

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS E NUTRIÇÃO

Avaliação da composição e da capacidade antioxidante “*in vivo*” e “*in vitro*” de antocianinas da casca de jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba* (Vell.) Berg) liofilizada em ratos Wistar

Dissertação de Mestrado em Alimentos e Nutrição

Alice Vieira Leite

Nutricionista

Prof. Dr. Mário Roberto Maróstica Júnior

Orientador

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do Título de Mestre em Alimentos e Nutrição-Área de Nutrição Básica Experimental Aplicada à Tecnologia de Alimentos.

Campinas

2010

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP

L536a Leite, Alice Vieira
Avaliação da composição e da capacidade antioxidante “in vivo” e
“in vitro” de antocianinas da casca de jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba*
(Vell.) Berg) liofilizada em ratos Wistar / Alice Vieira Leite. --
Campinas, SP: [s.n], 2010.

Orientador: Mário Roberto Maróstica Júnior
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Jaboticaba. 2. Antocianina. 3. Compostos fenólicos. 4.
Orac. 5. DPPH. I. Mário Roberto Maróstica Júnior. II.
Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de
Alimentos. III. Título.

cars/bibfea

Título em inglês: Evaluation of composition and antioxidant capacity in vivo and in vitro
anthocyanins in freeze-dried jaboticaba peel (*Myrciaria jaboticaba* (Vell.)
Berg) in rats

Palavras-chave em inglês (Keywords): Jaboticaba, Anthocyanin, Phenolic compounds, Orac,
DPPH.

Área de concentração: Nutrição Experimental Aplicada à Tecnologia de Alimentos

Titulação: Mestre em Alimentos e Nutrição

Banca examinadora: Mário Roberto Maróstica Júnior

Jaime Amaya Farfan

Roberta Roesler

Programa de Pós Graduação em Alimentos e Nutrição

BANCA EXAMINADORA

Este exemplar corresponde à redação final de dissertação defendida em
__/__/__ por Alice Vieira Leite aprovada pela comissão julgadora em __/__/__

Prof. Dr. Mário Roberto Maróstica Júnior

(Orientador)

Prof. Dr. Jaime Amaya Farfan

(Membro)

Profa. Dra. Lília Zago Ferreira dos Santos

(Membro)

Dra. Roberta Roesler

(Suplente)

Profa.Dra. Gláucia Maria Pastore

(Suplente)

Agradecimentos

Agradeço e a Deus por permitir que eu chegasse até aqui.

À minha mãezinha Elga pela determinação e carinho nestes anos todos e principalmente por me encorajar em todos os momentos de desânimo, inclusive nas noites de estudo.

Ao meu pai Celso, por me ensinar o princípio da pesquisa científica, padronização e exatidão.

Às minhas queridas irmãs Melissa e Lara por estarem presentes, mesmo longe, em todas as etapas da minha vida, torcendo e me incentivando.

Ao Glauber, meu noivo, por ser essencial em todas as etapas desse projeto, desde o transporte de jabuticabas nas madrugadas das quartas-feiras, até os finais de semana com os ratos. Agradeço pelo carinho, presença constante em minha vida e incentivo para que eu nunca desistisse. Você é parte desta realização.

Aos meus tios, primos e familiares por estarem tão presentes em minha vida.

Ao professor Mário Maróstica, pela orientação, paciência e confiança no meu trabalho e principalmente por se mostrar prestativo em todas as minhas dúvidas, sempre com propostas inteligentes. Obrigada por ter sido um verdadeiro leme no meu trabalho.

À Universidade Federal de Alfenas pela sólida formação e aos professores Marcos Coelho Bissoli e José Maurício Schneedorf Ferreira da Silva por despertarem em mim o gosto pela pesquisa.

Aos professores, Michel de Angelis Cardoso e Maria de Fátima Barcellos, da Universidade Federal de Lavras pela experiência laboratorial que me proporcionaram no estágio, além do carinho e da credibilidade.

À professora da Universidade Federal de Alfenas, Sueli Leiko, minha orientadora de iniciação científica, por contribuir na minha formação.

Aos professores presentes na banca: Gláucia Maria Pastore, Jaime Amaya Farfan, Lília Zago Ferreira dos Santos e Roberta Roesler pelas valiosas correções.

À Professora Gláucia Maria Pastore, suas alunas Luciana Malta e Cecília Castro, e Angélica, pelas análises realizadas em conjunto com o Bioaromas. Lu e Ceci, vocês foram peça chave neste trabalho, obrigada pelos ensinamentos, pela paciência e principalmente pela amizade nesses meses que passamos juntas naquele laboratório “congelado”.

Ao Professor Marcos Eberlin e sua orientada Maria Francesca Riccio pela valiosa colaboração nas análises.

Às estagiárias Luiza e Tereza. Obrigada principalmente pelo carinho e dedicação que tiveram com o meu trabalho.

Ao Prof. Nilo Sérgio Sabbião Rodrigues pela oportunidade, durante o PED, de vivenciar e acreditar na docência.

À querida amiga Maria Inês pela amizade e carinho e principalmente por compartilhar de forma minuciosa e cuidadosa suas experiências nas análises laboratoriais.

À minha companheira de todas as horas, Glaucia Carielo Lima. Obrigada por você ser um porto seguro nestes anos todos de convivência.

Às amigas de todas as horas, Paula Poeta e Izabela Rocha pela amizade e apoio constante nestes sete anos de convivência.

Às amigas Paula Uggioni e Mariana por estarem sempre compartilhando suas experiências e dividindo momentos de descontração nos intervalos do árduo trabalho.

À amiga Suzana, por auxiliar no dia a dia do trabalho experimental. Obrigada por ser mais que um auxílio e sim, uma amiga.

À Soely, por compartilhar sua experiência nas metodologias desenvolvidas.

Aos amigos e funcionários da FEA: Chico, Fátima, Cidinha, Carla, Eliana, Bete, Iara, Val, Nice e Eliete pelos momentos de descontração proporcionados.

À família LANUM: Paula Poeta, Luciane Berno, Maria Inês, Elisvânia Freitas, Claudia Cardoso, Nathalia Dragano e Glaucia Carielo e Anne y Castro.

À Família Depan 2008: Liane, Daniela Miotto, Izabela, Mariana, Isabelle e Priscila.

Aos amigos e amigas que apesar da distância estavam sempre torcendo por mim, em especial a Elaine Terra pela presença sempre constante.

Aos animais experimentais, que por dois meses foram meus fiéis companheiros, obrigada por terem dado a vida para ciência.

Ao CNPq pela bolsa de estudos concedida.

