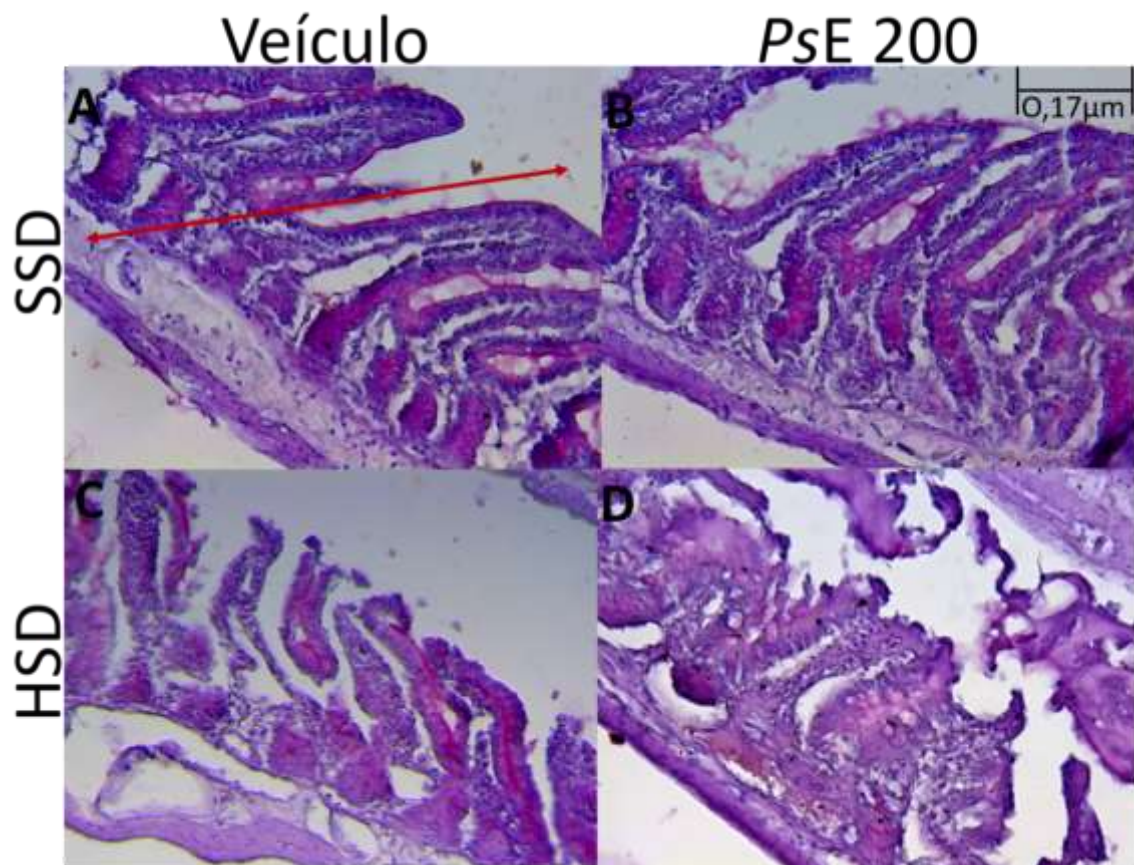
Fonte: Própria autora

Figura 16. Altura de vilosidades do jejuno: A) Visão geral do corte histológico de jejuno de ratos SSD veículo; B) SSD *PsE* 200; C) HSD veículo; D) HSD *PsE* 200. Coloração: Hematoxilina e eosina. A seta vermelha mostra como foi realizada a aferição da altura das vilosidades. Objetiva de 40x.



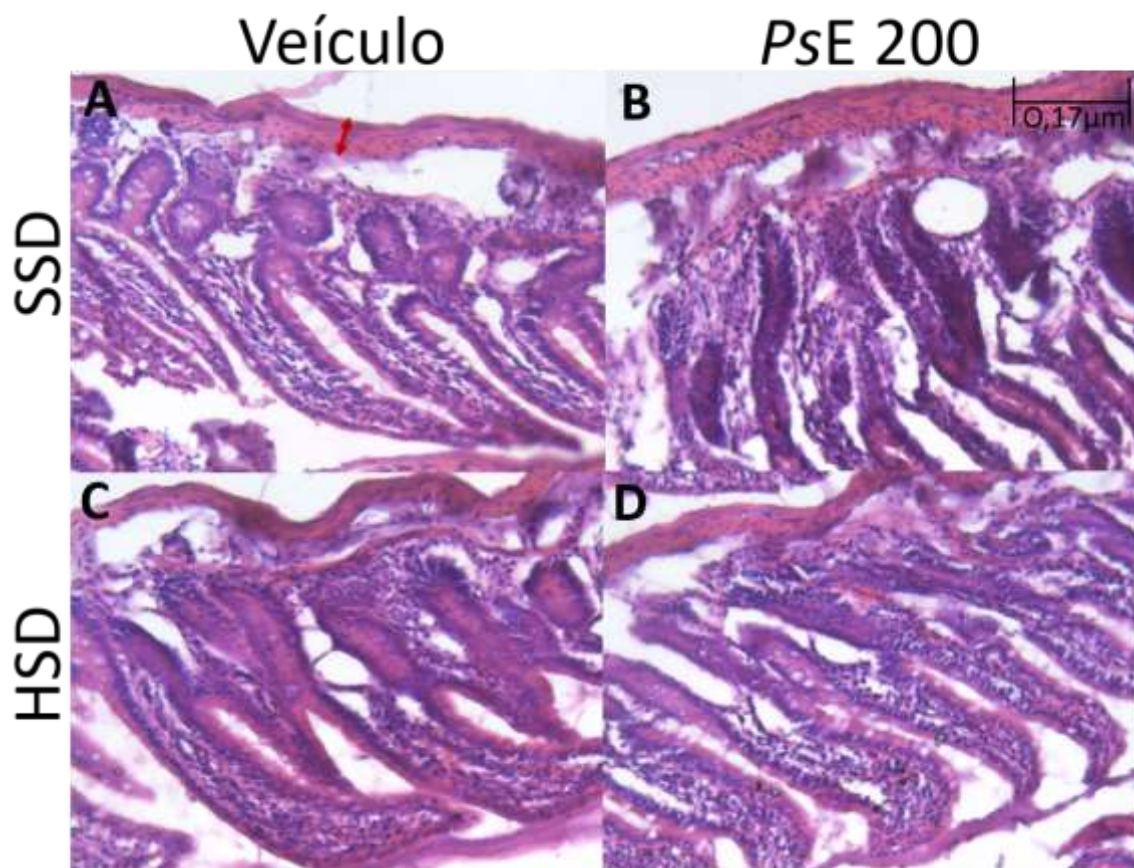
Fonte: Própria autora

Figura 17. Altura de vilosidades do íleo: A) Visão geral do corte histológico de íleo de ratos SSD veículo; B) SSD *PsE* 200; C) HSD veículo; D) HSD *PsE* 200. Coloração: Hematoxilina e eosina. A seta vermelha mostra como foi realizada a aferição da altura das vilosidades. Objetiva de 40x.



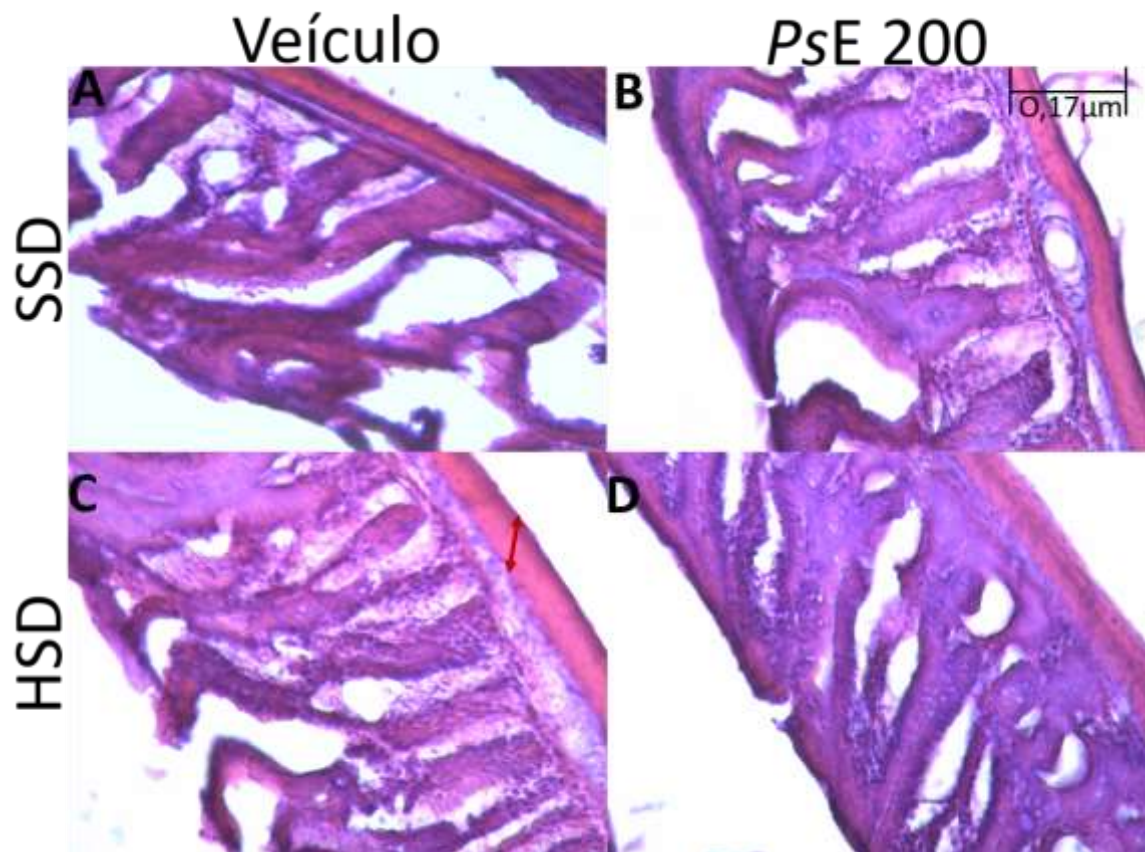
Fonte: Própria autora

Figura 18. Espessamento da camada muscular do duodeno: A) Visão geral do corte histológico de duodeno de ratos SSD veículo; B) SSD *PsE* 200; C) HSD veículo; D) HSD *PsE* 200. Coloração: Hematoxilina e eosina. A seta vermelha mostra como foi realizada a aferição do espessamento da camada muscular. Objetiva de 40x.



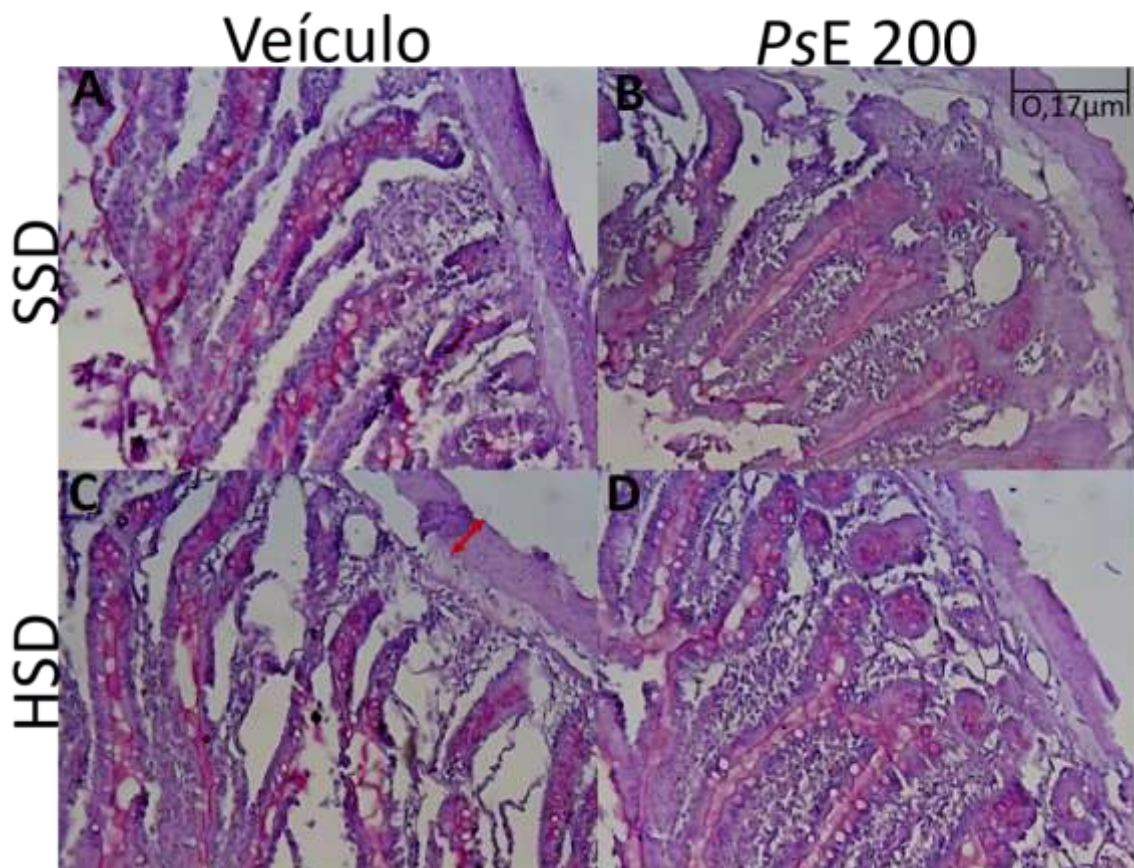
Fonte: Própria autora

Figura 19. Espessamento da camada muscular do jejuno: A) Visão geral do corte histológico de jejuno de ratos SSD veículo; B) SSD *PsE* 200; C) HSD veículo; D) HSD *PsE* 200. Coloração: Hematoxilina e eosina. A seta vermelha mostra como foi realizada a aferição do espessamento da camada muscular. Objetiva de 40x.



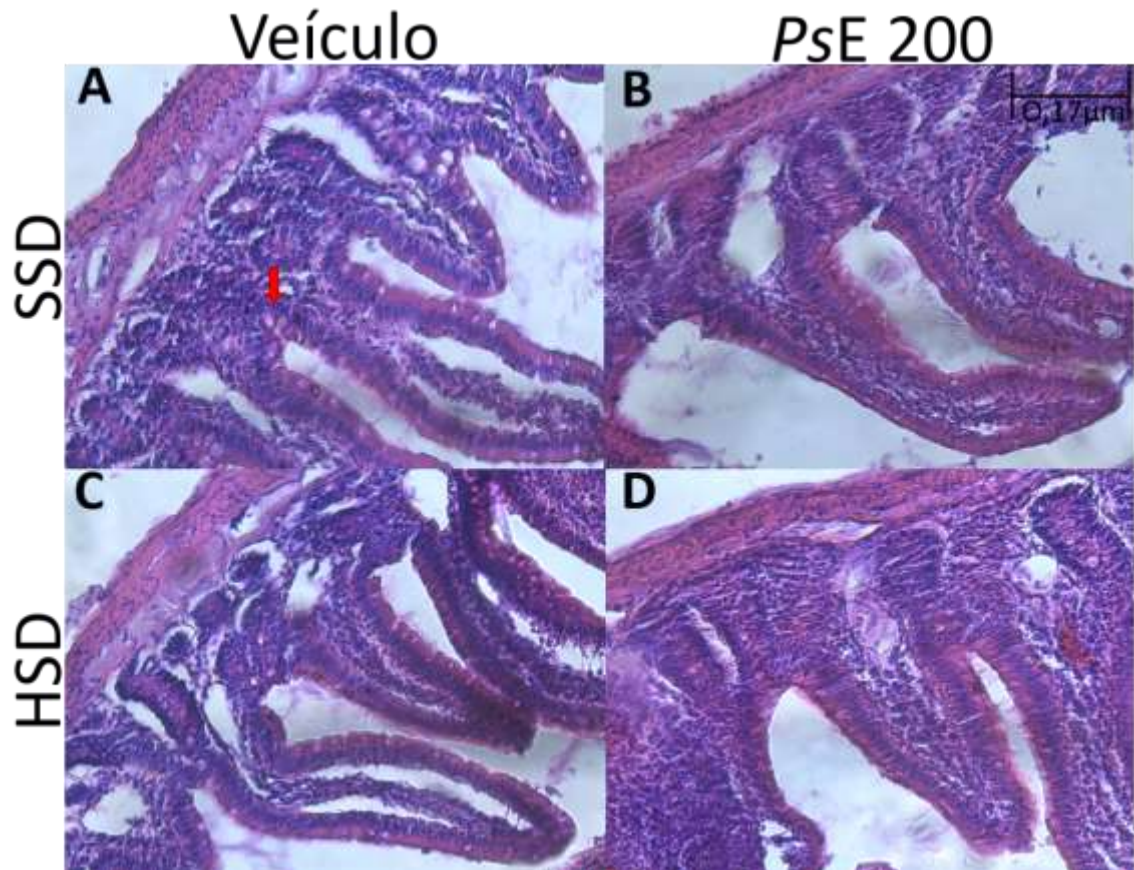
Fonte: Própria autora

Figura 20. Espessamento da camada muscular do íleo: A) Visão geral do corte histológico de íleo de ratos SSD veículo; B) SSD *PsE* 200; C) HSD veículo; D) HSD *PsE* 200. Coloração: Hematoxilina e eosina. A seta vermelha mostra como foi realizada a aferição do espessamento da camada muscular. Objetiva de 40x.



