

USO DO EXTRATO DE FOLHAS DE *Mangifera indica* L. E DA MANGIFERINA NA LESÃO ATEROSCLERÓTICA EM CAMUNDONGOS APOE^{-/-}

USE OF *Mangifera indica* L. LEAVES EXTRACT AND MANGIFERIN ON THE ATHEROSCLEROTIC LESION IN APOE^{-/-} MICE.

**Bruna Moraes ARAÚJO¹; Reggiani Vilela GONÇALVES²;
Maria do Carmo Gouveia PELUZIO³; João Paulo Viana LEITE¹;
Gepoliano dos Santos CHAVES¹; Sílvia Oliveira LOPES³; Cibele do Carmo MIRANDA¹;
José Humberto de QUEIROZ¹**

1. Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal de Viçosa - UFV, Viçosa, MG, Brasil;

2. Departamento Básico-Área da Saúde, Universidade Federal de Juiz de Fora, Campus Governador Valadares, MG, Brasil;

3. Departamento de Nutrição e Saúde - UFV, Viçosa, MG, Brasil.

RESUMO: As folhas de *Mangifera indica* L são importantes como fonte de compostos fenólicos, especialmente mangiferina, que apresentam propriedades antidiabética, hipolipemiante, antioxidante e anti-inflamatória. O estudo teve como objetivo avaliar os efeitos do extrato etanólico de folhas de *M. indica* e da mangiferina isolada sobre a lesão aterosclerótica em camundongos ApoE^{-/-}. Métodos: Camundongos ApoE^{-/-} com 15 semanas de idade foram divididos aleatoriamente em 4 grupos de acordo com o tratamento, por gavagem, durante 56 dias: controle (veículo, dimetil sulfóxido); E200 (200 mg/kg/dia de extrato da folha de *M. indica*), E400 (400 mg/kg/dia de extrato da folha de *M. indica*); M40 (40 mg/kg/dia de mangiferina). Parâmetros sanguíneos foram dosados utilizando-se kits enzimáticos e as lesões ateroscleróticas foram avaliadas pelo método *en face*. Resultados: O extrato seco apresentou 17% de mangiferina. Os níveis sanguíneos de colesterol total, frações HDLc e LDLc e triacilgliceróis, bem como o percentual de deposição lipídica no arco aórtico e aorta torácica não diferiram significativamente entre os grupos ($p > 0,05$). Conclusão: A administração do extrato de folhas de *M. indica* e da mangiferina em camundongos ApoE^{-/-} não afetou a lipídemia e não diminuiu as lesões ateroscleróticas pré-existentes.

PALAVRAS-CHAVES: Polifenóis. Xantonas. Aterosclerose. Análise *en face*

INTRODUÇÃO

A aterosclerose é uma das principais alterações envolvida nas desordens cardiovasculares e compreende um processo inflamatório progressivo das artérias de grande e médio calibre, primariamente relacionado ao acúmulo subendotelial de lipídios, que envolve uma complexa interação entre estresse oxidativo, LDL oxidada e estímulos proinflamatórios que desencadeiam disfunção endotelial (LUSIS, 2000; TEDGUI; MALLAT, 2006).

O consumo de alimentos e bebidas ricos em compostos fenólicos tem sido correlacionado inversamente com a incidência de doenças cardiovasculares (MANACH, MAZUR; SCALBERT, 2005). Ensaios clínicos têm confirmado os benefícios destes compostos na melhora da dislipídemia, na redução da oxidação de LDL e na regulação da expressão de moléculas de adesão e citocinas proinflamatórias em indivíduos com fatores de risco cardiovascular (EGERT et al., 2009; BROEKHUIZEN et al., 2011; CURTIS et al., 2012). Adicionalmente, estudos *in vivo* têm

evidenciado o potencial antiaterosclerótico de alguns compostos fenólicos (antocianina, a quercetina e a catequina) (HAYEK et al., 1997; XIA et al., 2006; NORATA et al., 2007; LOKE et al., 2010).

A espécie *Mangifera indica* L. (mangueira), mais conhecida por sua importância na comercialização das frutas, é comumente utilizada na medicina tradicional e representa importante fonte de compostos fenólicos, especialmente mangiferina. Em Cuba, o extrato aquoso da casca de *M. indica* é produzido em escala industrial e comercializado como suplemento nutricional (Vimang®), cujas inúmeras propriedades farmacológicas têm sido atribuídas em parte à mangiferina (MASIBO; HE, 2009).

Estudos *in vivo* têm demonstrado que a mangiferina apresenta atividades antidiabética (MURUGANANDAN et al., 2005; DINESHKUMAR, MITRA; MANJUNATHA, 2010), hipolipemiante (MIURA et al., 2001; GUO et al., 2011, NIU et al., 2012), antioxidante (MURUGANANDAN et al., 2002; PRABHU et al., 2006) e anti-inflamatória (PRABHU, NARAYAN;

DEVI, 2009; DAS et al., 2012). De acordo com essas atividades, é possível que a mangiferina auxilie na prevenção de doenças cardiovasculares, atuando sobre o processo aterosclerótico. De fato, o extrato da casca de *M. indica* em combinação com a tintura de *Crataegus* mostrou-se benéfico no controle da dislipidemia e do desenvolvimento de lesão aterosclerótica em ratos submetidos à dieta aterogênica (AKILA; DEVARAJI, 2008), no entanto, o efeito do extrato isolado não foi investigado.