"Atrás do grupo-escolar ficam as
jabuticabeiras.
Estudar, a gente estuda. Mas depois,
ei pessoal: furtar jabuticaba.
Jabuticaba chupa-se no pé.
O fruto exaure-se no ato de furtar
Consciência mais leve do que asa
ao descer,
volto de mãos vazias para casa."

Carlos Drummond de Andrade

O tempo e as jabuticabas

“Contei meus anos e descobri que terei menos tempo para viver daqui para frente do que já vivi até agora. Sinto-me como aquela menina que ganhou uma bacia de jabuticabas. As primeiras, ela chupou displicente, mas percebendo que faltam poucas, rói o caroço.

Já não tenho tempo para lidar com mediocridades. Não quero estar em reuniões onde desfilam egos inflados. Não tolero gabolices. Inquieto-me com invejosos tentando destruir quem eles admiram, cobiçando seus lugares, talentos e sorte.

Já não tenho tempo para projetos megalomaniacos. Não participarei de conferências que estabelecem prazos fixos para reverter a miséria do mundo. Não quero que me convidem para eventos de um fim de semana com a proposta de abalar o milênio.

Já não tenho tempo para reuniões intermináveis para discutir estatutos, normas, procedimentos e regimentos internos.

Já não tenho tempo para administrar melindres de pessoas, que apesar da idade cronológica, são imaturos.

Não quero ver os ponteiros do relógio avançando em reuniões de 'confrontação', onde 'tiramos fatos a limpo'. Detesto fazer acareação de desafetos que brigaram pelo majestoso cargo de secretário geral do coral. Lembrei-me agora de Mário de Andrade que afirmou: 'as pessoas não debatem conteúdos, apenas os rótulos'. Meu tempo tornou-se escasso para debater rótulos, quero a essência, minha alma tem pressa. Sem muitas jabuticabas na bacia, quero viver ao lado de gente humana, muito humana; que sabe rir de seus tropeços, não se encanta com triunfos, não se considera eleita antes da hora, não foge de sua mortalidade, defende a dignidade dos marginalizados, e deseja tão somente andar ao lado do que é justo. Caminhar perto de coisas e pessoas de verdade, desfrutar desse amor absolutamente sem fraudes, nunca será perda de tempo.'

O essencial faz a vida valer a pena”.

Rubem Alves

SUMÁRIO

Resumo Geral	1
Abstract	3
Capítulo 1	5
1. Introdução e Justificativa	5
1.1 Compostos fenólicos e sua função antioxidante	5
1.2 Importância do estudo do metabolismo de antocianinas	6
1.3 Ação antioxidante e as controvérsias do metabolismo antioxidante	10
1.4 Metodologias para análise da capacidade antioxidantes <i>in</i> <i>vitro</i>	12
1.5 Frutas brasileiras fontes de antocianinas	14
1.6 Considerações a respeito das características e produção brasileira de jabuticaba	15
Referências	17
Capítulo 2 - Identificação e quantificação de antocianinas de casca de jabuticaba (Myrciaria jaboticaba Vell Berg) liofilizada utilizando HPLC- PDA e HPLC-ESI-MS/MS	21
Resumo	21
1. Introdução	23
2. Material e Métodos	25
2.1 O fruto	25
2.2 Preparo das cascas de jabuticabas liofilizadas	26

2.3	Determinação dos macronutrientes	26
2.4	Determinação de antocianinas totais por espectrofotometria ...	26
2.5	Determinação de antocianinas monoméricas por espectrofotometria	27
2.6	Determinação de compostos fenólicos totais por espectrofotometria	28
2.7	Extração de antocianinas para identificação por Espectrometria de Massas e quantificação por CLAE (Cromatografia líquida de alta eficiência)	28
2.7.1	Descrição da metodologia de preparo das amostras de jabuticaba para análise de antocianinas	28
2.7.2	Descrição da metodologia para análise de antocianinas por espectrometria de massas	29
2.7.3	Descrição da metodologia para análise de antocianinas por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a arranjo de diodos (HPLC-PDA)	30
2.8	Determinação da capacidade de seqüestrar radicais livres utilizando método ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity)	31
2.9	Determinação da capacidade de seqüestrar radicais livres por DPPH	31
2.10	Determinação da capacidade de sequestrar radicais livres por ABTS	33
3.	Resultados e discussão	33
3.1.	Determinações do percentual das frações (polpa/semente e	

casca), rendimento do pó liofilizado e determinação dos macronutrientes	33
3.2. Determinações dos compostos bioativos presentes na casca de jabuticaba liofilizada e sua atividade antioxidante	34
4. Conclusão	40
Agradecimentos	41
Referências Bibliográficas	49
Capítulo 3 - Aumento do potencial antioxidante de plasma de ratos alimentados com casca de jabuticaba (<i>Myrciaria jaboticaba</i> Vell Berg) liofilizada	55
Resumo	55
1. Introdução	56
2. Material e Métodos	57
2.1. O fruto	57
2.2. Preparo das cascas de jabuticabas liofilizadas	57
2.3. Determinação dos macronutrientes	58
2.4. Extração de antocianinas para identificação por Expectrometria de Massas e quantificação por CLAE (Cromatografia líquida de alta eficiência)	58
2.4.1.Descrição da metodologia de preparo das amostras de jabuticaba para análise de antocianinas	58
2.4.2.Descrição da metodologia para análise de antocianinas por espectrometria de massas	58
2.4.3.Descrição da metodologia para análise de antocianinas por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a arranjo	

de diodos (HPLC-PDA)	59
2.5. Descrição da metodologia para análise de antocianinas por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a arranjo de diodos (HPLC-PDA)	59
2.5.1. Testes de cinética absorção de compostos fenólicos de pó liofilizado de casca jabuticaba utilizando as análises antioxidantes no plasma	59
2.5.2. Ensaio “ <i>in vivo</i> ” para estudo da atividade antioxidante de pó liofilizado de casca de jabuticaba	60
2.6. Preparo do plasma para os ensaios antioxidantes	61
2.7. Determinação da capacidade de seqüestrar radicais livres utilizando o método ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity)	61
2.8. Determinações da capacidade de seqüestrar radicais livres por ABTS	62
2.9. Análise dos resultados	62
3. Resultados e discussão	63
3.1. Determinações do percentual das frações (polpa/semente e casca), rendimento do pó liofilizado, determinação dos macronutrientes e identificação e quantificação de antocianinas	63
3.2. Ganhos de peso	64
3.3. Testes de cinética absorção de compostos fenólicos de pó liofilizado de casca de jabuticaba utilizando as análises antioxidantes no plasma	64