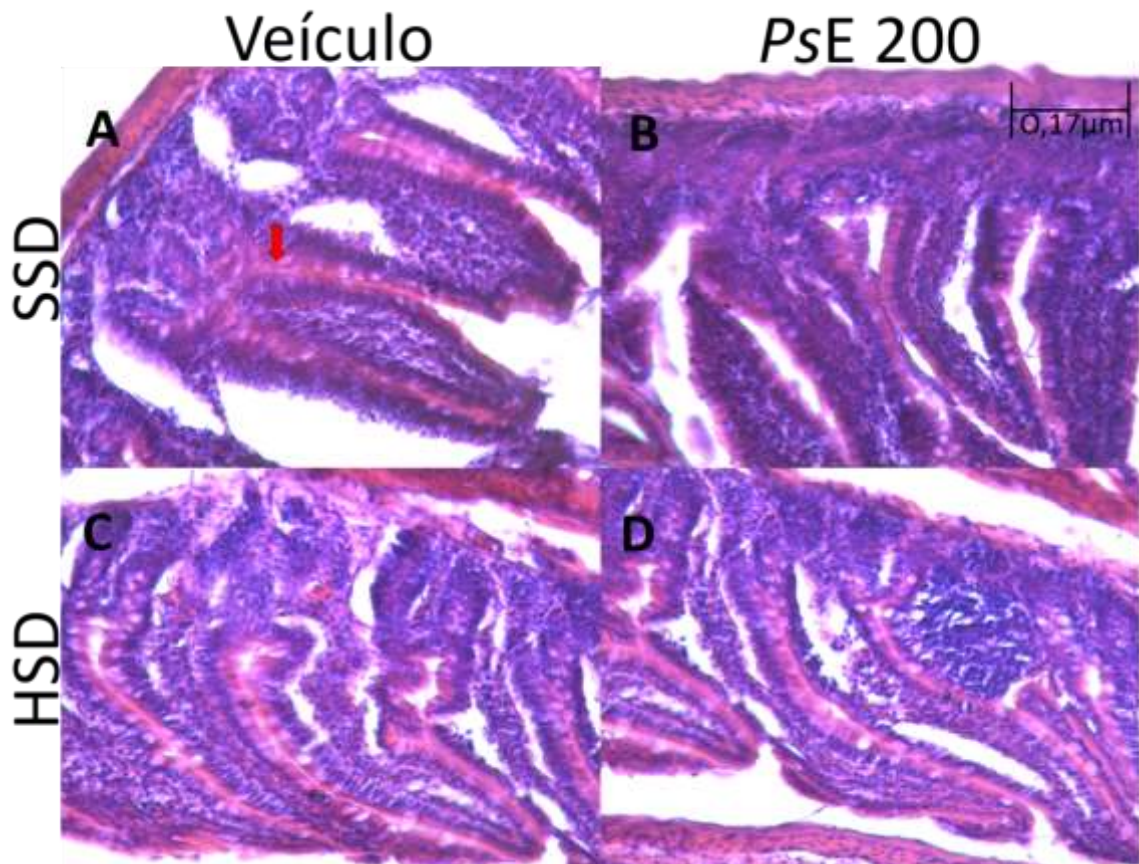
Fonte: Própria autora

Figura 21. Contagem de células caliciformes no duodeno: A) Visão geral do corte histológico de duodeno de ratos SSD veículo; B) SSD *PsE* 200; C) HSD veículo; D) HSD *PsE* 200. Coloração: Hematoxilina e eosina. A seta vermelha mostra a localização de células caliciformes. Objetiva de 40x.



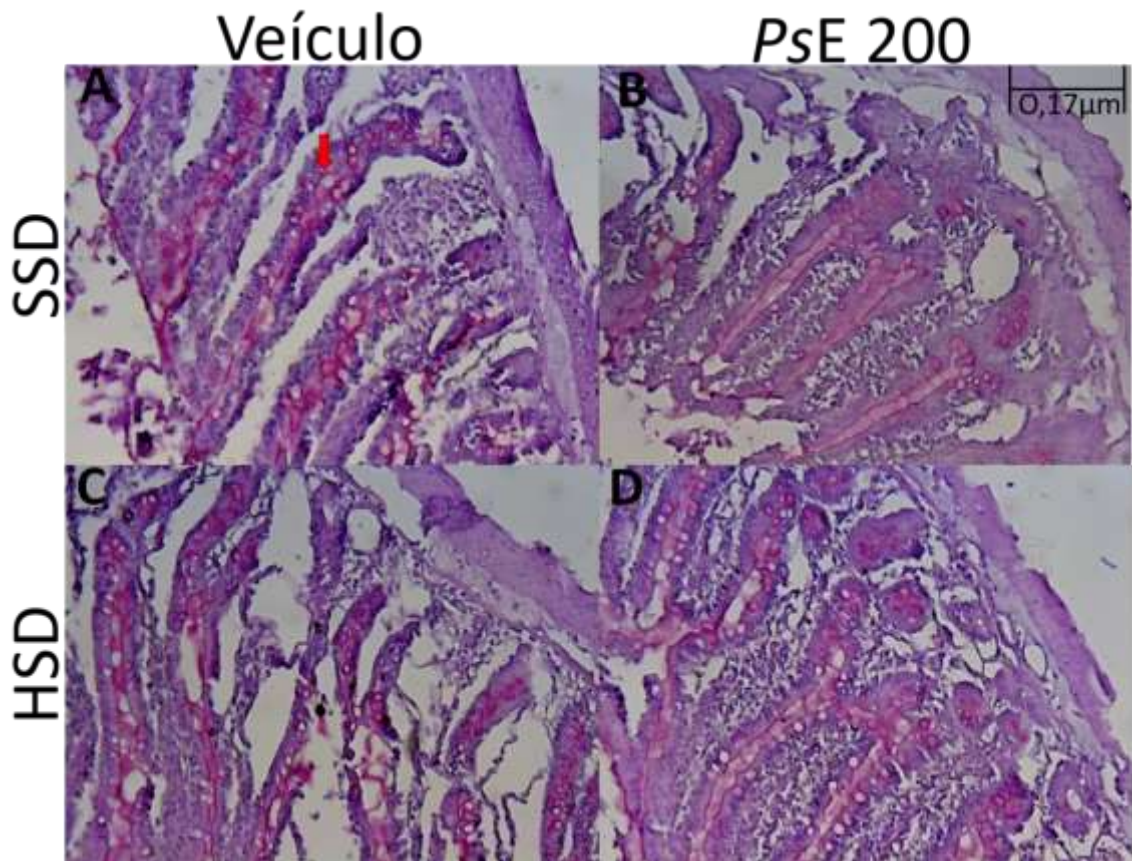
Fonte: Própria autora

Figura 22. Contagem de células caliciformes no jejuno: Células caliciformes: A) Visão geral do corte histológico de jejuno de ratos SSD veículo; B) SSD *PsE* 200; C) HSD veículo; D) HSD *PsE* 200. Coloração: Hematoxilina e eosina. A seta vermelha mostra a localização de células caliciformes. Objetiva de 40x.



Fonte: Própria autora

Figura 23. Contagem de células caliciformes no íleo: A) Visão geral do corte histológico de íleo de ratos SSD veículo; B) SSD *PsE* 200; C) HSD veículo; D) HSD *PsE* 200. Coloração: Hematoxilina e eosina. A seta vermelha mostra a localização de células caliciformes. Objetiva de 40x.

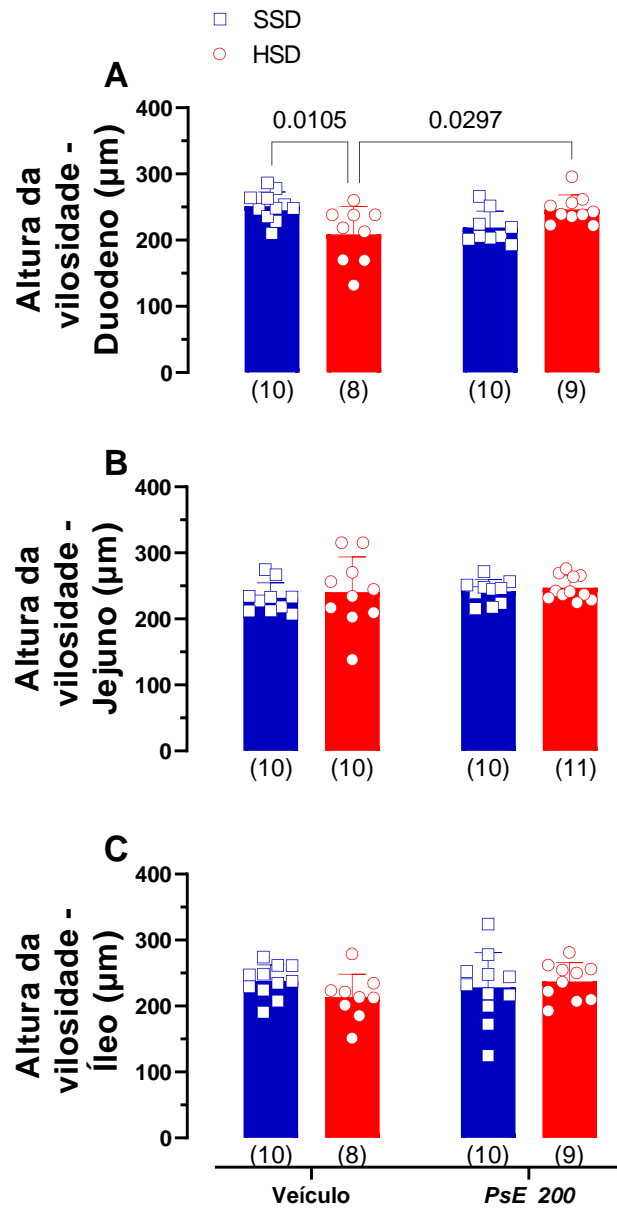


Fonte: Própria autora

Na análise histológica, a altura das vilosidades foi reduzida pelo consumo de sódio apenas no duodeno (17%), sendo reestabelecida após o tratamento oral com *PsE* 200 mesmo nos animais que ainda continuaram submetidos a dieta com sobrecarga de sódio (SSD veículo: $251,12 \pm 6,5 \mu\text{m}$, HSD veículo: $208,6 \pm 14,0 \mu\text{m}$, SSD *PsE* 200: $218,9 \pm 8,2 \mu\text{m}$, HSD *PsE* 200: $246,6 \pm 6,8 \mu\text{m}$; ANOVA de duas vias; $p > 0,05$), Figura 24, painel A. Nos demais compartimentos do intestino delgado, não houve alterações em relação à altura das vilosidades (Jejuno: SSD veículo: $231,8 \pm 7,1 \mu\text{m}$, HSD veículo: $240,4 \pm 16,9 \mu\text{m}$,

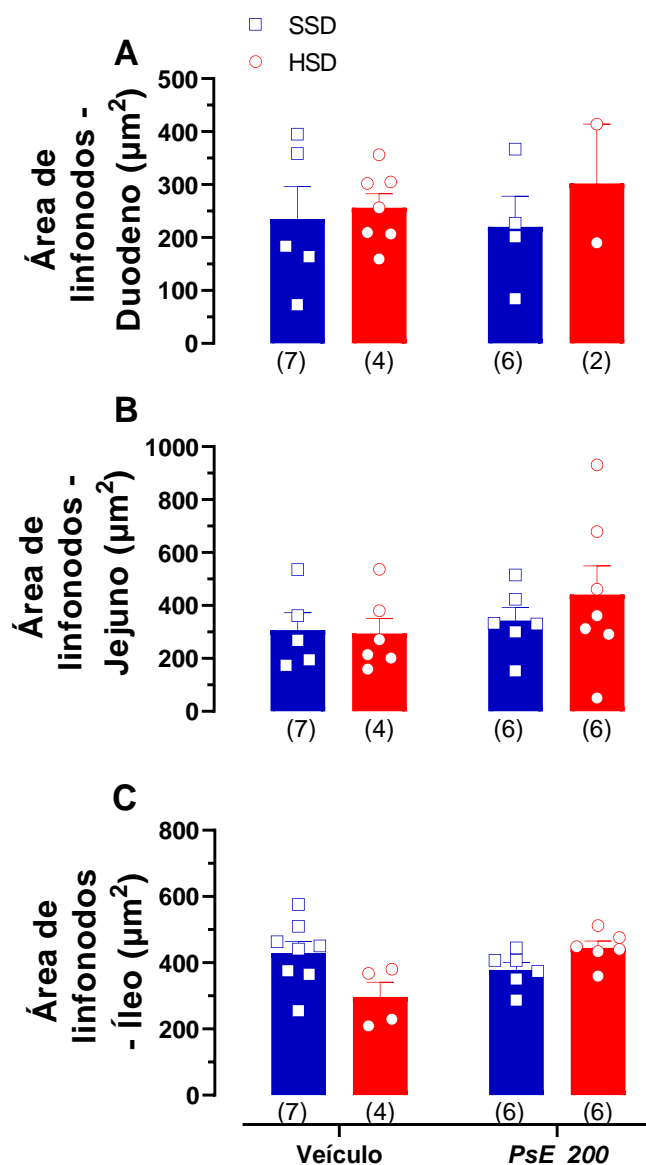
SSD *PsE* 200: $241,5 \pm 5,6 \mu\text{m}$, HSD *PsE* 200: $247,0 \pm 5,49 \mu\text{m}$; Íleo: SSD veículo: $237,8 \pm 7,4 \mu\text{m}$, HSD veículo: $213,6 \pm 11,6 \mu\text{m}$, SSD *PsE* 200: $228,3 \pm 15,8 \mu\text{m}$, HSD *PsE* 200: $237,2 \pm 8,9 \mu\text{m}$; ANOVA de duas vias; $p > 0,05$) (Figura 24, painéis B e C). A área dos linfonodos não foi comprometida pelo consumo de dieta com sobrecarga de sódio e nem pelo tratamento crônico intragástrico com *PsE* 200 nos três compartimentos do intestino delgado: duodeno, jejuno e íleo (Figura 25A, B e C). Não houve espessamento de camada muscular em nenhum dos três seguimentos do intestino delgado: Duodeno, jejuno e íleo, independente da dieta ou do tratamento com *PsE* 200, conforme mostrado na Figura 26A, B e C. O número de células caliciformes foi aumentado no duodeno entre os ratos HSD (SSD veículo: $7 \pm 0,3$, HSD veículo: $8 \pm 0,2$, ANOVA de duas vias; $p > 0,05$). Contudo, o tratamento crônico com *PsE* 200 aumentou ainda mais o número de células caliciformes no duodeno em ratos HSD (SSD *PsE* 200: $8 \pm 0,3$, HSD *PsE* 200: $9 \pm 0,4$, ANOVA de duas vias; $p > 0,05$), Figura 27, painel A. Já no jejuno, não foram observadas alterações nos números de células caliciformes (SSD veículo: $7 \pm 0,3$, HSD veículo: $8 \pm 0,4$, SSD *PsE* 200: $8 \pm 0,2$, HSD *PsE* 200: $8 \pm 0,4$, ANOVA de duas vias; $p > 0,05$) (Figura 27, painel B). No íleo, o tratamento aumentou o número de células caliciformes em ratos alimentados com dieta padrão (SSD veículo: $7 \pm 0,3$, HSD veículo: $8 \pm 1,1$, SSD *PsE* 200: $10 \pm 0,9$, HSD *PsE* 200: $9 \pm 0,6$, ANOVA de duas vias; $p > 0,05$), conforme mostrado na Figura 27, painel C.

Figura 24. Altura das vilosidades no intestino delgado: Duodeno (A), Jejuno (B) e Íleo (C) para ratos submetidos a dieta padrão (SSD), dieta com sobrecarga de sódio (HSD) e tratados com *PsE* 200 ou veículo. As medidas foram realizadas em amostras retiradas de ratos HSD e SSD na 16ª semana pós o desmame, após 4 semanas de administração intragástrica de *PsE* 200 ou veículo (água destilada) por gavagem orogástrica. Círculos e quadrados dispersos representam valores individuais e as barras representam dados médios do grupo (média±SEM). ANOVA de uma via seguida de pós teste de Tukey; $p < 0,05$.



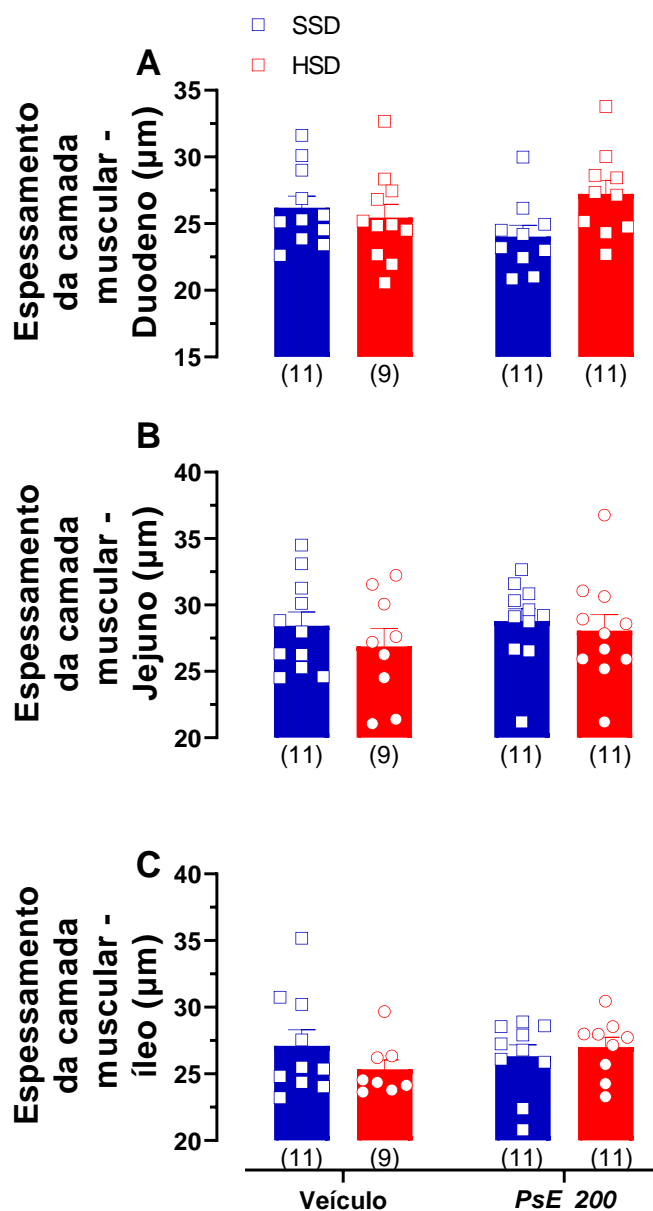
Fonte: Própria autora

Figura 25. Área de linfonodos no intestino delgado: Duodeno (A), Jejuno (B) e Íleo (C) para ratos submetidos a dieta padrão (SSD), dieta com sobrecarga de sódio (HSD) e tratados com *PsE* 200 ou veículo. As medidas foram realizadas em amostras retiradas de ratos HSD e SSD na 16ª semana pós o desmame após 4 semanas de administração intragástrica de *PsE* 200 ou veículo (água destilada) por gavagem orogástrica. Círculos e quadrados dispersos representam valores individuais e as barras representam dados médios do grupo (média±SEM). ANOVA de uma via seguida do pós teste de Tukey; $p < 0,05$.



