

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos
Área de Bromatologia

Avaliação do efeito de extratos ricos em compostos fenólicos da jabuticaba-sabará (*Plinia jaboticaba* (Vell.) Berg) na prevenção da obesidade e do *diabetes mellitus* tipo 2

Márcio Hercules Caldas Moura

São Paulo

2016

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos
Área de Bromatologia

Avaliação do efeito de extratos ricos em compostos fenólicos da jaboticaba-sabará (*Plinia jaboticaba* (Vell.) Berg) na prevenção da obesidade e do *diabetes mellitus* tipo 2

Márcio Hercules Caldas Moura

Versão Original

Dissertação para obtenção do título de

MESTRE

Orientador: Prof. Dr. Maria Inés Genovese

São Paulo

2016

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Moura, Márcio Hercules Caldas
M929a Avaliação do efeito de extratos ricos em compostos fenólicos da jaboticaba-sabará (*Plinia jaboticaba* (Vell.) Berg) na prevenção da obesidade e do *diabetes mellitus* tipo 2 / Márcio Hercules Caldas Moura. -- São Paulo, 2016.
55p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental.
Orientador: Genovese, Maria Inés

1. Alimento : Composto fenólico : Ciência dos alimentos
2. Bromatologia 3. Obesidade 4. Diabetes mellitus I. T. II.
Genovese, Maria Inés, orientador.

641 CDD

MÁRCIO HERCULES CALDAS MOURA

Avaliação do efeito de extratos ricos em compostos fenólicos da jaboticaba-sabará (*Plinia jaboticaba* (Vell.) Berg) na prevenção da obesidade e do *diabetes mellitus* tipo 2

Comissão Julgadora da
Dissertação para obtenção do Título de Mestre

Prof. Dr. Maria Inés Genovese

Orientador

Presidente

1º examinador

2º examinador

São Paulo, _____ de _____ de 2016

Este trabalho é dedicado ao meu pai Expedito (*in memoriam*),
as minhas mães Ozany, Maria do Socorro e Rosilene
e à minha amada esposa Thiara.

Non Solus.

AGRADECIMENTOS

Ao Grande Arquiteto do Universo, a Primeira Causa, pela oportunidade de adquirir mais conhecimentos neste eterno caminho.

Ao meu pai e educador Expedito, a pessoa mais inspiradora e íntegra que já conheci, pela excelente educação e por enfatizar diariamente que a fé associada ao trabalho árduo é o melhor caminho para a vitória. Me lembro com carinho daqueles anos que diariamente sentávamos em frente a nossa casa, uma simplória construção de tábuas, sem luz elétrica e afastada da cidade, para lermos o máximo que podíamos antes do pôr do sol. Lamento por sua ausência neste momento importante. Saudades.

A minha mãe Ozany, a minha avó/mãe Maria do Socorro e a minha tia/mãe Rosilene, por se dedicarem a mim de diversas formas. Tudo o que faço é para tentar retribuir de alguma maneira tanto amor e carinho que recebo de vocês.

A minha amada esposa e companheira Thiara, por sonhar, acreditar e lutar diariamente ao meu lado. Obrigado, minha querida, por suavizar este difícil caminho que é tentar vencer na vida através da Educação. Sou profundamente agradecido por tudo o que você tem feito pelos nossos sonhos.

A minha orientadora Prof^a Maria Inés Genovese, pela paciência, dedicação e trabalho intenso nesta difícil tarefa de orientar e moldar aspirantes a pesquisadores. Sua dedicação faz toda a diferença.

A todos meus colegas de trabalho, especialmente àqueles mais próximos a mim e a este projeto, Alice, Carlos, Daniel, Flávia, Gabriela Cunha, Gabriela Lima, Helena, Heloísa, Marcela, Luana, Renata, Rosa, e Tatyane, pelo companheirismo e pelas mais variadas formas de ajuda. Sou feliz por trabalharmos juntos.

Aos professores das diversas disciplinas que cursei, a todos os funcionários da Faculdade de Farmácia, do biotério do Instituto de Ciências Biológicas I e aos colegas que fiz durante este curso. Peço desculpas por não agradecer a todos, um por um, nome por nome, porém vocês estão no meu coração.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de estudos e as diversas instituições que possibilitaram a realização deste trabalho.

Meus sinceros agradecimentos.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Estrutura química dos flavonoides (Adaptado de DEL RIO et al., 2013). 15
- Figura 2.** Proantocianidinas, ácido gálico, ácido elágico e taninos derivados (tanino gálico* e tanino elágico**) (Adaptado de DEL RIO et al., 2013). 16
- Figura 3.** Ácidos hidroxicinâmicos, seus derivados e estilbenos mais comuns (Adaptado de CROZIER, JAGANATHB e CLIFFORD, 2009). 17
- Figura 4.** Resumo do *design* experimental. EFS: extração em fase sólida; C18: octadecilsilano; PA: poliamida; HLS: Dieta rica em lipídios e sacarose; EAG: equivalente de ácido gálico; ITT: teste de tolerância à insulina; OGTT: teste oral de tolerância à glicose. 31
- Figura 5.** Cromatograma em 270 nm e espectro UV de glicosídeos de flavonoides e ácidos fenólicos dos extratos C18 (A) e PA (B). Nos espectros UV, as linhas azuis são as bandas de absorção dos extratos e as linhas vermelhas as bandas de absorção dos padrões. 36
- Figura 6.** Ingestão de água e ração (A), ingestão de energia e eficiência alimentar (B) de camundongos alimentados com dieta HLS e água (grupo HF) ou extratos fenólicos de jabuticaba por gavagem (C18 e PA). Valores são média \pm DP (n = 8-10/grupo). As linhas pontilhadas são os valores médios do grupo controle que não foram incluídos na análise estatística. *Calculado como: [ganho de massa corporal (g)/ingestão energética (kcal)] x 100. ^{A,B,C} Letras maiúsculas diferentes sobre as colunas indicam diferença estatística ($p < 0.05$). ^{a,b,c} Letras minúsculas diferentes sobre as colunas indicam diferença estatística ($p < 0.05$). ... 39
- Figura 7.** Massa corporal (A) e ganho de massa corporal (B) de camundongos alimentados com dieta HLS e água (grupo HF) ou extratos fenólicos de jabuticaba por gavagem (C18 e PA). Valores são média \pm DP (n = 8-10/grupo). A linha pontilhada é o valor médio do grupo controle que não foi incluído na análise estatística. * ($p < 0.04$) HF vs. Ct. ** ($p < 0.02$) HF vs. Ct e C18. # ($p < 0.02$) HF vs. demais grupos. Letras diferentes sobre as colunas indicam diferença estatística ($p < 0.05$). 39
- Figura 8.** Massa relativa \square ou absoluta \blacksquare do tecido adiposo branco inguinal (iTAB) [A], retroperitoneal (rTAB) [B], epididimal (eTAB) [C] e total (tTAB) [D] de camundongos alimentados com dieta HLS e água (grupo HF) ou extratos fenólicos de jabuticaba por gavagem (C18 e PA). Valores são média \pm DP (n = 8-10/grupo). As linhas pontilhadas são os valores médios do grupo controle que não foram incluídos na análise estatística. ^{A,B,C} Letras maiúsculas diferentes sobre as colunas indicam diferença estatística ($p < 0.05$). ^{a,b,c} Letras minúsculas diferentes sobre as colunas indicam diferença estatística ($p < 0.05$). 40
- Figura 9.** Glicemia de jejum e glicemia de jejum total (A), teste de tolerância à insulina e Kitt (B), teste oral de tolerância à glicose e área sob a curva (C), insulina plasmática, área sob a curva e índice HOMA-IR (D) de camundongos alimentados com dieta HLS e água (grupo HF) ou extratos fenólicos de jabuticaba por gavagem (C18 e PA). Valores são média \pm DP (n = 6-10/grupo). As linhas pontilhadas são os valores médios do grupo controle que não foram incluídos na análise estatística. * ($p < 0,05$) HF vs. PA. # ($p < 0,05$) HF vs. demais grupos. **HOMA-IR = (insulina X glicose)/22,5. Letras diferentes sobre as colunas indicam diferença estatística ($p < 0.05$). 44

Figura 10. Níveis plasmáticos de colesterol total (A), colesterol LDL (B), colesterol HDL (C), triacilgliceróis (D) e triacilgliceróis hepáticos (D) de camundongos alimentados com dieta HLS e água (grupo HF) ou extratos fenólicos de jabuticaba por gavagem (C18 e PA). Valores são média \pm DP (n = 6-10/grupo). As linhas pontilhadas são os valores médios do grupo controle que não foram incluídos na análise estatística. Letras diferentes sobre as colunas indicam diferença estatística ($p < 0.05$).....46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Caracterização química dos extratos ricos em fenólicos da jabuticaba-sabará obtidos por EFS em colunas de C18 ou PA.	37
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

%: porcentagem.	DHLNA: doença hepática lipídica não alcoólica.
≤: Menor igual.	DM2: <i>Diabetes mellitus</i> tipo 2.
®: Marca registrada.	EAG: equivalente de ácido gálico.
µg: micrograma.	EFS: extração em fase sólida.
µL: microlitro.	et al.: e colaboradores.
µm: micrometro.	GLUT 4: transportador de glicose 4.
µmol: micro mol.	HDL: lipoproteína de alta densidade colesterol.
dL: decilitro.	HLS: dieta rica em lipídios e sacarose.
g: grama.	IDF: Federação Internacional de Diabetes.
g: gravitacional.	IL-6: interleucina-6.
kg: quilograma.	IMC: Índice de Massa Corporal.
L: litro.	ITT: Teste de Tolerância à Insulina.
m/v: massa por volume.	LDL: lipoproteína de baixa densidade colesterol.
mg: miligrama.	MCP-1: proteína quimiotática para monócitos.
mL: mililitro	NHANES: Pesquisa Nacional de Saúde e Nutrição dos Estados Unidos.
N: normal.	OGTT: Teste Oral de Tolerância à Glicose.
ng: nanograma	OMS: Organização Mundial da Saúde.
nm: nanômetro.	PKC: proteína quinase C.
nmol/L: nano mol/L.	RI: resistência à insulina.
°C: graus Celsius.	SGLT1: transportador de glicose dependente de sódio.
pH: potencial hidrogeniônico.	SM: síndrome metabólica.
UI: unidade internacional.	TNF-α: fator de necrose tumoral-alfa.
v/v/v: volume por volume por volume.	TROLOX: hidroxí-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-ácido carboxílico.
CBA: compostos bioativos de alimentos.	UV: ultravioleta.
CEAGESP: Companhia de Entrepostos e Armazéns Gerais de São Paulo.	
CLAE: cromatografia líquida de alta eficiência.	
DCNT: doenças crônicas não transmissível.	
DCV: doenças cardiovasculares.	

3.2.3.5. Conteúdo hepático de triacilgliceróis	32
3.2.4. Análise estatística	34
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
4.1. Caracterização química dos extratos	35
4.2. Efeitos <i>in vivo</i> dos extratos fenólicos da jabuticaba-sabará.....	38
4.2.1. Balanço energético, massa corporal e adiposidade.....	38
4.2.2. Metabolismo da glicose	43
4.2.3. Perfil lipídico	46
5. CONCLUSÕES	48
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49

RESUMO

MOURA, M. H. C. **Avaliação do efeito de extratos ricos em compostos fenólicos da jabuticaba-sabará (*Plinia jaboticaba* (Vell.) Berg) na prevenção da obesidade e do diabetes mellitus tipo 2.** (Dissertação de Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

A jabuticaba-sabará (*Plinia jaboticaba* (Vell.) Berg) é uma fruta nativa da Mata Atlântica que possui alto teor de antocianinas, proantocianidinas e elagitaninos, fenólicos associados com diversos benefícios à saúde. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de dois extratos ricos em compostos fenólicos da jabuticaba-sabará sobre a massa corporal e o metabolismo da glicose e dos lipídios de camundongos alimentados com dieta rica em lipídios e sacarose (HLS). Foram utilizados 40 camundongos machos C57BL/6J com oito semanas de idade e alimentados com ração padrão para camundongos ou dieta HLS durante oito semanas. Os animais foram divididos aleatoriamente em quatro grupos de dez. Os dois primeiros grupos receberam, respectivamente, ração padrão para camundongos ou dieta HLS e água *ad libitum*, sendo denominados, nesta ordem, grupo controle (Ct) e grupo HF. Os dois últimos grupos foram alimentados com dieta HLS recebendo, por gavagem, os extratos ricos em compostos fenólicos, sendo denominados grupo C18 e PA, respectivamente. Para o grupo C18 foi administrado o extrato obtido por extração em fase sólida (EFS) em colunas de octadecilsilano (C18), possuindo maior concentração de taninos. O grupo PA recebeu o extrato obtido por EFS em colunas de poliamida (PA), resultando em um extrato com menor concentração de taninos em relação ao extrato C18. A dose de fenólicos administrada aos animais foi de 50 mg equivalentes de ácido gálico (EAG)/kg de massa corporal para ambos os grupos. Na sexta semana foi realizado o teste de tolerância à insulina (ITT) e, na sétima, o teste oral de tolerância à glicose (OGTT). Além da massa corporal, os animais foram também avaliados quanto a glicemia, insulinemia e perfil lipídico (colesterol total, HDL, LDL e triacilgliceróis). Os grupos suplementados apresentaram menor ganho de massa dos tecidos adiposos brancos em comparação ao grupo HF (43% para o grupo C18 e 28% para o grupo PA). Além disto, ambos os extratos atenuaram os níveis de glicose e o extrato C18 melhorou os níveis de insulina plasmática, colesterol total e triacilgliceróis hepáticos. Portanto, extratos ricos em compostos fenólicos da jabuticaba-sabará foram eficientes na prevenção do ganho de massa corporal, evitando o crescimento excessivo dos tecidos adiposos brancos, de altos níveis de glicose, insulina, colesterol total e triacilgliceróis hepáticos em camundongos alimentados com dieta rica em lipídios e sacarose.

PALAVRAS-CHAVES: jabuticaba; compostos fenólicos; obesidade, C57BL/6J.

ABSTRACT

MOURA, M. H. C. **Evaluation of the effect of phenolic-rich extracts from jaboticaba-sabará (*Plinia jaboticaba* (Vell.) Berg) in prevention of obesity and type 2 diabetes mellitus.** (Dissertação de Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Sabará jaboticaba is a Brazilian Atlantic Forest fruit rich in anthocyanins, proanthocyanidins and ellagitannins, phenolic compounds that have been associated to several benefits to health. This work aimed to evaluate the effect of the administration of two phenolic-rich extracts from Sabará jaboticaba on body weight gain and on glucose and lipid metabolism of high-fat-sucrose-fed mice. Forty 8-week old male C57BL/6J mice were fed a low-fat chow diet or a high fat, high-sucrose (HFHS) diet for 8 weeks. The animals were randomly divided into four groups of ten mice each. The first two groups received, respectively, a low-fat chow diet or a HFHS diet and water *ad libitum* and were nominated, in order, control (Ct) and HF group. The last two groups were fed a HFHS diet and received by gavage the phenolic-rich extracts, being respectively nominated C18 and PA group. The C18 group received an extract obtained by solid phase extraction (SPE) in octadecylsilane (C18) column, therefore the most concentrated in tannins. The PA group received an extract obtained by SPE in polyamide (PA) column, therefore less concentrated in tannins. The dose of phenolics administered to animals was of 50 mg acid gallic equivalent (GAE)/kg body weight, for both groups. The insulin tolerance test (ITT) was performed in the sixth week and the oral glucose tolerance test (OGTT) in the seventh week. In addition, the animals were assessed for glycaemia, insulinemia and lipid profile (total-, HDL-, LDL-cholesterol and triacylglycerols). The supplemented groups had lower white adipose tissue gain than HF group (43% for the C18 group and 28% for the PA group). In addition, both extracts attenuated hyperglycemia and the C18 extract improved the plasmatic insulin levels, total cholesterol and hepatic triacylglycerol content. Thus, phenolic-rich extracts from Sabará jaboticaba were effective in preventing body weight gain, avoiding the overgrowth of white adipose tissues, and high levels of glucose, insulin, total cholesterol and hepatic triacylglycerols in HFHS-fed C57BL/6J mice.

Keywords: jaboticaba, phenolic compounds, obesity, C57BL/6J mice.

1. INTRODUÇÃO

O Brasil possui aproximadamente um terço da flora mundial distribuída em 10 biomas e, portanto, uma magnífica biodiversidade decorrente dessa riqueza natural. A Mata Atlântica é um destes biomas e estende-se de forma ambientalmente heterogênea pelos 3.300 km da costa brasileira. Encontra-se distribuída em diferentes condições topográficas e climáticas e em consequência a diversidade de sua fauna e flora é impressionante: 8.000 espécies vegetais e 700 espécies animais endêmicas (MYERS et al., 2000; TABARELLI et al., 2005).