3.3.1. Atividade anti-radical ABTS e ORAC	64
3.4. Ensaio “ <i>in vivo</i> ” para estudo da atividade antioxidante de pó liofilizado de casca de jaboticaba	65
3.4.1. Ensaio de ABTS	65
3.4.2. Ensaio de ORAC	65
4. Conclusão	67
Agradecimentos	67
Referências	68
Capítulo 4 - Diminuição da glicose sanguínea, colesterol total e do LDL- colesterol pela adição da casca de jaboticaba (<i>Myrciaria jaboticaba</i> (Vell.) Berg) liofilizada à dieta de ratos Wistar adultos	82
Resumo	82
1. Introdução	83
2. Material e Métodos	85
2.1. Preparo das cascas de jaboticabas liofilizadas	85
2.2. Determinação dos macronutrientes	85
2.3. Extração de antocianinas para identificação por Espectrometria de Massas e quantificação por CLAE (Cromatografia líquida de alta eficiência)	85
2.3.1. Descrição da metodologia de preparo das amostras de jaboticaba para análise de antocianinas	85
2.3.2. Descrição da metodologia para análise de antocianinas por espectrometria de massas	86
2.3.3. Descrição da metodologia para análise de antocianinas por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a arranjo	

de diodos (HPLC-PDA)	86
2.4. Ensaios Biológicos - Administração da casca de jabuticaba em ratos	87
2.4.1.Ensaios “ <i>in vivo</i> ” para estudo da atividade antioxidante da casca de jabuticaba	87
2.5. Análises sanguíneas	88
2.5.1.Glicose sérica	88
2.5.2.Lipídeos séricos	88
2.5.3. ALT (Alanina aminotransferase) e AST (Aspartato aminotransferase)	88
2.6. Análise dos resultados	88
3. Resultados e discussão	89
3.1. Identificação e quantificação de antocianinas no pó de casca de jabuticaba liofilizada	89
3.2. Ganhos de peso	89
3.3. Glicose sérica	90
3.4. Lipídeos séricos	91
3.5. Alanina aminotransferase (ALT) e Aspartato aminotransferase (AST)	93
4. Conclusão	94
Agradecimentos	95
Referências	96
Conclusão Geral	106

RESUMO GERAL

O objetivo do presente estudo foi avaliar a produção de casca de jabuticaba em pó, sua composição de antocianinas e efeito antioxidante em animais de laboratório. Muitas frutas tropicais são ricas em antocianinas e existem poucos dados disponíveis sobre a caracterização e quantificação destas antocianinas. A identificação e quantificação de antocianinas de casca de jabuticaba liofilizada foram realizadas por HPLC-PDA e HPLC-ESI-MS/MS e revelaram a presença de dois compostos, delphinidina-3-glicosídeo e cianidina-3- glicosídeo (635,3 e 1964 mg/100 de peso seco), respectivamente. Para as análises do potencial antioxidante foram utilizados os ensaios de ORAC, DPPH e ABTS. Para estes ensaios foram encontrados os seguintes valores, respectivamente, $25514,25 \pm 3037,24 \mu\text{MTEAC.g}^{-1}$, $45,38 \mu\text{g.ml}^{-1}$, $9457,74 \pm 54,29 \mu\text{MTEAC.g}^{-1}$. Foram quantificados também os fenólicos totais por Folin-Ciocalteu, e encontrado $556,28 \pm 20,37 \text{ gGAE}^b.\text{kg}^{-1}$. Neste estudo, a casca de jabuticaba liofilizada mostrou uma grande capacidade antioxidante comprovada por todos os métodos antioxidantes analisados, pela quantidade de compostos fenólicos encontrada e principalmente pela concentração de cianidina-3-glicosídeo e delphinidina-3- glicosídeo. Diante dos dados descritos acima, o efeito antioxidante da ingestão de pó casca de jabuticaba liofilizada no plasma de ratos foi investigado em dois experimentos. No primeiro foi realizado um teste de cinética de absorção, no qual trinta e cinco ratos machos, divididos em 5 grupos, receberam por gavagem 7 mg de antocianinas/ 100 g de peso. A coleta de sangue foi realizada nos tempos 0, 30, 60 e 120 minutos. O potencial antioxidante foi quantificado no plasma por ORAC e TEAC. Neste experimento não ocorreu diferença significativa no potencial antioxidante plasmático quando

comparados os diversos tempos. No segundo experimento, 40 ratos machos foram divididos em 4 grupos que consumiram, respectivamente, 0, 1, 2 e 4% de pó de casca de jabuticaba liofilizada acrescido a dieta. Foi observado um aumento no potencial antioxidante plasmático (1.7 vezes pelo método de TEAC e 1.3 vezes por ORAC), porém a concentração de 4% não apresentou efeito antioxidante.

A partir dos resultados do potencial antioxidante *in vivo*, e diante do fato de que a ingestão de uma dieta rica em antioxidantes e com pouca quantidade de gorduras pode reduzir o risco de obesidade e resistência à insulina, investigou-se o efeito da casca de jabuticaba liofilizada sobre as concentrações plasmáticas de glicose, frações lipídicas, aspartato aminotransferase e alanina aminotransferase em ratos Wistar machos adultos. Os animais foram distribuídos nos seguintes grupos: G0, o grupo controle e G1, G2 e G4, os grupos que receberam 1, 2 e 4%, respectivamente, do pó de casca de jabuticaba liofilizada adicionado à dieta AIN-93M. A suplementação reduziu as concentrações de glicose nos grupos G1 e G2, porém no grupo G3 esse efeito não foi encontrado. O colesterol total sofreu redução para os animais tratados com 1% de cascas de jabuticabas em relação ao grupo controle, mas os animais tratados com 2 e 4% de cascas de jabuticabas sofreram aumento no colesterol total e da fração LDL-colesterol, porém, o valor para colesterol total apresenta-se dentro da faixa normal para ratos Wistar. Os triacilgliceróis e a fração HDL-colesterol não sofreram alterações significativas. Os resultados indicam um possível benefício da suplementação da casca de jabuticaba na redução da glicemia plasmática, dos níveis de LDL e colesterol total e a possível existência de uma dose recomendada.

