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

Avaliação do efeito de extratos de compostos fenólicos da jaboticaba Sabará (*Myrciaria jaboticaba* (Vell.) Berg) administrados a camundongos C57BL/6 alimentados com dieta hiperlipídica com alto teor de sacarose

MARIA GABRIELA DA CUNHA

Dissertação para obtenção do título de Mestre
Orientadora: Prof. Dr. Maria Inés Genovese

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 de compostos fenólicos da jaboticaba Sabará (*Myrciaria jaboticaba* (Vell.) Berg) administrados a camundongos C57BL/6 alimentados com dieta hiperlipídica com alto teor de sacarose

MARIA GABRIELA DA CUNHA

Versão Original

Dissertação para obtenção do título de Mestre
Orientadora: Prof. Dr. Maria Inés Genovese

São Paulo
2016

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica

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

Cunha, Maria Gabriela da
C972a Avaliação do efeito de extratos de compostos fenólicos da jabuticaba
Sabará (*Myrciaria jaboticaba* (Vell.) Berg) administrados a camundongos
C57BL/6 alimentados com dieta hiperlipídica com alto teor de sacarose /
Maria Gabriela da Cunha. -- São Paulo, 2016.
51p.

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. Obesidade
3. Jabuticaba 4. Inflamação I. T. II. Genovese, Maria Inés, orientador.

Maria Gabriela da Cunha

Avaliação do efeito de extratos de compostos fenólicos da jaboticaba Sabará
(Myrciaria jaboticaba (Vell) Berg) administrados a camundongos C57BL/6
alimentados com dieta hiperlipídica com alto teor de sacarose

Comissão julgadora
da
Tese para obtenção do Título de Mestre

Prof. Dr. Maria Inés Genovese
orientador/presidente

1º examinador

2º examinador

3º examinador

São Paulo, ____ de _____ de 2016.

Dedicatória

Ao Autor da vida, pois sem Ele, eu nada seria.
A meus pais, pelo amor e por me tornarem o que sou hoje.

Agradecimentos

À Universidade de São Paulo, que mais uma vez me deu a oportunidade crescer.

À minha orientadora, Prof. Dr. Maria Inés Genovese, por ter me recebido e compartilhado seus conhecimentos de forma generosa. Serei eternamente grata pela confiança e por todo o aprendizado que me proporcionou.

À Universidade Laval, em especial ao Prof. Dr. André Marette e à toda a equipe de seu laboratório, por todo o apoio a este projeto e aprendizado proporcionado. De igual forma, agradeço ao governo federal canadense, pelo fornecimento da bolsa de estudos ELAP, que me possibilitou ter a experiência única e inesquecível de desenvolver grande parte das análises deste trabalho neste país incrível.

Aos amigos e colegas do nosso grupo de pesquisas, por todo o aprendizado compartilhado e todo o apoio, que sempre veio regado a muitas risadas e união. Meus dias foram muito alegres ao lado de vocês.

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de estudos, e às demais instituições que direta ou indiretamente colaboraram com a realização deste trabalho.

RESUMO

CUNHA, M.G. **Avaliação do efeito de extratos de compostos fenólicos da jabuticaba Sabará (*Myrciaria jaboticaba* (Vell) Berg) administrada a camundongos C57BL/6 alimentados com dieta hiperlipídica com alto teor de sacarose.** 2016. 51f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Crescem a cada dia os índices globais de obesidade associada à síndrome metabólica (SM) e à inflamação. Sob este aspecto, os compostos fenólicos (CFs) exercem papel importante, especialmente no que diz respeito às suas propriedades anti-inflamatória e antiobesogênica. A jabuticaba Sabará (*Myrciaria jaboticaba* (Vell.) Berg) é uma fruta nativa bem aceita pelos brasileiros e rica em CFs. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da administração diária de extratos ricos em CFs desta fruta a camundongos C57BL/6, alimentados com dieta hiperlipídica com alto teor de sacarose (HFHS) por 8 semanas. Os extratos ricos em CFs foram obtidos por extração do fruto inteiro em solução metanol/água (80:20, v/v), seguida de rotaevaporação e extração em fase sólida (EFS). Os animais foram distribuídos em 5 grupos: o grupo Padrão recebeu dieta padrão de laboratório e veículo (água) por gavagem, o grupo HFHS recebeu dieta HFHS e veículo, o grupo EB recebeu 200 mg b. s. (base seca)/kg de peso corporal (PC) de extrato bruto (EB), o grupo C18 recebeu 50 mg EAG (equivalentes de ácido gálico)/kg de PC do extrato obtido em sorvente octadecil silano (C18) (que permite a obtenção de todos os CFs da fruta) e o grupo PA recebeu 50 mg EAG/kg de PC do extrato obtido em sorvente poliamida (PA) (que permite a obtenção de todos os CFs da fruta, exceto os elagitaninos). O grupo C18 apresentou menores ganho de peso, adiposidade e eficiência energética, comparado ao grupo HFHS. Já o grupo EB teve menor expressão gênica do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) no tecido adiposo branco epididimal, e menor concentração deste mesmo marcador no fígado. Estes resultados sugerem que os elagitaninos têm um papel importante na redução do risco do desenvolvimento de obesidade em camundongos que receberam dieta indutora de obesidade e SM, enquanto o EB da fruta parece contribuir para a redução da inflamação destes animais, porém os mecanismos para tal ainda não estão esclarecidos.

PALAVRAS-CHAVE: obesidade, síndrome metabólica, inflamação, compostos fenólicos, jabuticaba Sabará.

ABSTRACT

CUNHA, M.G. **Evaluation of effects of phenolic-rich jaboticaba Sabará (*Myrciaria jaboticaba* (Vell.) Berg) extract in mice C57BL/6 fed a high fat / high sucrose diet** 2016. 51f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

The incidence of obesity is increasing associated with other disorders as metabolic syndrome (MS) and low-grade inflammation. Phenolic compounds (PC) have some well-known properties, such as anti-inflammatory, antidiabetic and antiobesity capacities. Jaboticaba Sabará (*Myrciaria jaboticaba* (Vell.) Berg) is a brazilian fruit well accepted in this country and it has a high PCs amount. The aim of this study was to investigate the effects of phenolic-rich jaboticaba extracts in C57Bl/6J mice fed a high fat/high sucrose (HF/HS) diet during 8 weeks. The phenolic-rich jaboticaba extracts were prepared from fruit extraction in methanol/water solution (80:20, v/v), followed by rotary evaporation and solid phase extraction (SPE). The mice were distributed in 5 groups: the Chow group was fed a chow diet and gavaged daily with vehicle (water), the HFHS group was fed a HF/HS diet vehicle as well, the CE group received 200 mg of jaboticaba crude extract (CE)/kg body weight (BW), the C18 group received 50 mg AGE (acid galic equivalent)/kg BW of phenolic-rich jaboticaba extract obtained by octadecyl silane (C18) sorbent (which permits to extract every PCs from the fruit) and the PA group were gavaged with 50 mg AGE/kg BW of this fruit extract obtained by polyamide (PA) sorbent (which allows to extract every PCs from jaboticaba, excepting ellagitannins). The C18 group had the lowest BW gain, adiposity and energy efficiency, compared to the HFHS group. The CE group presented low tumor necrose factor- α (TNF- α) gene expression on epididymal white adipose tissue and it had also a low hepatic concentration of this inflammatory marker, compared to HFHS group. These results suggest ellagitannins has an important role on reducing risk of obesity in HF/HS-fed mice, while jaboticaba CE seems to contribute on reduction of inflammation in these animals, but the mechanisms are still not understood.

KEY WORDS: obesity, metabolic syndrome, inflammation, phenolic compounds, jaboticaba Sabará.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	11
1.1	Obesidade: epidemia mundial	11
1.1.1	Fisiopatologia da obesidade	11
1.1.1.1	Obesidade e inflamação	11
1.1.1.2	A influência do intestino na obesidade e na inflamação	12
1.1.2	Medidas para ajudar a reverter o quadro mundial da obesidade	14
1.2	Compostos fenólicos na inflamação e na obesidade	15
1.2.1	Compostos fenólicos: definição, classificação e principais fontes alimentares	15
1.2.2	Efeitos dos compostos fenólicos na saúde	16
1.2.3	Jabuticaba Sabará: fruta brasileira rica em compostos fenólicos	17
3.	OBJETIVOS	19
3.1	Objetivo geral	19
3.2	Objetivos específicos	19
4.	MATERIAIS E MÉTODOS	20
4.1	Preparo dos extratos ricos em compostos fenólicos da jabuticaba Sabará	20
4.1.2	Caracterização dos extratos	21
4.1.2.1	Capacidade redutora do Folin-Ciocalteu	21
4.1.2.2	Teor de proantocianidinas pelo método do butanol acidificado	21
4.1.2.3	Teor de proantocianidinas pelo método DMAC	21
4.1.2.4	Teor de ácido elágico total por hidrólise ácida	22
4.1.2.6	Teor de açúcares totais pelo método Dubois	22
4.2	Modelo animal	23
4.2.1	Avaliação de marcadores inflamatórios no fígado, no plasma e no tecido adiposo branco epididimal	26

4.2.1.1	Concentração de IL-6 e de TNF- α no fígado e no plasma	26
4.2.1.2	Expressão gênica de IL-6 e de TNF- α pelo método de reação em cadeia da polimerase	27
4.2.2	Expressões gênicas de LPL e FAS no tecido adiposo branco epididimal e de UCP-1 no tecido adiposo marrom pelo método de reação em cadeia da polimerase	28
4.2.3	Concentração de triacilglicerol hepático	29
4.3	Análise de resultados.....	29
5.	RESULTADOS	30
5.1	Caracterização dos extratos ricos em compostos fenólicos da jabuticaba Sabará	30
5.2	Avaliação dos efeitos biológicos dos extratos obtidos a partir da jabuticaba Sabará em camundongos C57BL/6 alimentados com dieta hiperlipídicas com alto teor de sacarose.....	30
6.	DISCUSSÃO	42
7.	CONCLUSÃO	45
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	46

1. INTRODUÇÃO

1.1 Obesidade: uma epidemia mundial

Em termos gerais, a obesidade é caracterizada pelo desequilíbrio entre a quantidade de energia consumida e a gasta pelo corpo, que gera acúmulo excessivo de tecido adiposo e, conseqüentemente, complicações à saúde. Dentre as principais causas da obesidade, destacam-se o consumo excessivo de produtos de alta densidade energética e com alto teor de gorduras saturadas e/ou açúcares, além do aumento da inatividade física associado a mudanças de estilo de vida geradas pela urbanização (WHO, 2015; SAMPLE et al., 2015).