A jabuticabeira (*Plinia* sp.) pertence à família Myrtaceae, predominante do bioma Mata Atlântica e das regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste brasileiras, além de dispersões secundárias no Paraguai e Argentina. Existem nove espécies, uma delas já extinta, cinco encontradas em centros de pesquisas e três espalhadas pela natureza ou cultivadas, são elas: a jabuticaba-de-cabinho (*Plinia trunciflora* (Berg) Mattos), a jabuticaba-paulista (*Plinia cauliflora* (DC.) Berg) e a jabuticaba-sabará (*Plinia jaboticaba* (Vell.) Berg), sendo esta a mais conhecida e cultivada, principalmente nos estados brasileiros de Minas Gerais e São Paulo (CITADIN; DANNER; SASSO, 2010).

A jabuticaba destaca-se entre as frutas nativas brasileiras pelo alto potencial comercial devido as suas propriedades sensoriais agradáveis, sendo consumida tanto *in natura* como na forma de geleias, doces, bebidas, sorvetes, etc. É indicada como planta ornamental por sua exuberância e utilizada na medicina popular no combate a doenças respiratórias. Sua produção encontra-se em amplo crescimento com venda assegurada em grande parte do país. O Código Florestal Brasileiro permite que a jabuticabeira reconstitua a reserva legal das propriedades rurais tornando-se, portanto, uma ótima alternativa para a agricultura familiar, capaz de proporcionar renda às famílias extrativistas que a comercializam (BRASIL, 2012; CITADIN; DANNER; SASSO, 2010; DONADIO, 2000).

1.1. Compostos bioativos de alimentos

A importância dos macronutrientes e dos micronutrientes para a saúde humana está bem definida. Crescentes evidências científicas comprovam que outros componentes, os denominados compostos bioativos de alimentos (CBAs), são também promotores da saúde a longo prazo, reduzindo o risco de diversas doenças crônicas não transmissíveis (DCNT), tais como câncer, *diabetes mellitus* tipo 2 e doenças cardiovasculares (DEL RIO et al., 2013).

Os CBAs são metabólitos secundários de plantas, utilizados como defesa contra danos diversos (infecções microbianas, agentes alelopáticos, excesso de radiação UV), bio-sinalizadores em síntese metabólica e, também, para atrair polinizadores. Apresentam estrutura química variada e já são descritos aproximadamente 8.000 tipos diferentes (DEL RIO et al., 2013).

Os compostos fenólicos formam um dos principais grupos de CBAs e são assim denominados por possuírem ao menos um anel aromático mono ou polissubstituído por hidroxilas. Segundo Crozier, Jaganath e Clifford (2009), os compostos fenólicos se dividem em dois grupos: flavonoides e não-flavonoides. Os flavonoides são polifenóis cuja estrutura básica compreende dois anéis aromáticos unidos por três carbonos C6—C3—C6, ou seja, difenilpropanos. São os mais numerosos do reino vegetal e estão presentes em maior proporção nas folhas e na casca das frutas. A **Figura 1** mostra a estrutura básica dos flavonoides e suas principais classes.

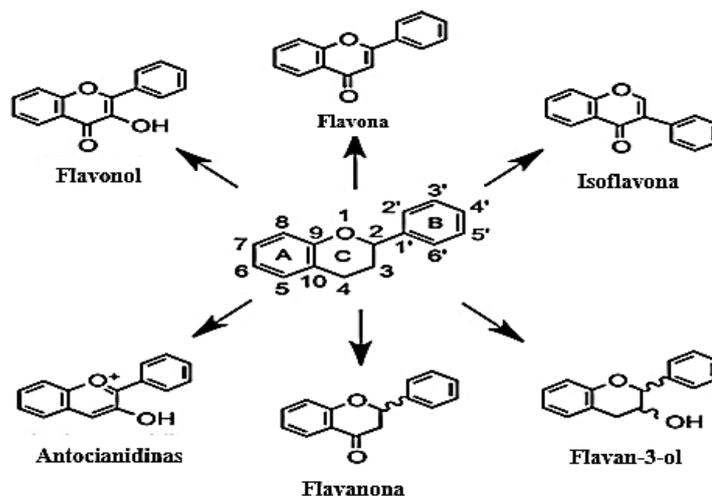


Figura 1. Estrutura química dos flavonoides (Adaptado de DEL RIO et al., 2013).

Os flavan-3-óis formam a subclasse de flavonoides de estrutura química mais complexa, pois variam de monômeros, como a catequina, a oligômeros e polímeros, denominados proantocianidinas. As proantocianidinas são também conhecidas como taninos condensados e, por sua vez, são classificadas em Tipo A ou Tipo B. Aquelas pertencentes ao primeiro grupo possuem uma ligação éter a mais entre os carbonos C2 e C7. Quando são formadas por (+)-catequina e seu isômero, a (-)-epicatequina, pertencem ao Tipo B. As procianidinas são as mais abundantes proantocianidinas em plantas, sendo formadas exclusivamente por monômeros de (epi)catequina (**Figura 2**) (CROZIER; JAGANATH; CLIFFORD, 2009).

Os ácidos fenólicos são os principais compostos fenólicos não-flavonoides. Os ácidos fenólicos compreendem os ácidos hidroxibenzoicos e derivados e os ácidos hidroxicinâmicos e derivados (**Figura 2**). O ácido gálico e o ácido elágico são os principais representantes dos ácidos hidroxibenzoicos. O ácido gálico é o mais comum dos ácidos fenólicos e é precursor de outros compostos bioativos, por exemplo, taninos gálicos. O ácido elágico é a molécula base para a formação dos taninos elágicos, denominados taninos hidrolisáveis. Uvas, vinhos, chá verde e chá preto são alimentos ricos em ácido gálico. Frutas vermelhas como framboesa, morango, amora, romã e outras como nozes e avelãs são ricas em taninos elágicos (CLIFFORD; SCALBERT, 2000; CROZIER; JAGANATH; CLIFFORD, 2009).

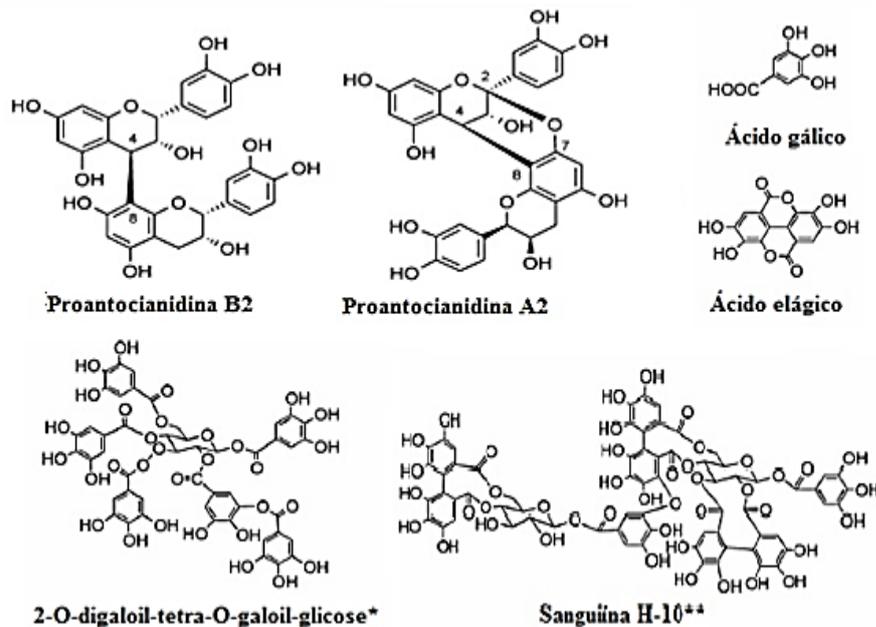


Figura 2. Proantocianidinas, ácido gálico, ácido elágico e taninos derivados (tanino gálico* e tanino elágico**) (Adaptado de DEL RIO et al., 2013).

Os ácidos hidroxicinâmicos mais comuns são os ácidos caféico, *p*-cumárico, ferúlico e sináptico. Ocorrem geralmente conjugados com outros compostos, tais como o ácido tartárico ou o ácido quínico e são denominados coletivamente como ácidos clorogênicos (**Figura 3**). Os ácidos clorogênicos 3-O, 4-O e 5-O-cafeoilquínico formam aproximadamente 10% dos grãos de café da espécie *Coffea canephora*. Como o café é mundialmente apreciado, para muitas pessoas o consumo regular desta bebida é a principal fonte de fenólicos da dieta. Encontrados em quantidade muito inferior na dieta habitual estão os não-flavonoides estilbenos com estrutura química C6—C2—C6. O resveratrol é o principal estilbeno e o vinho tinto contém grande quantidade deste composto (**Figura 3**) (CROZIER; JAGANATH; CLIFFORD, 2009).

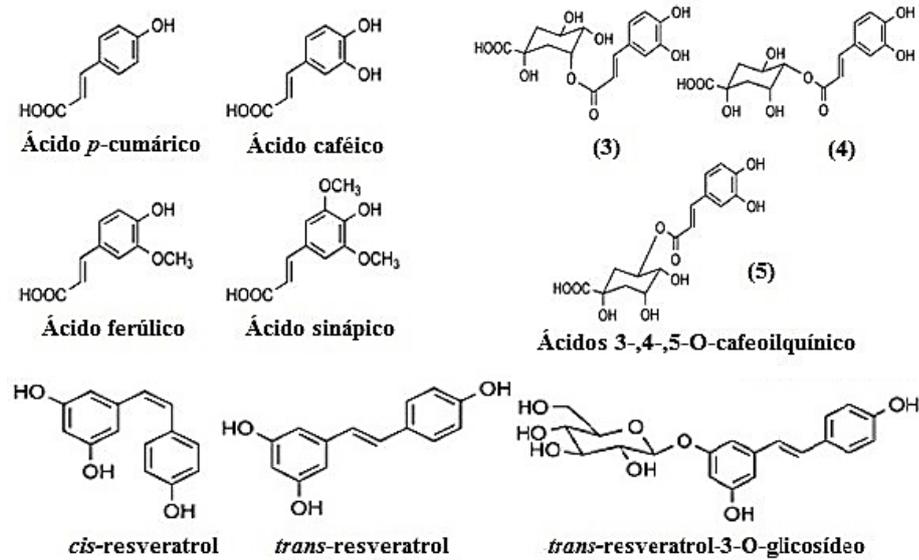


Figura 3. Ácidos hidroxicinâmicos, seus derivados e estilbenos mais comuns (Adaptado de CROZIER, JAGANATHB e CLIFFORD, 2009).

1.2. Compostos fenólicos e obesidade

A obesidade é um grave problema de saúde pública, pois predispõe o indivíduo a diversas DCNT. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estimou, em 2014, mais de meio bilhão de adultos classificados como obesos [Índice de Massa Corporal (IMC) $\geq 30 \text{ kg/m}^2$]. A situação agrava-se porque, em todo o mundo, aproximadamente 42 milhões de crianças com idade inferior a cinco anos também estão com sobrepeso e crianças acima do peso geralmente tornam-se adultos obesos. Em aproximadamente três décadas, entre os anos de 1980 e 2008, a prevalência de obesidade praticamente dobrou e estima-se em 3,4 milhões o número de óbitos associados às doenças advindas do sobrepeso e da obesidade (WHO, 2014).

A obesidade é uma doença crônica complexa, de mecanismos fisiopatológicos ainda não totalmente esclarecidos, variando em função da etnia, da idade e do gênero do indivíduo. Está entre os principais fatores associados ao desenvolvimento da síndrome metabólica (SM) (EMANUELA et al., 2012). O excesso de tecido adiposo aumenta a síntese de citocinas pró-inflamatórias, tais como a interleucina-6 (IL-6), o fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) e a proteína quimiotática para monócitos (MCP-1). Na obesidade, o aumento de macrófagos no tecido adiposo inicia-se pelo processo de migração de monócitos do sangue para esse tecido, mediado pela MCP-1, onde diferenciam-se em macrófagos. O recrutamento e a infiltração de macrófagos no tecido adiposo resultam em inflamação local, aumentando ainda mais a concentração plasmática de citocinas pró-inflamatórias, exercendo papel decisivo no desenvolvimento da resistência periférica à insulina (BASTOS; ROGERO; ARÊAS, 2009).

O tipo e a localização dos depósitos de tecido adiposo branco pelo corpo, assim como a taxa de crescimento e o grau de vascularização dos adipócitos definem o estado de inflamação dos mesmos. A obesidade potencializa os riscos à saúde quando os depósitos de tecido adiposo branco estão próximos às vísceras, caracterizando a adiposidade central ou abdominal (BASTOS; ROGERO; ARÊAS, 2009; EMANUELA et al., 2012).

Segundo a Federação Internacional de Diabetes (IDF), uma circunferência abdominal elevada associada com pelo menos dois destes quatro fatores de risco, a saber, níveis elevados de triacilgliceróis, pressão arterial e glicemia em jejum e concentração diminuída de colesterol HDL, predispõe o indivíduo à SM. Dados da Pesquisa Nacional de Saúde e Nutrição dos Estados Unidos (NHANES) confirmam que o acúmulo de gordura abdominal, independente de outros fatores, aumenta o risco de doenças cardiovasculares e *diabetes mellitus* tipo 2 (DM2), doenças características da SM. Além do mais, este estudo também sugere uma relação positiva entre circunferência abdominal aumentada e risco de morte (VAN GAAL et al., 2006).

Depósitos de gordura abdominal aumentam a quantidade de ácidos graxos livres no sistema porta hepático que, chegando ao fígado, potencializam a produção de triacilgliceróis, inibindo a depuração hepática da insulina e causando hiperinsulinemia, que em estado crônico e avançado resulta em resistência à insulina (RI), fator crucial para o desenvolvimento do DM2 (ROBERTS; HEVENER; BARNARD, 2014). A RI e a adiposidade visceral também contribuem para o aumento do risco de doenças cardiovasculares pois, ao desequilibrarem a homeostase da secreção de citocinas pró-inflamatórias, causam disfunção endotelial (VAN GAAL et al., 2006).

A prevenção e o tratamento da obesidade requerem modificações não apenas no estilo de vida, mas também nos hábitos alimentares. Uma dieta saudável deve conter diariamente legumes, nozes, grãos integrais e aproximadamente 400 g (5 porções) de frutas e hortaliças. Frutas e hortaliças são ricas em compostos fenólicos e tais compostos tem sido atribuída a capacidade de aumentar o gasto energético e a oxidação lipídica, ajudando no combate à obesidade (HURSEL; WESTERTERP-PLANTENGA, 2013; WHO/FAO, 2004).

Uma dieta rica em compostos fenólicos está associada à redução dos riscos relacionados à obesidade. Por exemplo, o consumo regular de morangos, espinafre e outras frutas e hortaliças é capaz de aumentar a capacidade antioxidante do plasma em humanos, reduzir os níveis de glicemia, colesterol total e triacilgliceróis. Compostos fenólicos também se mostraram eficientes na redução da adiposidade central em adultos jovens e atenuaram sua ocorrência (ABETE et al., 2011; HERMSDORFF et al., 2011; SAE-TAN; GROVE; LAMBERT, 2011).

No entanto, há também estudos que não encontram relação entre a ingestão de fenólicos e a diminuição da massa corporal e/ou adiposidade em animais alimentados com dietas ricas em gordura e sacarose e, em humanos, não está claramente demonstrado a capacidade dos compostos fenólicos de atenuarem os riscos das DCNT (DEL RIO et al., 2013). Diante disto, diversos estudos destacam, oportunamente, a necessidade da realização de pesquisas mais elaboradas com melhor caracterização química dos compostos avaliados e/ou uma população amostral adequada de animais ou de indivíduos suficiente para elucidar satisfatoriamente as vias bioquímicas de ação dessas substâncias (DEL RIO et al., 2013).

1.3. Compostos fenólicos e DM2

Controlar o nível de glicose no sangue, ou seja, evitar a glicotoxicidade, é essencial para a saúde e fundamental para que tratamentos contra as desordens metabólicas sejam eficientes. O estilo de vida moderno, com hábitos majoritariamente sedentários e alimentação hipercalórica, contribui para a crescente prevalência do diabetes. A OMS estimou que em 2014 a prevalência desta doença em adultos com mais de 18 anos foi de 9% em todo o mundo e, em 2012, algo próximo a 1,5 milhões de óbitos foram diretamente relacionados à hiperglicemia (BARRETT et al., 2013; WHO, 2014).