Ao contrário da casca, estudos dos potenciais terapêuticos das folhas de *M. indica* têm sido pouco documentados, a despeito dos seus teores de mangiferina igualmente elevados, como demonstrado por Barreto et al (2008). O interesse crescente pelo desenvolvimento de fitoterápicos e fitofármacos, e a constante busca por adjuvantes na terapia antiaterogênica, constituem fatores que motivam a investigação dos efeitos do extrato da folha de *M. indica* e da mangiferina sobre o processo aterosclerótico.

O presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos do extrato da folha de *M. indica* e da mangiferina sobre a extensão da lesão aterosclerótica em camundongos ApoE^{-/-}, que apresentam hipercolesterolemia severa e desenvolvem lesões ateroscleróticas muito similares às observadas em humanos (NAKASHIMA et al., 1994).

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta da matéria-prima

Folhas de *M. indica*, variedade Ubá, foram coletadas em pomar comercial localizado no município de Visconde do Rio Branco, MG, no mês de setembro de 2009. As folhas foram secas à temperatura ambiente e trituradas em moinhos de faca.

Preparação do extrato

Folhas de *M. indica* secas e trituradas (905g) foram submetidas à percolação exaustiva com etanol 90% P.A. O extrato obtido foi concentrado em evaporador rotativo (em temperatura não superior de 60 °C), sendo em seguida levado a liofilização para completa remoção do solvente, obtendo-se 170g de extrato seco.

Extração e isolamento da mangiferina

O isolamento e purificação da mangiferina foram realizados de acordo com Muruganandan et al. (2005), com algumas adaptações. As folhas de *M. indica* secas e trituradas (406,7g) foram

desengorduradas com éter de petróleo P.A, durante 12 horas, e, posteriormente, submetidas à extração com etanol 98% P.A, durante 16 horas, em extrator Soxhlet. O extrato etanólico obtido foi concentrado em evaporador rotativo, ressuspendido em acetato de etila P.A. e armazenado por uma semana em geladeira até a decantação de um sólido, o qual foi separado por filtração à vácuo, lavado com éter etílico e submetido a sucessivas etapas de recristalização com acetato de etila. O sólido final foi submetido à análise espectroscópica (IV, RMN de hidrogênio e de ¹³C) para confirmação estrutural. O grau de pureza do sólido foi avaliado por HPLC-DAD, comparando-se tempo de retenção com padrão mangiferina.

Prospecção fitoquímica e análise de fenóis totais

O extrato liofilizado foi submetido às análises fitoquímicas realizada em placas de cromatografia revestidas com sílica gel GF 254® (Merck, Darmstadt, Alemanha), para detecção de cumarinas, flavonóides, antraquinonas, taninos, alcalóides, triterpenos/esteróides e heterosídeos cardiotônicos (WAGNER, BLADT; ZGAINSKI, 1984). Adicionalmente, foram estimados os teores de fenóis totais no extrato por espectrometria na região do visível (760 nm), utilizando como reagente colorimétrico a solução de Folin-Ciocalteu (SINGLETON, DHTHOFER; LAMUELA-RANVENTOS, 1999).

Análise HPLC

A quantificação de mangiferina no extrato seco de *M. indica* foi realizada de acordo com Ling et al. (2009) em aparelho HPLC Shimadzu LC-2AD (Shimadzu®, Japão) equipado com detector de arranjo diodo SPD-M20A, coluna C₁₈ (150 x 4,6mm, 4,6µm), com pré-coluna C₁₈. A fase móvel consistiu de solvente A (0,3% ácido acético P.A. em água destilada) e solvente B (acetonitrila, grau HPLC), começando de 10% B por 5 minutos, 20% B por 15 minutos, 100% B por 15 minutos e 10% B por 10 minutos para lavagem e reestabelecimento das condições iniciais da coluna. O comprimento de onda usado para detecção foi de 254 nm. A temperatura da coluna foi de 40 °C. A taxa de fluxo foi de 1 mL/min e o volume injetado foi de 50 µL. Realizou-se quantificação pelo método de padrão externo com mangiferina, sendo injetados cinco diferentes volumes de solução de mangiferina a 1mg/ml: 5, 10, 15, 20 e 25 µL, obtendo-se, respectivamente, 3,33; 6,66; 9,99; 13,32 e 16,65 µg de mangiferina. O tempo de retenção do padrão de mangiferina foi de 8.2 min. Dissolveu-se 1mg do extrato em 1,5mL em solução metanol/água (2:1).