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the antioxidant effects of anthocyanin and the antioxidant effects of peel jabuticaba powder in laboratory animals. Many tropical fruits are rich in anthocyanins, but there are few data available on the characterization and quantification of these anthocyanins. The identification and quantification of anthocyanins from bark jabuticaba was performed by HPLC-PDA and LC-ESI-MS/MS Q-TOF. The analysis revealed the presence of two compounds, delphinidin-3-glucoside and cyanidin-3-glucoside (635, 3 and 1964 mg/100 dry weight, respectively). ORAC, DPPH and ABTS methods were used for antioxidant analysis and the results were, 25514,24±3037,24 μ MTEAC.g⁻¹, 45.38 μ g.ml⁻¹, 9457,74±54,29 μ MTEAC.g⁻¹, respectively. The total phenolics (Folin-Ciocalteu method) revealed that the jabuticaba powder contained 556,28±20,37 gGAEB.kg⁻¹. In this study, freeze-dried peel jabuticaba showed great antioxidant proven by all methods antioxidants tested. The effects of the ingestion of jabuticaba peel in the antioxidant capacity of plasma of rats was investigated in two '*in vivo*' experiments. In the first test, the absorption kinetics were evaluated. The male rats were divided into 5 groups received, by gavage, 7 mg anthocyanins / 100 g of body weight. Blood collection was performed at 0, 30, 60 and 120 minutes. The antioxidant potential was quantified in plasma by ORAC and TEAC. In this experiment there was no significant difference in plasma antioxidant potential when comparing the different times. In the second experiment, 40 rats were divided into 4 groups that consumed, respectively, 0, 1, 2 and 4% powdered peel jabuticaba lyophilized plus diet. We observed an increase in plasma antioxidant potential (1.7 times by the method of TEAC and ORAC by 1.3

times), but the concentration of 4% had no antioxidant effect. We investigated the effect of freeze-dried peel jabuticaba on plasma glucose, lipid fractions, aminotransferase and aspartate aminotransferase alanian in adult male Wistar rats. The animals assigned to groups G0, the control group, G1, G2 and G4 groups receiving 1, 2 and 4%, respectively, of freeze-dried peel jabuticaba added to the AIN-93M diet. Supplementation reduced the concentration of glucose in G1 and G2, but in G4 this effect was not found. Total cholesterol was reduced in animals treated with 1% bark jabuticabas in the control group, but animals treated with 2 and 4% experienced an increase in total cholesterol and LDL cholesterol, but the value for cholesterol total amount is within the normal range for rats. Triglycerides and HDL-cholesterol did not change significantly. The results indicate the possible benefit of supplementing with bark jabuticaba in reducing plasma glucose, LDL cholesterol and total cholesterol and the possible existence of a dose.

Capítulo 1

1. Introdução e justificativa

1.1 Compostos fenólicos e sua função antioxidante

O consumo de frutas e hortaliças tem aumentado principalmente em decorrência do seu valor nutritivo e efeitos à saúde que vão além do propósito de nutrir. Estes alimentos contêm diferentes fitoquímicos, muitos dos quais possuem propriedades antioxidantes que podem estar relacionadas com o retardo do envelhecimento e a prevenção de certas doenças. Estudos têm demonstrado que outros compostos antioxidantes, além dos bem conhecidos β -caroteno, vitamina C e vitamina E, estão presentes e contribuem para as propriedades funcionais desses alimentos (WANG *et al.*, 1996; RICE-EVANS *et al.*, 1996).

Dentre os compostos de interesse, encontram-se os fenólicos. Pesquisas evidenciam que compostos fenólicos exibem ação antioxidante. Pearson *et al.* (1999) demonstraram que os fenólicos presentes em suco comercial e extrato fresco de maçãs (casca, polpa e fruta inteira) inibiram, *in vitro*, a oxidação de LDL-colesterol em humanos. A atividade antioxidante apresentada por vários vegetais, incluindo frutos, folhas e sementes, está correlacionada ao seu teor de compostos fenólicos totais (VELIOGLU *et al.*, 1998, KAHKONEN *et al.*, 1999). Entre os compostos fenólicos com propriedade antioxidante, destacam-se os flavonóides que quimicamente, englobam as antocianinas e os flavonóis (FRANCIS, 1989). Atualmente, existe uma tendência mundial em usar pigmentos naturais como corantes para alimentos e entre eles destacam-se as antocianinas. Esse interesse é também influenciado

pelas observações promissoras de seu potencial benéfico à saúde decorrente de sua ação antioxidante (ESPÍN *et al.*, 2000, WANG *et al.*, 1997).

As antocianinas (das palavras gregas *anthos*, flor e *kianos*, azul) são pigmentos vegetais responsáveis pela maioria das cores azul, roxa e a maioria das tonalidades de vermelho encontradas em flores, frutos, algumas folhas, caules e raízes de plantas (MARKAKIS, 1982). São compostos solúveis em água e altamente instáveis em temperaturas elevadas (SHAHIDI e NACZK, 1995).

1.2 Importância do estudo do metabolismo de antocianinas

Apesar de já se conhecer a capacidade antioxidante das antocianinas, dados relativos ao metabolismo de antocianinas em animais de laboratório são infelizmente muito escassos até o momento. Interesses nas propriedades de promoção de saúde de antocianinas de frutas (mais especificamente em “berries”) estão se intensificando; entretanto, evidências estão baseadas primariamente em características “*in vitro*”, sendo que mecanismos associados com absorção, metabolismo e farmacocinética estão ainda largamente inexplorados. Estudos relatam uma média na concentração máxima plasmática de antocianinas de $0,03 \pm 0,02 \mu\text{mol/L}$. A excreção urinária média reportada é $< 0,1\%$ da dose ingerida (KALT *et al.*, 2008).

Alguns elementos já estão elucidados com respeito ao metabolismo de antocianinas, porém, muitas rotas metabólicas são desconhecidas. As reações de conjugação mais comumente citadas envolvidas no metabolismo de outros flavonóides incluem glucoronidação, metilação e sulfatação. É razoável suspeitar que antocianinas sejam metabolizadas da mesma forma, pois

possuem estruturas moleculares muito semelhantes aos flavonóides. Entretanto, muitas pesquisas são requeridas para entender mecanismos associados com absorção e metabolismo para se estabelecer suas verdadeiras atividades biológicas e efeitos à saúde (KAY, 2006).

Um estudo recente avaliou a absorção de antocianinas de frutas em porcos. As frutas estudadas foram: 'Marionberry'; framboesa; groselha; 'Chokeberry' e 'Elderberry'. Na urina dos animais tratados com antocianinas, todas as formas originais das antocianinas majoritárias de cada uma das frutas estudadas estavam presentes em sua forma glicosilada, comprovando que as antocianinas não foram modificadas por glicosidases do trato gastro-intestinal. Além disso, formas metiladas (tanto na posição 3' quanto na posição 4' do anel flavônico) foram observadas na urina para todas as antocianinas originais para todas as frutas testadas, exceto delphinidina e pelargonina. O metabólito cianidina-monoglucoronídeo, assim como, os conjugados misturados (formas metiladas e glucoronisada) foram observadas após consumo de todas as frutas consideradas no estudo (PRIOR e WU, 2007).