Experimentos em animais demonstram que dietas ricas em sacarose são capazes de causar resistência à glicose, diminuir a secreção de insulina e aumentar a atividade da sucrase no intestino delgado, resultando em níveis elevados de glicose no sangue (SUMIYOSHI; SAKANAKA; KIMURA, 2006). A glicotoxicidade é a maior causa de morbimortalidade no DM2, danificando os rins, a retina, o sistema nervoso periférico e contribuindo, em estágios mais avançados, para a falência das células β -pancreáticas e para o desenvolvimento da RI (BIDEN et al., 2014; SUMIYOSHI; SAKANAKA; KIMURA, 2006). Portanto, manter o nível de glicose dentro dos parâmetros saudáveis é determinante para o sucesso na redução dos riscos à saúde causados pela glicotoxicidade.

O DM2 corresponde a aproximadamente 90% dos casos de diabetes, possui patogênese complexa e é causada por associação entre fatores genéticos e ambientais. Embora sua etiologia específica não esteja completamente elucidada, a combinação de RI com disfunção das células β -pancreáticas é fundamental para a gênese dessa doença, ou seja, quando a célula β -pancreática não é mais capaz de manter a insulinemia necessária para superar a RI, ocorre o desenvolvimento do DM2 (PIRES; COZZOLINO, 2013; SHIMIZU, 2010).

A RI é um grave problema de saúde, resultado da incapacidade da insulina de exercer corretamente sua função nos tecidos alvos, ou seja, a de ativar as vias metabólicas que transportam a glicose extracelular para dentro das células. Com o passar do tempo a RI desenvolve a hipertensão, a dislipidemia e a inflamação sistêmica, além de danificar o pâncreas irreversivelmente (ANHÊ et al., 2013; CHOI et al., 2008). Em termos nutricionais, as causas da RI poderiam se resumir a uma alimentação hiperlipídica com alto teor de carboidratos refinados associada ao sedentarismo, podendo ser maximizada por fatores genéticos, tais como a predisposição para a adiposidade abdominal (ROBERTS; HEVENER; BARNARD, 2014).

Diversos estudos, principalmente *in vitro*, tem comprovado que os compostos fenólicos podem contribuir para manter os níveis de glicose dentro dos parâmetros saudáveis. Estes compostos podem diminuir a glicemia pós-prandial ao inibir a ação de enzimas digestivas responsáveis pela transformação dos carboidratos disponíveis em glicose, tais como a α -glicosidase, a α -amilase e a amiloglicosidase. Mostraram-se também capazes de reduzir a captação de glicose via transportador de glicose dependente de sódio (SGLT1) pelos enterócitos, apresentando, portanto, propriedade hipoglicemiante. Há estudos que relatam sua capacidade de promover a translocação do transportador de glicose 4 (GLUT4) no músculo esquelético e no tecido adiposo de animais, reduzindo a hiperglicemia, além de inibir enzimas associadas a glicogenólise e/ou gliconeogênese, contribuindo para a regulação do metabolismo glicêmico (ADER et al., 2001; ANHÊ et al., 2013; CHENG et al., 2012; GONÇALVES; LAJOLO; GENOVESE, 2010; YAMASHITA et al., 2012).

1.4. Compostos fenólicos e dislipidemia

Quando a concentração de ácidos graxos circulantes ultrapassa a capacidade de armazenamento do tecido adiposo, estes são acumulados nos tecidos periféricos e podem produzir efeitos indesejáveis à saúde, a lipotoxicidade. A ingestão crônica de dietas hiperlipídicas resulta em lipotoxicidade. A OMS trabalha para que os países adotem políticas mais rigorosas no controle da ingestão de nutrientes que possam contribuir para este quadro clínico, limitando, por exemplo, o consumo de ácidos graxos saturados através da eliminação ou drástica redução da gordura vegetal hidrogenada na preparação dos alimentos industrializados (BIDEN et al., 2014; WHO, 2014).

Em camundongos, o nível elevado de ácidos graxos livres circulantes, resultante da ingestão crônica de dietas com alto teor de gordura, desenvolveu RI e hiperglicemia. Esses

animais também apresentaram considerável ganho de peso, além de hiperlipidemia e hiperleptinemia (SUMIYOSHI; SAKANAKA; KIMURA, 2006). Modelos experimentais também correlacionam positivamente a lipotoxicidade com o estresse do retículo endoplasmático que, por sua vez, está associado ao mau funcionamento das células β -pancreáticas de portadores de DM2 (BIDEN et al., 2014).

No fígado, o excesso de lipídios é capaz de causar resistência hepática à insulina e hiperglicemia. Entre os mecanismos propostos para esta associação está aquele que considera o diacilglicerol fundamental para o desenvolvimento destas desordens metabólicas. O excesso de diacilglicerol hepático é capaz de ativar a proteína quinase C (PKC), esta, por sua vez, reduz a fosforilação da tirosina do substrato receptor de insulina 2 (IRS2), inibindo a sinalização insulínica, impedindo, portanto, a captação da glicose plasmática, o que reduz a glicogênese e aumenta a glicogenólise e a gliconeogênese (PERRY et al., 2014).

A ingestão crônica de lipídios aumenta o risco de desenvolvimento da doença hepática lipídica não alcoólica (DHLNA), a doença hepática mais comum no mundo ocidental. Ocorre quando lipídios são armazenados nos hepatócitos sem o consumo excessivo de álcool. Entre os principais fatores de risco para o desenvolvimento da DHLNA está a RI, que prejudica tanto o metabolismo da glicose quanto o dos lipídios, está presente no DM2 e pode manifestar-se na obesidade e na SM (GOEDEKE et al., 2014).

Diversos estudos relatam a capacidade dos compostos fenólicos de contribuir com a regulação do metabolismo lipídico de formas variadas. Por exemplo, *in vitro*, fenólicos inibiram a lipase pancreática, apresentando, portanto, potencial para reduzir a absorção de lipídios (AL-MUAMMAR; KHAN, 2012; MARRELLI et al., 2013). Fenólicos do alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) e da romã (*Punica granatum*), por exemplo, aumentaram os níveis do colesterol HDL e reduziram os níveis de colesterol total, colesterol LDL e triacilgliceróis plasmáticos em modelo animal (AFONSO et al., 2013; AL-MUAMMAR; KHAN, 2012). Extrato rico em proantocianidinas de sementes de uvas foi capaz de regular a expressão de microRNAs associados ao metabolismo hepático de lipídios, contribuindo para a prevenção da obesidade e da SM (BASELGA-ESCUDERO et al., 2015).

O aumento da quantidade de colesterol LDL e a diminuição do colesterol HDL são fatores indicativos do risco de doenças cardiovasculares (DCV). Embora não esteja claro se a hipercolesterolemia agrava ainda mais as chances de DCV em indivíduos obesos, é fato que a RI aumenta substancialmente o risco destas doenças naqueles que possuem adiposidade central (VAN GAAL et al., 2006). Há evidências positivas da ação de antocianinas, consumidas puras

ou em sucos concentrados, na melhoria da função vascular ao reduzir a inflamação sistêmica e aumentar a expressão da enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS), que possui ação vasodilatadora (DEL RIO et al., 2013).

Portanto, há fortes indícios de que os compostos fenólicos contribuem com a regulação do metabolismo da glicose e dos lipídios, protegendo o organismo dos problemas advindos da obesidade, do DM2, da dislipidemia e da SM por possuírem propriedades antioxidantes, antimutagênicas, anti-inflamatórias, antitrombóticas e anticancerígenas (DEL RIO et al., 2013).

1.5. Jabuticaba e compostos fenólicos

Diversos compostos fenólicos mostram-se promissores na redução do risco de DCNT. Entre estes compostos, as proantocianidinas, os elagitaninos e as antocianinas destacam-se por sua capacidade antioxidante e anti-inflamatória, além de auxiliarem na regulação do metabolismo da glicose e dos lipídios (DEL RIO et al., 2013). A jabuticaba possui alto teor destes compostos fenólicos. É um dos frutos brasileiros mais ricos em proantocianidinas e antocianinas, possuindo também, entre 35 frutas nativas brasileiras, as maiores concentrações de ácido elágico livre e total (ABE; LAJOLO; GENOVESE, 2012). Além desta composição fenólica potencialmente benéfica ao organismo, seu aroma e sabor agradáveis e sua oferta durante vários meses do ano, possibilita seu consumo pela população brasileira tanto *in natura* quanto em diversas preparações, tais como doces e bebidas, dispensando processos industriais e comerciais complexos para sua utilização.

Alezandro et al. (2013) compararam as duas espécies de jabuticaba mais cultivadas e comercializadas no Brasil, ou seja, Paulista e Sabará, em relação a composição centesimal e mineral, o perfil fenólico e a capacidade antioxidante *in vitro*, em diferentes frações da fruta (casca, polpa, semente) e em diferentes estágios de maturação. Seus resultados atestam a excelente característica nutritiva dos frutos de ambas as espécies possuindo, por exemplo, altas concentrações de potássio, manganês e cobre. A variedade Sabará superou a Paulista em relação ao conteúdo fenólico, capacidade antioxidante *in vitro*, concentração de proantocianidinas, ácido elágico livre e total. Além disso, a partir dos resultados obtidos, ficou evidente que a fruta inteira, isto é, com casca, polpa e semente, e em seu máximo estágio de maturação, possui maior potencial benéfico à saúde. Por estes motivos, o fruto inteiro e completamente maduro da variedade Sabará foi escolhido para este estudo.

Dados anteriores indicaram também que os fenólicos da jabuticaba-sabará, na dose aproximada de 50 mg equivalente de ácido gálico (EAG)/kg de massa corporal administrados a ratos induzidos ao diabetes por estreptozotocina, foram potencialmente benéficos à saúde destes animais, melhorando diversos indicadores metabólicos (ALEZANDRO; GRANATO; GENOVESE, 2013). Diante disto, no presente trabalho, dois extratos ricos em compostos fenólicos da jabuticaba-sabará, com maior ou menor concentração de taninos, ambos na dose supracitada, foram avaliados na prevenção do ganho de massa corporal e na regulação do metabolismo da glicose e dos lipídios de camundongos C57BL/6J alimentados com dieta rica em lipídios e sacarose.

1.6. Camundongos C57BL/6J no estudo da obesidade e do DM2 induzidos por dieta

Diversos modelos animais têm sido desenvolvidos para o estudo da obesidade e do DM2. Porcos, gatos, cachorros, coelhos, ratos e camundongos são algumas das opções existentes. No entanto, modelos que utilizam animais grandes apresentam algumas dificuldades, como o alto custo de manutenção e, por isso, são bem menos utilizados. Roedores apresentam diversas vantagens como modelos experimentais, são pequenos, onívoros, com comportamento menos violento, permitindo manuseio, e baixo custo de manutenção. Além disto e mais importante, roedores podem desenvolver desordens metabólicas com características muito semelhantes aos seres humanos. Dentre os roedores, os camundongos C57BL/6J vem sendo amplamente utilizados por diversos pesquisadores (ISLAM; WILSON, 2012).

Há mais de duas décadas camundongos C57BL/6J são usados como modelos animais no estudo da obesidade e do DM2 induzidos por dieta hiperlipídica e, portanto, foram escolhidos para a realização deste estudo. Estes animais são geneticamente predispostos à obesidade e ao DM2 tornando-se obesos após um período de 8 a 16 semanas expostos a uma dieta na qual 40 a 60% das calorias são de origem lipídica. Como a obesidade é um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento do DM2, há estudos que relatam algumas das suas características já a partir da quarta semana de exposição à dieta. No entanto, é após períodos bem maiores de alimentação que se acentuam a resistência à insulina, a tolerância à glicose, a dislipidemia e a hiperglicemia nesses animais. Camundongos C57BL/6J não costumam desenvolver diabetes com glicosúria nem com níveis de glicose superiores a 300 mg/dL, pois embora tornem-se resistentes à insulina não apresentam falência das células- β pancreáticas (HARIRI; THIBault, 2010; ISLAM; WILSON, 2012).

2. OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar o potencial de extratos ricos em compostos fenólicos da jabuticaba-sabará (*Plinia jaboticaba* (Vell.) Berg) na prevenção da obesidade e do *diabetes mellitus* tipo 2 em camundongos alimentados com dieta rica em lipídios e sacarose.

Os objetivos específicos foram:

- Caracterizar quimicamente dois extratos ricos em fenólicos obtidos a partir da jabuticaba-sabará, a saber, com maior ou menor concentração de taninos, em relação ao conteúdo de fenólicos totais, proantocianidinas, ácido elágico total, elagitanninos, flavonoides, capacidade antioxidante e inibição *in vitro* das enzimas lipase pancreática e α -glicosidase.

- Avaliar o efeito da administração de dois extratos ricos em fenólicos da jabuticaba-sabará, a saber, com maior ou menor concentração de taninos, na prevenção do ganho de massa corporal e adiposidade, no metabolismo da glicose e no perfil lipídico de camundongos C57BL/6J alimentados com dieta rica em lipídios e sacarose por oito semanas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material

A jabuticaba-sabará madura foi obtida na Companhia de Entrepósitos e Armazéns Gerais de São Paulo (CEAGESP) da empresa produtora Frutas Unidos Ltda. Os frutos foram higienizados, congelados em nitrogênio líquido e liofilizados integralmente. Após esta etapa, foram pulverizados em gral ou, quando necessário, em um moinho analítico (A10 S2, IKA Works Inc., Wilmington, NC, E.U.A.) sob refrigeração com nitrogênio líquido e posteriormente armazenados em freezer a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ para futuras análises.

3.2. Métodos

3.2.1. Obtenção dos extratos de compostos fenólicos

Os extratos fenólicos foram obtidos a partir da extração hidrometanólica da amostra liofilizada. Uma solução de metanol/água/ácido acético (70:30:5 v/v/v) foi utilizada para as extrações à razão de 1:25 (m/v). Após 2 horas sob agitação a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, a mistura foi filtrada a vácuo, utilizando-se papel de filtro Whatman nº 1 e o resíduo foi re-extraído mais duas vezes (por 30 minutos cada) nas mesmas condições. Em seguida, o metanol foi eliminado da solução utilizando-se um rotaevaporador (Rotavapor R-210; Büchi, Suíça) em uma temperatura $\leq 37\text{ }^{\circ}\text{C}$. O extrato foi ressuscendido em água destilada para a realização da extração em fase sólida (EFS).

A EFS foi realizada utilizando-se colunas de octadecilsilano (C18) (Supelclean™ LC-18, Supelco) ou poliamida (PA) (SC6, Macherey-Nagel GmbH and Co., Duren, Alemanha) na proporção de 1 g de polímero para cada 25 mL de extrato aquoso. As colunas foram pré-condicionadas pela passagem de 20 mL de metanol e 60 mL de água por grama de cada polímero utilizado. Após a passagem do extrato, as colunas foram lavadas com água e a eluição dos compostos fenólicos foi feita com metanol, seguido do mesmo volume de metanol/amônia (99,5:0,5) para as colunas PA. Finalmente, os extratos foram rotaevaporados e ressuscendidos em água na concentração desejada.

3.2.2. Caracterização química dos extratos

3.2.2.1. Conteúdo total de fenólicos

Foi determinado através da capacidade redutora do Folin-Ciocalteu segundo Singleton, Orthofer e Lamuera-Raventos (1999). A 250 μL dos extratos fenólicos, obtidos da forma supracitada, ou diluição adequada dos mesmos, foram adicionados 250 μL do reagente Folin-Ciocalteu e 2 mL de água destilada. Após 3 minutos à temperatura ambiente, adicionam-se 250 μL de solução saturada de carbonato de sódio (Na_2CO_3) e, então, os tubos foram colocados em banho a 37 °C por 30 minutos para desenvolvimento da coloração azulada característica. Um espectrofotômetro (Ultrospec 2000, Pharmacia Biotech, NJ, E.U.A.) foi utilizado para leitura da absorbância a 750 nm. Os resultados foram expressos em mg equivalente de ácido gálico (EAG) por mL de extrato.

3.2.2.2. Quantificação de proantocianidinas pelo método do butanol-HCl

Esta análise foi realizada segundo Porter, Hrstich e Chan (1986), com algumas modificações. A solução de n-butanol e ácido clorídrico concentrado foi preparada na proporção 3:2 respectivamente. 154 mg de sulfato de ferro II hepta-hidratado ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) foram adicionados a 1 L de butanol/ácido clorídrico e 2,5 mL desta solução foram adicionados a 250 μL do extrato, diluído quando necessário. Uma solução de cianidina-3-rutinosídeo na concentração de 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ foi utilizada no preparo da curva padrão. Os tubos de ensaio contendo a curva padrão e as amostras foram levemente agitados em banho a 95 °C por 15 minutos para posterior leitura das absorbâncias a 540 nm em espectrofotômetro (Ultrospec 2000, Pharmacia Biotech, NJ, E.U.A.). Os resultados foram expressos em mg equivalente de cianidina-3-rutinosídeo (C3R) por mL de extrato.