Animais e dieta

Quarenta e oito camundongos apoE^{-/-} de ambos os sexos, com 15 semanas de idade, provenientes do Biotério Central do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Viçosa, foram mantidos no laboratório de Nutrição Experimental do Departamento de Nutrição e Saúde da UFV, em ambiente climatizado (temperatura média de 22 °C), com ciclo claro/escuro de 12 horas, dispostos em gaiolas coletivas, separando-se os machos das fêmeas. Os animais receberam *ad libitum* água e dieta normocalórica AIN-93M (REEVES, NIELSEN; FAHEY, 1993). Do número total, houve perda de 15 animais, principalmente de forma acidental durante a realização da gavagem.

Desenho experimental

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética de Experimentação Animal (CETEA), da Universidade Federal de Minas Gerais, protocolo número 3/2010. Os animais foram divididos em 4 grupos de acordo com o tratamento recebido: controle (veículo); E200 (200 mg/kg de extrato de folha de *M. indica*); E400 (400 mg/kg de extrato de folha de *M. indica*); M40 (40 mg/kg de mangiferina). O veículo utilizado para administração dos extratos e da mangiferina foi o DMSO (50 µL). As administrações do veículo, dos extratos e da mangiferina foram realizadas por gavagem. Ao longo do experimento, o peso dos animais e o consumo alimentar não variou significativamente entre os grupos. Após 56 dias de tratamento, respeitando jejum de 12 horas, os animais foram eutanasiados por meio de sangria sob anestesia com solução de xilazina (10 mg/mL) e quetamina (2 mg/mL). O sangue foi coletado por punção cardíaca, transferido para microtubos e centrifugado a 2400 x g, por 10 minutos a 4 °C para separação do soro. As aortas destinadas às análises *en face* foram fixadas em formalina de Carson.

Avaliação da lipídemia

Para avaliação da lipídemia, foram dosados: colesterol total (método enzimático-colorimétrico, peroxidase), fração HDLc (método enzimático-colorimétrico, direto) e triacilgliceróis (método enzimático-colorimétrico, peroxidase). As análises foram realizadas no analisador bioquímico automático (BS200®, Mindray, China), utilizando kits de dosagem específicos (Bioclin®, Brasil). As amostras de soro foram diluídas em solução fisiológica de NaCl até completar o volume de 500 µL, já que o volume máximo de soro obtido foi muito inferior ao volume mínimo requerido pelo

analisador bioquímico e os valores obtidos foram, então, corrigidos pelos fatores de diluição de cada amostra.

Avaliação da extensão da lesão aterosclerótica

A avaliação da extensão da lesão aterosclerótica nas aortas dos camundongos foi feita por mensuração da área de deposição lipídica segundo o método *en face* com a coloração de Sudan IV (PALINSKI et al., 1994). As aortas previamente fixadas em formalina de Carson foram submersas em álcool a 70% por 5 minutos. Em seguida, coradas em solução filtrada de Sudan IV (0,5% de Sudan IV, 35% de etanol e 50% de acetona) durante 10 minutos, sob agitação constante. O excesso de solução corante foi eliminado das aortas submergindo-as em etanol 80% durante 5 minutos, sob agitação constante. As aortas foram dissecadas, cortadas longitudinalmente, estendidas sobre uma superfície de isopor e fixada com alfinetes. Para captura das imagens, utilizou-se câmera digital (DSC-W55®, Sony, Japão) em posição fixa, com 7,0 mega-pixels de definição e função macro ativada. As imagens capturadas foram analisadas no programa Image Pro Plus 4.5® (Media Cybernetics, USA). As regiões de deposição lipídica foram mensuradas utilizando-se a ferramenta *create a polygon feature*. Os resultados foram expressos como percentual de deposição lipídica em relação à área total avaliada. A área total das aortas, mensurada com a mesma ferramenta, compreendeu o arco aórtico e parte da aorta descendente, partindo-se da região relacionada com a artéria carótida comum direita e seguindo pela aorta descendente até totalizar uma área aproximada de 0,3 cm².

Análises estatísticas

Os dados foram expressos em média e desvio padrão (média±DV). Os resultados referentes aos parâmetros sanguíneos e às análises *en face* do tecido aórtico foram submetidas ao teste de múltiplas comparações Newman-Keulls. O nível de significância usado foi de 5%. Os testes foram aplicados utilizando o software GraphPad Prism 5.0® (GraphPad Software, Inc, USA).

RESULTADOS

Caracterização fitoquímica e determinação estrutural

O extrato de folhas de *M. indica* apresentou um rendimento de 18,8% (p/p) em relação à droga vegetal. A prospecção fitoquímica revelou a presença de taninos, flavonoides, cumarinas,

antraquinonas e triterpenos. Cardiotônicos, alcaloides e saponinas não foram detectados no extrato. O teor de fenóis totais no extrato correspondeu a 21,3% (212,7 mg de EAG/g de extrato seco) e o teor de mangiferina foi de 17%.