No mesmo trabalho, cianidina-3-glicosídeo-monoglucoronídeo e o seu conjugado foram observados após consumo de 'marionberry' ou 'elderberry'. Em porcos tratados com 'marionberry', onze metabólitos foram identificados e quantificados. A soma de metabólitos de pelargonina-3-glicosídeo foi aproximadamente 6 vezes maior em relação a cianidina-3-glicosídeo ou cianidina-3-rutinosídeo. Os autores comprovam que a razão concentração/dose no plasma para cianidina-3-rutinosídeo foi significativamente maior que para cianidina-3-glicosídeo. A maioria da cianidina-3-glicosídeo (65,3 % da dose

total) e pelargonina-3-glicosídeo (91,3 % da dose total) foram excretadas sob forma metabolizada (PRIOR e WU, 2007).

Relata-se que antocianinas com glicosidações complexas parecem permanecer em altas concentrações por grandes períodos de tempo no trato gastro-intestinal de porcos. Muitos estudos ainda precisam ser concluídos, entretanto, metilação e glucoronidação parecem ser as duas rotas majoritárias no metabolismo de antocianinas. Particularmente, derivados de delphinidina parecem possuir pequena recuperação urinária comparada com cianidina ou pelargonina e se mostraram presentes na urina em sua forma original, enquanto existem indícios de que uma proporção grande de cianidina e pelargonina na urina sejam metabolizadas em formas metiladas. Diferentes antocianidinas (antocianidinas é o termo que define antocianinas sem açúcares ligados à molécula; ou seja, refere-se à forma aglicona) e grupos glicosídicos afetam de forma significativa a absorção e metabolismo de antocianinas “*in vivo*”. Metabolicamente, antocianinas parecem se comportar muito diferente em relação a outros flavonóides (PRIOR e WU, 2007).

Os escassos estudos disponíveis a respeito do metabolismo de antocianinas relatam a utilização da forma glicosilada. Nenhum trabalho se dispôs a estudar de forma aprofundada o metabolismo de antocianinas agliconas (ou antocianidinas) em animais de laboratório, apesar de estudos “*in vitro*” confirmarem que a forma aglicona é mais ativa quanto à captura de radicais livres e atividade antioxidante (PRIOR e WU, 2007).

Além disso, numerosos estudos laboratoriais em vivo têm demonstrado a inibição da carcinogênese por polifenóis. Entretanto, esses resultados devem ser interpretados com cuidado para se averiguar corretamente a contribuição

de polifenóis da dieta na redução do risco de câncer em humanos. Alguns polifenóis identificados em animais podem ter aplicação direta, uso limitado ou serem completamente sem utilidade na prevenção de câncer em humanos (YANG *et al.*, 2001).

Alguns polifenóis são considerados agentes quimiopreventivos de câncer por inibirem sua ativação, comumente catalisada por enzimas do citocromo P450 “*in vivo*” ou “*in vitro*”. Se o carcinógeno utilizado no modelo animal não for um carcinógeno humano, o agente talvez possa não ser útil em humanos. Inibidores das enzimas do citocromo P450 não são úteis, pois podem afetar suas funções fisiológicas normais como no metabolismo de esteróides (YANG *et al.*, 2001).

Muitos polifenóis são considerados agentes quimiopreventivos, pois induzem as enzimas da fase II. Teoricamente, a indução das enzimas da fase II pode facilitar a eliminação de alguns carcinógenos ou seus intermediários reativos. Certo cuidado deve ser tomado na aplicação direta desse conceito em humanos. A indução de enzimas da fase II é provavelmente uma resposta a agentes danosos. Por exemplo, algumas enzimas da fase II são eletrófilas ou pró-oxidantes, quando em doses moderadas, os efeitos podem ser benéficos, mas efeitos tóxicos podem ser produzidos a altas doses. Adicionalmente, algumas enzimas da fase II participam na ativação de certos carcinógenos (YANG *et al.*, 2001).

Alguns polifenóis inibem o metabolismo do ácido araquidônico. O metabolismo do ácido araquidônico (e ácido linoléico) conduz à produção de muitos metabólitos pro-inflamatórios ou mutagênicos como certas prostaglandinas e espécies reativas de oxigênio. A inibição da fosfolipase A2 e

lipoxigenase são potencialmente benéficas e têm sido propostas como mecanismos da ação quimiopreventiva de curcumina e outros polifenóis (YANG *et al.*, 2001).

Polifenóis são reconhecidos por suas propriedades antioxidativas. Eles são considerados como quimiopreventivos por alguns autores, pois polifenóis podem capturar ou prevenir a formação de espécies reativas de oxigênio, o que têm papel fundamental na carcinogênese. Evidências desses mecanismos, entretanto, têm sido circunstanciais e mais investigações são necessárias (YANG *et al.*, 2001).

1.3 Ação antioxidante e as controvérsias do metabolismo antioxidante

Em organismos vivos, as espécies reativas de oxigênio (ROS) ou radicais livres (radical hidroxila, ânion superóxido e oxigênio *singlet*) reagem com biomoléculas como proteínas e lipídios, causando sérias lesões na membrana celular e em seu DNA. Existem indícios de que estes processos estejam fortemente associados à carcinogênese e aos processos degenerativos da idade (MADHUJITH e SHAHIDI, 2005). Felizmente, o corpo humano está equipado com um sistema de defesa eficaz para neutralizar a toxicidade de ROS. Este sistema inclui enzimas desintoxicantes como a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GP) e glutathione redutase (GR). O sistema de defesa também inclui antioxidantes de alto peso molecular, tais como albumina e ferritina, e os antioxidantes de baixo peso molecular como a glutathione (GSH) e ácido úrico. O estresse oxidativo refere-se a um desequilíbrio entre a taxa de geração de ROS e a taxa para desintoxicar-los. Este desequilíbrio é criado por qualquer uma superprodução

de ROS, como no caso da inflamação persistente ou um defeito no celular sistema de defesa como no esgotamento do reservatório de GSH. Assim, cada vez mais os estudos epidemiológicos mundiais sugerem a utilização de determinadas ervas, frutas e vegetais na prevenção e / ou tratamento de várias doenças. De particular interesse são os polifenóis, que mostram efeitos promissores na prevenção de doenças cardiovasculares, desordens inflamatórias e diferentes cânceres (ISSA, VOLATE, e WARGOVICH, 2006).

Em contrapartida, o aumento na formação de radicais livres pode desempenhar um papel importante no combate da carcinogênese, aterosclerose, diabetes, enfisema, cataratas e outras doenças degenerativas. Este aumento de radicais são detectados na maioria dessas patologias. No entanto, em muitos casos, não é fácil diferenciar se este aumento de radicais é a causa ou consequência da doença. Os radicais livres são mediadores, disparadores ou executores dos mecanismos essenciais de proteção, tais como apoptose, fagocitose e reações de desintoxicação. Entre estes mecanismos, apoptose, que elimina células pré-cancerosas e cancerígenas e células danificadas por vírus (SALGANIK, R.I., 2001).