3.2.2.3. Quantificação de proantocianidinas pelo método DMAC

A metodologia DMAC (4-dimetilaminocinamaldeído) para quantificação de proantocianidinas foi utilizada de acordo com Prior et al. (2010), com algumas modificações. Uma alíquota de 210 μL da solução de DMAC foi acrescentada a 70 μL da solução controle (etanol aquoso 80%), padrões e extratos (diluídos quando necessário) em uma microplaca de

96 poços. Após incubação por 25 minutos a 25 °C, a absorbância foi lida a 640 nm a cada minuto utilizando-se um espectrofotômetro de microplaca (Synergy H1 hybrid reader, Biotek, IL, E.U.A.). O conteúdo de proantocianidinas foi calculado a partir de uma curva padrão de procianidina B2 (Extrasynthèse, Lyon, França) na concentração de 100 µg/mL. Os resultados foram expressos em mg equivalente de procianidina B2 (PB2) por mL de extrato.

3.2.2.4. Ácido elágico total, flavonoides e ácidos fenólicos

O conteúdo de ácido elágico total foi determinado segundo Pinto, Lajolo e Genovese (2008). Após secagem sob nitrogênio, os extratos foram hidrolisados com 2 mL de uma solução metanólica de ácido trifluoroacético 2 N por 90 minutos a 120 °C em autoclave. Novamente secos em nitrogênio, ressuspensos em metanol próprio para Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e filtrados com filtros de polietileno com membrana de PTFE (Millipore, MA, E.U.A.) de 0,22 µm de poro.

Os principais flavonoides e ácidos fenólicos foram determinados segundo Arabbi, Genovese e Lajolo (2004). Após rotaevaporação, os extratos foram ressuspensos em 1 mL de metanol próprio para CLAE e filtrados em filtros de polietileno com membrana PTFE (Millipore, MA, E.U.A.) de 0,22 µm de poro. O cromatógrafo utilizado foi o modelo Hewlett-Packard 1100, com injetor automático de amostras, bomba quaternária e detector de arranjo de diodo (DAD), coluna Prodigy 5 µm ODS 3 250 × 4,60 nm (Phenomenex Ltda., Reino Unido), controlados por software ChemStation. O gradiente de solventes foi constituído por A (água/tetrahydrofurano/ácido trifluoroacético nas proporções 98:2:0,1) e B (acetonitrila). As amostras foram injetadas em duplicatas e os fenólicos identificados comparando-se o tempo de retenção e espectro com padrões obtidos das empresas Sigma (Chemicals Co., St. Louis, E.U.A) e Extrasynthèse (Genay, França).

3.2.2.5. Capacidade antioxidante in vitro pelo método de sequestro do radical DPPH

Esta análise foi realizada de acordo com Brand-Williams, Cuvelier e Berset (1995), com algumas modificações descritas a seguir. Uma solução metanólica do radical estável DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila, Sigma Chemical Co., St. Louis, E.U.A) foi preparada na concentração de 31 µg/mL de forma a apresentar uma absorbância entre 0,6 e 0,7 a 517 nm. Uma solução de Trolox na concentração de 250 µg/mL foi utilizada para a curva padrão. Uma

alíquota de 250 µL da solução de DPPH foi acrescentada a 50 µL do controle (metanol), dos pontos da curva de Trolox e dos extratos em uma microplaca de 96 cavidades. Foram efetuadas leituras de absorvância a 517 nm no tempo zero e após 20 minutos, utilizando-se espectrofotômetro de microplaca (Synergy H1 hybrid reader, Biotek, IL, E.U.A.) a 25 °C. Os cálculos foram efetuados segundo a fórmula a seguir e os resultados foram expressos em µmol equivalente de Trolox por mL de extrato.

$$\% \text{ Descoloração do DPPH} = \frac{(A_{\text{controle}} - A_{\text{amostra}}) \times 100}{A_{\text{controle}}}$$

Onde:

A_{controle} = absorvância do controle (50 µL de metanol + 250 µL de DPPH);

A_{amostra} = absorvância da amostra.

3.2.2.6. Capacidade antioxidante in vitro pelo método FRAP (capacidade redutora do ferro)

Foi utilizado o método desenvolvido por Benzie e Strain (1999) adaptado para microplaca. A solução FRAP foi preparada no momento da análise na concentração 10:1:1 das seguintes soluções: tampão acetato de sódio (0,3 mol/L, pH 3,6), TPTZ (2,4,6-tripiridil-s-triazine, 10 nmol/L em ácido clorídrico 40 nmol/L) e cloreto férrico (20 nmol/L). Uma solução de Trolox na concentração 250 µg/mL foi utilizada para construir a curva padrão. A cada 20 µL de cada ponto da curva padrão e das amostras foram acrescentados 150 µL da solução FRAP em uma microplaca de 96 cavidades. As absorvâncias foram lidas após quatro minutos a 593 nm utilizando-se espectrofotômetro de microplaca (Synergy H1 hybrid reader, Biotek, IL, E.U.A.). Os resultados foram expressos em µmol equivalente de Trolox por mL de extrato.

3.2.2.7. Capacidade antioxidante in vitro pelo método ORAC (capacidade de absorção dos radicais de oxigênio)

Análise realizada de acordo com o método descrito por Dávalos, Gómez-Cordovés e Bartolomé (2004) com algumas modificações. Uma alíquota de 25 µL dos extratos fenólicos diluída em tampão fosfato (75 nmol/L, pH 7,4), o controle e uma curva padrão de Trolox (400 µmol/L) foram misturados com 150 µL de uma solução de fluoresceína (40 nmol/L) e incubados a 37 °C. Adicionou-se 25 µL da solução de AAPH (2,2' - azobis (2-amidinopropano) di-

hidrocloro, 153 nmol/L) para iniciar a reação. A intensidade da fluoresceína foi verificada a cada minuto, até o tempo final de 60 minutos, em espectrofotômetro de microplaca (Synergy H1 hybrid reader, Biotek, IL, E.U.A.). Finalmente, a capacidade antioxidante foi determinada pela perda de fluorescência da fluoresceína versus a concentração de antioxidante. Os resultados foram expressos em μmol equivalente de Trolox por mL de extrato.

3.2.2.8. Capacidade de inibição *in vitro* da lipase pancreática

A capacidade de inibição *in vitro* da lipase pancreática pelos extratos foi avaliada de acordo com Nakai et al. (2005). Uma solução tampão de Tris-HCl pH 8,0 (Tris-HCl 13 nmol/L, NaCl 150 nmol/L e CaCl_2 1,3 nmol/L) foi utilizada como solvente para a solução de lipase pancreática (EC 3.1.1.3, tipo II, Sigma Chemical Co., St. Louis, E.U.A., 1 mg/mL) e do substrato oleato (4-metilumbeliferil oleato, 0,1 nmol/L). Citrato de sódio (0,1 mol/L) foi utilizado para parar a reação. A 25 μL dos extratos em diferentes concentrações foram acrescentados 50 μL de oleato e 25 μL da solução enzimática em uma microplaca de 96 cavidades. Após incubação por 30 minutos a 25 °C, 100 μL de citrato de sódio foram acrescentados para parar a reação. A ação da enzima sobre o oleato foi avaliada pela leitura das absorbâncias em um espectrofotômetro de microplaca (Synergy H1 hybrid reader, Biotek, IL, E.U.A.) utilizando comprimento de onda de excitação igual a 355 nm e emissão igual a 460 nm. Os resultados foram expressos como IC_{50} considerando o conteúdo total de fenólicos determinado por Folin-Ciocalteu como descrito previamente (μg EAG/mL de reação). O controle positivo para este ensaio foi uma solução de Orlistat (PHR1445, Sigma Chemical Co., St. Louis, E.U.A., 1 mg/mL) em dimetilsulfóxido (DMSO).

3.2.2.9. Capacidade de inibição *in vitro* α -glicosidase

A capacidade de inibição *in vitro* da α -glicosidase pelos extratos foi avaliada de acordo com Mccue, Kwon e Shetty (2005) com as modificações descritas a seguir. Uma solução tampão de fosfato de potássio (0,1 mol/L, pH 6,9) foi utilizada como solvente no preparo da solução de α -glicosidase (EC 3.2.1.20, tipo I, Sigma Chemical Co., St. Louis, E.U.A., 1,0 U/mL) e do substrato *p*-nitrofenil- α -D-glicopiranosídeo (5 nmol/L). A 50 μL dos extratos em diferentes concentrações foram acrescentados 100 μL da solução enzimática e 50 μL do substrato em microplaca de 96 cavidades. Realizou-se uma incubação por 5 minutos a 37 °C e a leitura a 405

nm utilizando um espectrofotômetro de microplaca (Synergy H1 hybrid reader, Biotek, IL, E.U.A.) foi realizada antes e depois da incubação. Os resultados foram expressos como IC₅₀ considerando o conteúdo total de fenólicos determinado por Folin-Ciocalteu como descrito previamente (µg EAG/mL de reação). O controle positivo para este ensaio foi uma solução de Acarbose (PHR1253, Sigma Chemical Co., St. Louis, E.U.A.) em tampão na concentração de 5 nmol/L. Uma curva de inibição foi construída de acordo com a equação abaixo e o IC₅₀ calculado a partir da equação obtida.

% Inibição da α-glicosidase =

$$\frac{(A_{\text{controle 5 minutos}} - A_{\text{controle 0 min}}) - (A_{\text{amostra 5 min}} - A_{\text{amostra 0 min}}) \times 100}{(A_{\text{controle 5 minutos}} - A_{\text{controle 0 min}})}$$

Onde:

A_{branco} = absorvância do controle (ausência dos extratos);

A_{amostra} = absorvância na presença dos extratos em diferentes concentrações.

3.2.3. Avaliação do efeito dos extratos fenólicos da jabuticaba-sabará em camundongos alimentados com dieta rica em lipídios e sacarose

3.2.3.1. Animais e design experimental

Todos os procedimentos realizados nos experimentos *in vivo* foram aprovados pelo Comitê de Ética para Pesquisa Animal da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (Protocolo CEUA/FCF/471).

Foram utilizados 40 camundongos machos C57BL/6J com oito semanas de idade e com aproximadamente 26 g de massa corporal. Durante as duas semanas que precederam o experimento os animais permaneceram em condições padrões de biotério, ou seja, temperatura aproximada de 22 °C, ciclos alternados de 12 h luz/12 h escuro, alimentados com ração padrão para camundongos (NUVILAB CR-1, Nuvital Nutrientes S/A, PR, Brasil) e água *ad libitum*.

Os animais foram divididos aleatoriamente em quatro grupos de 10 cada, da seguinte forma: Grupo Controle (Ct): alimentados com ração padrão para camundongos e água *ad libitum*; Grupo HF: alimentados com dieta rica em lipídios e sacarose (HLS) e água *ad libitum*; Grupo C18: alimentados com dieta HLS e gavagem com extrato obtido por EFS em colunas de C18, previamente explicado em 3.2.1., na dose estabelecida de 50 mg EAG/kg de massa corporal; Grupo PA: alimentados com dieta HLS e gavagem com extrato obtido por EFS em

poliamida, previamente explicado em 3.2.1, na dose de 50 mg EAG/kg de massa corporal. A gavagem com água, para os grupos Ct e HF, ou com os extratos, para os grupos C18 e PA, foi realizada todos os dias durante 8 semanas. A **Figura 4** resume o *design* experimental.

A dieta padrão NUVILAB CR1 possui 23% de proteínas, 5% de lipídios e 56% de carboidratos e fornece 3,6 kcal/g, sendo 25,6% deste valor proveniente de proteínas, 11,5% de lipídios e 62,9% de carboidratos. A dieta HLS foi preparada manualmente como descrito por Lemieux et al. (2003), possui 23% de proteínas, 20% de lipídios e 45% de carboidratos e fornece 4,6 kcal/g, sendo 20% deste valor proveniente de proteínas, 39% de lipídios e 41% de carboidratos.

Ao final das oito semanas experimentais os animais foram eutanasiados, após anestesia com isoflurano, por punção cardíaca. O plasma foi separado do sangue por centrifugação a 3000 g a 4 °C por 20 minutos. O fígado, o músculo gastrocnêmio e os tecidos adiposos (inguinal, retroperitoneal, epididimal e marrom) foram removidos, pesados sob constante refrigeração e armazenados a – 80 °C para análises posteriores.

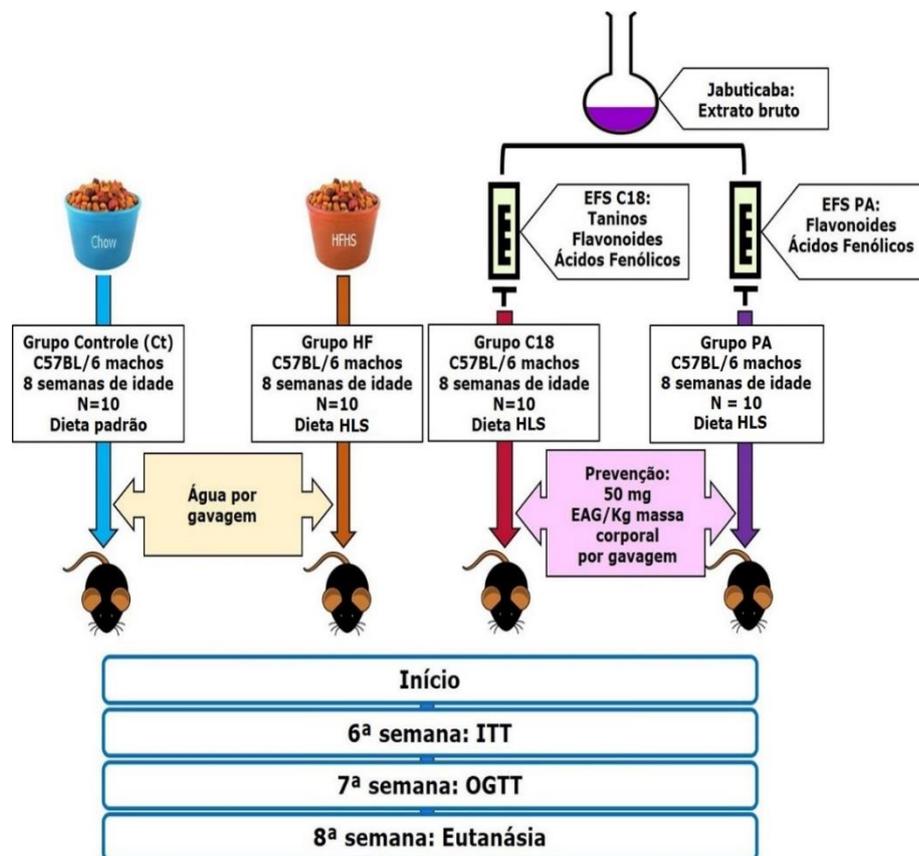


Figura 4. Resumo do *design* experimental. EFS: extração em fase sólida; C18: octadecilsilano; PA: poliamida; HLS: Dieta rica em lipídios e sacarose; EAG: equivalente de ácido gálico; ITT: teste de tolerância à insulina; OGTT: teste oral de tolerância à glicose.

3.2.3.2. Teste de Tolerância à Insulina (ITT)

O ITT foi realizado na sexta semana do experimento injetando-se insulina intraperitonealmente na concentração de 0,5 UI/kg de massa corporal. A glicose foi medida a partir do sangue retirado da veia caudal antes da injeção e após, a cada 15 minutos, por uma hora, utilizando-se um glicosímetro Accu-Chek Performa (Roche, Mannheim, Alemanha). Os dados foram expressos como a taxa de decaimento da glicose (Kitt) entre 0 e 15 minutos ($t_{1/2}$) a partir da fórmula $0,693/t_{1/2}$ multiplicado por 100.

3.2.3.3. Teste Oral de Tolerância à Glicose (OGTT)

O OGTT foi realizado na sétima semana do experimento. Após 6 horas em jejum uma solução de glicose na concentração de 1,0 g/kg de massa corporal foi administrada por gavagem. A glicose foi medida a partir do sangue retirado da veia caudal antes da gavagem e após, a cada 15 minutos, por 90 minutos, utilizando-se um glicosímetro Accu-Chek Performa (Roche, Mannheim, Alemanha). O plasma foi separado do sangue por centrifugação a 3000 g a 4 °C por 20 minutos para análise de insulina por ELISA (Rat/Mouse Insulin ELISA Kit, Millipore, MA, E.U.A.).