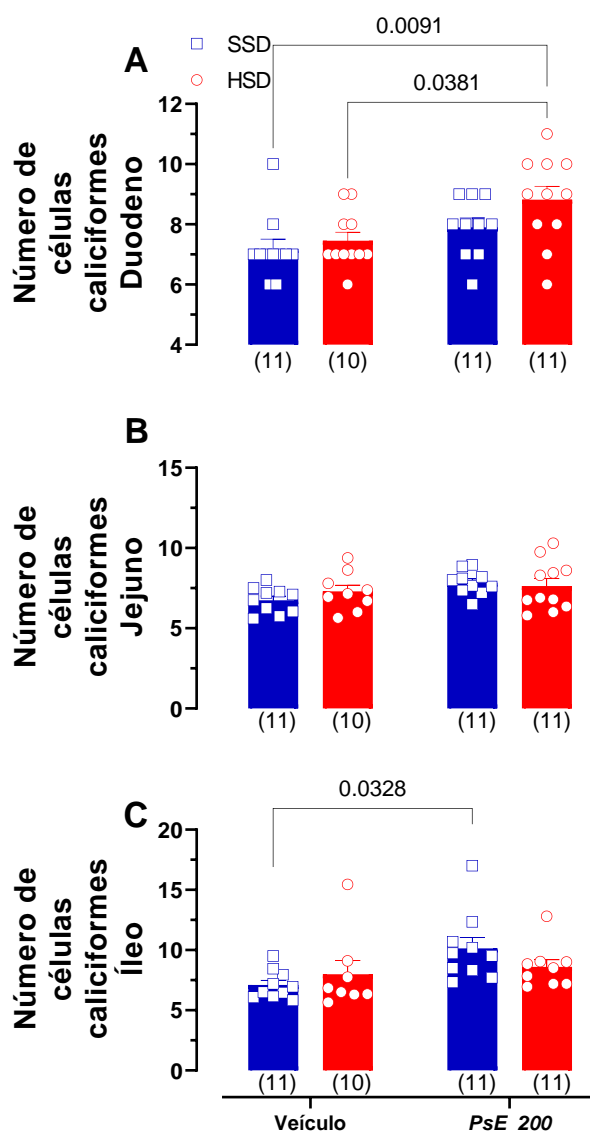
Fonte: Própria autora

Figura 26. Espessamento da camada muscular no intestino delgado: Duodeno (A), Jejuno (B) e Íleo (C) para ratos submetidos a dieta padrão (SSD), dieta com sobrecarga de sódio (HSD) e tratados com *PsE* 200 ou veículo. As medidas foram realizadas em amostras retiradas de ratos HSD e SSD na 16ª semana pós o desmame após 4 semanas de administração intragástrica de *PsE* 200 ou veículo (água destilada) por gavagem orogástrica. Círculos e quadrados dispersos representam valores individuais e as barras representam dados médios do grupo (média±SEM). ANOVA de uma via seguida do pós teste de Tukey; $p < 0,05$.



Fonte: Própria autora

Figura 27. Número de células caliciformes no intestino delgado: Duodeno (A), Jejuno (B) e Íleo (C) para ratos submetidos a dieta padrão (SSD), dieta com sobrecarga de sódio (HSD) e tratados com *PsE* 200 ou veículo. As medidas foram realizadas em amostras retiradas de ratos HSD e SSD na 16ª semana pós o desmame após 4 semanas de administração intragástrica de *PsE* 200 ou veículo (água destilada) por gavagem orogástrica. Círculos e quadrados dispersos representam valores individuais e as barras representam dados médios do grupo (média±SEM). ANOVA de uma via seguida do pós teste de Tukey; $p < 0,05$.



Fonte: Própria autora

Capítulo V

Avaliação da PsE sobre citocinas pró e anti-inflamatórias e perfil redox

9.1. Objetivos

- 1) Avaliar o efeito anti ou pró-inflamatório do extrato de *Psidium guajava* L.
- 2) Avaliar a atividade de enzimas antioxidantes hepáticas com o uso de extrato de *Psidium guajava* L.

9.2. Estratégia experimental

- Dosear os níveis de citocinas pró inflamatórias (TNF- α e IL-17) e anti-inflamatórias (IL-10) no plasma de animais HSD e tratados com PsE 200.
- Verificar a atividade de enzimas antioxidantes hepáticas de animais submetidos as dietas HSD e SSD, e ainda, que receberam com PsE 200 ou veículo.

9.3. Metodologia

9.3.1. Modelo experimental

O modelo experimental, acomodação dos ratos antes do início dos protocolos experimentais e a preparação da ração com sobrecarga de sódio está descrito com detalhes no Capítulo II. Todos os procedimentos que foram realizados utilizando os animais, foram conduzidos de acordo com as diretrizes do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) tiveram aprovação prévia da Comissão de Ética em Uso Animal da Universidade Federal de Ouro Preto, sob protocolo de nº 8880090719.

9.3.2. Administração oral de PsE

A administração oral de PsE foi realizada por um período de quatro semanas, sendo então, denominado de tratamento crônico. Este tratamento foi realizado ao final das 12 semanas após o desmame, nas quais os animais dos grupos de dieta SSD e HSD passaram a receber a administração oral de placebo (água destilada) ou PsE 200 (formulação preparada contendo 200 mg/kg de extrato bruto seco). As administrações crônicas de PsE foram feitas por gavagem orogástrica, no volume de 1 mL e com as concentrações das suspensões administradas diariamente corrigidas pelo peso corporal dos animais de forma a manter-se a dosagem constante.

9.3.3. Coleta de amostras de plasma

Em um grupo separado, sem qualquer intervenção cirúrgica, os ratos SSD e HSD, tratados com PsE 200 ou veículo foram anestesiados com Cetamina (Ketalex, Dechra, Londrina, PR) e xilasina (Syntec do Brasil Ltda, Hortolândia, SP). A coleta de sangue foi realizada por punção cardíaca, após eutanásia com overdose de anestésico. As amostras de

plasma foram separadas, congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80°C para determinação dos níveis de citocinas.

9.3.4. Dosagem dos níveis plasmáticos de citocinas

Os níveis plasmáticos das citocinas IL-10, IL-17A (Bioassay Technology Laboratory, BT Lab, China) e TNF- α (PeproTech, London, UK) foram medidos usando kits de ensaio imunoenzimático (ELISA) comercialmente disponível de acordo com as instruções do fabricante, que podem ser consultadas nos sites www.peprotech.com.br e www.bt-laboratory.com.

9.3.4.1. Avaliação do perfil redox em ratos HS12W

9.3.4.2. Modelo experimental

O modelo experimental, acomodação dos ratos antes do início dos protocolos experimentais e a preparação da ração com sobrecarga de sódio está descrito com detalhes no Capítulo II. Todos os procedimentos que foram realizados utilizando os animais, foram conduzidos de acordo com as diretrizes do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) tiveram aprovação prévia da Comissão de Ética em Uso Animal da Universidade Federal de Ouro Preto, sob protocolo de nº 8880090719.

9.3.4.3. Administração oral de PsE

A administração oral de PsE foi realizada por um período de quatro semanas, sendo então, denominado de tratamento crônico. Este tratamento foi realizado ao final das 12 semanas após o desmame, nas quais os animais dos grupos de dieta SSD e HSD passaram

a receber a administração oral de placebo (água destilada), *PsE* 100 ou *PsE* 200 (formulação preparada contendo 100 mg/kg de extrato bruto seco ou formulação preparada contendo 200 mg/kg de extrato bruto seco). O motivo desta dose não ser utilizada em todos os experimentos, foi que estudos prévios de nosso laboratório verificaram que *PsE* 100 não foi eficaz em reduzir a pressão arterial dos ratos (BRAGA; GOMES; BATISTA; DE SOUZA *et al.*, 2022). Apenas a *PsE* 200 reduziu os níveis pressóricos de ratos acordados (BRAGA; GOMES; BATISTA; DE SOUZA *et al.*, 2022). As administrações crônicas de *PsE* foram feitas por gavagem orogástrica, no volume de 1 mL e com as concentrações das suspensões administradas diariamente corrigidas pelo peso corporal dos animais de forma a manter-se a dosagem constante.

9.3.4.4. *Doseamento de SOD, CAT, GSH e TBARS*

No intuito de determinar a atividade de enzimas envolvidas no perfil redox como SOD, CAT, GSH e TBARS dos animais, ratos com 16 semanas de ambas dietas (SSD e HSD) e que receberam administração oral de *PsE* 200 ou veículo, foram anestesiados com sobredose de Cetamina (Ketalex, Dechra, Londrina, PR) e xilasina (Syntec do Brasil Ltda, Hortolândia, SP), tiveram uma incisão torácica e fígados foram extraídos, imersos em nitrogênio líquido e armazenados a -80° C até posteriores análises.

9.3.4.5. *Determinação da atividade de enzima superóxido dismutase (SOD)*

A superóxido dismutase (SOD) é uma enzima importante na proteção celular contra os efeitos do estresse oxidativo. Inicialmente, amostras de tecido hepático de ratos foram coletadas após eutanásia. As soluções de extração de tecido foram preparadas contendo tampão fosfato de sódio 50 mM (pH 7,8), etilenodiaminotetracético (EDTA) 1 mM, sacarose 0,32 M e triton X-100 0,1%. Os tecidos foram homogeneizados em um tubo de

ensaio contendo a solução de extração, em um banho de gelo. Em seguida, foram centrifugados a 4°C por 20 minutos a 12.000 g. O sobrenadante foi coletado e utilizado para a determinação da atividade da enzima SOD. Para a determinação da atividade da SOD, foram preparadas soluções contendo tampão fosfato de sódio 50 mM (pH 7,8), metionina 13 mM, nitroblue tetrazólio (NBT) 75 µM e EDTA 0,1 mM. Em seguida, foram adicionados 20 µL de sobrenadante do tecido hepático a 980 µL da solução de reação. A reação foi iniciada pela adição de 2 µL de solução de hipoxantina 2 mM. A mistura foi incubada a 37°C por 15 minutos e a reação foi interrompida adicionando 200 µL de clorofórmio e 400 µL de metanol ao tubo de ensaio. Após a centrifugação a 2.500 g por 10 minutos, a absorvância do sobrenadante foi medida em 560 nm. Os resultados foram expressos em % de inibição/ mg de proteínas (ŌYANAGUI, 1984).

9.3.4.6. *Determinação da atividade de catalase (CAT)*

O estudo da atividade enzimática da catalase é importante para compreender o perfil redox de tecidos biológicos. Para iniciar a análise, foram preparadas as soluções de H₂O₂ 0,1%, tampão fosfato de potássio (pH 7,0) e NaOH 1M. Em seguida, uma suspensão do tecido a ser testado foi preparada em tampão fosfato de potássio (pH 7,0). Para determinar a atividade enzimática da catalase, foram adicionados 2,0 mL da suspensão do tecido em um tubo de ensaio, juntamente com 2,0 mL de solução de H₂O₂ 0,1%. Após 15 segundos, foi adicionado 2,0 mL de solução de NaOH 1M ao tubo de ensaio e homogeneizado. Em seguida, o tubo de ensaio foi deixado em repouso por 1 minuto, antes de adicionar 4,0 mL de água destilada. Para medir a absorvância da solução, foi utilizado um espectrofotômetro, e a leitura foi realizada em 240 nm. A diferença entre o valor inicial de absorvância e o valor final de absorvância foi utilizada para calcular a atividade enzimática da catalase. A atividade da catalase foi expressa em unidades CAT/mg de

proteína, sendo a quantidade de proteína determinada pelo método de Bradford. A atividade enzimática da catalase é um importante indicador do perfil redox em tecidos biológicos, permitindo o entendimento dos mecanismos envolvidos na proteção celular contra danos oxidativos (AEBI, 1984).

9.3.4.7. *Determinação da atividade de Glutathione (GSH)*

O protocolo descrito por Simplicio em 2015 foi utilizado para a determinação da atividade da enzima glutathione em amostras de tecido hepático de ratos. Inicialmente, as soluções utilizadas foram preparadas, incluindo tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 7,4), glutathione reduzida 1 mM, peróxido de hidrogênio (H₂O₂) 1 mM e azida sódica 1 mM. O tecido foi homogeneizado em um tubo de ensaio contendo tampão fosfato de potássio (pH 7,4) e centrifugado a 2.000 g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi coletado e utilizado para a determinação da atividade da GPx. Para a determinação da atividade da GPx, foram preparadas soluções contendo tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 7,4), glutathione reduzida 1 mM, peróxido de hidrogênio (H₂O₂) 1 mM e sobrenadante do tecido hepático. Em seguida, foram adicionados 10 µL de azida sódica 1 mM e a mistura foi incubada a 37°C por 10 minutos. A reação foi interrompida pela adição de ácido sulfúrico (H₂SO₄) 6% e ácido tiobarbitúrico 0,8%. A mistura foi aquecida a 100°C por 15 minutos e depois resfriada em banho de gelo. O líquido sobrenadante foi coletado e a absorbância foi medida em 532 nm. A atividade da enzima glutathione foi expressa em unidades de glutathione/mg de proteína. (SIMPLICIO; RESSTEL; TIRAPELLI; D'ORLÉANS-JUSTE *et al.*, 2015).

9.3.4.8. *Determinação de TBARS*

Inicialmente, foi preparada uma solução de ácido tiobarbitúrico 0,375% e ácido clorídrico 15% em água destilada. Foram também preparadas soluções contendo 1,15% de cloreto de sódio (NaCl) e 0,1 M de ácido etileno diamino tetracético (EDTA), além de solução de butil-hidroxianisol (BHA) 1% em etanol. As amostras de fígado foram coletadas em tubos contendo EDTA como anticoagulante e centrifugadas a 1500 g por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi coletado e dividido em alíquotas de 200 µL. Em seguida, foram adicionados 600 µL de solução de BHA 1% e as amostras foram incubadas a 37°C por 10 minutos. Após a incubação, foram adicionados 50 µL de NaCl 1,15% e 250 µL da solução de ácido tiobarbitúrico. As amostras foram aquecidas em banho-maria a 100°C por 1 hora, seguido de resfriamento em banho de gelo. As amostras foram centrifugadas a 3000 g por 10 minutos e a absorbância do sobrenadante foi medida em 535 nm. Foi utilizado como padrão o malondialdeído (MDA), um produto da peroxidação lipídica. Os resultados foram expressos como nmol/mg proteína (MIRANDA-VILELA; RESCK; GRISOLIA, 2008).

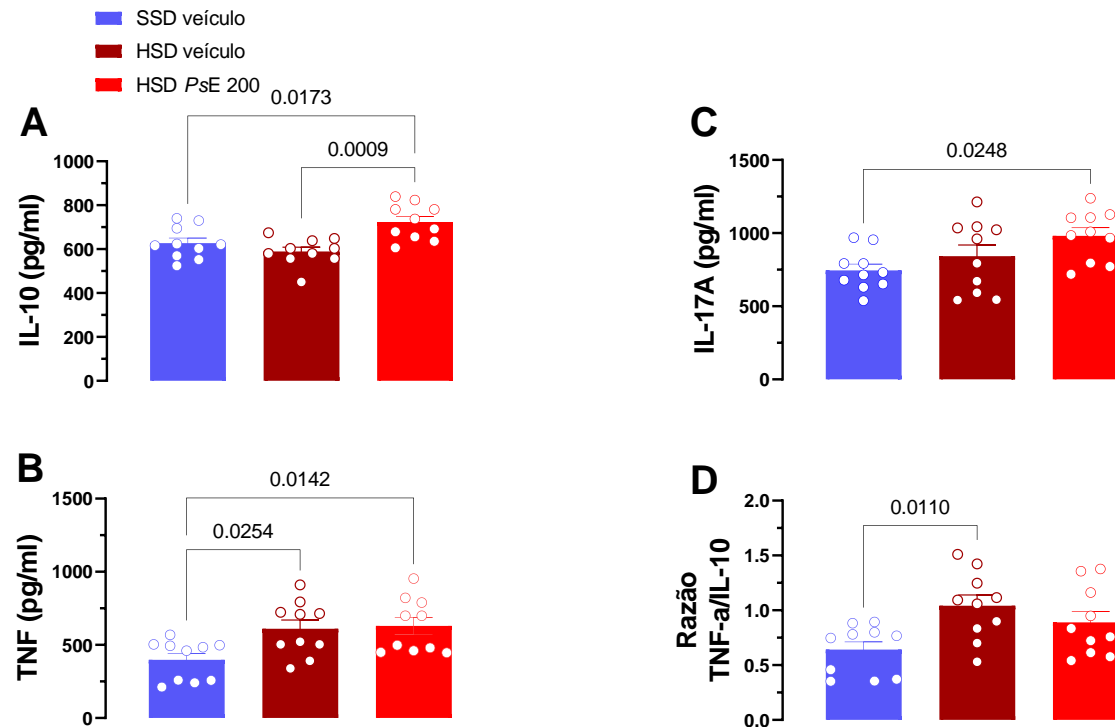
9.4. Análises estatísticas

Os dados foram expressos em média e erro padrão da média. As comparações entre os grupos foram realizadas por análise de variância uma via (ANOVA one way). Todos os dados foram analisados estatisticamente utilizando o software GraphPad Prism 8.0 para Windows (GraphPad Software, San Diego Califórnia, EUA). As diferenças entre pares de médias foram consideradas significantes quando a probabilidade de erro de tipo I foi menor que 5% ($p < 0,05$).

9.5. Resultados

Foram realizadas dosagens dos níveis plasmáticos de citocinas, incluindo IL-17A, TNF- α e IL-10, com o objetivo de avaliar a inflamação sistêmica. Os resultados obtidos neste estudo indicaram que os ratos submetidos à dieta rica em sal (HSD) não apresentaram aumento nos níveis plasmáticos de IL-17A (HSD veículo: $842,1 \pm 77,06$ pg/ml e SSD veículo: $745,2 \pm 43,25$ pg/ml, ANOVA de uma via, pós teste de Tukey, $p < 0,05$), mesmo após tratamento com *PsE* 200 (IL-17 A: $981,9 \pm 54,34$ pg/ml, ANOVA de uma via, pós teste de Tukey, $p < 0,05$). Por outro lado, os níveis de TNF- α aumentaram nos ratos HSD, sendo que o tratamento com *PsE* não foi capaz de reestabelecer esses valores (HSD veículo: $610,8 \pm 58,70$ pg/ml, SSD veículo: $397,9 \pm 43,33$, HSD *PsE*: $629,9 \pm 58,76$ pg/ml ANOVA de uma via, pós teste de Tukey, $p < 0,05$) (Figura 39, painéis B e C). Entretanto, os ratos HSD tratados com *PsE* 200 apresentaram um aumento de 70% nos níveis plasmáticos de IL-10 em comparação aos animais HSD tratados com veículo (HSD veículo: $589,4 \pm 19,71$ pg/ml e HSD *PsE* 200: $732,2 \pm 25,68$ pg/ml, ANOVA de uma via, pós teste de Tukey, $p < 0,05$). Ademais, não foram observadas alterações significativas na razão TNF- α /IL-10 (HSD veículo: $1,04 \pm 0,09$, SSD veículo: $0,64 \pm 0,07$ e HS *PsE* 200: $0,88 \pm 0,09$ ANOVA de uma via, pós teste de Tukey, $p < 0,05$) (Figura 28, painéis A, B, C e D).