O processo de purificação forneceu 2g de mangiferina que apresentou cromatograma no HPLC com pico único (TR 8.2 min) e espectro UV obtido por arranjo fotodiodo compatível com padrão. A confirmação da estrutura química da mangiferina isolada foi realizada por comparação dos dados de IV e RMN com a literatura. A mangiferina isolada obteve coloração amarelada; IV (pastilha KBr, cm^{-1}): 3.362 (estiramento axial de OH), 1.648 (estiramento axial de carbonila), 1.591,

1.519, 1489 e 1462 (característico de composto aromático). RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3 , δ): 4,57 (13,74 (s, 1H, OH) 7,3 (s, 1H, H-8) 6,8 (S, 1H, H-5) 6,3 (s, 1H, H-4) 4,55 (d, $J = 9,6$ Hz, H-1'). RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3 , δ): 161,76 (C-1) 104,03 (C-2) 163,79 (C-3) 93,27 (C-4) 156,19 (C-4a) 150,88 (C-4b) 102,49 (C-5) 154,42 (C-6) 143,83 (C-7) 107,56 (C-8) 111,48 (C-8a) 101,27 (C-8b) 179,02 (C-9) 73,08 (C-1') 70,22 (C-2') 78,96 (C-3') 70,62 (C-4') 81,54 (C-5') 62, 8 (C-6'). Os dados foram confrontados com valores relatados na literatura (GÓMEZ-ZALETA et al., 2006), sendo confirmada a estrutura da mangiferina (Figura 1).

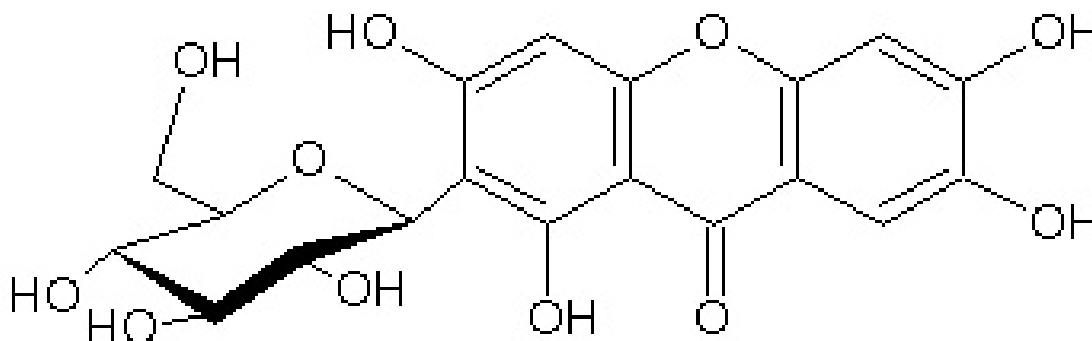


Figura 1 Estrutura da mangiferina

Lipidemia

A lipidemia analisada ao término de 56 dias de tratamento com extratos de folhas de *M. indica* e do composto isolado mangiferina está representados

na Tabela 1. Os níveis séricos de colesterol total, HDLc, LDLc e triacilgliceróis não variaram significativamente entre os grupos ($p > 0,05$).

Tabela 1. Lipidemia avaliada nos camundongos ApoE^{-/-} submetidos a 56 dias de tratamento com extratos de folhas de *M. indica* e do composto isolado mangiferina

	n	Controle	E200	E400	M40
Colesterol total	8 a 9	328,3 ± 72,8 ^a	368,5 ± 89,2 ^a	350,4 ± 81,5 ^a	328,2 ± 54,3 ^a
HDLc	7 a 9	10,5 ± 3,5 ^a	12,5 ± 4,7 ^a	11,2 ± 5,5 ^a	9,9 ± 2,5 ^a
LDLc	7 a 9	304,1 ± 61,7 ^a	339,6 ± 88,1 ^a	324,5 ± 78,9 ^a	307,0 ± 52,1 ^a
Triacilgliceróis	8 a 9	68,2 ± 25,8 ^a	82,2 ± 20,6 ^a	73,8 ± 17,2 ^a	56,5 ± 10,8 ^a

Valores expressos em média (mg/dL) ± DP. Controle: veículo DMSO; E200: 200 mg/kg do extrato de folhas de *M. indica*; E400: 400 mg/kg do extrato de folhas de *M. indica*; M40: 40 mg/kg de mangiferina. Letras iguais representam diferença não significativa ($p > 0,05$) entre os grupos, segundo o Teste Newman-Keulls

Extensão da lesão aterosclerótica

A extensão da lesão aterosclerótica no arco aórtico e aorta torácica, quantificada pelo método *en face* com a coloração de Sudan IV e expressa em percentual da área de deposição lipídica em relação à área total avaliada, correspondeu a 5,55 ± 2,61 no

grupo controle; 3,45 ± 3,27 no grupo E200; 4,67 ± 3,53 no grupo E400 e 4,55 ± 2,02 no grupo M40. Não houve variação significativa entre os grupos ($p > 0,05$) (Figura 2).