Assim, existem evidências recentes de que certo nível destas espécies é imprescindível para muitas funções fisiológicas. Por exemplo, o enovelamento de proteínas nascentes no retículo endoplasmático ocorre em um meio mais oxidante que o restante da célula para a formação de pontes dissulfeto. Também, muitos genes são transcritos após oxidação transitória e baixas concentrações de alguns oxidantes estimulam a proliferação celular. Questiona-se até que ponto as estratégias de aumento de defesas

antioxidantes por meio de nutrientes seriam benéficas, considerando-se que o excesso consumido poderá, ao longo da evolução, remover a pressão que modela sistemas endógenos, levando a uma sub-regulação ou não expressão de genes envolvidos com a defesa antioxidante endógena (CERQUEIRA, MEDEIROS E AUGUSTO, 2007).

Deste modo, as antocianinas parecem estar envolvidas em muitas atividades biológicas que podem impactar positivamente ou negativamente (quando em excesso) na saúde e estas ações podem ser mediadas por suas atividades antioxidantes e /ou ações moduladoras nas células. A maioria dos estudos utiliza modelos “*in vitro*”. Os modelos ‘*in vitro*’ são vantajosos por serem mais rápidos e baratos em relação aos modelos “*in vivo*”; entretanto, os últimos podem oferecer vantagens em relação aos primeiros para avaliação de componentes alimentares, como estudo da absorção, metabolismo e outros efeitos fisiológicos de forma mais confiável. Sendo assim, para compreender melhor as propriedades das antocianinas e seus efeitos sobre a saúde, é necessário que se façam mais investigações sobre a absorção e metabolismo desses compostos fenólicos (FELGINES *et al.*, 2008).

1.4 Metodologias para análise da capacidade antioxidantes *in vitro*

A capacidade antioxidante pode ser avaliada por inúmeros métodos *in vitro*. Contudo, ainda não existe um método validado que seja realmente confiável para medir a capacidade antioxidante de alimentos e amostras biológicas (HUANG, OU e PRIOR, 2005).

Os métodos de avaliação da capacidade antioxidante são divididos em

ensaios baseados nas reações de transferência de elétron (TE) e ensaios baseados nas reações de transferência de átomos de hidrogênio (TAH), de acordo com as reações químicas envolvidas, como na classificação dos compostos antioxidantes (HUANG, OU e PRIOR, 2005).

Os ensaios baseados na TE envolvem uma reação de redução, com o agente oxidante como indicador da reação final. Dentre os métodos baseados na transferência de elétrons, incluem-se: ensaio da capacidade antioxidante equivalente ao Trolox (TEAC), ensaio da capacidade antioxidante do íon férrico, ensaio da capacidade redutora de Cu(II), e o método da capacidade seqüestrante do radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) (HUANG, OU e PRIOR, 2005).

Os ensaios baseados na TAH, geralmente utilizam um gerador sintético de radicais livres, um agente oxidante (marcador), e um antioxidante doador de átomos de hidrogênio. Aparentemente a reação de transferência de átomos de hidrogênio é a chave de uma das etapas da oxidação. O método baseado na TAH é mais relevante na capacidade antioxidante de interromper a cadeia da reação de oxidação. Devido às particularidades dos métodos, é extremamente difícil comparar os resultados entre os diferentes ensaios (HUANG, OU e PRIOR, 2005). Nos métodos de transferência de átomos de hidrogênio, são utilizados geradores térmicos de radicais que levam a fluxos constantes de radicais peroxil em soluções saturadas de ar. Ocorre competição entre o antioxidante adicionado e o oxidante (substrato) pelos radicais. Deste modo, a oxidação do substrato (oxidante) é inibida ou retardada. Os ensaios que apresentam estas características são: ensaio de ORAC (Oxygen Radical

Absorbance Capacity); de descoloração da crocina, entre outros (HUANG, OU e PRIOR, 2005).

1.5 Frutas brasileiras fontes de antocianinas

Existem frutas brasileiras que apresentam quantidades significativas de antocianinas. Segundo Bobbio *et al.*(2000), um teor de antocianinas de 263mg/100g foi encontrado na casca de açaí.

Com base em dados cromatográficos, um estudo realizado com frutos de baguaçu (*Eugenia umbelliflora* Berg) coletados no sul do país, em Florianópolis-SC, encontrou um total de antocianinas de 342 mg/100 g de frutos frescos (KUSKOSKI *et al.*, 2003). Já no fruto camu-camu (*Myrciaria dubia* (HBK) McVaugh), originário da Amazônia, um estudo no estado de São Paulo, determinou nos frutos da cidade de Iguapé, $54 \pm 25,9$ mg de antocianinas por 100g do fruto e nos frutos de Mirandópolis, $30,3 \pm 6,8$ mg/100g do fruto. Os frutos de quixabeira, provenientes do semi-árido do nordeste, apresentaram teor de antocianina de 37,83 mg/100mL de suco (ZANATTA, *et al.*, 2005).

Em estudo recente com frutas tropicais realizado pela EMBRAPA do Ceará, observou-se que em frutas frescas, foram encontradas as seguintes concentrações de antocianinas totais (concentrações em mg/100g): acerola, 48; acerola roxinha, 23; guajiru, 104; jambolão, 79 e jussara, 290 (BRITO, *et al.*, 2007).

As antocianinas de uva são muito estudadas pelo fato de as mesmas serem amplamente cultivadas em diversas regiões do mundo. A quantidade e a composição das antocianinas presentes nas uvas diferem de acordo com a

espécie, variedade, maturidade, condições climáticas e cultivar. O conteúdo de antocianinas em uvas vermelhas varia de 30 a 750 mg por 100 g da fruta madura. Em uvas Concord varia entre 61-112 mg/100 g, enquanto que uvas viníferas como Pinot Noir, Cabernet Sauvignon e Vincent apresentam concentrações médias de antocianinas de 33, 92 e 439 mg/100 g, respectivamente (MAZZA, 1995).

Jabuticabas também apresentam quantidades relevantes de antocianinas. Em estudo realizado por Terzi (2004) com jabuticabas, utilizando-se três diferentes métodos espectrofotométricos, foram determinados teores entre 310 e 315 mg de antocianinas por 100 g de fruta. Reynertson (2007) utilizando o fruto inteiro e seco, encontrou valores de 433 mg.100g⁻¹ para a cianidina-3-glicosídeo e 81 mg.100g⁻¹ para a delphinidina-3 glicosídeo.