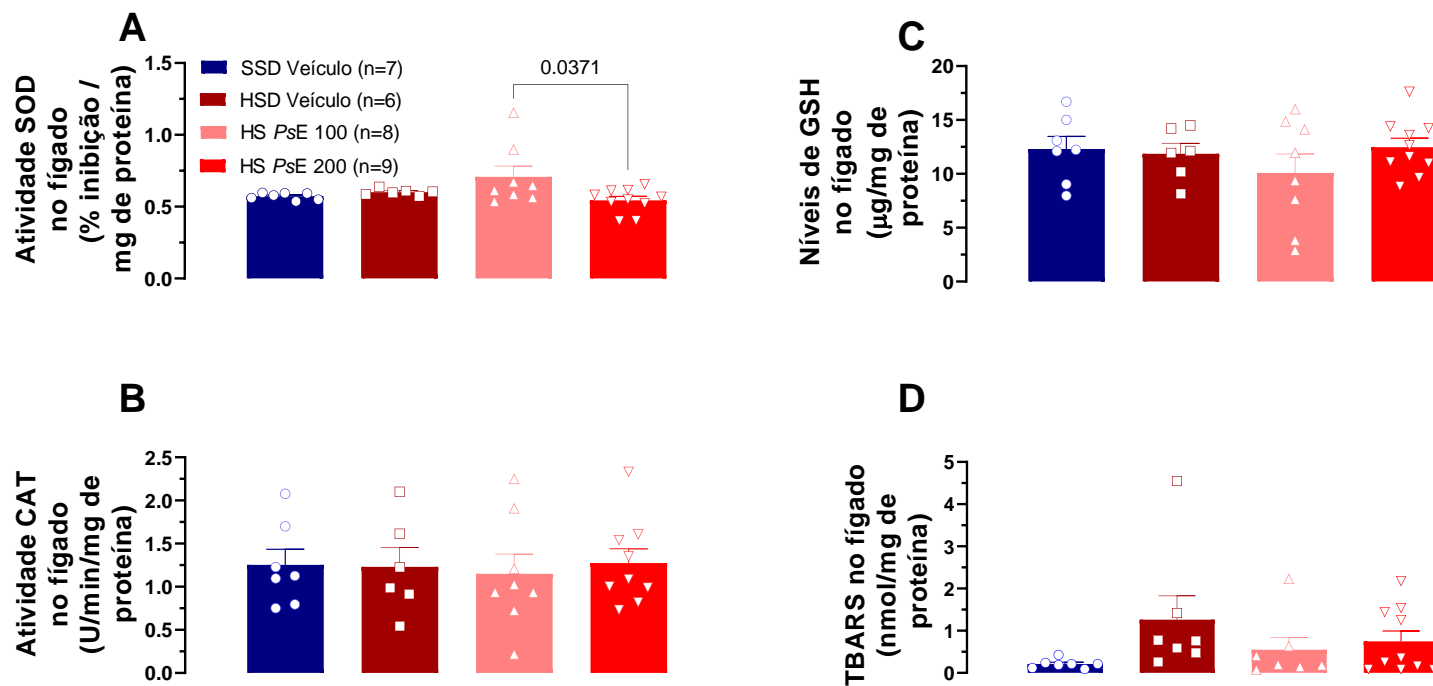
Figura 28. Concentrações plasmáticas de IL-10 (A), TNF- α (B) e IL-17A (C) e razão a razão TNF- α /IL-10 (D) para SSD, HSD) e tratados com *PsE* 200. As medidas foram realizadas em amostras retiradas de ratos HSD e SSD na 16ª semana após o uso, após 4 semanas de administração intragástrica de *PsE* 200 ou veículo (água destilada) por gavagem orogástrica. Círculos dispersos representam valores individuais e as barras representam dados médios do grupo (média \pm SEM). ANOVA de uma via seguida do pós teste de Tukey; $p < 0,05$.



Fonte: Própria autora

Os resultados obtidos pelos ensaios em amostras do fígado, mostraram redução de SOD dos ratos HSD que receberam *PsE* 200 em relação aos ratos que receberam *PsE* 100, não havendo quaisquer alterações nos demais grupos (Figura 29, painel A) (HSD *PsE* 100: $0,707 \pm 0,07$ % inibição / mg de proteína e HSD *PsE* 200: $0,544 \pm 0,026$ 07 % inibição / mg de proteína, ANOVA de uma via, pós teste de Tukey, $p < 0,05$) não havendo quaisquer alterações nos demais grupos (HSD veículo: $0,601 \pm 0,009$ % inibição / mg de proteína e SSD veículo: $0,572 \pm 0,08$ % inibição / mg de proteína, ANOVA de uma via, pós teste de Tukey, $p < 0,05$) (Figura 29, painel A). A atividade de catalase não foi diferente entre os grupos SSD e HSD (SSD veículo: $1,253 \pm 0,181$ U/min/mg de proteína e HSD veículo: $1,231 \pm 0,226$ U/min/mg de proteína, ANOVA de uma via, pós teste de Tukey, $p < 0,05$) e nem nos tratamentos com *PsE* (HSD *PsE* 100: $1,150 \pm 0,229$ U/min/mg de proteína e HSD *PsE* 200: $1,274 \pm 0,166$ U/min/mg de proteína, ANOVA de duas vias, pós teste de Tukey, $p < 0,05$) (Figura 29, painel B). A GSH também não foi diferente entre grupos e tratamentos (SSD veículo: $12,30 \pm 1,162$ $\mu\text{g}/\text{mg}$ de proteína, HSD veículo: $11,85 \pm 0,983$ $\mu\text{g}/\text{mg}$ de proteína, HSD *PsE* 100: $10,08 \pm 1,768$ $\mu\text{g}/\text{mg}$ de proteína HSD *PsE* 200: $12,48 \pm 0,819$ $\mu\text{g}/\text{mg}$ de proteína, ANOVA de uma via, pós teste de Tukey, $p < 0,05$), (Figura 29, painel C) assim como valores da análise de TBARS (SSD veículo: $0,215 \pm 0,04$ nmol/mg de proteína, HSD veículo: $0,804 \pm 0,163$ nmol/mg de proteína, HSD *PsE* 100: $0,268 \pm 0,085$ nmol/mg de proteína, HSD *PsE* 200: $0,586 \pm 0,209$ nmol/mg de proteína, ANOVA de uma via, pós teste de Tukey, $p < 0,05$) (Figura 29, painel D).

Figura 29. Atividade de superóxido dismutase (SOD) (A), atividade de catalase (CAT) (B) níveis de glutathiona peroxidase (GSH) (C) e TBARS no fígado (D) para animais veículos (SSD), modelo experimental (veículo HSD) e tratados com *PsE* (tratados com HS). As medidas foram realizadas em amostras retiradas de ratos HSD e SSD na 16ª semana após o uso, após 4 semanas de administração intragástrica de *PsE* 200 ou veículo (água destilada) por gavagem orogástrica. Círculos, quadrados e triângulos dispersos representam valores individuais e as barras representam dados médios do grupo (média±SEM). ANOVA de uma via seguida do pós teste de Tukey; $p < 0,05$.



Fonte: Própria autora

10. Discussão

Com base nos resultados deste estudo sobre os efeitos biológicos, é possível que a administração oral de extrato de *Psidium guajava* L. (PsE) esteja associada à inibição da absorção de sódio intestinal em ratos HS12W, com uma inibição ainda maior em animais submetidos a administração oral crônica de PsE. É provável que o extrato de *Psidium guajava* L. esteja agindo como um agente excitatório na atividade simpática dos animais que receberam a administração oral de PsE, podendo haver uma combinação desses mecanismos. Além disso, a alteração na composição bacteriana e a produção de citocinas inflamatórias, especialmente após a administração oral de PsE, também pode estar contribuindo para as alterações na pressão arterial.

A utilização mais comum de folha de goiabeira pode ser a partir do preparo de chás (GUTIÉRREZ; MITCHELL; SOLIS, 2008). O processo de obtenção do extrato de folhas de goiabeira por macerações sucessivas (remaceração) visou o esgotamento do material vegetal, para obter de maior quantidade de extrato e maiores teores de compostos bioativos (HUDZ; MAKOWICZ; SHANAIDA; BIAŁOŃ *et al.*, 2020). Neste trabalho, a opção pelo uso do etanol e não a água, foi pelo etanol ser um solvente com menor toxicidade em relação a outros solventes orgânicos. Outro aspecto técnico importante para escolha do etanol é a relativa facilidade para sua remoção, o que permite o uso de temperatura relativamente baixa, diminuindo-se, assim, a probabilidade de degradação de fitoquímicos durante o processamento para obtenção do extrato bruto seco (CHEREMISINOFF, 2003). Quanto a caracterização de compostos fitoquímicos, o doseamento de taninos foi menor no extrato bruto seco de folha de goiaba utilizado neste estudo quando comparado ao teor encontrado por outros estudos (ELFALLEH; HANNACHI; TLILI; YAHIA *et al.*, 2012; MAILLOA; MAHENDRADATTA; LAGA; DJIDE *et al.*, 2014). Os taninos atuam como

fatores antinutricionais porque reduzem a digestibilidade de nutrientes, como proteínas, quelam micronutrientes importantes, evitando assim a absorção, além de gerar toxicidade ao organismo (POPOVA; MIHAYLOVA, 2019). Os resultados deste estudo mostraram que o conteúdo de tanino tanto no extrato quanto na *PsE* é muito baixo (menos de 0,02%). Estudos anteriores propuseram que o conteúdo de tanino na dieta superior a 1% pode prejudicar o metabolismo dos nutrientes (NAUMANN; TEDESCHI; ZELLER; HUNTLEY, 2017). Portanto, o conteúdo de taninos encontrado no extrato e na *PsE* pode não causar problemas nutricionais já que o conteúdo do extrato é muito inferior a 1%. Os resultados da composição de metais presentes no extrato bruto seco, determinado por ICP-IOIS, mostraram uma concentração menor de Cu (8,39%) e Fe (61,8%) no extrato. Por outro lado, Neto e colaboradores 2013, quantificaram o conteúdo de P, K, Ca e Mg nas folhas de *Psidium guajava L.* e encontraram 1,630 mg/kg, 13,440 mg/kg, 15,330 mg/kg e 3,140 mg/kg, respectivamente. Em suma, os teores de K⁺ e P obtidos por este trabalho foram semelhantes aos valores relatados por Neto, mas menores para Ca e Mg (DANTAS NETO; MACIEL; ALVES; AZEVEDO *et al.*, 2013), indicando que podem haver pequenas alterações nas concentrações destes micronutrientes decorrentes do período de coleta das folhas, estação do ano e tipo de solo pelas quais estão plantadas as goiabeiras (VALCÁRCEL; ALONSO; RODRÍGUEZ-GIL; CASTAÑO *et al.*, 2013).

Quanto a presença de compostos bioativos, determinado pelo UPLC-MS, foram identificados quatro compostos. O Composto 1 foi proposto como kaempferol (flavonol), de acordo com o pico [M - H] - em m/z 286. Esses achados estão de acordo com os de Liang e colaboradores (2005) que identificaram flavonóides e glicosídeos flavonoides nas folhas de *Psidium guajava L.* (LIANG; QIAN; YAO, 2005). O Composto 2 exibiu um pico [M - H] - em m/z 301, correspondendo à quercetina (flavonol). Essa característica foi

observada por outros autores em estudos para determinar compostos polares em folhas e extrato de *Psidium guajava* L. (DIAZ-DE-CERIO; PASINI; VERARDO; FERNANDEZ-GUTIERREZ et al., 2017). O composto 3 (miricetina, flavonol) que exibiu um pico de base [M - H] - em m/z 317 também foi identificado em *Psidium guajava* L. por Wang e colaboradores (2017) (WANG, L.; WU, Y.; BEI, Q.; SHI, K. et al., 2017). O quarto composto exibiu um pico de base [M - H] - em m / z 317, sendo característico de um derivado de miricetina (WANG, L.; WU, Y.; BEI, Q.; SHI, K. et al., 2017). Assim, os componentes identificados neste estudo já são comumente conhecidos como constituintes de folhas de *Psidium guajava* L., ou seja, já foram identificados anteriormente, indicando que foram preservados no extrato preparado e utilizado neste estudo.

Em ensaios experimentais, a avaliação direta da atividade simpática pela medida direta do nervo lombar, mostrou que a administração oral aguda de PsE em ratos anestesiados aumentou a atividade simpática no leito lombar (ASNL) em comparação aos animais que receberam apenas veículo, sendo similar nos grupos SSD e HSD. Na literatura já foi mostrada a relação do consumo de sódio em elevadas concentrações e seu efeito sobre a atividade simpática lombar. No estudo de Yoshimoto e colaboradores (2019) ratos Dahl sal sensíveis e Dahl sal resistentes foram submetidos a dieta contendo 8% de NaCl de sódio por 14 dias, com um período basal de 3 dias antes e 7 dias após este regime, com dieta padrão (YOSHIMOTO; ONISHI; MINEYAMA; IKEGAME et al., 2019). Os animais foram devidamente instrumentados para registro de pressão arterial e atividade simpática dos nervos lombar e renal (YOSHIMOTO; ONISHI; MINEYAMA; IKEGAME et al., 2019). Os ratos Dahl sal sensíveis tiveram aumento dos níveis pressóricos quando alimentados por dieta com sobrecarga de sódio, mas não apresentaram alterações na atividade simpática renal e uma pequena alteração na atividade simpática lombar

(YOSHIMOTO; ONISHI; MINEYAMA; IKEGAME *et al.*, 2019). Após o retorno para dieta com quantidades normais de sódio, os níveis pressóricos reduziram para valores basais, ocorrendo um aumento na atividade simpática renal e redução da atividade simpática lombar (YOSHIMOTO; ONISHI; MINEYAMA; IKEGAME *et al.*, 2019). Com este estudo os autores concluíram que os animais Dahl sal sensíveis tiveram alterações nas respostas desencadeadas pelo sistema nervoso em decorrência a redução de sódio, podendo ser devido a aumento de vasopressina circulante e por aumento da resistência vascular total, podendo não ser a atividade simpática renal ou lombar os fatores principiantes do processo hipertensivo (YOSHIMOTO; ONISHI; MINEYAMA; IKEGAME *et al.*, 2019). Por outro lado, a infusão de soluções com elevadas concentrações de sódio em áreas encefálicas também leva o aumento de pressão arterial, reduz a atividade simpática renal e aumenta a resposta simpática lombar (KINSMAN; SIMMONDS; BROWNING; STOCKER, 2017; STOCKER; LANG; SIMMONDS; WENNER *et al.*, 2015). Stocker e colaboradores verificaram a contribuição dos neurônios RVLM para o sistema nervoso autônomo e a resposta pressora à hipernatremia (STOCKER; LANG; SIMMONDS; WENNER *et al.*, 2015). Para isto foram utilizados ratos Sprague-Dawley, sob dieta padrão, instrumentados previamente para registros dos nervos lombar, renal, esplâncnica e adrenal. Como resultados, verificaram que a infusão do ventrículo lateral de 0,15 mol / L, 0,6 mol / L e 1,0 mol / L de NaCl (5 µL / 10 minutos) produziu aumentos dependentes da concentração de Na⁺ na atividade simpática lombar, adrenal e pressão arterial, sem alterações na atividade simpática esplâncnica e uma diminuição na atividade simpática renal (STOCKER; LANG; SIMMONDS; WENNER *et al.*, 2015). Além disso, verificaram também que neurônios do RVLM tem grande contribuição com aumento de atividade simpática. Coletivamente, esses achados sugerem que aumentos agudos nas concentrações de NaCl no líquido cefalorraquidiano aumentam a atividade simpática e a

pressão arterial (STOCKER; LANG; SIMMONDS; WENNER *et al.*, 2015). Em outro trabalho, Kinsman e colaboradores avaliaram o efeito da infusão sistêmica ou central de NaCl hipertônico e outros osmólitos sobre a pressão arterial e atividade simpática dos leitões lombar, renal e adrenal e as respostas obtidas por neurônios órgão vasculoso da lâmina terminal (OVLT) a partir de diferentes concentrações de NaCl (KINSMAN; BROWNING; STOCKER, 2017). Para realização deste trabalho foram utilizados ratos Sprague-Dawley. Os resultados obtidos, a infusão intracerebroventricular de 1,0M NaCl produziu um aumento na atividade do nervo simpático lombar e adrenal e nos níveis pressóricos quando comparado ao sorbitol (KINSMAN; SIMMONDS; BROWNING; STOCKER, 2017). Além disso, a microinjeção no OVLT de NaCl 1,0 M aumentou a atividade simpática lombar (KINSMAN; SIMMONDS; BROWNING; STOCKER, 2017). Assim segundo os resultados obtidos por estes experimentos, os autores sugerem que a infusão de NaCl, mais que outros estímulos osmóticos, estão relacionados a aumento da atividade simpática lombar e adrenal, além de neurônios do OVLT, estão diretamente relacionados a estas alterações

Dados da sensibilidade barorreflexa, não indicaram diferença entre ratos HSD e SSD, sugerindo que diferenças na sensibilidade barorreflexa devido à dieta rica em sal podem não ser responsáveis pela queda de ASNL proporcional aumento devido à queda na pressão arterial de ratos HSD em comparação com ratos SSD. Apesar de termos analisado e processado dados apenas de animais que tiveram confirmação da presença de *PsE* no duodeno, a taxa de esvaziamento estomacal pode variar de animal para animal, incorporando algum grau de variação na quantidade de moléculas bioativas de *PsE*.