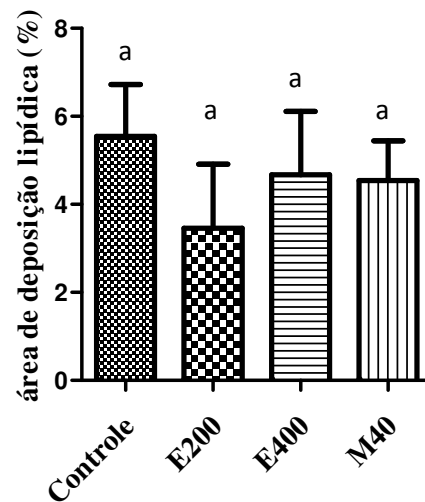


Figura 2. Área percentual de deposição lipídica no tecido aórtico de camundongos ApoE^{-/-} submetidos a 8 semanas de tratamento com extratos de folhas de *M. indica* e do composto isolado mangiferina. Médias ± DP são apresentados. $n = 5$ a 6. Controle: veículo DMSO; E200: 200 mg/kg do extrato de folhas de *M. indica*; E400: 400 mg/kg do extrato de folhas de *M. indica*; M40: 40 mg/kg de mangiferina. Não houve diferença entre os grupos ($p > 0,05$). Letras iguais representam diferença não significativa ($p > 0,05$), segundo o Teste Newman-Keulls.

DISCUSSÃO

Além da sua importância na comercialização das frutas, a espécie *M. indica* tem se mostrado promissora na área de produtos naturais voltados para a saúde humana; um bom exemplo é o uso do extrato da casca de *M. indica* na formulação do suplemento alimentar Vimang®. O potencial terapêutico do Vimang® e do seu composto fenólico predominante, a mangiferina, tem sido amplamente estudado. Adicionalmente, tem havido um interesse crescente pelo estudo da bioatividade de outras partes de *M. indica*, embora estudos das propriedades das folhas ainda sejam escassos, a despeito dos seus altos teores de mangiferina e outros compostos fenólicos (MASIBO; HE, 2009).

Efeitos hipolipemiantes da mangiferina relatados em alguns estudos parecem ser influenciados por fatores como modelo experimental e espécie animal utilizados. Comparando-se, por exemplo, as ações da mangiferina em estudos com ratos, pôde-se observar que seus efeitos hipolipemiantes foram mais expressivos nas dislipidemias associadas à toxicidade pelo isoproterenol (NAIR; DEVI, 2006) ou ao diabetes induzido por estreptozotocina (DINESHKUMAR, MITRA; MANJUNATHA, 2010) do que por dieta hipercolesterolêmica (NIU et al., 2012), destacando-se que as doses utilizadas neste último modelo foram intermediárias àsquelas utilizadas nos outros dois modelos. Comparando-se, ainda, os efeitos da mangiferina na dislipidemia induzida por dieta hiperlipídica, verificou-se que

este composto afetou o nível de colesterol total em camundongos (MIURA et al., 2001), mas não em ratos (NIU et al., 2012) ou hamsters (GUO et al., 2011), mesmo que as doses administradas nestas duas últimas espécies tenham sido similares ou superiores àsquelas administradas em camundongos. A ausência de efeitos da mangiferina sobre o colesterol total também foi relatada em camundongos LDLr^{-/-} (PARDO-ANDREU et al., 2008). Dessa forma, o modelo de indução de dislipidemia e a espécie animal utilizada parecem constituir fatores determinantes das respostas aos tratamentos com mangiferina. Possivelmente estas variáveis expliquem por que no presente estudo a administração de mangiferina e de extratos da folha de *M. indica* não promoveram alterações no perfil lipídico dos camundongos ApoE^{-/-}.

O presente estudo investigou pela primeira vez os efeitos do extrato da folha de *M. indica* e da mangiferina sobre o processo aterosclerótico, baseando-se nas propriedades antihipolipemiantes, antioxidantes e anti-inflamatórias deste composto previamente relatadas. Os tratamentos com duração de 56 dias iniciados em camundongos ApoE^{-/-} com 15 semanas de idade não reduziu o tamanho das lesões ateroscleróticas. Fatores como doses utilizadas, momento da intervenção e tempo de tratamento talvez não tenham sido adequados para se produzir efeitos significativos.

Grande parte dos benefícios antiaterogênicos de compostos fenólicos em camundongos ApoE^{-/-} têm sido relacionados a intervenções terapêuticas iniciadas em animais

muito jovens (4-6 semanas de idade) (HAYEK et al., 1997; NORATA et al., 2007; LOKE et al., 2010). Nesta faixa etária, esses animais sequer desenvolveram estrias gordurosas, ao passo que animais com 15 semanas de idade, como os utilizados no nosso estudo, já apresentam estrias gordurosas bem desenvolvidas. Ainda que, na presente condição experimental, os extratos de folhas de *M. indica* e a mangiferina não tenham reduzido as lesões ateroscleróticas pré-existentes, não se pode excluir um possível efeito antiaterosclerótico a partir de uma intervenção precoce, visto que outros tipos de tratamentos testados em camundongos ApoE^{-/-} foram ineficazes quando iniciados entre a 10^a e 12^a semana de idade, mas retardaram o desenvolvimento e progressão das lesões quando iniciados entre a 5^a e 6^a semana de idade (MURAYAMA et al., 1999; HASTY et al., 1999).