3.2.3.4. Perfil lipídico

As concentrações plasmáticas de colesterol total, lipoproteína de alta densidade colesterol (HDL), lipoproteína de baixa densidade colesterol (LDL) e triacilgliceróis (TAG) foram determinadas utilizando-se um analisador para testes bioquímicos (LABMAX 240®) com seus respectivos kits seguindo as orientações do fabricante (LABTEST, Lagoa Santa, MG, Brasil).

3.2.3.5. Conteúdo hepático de triacilgliceróis

O conteúdo hepático de triacilgliceróis foi determinado segundo Hara e Radin (1978) com modificações. Em um Eppendorf, 60 mg de tecido fresco foram misturado a 1 mL de hexano/isopropanol (3:2). A mistura permaneceu em agitação por 24 horas a 4° C completamente fechado. Após esse período, foi centrifugada a 1000 g por 15 minutos. O

sobrenadante foi totalmente removido e misturado a 1,5 mL de sulfato de sódio anidro (6,6%). Após decantação por 15 minutos, uma alíquota de 200 µL foi retirada, seca em nitrogênio e ressuspensa com 0,5 mL de isopropanol. O conteúdo hepático de triacilgliceróis foi determinado utilizando-se um analisador para testes bioquímicos (LABMAX 240®) com seus respectivos kits seguindo as orientações do fabricante (LABTEST, Lagoa Santa, MG, Brasil).

3.2.4. Análise estatística

Todos os resultados foram apresentados como média \pm desvio padrão (DP). Inicialmente, os dados foram avaliados quanto à natureza da sua distribuição pelo teste de Shapiro-Wilk. A análise de variância ANOVA *one-way* seguida do teste de comparação múltipla de Tukey foi utilizada para dados com distribuição normal. O teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de comparação múltipla de Dunn foi utilizado para distribuições não paramétricas. O grupo controle, isto é, os animais alimentados com dieta padrão, foi usado apenas como referência afim de mostrar os efeitos obsogênicos da dieta HLS e seus valores não foram incorporados nas análises estatísticas. As análises estatísticas foram realizadas através do software GraphPad Prism versão 5.00 para Windows (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Caracterização química dos extratos

Os diferentes extratos ricos em compostos fenólicos da jabuticaba-sabará foram obtidos por extração em fase sólida (EFS) utilizando-se adsorventes diferentes. O extrato C18 foi obtido por EFS com octadecilsilano (C18) e o extrato PA obtido por EFS com poliamida (PA). O C18 permite completa extração dos compostos fenólicos, isto é, flavonoides, incluindo taninos, e ácidos fenólicos. Por sua vez, a PA liga-se irreversivelmente aos taninos através de fortes ligações de hidrogênio, retendo-os em sua maioria (SIGMA-ALDRICH, 2015). Dessa forma, ambos os extratos possuem todos os compostos fenólicos da jabuticaba, no entanto, o extrato C18 é rico em taninos, enquanto o extrato PA apresenta baixa concentração dos mesmos.

Os cromatogramas obtidos por CLAE dos extratos C18 e PA estão apresentados na **Figura 5A e 5B**, respectivamente. Os perfis fenólicos foram similares para ambos os extratos, porém a concentração de antocianinas, ácido elágico livre e elagitaninos foi muito maior no extrato C18. A caracterização química desses extratos em relação aos fenólicos totais, proantocianidinas, elagitaninos, flavonoides, ácidos fenólicos, capacidade antioxidante *in vitro* e atividade inibitória de enzimas digestivas é apresentada na **Tabela 1**. Proantocianidinas (PAC) e derivados de ácido elágico, tais como elagitaninos (EA), foram os principais compostos fenólicos encontrados nos extratos de jabuticaba, seguidos por menores quantidades de derivados de antocianina e quercetina. Como esperado, o extrato PA apresentou menor conteúdo de taninos, ou seja, 43% menos proantocianidinas e, somente, 0,7% de elagitaninos encontrados no extrato C18.

Devido as suas estruturas químicas, PAC e ET possuem propriedade antioxidante natural e, como pode ser visto na **Tabela 1**, proporciona alta capacidade antioxidante *in vitro* para o extrato C18 em comparação ao extrato PA, menos concentrado em taninos (PRIOR et al., 2010). A capacidade antioxidante do extrato PA variou de 12 a 32% em relação ao extrato C18, dependendo da propriedade química analisada, isto é, redução do radical DPPH, capacidade redutora do ferro ou ORAC. No entanto, o extrato PA apresentou maior atividade inibitória da lipase pancreática *in vitro*. Seu IC₅₀ foi quatro vezes menor que o do extrato C18 e aproximadamente cinco vezes menor que o do Orlistat, um fármaco inibidor de lipase. Por outro lado, o extrato C18 mostrou-se um potente inibidor *in vitro* da α -glicosidase, sendo muito mais eficiente que o extrato PA e a Acarbose, um fármaco hipoglicemiante que inibe essa enzima.

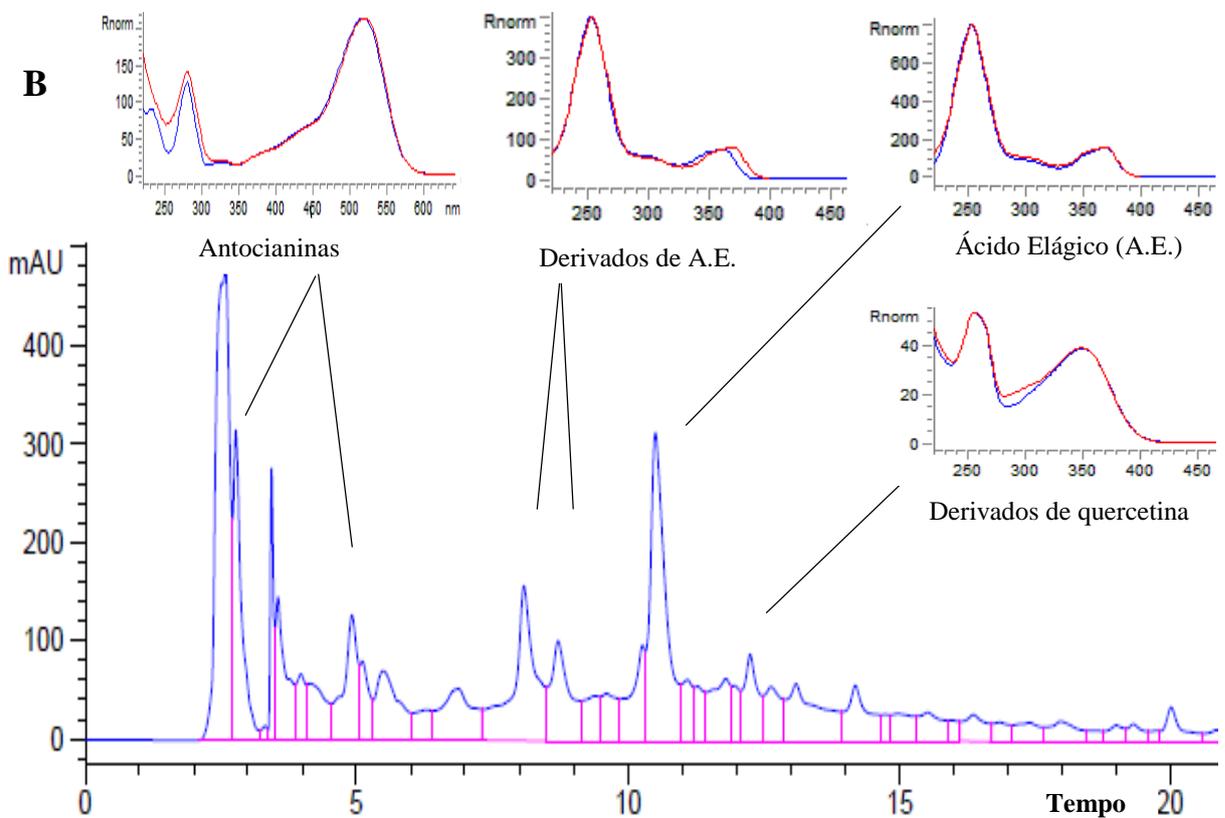
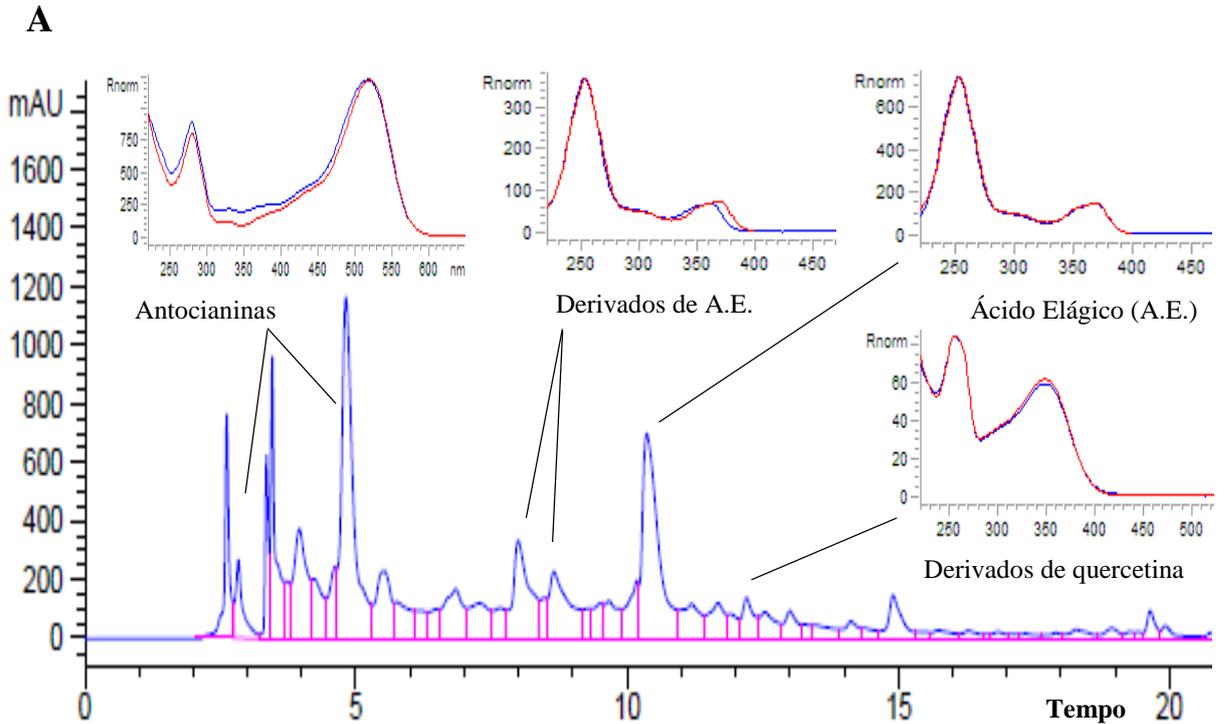


Figura 5. Cromatograma em 270 nm e espectro UV de glicosídeos de flavonoides e ácidos fenólicos dos extratos C18 (A) e PA (B). Nos espectros UV, as linhas azuis são as bandas de absorção dos extratos e as linhas vermelhas as bandas de absorção dos padrões.

Tabela 1. Caracterização química dos extratos ricos em fenólicos da jabuticaba-sabará obtidos por EFS em colunas de C18 ou PA.

	Extrato C18	Extrato PA
<i>Fenólicos totais</i> ($\mu\text{g EAG/mL}$)	8750 \pm 100	1640 \pm 30
<i>Proantocianidinas</i>		
Butanol-HCl ($\mu\text{g C3R/mL}$)	350 \pm 3	150 \pm 10
DMAC ($\mu\text{g PB2/mL}$)	300 \pm 10	130 \pm 4
<i>Flavonoides e ácidos fenólicos</i> ($\mu\text{g/mL}$)		
Antocianinas	216 \pm 2	138 \pm 2
Derivados de quercetina	19 \pm 1	14.0 \pm 0.1
Ácido elágico livre (AEL)	430 \pm 8	195 \pm 15
Ácido elágico total (AET)*	3454 \pm 15	230 \pm 6
Elagitaninos**	3027 \pm 13	21.0 \pm 0.5
<i>Capacidade antioxidante</i> ($\mu\text{mol Trolox/mL}$)		
DPPH	74 \pm 3	9.0 \pm 0.2
FRAP	137 \pm 3	17.0 \pm 0.5
ORAC	80 \pm 4	26 \pm 2
<i>Capacidade inibitória de enzimas digestivas</i> ($\text{IC}_{50} = \mu\text{g EAG/mL de reação}$)		
Lipase pancreática ^a	271 \pm 15	70 \pm 1
α -glicosidase ^b	4.13 \pm 1.90	14.30 \pm 4.20

Valores são média \pm DP; EAG: equivalente de ácido gálico; C3R: equivalente de cianidina-3-rutinosídeo; PB2: equivalente de procianidina B2. *Soma de ácido elágico livre e glicosídeos de ácido elágico. **Calculado por diferença: AET – AEL. ^aOrlistat IC_{50} 401 $\mu\text{g/mL}$ de reação. ^bAcarbose IC_{50} 141,20 $\mu\text{g/mL}$ de reação.

Diversos estudos, principalmente *in vitro*, relatam que compostos fenólicos de fontes alimentares variadas são capazes de inibir enzimas digestivas. Extratos de cambuci, cupuaçu, uva vermelha, pimenta verde e framboesa, por exemplo, foram capazes de inibir a atividade da α -amilase. Extratos de morango, mirtilo, gengibre e groselha foram capazes de inibir a atividade da α -glicosidase. Extratos de folhas de romã e de plantas da dieta mediterrânea, por exemplo, inibiram a atividade da lipase pancreática. Da mesma forma, diversos outros flavonoides e ácidos fenólicos têm sido relatados como potentes inibidores de enzimas digestivas (AL-MUAMMAR; KHAN, 2012; GONÇALVES; LAJOLO; GENOVESE, 2010; LACROIX; LI-CHAN, 2014; MARRELLI et al., 2013; MCDUGALL et al., 2005).

Porém os efeitos dos fenólicos sobre as enzimas digestivas ainda são contraditórios. Há diversos relatos de alta capacidade inibitória, assim como outros de baixa ou nenhuma ação inibitória. Portanto, podemos concluir que a capacidade inibitória dos fenólicos sobre as enzimas digestivas depende das estruturas químicas desses compostos, interações intermoleculares e metodologias utilizadas na avaliação (LACROIX; LI-CHAN, 2014; SERGENT et al., 2012). Neste trabalho, o alto conteúdo fenólico do extrato C18 tornou-o um potente inibidor de α -glicosidase, mas um fraco inibidor de lipase pancreática, quando

comparado ao extrato PA. No entanto, ambos os extratos foram mais eficientes na inibição *in vitro* dessas enzimas que os respectivos controles, Acarbose e Orlistat.

4.2. Efeitos *in vivo* dos extratos fenólicos da jabuticaba-sabará

Neste estudo, verificou-se os efeitos que a administração diária dos extratos C18 e PA, ambos na dose de 50 mg EAG/kg de massa corporal, teria na proteção contra desordens metabólicas induzidas pela ingestão de uma dieta HLS por camundongos C57BL/6J. Essa dose foi escolhida com base em um estudo prévio realizado por Alezandro, Granato e Genovese (2013), no qual foi relatado resultados promissores dos compostos fenólicos da jabuticaba-sabará em modelo animais de obesidade e DM2. O conteúdo total de fenólicos foi usado para estimar a dose diária média administrada aos camundongos afim de manter os 50 mg EAG/kg de massa corporal para cada animal ao longo do experimento.

4.2.1. Balanço energético, massa corporal e adiposidade

A **Figura 6A** apresenta a ingestão diária, em gramas, de água e ro dos grupos experimentais, enquanto na **Figura 6B** estão apresentados os valores da ingestão diária de energia, em kcal, e aqueles relativos à eficiência alimentar. Como observado na **Figura 6B**, embora a ingestão média de energia tenha sido similar entre todos os grupos, os animais do grupo HF apresentaram maior eficiência alimentar, ou seja, estes animais foram mais eficientes para converter a energia do alimento em massa corporal. Por outro lado, ambos os grupos que receberam os extratos fenólicos apresentaram valores semelhantes aos do grupo controle (linha pontilhada), isto é, os fenólicos da jabuticaba-sabará preveniram a conversão excessiva da energia alimentar em massa corporal.