Segundo a Organização Mundial da Saúde, a prevalência de casos de obesidade em todo o mundo duplicou entre 1980 e 2014, quando o número de adultos (com 18 anos de idade ou mais) com sobrepeso já ultrapassava 1,9 bilhões e, dentre estes, 600 milhões já eram considerados obesos. No que se refere às crianças com idade inferior a 5 anos, em 2013, 42 milhões delas já apresentavam obesidade ou sobrepeso (WHO, 2015).

1.1.1 Fisiopatologia da obesidade

1.1.1.1 Obesidade e inflamação

O tecido adiposo é considerado um órgão endócrino que exerce papel fundamental no desenvolvimento da obesidade e do quadro inflamatório crônico de baixo grau que a acompanha (DOYLE et al., 2012). Existem 3 diferentes tipos de adipócitos:

- branco: responsável por estocar lipídeos, produzir hormônios e substâncias inflamatórias (KROTKIEWSKI, 1983). O acúmulo de triacilglicerol (TG) no adipócito é uma das principais formas de estoque de lipídeos, dependente de enzimas lipogênicas como a lipase lipoproteica (LPL, do inglês, *lipoprotein lipase*) e a ácido graxo sintase (FAS, do inglês, *fatty acid synthase*) (FONSECA-ALANIZ et al., 2006; VERLENGIA; LIMA, 2002);

- marrom: exerce papel importante na manutenção da temperatura corporal e no metabolismo energético (termogênese). Sob este aspecto, destaca-se a importância da termogenina ou *uncoupling protein-1* (UCP-1), proteína expressa por estes adipócitos e

abundantemente encontrada na membrana interna de suas mitocôndrias, onde participa do seu desacoplamento e da liberação de calor (energia). Estudos recentes também sugerem que os adipócitos marrons exercem influência no controle da sensibilidade à insulina (CHONDRONIKOLA et al., 2014; VIRTANEN et al., 2009);

- bege: encontrado no tecido adiposo branco subcutâneo (junto aos adipócitos brancos). Apresenta características similares às de ambos os adipócitos citados acima, como o fato de serem capazes de armazenar lipídeos, mas também de dissipar calor através da UCP-1 (WU, J. et al., 2012).

O tecido adiposo branco (formado basicamente por adipócitos brancos e células dos sistemas imunitário, vascular e neuronal) é classificado basicamente como visceral e subcutâneo, dependendo de sua localização. Sob este aspecto, o tecido adiposo branco visceral destaca-se por apresentar maior capacidade proinflamatória, a qual é bem evidenciada na obesidade, quando favorece o risco de desenvolvimento das complicações associadas à síndrome metabólica (SM), tais como resistência à insulina (RI), diabetes *mellitus* tipo 2, dislipidemias, hipertensão arterial, doenças cardiovasculares e hepáticas como a esteatohepatite não-alcoólica (FAROOQ; FARWA; KHAN, 2015; GUSTAFSON; SMITH, 2015).

Esta inflamação inicia-se com o acúmulo de lipídeos nos adipócitos brancos (obesidade hipertrófica), a qual faz com que estas células secretem proteína quimiotática de monócitos (MCP-1), uma quimiocina que sinaliza a infiltração de macrófagos e de outras células do sistema imunitário no tecido adiposo branco. Com a infiltração dos macrófagos, os adipócitos também são estimulados a secretar a citocina fator de necrose tumoral alfa (TNF- α). Além disso, tanto os adipócitos quanto os macrófagos, uma vez estimulados pela obesidade hipertrófica, têm ativada uma série de proteínas inflamatórias, tais como as interleucinas 1 β e 6 (IL-1 β e IL-6, respectivamente), entre outras. É a ativação desta cascata proinflamatória que está diretamente relacionada ao aumento do risco de SM (GUSTAFSON; SMITH, 2015; GAO et al., 2014; NORSEEN et al., 2012; KANDA et al., 2006).

1.1.1.2 A influência do intestino na obesidade e na inflamação

Outro fator importante a ser considerado na relação entre obesidade, inflamação e SM é a condição intestinal. Indivíduos obesos apresentam alteração na microbiota intestinal, mais

especificamente um aumento na proporção entre bactérias intestinais gram-positivas dos filos *Firmicutes* e *Actinobacteria* e uma redução das gram-negativas *Bacteroidetes*; essa mudança implica em diferenças no metabolismo energético, as quais induzem à obesidade, uma vez que a microbiota de indivíduos obesos parece ter maior habilidade para favorecer o acúmulo de energia. Além disso, esta alteração na população bacteriana intestinal de obesos aumenta a permeabilidade intestinal, o que é evidenciado pelos altos níveis plasmáticos de lipopolissacarídeo (LPS), principal componente da membrana de bactérias gram-negativas. Uma vez em níveis elevados na corrente sanguínea, o LPS também induz à inflamação e, consequentemente à SM (ANHÊ et al., 2015; CARICILLI; SAAD, 2013; DING, 2010; TURNBAUGH, 2009; CANI et al., 2007; BACKHED et al., 2004).

A **Figura 1** a seguir ilustra a relação entre o aumento dos níveis de LPS no plasma e a RI. No tecido adiposo e no músculo esquelético, o processo normal de entrada de glicose nas células inicia-se com a chegada da insulina à corrente sanguínea, a qual, em contato com seu receptor celular, localizado na parte externa da membrana plasmática, ativa a sua autofosforilação em resíduos de tirosina, bem como a fosforilação de proteínas denominadas substratos de receptores de insulina (IRSs) – como os IRSs 1 e 2, também ilustrados nesta figura. Uma vez fosforilados em tirosina, os IRSs 1 e 2 ativam alostericamente a fosfatidilinositol 3 quinase (PI3 quinase) e consequentemente, a proteína quinase B (Akt), que promove a translocação do GLUT4 (do inglês, *glucose transporter type 4*) para a membrana celular, e assim, a captação de glicose (CARICILLI; SAAD, 2013).

Figura 1. Relação entre presença de LPS (lipopolissacarídeo) na circulação sanguínea e redução da sensibilidade à insulina (adaptado de Caricilli e Saad, 2013). TLR4: *tool like receptor* tipo 4; IRS-1/2: substratos de receptores de insulina tipos 1 e 2; PI3 kinase: fosfatidilinositol 3 quinase; AKT: proteína quinase B; IKK: I κ B quinase; JNK: c-Jun N-terminal quinase.

Porém, na presença de processo inflamatório, ocorre a ativação de proteínas da família TLR (do inglês, *Toll Like Receptor*) que interferem nesta sinalização intracelular da insulina. Mais especificamente, o TLR do tipo 4 é ativado na presença de LPS e de gorduras saturadas, quando promove a fosforilação de diversas outras proteínas quinases, até finalmente ativar as proteínas c-Jun N-terminal quinase (JNK) e I κ B quinase (IKK), que são gatilho para a produção de citocinas inflamatórias como a IL-6 e o TNF- α . Além disso, a ativação do TLR4 também promove a fosforilação da serina em lugar da tirosina, o que reduz a ação dos IRSs e, consequentemente, a entrada de glicose na célula (CARICILLI; SAAD, 2013).

1.1.2 Medidas para ajudar a reverter o quadro mundial da obesidade

Para ajudar a reverter esta epidemia mundial, que é a obesidade, as medidas mais conhecidas são: a restrição do consumo de alimentos ricos em gorduras (especialmente as do tipo

saturadas) e açúcares, além da prática regular de atividade física. Porém, nos últimos anos, também tem sido destacada a importância do aumento do consumo de fontes de compostos bioativos para esta finalidade, tais como frutas, verduras, legumes, grãos integrais e oleaginosas (WHO, 2015; SAMPLE et al, 2015; BASTOS; ROGERO; ARÊAS, 2009).

1.2 Compostos fenólicos na inflamação e na obesidade

1.2.1 Compostos fenólicos: definição, classificação e principais fontes alimentares

Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), compostos bioativos são não-nutrientes de ação metabólica ou fisiológica específica no organismo. Dentre eles, destacam-se os compostos fenólicos (CFs), que são os compostos bioativos mais abundantes na dieta e mais relacionados a benefícios à saúde (CROZIER; JAGANATH; CLIFFORD, 2009).

Os CFs são produtos do metabolismo secundário de plantas, denominados desta forma por possuírem ao menos um anel aromático ligado a pelo menos um grupo hidroxila. No reino vegetal, já foram identificadas mais de 8.000 estruturas fenólicas, sendo que uma parte considerável destas foi detectada em alimentos (CROZIER; JAGANATH; CLIFFORD, 2009; STRACK, 1997).

Os CFs são comumente classificados conforme a quantidade e a disposição de seus átomos de carbono e podem ser encontrados conjugados a moléculas de açúcar e/ou a ácidos orgânicos. As principais classes de CFs são:

- flavonoides: apresentam 15 carbonos e 2 anéis aromáticos unidos por 3 carbonos. São os CFs mais encontrados no Reino Vegetal, especialmente nas folhas e frutos das plantas. Suas principais subclasses são: flavonóis, flavonas, flavan-3-óis (que abrangem catequinas e epicatequinas), antocianidinas, flavanonas e isoflavonas;

- não-flavonoides: compreendem os ácidos fenólicos (dentre os quais destacam-se os ácidos gálico e elágico) e os taninos (condensados, que incluem as proantocianidinas, e hidrolisáveis, que incluem os elagitaninos) (CROZIER; JAGANATH; CLIFFORD, 2009; SCALBERT; WILLIAMSON, 2000; STRACK, 1997).