Segundo Xia et al. (2006), existem benefícios antiateroscleróticos de extrato rico em antocianinas mesmo em camundongos ApoE^{-/-} com lesões avançadas. No entanto, devemos levar em conta que o tempo de exposição dos animais aos extratos ricos em antocianinas foi pelo menos o dobro do tempo de exposição aos extratos de folhas de *M. indica* L e à mangiferina no presente estudo, um fator que talvez explique as diferenças encontradas entre os respectivos trabalhos. Embora os tratamentos do presente estudo não tenham alterado a extensão das lesões ateroscleróticas, seria interessante investigar os seus efeitos sobre a

composição das placas. A exemplo, o tratamento com N-acetilcisteína, derivado da L-cisteína com propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias, durante 56 dias, não reduziu a extensão das lesões ateroscleróticas em camundongos ApoE^{-/-}, mas promoveu alterações na composição das placas condizentes com melhora da estabilidade das mesmas (LU et al., 2011), o que teria relevância clínica já que as complicações da aterosclerose, em geral, provém da ruptura de placas instáveis com consequente formação de trombos (LUSIS, 2000).

Novas pesquisas com extratos da folha de *M. indica* e mangiferina em camundongos ApoE^{-/-} devem ser realizadas com novas doses, ajustando-se o tempo de tratamento e avaliando-se tanto o tamanho quanto a composição das lesões ateroscleróticas. Simultaneamente, possíveis correlações com mecanismos antioxidantes e anti-inflamatórios devem ser investigados.

CONCLUSÃO

A administração do extrato de folhas de *M. indica* e da mangiferina em camundongos ApoE^{-/-} não afetou a lipidemia e não diminuiu as lesões ateroscleróticas pré-existentes.

AGRADECIMENTOS

À CAPES pela concessão de bolsa de doutorado a BMA, e ao CNPq pela concessão de bolsa de iniciação científica a GSC.

ABSTRACT: *Mangifera indica* L leaf are an important source of phenolic compounds, especially mangiferin, that exhibits antidiabetic, hypolipidemic, anti-oxidant and anti-inflammatory activities. This study aimed to evaluate the effects of mangiferin and ethanolic extract of *M. indica* leaf on atherosclerotic lesions in mice ApoE^{-/-}. Methods: Fifteen-week-old ApoE^{-/-} mice were randomly divided into 4 groups according to the treatment giving by gavage during 56 days: control - vehicle (**dimethyl sulfoxide**); E200 - 200 mg/kg/day *M. indica* leaf extract; E400 - 400 mg/kg/day *M. indica* leaf extract, M40 - 40 mg/kg/day mangiferin. Administrations of vehicle, extracts and mangiferin were performed every day by gavage during 8 weeks. Blood parameters were measured using enzymatic kits and atherosclerotic lesions were evaluated by *en face* method. Results: The dried extract showed 17% of mangiferin. Total cholesterol, HDLc, LDLc and triglycerides blood levels, as well as the percentage of lipid deposition in the aortic arch and thoracic aorta were not significantly different between the groups (p > 0.05). Conclusion: The administration of *M. indica* leaf extract and mangiferin in ApoE^{-/-} mice did not affect serum lipids and did not decreased pre-existing atherosclerotic lesions

KEYWORDS: Polyphenols. Xanthones. Atherosclerosis. *en face* analysis

REFERÊNCIAS

BARRETO, J. C.; TREVISAN, M. T. S.; HULL, W. E.; ERBEN, G.; BRITO, E.; PFUNDSTEIN, B.; WÜRTELE, G.; SPIEGELHALDER, B.; OWEN, A. W. Characterization and Quantitation of Polyphenolic Compounds in Bark, Kernel, Leaves, and Peel of Mango (*Mangifera indica* L.). **J. Agric. Food Chem.**, Washington, v. 56, p. 5599–5610, 2008.