1.6 Considerações a respeito das características e produção brasileira de jabuticaba

A jabuticaba é nativa do Brasil e originária do Centro-Sul, podendo ser encontrada desde o Estado do Pará até o Rio Grande do Sul, mas é nos Estados de São Paulo, Rio de Janeiro, Minas Gerais e Espírito Santo que ocorrem maiores produções. Dentre as espécies atualmente conhecidas, destaca-se a *Myrciaria cauliflora* (DC) Berg (jabuticaba paulista ou jabuticaba ponhem ou jabuticaba assú) e a *Myrciaria jabuticaba* (Vell) Berg (jabuticaba sabará) que produzem frutos apropriados tanto para a indústria como para consumo *in natura* (DONADIO, 2000; MATTOS, 1983).

O fruto da jabuticabeira apresenta de 3-4 cm de diâmetro contendo de uma a quatro sementes grandes, com uma espessa casca roxa que recobre

uma polpa gelatinosa, doce e branca. Os frutos nascem diretamente sobre o tronco principal e os ramos da planta, com uma aparência distinta de frutificação. Comum nos mercados brasileiros, as jabuticabas são largamente consumidas frescas e sua popularidade tem sido comparada à da uva nos Estados Unidos (POPENOE, 1920).

A jabuticabeira é uma das frutíferas que tem despertado grande interesse entre os produtores rurais devido a sua alta produtividade, rusticidade e aproveitamento de seus frutos nas mais diversas formas. É uma fruta tipicamente brasileira, que apesar de ser considerada apropriada tanto para consumo 'in natura' como para a indústria (xaropes, vinho, licor, vinagre e geléia) (DONADIO, 1993; MAGALHÃES, 1996) tem seu comércio limitado devido a sua alta perecibilidade. Apesar disso, dados da CEAGESP indicam que no ano de 2007 foram comercializados 1.850.550,0 kg de jabuticaba, o que representa produção considerável de uma fruta tipicamente brasileira e pouco estudada do ponto de vista comercial e suas propriedades funcionais na alimentação (CEAGESP, 2007).

Apesar de existir um consumo pronunciado de jabuticaba principalmente na região sudeste, poucos trabalhos se destinam ao estudo das rotas metabólicas das antocianinas do fruto em questão. Faz-se então necessário entendimento mais aprofundado da relação entre capacidade antioxidante de certos compostos e o seu metabolismo. Além disso, poucos dados relativos à absorção de antocianinas de jabuticabas foram publicados até o momento. Dessa forma, será escopo desse trabalho a composição e o estudo da atividade antioxidante de antocianinas de jabuticaba, fruta tipicamente brasileira.

Referências

BOBBIO, F.O.; DRUZIAN, J.I.; ABRAÃO, P.A.; BOBBIO,P.A.; FEDELLI,S. Identificação e quantificação da antocianinasdo fruto do açaizeiro (Euterpe oleracea). **Mart. Ciênc.Tcnol. Aliment.** v. 20, n. 3, 2000.

BRITO, E.S. de; ARAÚJO, M.C.P.de; ALVES, R.E.; CARKEET, C.; CLEVIDENCE, B.A.; NOVOTNY, J.A. Anthocyanins Present in Selected Tropical Fruits: Acerola, Jambolão, Jussara, and Guajiru. **J. Agric. Food Chem.**, v.55, n.23, p. 9389–9394, 2007.

CEAGESP. Seção de Economia e Desenvolvimento – Ceagesp. SIEM - **Sistema de Informação e Estatística de Mercado**, 2008

CERQUEIRA, F.M. MEDEIROS, M.H.G. de, AUGUSTO, O. Antioxidantes dietéticos: controvérsias e perspectivas. **Química Nova**, v.30, n. 2, p., 441-449, 2007.

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

ESPÍN, J.C.; SOLER-RIVAS, C.; WICHERS, H.J.; GARCÍA-VIGUERA, C. Anthocyanin-based natural colorants: a new source of antiradical activity for foodstuff. **J. Agric.Food Chem.**, v. 48, p.1588- 1592, 2000.

FRANCIS, F.J. Food colorants: anthocyanins. **Crit. Rev. Food Sci. Nutr.**, v. 28, p. 273-314, 1989.

FELGINES,C., TEXIER,O., BESSON, C., VITAGLIONE, P., LAMAISON, J., FOGLIANO, V., SCALBERT, A., VANELLA, L., GALVANO, F. Influence of

glucose on cyanidin 3-glucoside absorption in rats. **Molecular Nutrition & Food Research**, v.52, p.959-964, 2008.

HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R. L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.53, n.6, p.1841-1856, 2005.

ISSA, A.Y.; VOLATE, S.R.; WARGOVICH, M.J. The role of phytochemicals in inhibition of cancer and inflammation: New directions and perspectives. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.19, n.5, p.405-419, 2006.

KÄHKÖNEN, M.P.; HOPIA, A.I.; VUORELA, H.J.; RAUHA, J.-P.; PIHLAJA, K.; KUJALA, T.S.; HEINONEN, M. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. **J. Agric. Food Chem.**, v. 47, p. 3954-3962, 1999.

KALT, W; BLUMBERG, J.B.; MCDONALD, J.E.; VINQVIST-TYMCHUK, M.R.; FILLMORE, S.A.E.; GRAF, B.A.; O'LEARY, J.M.; MILBURY, P.E. Identification of Anthocyanins in the Liver, Eye, and Brain of Blueberry-Fed Pigs. **J. Agric. Food Chem.**, v. 56, n. 3, p. 705-712, 2008.

KAY, C.D. Aspects of anthocyanin absorption, metabolism and pharmacokinetics in humans. **Nutr. Res. Rev.**, v.19, n.1 ,p. 137-146, 2006.

KUSKOSKI, E.M.; VEGA, J.M.; RIOS, J.J.; FETT, R.; TRONCOSO, A.M.; ASUERO, A.G. Kuskoski, E.M. Characterization of Anthocyanins from the Fruits of Baguacu (*Eugenia umbelliflora* Berg). **J. Agric. Food Chem.** v.51, n.18 , p. 5450-5454, 2003

MADHUJITH, T.; SHAHIDI, F. Antioxidant potencial of pea beans *Phaseolus vulgaris* L.). **Journal of Food Science**, v.70, n.1, p.s85-s90, 2005.

MARKAKIS, P. Stability of anthocyanins in foods. In: MARKAKIS, P. (Ed.) **Anthocyanins as food colors**. New York: Academic Press, 1982. p. 163-180.

MATTOS, J.R. **Frutíferas nativas do Brasil: jaboticabeiras**. Porto Alegre, 1983, 92p.

MAZZA, G. Anthocyanins in grape and grape products. **Crit. Rev. Food Sci. Nutr.**, v. 35, p. 341-371,1995.