Dentre as principais fontes de CFs consumidas na maior parte do mundo estão os chás verde e preto, o café, o cacau/chocolate, a cebola, as oleaginosas, as bebidas alcoólicas fermentadas tais como vinho tinto, cerveja e cidra, além de frutas como as *berries*, a romã e a jabuticaba (ALEZANDRO et al., 2013a; CROZIER; JAGANATH; CLIFFORD, 2009).

1.2.2 Efeitos dos compostos fenólicos na saúde

Dentre as propriedades mais conhecidas dos CFs estão seu grande potencial anti-inflamatório, antioxidante, hipoglicêmico, hipolipidêmico e até mesmo antifúngico e antibacteriano. Estas características são bem consolidadas através de estudos que comprovam os efeitos positivos dos mesmos, por exemplo, na redução de dislipidemias, RI, inflamação, obesidade, disbiose intestinal, complicações cardiovasculares e hepáticas, e até mesmo em alguns tipos de câncer (ANHÊ et al., 2015; KUBATKA, P. et al., 2015; ROOPCHAND et al., 2015; BORGES; CONCEIÇÃO; SILVEIRA, 2014; YOSHIMURA et al., 2013; PARK et al., 2011; SHRESTHA et al., 2009).

Um estudo desenvolvido por Anhê et al. (2015) mostrou que a administração de 200 mg de base seca (b. s.)/kg de peso corporal do extrato bruto (EB) de cranberry (rico em CFs, tais como flavonóis e proantocianidinas) a camundongos que receberam dieta com alto teor de gorduras e sacarose (conhecida como dieta HFHS, do inglês *high-fat high-sucrose*) por 8 semanas foi eficaz em evitar o acúmulo de tecido adiposo branco, melhorar a sensibilidade à insulina, bem como em reduzir os níveis plasmáticos de LPS e da síntese de marcadores inflamatórios no fígado e no intestino (tais como TNF- α , COX-2 (ciclooxigenase 2) e NF- κ B (fator nuclear kappaB)). O extrato também ajudou a evitar o acúmulo hepático de TG e melhorou significativamente a microbiota intestinal, tornando-a similar à de indivíduos magros (em termos de equilíbrio entre as populações bacterianas *Bacteroidetes* e *Firmicutes*).

Já outro estudo de Yoshimura et al. (2013) mostrou que a administração de 0,1% de ácido elágico (CF presente em frutas como morango e framboesa), na forma livre, adicionado à dieta hiperlipídica de ratos obesos e hiperglicêmicos por 68 dias, promoveu a melhora dos níveis glicêmicos e insulinêmicos destes animais, além de uma melhora do perfil lipídico sérico (redução dos níveis de ácidos graxos livres e de TG, associada ao aumento dos níveis de HDL-col (do inglês, *high density lipoprotein-cholesterol*). Análises histológicas do fígado destes ratos

também indicaram que houve formação de poucas microvesículas lipídicas, em comparação às muitas macrovesículas encontradas no grupo controle.

Outra classe de CFs que tem sido foco de muitos estudos são as antocianinas, responsáveis pela coloração vermelha, azul e violeta de diversos vegetais, dentre eles a framboesa, o morango e a jabuticaba. Diversos estudos mostram suas propriedades antioxidante, antimicrobiana, anticarcinogênica e antiviral (BORGES; CONCEIÇÃO; SILVEIRA, 2014; WU, S. et al., 2012). Além disso, seus efeitos associados à melhora da RI e da inflamação também têm sido comprovados, por exemplo, através de um estudo realizado por Jennings et al. (2014), que calculou, através de questionário alimentar, a quantidade de antocianinas presente na dieta de 1.997 mulheres saudáveis com idade entre 18 e 76 anos. Os resultados mostraram que o alto consumo de fontes de antocianinas estava associado a baixos níveis séricos de marcadores de inflamação (como a proteína C-reativa) e a menores níveis insulinêmicos.

1.2.3 Jabuticaba Sabará: fruta brasileira rica em compostos fenólicos

O Brasil é o terceiro maior produtor mundial de frutas, atrás apenas da China e da Índia. A produção brasileira é de cerca de 41,5 milhões de toneladas por ano, o que corresponde a 5% da produção mundial (SEAB/DERAL, 2015).

Dentre as frutas brasileiras de grande aceitação, destaca-se a jabuticaba (*Myrciaria* spp.). Pertencente à família botânica Myrtaceae, a jabuticaba é uma fruta cultivada na Mata Atlântica, especialmente no estado de São Paulo. Consumida não apenas na forma *in natura*, mas também em sucos, geleias, vinhos e licores, ela apresenta grande potencial junto à indústria de alimentos (DONADIO, 2000).

Um estudo de Alezandro et al. (2013a) caracterizou o perfil de CFs da jabuticaba e concluiu que nas suas sementes há altas concentrações de elagitaninos e de proantocianidinas, enquanto na sua casca existem elevados teores de antocianinas e de derivados de quercetina.

Comparada a outras 35 frutas comercializadas no Brasil (de diferentes famílias botânicas), a jabuticaba Sabará (*Myrciaria jaboticaba*) também se destaca pelo alto teor de ácido elágico, que chega a ser maior que o das *berries*, tais como *blueberry*, *cranberry* e morango. Estes altos teores de ácido elágico total são derivados dos elagitaninos, uma vez que o teor de ácido elágico

livre desses frutos é muito baixo (em torno de 2 a 5% do total de ácido elágico) (ABE et al., 2012).

No que diz respeito às antocianinas e aos derivados de quercetina, presentes predominantemente na casca da jabuticaba Sabará, um experimento de 10 semanas com ratos da linhagem Sprague-Dawley que receberam dieta hiperlipídica junto com a casca da fruta liofilizada comprovou que a presença da mesma reduziu os níveis de insulina sérica e aumentou os níveis de HDL-col plasmático (LENQUISTE et al., 2012).

Outro estudo desenvolvido por Alezandro et al. (2013b) comparou 2 diferentes tipos de extratos de jabuticaba Sabará – um obtido em coluna octadecil silano (C18, que permite a obtenção de todos os CFs da fruta) e outro, obtido em coluna poliamida (PA, para obtenção de todos os CFs, exceto os elagitaninos). Cada grupo de camundongos recebeu doses diárias de extrato (calculadas a partir de 3 g de fruta liofilizada/kg de peso corporal, o que equivale a cerca de 50 mg equivalentes de ácido gálico (EAG)/kg de peso corporal quando purificado em coluna C18) durante 8 semanas, concomitantemente com a dieta HFHS. Os resultados mostraram que o grupo que recebeu o extrato obtido em coluna C18 apresentou menor ganho de peso corporal, menor acúmulo de TG hepático e melhor sensibilidade à insulina, evidenciando a influência dos elagitaninos (ou de sua ação sinérgica com o restante dos CFs da jabuticaba Sabará) no controle destes fatores.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral:

- Avaliar o efeito de CFs da jabuticaba Sabará sobre a adiposidade e outros fatores relacionados à SM (como esteatohepatite não-alcoólica, inflamação, sensibilidade à insulina e integridade intestinal) de camundongos que receberam dieta indutora de SM.

2.2 Objetivos específicos:

- Caracterizar quimicamente os extratos ricos em CFs da jabuticaba Sabará em relação ao conteúdo de fenólicos totais, ácidos fenólicos, flavonoides e outros compostos.

- Determinar o efeito da administração diária destes extratos sobre a adiposidade, avaliando especificamente enzimas relacionadas ao metabolismo de gorduras, sobre a eficiência energética, a sensibilidade à insulina, a concentração de marcadores inflamatórios e de integridade intestinal em camundongos machos da linhagem C57BL/6 alimentados com dieta HFHS por 8 semanas.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Preparo dos extratos ricos em compostos fenólicos da jabuticaba Sabará

A jabuticaba Sabará madura foi colhida em janeiro de 2014 em São João da Boa Vista (latitude 21° 58' 09" S e longitude 46° 47' 53" W), no estado de São Paulo, e obtida de plantação comercial na mesma época através da Companhia de Entrepósitos e Armazéns Gerais de São Paulo (CEAGESP), um dos principais distribuidores de frutas, verduras e legumes do Estado.

As amostras foram lavadas, congeladas (-20° C) e liofilizadas. Depois, foram homogeneizadas em gral e pistilo, com auxílio de nitrogênio líquido, uniformizadas em tamis 80 mesh e armazenadas a -20° C.

Para a obtenção dos extratos ricos em CFs, as amostras foram extraídas em solução de metanol/água/ácido acético (70:29,5:0,5), na proporção de 1:50 (m/v) por 2 horas sob agitação a 5° C. O procedimento se repetiu por mais 2 vezes (1 hora por vez). A mistura foi filtrada a vácuo com papel de filtro (Whatman nº 1) e rotaevaporada (RE 120 Buchi®; Danderyd, Suécia) a 37° C até secagem e ressuspensa em água destilada. A partir desta etapa, foram preparados os 3 diferentes extratos a serem administrados aos animais no experimento *in vivo*, de acordo com as etapas a seguir:

- extrato bruto (EB): a amostra ressuspensa em água foi congelada, liofilizada para obtenção de 200 mg (b. s.)/kg de peso corporal e rediluída em 200 a 250 µL de água destilada por dose administrada a cada animal;

- extrato C18: um volume de amostra ressuspensa equivalente a 0,5 g de extrato liofilizado foi adicionado a um tubo de extração em fase sólida com 1 g de sorvente C18 (Supelclean® LC-18 SPE; Sigma-Aldrich Co., St Louis, Estados Unidos) para obtenção de todos os CFs da jabuticaba. Em seguida, foi feita lavagem do tubo com água destilada e eluição com 20 mL de metanol. A amostra foi rotaevaporada novamente (RE 120 Buchi®; Danderyd, Suécia) a 37° C até secagem e ressuspensa em volume de água destilada suficiente para conter 50 mg EAG/kg peso corporal do animal;

- extrato PA: o mesmo procedimento descrito acima foi seguido para obtenção dos CFs da jabuticaba, com exceção dos elagitaninos. Porém, para esta extração, ao invés de se utilizar sorvente C18, utilizou-se PA (PA CC6 Macherey-Nagel GmbH & Co.; Düren, Alemanha). Para

elução, foi utilizado mesmo volume de metanol, seguido de 60 mL de metanol/amônia (99,5:0,5 v/v). Ao final, obteve-se a mesma concentração de extrato (50 mg EAG/kg peso).