- BROEKHUIZEN, L. N.; VAN WIJK, D. F.; VINK, H.; STALMACH, A.; CROZIER, A.; HUTTEN, B. A., KASTELEIN, J. J.; HUGENHOLTZ, P. G.; KOENIG, W. STROES, E. S. Reduction of monocyte chemoattractant protein 1 and macrophage migration inhibitory factor by a polyphenol-rich extract in subjects with clustered cardiometabolic risk factors. **Br. J. Nutr.**, Cambridge, v. 106, n. 9, p. 1416-22, nov. 2011.
- CURTIS, P. J.; SAMPSON, M.; POTTER, J.; DHATARIYA, K.; KROON, P. A.; CASSIDY, A. Chronic ingestion of flavan-3-ols and isoflavones improves insulin sensitivity and lipoprotein status and attenuates estimated 10-year CVD risk in medicated postmenopausal women with type 2 diabetes: a 1-year, double-blind, randomized, controlled trial. **Diab Care**, Alexandria, v. 35, n. 2, p. 226-32, fev. 2012.
- DAS, J.; GHOSH, J.; ROY, A.; SIL, P. C. Mangiferin exerts hepatoprotective activity against D-galactosamine induced acute toxicity and oxidative/nitrosative stress via Nrf2–NFκB pathways. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, New York, v. 260, p. 35–47, apr. 2012.
- DINESHKUMAR, B.; MITRA, A.; MANJUNATHA, M. Studies on the antidiabetic and hypolipidemic potentials of mangiferin (xanthone glucoside) in streptozotocin-induced type 1 and 2 diabetic models rats. **Int. J. Adv. Pharm. Sci.**, West Bengal, v. 1, p. 75-85, 2010.
- EGERT, S.; BOSY-WESTPHAL, A.; SEIBERL, J.; KÜRBITZ, C.; SETTLER, U.; PLACHTA-DANIELZIK, S.; WAGNER, A.E.; FRANK, J., SCHREZENMEIR, J.; RIMBACH, G.
- WOLFFRAM, S.; MÜLLER, M. J. Quercetin reduces systolic blood pressure and plasma oxidized low-density lipoprotein concentrations in overweight subjects with a high-cardiovascular disease risk phenotype: a double-blinded, placebo-controlled cross-over study. **Br. J. Nutr.**, Cambridge, v. 102, n. 7; p. 1065-1074, oct. 2009.
- GÓMEZ-ZALETA, B.; RAMÍREZ-SILVA, M. T.; GUTIÉRREZ, A.; GONZÁLEZVERGARA, E.; GÜIZADO-RODRÍGUEZ, M.; ROJAS-HERNÁNDEZ, A. UV/vis, 1H, and 13C NMR spectroscopic studies to determine mangiferin pKa values. **Spectrochim. Acta Part A. Mol. Biomol. Spectrosc.**, Amsterdam, v. 64, p. 1002-1009, jun. 2006.
- GUO, F.; HUANG, C.; LIAO, X.; WANG, Y.; HE, Y.; FENG, R., LI, Y.; SUN, C. Beneficial effects of mangiferin on hyperlipidemia in high-fat-fed hamsters. **Mol. Nutr. Food Res.**, Weinheim, v. 55, n. 12, p. 1809-18, dec. 2011.
- HASTY, A. H. MACRAE, F. L.; BRANDT, S. J.; BABAEV, V. R., GLEAVES, L. A., FAZIO, S. Retroviral gene therapy in apoE-deficient mice: ApoE expression in the artery wall reduces early foam cell lesion formation. **Circulation**, Hagerstown, v. 99, p. 2571–6, may 1999.
- HAYEK, T.; FUHRMAN, B.; VAYA, J.; ROSENBLAT, M.; BELINKY, P.; COLEMAN, R., ELIS, A.; AVIRAM, M. Reduced progression of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice following consumption of red wine, or its polyphenols quercetin acatechin, is associated with reduced susceptibility of LDL to oxidation and aggregation. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, Baltimore, 17: 2744–52, nov. 1997.
- LING, L. T.; YAP, S.; RADHAKRISHNAN, A. K.; SUBRAMANIAM, T.; CHENG, H. M.; PALANISAMY, U. D. Standardised *Mangifera indica* extract is an ideal antioxidant. **Food Chem.**, Barking, v. 113, p. 1154–1159, apr. 2009.
- LOKE, W. M.; PROUDFOOT, J. M.; HODGSON, J. M.; MCKINLEY, A. J.; HIME, N.; MAGAT, M.; STOCKER, R.; CROFT, K. D. Specific Dietary Polyphenols Attenuate Atherosclerosis in Apolipoprotein E-Knockout Mice by Alleviating Inflammation and Endothelial Dysfunction. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, Baltimore, 30: 749-57, apr. 2010.
- LUSIS, A.J. Atherosclerosis. **Nat. Rev.**, London, v. 407, p. 233–241, sept. 2000.

LU, Y.; QIN, W.; SHEN, T.; DOU, L.; MAN, Y.; WANG, S.; XIAO, C.; LI, J. The antioxidant N-acetylcysteine promotes atherosclerotic plaque stabilization through suppression of RAGE, MMPs and NF- κ B in ApoE-deficient mice. **J. Atheroscler. Thromb.**, Tokyo, v. 18, n. 11, p. 998-1008, 2011.

MANACH, C.; MAZUR, A.; SCALBERT, A. Polyphenols and prevention of cardiovascular diseases. **Curr. Opin. Lipidol.**, London, v. 16, p. 3–8, fev. 2005.

MASIBO, M.; HE, Q. Mango Bioactive Compounds and Related Nutraceutical Properties—A Review. **Food Rev. Inter**, London, v. 25, n. 346–370, sept. 2009.

MIURA, T.; FUKUTA, A.; ICHIKI, H.; IWAMOTO, N.; KATO, M.; KUBO, M. Hypolipidemic activity of mangiferin in cholesterol-fed mice. **J. Trad. Med.**, Tokyo, v. 18, n. 3, p. 119–21, 2001.