A análise de possíveis mecanismos envolvendo o trato gastrointestinal, como conteúdo de sódio nas fezes e da absorção de sódio intestinal, mostraram que ratos HSD

tiveram maior excreção de sódio nas fezes. Estudo realizado por Pacha (1998) também avaliou a excreção de sódio nas fezes de animais submetidos a dieta contendo alto teor de sódio 1600 $\mu\text{mol Na}^+/\text{g}$ e baixo teor de sódio 40 $\mu\text{mol Na}^+/\text{g}$ (PACHA, 1998). Neste estudo foi avaliada a excreção de sódio de animais *Dahl salt* sensíveis e *Dahl salt* resistentes a partir da digestão ácida das fezes. Como resultado, os animais *Dahl -salt* sensíveis submetidos a dieta com alta concentração de sódio tiveram aumento da excreção de sódio em aproximadamente 83% em relação ao grupo *Dahl -salt* recebendo dieta com baixo teor de sódio (PACHA, 1998). Assim, torna-se evidente que o aumento do consumo de Na^+ na dieta leva a aumento da excreção intestinal de Na^+ , no intuito de manter os níveis plasmáticos constantes e a homeostase. No estudo de Pacha foi avaliado também a absorção intestinal de Na^+ animais submetidos a dieta com alto e baixo teor de sódio. Contudo, a absorção de sódio intestinal foi avaliada a partir do conteúdo fecal de Na^+ . Como resultado, os autores verificaram que os animais HS tiveram aumento expressivo da concentração de Na^+ fecal. Os autores sugerem que este aumento pode estar relacionado a diminuição da absorção jejunal de Na^+ em ratos alimentados com dieta *high salt* (PACHA, 1998). Além disso, dados deste trabalho mostraram que a administração oral de *PsE* está levando a maior aumento do conteúdo de sódio nas fezes, muito provavelmente por inibir a absorção de sódio no intestino delgado de ratos HSD, conforme mostrado nos ensaios de perfusão intestinal.

Quanto as alterações morfológicas no intestino delgado, houve redução de altura das vilosidades apenas em um compartimento intestinal, no duodeno. Wang e colaboradores (2018) realizaram um estudo em que ratos Sprague-Dawley foram alimentados com dieta contendo 4% de NaCl por 4 semanas e, posteriormente, foi avaliada a morfologia do intestino delgado. Os resultados mostraram redução de altura das

vilosidades em todos os compartimentos intestinais após o consumo de dieta com sobrecarga de sódio (WANG; LI; FANG; YANG *et al.*, 2018). Essa alteração em nosso modelo pode estar aparecendo em menor proporção pela concentração de sódio na dieta, que foi menor em relação ao teor consumido pelos ratos do estudo de Wang. Além disso, o tamanho da vilosidade no duodeno foi reestabelecido nos animais submetidos a dieta com sobrecarga de sódio e que receberam administração oral de PsE 200. Corroborando com nossos dados, Khedr e colaboradores (2021) avaliaram a altura de vilosidade de camundongos Swiss após a infecção parasitária com cistos da *Giardia lamblia* e iniciaram o tratamento com 75mg/kg de extrato de folha de *Psidium guajava* durante um mês, após o 6º dia de infecção. Foi observado que a infecção com *Giardia lamblia* reduziu o tamanho das vilosidades em relação ao grupo não infectado e que o tratamento com extrato de folha de goiabeira (75mg/kg) foi capaz de restabelecer a altura das vilosidades (KHEDR; MOKHAMER; HASSAN; EL-FEKI *et al.*, 2021). Uma possível explicação para este reestabelecimento da arquitetura tecidual no duodeno seria a presença de compostos bioativos, principalmente os flavonoides, que já foi mostrado seu efeito, em estudos prévios, na melhora em úlceras na mucosa gástrica (TENDE; EZE; TENDE; ONAADEPO *et al.*, 2013). Quanto a células caliciformes, apenas no duodeno e íleo houve alterações. Santisteban e colaboradores (2017) verificaram possíveis alterações na arquitetura do intestino delgado de ratos (*Spontaneously Hypertensive Rat*) SHR e Wistar-Kyoto, grupo controle, bem como as alterações em células caliciformes. Como resultados, os autores verificaram que os ratos SHR não tiveram alterações no percentual de células caliciformes (SANTISTEBAN; QI; ZUBCEVIC; KIM *et al.*, 2017). Também não foram observadas alterações de espessamento de camada muscular nos três compartimentos do intestino delgado. Em ensaios experimentais realizados por Aguiar e colaboradores (2018), camundongos fêmeas foram alimentadas com dieta contendo 4% de NaCl por um período

de três semanas, sendo avaliados ao final deste período os níveis de pressão arterial e a histologia do cólon destes camundongos (AGUIAR; MIRANDA; GUIMARÃES; SANTIAGO *et al.*, 2018). Ao final dos experimentos, os autores verificaram que houve aumento dos níveis de pressão arterial em relação aos camundongos que receberam dieta com sobrecarga de sódio, além de depleção de células caliciformes, infiltração celular na mucosa colônica, erosão, ulceração e destruição na camada muscular da mucosa, além de edema na camada submucosa (AGUIAR; MIRANDA; GUIMARÃES; SANTIAGO *et al.*, 2018). Os dados deste trabalho, apesar de contraditórios, podem ser explicados pela diferença de concentração de sódio na dieta, que no trabalho de Aguiar foi maior, e também pela diferença de sexo dos animais utilizados nos estudos. Santisteban e colaboradores (2017) verificaram possíveis alterações no espessamento de camada muscular do intestino delgado de ratos (*Spontaneously Hypertensive Rat*) SHR e Wistar-Kyoto, usado como grupo controle (SANTISTEBAN; QI; ZUBCEVIC; KIM *et al.*, 2017). Como resultados, os autores verificaram que os ratos SHR tiveram aumento na espessura da camada da túnica muscular (SANTISTEBAN; QI; ZUBCEVIC; KIM *et al.*, 2017). Essa contradição de dados, pode ser explicada pela mudança de modelo experimental, já que o modelo SHR é um modelo genético, sem a necessidade de ingestão de sódio na dieta.

Os resultados obtidos neste estudo também mostraram redução das unidades formadoras de colônias (UFC), realizadas em testes *pour plate* em ratos que receberam dieta com sobrecarga de sódio e, mais ainda, que foram submetidos à administração oral de PsE 200, mostrando que a formulação pode estar tendo um efeito antimicrobiano. Dados pregressos da literatura já demonstraram que o extrato da folha de *Psidium guajava* tem efeito antimicrobiano. Sanches e colaboradores (2005) avaliaram atividade antimicrobiana de extrato etanólico de folhas de *Psidium guajava* L. Os resultados mostraram a preparação

de extrato da folha pode ser útil para usos antibacterianos, sendo testado e eficiente sobre gêneros estafilococos e enterococos (SANCHES; GARCIA CORTEZ; SCHIAVINI; NAKAMURA *et al.*, 2005). Wang e colaboradores (2018) avaliaram o efeito antimicrobiano do extrato de *Psidium guajava* L. incorporado a uma nanopartícula de prata na concentração de 100 µg/mL e apenas o extrato da folha de *Psidium guajava* sobre as seguintes bactérias: Bactérias Gram-negativas incluíram *Escherichia coli* e *Alcaligenes faecalis* e o Bactérias Gram-positivas incluem *Arthrobacter creatinolyticus*, *Bacillus aryabhatai*, *Bacillus subtilis* e *Bacillus megaterium* (WANG; WU; XIE; WU *et al.*, 2018). Os autores observaram que na concentração de 100 µg/mL, ensaios de atividade antimicrobiana do extrato de *Psidium guajava* L. incorporado à nanopartícula de prata, inibiram significativamente as bactérias selecionadas, *S. cerevisiae*, *A. niger* e *R. oryzae*, e em maior proporção, *Alcaligenes faecalis* e *Escherichia coli* (WANG; WU; XIE; WU *et al.*, 2018). Não somente ensaios experimentais comprovaram a ação antimicrobiana do extrato de folha de *Psidium guajava* L, mas estudos *in vitro* também mostraram a eficácia deste extrato contra algumas cepas bacterianas. Estudo *in vitro* elaborado por Mehta e colaboradores (2014) averigou o potencial antimicrobiano do extrato da folha de *Psidium guajava* L. nas seguintes concentrações: 1%, 5%, 10%, 15% e 20% sobre a população de *S. mutans* e *S. mitis* (MEHTA; RAJESH; RAO; SHENOY *et al.*, 2014). Os achados obtidos pelo estudo foram que as concentrações de 5% e 20% do extrato de *Psidium guajava* foram capazes de inibir o crescimento de *S. mutans* e *S. mitis* (MEHTA; RAJESH; RAO; SHENOY *et al.*, 2014). De acordo com o apanhado de resultados, tanto *in vivo*, quanto *in vitro*, pode-se sugerir que os mecanismos antimicrobianos podem estar associados ao cloranfenicol, aminoglicosídeos, tetraciclinas, penicilina e glicopeptídeo, que são compostos presentes no extrato de *Psidium guajava* L.

Como ocorreu a redução das unidades formadoras de colônias de bactérias no intestino dos ratos, foram avaliadas quais espécies seriam afetadas pelo consumo de uma refeição rica em sal e a administração oral com *PsE* 200. Alguns dados na literatura já mostram os possíveis prejuízos a microbiota decorrente de dietas com altas concentrações de sal, principalmente na população bacteriana de *Lactobacillus* (WILCK; MATUS; KEARNEY; OLESEN *et al.*, 2017). Wilck e colaboradores (2017) descobriram que uma dieta de 4% de NaCl (8 a 10 vezes a quantidade recomendada para roedores) por 14 dias, causou uma diminuição na população de *Lactobacillus murinus* no microbioma de camundongos (WILCK; MATUS; KEARNEY; OLESEN *et al.*, 2017). A mudança na composição das bactérias nos camundongos alimentados com dieta com sobrecarga de sódio foi acompanhada por um aumento expressivo nos níveis de pressão arterial e nas células pró-inflamatórias CD4 T_H17 na mucosa do intestino (WILCK; MATUS; KEARNEY; OLESEN *et al.*, 2017). Quando os camundongos foram submetidos a uma dieta padrão, contendo a quantidade de sal adequada para roedores, a população de *Lactobacillus murinus* no intestinal reestabeleceu-se os níveis normais, indicando claramente que uma dieta rica em sal pode influenciar a população de bactérias no intestino (WILCK; MATUS; KEARNEY; OLESEN *et al.*, 2017). Em nosso experimento, não observamos alterações no *Lactobacillus*, o que pode ser explicado pela concentração de sódio na dieta ser inferior ao utilizado pelo estudo de Wilck.

O processo inflamatório crônico pode estar envolvido com os mecanismos que desencadeiam à hipertensão (BATISTA; BRAGA; DE MOURA; DE SOUZA *et al.*, 2020). Estudo da literatura já ressaltaram que os extratos de *Psidium guajava* mostraram propriedades anti-inflamatórias por meio de mecanismos que envolvem o aumento dos níveis da citocina anti-inflamatória IL-10. Kumar e colaboradores (2020) demonstraram que um extrato hidroalcoólico de *Psidium guajava* L. aumenta os níveis teciduais de IL-10

hepática em ratos expostos à radiação, sugerindo que *Psidium guajava* L. possui capacidades anti-inflamatórias através do aumento da produção de IL-10 (KUMAR; KUMARCHANDRA; RAI; KUMBLEKAR, 2020). Além disso, em nosso paradigma experimental de hipertensão sal dependente, encontramos uma quantidade significativa de IL-10 plasmática em animais tratados com *PsE* 200. Camundongos knockout para IL-10 γ/γ machos tiveram respostas de pressão arterial mais altas à infusão de angiotensina II do que camundongos do tipo selvagem, enquanto a administração subcutânea de IL-10 inibiu a resposta da pressão arterial à infusão de angiotensina II em camundongos do tipo selvagem (LIMA; ZEMSE; CHIAO; BOMFIM et al., 2016). Além disso, foi demonstrado que a infusão subcutânea de IL-10 pode reduzir a pressão arterial em ratos espontaneamente hipertensos (SHR) (GILLIS; MUSALL; BABAN; SULLIVAN, 2020), indicando que esta citocina reguladora tem propriedades anti-hipertensivas. Recentes achados da literatura, tem mostrado que a citocina IL-17A afeta os níveis de pressão arterial, neuroinflamação e alterações no sistema nervoso central, principalmente em ensaios experimentais (FARACO; BREA; GARCIA-BONILLA; WANG et al., 2018; WILCK; MATUS; KEARNEY; OLESEN et al., 2017). O aumento da produção IL-17A associado à dieta com sobrecarga de sal, não se alterou no modelo experimental HS12W. Por outro lado, o tratamento com *PsE* 200 não reduziu as concentrações plasmáticas de TNF, uma substância pró-inflamatória, indicando que os efeitos do *PsE* 200 no sistema imunológico não parecem influenciar a via que o alto consumo de sal proporciona para produzir TNF. Como o tratamento com *PsE* reduziu os níveis de pressão arterial, mas não o conteúdo plasmático de TNF, os resultados também mostram que o TNF está relacionado ao consumo excessivo de sódio, mas não diretamente correlacionado com a conversão anti-hipertensiva do *PsE*. O TNF é crucial para a migração de células inflamatórias periféricas para o cérebro durante a neuroinflamação (PAOURI; TZARA; KARTALOU; ZENELAK

et al., 2017). No sistema nervoso central, o TNF tem propriedades pró-hipertensivas ao atuar no núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) podendo desencadear respostas simpatoexcitatórias e pressoras em ratos com níveis de pressão normais (SHI; GAN; FAN; ZHANG *et al.*, 2011)., a A via de sinalização da IL-17, além do TNF, tem sido também relacionada ao controle da pressão arterial principalmente no desenvolvimento da hipertensão, por meio de mecanismos associados à neuroinflamação (DENG; WANG; ZHOU; SHAN *et al.*, 2017; FARACO; BREA; GARCIA-BONILLA; WANG *et al.*, 2018; WILCK; MATUS; KEARNEY; OLESEN *et al.*, 2017). Os resultados desta investigação, no entanto, não apoiam a noção de que a IL-17 circulante desempenha um papel no modelo de hipertensão HS12W. Além disso, a administração de *PsE* 200 não teve impacto perceptível no nível de IL-17 circulante, indicando que os efeitos anti-hipertensivos de *PsE* não parecem estar conectados à IL-17 de forma direta.

Os dados deste trabalho, não subsidiaram diferenças em relação as enzimas antioxidantes no fígado, como catalase e glutathiona peroxidase. Os dados obtidos estão similares aos obtidos na literatura quando avaliado apenas a dieta com sobrecarga de sódio para algumas enzimas e, distintos para outras. Dornas e colaboradores (2013) avaliaram as defesas antioxidantes e o estresse oxidativo por meio das enzimas antioxidantes no fígado (DORNAS; DE LIMA; DOS SANTOS; DA COSTA GUERRA *et al.*, 2013). Foram utilizados ratos Fischer com 12 semanas de idade, submetidos a dieta contendo 8% de NaCl por 10 semanas e, após, este periodo foram coletados fígados e realizados ensaios de determinação de enzimas antioxidantes (DORNAS; DE LIMA; DOS SANTOS; DA COSTA GUERRA *et al.*, 2013). Os dados mostraram aumento de SOD e TBARS, sem alterações na CAT e GSH, como ocorreu neste estudo (DORNAS; DE LIMA; DOS SANTOS; DA COSTA GUERRA *et al.*, 2013). Além disso, no presente trabalho, o tratamento com *PsE* 200 apenas reduziu SOD em relação aos animais que receberam *PsE*

100. Estudo envolvendo o uso de *Psidium guajava* L e enzimas antioxidantes plasmáticas foi realizado por Huang e colaboradores (2011) que avaliaram a ação antioxidante da fração de polifenóis de extrato de goiaba (*Psidium guajava* L.) sobre a diabetes e as enzimas antioxidantes como SOD e CAT (HUANG; YIN; CHIU, 2011). Para isto, utilizaram ratos machos *Sprague–Dawley* diabéticos pela ação de estreptozotocina (STZ) administrada intraperitonealmente. Foi realizado então, a suplementação oral via gavagem orogástrica diária, por quatro semanas, de extrato de goiaba nas doses de (125 e 250 mg/kg) (HUANG; YIN; CHIU, 2011) Ao final do período das quatro semanas, foi observado que houve redução pronunciada dos níveis glicêmicos dos animais. Além disso, houve aumento na concentração de SOD plasmática dos ratos com a maior dose de *Psidium guajava* (250 mg/kg) e não houve alteração com a menor dose que foi a de 125 mg/kg (HUANG; YIN; CHIU, 2011). Houve também reestabelecimento no TBARS após o tratamento com *PsE*, já que os ratos diabéticos tiveram aumento de aproximadamente cinco vezes nos níveis dessa enzima (HUANG; YIN; CHIU, 2011). Foi sugerido pelos autores que esse efeito antioxidante, proporcionado pelas enzimas, pode estar relacionado a presença de ácido ascórbicos e compostos fenólicos característicos da *Psidium guajava* como guavin B e quercetina.