4.1.2 Caracterização dos extratos

4.1.2.1 Capacidade redutora do Folin-Ciocalteu

O teor de CFs totais foi determinado através do método Folin-Ciocalteu (SINGLETON; ORTHOFER; LAMUELA-RAVENTOS, 1999), com adaptações. A 250 µL de extrato diluído adicionaram-se 2 mL de água destilada e 250 µL do reagente Folin-Ciocalteu (ácido fosfotúngstico-fosfomolibdico) (Sigma-Aldrich Co.; St Louis, Estados Unidos). Após 3 minutos à temperatura ambiente, foram adicionados 250 µL de solução saturada de carbonato de sódio (Na_2CO_3) e os tubos foram levados a banho em água (37° C) por 30 minutos, quando surgiu a coloração azulada. Os resultados foram expressos em equivalentes de ácido gálico /mL extrato. O ácido gálico também foi adquirido da Sigma-Aldrich Co. (St Louis, Estados Unidos).

4.1.2.2 Teor de proantocianidinas pelo método do butanol acidificado

A quantificação de proantocianidinas foi realizada conforme descrito por Skerget et al. (2005) com adaptações. Foram adicionados 250 µL de amostra devidamente diluída em um tubo com solução de n-butanol/HCl, o qual foi tampado e levado a banho em água (95°C) por 15 minutos. Após atingir temperatura ambiente, a absorbância foi medida a 540 nm. Os resultados foram expressos em mg equivalentes de cianidina-3-rutinosídeo/mL extrato. O padrão foi adquirido da empresa Extrasynthèse (Genay, France).

4.1.2.3 Teor de proantocianidinas pelo método DMAC

De acordo com a metodologia de Prior et al. (2010) com algumas modificações, 70 µL de amostra previamente diluída foi colocada em microplaca transparente de 96 poços, seguida pela adição de 210 µL de solução 4-dimetilaminocinamaldeído (DMAC), adquirida pela empresa Sigma-Aldrich Co. (St Louis, USA). Em seguida, a microplaca foi incubada a 25°C por 30 minutos, enquanto foi medida a cada minuto a absorbância a 640 nm. Ao final, foi selecionada a absorbância de máximo valor, dentro deste intervalo de tempo. A concentração de

proantocianidinas por amostra foi expressa em equivalentes de procianidina B2 (Extrasynthèse; Genay, France) por 1 mL de extrato.

4.1.2.4 Teor de ácido elágico total por hidrólise ácida

A quantificação de ácido elágico total foi feita de acordo com Pinto, Lajolo e Genovese (2008), com adaptações. A 1 mL de amostra, foi adicionado 1 mL de ácido trifluoroacético (4N) a 120° C por 90 minutos para ocorrer hidrólise. Em seguida, a solução foi seca sob nitrogênio, ressuspensa em metanol e filtrada para análise em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), segundo Arabbi, Genovese e Lajolo (2004). As amostras de extrato PA foram rotaevaporadas a 38°C, ressuspensas em 1 mL de metanol para cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e filtradas em filtros de politetrafluoroetileno (PTFE) (Millipore Ltd, Bedford, MA). Para identificação e quantificação dos compostos, foi utilizada coluna Prodigy 5 µm ODS(3) (250 x 4.6 mm, Phenomenex Ltd, Torrance, CA). O gradiente de solventes utilizado foi constituído por A (água : tetrahidrofuroano : ácido trifluoroacético – 98 : 2 : 0,1) e B (acetonitrila), de forma a ter 17% de B por 2 min., 25% de B após 5 min., 35% de B após 8 min. e 50% de B após mais 5 min. Utilizou-se cromatógrafo do sistema Hewlett-Packard 1100 com injetor automático de amostras, bomba quaternária e detector de arranjo de diodo (DAD), sob controle do software ChemStation. As amostras foram injetadas e o composto fenólico foi avaliados, por meio da comparação do tempo de retenção e espectro com os padrões. A quantificação foi baseada em calibração externa e os padrões foram adquiridos da Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, EUA) e da Extrasynthèse (Genay, França).

4.1.2.6 Teor de açúcares totais pelo método Dubois

De acordo com Dubois et al. (1956) com modificações, foram adicionados 500 µL da amostra previamente diluída, 500 µL de fenol (5%) e 5 mL de ácido sulfúrico em um tubo. Após 10 min., a solução foi agitada e, ao atingir temperatura ambiente, foi feita leitura da absorbância a 490 nm. Os resultados foram expressos em mg equivalentes de glicose por mL de extrato. O padrão de glicose foi adquirido da Sigma-Aldrich Co. (St Louis, EUA).

4.2 Modelo animal

Foi realizado o experimento *in vivo* durante 8 semanas, com 60 camundongos machos da linhagem C57BL/6, que receberam dieta padrão de laboratório (**Quadro 1**) ou dieta HFHS (**Quadro 2**) indutora de obesidade e de SM. Os animais foram mantidos em ambiente com temperatura de 25°C, 75% de umidade, ciclos alternados de 12 h luz/12 h escuro, com ração e água *ad libitum*. Eles foram separados aleatoriamente em 5 grupos, conforme a seguir:

- Grupo Padrão (n=12): animais alimentados com dieta padrão de laboratório e água por gavagem;
- Grupo HFHS (n=12): animais controle alimentados com dieta HFHS e água (gavagem);
- Grupo EB (n=12): animais alimentados com dieta HFHS, e o EB da jabuticaba na dose de 200 mg (b. s.)/kg de peso corporal (correspondentes a 10 mg EAG/kg de peso corporal) por gavagem;
- Grupo C18 (n=12): animais alimentados com dieta HFHS e extrato C18 (para conter todos os CFs da fruta), na mesma dose de 50 mg EAG/kg de peso corporal (gavagem);
- Grupo PA (n=12): animais alimentados com dieta HFHS e extrato PA (para conter os CFs da fruta, exceto elagitaninos), em dose correspondente a 50 mg EAG/kg de peso corporal (gavagem).

O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Proteção aos Animais da Universidade Laval (Québec City, Canada) e todos os procedimentos foram realizados em completa conformidade com a legislação canadense do assunto.

O peso corpóreo e a ingestão alimentar dos animais foram monitorados 2 vezes por semana. Os tecidos adiposos retroperitoneal, epididimal e inguinal foram coletados ao final para avaliação da variação de adiposidade dos animais.

Quadro 1. Composição centesimal da dieta padrão 2018 Teklad Global® utilizada no experimento *in vivo*, conforme informação fornecida pelo fabricante (Harlan Laboratories).

Componentes	Quantidade (g/100g)	Valor energético (kcal/100g)	Valor energético (%)
Proteína bruta	18,6	74,4	24,0
Extrato etéreo	6,2	55,8	18,0
Matéria fibrosa	3,5	-	-
Carboidratos	45,0	180,0	58,0
(calculados por diferença)			
Cálcio	1,0	-	-
Fósforo	0,7	-	-
Sódio	0,2	-	-
Potássio	0,6	-	-
Cloro	0,4	-	-
Magnésio	0,2	-	-
Total		310,0	100,00

Quadro 2. Composição de ingredientes da dieta HFHS utilizada no experimento *in vivo*.

Componentes	Quantidade (g/100 g)	Valor energético (kcal/100 g)	Valor energético (%)
Caseína	20,0	80,0	14,7
L-cistina	0,2	0,7	0,1
Sacarose	26,9	107,6	19,8
Celulose	5,0	-	-
Mistura de minerais	6,7	-	-
Mistura de vitaminas	1,4	-	-
Gordura de porco	19,8	178,2	32,7
Óleo de milho	19,8	178,2	32,7
Bitartarato de colina	0,2	-	-
Total	100,0	544,7	100,0

Fonte: Anhê et al. 2015

Na 6ª semana os animais foram avaliados por teste de tolerância à insulina intraperitoneal (TTIIP), segundo a metodologia descrita por Protzek et al. (2010) com modificações. Antes da administração de insulina, foram coletadas alíquotas de sangue via caudal, correspondentes ao tempo zero (T0). A seguir, foi injetada solução de insulina por via intraperitoneal (0,65 UI/kg peso corporal), e então, foram coletadas novas alíquotas de sangue (também por via caudal) após 5, 10, 15, 20, 30 e 60 minutos, para determinação da glicemia (determinada por glicosímetro Accu-Check Active Roche® C.15198 (Hoffman-La Roche AG, Basel, Suíça)).

Na 7ª semana foram coletadas as fezes produzidas por cada animal dentro do período de 24 horas e, em seguida, as mesmas foram congeladas a -80° C para avaliação de seu conteúdo energético. As amostras fecais foram secas em capela e inseridas em bomba calorimétrica 6100 Compensated Jack Calorimeter® (Parr Instrument Company, Moline, EUA) para determinação de seu conteúdo energético. Os resultados foram expressos em kcal/amostra (24 h).

Na 8ª semana, os animais foram avaliados por meio de teste oral de tolerância à glicose (TOTG), conforme descrito por Xu et al. (2009), com adaptações. Após jejum de 12 horas, foram coletadas alíquotas de sangue por veia safena referentes aos tempos zero (T0, que precede a administração da dextrose), 30, 60, 90 e 120 minutos após a administração de 2 µL de solução de dextrose / g de peso corporal. Para o índice HOMA-IR (do inglês, *homeostatic model assessment – insulin resistance*), a glicemia foi determinada através do glicosímetro Accu-Check Active Roche® C.15198 (Hoffman-La Roche AG, Basel, Suíça) e a insulina foi avaliada através de *kit* bioquímico comercial ELISA Alpco® (American Laboratory Products Company, Salem, EUA); o cálculo do índice foi feito com base na fórmula: [insulinemia de jejum (µUI/mL) x glicemia de jejum (mmol/L)] / 22,5.

Ao final do experimento, os animais foram eutanasiados, após jejum de 6 horas, com a administração inalatória de isoflurano (5%) diluído em oxigênio (através de máscara facial), seguida de punção cardíaca.

A **Figura 2** a seguir descreve resumidamente o cronograma do experimento animal detalhado acima.