MURAYAMA, T.; YOKODE, M.; KATAOKA, H.; IMABAYASHI, T.; YOSHIDA, H.; SANO, H.; NISHIKAWA, S.; NISHIKAWA, S.; KITA, T. Intraperitoneal administration of anti-c-fms monoclonal antibody prevents initial events of atherogenesis but does not reduce the size of advanced lesions in apolipoprotein E-deficient mice. **Circulation**, Hagerstown, v. 99, p. 1740–1746, apr 1999.

MURUGANANDAN, S.; GUPTA, S.; KATARINA, M.; LAL, J.; GUPTA, P. K. Mangiferin protects the streptozotocin-induced oxidative damage to cardiac and renal tissues in rats. **Toxicol.**, Limerick, v. 176, p. 165–73, jul. 2002.

MURUGANANDAN, S.; SRINIVASAN, K.; GUPTA, S.; GUPTA, P. K.; LAL, J. Effect of mangiferin on hyperglycemia and atherogenicity in streptozotocin diabetic rats. **J. Ethnopharmacol**, Limerick, v. 97, p. 497–501, mar. 2005.

NAIR, P. S.; DEVI, S. C. S. Efficacy of mangiferin on serum and heart tissue lipids in rats subjected to isoproterenol induced cardiotoxicity. **Toxicol**, Limerick, v. 228, p. 135–39, dec. 2006.

NAKASHIMA, Y.; PLUMP, A. S.; RAINES, E. W.; BRESLOW, J. L.; ROSS, R. ApoE-Deficient Mice Develop Lesions of All Phases of Atherosclerosis Throughout the Arterial Tree. **Arterioscler Thromb. Vasc. Biol.**, Baltimore, v. 14, n. 1, p. 133-140, jan. 1994.

NIU, Y.; LI, S.; NA, L.; FENG, R.; LIU, L.; LI, Y.; CHANGHAO, S. Mangiferin decreases plasma free fatty acids through promoting its catabolism in liver by activation of AMPK. **Plos One**, San Francisco, v. 7, n. 1, p. 1-8, jan 2012

NORATA, G. D.; MARCHESI, P.; PASSAMONTI, S.; PIRILLO, A.; VIOLI, F.; CATAPANO, A. L. Anti-inflammatory and anti-atherogenic effects of catechin, caffeic acid and trans-resveratrol in apolipoprotein E deficient mice. **Atherosclerosis**, Limerick, v. 191, p. 265–271, jun 2007.

PALINSKI, W.; ORD, V. A.; PLUMP, A. S.; BRESLOW, J. L.; STEINBERG, D.; WITZTUM, J. L. ApoE-deficient mice are a model of lipoprotein oxidation in atherogenesis. Demonstration of oxidation-specific epitopes in lesions and high titers of autoantibodies to malondialdehyde-lysine in serum. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, Baltimore, v. 14, n. 4, p. 605-16, 1994.

PARDO-ANDREU, G. L.; PAIM, B. A.; CASTILHO, R. F.; VELHO, J. A.; DELGADO, R.; VERCESI, A. E.; OLIVEIRA, H.C.F. *Mangifera indica* L extract (Vimang®) and its main polyphenol mangiferin prevent mitochondrial oxidative stress in atherosclerosis-prone hypercholesterolemic mouse. **Pharmacol. Res.**, London, v. 57, p. 332-338, may 2008.

PRABHU, S.; JAINU, M.; SABITHA, K. E.; DEVI, S. C. S. Role of mangiferin on biochemical alterations and antioxidant status in isoproterenol induced myocardial infarction in rats. **J. Ethnopharmacol.**, Limerick, v. 107, n. 1, p. 126–133, aug. 2006.

PRABHU, S.; NARAYAN, S.; DEVI, S. S. C. Mechanism of Protective Action of Mangiferin on Suppression of Inflammatory Response and Lysosomal Instability in Rat Model of Myocardial Infarction. **Phytother Res.**, London, v. 23, n. 6, p. 756–760, jun. 2009.

REEVES, P. G.; NIELSEN, F. H.; FAHEY, G. C. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American institute of nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. **J. Nutrit.**, Rockville, v. 123, p. 1939-1951, nov. 1993.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RANVENTÓS, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. **Meth. Enzymol**, California, v. 299, p. 152-78, 1999.

TEDGUI, A.; MALLAT, Z. Cytokines in atherosclerosis: pathogenic and regulatory pathways. **Physiol. Rev**, Bethesda v. 86, n 2, p. 515-81, apr 2006.

XIA, X.; LING, W.; MA, J.; XIA, M.; HOU, M.; WANG, Q.; ZHU, H.; TANG, Z. An anthocyanin-rich extract from black rice enhances atherosclerotic plaque stabilization in apolipoprotein e-deficient mice. **J. Nutrit**, Rockville, v. 136, p. 2220–2225, aug. 2006

WAGNER, H.; BLADT, S.; ZGAINSKI, E. M. **Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas**. 1^a ed. Berlim: Springer Verlag, 1984, 320p.