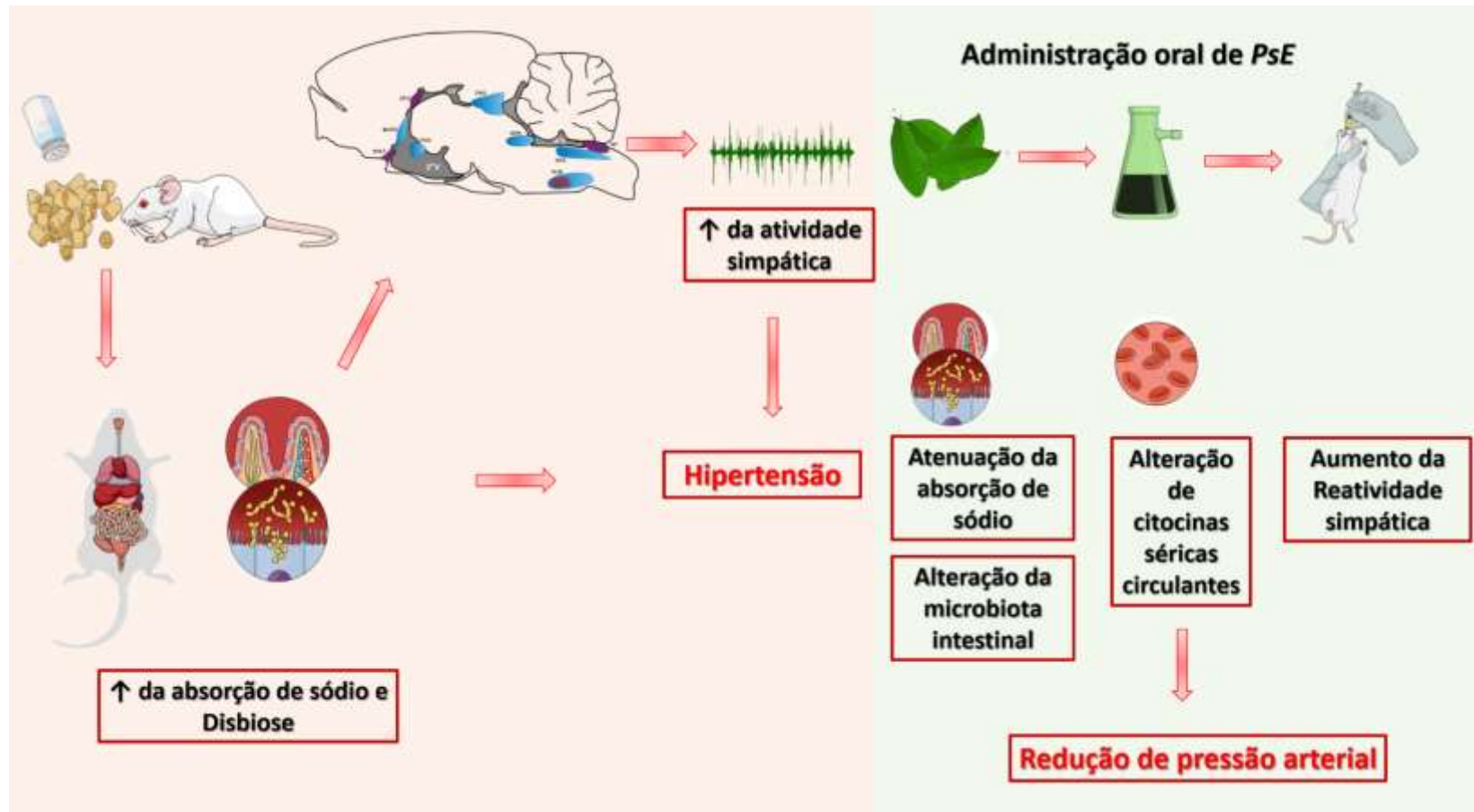
A partir dos resultados obtidos por este trabalho, quanto aos efeitos biológicos, os possíveis mecanismos que envolvem a ação da administração oral de *PsE* podem estar relacionados a inibição da absorção de sódio intestinal nos ratos HS12W, sendo ainda maior inibição da absorção em animais submetidos a administração oral crônica de *PsE*. O extrato de *Psidium guajava* L. está atuando como agente excitatório na atividade simpática dos animais submetidos a administração oral de *PsE*, podendo serem combinados estes mecanismos. Outro fator pode estar contribuindo para alterações pressóricas é a mudança

na composição bacteriana e produção de citocinas inflamatórias, principalmente após a administração oral de *PsE*.

11. Conclusão

Em suma, a partir deste trabalho pode-se concluir que *PsE* está atenuando a resposta simpatoexcitatória e absorção de sódio intestinal em ratos HS12W e parte destes efeitos podem estar associados com a alteração da família *Ruminococaceae* e processo inflamatório.

Figura 30. Esquema simplificado da hipótese proposta para explicar alguns dos mecanismos de cardiovasculares que podem ocasionar à hipertensão sódio-dependente em ratos HS12W e os possíveis mecanismos anti-hipertensivos da *PsE*.



Fonte: Própria autora

Referências

ADAMS, J. M.; MCCARTHY, J. J.; STOCKER, S. D. Excess dietary salt alters angiotensinergic regulation of neurons in the rostral ventrolateral medulla. **Hypertension**, 52, n. 5, p. 932-937, Nov 2008. DOI: doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.108.118935.

AEBI, H. Catalase in vitro. *In: Methods in enzymology*: Elsevier, 1984. v. 105, p. 121-126.

AGARWAL, A.; WILLIAMS, G. H.; FISHER, N. D. Genetics of human hypertension. **Trends in Endocrinology, Metabolism**, 16, n. 3, p. 127-133, 2005.

AGUIAR, S. L. F.; MIRANDA, M. C. G.; GUIMARÃES, M. A. F.; SANTIAGO, H. C. *et al.* High-Salt Diet Induces IL-17-Dependent Gut Inflammation and Exacerbates Colitis in Mice. **Frontiers in immunology**, 8, p. 1969-1969, 2018. DOI: doi.org/10.3389/fimmu.2017.01969.

ALMEIDA, C. E.; KARNIKOWSKI, M. G. O.; FOLETO, R.; BALDISSEROTTO, B. Analysis of antidiarrhoeic effect of plants used in popular medicine. **Revista de Saúde Pública**, 29, n. 6, p. 428-433, 1995. DOI: doi.org/10.1590/s0034-89101995000600002.

AMARAL, A. B.; SILVA, M. V. D.; LANNES, S. C. D. S. Lipid oxidation in meat: mechanisms and protective factors – a review. **Food Science and Technology**, 38, n. suppl 1, p. 1-15, 2018. DOI: doi.org/10.1590/fst.32518.

AVERINA, V. A.; OTHMER, H. G.; FINK, G. D.; OSBORN, J. W. A mathematical model of salt-sensitive hypertension: the neurogenic hypothesis. **The Journal of physiology**, 593, n. 14, p. 3065-3075, 2015. DOI: doi.org/10.1113/jphysiol.2014.278317.

BATISTA, M. A. C.; BRAGA, D. C. D. A.; DE MOURA, S. A. L.; DE SOUZA, G. H. B. *et al.* Salt-dependent hypertension and inflammation: targeting the gut–brain axis and the immune system with Brazilian green propolis. **Inflammopharmacology**, 28, n. 5, p. 1163-1182, 2020. DOI: doi.org/10.1007/s10787-020-00742-2.

BEGUM, S.; HASSAN, S. I.; ALI, S. N.; SIDDIQUI, B. S. Chemical constituents from the leaves of *Psidium guajava*. **Nat Prod Res**, 18, n. 2, p. 135-140, Apr 2004. DOI: doi.org/10.1080/14786410310001608019.

BOURQUE, C. W. Central mechanisms of osmosensation and systemic osmoregulation. **Nat Rev Neurosci**, 9, n. 7, p. 519-531, Jul 2008. DOI: doi.org/10.1038/nrn2400.

BRAGA, D. C. D. A.; GOMES, P. M.; BATISTA, M. A. C.; DE SOUZA, J. A. *et al.* Effects of *Psidium guajava* L. leaves extract on blood pressure control and IL-10

production in salt-dependent hypertensive rats. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, 155, p. 113796, 2022. DOI: doi.org/10.1016/j.biopha.2022.113796.

CAMPAGNOLI, T.; GONZALEZ, L.; CRUZ, F. S. Salt intake and blood pressure in the university of Asuncion-Paraguay youths: a preliminary study. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, 34, n. 4, p. 361-368, 2012. DOI: doi.org/10.5935/0101-2800.20120026.

CAPPUCCIO, F. P. Salt and cardiovascular disease. **BMJ**, 334, n. 7599, p. 859-860, 2007. DOI: doi.org/10.1136/bmj.39175.364954.be.

CARRETERO, O. A.; OPARIL, S. Essential Hypertension. **Circulation**, 101, n. 3, p. 329-335, 2000. DOI: doi.org/10.1161/01.cir.101.3.329.

CHAACHOUAY, N.; BENKHNIGUE, O.; FADLI, M.; EL IBAOUI, H. *et al.* Ethnobotanical and ethnopharmacological studies of medicinal and aromatic plants used in the treatment of metabolic diseases in the Moroccan Rif. **Heliyon**, 5, n. 10, p. e02191, 2019. DOI: doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e02191.

CHEREMISINOFF, N. P. **Industrial solvents handbook, revised and expanded.** CRC press, 2003. 0203911334.

CHIWORORO, W. D.; OJEWOLE, J. A. Biphasic effect of *Psidium guajava* Linn. (Myrtaceae) leaf aqueous extract on rat isolated vascular smooth muscles. **J Smooth Muscle Res**, 44, n. 6, p. 217-229, Dec 2008. DOI: doi.org/10.1540/jsmr.44.217.

CHOI, S.; RYU, K. H.; PARK, S. H.; JUN, J. Y. *et al.* Direct vascular actions of quercetin in aorta from renal hypertensive rats. **Kidney Res Clin Pract**, 35, n. 1, p. 15-21, Mar 2016. DOI: doi.org/10.1016/j.krcp.2015.12.003.

CHRISTOFF, A. P.; SEREIA, A. F. R.; BOBERG, D.; MORAES, R. *et al.* Bacterial identification through accurate library preparation and high-throughput sequencing. **J Neoprosecta Microbiome Technologies**, 25, 2017.

COHEN, G.; HOCHSTEIN, P. Glutathione peroxidase: the primary agent for the elimination of hydrogen peroxide in erythrocytes. **Biochemistry**, 2, n. 6, p. 1420-1428, 1963.

DAHL, L. K.; LEITL, G.; HEINE, M. Influence of dietary potassium and sodium/potassium molar ratios on the development of salt hypertension. **J Exp Med**, 136, n. 2, p. 318-330, Aug 1 1972.

DANTAS NETO, J.; MACIEL, J. L.; ALVES, A. D. S.; AZEVEDO, C. A. V. D. *et al.* Teores de macronutrientes em folhas de goiabeira fertirrigada com nitrogênio. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, 17, n. 9, p. 962-968, 2013. DOI: doi.org/10.1590/s1415-43662013000900008.

DASWANI, P. G.; GHOLKAR, M. S.; BIRDI, T. J. Psidium guajava: A Single Plant for Multiple Health Problems of Rural Indian Population. **Pharmacognosy reviews**, 11, n. 22, p. 167-174, Jul-Dec 2017. DOI: doi.org/10.4103/phrev.phrev_17_17.

DE VASCONCELOS, T. B.; CARDOSO, A. R. N. R.; JOSINO, J. B.; MACENA, R. H. M. *et al.* Radicais livres e antioxidantes: proteção ou perigo? **J Journal of Health Sciences**, 16, n. 3, 2014.

DENG, Z.; WANG, Y.; ZHOU, L.; SHAN, Y. *et al.* High salt-induced activation and expression of inflammatory cytokines in cultured astrocytes. **Cell Cycle**, 16, n. 8, p. 785-794, Apr 18 2017. DOI: doi.org/10.1080/15384101.2017.1301330.

DÍAZ-DE-CERIO, E.; GÓMEZ-CARAVACA, A. M.; VERARDO, V.; FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, A. *et al.* Determination of guava (*Psidium guajava* L.) leaf phenolic compounds using HPLC-DAD-QTOF-MS. **Journal of Functional Foods**, 22, p. 376-388, 2016/04/01/ 2016. DOI: doi.org/10.1016/j.jff.2016.01.040.

DIAZ-DE-CERIO, E.; PASINI, F.; VERARDO, V.; FERNANDEZ-GUTIERREZ, A. *et al.* *Psidium guajava* L. leaves as source of proanthocyanidins: Optimization of the extraction method by RSM and study of the degree of polymerization by NP-HPLC-FLD-ESI-MS. **J Pharm Biomed Anal**, 133, p. 1-7, Jan 30 2017. DOI: doi.org/10.1016/j.jpba.2016.10.011.

DIAZ-DE-CERIO, E.; VERARDO, V.; GOMEZ-CARAVACA, A. M.; FERNANDEZ-GUTIERREZ, A. *et al.* Health Effects of *Psidium guajava* L. Leaves: An Overview of the Last Decade. **Int J Mol Sci**, 18, n. 4, Apr 24 2017. DOI: doi.org/10.3390/ijms18040897.

DJORDJEVIC, A.; SPASIC, S.; JOVANOVIC-GALOVIC, A.; DJORDJEVIC, R. *et al.* Oxidative stress in diabetic pregnancy: SOD, CAT and GSH-Px activity and lipid peroxidation products. **J The Journal of Maternal-Fetal**, 16, n. 6, p. 367-372, 2004.

DORNAS, W. C.; DE LIMA, W. G.; DOS SANTOS, R. C.; DA COSTA GUERRA, J. F. *et al.* High dietary salt decreases antioxidant defenses in the liver of fructose-fed insulin-resistant rats. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, 24, n. 12, p. 2016-2022, 2013. DOI: doi.org/10.1016/j.jnutbio.2013.06.006.

DOROSHOW, J.; DAVIES, K. Redox cycling of anthracyclines by cardiac mitochondria. II. Formation of superoxide anion, hydrogen peroxide, and hydroxyl radical. **J Journal of Biological Chemistry**, 261, n. 7, p. 3068-3074, 1986.

ELFALLEH, W.; HANNACHI, H.; TLILI, N.; YAHIA, Y. *et al.* Total phenolic contents and antioxidant activities of pomegranate peel, seed, leaf and flower. **Researchgate**, p. 4724-4730, 2012. DOI: doi.org/10.5897/JMPR11.995.

ERSHOVA, O.; BAIROVA, T.; KOLESNIKOV, S.; KALYUZHNYAYA, O. *et al.* Oxidative stress and catalase gene. **J Bulletin of experimental biology medicine (Baltimore)**, 161, n. 3, p. 400-403, 2016.

FARACO, G.; BREA, D.; GARCIA-BONILLA, L.; WANG, G. *et al.* Dietary salt promotes neurovascular and cognitive dysfunction through a gut-initiated TH17 response. **Nat Neurosci**, 21, n. 2, p. 240-249, Feb 2018. DOI: doi.org/10.1038/s41593-017-0059-z.

FARAWAY, J. J. **Practical regression and ANOVA using R**. University of Bath Bath, 2002.

FORDTRAN, J. S.; RECTOR, F. C.; CARTER, N. W. The mechanisms of sodium absorption in the human small intestine. **Journal of Clinical Investigation**, 47, n. 4, p. 884-900, 1968. DOI: doi.org/10.1172/jci105781.

GILES, T. D.; MATERSON, B. J.; COHN, J. N.; KOSTIS, J. B. Definition and Classification of Hypertension: An Update. **The Journal of Clinical Hypertension**, 11, n. 11, p. 611-614, 2009. DOI: doi.org/10.1111/j.1751-7176.2009.00179.x.

GILLIS, E. E.; MUSALL, J. B.; BABAN, B.; SULLIVAN, J. C. IL-10 treatment decreases blood pressure in male, but not female, spontaneously hypertensive rats. **J American Journal of Physiology-Renal Physiology**, 319, n. 3, p. F359-F365, 2020.

GOMES, P. M.; SA, R. W. M.; AGUIAR, G. L.; PAES, M. H. S. *et al.* Chronic high-sodium diet intake after weaning lead to neurogenic hypertension in adult Wistar rats. **Sci Rep**, 7, n. 1, p. 1-14, Jul 18 2017. DOI: doi.org/10.1038/s41598-017-05984-9.

GUTIÉRREZ, R. M. P.; MITCHELL, S.; SOLIS, R. V. Psidium guajava: A review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology. **Journal of Ethnopharmacology**, 117, n. 1, p. 1-27, 2008. DOI: doi.org/10.1016/j.jep.2008.01.025.

GUYENET, P.; STORNETTA, R.; SOUZA, G.; ABBOTT, S. *et al.* Neuronal Networks in Hypertension: Recent Advances. **Hypertension**, 06/29 2020. DOI: doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.120.14521.

GUYENET, P. G. The sympathetic control of blood pressure. **Nat.Rev.Neurosci.**, 7, n. 5, p. 335-346, 2006.

GUYTON, A. C. Dominant role of the kidneys and accessory role of whole-body autoregulation in the pathogenesis of hypertension. **Am J Hypertens**, 2, n. 7, p. 575-585, Jul 1989. DOI: doi.org/10.1093/ajh/2.7.575.

GUYTON, A. C.; COLEMAN, T. G.; COWLEY, A. V., Jr.; SCHEEL, K. W. *et al.* Arterial pressure regulation. Overriding dominance of the kidneys in long-term regulation and in hypertension. **Am J Med**, 52, n. 5, p. 584-594, May 1972. DOI: doi.org/10.1016/0002-9343(72)90050-2.

GUZIK, T. J.; HOCH, N. E.; BROWN, K. A.; MCCANN, L. A. *et al.* Role of the T cell in the genesis of angiotensin II-induced hypertension and vascular dysfunction. **The Journal of Experimental Medicine**, 204, n. 10, p. 2449-2460, 2007. 10.1084/jem.20070657.

HALLIWELL, B. Superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase: solutions to the problems of living with oxygen. **New Phytologist**, 73, n. 6, p. 1075-1086, 1974. DOI: doi.org/10.1111/j.1469-8137.1974.tb02137.x.

HILBE, J. M. Poisson Regression. *In: Modeling Count Data*. Cambridge: Cambridge University Press, 2014. p. 35-73.

HUANG, B. S.; VAN VLIET, B. N.; LEENEN, F. H. Increases in CSF [Na⁺] precede the increases in blood pressure in Dahl S rats and SHR on a high-salt diet. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, 287, n. 3, p. 1160-1166, Sep 2004. DOI: doi.org/10.1152/ajpheart.00126.2004.

HUANG, C. S.; YIN, M. C.; CHIU, L. C. Antihyperglycemic and antioxidative potential of Psidium guajava fruit in streptozotocin-induced diabetic rats. **Food Chem Toxicol**, 49, n. 9, p. 2189-2195, Sep 2011. DOI: doi.org/10.1016/j.fct.2011.05.032.

HUBER, P. C.; ALMEIDA, W. P.; FÁTIMA, Â. d. Glutathione e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. **J Química Nova**, 31, p. 1170-1179, 2008.

HUDZ, N.; MAKOWICZ, E.; SHANAIDA, M.; BIAŁOŃ, M. *et al.* Phytochemical Evaluation of Tinctures and Essential Oil Obtained from *Satureja montana* Herb. **Molecules**, 25, n. 20, p. 4763, 2020. DOI: doi.org/10.3390/molecules25204763.

JAIARJ, P.; KHOOHASWAN, P.; WONGKRAJANG, Y.; PEUNGVICHA, P. *et al.* Anticough and antimicrobial activities of *Psidium guajava* Linn. leaf extract. **J Ethnopharmacol**, 67, n. 2, p. 203-212, Nov 1 1999. DOI: doi.org/10.1016/s0378-8741(99)00022-7.

JAIARJ, P.; KHOOHASWAN, P.; WONGKRAJANG, Y.; PEUNGVICHA, P. *et al.* Anticough and antimicrobial activities of *Psidium guajava* Linn. leaf extract. **Journal of Ethnopharmacology**, 67, n. 2, p. 203-212, 1999. 10.1016/s0378-8741(99)00022-7.