Figura 2. Modelo animal com dieta indutora de síndrome metabólica e análises de avaliação de seu efeito. HFHS: do inglês, *high-fat high-sucrose* diet; EB: extrato bruto; C18 (octadecil silano, referente a outro sorvente utilizado para o mesmo fim); PA: poliamida (referente ao sorvente utilizado para preparo de extrato a ser administrado aos animais); TTIIP: teste de tolerância à insulina via intraperitoneal; TOTG: teste oral de tolerância à glicose.

4.2.1 Avaliação de marcadores inflamatórios no fígado, no plasma e no tecido adiposo branco epididimal

4.2.1.1 Concentração de IL-6 e de TNF- α no fígado e no plasma

As concentrações plasmáticas e hepáticas de IL-6 e de TNF- α foram avaliadas por meio de *kits* bioquímicos comerciais ELISA R&D Systems® (R&D Systems, Inc., Minneapolis, EUA). Já a análises da concentração de LPS foi realizada com uso do *kit* bioquímico comercial ELISA MyBiosource® (MyBiosource, Inc., San Diego, EUA).

4.2.1.2 Expressão gênica de IL-6 e de TNF- α pelo método de reação em cadeia da polimerase

O ácido ribonucléico (RNA) dos tecidos hepático e adiposo branco epididimal foram extraídos com o reagente Trizol® (50 a 100 mg tecido/mL Trizol®) e posterior homogeneização. (No caso do tecido adiposo epididimal, foi necessária incubação por 5 minutos, à temperatura ambiente, ao final desta etapa.)

Em seguida, foram adicionados 200 μ L de clorofórmio, quando surgiu a coloração rósea. As amostras foram, então, homogeneizadas e centrifugadas por 15 minutos a 21.913 g e a 4° C. Da fase sobrenadante, foram coletados 300 μ L e adicionado o mesmo volume de etanol (100%). O conteúdo foi transferido para tubo com coluna de lã de vidro e centrifugado por 1 minuto a 25.155 g, a 4°C. A lavagem e a eluição da coluna foi feita com uso de *kit* comercial Gene JET RNA Purification - Thermo Fisher Scientific® (Life Technologies Ltd., Waltham, EUA).

Para cálculo da concentração de RNA, as amostras foram diluídas em água (1:25) e submetidas à leitura espectrofotométrica em comprimentos de onda de 260 e 280 nm, para avaliação da concentração e pureza do RNA total (RNA_{tot}). A razão A_{260/280} é proporcional à concentração de RNA total na amostra (SAMBROOK, FRITSCH e MANIATIS, 1989).

Ajustadas as concentrações de RNA, foi adicionado *kit* comercial Thermo Fisher Scientific® (Life Technologies Ltd., Waltham, EUA) às amostras, que foram então incubadas em termociclador Rotor-Gene RG-3000A RCovertt Research®, controlado pelo *software* Rotor Gene - Covertt Research® (ambos da empresa Montreal Biotech, Inc., Kirkland, Canadá) com ajuste de temperaturas adequadas para que ocorra a transcrição reversa (geração de cDNA), de forma cíclica.

Para amplificação do cDNA, foi utilizado termociclador Rotor-Gene RG-3000A Covertt Research® e a quantificação de cópias do gene foi realizada através do *software* Rotor Gene - Covertt Research® (ambos da Montreal Biotech, Inc., Kirkland, Canadá).

Optou-se por amplificar o cDNA destes tecidos hepático e adiposo epididimal por meio do sistema TaqMan®. As sondas utilizadas descritas no **Quadro 3**, e foram adquiridos pela empresa Integrated DNA Technologies (Coralville, EUA). Já os reagentes foram adquiridos através da empresa Life Technologies Ltd. (Waltham, EUA).

Quadro 3. Localização das sondas TaqMan® referentes a genes de camundongos (*Mus musculus*).

Gene (abreviação – nome)	Acesso nº
Act β – actina beta	Mm 01205647_g1
TNF- α – fator de necrose tumoral alfa	Mm00443258_m1
IL-6 – interleucina-6	Mm 00446190_m1

Os resultados foram expressos como razão entre a expressão do gene-alvo e do gene *housekeeping* (Act β). A escolha do gene *housekeeping* se deu porque sua expressão não se altera com a administração de extratos de jabuticaba.

4.2.2 Expressões gênicas de LPL e FAS no tecido adiposo branco epididimal e de UCP-1 no tecido adiposo marrom pelo método de reação em cadeia da polimerase

O RNA dos tecidos adiposos marrom e branco epididimal foi extraído conforme metodologia descrita no tópico anterior. A amplificação do cDNA de ambos os tecidos foi realizada por meio do sistema SYBR Green® (também pertencente à empresa Life Technologies Ltd., Waltham, EUA). Os *primers* utilizados estão detalhados no **Quadro 4**, e também foram adquiridos pela empresa Integrated DNA Technologies (Coralville, EUA) e os reagentes, da empresa Life Technologies Ltd. (Waltham, EUA).

Quadro 4. Sequência de nucleotídeos de *primers* (SYBR Green®) referentes a genes de camundongos (*Mus musculus*).

Gene (abreviação – nome)	Acesso nº	Sequência de nucleotídeos (<i>primers</i>)
Act β – actina beta	NM_007393.3	forward 5'-CTC TAG ACT TCG AGC AGG AG-3' / reverse 5'-AGA GTA CTT GCG CTC AGG AG-3'
UCP1 – termogenina	NC_000074.6	forward 5' - GCA GTG TTC ATT GGG CAG CC -3' / reverse 5' – GGA CAT CGC ACA GCT TGG TAC -3'
FAS – ácido graxo sintase	NM_007988	forward 5'-CCGAGTCAGAGAACCTACAG-3' / reverse 5'-CCTGGATAGCATTCCGAACCT-3'
LPL – lipase lipoproteica	NM_008509	forward 5'-CTTCATTGACTCCCTGCTGAATG-3' / reverse 5'-GAAGGCCTGGTTGTGTTGCTT-3'

Fonte: *Genebank*

4.2.3 Concentração de triacilglicerol hepático

Foi feita a dosagem do conteúdo TG hepático segundo a metodologia desenvolvida por Folch, Lees e Sloane Stanley (1957). Para tal, cerca de 0,1 g de amostra foi homogeneizada com 3 mL de solução clorofórmio / metanol, na proporção 2:1 (v/v), seguida de centrifugação por 10 minutos a 447,2 g, incubação por 12 horas a temperatura ambiente, transferência do sobrenadante para novos tubos e adição de 750 µL de solução salina clorofórmio/metanol/cloreto de sódio, na proporção 2:1:0,75 (v/v/v) para cada 3 mL da solução de clorofórmio. Em seguida, foi feita nova centrifugação por 5 minutos a 447,2 g. A fase superior foi descartada e a fase restante foi seca em nitrogênio líquido Reacti-Therm III (Thermo Scientific, Bellefonte, EUA). Ao final, o pellet formado foi ressuspendido em 1 mL de etanol 100% e o conteúdo do TG foi analisado por meio de *kit* comercial Randox TG® (Randox Laboratories Ltd., Kearneysville, EUA).

4.3 Análise de resultados

Os dados referentes à caracterização química dos extratos foram calculados com base em média $\pm$ desvio-padrão (DP). Já os dados biológicos foram calculados com base na média $\pm$ erro-padrão (EP).

Foi aplicado o teste de normalidade Shapiro-Wilk e, para dados paramétricos, foi aplicada análise de variância ANOVA One-way seguida por teste post hoc de Fisher LSD (Least Significant Difference). Já os dados não-paramétricos foram avaliados por ANOVA Kruskal-Wallis & Median Test. Para tanto, foi utilizado o *software* Statistica ® versão 12 (Tulsa, EUA), exceto o cálculo de KITT (referente ao ipITT), realizado por meio do *software* GraphPad Prism® versão 6.01 (San Diego, EUA).

5. RESULTADOS

5.1 Caracterização dos extratos ricos em compostos fenólicos da jabuticaba Sabará

Conforme descrito na **Tabela**, os animais dos grupos C18 e PA receberam 5 vezes mais compostos fenólicos totais do que o grupo EB. A quantidade de ácido elágico total em cada uma das doses diárias de extratos variou, principalmente, em função da presença de elagitaninos: o extrato C18 apresentou a maior quantidade de ácido elágico total (correspondente à maior presença de elagitaninos neste extrato, conforme explicado anteriormente).

Tabela. Caracterização química dos extratos ricos em compostos fenólicos da jabuticaba Sabará, expressa em concentração (mg/mL) e por dose diária administrada aos animais*.

Compostos	EB		C18		PA	
	mg/mL	mg/dia	mg/mL	mg/dia	mg/mL	mg/dia
Fenólicos totais (mg EAG/mL)	1,02 ± 0,01	10,0	5,85 ± 0,01	50,0	3,06 ± 0,01	50
Ácido elágico total (mg/mL)	1,21 ± 0,09	0,58	14,6 ± 0,31	1,36	5,33 ± 0,22	0,89
Proantocianidinas por:						
<i>n</i> -butanol (mg eq cianidina-3-rutinosídeo/mL)	19,6 ± 2,21	9,5	427 ± 28,3	39,7	573 ± 14,1	95,7
DMAC (mg eq procianidina B2/mL)	7,5 ± 0,69	3,6	526 ± 17,6	48,9	441 ± 8,0	73,6
Açúcares totais	18,9 ± 0,65	4,64	6,83 ± 0,02	1,46	5,65 ± 0,15	2,31

Dados expressos como média ± desvio-padrão. * cálculo com base em animal com peso corporal de 25 g.

5.2 Avaliação dos efeitos dos compostos fenólicos da jabuticaba Sabará sobre a adiposidade em modelo animal

Dentre os grupos que receberam os extratos preparados a partir da jabuticaba Sabará, o grupo C18 apresentou o menor ganho de peso (**Figuras 1A e 1B**) e menor eficiência energética (**Figura 1C**) em comparação ao grupo HFHS.