Os extratos fenólicos, principalmente o extrato C18, foram eficientes na prevenção do ganho demasiado de massa corporal dos camundongos alimentados com dieta HLS já a partir da quarta semana experimental (**Figura 7A**). O grupo HF apresentou ganho médio de massa corporal aproximadamente 50% maior do que aqueles que receberam os extratos (17,53% para o HF, 8,77% para o C18 e 9,04% para o PA) (**Figura 7B**). Muitos estudos confirmam a capacidade dos compostos fenólicos de prevenir e/ou reduzir o ganho de massa corporal em humanos e roedores (DEL RIO et al., 2013).

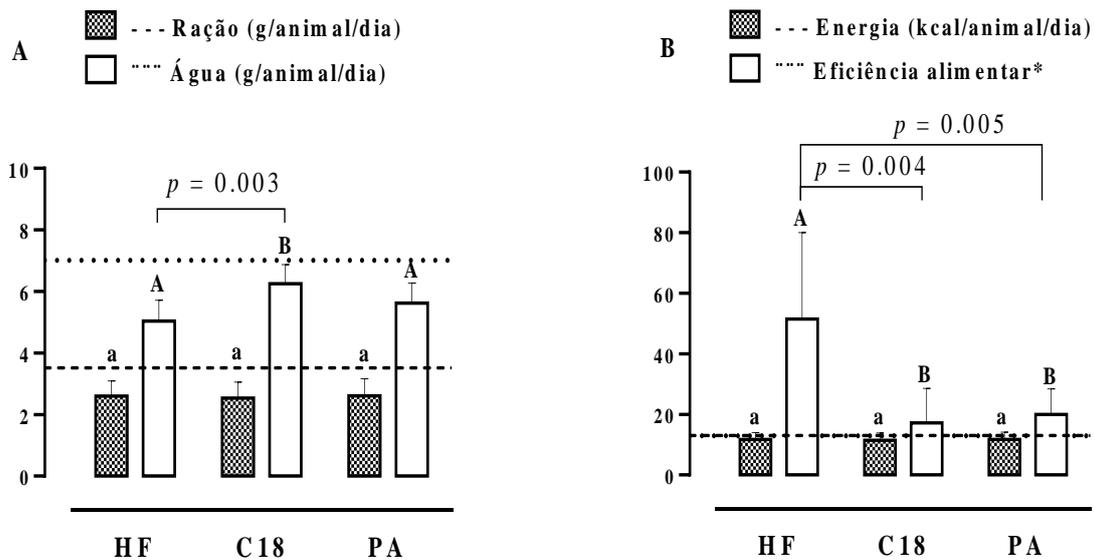


Figura 6. Ingestão de água e ração (A), ingestão de energia e eficiência alimentar (B) de camundongos alimentados com dieta HLS e água (grupo HF) ou extratos fenólicos de jabuticaba por gavagem (C18 e PA). Valores são média \pm DP ($n = 8-10$ /grupo). As linhas pontilhadas são os valores médios do grupo controle que não foram incluídos na análise estatística. *Calculado como: [ganho de massa corporal (g)/ingestão energética (kcal)] \times 100. A,B,C Letras maiúsculas diferentes sobre as colunas indicam diferença estatística ($p < 0.05$). a,b,c Letras minúsculas diferentes sobre as colunas indicam diferença estatística ($p < 0.05$).

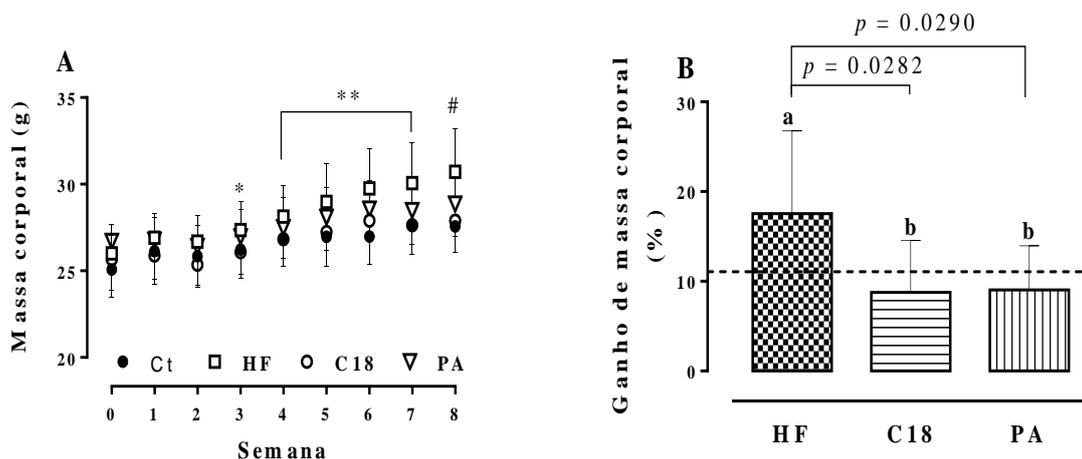


Figura 7. Massa corporal (A) e ganho de massa corporal (B) de camundongos alimentados com dieta HLS e água (grupo HF) ou extratos fenólicos de jabuticaba por gavagem (C18 e PA). Valores são média \pm DP ($n = 8-10$ /grupo). A linha pontilhada é o valor médio do grupo controle que não foi incluído na análise estatística. * ($p < 0.04$) HF vs. Ct. ** ($p < 0.02$) HF vs. Ct e C18. # ($p < 0.02$) HF vs. demais grupos. Letras diferentes sobre as colunas indicam diferença estatística ($p < 0.05$).

Considera-se obesidade moderada quando animais alimentados com dieta obesogênica apresentam ganho de massa corporal entre 10 e 25% e obesidade severa quando tal valor é maior ou igual a 40%, em comparação aos animais alimentados com dieta padrão (HARIRI; THIBAUT, 2010). Assim, considerando estes parâmetros e os resultados observados na **Figura 7A e 7B**, os animais do grupo HF eram os mais obesos ao final do experimento, apresentando obesidade moderada. Interessantemente, os animais do grupo C18 e PA apresentaram ganho de massa corporal estatisticamente semelhante entre si e em relação ao grupo controle (linha pontilhada).

A administração de extratos ricos em fenólicos da jabuticaba-sabará preveniu o aumento excessivo do tecido adiposo branco inguinal (iTAB), retroperitoneal (rTAB), epididimal (eTAB) e total (tTAB = iTAB + rTAB + eTAB) (**Figura 8**).

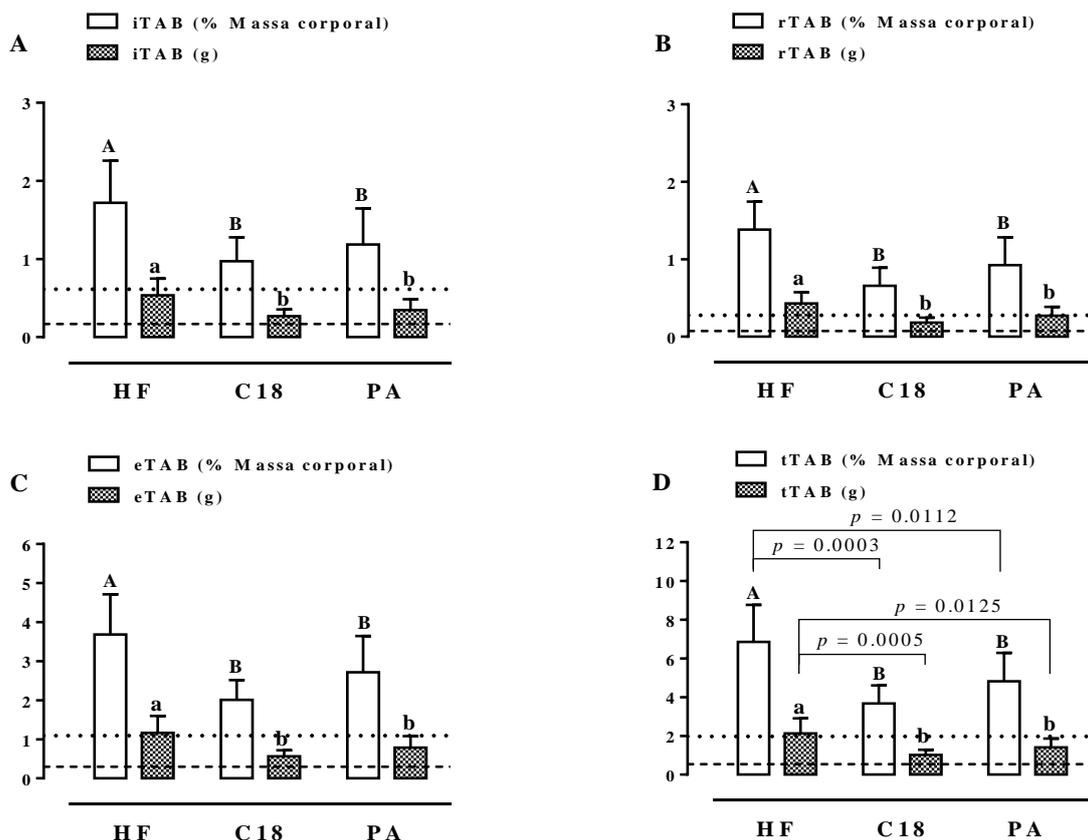


Figura 8. Massa relativa □ ou absoluta ■ do tecido adiposo branco inguinal (iTAB) [A], retroperitoneal (rTAB) [B], epididimal (eTAB) [C] e total (tTAB) [D] de camundongos alimentados com dieta HLS e água (grupo HF) ou extratos fenólicos de jabuticaba por gavagem (C18 e PA). Valores são média \pm DP ($n = 8-10$ /grupo). As linhas pontilhadas são os valores médios do grupo controle que não foram incluídos na análise estatística. ^{A,B,C} Letras maiúsculas diferentes sobre as colunas indicam diferença estatística ($p < 0.05$). ^{a,b,c} Letras minúsculas diferentes sobre as colunas indicam diferença estatística ($p < 0.05$).

O extrato C18 foi aproximadamente 24% mais eficiente que o extrato PA na prevenção do aumento excessivo do tTAB. As médias relativas do iTAB, rTAB e eTAB foram, respectivamente, 43,58%, 52,39% e 45,52% menores para o grupo C18 quando comparadas às médias do grupo HF. Da mesma forma, tais valores para o grupo PA foram, respectivamente, 31,10%, 33,16% e 27,88% menores que os do grupo HF. Resumindo, o ganho médio de tTAB foi aproximadamente 43% inferior no grupo C18 e 28% inferior no grupo PA quando comparados ao grupo HF (**Figura 8D**). A massa média relativa e absoluta do tecido adiposo marrom, fígado e músculo gastrocnêmio foi estatisticamente semelhante entre todos os grupos (dados não mostrados).

Aos fenólicos são atribuídos quatro possíveis mecanismos de ação com propriedades antiobesogênicas, a saber: aumento do gasto energético, aumento da oxidação de ácidos graxos, diminuição do apetite e diminuição da absorção de nutrientes (RAINS; AGARWAL; MAKI, 2011). A respeito dos três primeiros, estudos, majoritariamente em animais, relatam que compostos fenólicos podem estimular a produção de norepinefrina (NE), um mediador que age no sistema nervoso simpático (SNS), aumentando o gasto energético e promovendo oxidação de ácidos graxos. Borchardt e Huber (1975) apresentaram evidências que catequinas inibem a catecol-O-metiltransferase, uma enzima que degrada NE, permitindo a ação desta última por um período maior, estimulando a lipólise e aumentando a oxidação de ácidos graxos.

Nagao et al. (2009) administraram bebida rica em flavonoides (583 mg/dia) para homens e mulheres diabéticos e observaram, após 12 semanas de intervenção, uma redução significativa em suas circunferências abdominais. Tentolouris, Liatis e Katsilambros (2006) embasam esses resultados, mostrando que o tecido adiposo abdominal é mais lipoliticamente ativo que os demais depósitos de gordura, pois possuem mais receptores β_3 -adrenérgico, onde catecolaminas podem agir. Conseqüentemente, a inibição do apetite por flavonoides pode estar baseada justamente em sua capacidade de estimular a lipólise. Estudos apoiam a hipótese que o nível de energia dentro do fígado funciona como um regulador de apetite, sinalizando para o cérebro, via neurônios sensoriais vagais, a necessidade de alimentar-se. Assim, quando a oxidação hepática de ácidos graxos está baixa, o apetite está aumentado. Portanto, considerando que os fenólicos podem estimular a oxidação de ácidos graxos, é possível que sejam capazes de regular o apetite (KAMPHUIS; MELA; WESTERTER-PLANTENGA, 2003; RAINS; AGARWAL; MAKI, 2011). Os efeitos antiobesogênicos dos polifenóis também podem estar relacionados com sua capacidade de inibir *in vivo* e *in vitro* a lipase pancreática, aumentar a sensibilidade da insulina e agir de forma semelhante a sibutramina, um inibidor de apetite, diminuindo os níveis

glicêmicos e prevenindo a formação excessiva de depósitos de gordura (LEI et al., 2007; VROEGRIJK et al., 2011).

No entanto, os resultados obtidos neste estudo não confirmaram nem a inibição *in vivo* de enzimas digestivas, mesmo que tenha sido observada alta inibição *in vitro* de tais enzimas, nem a supressão do apetite pelos fenólicos da jabuticaba, pois o conteúdo energético das fezes (dados não mostrados) e a ingestão de energia (**Figura 6B**) foram estatisticamente semelhantes entre os grupos. Desta forma, mais estudos são necessários para confirmar a hipótese de que outros mecanismos de ação não relacionados à inibição de enzimas digestivas e/ou à supressão do apetite estão envolvidos nos resultados observados.

De acordo com a **Tabela 1**, proantocianidinas e elagitaninos são as principais classes de compostos fenólicos nos extratos de jabuticaba, seguidos por uma quantidade menor de flavonoides, principalmente antocianinas. Prior et al. (2008) avaliaram os efeitos de pós liofilizados de mirtilo e de morango e de antocianinas purificadas destas frutas no metabolismo de camundongos alimentados com dieta HLS. Seus resultados mostraram que as antocianinas purificadas, mas não os pós liofilizados, apresentaram efeitos positivos contra o ganho de massa corporal, prevenindo a obesidade. Uma hipótese bem aceita para isto é a de que a absorção e os processos de biodisponibilidade dos fenólicos são obstruídos por outros componentes dos alimentos, tais como carboidratos e lipídios. Em outro estudo, suco de mirtilo administrado a camundongos obesos e obesos/diabéticos também não preveniu o ganho de massa corporal, no entanto regulou os níveis de leptina e de adiponectina. A leptina e a adiponectina são hormônios produzidos pelos adipócitos e estão positivamente associados à regulação do metabolismo, ou seja, desordens na sua produção tem sido relacionadas à obesidade e ao DM2 (MEYDANI; HASAN, 2010).

Dessa forma, a alta concentração fenólica dos extratos utilizados neste estudo associada à ausência de outros componentes alimentares, podem justificar os efeitos antiobesogênicos observados, embora as vias metabólicas ainda não tenham sido completamente elucidadas. O extrato C18 foi mais efetivo na prevenção do ganho excessivo de massa corporal que o extrato PA, sugerindo que os taninos desempenharam papel importante neste resultado. Mais estudos são necessários para entender como os fenólicos da jabuticaba agem, isto é, se pelos mecanismos mencionados anteriormente, outros ainda desconhecidos ou todos simultaneamente.

4.2.2. Metabolismo da glicose

Os efeitos dos extratos ricos em compostos fenólicos da jabuticaba-sabará sobre o metabolismo da glicose foram avaliados através da glicemia de jejum, teste de tolerância a insulina (ITT), teste oral de tolerância a glicose (OGTT) e insulina plasmática. A **Figura 9A** mostra que a glicemia de jejum, mesmo apresentando distribuição atípica durante o experimento, foi maior para o grupo HF desde a primeira semana. A glicemia de jejum total, isto é, a média geral da glicemia de jejum por grupo a partir da primeira semana, apresentou diferenças estatísticas entre o grupo HF e os grupos suplementados (**inserção na Figura 9A**).

Os valores do ITT e do Kitt foram estatisticamente semelhantes entre os grupos (**Figura 9B e inserção**). Da mesma forma, o OGTT, embora indique uma possível redução nos níveis de glicose causada pelos extratos, apresentou valores estatisticamente semelhantes entre os grupos (**Figura 9C e inserção**). Os níveis plasmáticos de insulina foram compatíveis com o OGTT, isto é, mesmo sem significância estatística, os grupos suplementados apresentaram valores menores durante o experimento, exibindo também menor área sob a curva (AUC) e índice HOMA-IR, este último com uma pequena, mas estatisticamente significativa redução (**Figura 9D e inserções**).