JIN, L.; PIAO, Z. H.; SUN, S.; LIU, B. *et al.* Gallic Acid Reduces Blood Pressure and Attenuates Oxidative Stress and Cardiac Hypertrophy in Spontaneously Hypertensive Rats. **Sci Rep**, 7, n. 1, p. 1-14, Nov 15 2017. DOI: doi.org/10.1038/s41598-017-15925-1.

KARPPANEN, H.; MERVAALA, E. Sodium intake and hypertension. **Prog Cardiovasc Dis**, 49, n. 2, p. 59-75, Sep-Oct 2006. DOI: doi.org/10.1016/j.pcad.2006.07.001.

KATEEL, R.; RAI, M. S.; KUMAR, A. Evaluation of diuretic activity of gallic acid in normal rats. **J JSIR J**, 3, n. 2, p. 217-220, 2014.

KHEDR, S. I.; MOKHAMER, E. H. M.; HASSAN, A. A. A.; EL-FEKI, A. S. *et al.* Psidium guajava Linn leaf ethanolic extract: In vivo giardicidal potential with ultrastructural damage, anti-inflammatory and antioxidant effects. **Saudi Journal of Biological Sciences**, 28, n. 1, p. 427-439, 2021. DOI: doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.10.026.

KIDD, P. M. J. A. M. R. Glutathione: systemic protectant against oxidative and free radical damage. **J Altern Med Rev**, 2, n. 3, p. 155-176, 1997.

KING, A. J.; OSBORN, J. W.; FINK, G. D. Splanchnic circulation is a critical neural target in angiotensin II salt hypertension in rats. **Hypertension**, 50, n. 3, p. 547-556, Sep 2007. DOI: doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.107.090696.

KINSMAN, B. J.; SIMMONDS, S. S.; BROWNING, K. N.; STOCKER, S. D. Organum Vasculosum of the Lamina Terminalis Detects NaCl to Elevate Sympathetic Nerve Activity and Blood Pressure. **Hypertension**, 69, n. 1, p. 163-170, Jan 2017. DOI: doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.116.08372.

KIRKENDALL, W. M.; CONNOR, W. E.; ABOUD, F.; RASTOGI, S. *et al.* The effect of dietary sodium chloride on blood pressure, body fluids, electrolytes, renal

function, and serum lipids of normotensive man. **The Journal of laboratory clinical medicine**, 87, n. 3, p. 418-434, 1976.

KUMAR, A.; KUMARCHANDRA, R.; RAI, R.; KUMBLEKAR, V. Radiation mitigating activities of *Psidium guajava* L. against whole-body X-ray-induced damages in albino Wistar rat model. **3 Biotech**, 10, n. 12, p. 507, Dec 2020. DOI: doi.org/10.1007/s13205-020-02484-y.

LECHEVALLIER, M.; SEIDLER, R.; EVANS, T. Enumeration and characterization of standard plate count bacteria in chlorinated and raw water supplies. **Applied Environmental Microbiology**, 40, n. 5, p. 922-930, 1980.

LIANG, Q.; QIAN, H.; YAO, W. Identification of flavonoids and their glycosides by high-performance liquid chromatography with electrospray ionization mass spectrometry and with diode array ultraviolet detection. **Eur J Mass Spectrom (Chichester)**, 11, n. 1, p. 93-101, 2005. DOI: doi.org/10.1255/ejms.710.

LIMA, V. V.; ZEMSE, S. M.; CHIAO, C.-W.; BOMFIM, G. F. *et al.* Interleukin-10 limits increased blood pressure and vascular RhoA/Rho-kinase signaling in angiotensin II-infused mice. **Life Sciences**, 145, p. 137-143, 2016/01/15/ 2016. DOI: doi.org/10.1016/j.lfs.2015.12.009.

MAILOA, M. N.; MAHENDRADATTA, M.; LAGA, A.; DJIDE, N. J. I. J. o. S. *et al.* Antimicrobial activities of tannins extract from guava leaves (*Psidium guajava* L.) on pathogens microbial. **J International Journal of Scientific**, 3, n. 1, p. 236-241, 2014.

MAKKAR, H. P. S.; BECKER, K. Vanillin-HCl method for condensed tannins: Effect of organic solvents used for extraction of tannins. **Journal of Chemical Ecology**, 19, n. 4, p. 613-621, 1993. DOI: doi.org/10.1007/bf00984996.

MALACHIAS, M.; SOUZA, W.; PLAVNIK, F.; RODRIGUES, C. *et al.* Capítulo 1 - Conceituação, Epidemiologia e Prevenção Primária. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, 107, n. 3, 2016. DOI: doi.org/10.5935/abc.20160151.

MANSOR, H.; MAHMOOD, M. J. J. o. M. P. R. Non enzymatic and enzymatic antioxidant activities in aqueous extract of different *Ficus deltoidea* accessions. **J Journal of Medicinal Plants Research**, 3, n. 3, p. 120-131, 2009.

MEHTA, V. V.; RAJESH, G.; RAO, A.; SHENOY, R. *et al.* Antimicrobial Efficacy of *Punica granatum* mesocarp, *Nelumbo nucifera* Leaf, *Psidium guajava* Leaf and *Coffea Canephora* Extract on Common Oral Pathogens: An In-vitro Study. **J Clin Diagn Res**, 8, n. 7, p. ZC65-68, Jul 2014. DOI: doi.org/10.7860/JCDR/2014/9122.4629.

MIRANDA-VILELA, A. L.; RESCK, I. S.; GRISOLIA, C. K. Antigenotoxic activity and antioxidant properties of organic and aqueous extracts of pequi fruit (*Caryocar*

brasiliense Camb.) pulp. **Genetics and Molecular Biology**, 31, n. 4, p. 956-963, 2008.
DOI: doi.org/10.1590/s1415-47572008000500025.

MIRANDA, P. M.; DE PALMA, G.; SERKIS, V.; LU, J. *et al.* High salt diet exacerbates colitis in mice by decreasing Lactobacillus levels and butyrate production. **Microbiome**, 6, n. 1, 2018. DOI: doi.org/10.1186/s40168-018-0433-4.

MITTAL, P.; GUPTA, V.; KAUR, G.; GARG, A. K. *et al.* Phytochemistry and pharmacological activities of psidium guajava. **J IJPSR**, 1, n. 9, p. 9-19, 2010.

MONTEIRO, M. M. O.; FRANÇA-SILVA, M. S.; ALVES, N. F. B.; PORPINO, S. K. P. *et al.* Quercetin improves baroreflex sensitivity in spontaneously hypertensive rats. **Molecules (Basel, Switzerland)**, 17, n. 11, p. 12997-13008, 2012. DOI: doi.org/10.3390/molecules171112997.

NAUMANN, H. D.; TEDESCHI, L. O.; ZELLER, W. E.; HUNTLEY, N. F. The role of condensed tannins in ruminant animal production: advances, limitations and future directions. **Revista Brasileira de Zootecnia**, 46, n. 12, p. 929-949, 2017. DOI: doi.org/10.1590/s1806-92902017001200009.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. **Journal of Natural Products**, 79, n. 3, p. 629-661, 2016. DOI: doi.org/10.1021/acs.jnatprod.5b01055.

NODA, M.; HIYAMA, T. Y. Sodium sensing in the brain. **Pflugers Arch**, 467, n. 3, p. 465-474, Mar 2015. DOI: doi.org/10.1007/s00424-014-1662-4.

NTOUMBA, A. A.; MEVA, F. E. A.; EKOKO, W. E.; FOKO, L. P. K. *et al.* Biogenic Synthesis of Silver Nanoparticles Using Guava (*Psidium guajava*) Leaf Extract and Its Larvicidal Action against *Anopheles gambiae*</i>. **Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology**, 11, n. 01, p. 49-66, 2020. DOI: doi.org/10.4236/jbnb.2020.111004.

OJEWOLE, J. A. Hypoglycemic and hypotensive effects of *Psidium guajava* Linn. (Myrtaceae) leaf aqueous extract. **Methods Find Exp Clin Pharmacol**, 27, n. 10, p. 689-695, Dec 2005. DOI: doi.org/10.1358/mf.2005.27.10.948917.

OJEWOLE, J. A. Antiinflammatory and analgesic effects of *Psidium guajava* Linn. (Myrtaceae) leaf aqueous extract in rats and mice. **Methods Find Exp Clin Pharmacol**, 28, n. 7, p. 441-446, Sep 2006. DOI: doi.org/10.1358/mf.2006.28.7.1003578.

OJEWOLE, J. A.; AWE, E. O.; CHIWORORO, W. D. Antidiarrhoeal activity of *Psidium guajava* Linn. (Myrtaceae) leaf aqueous extract in rodents. **J Smooth Muscle Res**, 44, n. 6, p. 195-207, Dec 2008. DOI: doi.org/10.1540/jsmr.44.195.

OSBORN, J. L. Relation between sodium intake, renal function, and the regulation of arterial pressure. **Hypertension**, 17, n. 1 Suppl, p. I91-96, Jan 1991. DOI: doi.org/10.1161/01.hyp.17.1_suppl.i91.

OSBORN, J. W.; FINK, G. D.; KUROKI, M. T. Neural mechanisms of angiotensin II-salt hypertension: implications for therapies targeting neural control of the splanchnic circulation. **Curr Hypertens Rep**, 13, n. 3, p. 221-228, Jun 2011. DOI: doi.org/10.1007/s11906-011-0188-9.

ŌYANAGUI, Y. Reevaluation of assay methods and establishment of kit for superoxide dismutase activity. **Analytical Biochemistry**, 142, n. 2, p. 290-296, 1984/11/01/ 1984. DOI: doi.org/10.1016/0003-2697(84)90467-6.

PACHA, J. Sodium balance and jejunal ion and water absorption in Dahl salt-sensitive and salt-resistant rats. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, 25, n. 3-4, p. 220-224, Mar-Apr 1998. DOI: doi.org/10.1111/j.1440-1681.1998.t01-9-.x.

PAOURI, E.; TZARA, O.; KARTALOU, G.-I.; ZENELAK, S. *et al.* Peripheral tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) modulates amyloid pathology by regulating blood-derived immune cells and glial response in the brain of AD/TNF transgenic mice. **J Journal of Neuroscience**, 37, n. 20, p. 5155-5171, 2017.

PARK, C.; FRASER, A.; HOWE, L. D.; JONES, S. *et al.* Elevated Blood Pressure in Adolescence Is Attributable to a Combination of Elevated Cardiac Output and Total

Peripheral Resistance. **Hypertension**, 72, n. 5, p. 1103-1108, 2018. DOI: doi.org/10.1161/hypertensionaha.118.11925.

PIKE, L. S.; SMIFT, A. L.; CROTEAU, N. J.; FERRICK, D. A. *et al.* Inhibition of fatty acid oxidation by etomoxir impairs NADPH production and increases reactive oxygen species resulting in ATP depletion and cell death in human glioblastoma cells. **J Biochimica et Biophysica Acta -Bioenergetics**, 1807, n. 6, p. 726-734, 2011.

PISOSCHI, A. M.; POP, A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. **European Journal of Medicinal Chemistry**, 97, p. 55-74, 2015/06/05/ 2015. DOI: doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.04.040.

PONTIKIS, C. A. Psidium guajava L. (Guava). *In: Biotechnology in Agriculture and Forestry*: Springer Berlin Heidelberg, 1996. p. 308-320.

POPOVA, A.; MIHAYLOVA, D. Antinutrients in Plant-based Foods: A Review. **The Open Biotechnology Journal**, 13, n. 1, p. 68-76, 2019. DOI: doi.org/10.2174/1874070701913010068.

QI, J.; ZHAO, X. F.; YU, X. J.; YI, Q. Y. *et al.* Targeting Interleukin-1 beta to Suppress Sympathoexcitation in Hypothalamic Paraventricular Nucleus in Dahl Salt-Sensitive Hypertensive Rats. **Cardiovasc Toxicol**, 16, n. 3, p. 298-306, Jul 2016. DOI: doi.org/10.1007/s12012-015-9338-7.

REID, G.; BURTON, J. Use of *Lactobacillus* to prevent infection by pathogenic bacteria. **Microbes and Infection**, 4, n. 3, p. 319-324, 2002. DOI: doi.org/10.1016/s1286-4579(02)01544-7.

RODRIGUES, S. L.; SOUZA JUNIOR, P. R.; PIMENTEL, E. B.; BALDO, M. P. *et al.* Relationship between salt consumption measured by 24-h urine collection and blood pressure in the adult population of Vitoria (Brazil). **Braz J Med Biol Res**, 48, n. 8, p. 728-735, Aug 2015. DOI: doi.org/10.1590/1414-431X20154455.

RUCKER, A. J.; RUDEMILLER, N. P.; CROWLEY, S. D. Salt, Hypertension, and Immunity. **Annual review of physiology**, 80, p. 283-307, 2018. 10.1146/annurev-physiol-021317-121134.

SAHA, S. K.; LEE, S. B.; WON, J.; CHOI, H. Y. *et al.* Correlation between oxidative stress, nutrition, and cancer initiation. **J International journal of molecular sciences**, 18, n. 7, p. 1544, 2017.

SANCHES, N. R.; GARCIA CORTEZ, D. A.; SCHIAVINI, M. S.; NAKAMURA, C. V. *et al.* An evaluation of antibacterial activities of *Psidium guajava* (L.). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, 48, n. 3, p. 429-436, 2005. DOI: doi.org/10.1590/s1516-89132005000300014.

SANTISTEBAN, M. M.; QI, Y.; ZUBCEVIC, J.; KIM, S. *et al.* Hypertension-Linked Pathophysiological Alterations in the Gut. **Circulation Research**, 120, n. 2, p. 312-323, 2017. DOI: doi.org/10.1161/circresaha.116.309006.

SAUNDERS, J.; BEEVERS, D.; PATON, A. Alcohol-induced hypertension. **The Lancet**, 318, n. 8248, p. 653-656, 1981.

SCHMIEDER, R. E.; MESSERLI, F. H.; GARAVAGLIA, G. E.; NUNEZ, B. D. Dietary salt intake. A determinant of cardiac involvement in essential hypertension. **Circulation**, 78, n. 4, p. 951-956, 1988. DOI: doi.org/10.1161/01.cir.78.4.951.

SCHOONEN, M. A.; HARRINGTON, A. D.; LAFFERS, R.; STRONGIN, D. R. J. G. e. C. A. Role of hydrogen peroxide and hydroxyl radical in pyrite oxidation by molecular oxygen. **J Geochimica et Cosmochimica Acta**, 74, n. 17, p. 4971-4987, 2010.

SHI, Z.; GAN, X. B.; FAN, Z. D.; ZHANG, F. *et al.* Inflammatory cytokines in paraventricular nucleus modulate sympathetic activity and cardiac sympathetic afferent reflex in rats. **Acta Physiol (Oxf)**, 203, n. 2, p. 289-297, Oct 2011. DOI: doi.org/10.1111/j.1748-1716.2011.02313.x.

SHRIVASTAVA, A.; GUPTA, V. B. J. C. Y. S. Methods for the determination of limit of detection and limit of quantitation of the analytical methods. 2, n. 1, p. 21-25, 2011.

SILVEIRA-NUNES, G.; DURSO, D. F.; JR, L.; CUNHA, E. H. M. *et al.* Hypertension Is Associated With Intestinal Microbiota Dysbiosis and Inflammation in a Brazilian Population. **Front Pharmacol**, 11, p. 258, 2020. 10.3389/fphar.2020.00258.

SIMAO, A. A.; MARQUES, T. R.; MARCUSSI, S.; CORREA, A. D. Aqueous extract of *Psidium guajava* leaves: phenolic compounds and inhibitory potential on digestive enzymes. **An Acad Bras Cienc**, 89, n. 3 Suppl, p. 2155-2165, 2017. DOI: doi.org/10.1590/0001-3765201720160067.

SIMPLICIO, J. A.; RESSTEL, L. B.; TIRAPELLI, D. P. C.; D'ORLÉANS-JUSTE, P. *et al.* Contribution of oxidative stress and prostanoids in endothelial dysfunction induced by chronic fluoxetine treatment. **Vascular Pharmacology**, 73, p. 124-137, 2015/10/01/ 2015. DOI: doi.org/10.1016/j.vph.2015.06.015

SINGH, P.; STEPHENSON, R.; CASTILLO, A.; MAJID, D. S. A. High-salt intake reduces renal tissue levels of inflammatory cytokines in mice. **Physiological Reports**, 8, n. 24, 2021. DOI: doi.org/10.14814/phy2.14621.

STEEMERS, F. J.; GUNDERSON¹, Kevin L. Illumina, Inc. 2005.

STERN, J. E. Neuroendocrine-Autonomic Integration in the Paraventricular Nucleus: Novel Roles for Dendritically Released Neuropeptides. **Journal of Neuroendocrinology**, 27, n. 6, p. 487-497, 2015. DOI: doi.org/10.1111/jne.12252.

STOCKER, S. D.; CUNNINGHAM, J. T.; TONEY, G. M. Water deprivation increases Fos immunoreactivity in PVN autonomic neurons with projections to the spinal cord and rostral ventrolateral medulla. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, 287, n. 5, p. R1172-R1183, 2004. DOI: doi.org/10.1152/ajpregu.00394.2004.

STOCKER, S. D.; HUNWICK, K. J.; TONEY, G. M. Hypothalamic paraventricular nucleus differentially supports lumbar and renal sympathetic outflow in water-deprived rats. **J Physiol**, 563, n. Pt 1, p. 249-263, Feb 15 2005. DOI: doi.org/10.1113/jphysiol.2004.076661.

STOCKER, S. D.; LANG, S. M.; SIMMONDS, S. S.; WENNER, M. M. *et al.* Cerebrospinal Fluid Hypernatremia Elevates Sympathetic Nerve Activity and Blood Pressure via the Rostral Ventrolateral Medulla. **Hypertension**, 66, n. 6, p. 1184-1190, Dec 2015. DOI: doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.115.05936.

STOCKER, S. D.; MADDEN, C. J.; SVED, A. F. Excess dietary salt intake alters the excitability of central sympathetic networks. **Physiol Behav**, 100, n. 5, p. 519-524, Jul 14 2010. DOI: doi.org/10.1016/j.physbeh.2010.04.024.

STOCKER, S. D.; OSBORN, J. L.; CARMICHAEL, S. P. Forebrain osmotic regulation of the sympathetic nervous system. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, 35, n. 5-6, p. 695-700, May 2008. DOI: doi.org/10.1111/j.1440-1681.2007.04835.x.