Figura 1. Efeito dos extratos ricos em compostos fenólicos da jaboticaba Sabará (extrato bruto (EB) e extratos obtidos em sorventes octadecil silano (C18) e poliamida (PA)) sobre o peso corporal (A), ganho de peso corporal total (B) e eficiência energética (C) em camundongos alimentados com dieta HFHS (*high-fat high-sucrose*), além do grupo que recebeu dieta padrão (controle), por 8 semanas. $n = 11-12$. Dados expressos como média $\pm$ EP. Diferentes letras (a, b, c) representam diferenças significativas entre os grupos ($p < 0,05$).

Embora tenha havido esta diferença de ganho de peso entre os animais que receberam os extratos preparados a partir da jaboticaba Sabará, o mesmo não foi observado em relação à quantidade de dieta consumida por cada um destes grupos (**Figuras 2A e 2B**), tampouco em relação ao conteúdo energético ingerido (**Figuras 2C e 2D**) e o eliminado pelas fezes destes animais (**Figuras 2E e 2F**).

Figura 2. Efeito dos extratos ricos em compostos fenólicos da jabuticaba Sabará (extrato bruto (EB) e extratos obtidos em sorventes octadecil silano (C18) e poliamida (PA)) sobre o consumo da dieta (A), consumo total da dieta (B), consumo energético (C), consumo energético total (D), eliminação de energia pelas fezes em 24 h (E) e eliminação de energia pelas fezes relativa à da dieta (F) em camundongos alimentados com dieta HFHS (*high-fat high-sucrose*), além do grupo que recebeu dieta padrão (controle), por 8 semanas. n = 11-12 (A, B, C, D); n = 9-12 (E, F). Dados expressos como média $\pm$ EP. Diferentes letras (a, b) representam diferenças significativas entre os grupos ($p < 0,05$).

Figura 3. Efeito dos extratos ricos em compostos fenólicos da jabuticaba Sabará (extrato bruto (EB) e extratos obtidos em sorventes octadecil silano (C18) e poliamida (PA)) sobre os tecidos adiposos brancos: inguinal absoluto (A), inguinal relativo ao peso corporal (B), retroperitoneal absoluto (C), retroperitoneal relativo ao peso corporal (D), epididimal absoluto (E) e epididimal relativo ao peso corporal (F) em camundongos alimentados com dieta HFHS (*high-fat high-sucrose*), além do grupo que recebeu dieta padrão (controle), por 8 semanas. $n = 11-12$. Dados expressos como média $\pm$ EP. Diferentes letras (a, b, c) representam diferenças significativas entre os grupos ($p < 0,05$).

Em relação ao peso dos tecidos adiposos brancos, não houve diferença estatística entre os grupos que receberam os extratos da jabuticaba no que diz respeito aos pesos absoluto e relativo do tecido inguinal (**Figuras 3A e 3B**). Já em relação aos tecidos retroperitoneal e epididimal, o grupo C18 apresentou menores pesos absolutos, em comparação com o grupo HFHS (**Figuras 3C e 3E**); porém estas diferenças não foram significativas quando avaliados os pesos relativos ao corporal (**Figuras 3D e 3F**). No que diz respeito aos tecidos adiposos totais (representados pelo inguinal, retroperitoneal e epididimal), o grupo C18 destacou-se novamente por apresentar os menores pesos absoluto e relativo ao corporal (**Figuras 4A e 4B**).

Figura 4. Efeito dos extratos ricos em compostos fenólicos da jabuticaba Sabará (extrato bruto (EB) e extratos obtidos em sorventes octadecil silano (C18) e poliamida (PA)) sobre os tecidos adiposos brancos total absoluto (A) e total relativo ao peso corporal (B) em camundongos alimentados com dieta HFHS (*high-fat high-sucrose*), além do grupo que recebeu dieta padrão (controle), por 8 semanas. n = 11-12. Dados expressos como média $\pm$ EP. Diferentes letras (a, b, c) representam diferenças significativas entre os grupos ($p < 0,05$).

Embora o grupo C18 tenha apresentado peso corporal significativamente menor e baixa eficiência energética, a expressão gênica de UCP-1 do tecido adiposo marrom deste grupo não foi diferente do grupo HFHS. O mesmo observou-se nos demais grupos que receberam os outros extratos (**Figura 5**).

Figura 5. Efeito dos extratos ricos em compostos fenólicos da jabuticaba Sabará (extrato bruto (EB) e extratos obtidos em sorventes octadecil silano (C18) e poliamida (PA)) sobre a expressão gênica da proteína UCP1 (do inglês, *uncoupling protein 1* ou termogenina) no tecido adiposo marrom de camundongos alimentados com dieta HFHS (*high-fat high-sucrose*), além do grupo que recebeu dieta padrão (controle), por 8 semanas. $n = 9-12$. Dados expressos como média $\pm$ EP. Diferentes letras (a, b) representam diferenças significativas entre os grupos ($p < 0,05$).

Já as análises de expressão gênica dos marcadores inflamatórios TNF- α e IL-6 no tecido adiposo epididimal mostraram que o grupo EB apresentou menor expressão de TNF- α em comparação ao grupo HFHS (**Figura 6A**). Nenhuma diferença significativa foi encontrada em relação à expressão de IL-6 neste órgão (**Figura 6B**).

(A)

(B)

Figura 6. Efeito dos extratos ricos em compostos fenólicos da jabuticaba Sabará (extrato bruto (EB) e extratos obtidos em sorventes octadecil silano (C18) e poliamida (PA)) sobre a expressão gênica das proteínas TNF- α (fator de necrose tumoral – alfa) (A) e IL-6 (interleucina-6) (B) no tecido adiposo epididimal de camundongos alimentados com dieta HFHS (*high-fat high-sucrose*), além do grupo que recebeu dieta padrão (controle), por 8 semanas. $n = 8-12$. Dados expressos como média $\pm$ EP. Diferentes letras (a, b) representam diferenças significativas entre os grupos ($p < 0,05$).

Quando a análise de expressão gênica destes mesmos marcadores inflamatórios foi realizada no fígado, não foi encontrada nenhuma diferença estatística significativa (**Figuras 7A e 7B**). Porém a dosagem da concentração hepática de TNF- α e de IL-6 demonstrou que o grupo EB teve menor concentração de TNF- α em relação ao grupo HFHS (**Figura 7C**). Nenhuma diferença estatística significativa foi encontrada em relação à concentração de IL-6 no fígado (**Figura 7D**).

Figura 7. Efeito dos extratos ricos em compostos fenólicos da jabuticaba Sabará (extrato bruto (EB) e extratos obtidos em sorventes octadecil silano (C18) e poliamida (PA)) sobre a expressão gênica das proteínas TNF- α (fator de necrose tumoral – alfa) (A) e IL-6 (interleucina-6) (B) e sobre a concentração de TNF- α (C) e de IL-6 (D) no fígado de camundongos alimentados com dieta HFHS (*high-fat high-sucrose*), além do grupo que recebeu dieta padrão (controle), por 8 semanas. n = 10-12 (A, B, D); n = 11-12 (C). Dados expressos como média $\pm$ EP. Diferentes letras (a, b) representam diferenças significativas entre os grupos ($p < 0,05$).

Ao ser investigada a expressão gênica das enzimas LPL e FAS no tecido adiposo branco epididimal, notou-se não haver diferença estatística significativa entre os grupos que receberam os extratos da jabuticaba Sabará em relação ao grupo HFHS (Figuras 8A e 8B).

Figura 8. Efeito dos extratos ricos em compostos fenólicos da jabuticaba Sabará (extrato bruto (EB) e extratos obtidos em sorventes octadecil silano (C18) e poliamida (PA)) sobre a expressão gênica das proteínas LPL (lipase lipoproteica) e FAS (do inglês, fatty acid synthase) no tecido adiposo branco epididimal de camundongos alimentados com dieta HFHS (*high-fat high-sucrose*), além do grupo que recebeu dieta padrão (controle), por 8 semanas. n=9-11 (A); n=5-8 (B). Dados expressos como média $\pm$ EP. Diferentes letras (a, b) representam diferenças significativas entre os grupos ($p < 0,05$).

As análises de glicemia (**Figuras 9A e 9B**), insulinemia (**Figuras 9C e 9D**), bem como o cálculo do índice HOMA-IR (**Figura 9E**) obtidos a partir do TOTG mostraram que não houve diferença significativa entre os grupos que receberam os diferentes extratos da jabuticaba, em comparação com o grupo HFHS. O mesmo foi observado nos resultados glicemia e kitt referentes ao TTIP (**Figuras 10A e 10B**).

Figura 9. Efeito dos extratos ricos em compostos fenólicos da jabuticaba Sabará (extrato bruto (EB) e extratos obtidos em sorventes octadecil silano (C18) e poliamida (PA)) sobre a curva glicêmica (A), a área sob a curva (ASC) da glicemia total, a curva insulinêmica (C), a área sob a curva da insulinemia total e o índice HOMA-IR (do inglês, *homeostatic model assessment – insulin resistance*) obtidos através de teste oral de tolerância à glicose (TOTG) aplicado em camundongos alimentados com dieta HFHS (*high-fat high-sucrose*), além do grupo que recebeu dieta padrão (controle), por 8 semanas. n = 11-12. Dados expressos como média $\pm$ EP. Diferentes letras (a, b) representam diferenças significativas entre os grupos ($p < 0,05$).

(A)

(B)

Figura 10. Efeito dos extratos ricos em compostos fenólicos da jabuticaba Sabará (extrato bruto (EB) e extratos obtidos em sorventes octadecil silano (C18) e poliamida (PA)) sobre a curva glicêmica (A), o índice kitt (B) obtidos através de TTIP aplicado em camundongos alimentados com dieta HFHS (*high-fat high-sucrose*), além do grupo que recebeu dieta padrão (controle), por 8 semanas. $n = 11-12$. Dados expressos como média $\pm$ EP. Diferentes letras (a, b) representam diferenças significativas entre os grupos ($p < 0,05$).

Em relação à dosagem plasmática de LPS, não foi encontrada diferença estatística significativa entre os grupos que receberam extratos da jabuticaba Sabará em relação ao grupo HFHS (**Figura 11**).