Ambos os extratos atenuaram sem diferença estatística os valores de ITT, OGTT e insulina plasmática, sendo que os melhores resultados foram apresentados pelo extrato C18. A ausência de diferença estatística entre os grupos pode ser atribuída à realização precoce destas análises, ou seja, na sexta e na sétima semana, onde o DM2 ainda estava em desenvolvimento.

Camundongos C57BL/6J são considerados diabéticos quando a glicemia e a insulinemia de jejum apresentam valores superiores a 200 mg/dL e 3,1 ng/mL, respectivamente (AHRÉN et al., 1997; HAMZA et al., 2011; SURWIT et al., 1988). Neste experimento, os animais apresentaram glicemia de jejum e insulina plasmática na sexta semana, respectivamente, iguais a 142 ± 16 e $0,43 \pm 0,11$ para o grupo controle, 178 ± 16 e $0,40 \pm 0,11$ para o grupo HF, 149 ± 27 e $0,30 \pm 0,01$ para o grupo C18 e 146 ± 17 e $0,31 \pm 0,01$ para o grupo PA. Por esta razão, os animais do grupo HF não foram considerados diabéticos ou insulinoresistentes. No entanto, em conjunto, os dados relacionados ao metabolismo da glicose sugerem que os animais HF estavam propensos ao desenvolvimento do DM2 e que os extratos fenólicos da jabuticaba-sabará possuem potencial efeito protetivo contra distúrbios na homeostase da glicose induzidos por dieta HLS em camundongos.

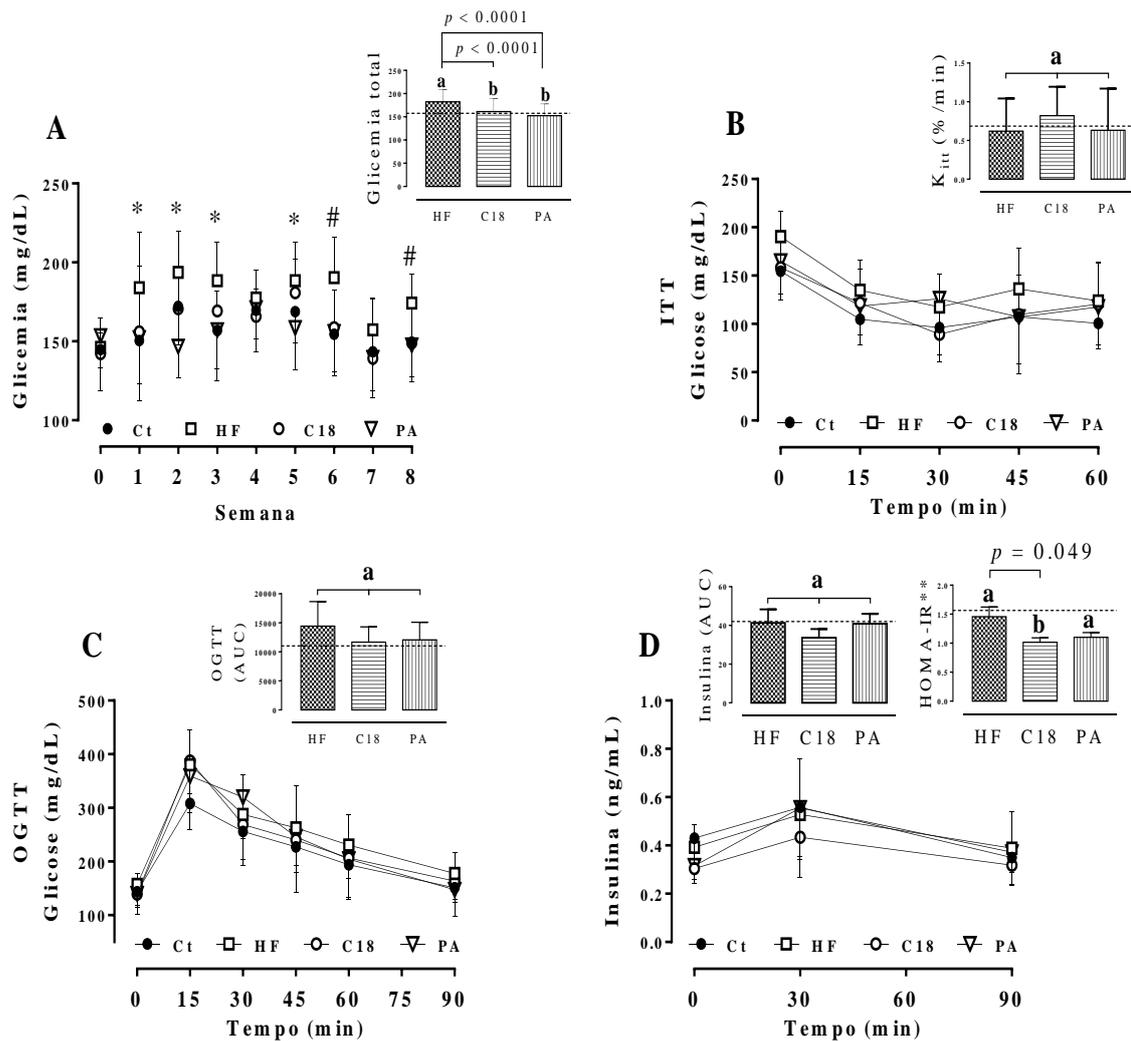


Figura 9. Glicemia de jejum e glicemia de jejum total (A), teste de tolerância à insulina e Kitt (B), teste oral de tolerância à glicose e área sob a curva (C), insulina plasmática, área sob a curva e índice HOMA-IR (D) de camundongos alimentados com dieta HLS e água (grupo HF) ou extratos fenólicos de jaboticaba por gavagem (C18 e PA). Valores são média \pm DP ($n = 6-10$ /grupo). As linhas pontilhadas são os valores médios do grupo controle que não foram incluídos na análise estatística. $^*(p < 0,05)$ HF vs. PA. $^\#(p < 0,05)$ HF vs. demais grupos. ** HOMA-IR = (insulina X glicose)/22,5. Letras diferentes sobre as colunas indicam diferença estatística ($p < 0.05$).

Os compostos fenólicos podem contribuir para a regulação do metabolismo glicêmico de diversas formas, por mecanismos ainda não completamente elucidados. Os resultados deste estudo estão em conformidade com diversos outros que atribuem aos fenólicos propriedade hipoglicemiante, pois foram capazes de inibir *in vitro* enzimas relacionadas à digestão de carboidratos, tais como a α -glicosidase (**Tabela 1**) (ANHÊ et al., 2013). Glicosídeos de quercetina, um dos flavonoides mais consumidos pela população brasileira, diminuíram a

captação de glicose do lúmen intestinal para dentro do enterócito por inibição competitiva via transportador de glicose dependente de sódio (SGLT1), apresentando potencial para reduzir a glicemia pós-prandial (ADER et al., 2001).

Entre 80 e 85% da glicose é metabolizada na periferia do corpo, principalmente pelo músculo esquelético, ou seja, este tecido desempenha papel fundamental na homeostase glicêmica (SHIMIZU, 2010). Portanto, o estímulo à captação de glicose pelo músculo esquelético pode ajudar no combate contra a glicotoxicidade. Camundongos C57BL/6J alimentados com dieta HLS contendo 0,5% e 2,0% de licor de cacau (*Theobroma cacao*) rico em proantocianidinas, tiveram aumento da expressão gênica do transportador de glicose 4 (GLUT4) na membrana plasmática de células musculares e de adipócitos marrons, apresentando, ao final de 13 semanas, menor glicemia que animais controle (YAMASHITA et al., 2012). Anand et al. (2010) já haviam observados resultados semelhantes ao administrarem 20 mg/kg de peso corporal do cinamaldeído extraído da canela (*Cinnamomum zeylanicum*) durante 2 meses a ratos diabéticos. Estes animais apresentaram maior translocação de GLUT4 nas células musculares que animais não suplementados, exibindo, ao final do experimento, menor concentração plasmática de glicose.

A menor glicemia de jejum observada nos grupos suplementados com os extratos de jabuticaba (**Figura 9A**) pode também estar relacionada com a redução na produção hepática de glicose através da inibição de duas das principais enzimas envolvidas na gliconeogênese e/ou glicogenólise, a glicose-6-fosfatase (G6Pase) e a fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK). Células de hepatoma de roedores tratadas com extrato fenólico de canela (*Cinnamomum burmannii*) apresentaram diminuição da expressão gênica dessas enzimas (CHENG et al., 2012). Da mesma forma, camundongos C57BL/6J alimentados com dieta HLS enriquecida na proporção de 5 g/100 g com o pó das folhas de caqui (*Diospyros kaki*), alimento rico em proantocianidinas, apresentaram, ao final de 5 semanas, reduzida expressão gênica da PEPCK com correspondente redução na glicemia de jejum (JUNG et al., 2012).

Existem, portanto, fortes evidências que diversos compostos fenólicos de fontes variadas são capazes de contribuir com a homeostase da glicose. Embora a maioria dos efeitos positivos venham de experimentos *in vitro* ou de modelos animais, há estudos epidemiológicos que embasam esta conclusão. Pesquisas mais específicas sobre a tolerância à glicose e sensibilidade à insulina sob a ação de compostos fenólicos são necessárias para elucidar os mecanismos bioquímicos pelos quais estes compostos podem agir (HANHINEVA et al., 2010).

4.2.3. Perfil lipídico

Os níveis de colesterol total foram estatisticamente inferiores no grupo C18 quando comparados aos demais grupos (**Figura 10A**). Esta redução foi de 24,38% no grupo C18 em relação ao grupo HF. Os níveis plasmáticos de LDL, HDL e triacilgliceróis (TAG) foram estatisticamente semelhantes entre todos os grupos (**Figura 10B, C e D**). Por outro lado, uma leve diferença estatisticamente significativa foi observada nos níveis hepáticos de TAG para o grupo C18 em comparação aos demais grupos, indicando um possível efeito protetor dos fenólicos da jabuticaba contra a formação de depósitos hepáticos de lipídios (**Figura 10E**).

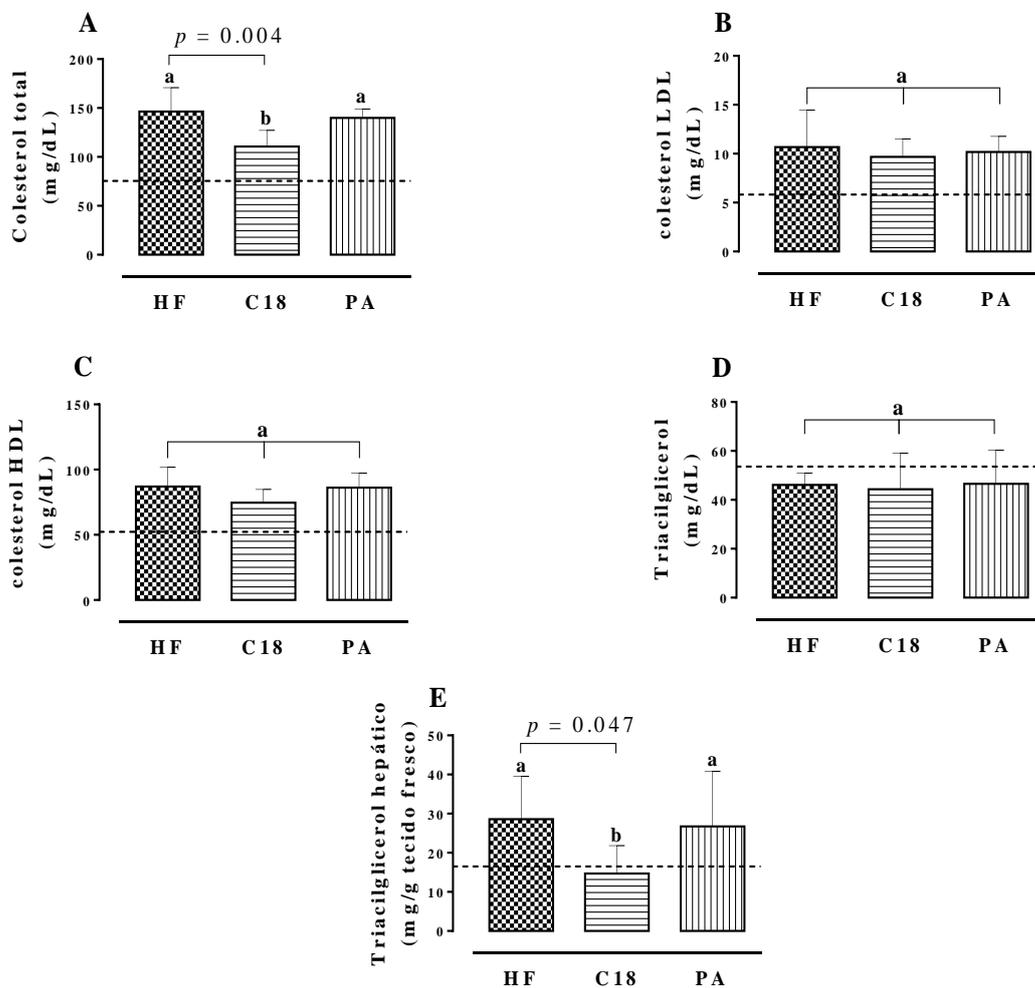


Figura 10. Níveis plasmáticos de colesterol total (A), colesterol LDL (B), colesterol HDL (C), triacilgliceróis (D) e triacilgliceróis hepáticos (D) de camundongos alimentados com dieta HLS e água (grupo HF) ou extratos fenólicos de jabuticaba por gavagem (C18 e PA). Valores são média \pm DP (n = 6-10/grupo). As linhas pontilhadas são os valores médios do grupo controle que não foram incluídos na análise estatística. Letras diferentes sobre as colunas indicam diferença estatística ($p < 0.05$).

Há um número significativo de pesquisas, principalmente em modelos animais, que relatam efeitos positivos dos compostos fenólicos na melhoria do perfil lipídico. Recentemente, Donado-Pestana et al. (2015) mostraram que extratos fenólicos do cambuci (*Campomanesia phaea* O. Berg), uma fruta da Mata Atlântica brasileira rica em compostos fenólicos, na dose de 32 mg/kg de massa corporal, diminuíram as concentrações plasmáticas de LDL, aumentando, porém, as de HDL, em camundongos alimentados com dieta HLS.

Di Donna et al. (2014) estudaram os efeitos de flavanonas da bergamota (*Citrus bergamia*) em ratos Wistar, relatando, após 3 semanas de suplementação com dose de 60 mg/kg de massa corporal, redução dos níveis plasmáticos de VLDL, LDL e TAG, mas com aumento dos níveis de HDL e da síntese de receptores hepáticos de LDL. O mecanismo sugerido pelos autores é que os fenólicos da bergamota foram capazes de inibir a 3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA redutase (HMGR), diminuindo a concentração circulante de LDL.

Baselga-Escudero et al. (2015) estudou os efeitos da suplementação crônica de proantocianidinas de sementes de uva nas doses de 5, 25 e 50 mg/kg de peso corporal em roedores alimentados com dieta de cafeteria e observou, após 3 semanas, que a superexpressão gênica dos microRNAs mir-33a e mirR-122 foi normalizada. Estes microRNAs desempenham papel chave na regulação do metabolismo hepático de lipídios, ou seja, descompassos na produção dos mesmos foram relacionados à obesidade e a SM.

Considerando os resultados apresentado na **Figura 10**, é provável que os extratos fenólicos da jabuticaba, principalmente o extrato C18, sejam capazes de regular o metabolismo lipídico. No entanto, a heterogeneidade desses dados, com resultados favoráveis observados na **Figura 10A e E** somando-se à ausência de resultados positivos nas **Figuras 10B, C e D**, levamos a conclusão que mais estudos são necessários para elucidar a ação desses fenólicos no metabolismo lipídico.

Por enquanto, os resultados apresentados neste trabalho mostram que extratos fenólicos da jabuticaba-sabará, administrados a camundongos C57BL/6J alimentados com dieta HLS, foram capazes de prevenir a formação excessiva de tecidos adiposos brancos, evitando o ganho demasiado de massa corporal. Além do mais, esses extratos fenólicos tiveram efeitos benéficos no metabolismo da glicose, atenuando a hiperglicemia e a hiperinsulinemia. O extrato C18 também preveniu altos níveis de colesterol total e triacilgliceróis hepáticos. Este trabalho corrobora muitos outros que atribuem às dietas ricas em compostos fenólicos a capacidade de reduzirem os riscos à saúde advindos da obesidade e do *diabetes mellitus* tipo 2.