TENDE, J. A.; EZE, E. D.; TENDE, Y. A.; ONAADEPO, O. *et al.*, 2013, **Anti-ulcerogenic Activity of Guava (*Psidium guajava*) Leaves Extract in Rats.**

TONEY, G. M.; CHEN, Q. H.; CATO, M. J.; STOCKER, S. D. Central osmotic regulation of sympathetic nerve activity. **Acta Physiologica Scandinavica**, 177, n. 1, p. 43-55, 2003. 10.1046/j.1365-201X.2003.01046.x.

VALCÁRCEL, Y.; ALONSO, S. G.; RODRÍGUEZ-GIL, J.; CASTAÑO, A. *et al.* Seasonal variation of pharmaceutically active compounds in surface (Tagus River) and tap water (Central Spain). **J Environmental Science**, 20, n. 3, p. 1396-1412, 2013.

VIERA, A. J.; NEUTZE, D. Diagnosis of secondary hypertension: an age-based approach. **J American family physician**, 82, n. 12, p. 1471-1478, 2010.

VIJAYAKUMAR, K.; MANIKANDAN, R. In vitro antioxidant activity of ethanolic extract of *Psidium guajava* leaves. **International Journal of Research Studies in Biosciences (IJRSB)**, 2015.

VREMAN, H. J.; WONG, R. J.; SANESI, C. A.; DENNERY, P. A. *et al.* Simultaneous production of carbon monoxide and thiobarbituric acid reactive substances in rat tissue preparations by an iron-ascorbate system. **J Canadian journal of physiology**, 76, n. 12, p. 1057-1065, 1998.

WANG, H.; LI, S.; FANG, S.; YANG, X. *et al.* Betaine Improves Intestinal Functions by Enhancing Digestive Enzymes, Ameliorating Intestinal Morphology, and Enriching Intestinal Microbiota in High-salt stressed Rats. **Nutrients**, 10, n. 7, p. 907, 2018. DOI: doi.org/10.3390/nu10070907.

WANG, L.; WU, Y.; BEI, Q.; SHI, K. *et al.* Fingerprint profiles of flavonoid compounds from different *Psidium guajava* leaves and their antioxidant activities. **J Journal of separation science**, 40, n. 19, p. 3817-3829, 2017.

WANG, L.; WU, Y.; BEI, Q.; SHI, K. *et al.* Fingerprint profiles of flavonoid compounds from different *Psidium guajava* leaves and their antioxidant activities. **J Sep Sci**, 40, n. 19, p. 3817-3829, Oct 2017. DOI: doi.org/10.1002/jssc.201700477.

WANG, L.; WU, Y.; XIE, J.; WU, S. *et al.* Characterization, antioxidant and antimicrobial activities of green synthesized silver nanoparticles from *Psidium guajava* L. leaf aqueous extracts. **Mater Sci Eng C Mater Biol Appl**, 86, p. 1-8, May 1 2018. DOI: doi.org/10.1016/j.msec.2018.01.003.

WEINBERGER, M. H. Salt sensitivity of blood pressure in humans. **Hypertension**, 27, n. 3 Pt 2, p. 481-490, Mar 1996a.

WEINBERGER, M. H. Salt sensitivity: does it play an important role in the pathogenesis and treatment of hypertension? **Curr Opin Nephrol Hypertens**, 5, n. 3, p. 205-208, May 1996b.

WHO. Geneva: (Technical Report Series, 628). 2012.

WHO. Guideline: Sodium intake for adults and children. Geneva: World Health Organization (WHO) 2016.

WILCK, N.; BALOGH, A.; MARKO, L.; BARTOLOMAEUS, H. *et al.* The role of sodium in modulating immune cell function. **Nat Rev Nephrol**, 15, n. 9, p. 546-558, Sep 2019. 10.1038/s41581-019-0167-y.

WILCK, N.; MATUS, M. G.; KEARNEY, S. M.; OLESEN, S. W. *et al.* Salt-responsive gut commensal modulates TH17 axis and disease. **Nature**, 551, n. 7682, p. 585-589, Nov 30 2017. DOI: doi.org/10.1038/nature24628.

YANG, T.; SANTISTEBAN, M. M.; RODRIGUEZ, V.; LI, E. *et al.* Gut Dysbiosis Is Linked to Hypertension. **Hypertension**, 65, n. 6, p. 1331-1340, 2015. DOI: doi.org/10.1161/hypertensionaha.115.05315.

YOSHIMOTO, M.; ONISHI, Y.; MINEYAMA, N.; IKEGAME, S. *et al.* Renal and Lumbar Sympathetic Nerve Activity During Development of Hypertension in Dahl Salt-Sensitive Rats. **Hypertension**, 74, n. 4, p. 888-895, 2019. DOI: doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.119.12866.

ZHOU, X.; SCHMIDTKE, P.; ZEPP, F.; MEYER, C. U. *et al.* Boosting interleukin-10 production: therapeutic effects and mechanisms. **J Current Drug Targets-Immune, Endocrine**, 5, n. 4, p. 465-475, 2005.

ZIETEMANN, C.; ROBERTO, S. R. Produção de mudas de goiabeira (*Psidium guajava* L.) em diferentes substratos. **Revista Brasileira de Fruticultura**, 29, n. 1, p. 137-142, 2007. DOI: doi.org/10.1590/s0100-29452007000100030.

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Efeito do tratamento com suspensão aquosa de extrato de *Psidium guajava* (goiabeira) na absorção de sódio pelo intestino delgado em ratos HS12W.", protocolada sob o CEUA nº 1420100719 (ID 000221), sob a responsabilidade de **Leonardo Máximo Cardoso e equipe; Daiane Cristina de Assis Braga; Lisandra Brandino de Oliveira; Andréia Carvalho Alzamora; Vagner Roberto Antunes** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Ouro Preto (CEUA/UFOP) na reunião de 12/07/2019.

We certify that the proposal "Effect of treatment with aqueous suspension of *Psidium guajava* extract (guava) on sodium absorption by the small intestine in HS12W rats.", utilizing 120 Heterogenics rats (males and females), protocol number CEUA 1420100719 (ID 000221), under the responsibility of **Leonardo Máximo Cardoso and team; Daiane Cristina de Assis Braga; Lisandra Brandino de Oliveira; Andréia Carvalho Alzamora; Vagner Roberto Antunes** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Ouro Preto Federal University (CEUA/UFOP) in the meeting of 07/12/2019.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa \(Acadêmica\)](#)

Vigência da Proposta: de [09/2019](#) a [09/2021](#) Área: [Ciências Biológicas](#)

Origem: [Centro de Ciência Animal](#)

Espécie: [Ratos heterogênicos](#)

sexo: [Machos e Fêmeas](#)

idade: [85 a 95 dias](#)

N: [120](#)

Linhagem: [Wistar](#)

Peso: [300 a 400 g](#)

Local do experimento: Laboratório de Fisiologia Endócrina e Cardiovascular ICEB II, sala 46. Laboratório de Hipertensão do ICEB.

Ouro Preto, 12 de julho de 2019



Profa. Dra. Paula Melo de Abreu Vieira
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Ouro Preto



Prof. Dr. Leonardo Máximo Cardoso
Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Ouro Preto



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "AVALIAÇÃO DOS MECANISMOS PELOS QUAIS O EXTRATO DE FOLHA DE GOIABEIRA (*Psidium guajava* L.) PRODUZ SEUS EFEITOS ANTI-HIPERTENSIVOS EM RATOS SOB DIETA COM SOBRECARGA DE SAL A PARTIR DO DESMAME", protocolada sob o CEUA nº 8880090719 (ID 000245), sob a responsabilidade de **Leonardo Máximo Cardoso e equipe; Daiane Cristina de Assis Braga; Andréia Carvalho Alzamora; Jaqueline Aparecida de Souza; Flávio Eduardo Dias Araújo Freitas; Vagner Roberto Antunes** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Ouro Preto (CEUA/UFOP) na reunião de 20/09/2019.

We certify that the proposal "EVALUATION OF THE MECHANISMS BY WHICH THE GUAVA (*Psidium guajava*) LEAF EXTRACT PRODUCES ITS ANTI-HYPERTENSIVE EFFECTS IN RATS FED HIGH SODIUM DIET FROM WEANING. ", utilizing 1426 Heterogenic rats (1426 males), protocol number CEUA 8880090719 (ID 000245), under the responsibility of **Leonardo Máximo Cardoso and team; Daiane Cristina de Assis Braga; Andréia Carvalho Alzamora; Jaqueline Aparecida de Souza; Flávio Eduardo Dias Araújo Freitas; Vagner Roberto Antunes** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Ouro Preto Federal University (CEUA/UFOP) in the meeting of 09/20/2019.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa \(Acadêmica\)](#)

Vigência da Proposta: de [09/2019](#) a [09/2024](#)

Área: [Ciências Biológicas](#)

Origem: [Centro de Ciência Animal](#)

Espécie: [Ratos heterogênicos](#)

sexo: [Machos](#)

idade: [85 a 95 dias](#)

N: [1426](#)

Linhagem: [Wistar](#)

Peso: [300 a 400 g](#)

Local do experimento: Laboratório de Fisiologia Endócrina e Cardiovascular ICEB II, sala 46

Ouro Preto, 20 de setembro de 2019

Prof. Dra. Paula Melo de Abreu Vieira
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Ouro Preto

Prof. Dr. Leonardo Máximo Cardoso
Vice-Coodenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Ouro Preto

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Influência da microbiota intestinal nos efeitos anti-hipertensivos do extrato de folhas de *Psidium guajava* L. (goiabeira)", protocolada sob o CEUA nº 5900220322 (ID 000013), sob a responsabilidade de **Leonardo Máximo Cardoso e equipe; Daiane Cristina de Assis Braga; Emanuelle Rodrigues Nolasco** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Ouro Preto (CEUA/UFOP) na reunião de 09/09/2022.

We certify that the proposal "Influence of intestinal microbiota on antihypertensive effects of *Psidium guajava* L. (guava) leaf extract", utilizing 189 Heterogenics rats (189 males), protocol number CEUA 5900220322 (ID 000013), under the responsibility of **Leonardo Máximo Cardoso and team; Daiane Cristina de Assis Braga; Emanuelle Rodrigues Nolasco** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Ouro Preto Federal University (CEUA/UFOP) in the meeting of 09/09/2022.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa \(Acadêmica\) e Treinamento](#)

Vigência da Proposta: de [06/2022](#) a [06/2026](#) Área: [Ciências Biológicas](#)

Origem: [Centro de Ciência Animal](#)

Espécie: [Ratos heterogênicos](#)

sexo: [Machos](#)

idade: [21 a 21 dias](#)

N: [189](#)

Linhagem: [Wistar](#)

Peso: [50 a 54 g](#)

Local do experimento: Os animais serão mantidos no CCA por 16 semanas. Ao final desse período, os animais serão transferidos para o biotério setorial do LFEC e mantidos lá por mais 16 dias.

Ouro Preto, 01 de novembro de 2022



Prof. Dr. Leonardo Máximo Cardoso
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Ouro Preto



Prof. Dr. Emerson Cruz de Oliveira
Vice-Coodenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Ouro Preto



Ministério do Meio Ambiente
CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

Comprovante de Cadastro de Acesso
Cadastro nº AEB4F09

A atividade de acesso ao Patrimônio Genético, nos termos abaixo resumida, foi cadastrada no SisGen, em atendimento ao previsto na Lei nº 13.123/2015 e seus regulamentos.

Número do cadastro: AEB4F09
Usuário: UFOP
CPF/CNPJ: 23.070.659/0001-10
Objeto do Acesso: Patrimônio Genético
Finalidade do Acesso: Pesquisa

Espécie

Psidium guajava

Título da Atividade: Avaliação dos mecanismos pelos quais o extrato de folha de goiabeira (*Psidium guajava* L.) produz seus efeitos anti-hipertensivos em ratos sob dieta com sobrecarga de sal a partir do desmame

Equipe

Leonardo Máximo Cardoso	UFOP
Daiane Cristina de Assis Braga	UFOP
Marina Gonçalves Caetano de Andrade	UFOP

Data do Cadastro: 26/05/2020 16:35:12
Situação do Cadastro: Concluído

Conselho de Gestão do Patrimônio Genético
Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em 14:27 de 27/10/2020.



SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO
DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL
ASSOCIADO - SISGEN

Produção científica vinculada a tese

Artigo científico

BRAGA, DAIANE CRISTINA DE ASSIS; GOMES, PAULA MAGALHÃES; BATISTA, MARCOS ADRIANO CARLOS ; DE SOUZA, JAQUELINE APARECIDA ; BASTOS, JULIANA CRISTINA SANTOS ALMEIDA ; RODRIGUES-DAS-DÔRES, ROSANA GONÇALVES ; ALZAMORA, ANDREIA CARVALHO ; DE SOUZA, GUSTAVO HENRIQUE BIANCO ; DE MOURA, SANDRA APARECIDA LIMA ; TALVANI, ANDRÉ ; ANTUNES, VAGNER ROBERTO ; CARDOSO, LEONARDO MÁXIMO . Effects of Psidium guajava L. leaves extract on blood pressure control and IL-10 production in salt-dependent hypertensive rats. BIOMEDICINE & PHARMACOTHERAPY, v. 155, p. 113796, 2022.

Capítulo de livro

BRAGA, DAIANE CRISTINA DE ASSIS ; MAGALHÃES GOMES, PAULA ; GONÇALVES RODRIGUES DAS DÔRES, ROSANA ; MÁXIMO CARDOSO, LEONARDO . ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E POTENCIAL REDUTOR DE PESO DO SHAKE DE Psidium guajava L. (GOIABEIRA). Ciência e Tecnologia de Alimentos: Pesquisas e Avanços. 1ed.: Agron Food Academy, 2021, p. 97-.

Produção científica não vinculada a tese

Artigo científico

SOUZA, JAQUELINE APARECIDA ; BECKER, LENICE KAPPES ; BATISTA, MARCOS ADRIANO CARLOS ; ASSIS BRAGA, DAIANE CRISTINA ; GOMES, PAULA MAGALHÃES ; ALZAMORA, ANDRÉIA CARVALHO ; VIEIRA, MARIA

APARECIDA RIBEIRO ; LIMA, WANDERSON GERALDO ; ANDRADE, MARINA GONÇALVES CAETANO ; LIMA SANCHES, BRUNO ; TOTOU, NÁDIA LÚCIA ; ASSIS DIAS MARTINS JÚNIOR, FRANCISCO ; OLIVEIRA, LISANDRA BRANDINO ; ANTUNES, VAGNER ROBERTO ; CARDOSO, LEONARDO MÁXIMO . Swimming training improves cardiovascular autonomic dysfunctions and prevents renal damage in rats fed a high-sodium diet from weaning. EXPERIMENTAL PHYSIOLOGY, v. 1, p. 1, 2020.

BATISTA, M.A.C. ; BRAGA, D. C. A. ; MOURA, S. A. L. ; SOUZA, G. H. B. ; SANTOS, O. D. H. ; CARDOSO, L. M. . Salt-dependent hypertension and infammation: targeting the gut?brain axis and the immune system with Brazilian green propolis. Infammopharmacology, v. 28, p. 1, 2020.

FREITAS, FLÁVIO EDUARDO DIAS ARAÚJO ; BATISTA, MARCOS ADRIANO CARLOS ; BRAGA, DAIANE CRISTINA DE ASSIS ; DE OLIVEIRA, LISANDRA BRANDINO ; ANTUNES, VAGNER ROBERTO ; CARDOSO, LEONARDO MÁXIMO . The gut-brain axis and sodium appetite: Can inflammation-related signaling influence the control of sodium intake?. APPETITE, v. 175, p. 106050, 2022.

Resumos publicados em anais de congressos

BRAGA, D. C. A.; DORES, R.G.R. ; SOUZA, G. H. B. ; ALMEIDA, J. C. S. ; OLIVEIRA, L.B. ; ALZAMORA, A.C. ; ANTUNES, V.G. ; CARDOSO, L. M. . Phytochemical and nutritional characterization of *Psidium guajava* L. (Guava) leaves extract.. In: 10th Probiotics, prebiotics & new foods, nutraceuticals and botanicals for nutrition & Human and Microbiota Health,, 2019, Roma. 10th Probiotics, prebiotics &

new foods, nutraceuticals and botanicals for nutrition & Human and Microbiota Health, 2019.

Trabalhos apresentados

BRAGA, D. C. A.; ALZAMORA, A.C. ; SOUZA, G. H. B. ; ANTUNES, V.G. ; CARDOSO, L. M. . Efeitos do extrato de goiabeira (*Psidium guajava*) sobre a pressão arterial e atividade simpática lombar de ratos com hipertensão sódio-dependente anestesiados. 2022. (Apresentação de Trabalho/Simpósio).

BRAGA, D. C. A.; ANDRADE, M. G.; SOUZA, J.A. ; BATISTA, M.A.C. ; Freitas, F.E.D.A ; OLIVEIRA, L.B. ; ALZAMORA, A.C. ; SOUZA, G. H. B. ; ANTUNES, V.G. ; CARDOSO, L. M. . Efeitos do tratamento com suspensão de *P. guajava* L. na absorção de sódio intestinal de ratos HS12S. 2020. (Apresentação de Trabalho/Simpósio).

BRAGA, D. C. A.; ANDRADE, M. G. ; SOUZA, J.A. ; BATISTA, M.A.C. ; Freitas, F.E.D.A ; SOUZA, G. H. B. ; ALZAMORA, A.C. ; OLIVEIRA, L.B. ; CARDOSO, L. M. . Efeitos do tratamento com suspensão a base de folhas de *Psidium guajava* L. (goiabeira) por 4 semanas na absorção de sódio intestinal de ratos HS12W. 2020. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

BRAGA, D. C. A.; LAGES L. ; GOMES, P.M. ; OLIVEIRA, L.B. ; ALZAMORA, A.C. ; DORES, R.G.R. ; CARDOSO, L. M. . Efeitos cardiovasculares do extrato etanólico de *Psidium guajava* L. em ratos Wistar sob dieta com sobrecarga de sódio. 2019. (Apresentação de Trabalho/Simpósio).

BRAGA, D. C. A.; DORES, R.G.R. ; GOMES, P.M. ; CARDOSO, L. M. . Teores de compostos fenólicos e flavonoides no extrato etanólico de goiabeira. 2019. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

BRAGA, D. C. A.; DORES, R.G.R. ; GOMES, P.M. ; CARDOSO, L. M. . Atividade antioxidante e potencial redutor de peso do shake de Psidium guajava (goiabeira). 2019. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