Figura 11. Efeito dos extratos ricos em compostos fenólicos da jaboticaba Sabará (extrato bruto (EB) e extratos obtidos em sorventes octadecil silano (C18) e poliamida (PA)) sobre a concentração plasmática de LPS (lipopolissacarídeos) em camundongos alimentados com dieta HFHS (*high-fat high-sucrose*), além do grupo que recebeu dieta padrão (controle), por 8 semanas. $n = 11-12$. Dados expressos como média $\pm$ EP. Diferentes letras (a, b) representam diferenças significativas entre os grupos ($p < 0,05$).

Análises complementares foram feitas no fígado no intuito de investigar sinais de esteatohepatite não-alcoólica. Foram elas: peso hepático absoluto e relativo, além da dosagem de TG hepático. Entre os grupos que receberam extratos preparados a partir da jaboticaba Sabará, o grupo C18 apresentou menor peso absoluto do fígado, comparado ao grupo HFHS; porém, esta diferença não foi mantida quando avaliado o peso hepático relativo ao corporal (**Figuras 12A e 12B**). No que diz respeito à dosagem de TG, o grupo EB apresentou níveis mais elevados em relação ao grupo HFHS (**Figura 12C**).

Figura 12. Efeito dos extratos ricos em compostos fenólicos da jabuticaba Sabará (extrato bruto (EB) e extratos obtidos em sorventes octadecil silano (C18) e poliamida (PA)) sobre os pesos hepáticos absoluto (A) e relativo ao corporal (B), e sobre a dosagem de triacilglicerol total no fígado (C) em camundongos alimentados com dieta HFHS (*high-fat high-sucrose*), além do grupo que recebeu dieta padrão (controle), por 8 semanas. $n = 11-12$. Dados expressos como média $\pm$ EP. Diferentes letras (a, b, c) representam diferenças significativas entre os grupos ($p < 0,05$).

6. DISCUSSÃO

Uma das principais razões para que a obesidade seja considerada uma epidemia mundial atualmente é o alto consumo de alimentos ricos em gorduras saturadas e açúcares, o que leva também à inflamação crônica de baixo grau associada à SM. Estudos com camundongos que recebem dieta similar mostram que estes animais desenvolvem complicações de saúde similares às observadas em humanos. Em contrapartida, também tem merecido destaque o papel dos CFs presentes em frutas como a jabuticaba Sabará e nas *berries* por exemplo, já que exercem importante papel no auxílio à redução do risco de desenvolvimento de obesidade e na melhora deste quadro de inflamação e SM (ANHÊ et al., 2015; SAMPLE et al., 2015; ALEZANDRO et al., 2013b; LENQUISTE et al., 2012; FRAULOB et al., 2010; GALLOU-KABANI et al., 2007).

O presente estudo demonstrou que os animais que receberam o extrato contendo todos os fenólicos da jabuticaba Sabará (grupo C18) apresentaram não apenas menor ganho de peso e de tecido adiposo, mas também menor eficiência energética, de forma similar à observada no estudo de Alezandro et al. (2013b). Com o intuito de identificar a razão para este menor ganho de peso, foi investigada a termogênese dos animais através da análise da expressão gênica da proteína UCP-1 no tecido adiposo marrom; contudo, não foi encontrada nenhuma diferença significativa entre os grupos que receberam os extratos da jabuticaba Sabará, em relação ao grupo HFHS. Também não foi possível encontrar indícios para esta explicação através das análises de consumo da dieta e de energia, ou mesmo pela eliminação de energia através das fezes, uma vez que não houve diferença entre estes grupos. Tampouco foram encontrados indícios para esta explicação através da avaliação da expressão gênica das proteínas relacionadas ao metabolismo lipídico (FAS e LPL) ou à inflamação (TNF- α e IL-6). Desta forma, mais estudos são necessários para que sejam descobertos os mecanismos pelos quais os compostos presentes no extrato C18 geram este menor ganho de peso nos animais.

No que diz respeito à caracterização química dos extratos, as diferenças observadas até então comprovam que, conforme esperado, os extratos obtidos em colunas de resinas C18 e PA concentram maior quantidade de CFs (cerca de 5 vezes mais), em comparação com o EB. Em relação aos elagitânicos, o extrato C18 apresentou maiores teores deste corroborando com o que já havia sido comprovado por Alezandro et al. (2013a). Embora não tenha sido feita a análise direta deste CF, as análises de ácido elágico total oferecem uma estimativa importante da

concentração do mesmo, visto que elagitaninos são derivados de ácido elágico, conforme demonstrado neste mesmo estudo citado.

Já em relação ao grupo de animais que recebeu o EB da jabuticaba Sabará, notou-se uma melhora do quadro inflamatório através da baixa concentração de TNF- α no fígado e da menor expressão gênica deste mesmo marcador inflamatório no tecido adiposo epididimal. No estudo desenvolvido por Anhê et al. (2015), o grupo de camundongos que recebeu dieta HFHS por 8 semanas e a mesma dose de 200 mg EB de *cranberry* (fruta cujo perfil de fenólicos é similar ao da jabuticaba, segundo Alezandro et al., 2013a), também apresentou melhora do quadro inflamatório, porém, evidenciada pela menor síntese proteica dos marcadores inflamatórios hepáticos COX-2 e NF-kB. Logo, o presente estudo corrobora com o que já foi evidenciado anteriormente e traz à tona outras vias pelas quais a inflamação também é suprimida através da administração do EB de frutas com perfil de CFs similares, como é o caso da jabuticaba Sabará e da *cranberry*.

Em relação à sensibilidade à insulina, estudos anteriores já comprovaram que os CFs da jabuticaba foram efetivos na melhora deste quadro em camundongos que receberam dieta HFHS por 8 semanas (ALEZANDRO et al., 2013b). Contudo, no presente estudo não foi encontrada diferença significativa entre os grupos de animais que receberam os extratos da fruta em relação ao grupo HFHS. Uma das possíveis explicações para tal diferença pode estar na composição da dieta: enquanto o estudo de Alezandro et al. (2013b) utilizou dieta HFHS com 40% de energia proveniente da sacarose e 40% vinda de gorduras, o presente experimento administrou aos camundongos dieta HFHS com menor teor de sacarose (correspondente a 25% da energia total da dieta) e teor mais elevado de gorduras (65% da energia total). Porém, de qualquer forma, o gráfico de curva glicêmica obtido através do TTIP sugere que, apesar de não ter havido diferença estatística significativa entre os grupos que receberam os extratos, o grupo C18 apresentou valores menores em alguns pontos de ambas as curvas, em comparação com o grupo HFHS, o que permite que seja levantada a hipótese de que futuros estudos com maior duração de tempo poderiam confirmar se haveria melhora significativa da sensibilidade à insulina neste grupo.

Em relação à permeabilidade intestinal dos animais, o mesmo estudo desenvolvido por Anhê et al. (2015) comprovou haver melhora significativa entre camundongos que receberam

dieta HFHS e o EB de *cranberry*, em comparação com os animais que receberam apenas dieta HFHS. Porém, o mesmo não foi observado no presente estudo, já que não houve diferença estatística significativa entre os grupos que receberam os extratos, em comparação com o grupo HFHS. Contudo, é possível notar na **Figura 11** que os grupos C18 e EB apresentaram as menores médias de concentração plasmática de LPS, comparáveis até mesmo ao grupo Padrão. Esta consideração permite sugerir que futuros estudos de protocolo similar, porém desenvolvidos por maior período de tempo, poderiam encontrar diferenças significativas nos níveis de LPS plasmático.

E, por fim, as análises complementares realizadas no fígado tiveram o intuito de investigar se os animais desenvolveram esteatohepatite não-alcoólica, já que esta é uma complicação comumente associada à SM e à obesidade (FAROOQ; FARWA; KHAN, 2015). Porém, os resultados de peso do fígado e de dosagem de triglicérides mostraram que não houve diferença significativa entre os grupos que receberam os extratos produzidos a partir da jabuticaba Sabará e o grupo HFHS. Possivelmente esta diferença não foi observada porque experimentos com camundongos para avaliação de comprometimentos hepáticos induzidos por dieta, em geral, têm maior duração de período (pelo menos, 12 semanas) e dietas com diferente composição (em geral, são apenas hiperlipídicas, ou hiperlipídicas com alto teor de outro tipo de açúcar, como a frutose) (CLAPPER et al., 2013).

7. CONCLUSÃO

Os elagitaninos presentes na jabuticaba Sabará (ou a ação sinérgica entre eles e outros CFs da jabuticaba) parecem favorecer o menor ganho de peso corporal e de tecido adiposo, além de reduzir a eficiência energética em camundongos que receberam dieta indutora de obesidade e de SM, porém não interferiram no quadro pró-inflamatório induzido por esta mesma dieta. Já o EB da jabuticaba Sabará favoreceu a redução da inflamação nestes animais, porém, sem alterar o ganho de peso, nem a eficiência energética destes animais, provavelmente devido à concentração muito menor de CFs.

Novos estudos fazem-se necessários para investigação dos mecanismos que geram, tanto o menor ganho de peso entre animais que receberam todos os CFs da jabuticaba Sabará, quanto a menor inflamação entre os que receberam o EB da fruta. Para tal, sugere-se também o desenvolvimento de novo experimento *in vivo* com camundongos C57BL/6, de protocolo similar, porém, por período superior ao de 8 semanas para que fatores como alteração de sensibilidade à insulina e esteatohepatite não-alcoólica associadas à SM possam ser melhor investigadas.

8. 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, p. 1679-87, 2012.
- Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Regulamento técnico de substâncias bioativas e probióticos isolados em alegação de propriedade funcional e/ou de saúde**. Resolução RDC nº 2, de 7 de janeiro de 2002.
- 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, p. 478-477, 2013a.
- ALEZANDRO, M. R. et al. **Polyphenols of jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba* (Vell.) Berg), a Brazilian grape-like fruit, attenuate hyperlipidemia, inflammation and insulin resistance**. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos). Faculdade de Farmácia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013b.
- ANHÊ, F. F. et al. A polyphenol-rich extract protects from diet-induced obesity, insulin resistance and intestinal inflammation in association with increased *Akkermansia* spp. population in the gut microbiota of mice. **Gut**, v. 64, n. 6, p. 872-883, 2015.
- ARABBI, P. R.; GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M. Flavonoids in vegetable foods commonly consumed in Brazil. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 1124-1131, 2004.
- ARIAS, N. et al. The combination of resveratrol and quercetin enhances the individual effects of these molecules on triacylglycerol metabolism in white adipose tissue. **European Journal of Nutrition**, 2015. In press.
- BACKHED, F. et al. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 44, p. 15718-15723, 2004.
- 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. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 53, n. 5, p. 646-656, 2009.
- BORGES, L. I.; CONCEIÇÃO, E. C.; SILVEIRA, D. Active compounds and medicinal properties of *Myrciaria* genus. **Food Chemistry**, v. 153, p. 224-233, 2014.