5. CONCLUSÕES

Os resultados deste trabalho mostraram que extratos fenólicos da jabuticaba-sabará foram eficientes na prevenção do crescimento excessivo dos tecidos adiposos brancos de camundongos alimentados com dieta rica em lipídios e sacarose, resultando, conseqüentemente, em menor ganho de massa corporal. O extrato mais concentrado em taninos elágicos (C18) apresentou, *in vitro*, maior capacidade antioxidante e maior inibição da α -glicosidase. Este extrato atenuou a hiperglicemia e a hiperinsulinemia, além de prevenir altos níveis de colesterol total e de triacilgliceróis hepáticos. O extrato menos concentrado em taninos (PA) foi mais eficiente na inibição *in vitro* da lipase pancreática e apresentou resultados relativos ao metabolismo da glicose estatisticamente semelhantes àqueles do extrato mais concentrado, embora ligeiramente inferiores. Estes resultados sugerem que os polifenóis da jabuticaba-sabará são efetivos na redução dos riscos à saúde causados pela obesidade, disglucemia e dislipidemia.

Diante da incidência alarmante da obesidade e dos problemas de saúde associados, tais como diabetes *mellitus* tipo 2 e dislipidemia, a adoção de um estilo de vida saudável, com atividade física regular e alimentação rica em fruta e hortaliças, torna-se cada vez mais necessária. Neste contexto, os compostos fenólicos da jabuticaba-sabará mostraram-se adjuvantes promissores na prevenção dos riscos à saúde associados com essas desordens metabólicas.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABE, L. T.; LAJOLO, F. M.; GENOVESE, M. I. Potential dietary sources of ellagic acid and other antioxidants among fruits consumed in Brazil: Jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba* (Vell.) Berg). **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 92, n. 8, p. 1679–1687, 2012.
- ABETE, I. et al. Obesity and metabolic syndrome: Potential benefit from specific nutritional components. **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases**, v. 21, n. SUPPL. 2, 2011.
- ADER, P. et al. Interaction of quercetin glucosides with the intestinal sodium/glucose co-transporter (SGLT-1). **Cancer Letters**, v. 162, n. 2, p. 175–180, 2001.
- AFONSO, M. S. et al. Phenolic compounds from Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) attenuate oxidative stress and reduce blood cholesterol concentrations in diet-induced hypercholesterolemic rats. **Nutrition & metabolism**, v. 10, n. 1, p. 19, 2013.
- AHRÉN, B. et al. Dissociated insulinotropic sensitivity to glucose and carbachol in high-fat diet-induced insulin resistance in C57BL/6J mice. **Metabolism: Clinical and Experimental**, v. 46, n. 1, p. 97–106, 1997.
- ALEZANDRO, M. R. et al. Comparative study of chemical and phenolic compositions of two species of jaboticaba: *Myrciaria jaboticaba* (Vell.) Berg and *Myrciaria cauliflora* (Mart.) O. Berg. **Food Research International**, v. 54, n. 1, p. 468–477, 2013.
- ALEZANDRO, M. R.; GRANATO, D.; GENOVESE, M. I. Jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba* (Vell.) Berg), a Brazilian grape-like fruit, improves plasma lipid profile in streptozotocin-mediated oxidative stress in diabetic rats. **Food Research International**, v. 54, n. 1, p. 650–659, 2013.
- AL-MUAMMAR, M. N.; KHAN, F. Obesity: The preventive role of the pomegranate (*Punica granatum*). **Nutrition**, v. 28, n. 6, p. 595–604, 2012.
- ANAND, P. et al. Insulinotropic effect of cinnamaldehyde on transcriptional regulation of pyruvate kinase, phosphoenolpyruvate carboxykinase, and GLUT4 translocation in experimental diabetic rats. **Chemico-Biological Interactions**, v. 186, n. 1, p. 72–81, 2010.
- ANHÊ, F. F. et al. Polyphenols and type 2 diabetes: A prospective review. **PharmaNutrition**, v. 1, n. 4, p. 105–114, 2013.
- ARABBI, P. R.; GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M. Flavonoids in vegetable foods commonly consumed in Brazil and estimated ingestion by the Brazilian population. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 52, n. 5, p. 1124–1131, 2004.
- BARRETT, A. et al. Inhibition of α -amylase and glucoamylase by tannins extracted from cocoa, pomegranates, cranberries, and grapes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 7, p. 1477–1486, 2013.

- BASELGA-ESCUADERO, L. et al. Long-term supplementation with a low dose of proanthocyanidins normalized liver miR-33a and miR-122 levels in high-fat diet-induced obese rats. **Nutrition Research**, v. 35, n. 4, p. 337–345, 2015.
- BASTOS, D. H. M.; ROGERO, M. M.; ARÊAS, J. A. G. Mecanismos de ação de compostos bioativos dos alimentos no contexto de processos inflamatórios relacionados à obesidade. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v. 53, n. 5, p. 646–56, 2009.
- BENZIE, I. F. F.; STRAIN, J. J. Ferric reducing (antioxidant) power as a measure of antioxidant capacity: the FRAP assay. **Methods Enzymol**, v. 299, p. 15–36, 1999.
- BIDEN, T. J. et al. Lipotoxic endoplasmic reticulum stress, β cell failure, and type 2 diabetes mellitus. **Trends in endocrinology and metabolism: TEM**, v. 25, n. 8, p. 389–398, 2014.
- BORCHARDT, R. T.; HUBER, J. A. Catechol O-methyltransferase. 5. Structure-activity relationships for inhibition by flavonoids. **Journal of medicinal chemistry**, v. 18, n. 13, p. 120–122, 1975.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT, Food Science Technology**, v. 28, p. 25–30, 1995.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA. **LEI Nº 12.651, DE 25 DE MAIO DE 2012. Dispõe sobre a proteção da vegetação nativa.** Disponível em: <http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=consultarLegislacaoFederal>. Acesso em: 16 mar. 2015.
- CHENG, D. M. et al. *In vivo* and *in vitro* antidiabetic effects of aqueous cinnamon extract and cinnamon polyphenol-enhanced food matrix. **Food chemistry**, v. 135, n. 4, p. 2994–3002, 2012.
- CHOI, S. W. et al. Acute hyperglycemia and oxidative stress: Direct cause and effect? **Free Radical Biology and Medicine**, v. 44, n. 7, p. 1217–1231, 2008.
- CITADIN, I.; DANNER, M. A.; SASSO, S. A. Z. Jaboticabeiras. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 32, n. 2, p. 343–656, 2010.
- CLIFFORD, M. N.; SCALBERT, A. Review Ellagitannins – nature , occurrence and dietary burden. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 80, n. November 1999, p. 1118–1125, 2000.
- CROZIER, A.; JAGANATH, I. B.; CLIFFORD, M. N. Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. **Natural product reports**, v. 26, n. 8, p. 1001–1043, 2009.
- DÁVALOS, A.; GÓMEZ-COROVÉS, C.; BARTOLOMÉ, B. Extending Applicability of the Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC-Fluorescein) Assay. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 1, p. 48–54, 2004.
- DEL RIO, D. et al. Dietary (poly)phenolics in human health: structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 18, n. 14, p. 1818–1892, 2013.

DI DONNA, L. et al. Hypocholesterolaemic activity of 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl flavanones enriched fraction from bergamot fruit (*Citrus bergamia*): “*In vivo*” studies. **Journal of Functional Foods**, v. 7, p. 558–568, 2014.

DONADIO, L. C. **Jaboticaba (Myrciaria jaboticaba (Vell.) Berg)**. Jaboticabal: FUNEP, 2000.

DONADO-PESTANA, C. M. et al. Phenolic compounds from cambuci (*Campomanesia phaea* O. Berg) fruit attenuate glucose intolerance and adipose tissue inflammation induced by a high-fat, high-sucrose diet. **Food Research International**, v. 69, p. 170–178, 2015.

EMANUELA, F. et al. Inflammation as a link between obesity and metabolic syndrome. **Journal of Nutrition and Metabolism**, v. 2012, 2012.

GOEDEKE, L. et al. Long-term therapeutic silencing of miR-33 increases circulating triglyceride levels and hepatic lipid accumulation in mice. **EMBO molecular medicine**, v. 6, n. 9, p. 1–9, 2014.

GONÇALVES, A. E. DE S. S.; LAJOLO, F. M.; GENOVESE, M. I. Chemical composition and antioxidant/antidiabetic potential of brazilian native fruits and commercial frozen pulps. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 8, p. 4666–4674, 2010.

HAMZA, N. et al. Treatment of high fat diet induced type 2 diabetes in C57BL/6J mice by two medicinal plants used in traditional treatment of diabetes in the east of Algeria. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 133, n. 2, p. 931–933, 2011.

HANHINEVA, K. et al. Impact of dietary polyphenols on carbohydrate metabolism. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 11, n. 4, p. 1365–1402, 2010.

HARA, A.; RADIN, N. S. Lipid extraction of tissues with a low-toxicity solvent. **Analytical Biochemistry**, v. 90, n. 1, p. 420–426, 1978.

HARIRI, N.; THIBAUT, L. High-fat diet-induced obesity in animal models. **Nutrition research reviews**, v. 23, n. 2, p. 270–299, 2010.

HERMSDORFF, H. H. M. et al. Dietary total antioxidant capacity is inversely related to central adiposity as well as to metabolic and oxidative stress markers in healthy young adults. **Nutrition & Metabolism**, v. 8, n. 1, p. 59, 2011.

HURSEL, R.; WESTERTER-PLANTENGA, M. S. Catechin- And caffeine-Rich teas for control of body weight in humans 1-4. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 98, n. 6, p. 1682–1693, 2013.

ISLAM, S.; WILSON, R. D. Animal models in diabetes research. **Methods in Molecular Biology**, v. 933, p. 161–174, 2012.

JUNG, U. J. et al. Supplementation of persimmon leaf ameliorates hyperglycemia, dyslipidemia and hepatic fat accumulation in type 2 diabetic mice. **PLoS ONE**, v. 7, n. 11, p. 1–10, 2012.

KAMPHUIS, M. M. J. W.; MELA, D. J.; WESTERTERP-PLANTENGA, M. S. Diacylglycerols affect substrate oxidation and appetite in humans. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 77, n. 5, p. 1133–1139, 2003.

LACROIX, I. M. E.; LI-CHAN, E. C. Y. Overview of food products and dietary constituents with antidiabetic properties and their putative mechanisms of action: A natural approach to complement pharmacotherapy in the management of diabetes. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 58, n. 1, p. 61–78, 2014.

LEI, F. et al. Evidence of anti-obesity effects of the pomegranate leaf extract in high-fat diet induced obese mice. **International Journal of Obesity**, v. 31, n. 6, p. 1023–1029, 2007.

LEMIEUX, C. et al. The estrogen antagonist EM-652 and dehydroepiandrosterone prevent diet- and ovariectomy-induced obesity. **Obes Res**, v. 11, n. 3, p. 477–490, 2003.

MARRELLI, M. et al. Inhibition of key enzymes linked to obesity by preparations from mediterranean dietary plants: effects on α -amylase and pancreatic lipase activities. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 68, n. 4, p. 340–346, 2013.

MCCUE, P.; KWON, Y. I.; SHETTY, K. Anti-amylase, anti-glucosidase and anti-angiotensin I-converting enzyme potential of selected foods. **Journal of Food Biochemistry**, v. 29, n. 3, p. 278–294, 2005.

MCDUGALL, G. J. et al. Different polyphenolic components of soft fruits inhibit α -amylase and α -glycosidase. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 7, p. 2760–2766, 2005.

MEYDANI, M.; HASAN, S. T. Dietary polyphenols and obesity. **Nutrients**, v. 2, n. 7, p. 737–751, 2010.

MYERS, N. et al. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, v. 403, n. 6772, p. 853–858, 2000.

NAGAO, T. et al. A catechin-rich beverage improves obesity and blood glucose control in patients with type 2 diabetes. **Obesity (Silver Spring, Md.)**, v. 17, n. 2, p. 310–317, 2009.

NAKAI, M. et al. Inhibitory effects of oolong tea polyphenols on pancreatic lipase *in vitro*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, p. 4593–4598, 2005.

PERRY, R. J. et al. The role of hepatic lipids in hepatic insulin resistance and type 2 diabetes. **Nature**, v. 510, n. 7503, p. 84–91, 2014.

PINTO, M. DA S.; LAJOLO, F. M.; GENOVESE, M. I. Bioactive compounds and quantification of total ellagic acid in strawberries (*Fragaria x ananassa* Duch.). **Food Chemistry**, v. 107, n. 4, p. 1629–1635, 2008.

PIRES, L. V.; COZZOLINO, S. M. F. Aspectos bioquímicos e nutricionais do diabetes melito. In: COZZOLINO, S. M. F.; COMINETTI, C. (Org.). **Bases bioquímicas e fisiológicas da nutrição: nas diferentes fases da vida, na saúde e na doença**. 1. ed. Barueri: Manole, 2013. p. 874 – 911.

PORTER, L. J.; HRSTICH, L. N.; CHAN, B. G. The conversion of procyanidins and prodelphinidins to cyanidin and delphinidin. **Phytochemistry**, v. 25, n. 1, p. 223–230, 1986.

PRIOR, R. L. et al. Whole berries versus berry anthocyanins: Interactions with dietary fat levels in the C57BL/6J mouse model of obesity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 3, p. 647–653, 2008.

PRIOR, R. L. et al. Multi-laboratory validation of a standard method for quantifying proanthocyanidins in cranberry powders. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 90, n. 9, p. 1473–1478, 2010.

RAINS, T. M.; AGARWAL, S.; MAKI, K. C. Antiobesity effects of green tea catechins: a mechanistic review. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 22, n. 1, p. 1–7, 2011.

ROBERTS, C. K.; HEVENER, A. L.; BARNARD, R. J. Metabolic Syndrome and Insulin Resistance: Underlying Causes and Modification by Exercise Training. **Comprehensive Physiology**, v. 3, n. 1, p. 1–58, 2014.

SAE-TAN, S.; GROVE, K. A.; LAMBERT, J. D. Weight control and prevention of metabolic syndrome by green tea. **Pharmacological Research**, v. 64, n. 2, p. 146–154, 2011.

SERGEANT, T. et al. Phenolic compounds and plant extracts as potential natural anti-obesity substances. **Food Chemistry**, v. 135, n. 1, p. 68–73, 2012.

SHIMIZU, M. Diabetes mellitus tipo 2 na síndrome metabólica. In: GIACAGLIA, L. R.; SILVA, M. E. R. DA; SANTOS, R. F. DOS (Org.). **Tratado da Síndrome Metabólica**. 1. ed. São Paulo: Roca, 2010. p. 381–390.

SIGMA-ALDRICH. **Solid Phase Extraction**. Disponível em: <http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Supelco/General_Information/t402150.pdf>. Acesso em: 11 jan. 2016.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUERA-RAVENTOS, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin–Ciocalteu reagent. **Oxidants and antioxidants**, v. 299, p. 152–178 (Pt A), 1999.

SUMIYOSHI, M.; SAKANAKA, M.; KIMURA, Y. Chronic intake of high-fat and high-sucrose diets differentially affects glucose intolerance in mice. **J Nutr**, v. 136, n. 3, p. 582–587, 2006.

SURWIT, R. S. et al. Original articles diet-induced type II diabetes in C57BL/6J mice. v. 37, n. 1850, p. 1163–1167, 1988.

TABARELLI, M. et al. Desafios e oportunidades para a conservação da biodiversidade na Mata Atlântica brasileira. **Megadiversidades**, p. 132–138, 2005.

TENTOLOURIS, N.; LIATIS, S.; KATSILAMBROS, N. Sympathetic system activity in obesity and metabolic syndrome. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1083, n. 1, p. 129–152, 2006.

VAN GAAL, L. F. et al. Mechanisms linking obesity with cardiovascular disease. **Nature**, v. 444, n. 7121, p. 875–880, 2006.

VROEGRIJK, I. O. C. M. et al. Pomegranate seed oil, a rich source of punicic acid, prevents diet-induced obesity and insulin resistance in mice. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, n. 6, p. 1426–1430, 2011.

WHO, World Health Organization. **Global status report on noncommunicable diseases 2014**. Geneva: WHO, 2014.

WHO/FAO. World Health Organization/Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Fruit and vegetables for health: Report of a joint FAO/WHO workshop**. Kobe: FAO/WHO, 2004.

YAMASHITA, Y. et al. Prevention mechanisms of glucose intolerance and obesity by cacao liquor procyanidin extract in high-fat diet-fed C57BL/6 mice. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 527, n. 2, p. 95–104, 2012.