CANI, P. D. et al. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. **Diabetes**, v. 56, p. 1761-1772, 2007.

CAO, H. e SHOCKEY, J. M. Comparison of TaqMan and SYBR Green qPCR methods for quantitative gene expression in tung tree tissues. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, p. 12296-12303, 2012.

CHONDRONIKOLA, M. et al. Brown adipose tissue improves whole-body glucose homeostasis and insulin sensitivity in humans. **Diabetes**, v. 63, p. 4089-4099, 2014.

CLAPPER, J. R. et al. Diet-induced mouse model of fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis reflecting clinical disease progression and methods of assessment. **American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 305, p. 483–495, 2013.

CROZIER, A.; JAGANATH, I. B.; CLIFFORD, M. N. Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. **Natural Product Reports**, v. 26, p. 1001-1043, 2009.

DING, S. et al. High-Fat Diet: Bacteria Interactions Promote Intestinal Inflammation Which Precedes and Correlates with Obesity and Insulin Resistance in Mouse. **Plos One**, v. 5, n. 8, p. 1-13, 2010.

DONADIO, L. C. **Jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba* (Vell.) Berg.** Jaboticabal: FUNEP. 2000, 55 p.

DOYLE, S. L. et al. Visceral obesity, metabolic syndrome, insulin resistance and cancer. **Proceedings of Nutrition Society**, v. 71, n. 1, p. 181-189, 2012.

DRAGANO, N. R. V.; MARÓSTICA, M. R. **Avaliação do efeito da casca de jaboticaba liofilizada sobre o ganho de peso, perfil lipídico e resistência à insulina em camundongos alimentados com dieta hiperlipídica.** Dissertação (mestrado). Faculdade de Engenharia dos Alimentos Unicamp, 2011.

FAROOQ, W.; FARWA, U.; KHAN, F.R. The metabolic syndrome and inflammation: role of insulin resistance and increased adiposity. **Oman Medical Journal**, v. 30, n. 2, p. 100-103, 2015.

FOLCH, J.; LEES, M.; SLOANE STANLEY, G. H. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 226, n. 1, p. 497-509, 1957.

FONSECA-ALANIZ, M.R. et al. O tecido adiposo como centro regulador do metabolismo. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabolismo**, v. 50, n. 2, p. 216-229, 2006.

FRAULOB et al. A mouse model of metabolic syndrome: insulin resistance, fatty liver and non-alcoholic fatty pancreas disease (NAFPD) in C57BL/6 mice fed a high fat diet. **Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition**, v. 46, p. 212-223, 2010.

GALLOU-KABANI, C. et al. C57BL/6J and A/J mice fed a high-fat diet delineate Components of metabolic syndrome. **Obesity**, v. 15, n. 8, p. 1996-2005, 2007.

GASPEROTTI, M. et al. Profiling and Accurate Quantification of Rubus Ellagitannins and Ellagic Acid Conjugates Using Direct UPLC-Q-TOF HDMS and HPLC-DAD Analysis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 4602-4616, 2010.

GAO, D. et al. Interleukin-1 β mediates macrophage-induced impairment of insulin signaling in human primary adipocytes. **American Journal of Physiology, Endocrinology and Metabolism**, v. 307, p. 289-304, 2014.

GUSTAFSON, B.; SMITH, U. Regulation of white adipogenesis and its relation to ectopic fat accumulation and cardiovascular risk. **Atherosclerosis**, v. 241, p. 27-35, 2015.

JENNINGS, A. et al. Intakes of anthocyanins and flavones are associated with biomarkers of insulin resistance and inflammation in women. **Journal of Nutrition**, v. 144, n. 2, p. 202-208, 2014.

KANDA, H. et al. MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity. **Journal of Clinical Investigation**, v. 116, n. 6, p. 1494-1505, 2006.

KROTKIEWSKI, M. et al. Impact of obesity on metabolism in men and women. Importance of regional adipose tissue distribution. **Journal of Clinical Investigation**, v. 72, p.1150-1162, 1983.

KUBATKA, P. et al. Fruit peel polyphenols demonstrate substantial anti-tumour effects in the model of breast cancer. **European Journal of Nutrition**, 2015. In press.

LEE, M. S.; KIM, C. T.; KIM, Y. Green tea (-)-epigallocatechin-3-gallate reduces body weight with regulation of multiple genes expression in adipose tissue of diet-induced obese mice.

Annals of Nutrition and Metabolism, v. 54, n. 2, p. 151-157, 2009.

LENQUISTE, S. A. et al. Freeze-dried jaboticaba peel added to high-fat diet increases HDL cholesterol and improves insulin resistance in obese rats. **Food Research International**, v. 49, n.1, p. 153–160. 2012.

- NASCIMENTO, S.; SUAREZ, E. R.; PINHAL, M. A. S. Tecnologia de PCR e RT-PCR em tempo real e suas aplicações na área médica. **Revista Brasileira de Medicina**, v.10, p. 7-19, 2012.
- NORSEEN, J. et al. Retinol-Binding Protein 4 Inhibits Insulin Signaling in Adipocytes by Inducing Proinflammatory Cytokines in Macrophages through a c-Jun N-Terminal Kinase- and Toll-Like Receptor 4-Dependent and Retinol-Independent Mechanism. **Molecular and Cellular Biology**, v. 32, n. 10, p. 2010-2019, 2012.
- PARK, H. J. et al. Green tea extract attenuates hepatic steatosis by decreasing adipose lipogenesis and enhancing hepatic oxidant defenses in ob/ob mice (review). **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 22, p. 393-400, 2011.
- PINTO, M. S.; LAJOLO, F. M.; GENOVESE, M. I. Bioactive compounds and quantification of total ellagic acid in strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch). **Food Chemistry**, v. 107, p. 1629-1635, 2008.
- PRIOR, R. L. et al. Assays for Hydrophilic Antioxidant Capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORAC)) of Plasma and Other Biological and Food Samples. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 3273-3279, 2003.
- 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, p. 1473–1478, 2010.
- PORTER, L.J.; HRSTICH, L.N.; CHAN, B.G. The conversion of procyanidins and prodelphinidins to cyanidin and delphinidin. **Phytochemistry**, v. 25, p. 223-230, 1986.
- PROTZEK, A. O. P. et al. Insulin and glucose sensitivity, insulin secretion and β -cell distribution in endocrine pancreas of the fruit bat *Artibeus lituratus*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 157, p. 142–148, 2010.
- Robbins, R. J. et al. Method performance and multi-laboratory assessment of a normal phase high pressure liquid chromatography–fluorescence detection method for the quantitation of flavanols and procyanidins in cocoa and chocolate containing samples. **Journal of Chromatography** v. 1216, p. 4831–4840, 2009.
- ROOPCHAND, D. E. et al. Dietary polyphenols promote growth of the gut bacterium *Akkermansia muciniphila* and attenuate high fat diet-induced metabolic syndrome. **Diabetes**, 2015. In press.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning**: a laboratory manual. 2^o edition, New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press, 1989.

SAMPLE, C. H. et al. Western-style diet impairs stimulus control by food deprivation state cues. Implications for obesogenic environments. **Appetite**, 2015. In press.

SCALBERT, A. e WILLIAMSON, G. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. **Journal of Nutrition**, v. 130, p. 2073-2085, 2000.

SECRETARIA DE ESTADO DA AGRICULTURA E DO ABASTECIMENTO (SEAB). Departamento de Economia Rural (DERAL). **Fruticultura** – Maio de 2015. Disponível em http://www.agricultura.pr.gov.br/arquivos/File/deral/Prognosticos/fruticultura_2014_15.pdf.

Acesso em: 01 Jun. 2015.

SHRESTHA, S. et al. Dietary green tea extract lowers plasma and hepatic triglycerides and decreases the expression of sterol regulatory element-binding protein-1c mRNA and its responsive genes in fructose-fed, ovariectomized rats. **Journal of Nutrition**, v. 139, p. 640-645, 2009.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTOS, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. **Methods in Enzymology**, v. 229, p. 152–178, 1999.

SKERGET, M. et al. Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities. **Food Chemistry**, v. 89, p. 191-198, 2005.

STRACK, D. In **Plant Biochemistry**, ed. P. M. Dey and J. B. Harborne, Academic Press, London, p. 387–416, 1997.

TURNBAUGH, P. J. et al. A core gut microbiome in obese and lean twins. **Nature**, v. 457, n. 7228, p. 480-484, 2009.

VIRTANEN, K. A. et al. Functional brown adipose tissue in healthy adults. **The New England Journal of Medicine**, v. 360, n. 15, p.1518-1525, 2009.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Obesity and overweight**. 2015. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/> . Acesso em: 13 Mai. 2015.

WU, J. et al. Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human. **Cell**, v. 150, p. 366-376, 2012.

WU, S. B. et al. Metabolite profiling of jaboticaba (*Myrciaria cauliflora*) and other dark-colored fruit juices. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, p. 7513–7525, 2012.

WU, X., e PRIOR, R. L. Systematic identification and characterization of anthocyanins by HPLC-ESI-MS/MS in common foods in the United States: fruits and berries. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 2589-2599, 2005.

XU, E. et al. Targeted disruption of carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 promotes diet-induced hepatic steatosis and insulin resistance. **Endocrinology**, v. 150, p. 3503-3512, 2009.

YOSHIMURA, Y. et al. Ellagic acid improves hepatic steatosis and serum lipid composition through reduction of serum resistin levels and transcriptional activation of hepatic ppara in obese, diabetic KK-Ay mice. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 434 p. 486-491, 2013.