POPENOE, W. **Manual of Tropical and Subtropical Fruits**. Hafner Press: New York, 1920, p. 272-311.

PRIOR, R. L.; WU, X. Anthocyanin Absorption and Metabolism from Berries in Humans and Animal Models. **Berry Health Symposium Abstract**. Disponível em <http://berryhealth.fst.oregonstate.edu/symposium/index.htm>, 2007.

REYNERTSON,K.A. **Phytochemical analysis of bioactive constituents from edible myrtaceae fruits**. New York: Tese-Graduate Faculty in Biology- City University of New York, 2007.

RICE-EVANS, C.A.; MILLER, N.J.; PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Rad. Biol. Med.**, v. 20, n. 7, p.933-956, 1996.

SALGANIK, R.I. The Benefits and Hazards of Antioxidants: Controlling Apoptosis and Other Protective Mechanisms in Cancer Patients and the Human

Population. **Journal of the American College of Nutrition**, v.20, n.5,p. 464S–472S, 2001.

SHAHIDI, F.; NACZK, M. **Food phenolics: sources, chemistry, effects and applications**. Lancaster: Technomic, 1995. 331 p.

TERCI, D.B.L. **Aplicações analíticas e didáticas de antocianinas extraídas de frutas**. 2004, 116 p. Tese (Doutorado).Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.

VELIOGLU, Y.S.; MAZZA, G.; GAO, L.; OOMAH, B.D. Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. **J. Agric. Food Chem.**, v.46, n.10, p.4113-4117, 1998.

WANG, H.; CAO, G.; PRIOR, R. L. Oxygen radical absorbing capacity of anthocyanins. **J. Agric. Food Chem.**, v. 45, n. 2, p. 304-309, 1997.

WANG, H.; CAO, G.; PRIOR, R.L. Total antioxidant capacity of fruits. **J. Agric. Food Chem.**, v. 44, n. 3, p.701-705, 1996.

YANG, C.S., HUANG, M.T., NEWMARK, H.L. Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds. **Annu. Rev. Nutr.**, v. 21, p. 381–406, 2001.

ZANATTA, C.F., CUEVAS, E.; BOBBIO, F.O.; WINTERHALTER, P.; MERCADANTE, A.Z. Determination of Anthocyanins from Camu-camu (*Myrciaria dubia*) by HPLC-PDA, HPLC-MS, and NMR. **J. Agric. Food Chem.**, 53, n. 24, p. 9531-9535, 2005.

Capítulo 2

Identificação e quantificação de antocianinas de casca de jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba* (Vell.) Berg) liofilizada utilizando HPLC-PDA e HPLC-ESI-MS/MS

(Artigo em fase de preparação para envio a revista Food Reserch International)

Alice Vieira Leite ^{a*}, Luciana Gomes Malta^a, Maria Francesca Riccio^b, Marcos Nogueira Eberlin^b, Gláucia Maria Pastore^a, Mário Roberto Maróstica Júnior^a

^aSchool of Food Engineering, University of Campinas-UNICAMP, P.O. Box 6121, 13083-862 Campinas-SP, Brazil

^bThoMSon Mass Spectrometry Laboratory, Institute of Chemistry, University of Campinas - UNICAMP, 13083-970 Campinas, SP, Brazil

*alicevleite@gmail.com

Resumo:

Muitas frutas tropicais são ricas em antocianinas e existem poucos dados disponíveis sobre a caracterização e quantificação destas antocianinas. A identificação e quantificação de antocianinas de casca de jaboticaba liofilizada foi realizada por HPLC-PDA e LC-ESI-MS/MS Q-TOF e revelaram a presença de dois compostos, delphinidina-3-glicosídeo e cianidina-3- glicosídeo (635,3 e 1964 mg/100 de peso seco), respectivamente. Para as análises do potencial antioxidante foram utilizados os ensaios de ORAC, DPPH e ABTS. Para estes ensaios foram encontrados os seguintes valores, respectivamente, 25514,25±3037,24 μ MTEAC.g⁻¹, 45,38 μ g.ml⁻¹, 9457,74±54,29 μ MTEAC.g⁻¹. Foram quantificado também os fenólicos totais por Folin-Ciocalteu, e

encontrado $556,28 \pm 20,37 \text{ gGAE.kg}^{-1}$. Neste estudo, a casca de jabuticaba liofilizada mostrou uma grande capacidade antioxidante comprovada por todos os métodos antioxidantes analisados, pela quantidade de compostos fenólicos encontrada e principalmente pela concentração de cianidina-3-glicosídeo e delphinidina-3- glicosídeo.

Keywords: jabuticaba, *Myrciaria jaboticaba* Vell Berg, antocianina, compostos fenólicos, Orac, DPPH, ABTS

1. Introdução

O crescente interesse pela atividade antioxidante de fitoquímicos presentes na dieta é justificado pelo fato desses compostos apresentarem um papel muito importante no sistema de defesa do organismo contra espécies reativas de oxigênio (ROS), que são os subprodutos nocivos gerados durante a respiração normal das células aeróbias (Ou, Huang, Hampsch-Woodill, Flanagan e Deemer, 2002). Sabe-se, porém, que essas espécies reativas de oxigênio podem causar danos biológicos em proteínas, lipídios e no DNA. O corpo humano possui uma série de sistemas para eliminar os radicais livres do organismo, mas, estes sistemas não são 100% eficientes. O consumo de dietas ricas em frutas, nozes e vegetais tem sido indicado, pois estes alimentos são considerados excelente fonte de antioxidantes (Haytowitz, Bhagwat, Prior, Wu, Gebhardt e Holden, 2007).

Sendo assim, o consumo de frutas pode não ser considerado simplesmente como o resultado de bom gosto e preferência pessoal, mas se tornou uma preocupação da saúde, devido aos teores de nutrientes vitais contidos nesses alimentos. Além de nutrientes essenciais, a maioria das frutas possui quantidades consideráveis de micronutrientes, como minerais, fibras, vitaminas e compostos fenólicos. Diversos estudos mostram a importância desses micronutrientes à saúde humana (Rufino, Alves, Brito, Pérez-Jiménez, Saura-Calixto, Mancini-Filho, 2010).

Dentre as muitas classes de compostos fenólicos existentes, as antocianinas têm chamado atenção de muitos pesquisadores devido à sua potente ação antioxidante. Vários extratos de plantas já foram testados na

redução do estresse oxidativo e possível prevenção de doenças inflamatórias (Dai, Gupte, Gates e Mumper, 2009).

As antocianinas são compostos coloridos responsáveis pelas cores vermelha, azul e roxo em frutas, vegetais, e plantas ornamentais. Os benefícios associados ao consumo de antocianinas incluem redução de riscos de doença coronariana, proteção contra a obesidade e hipoglicemia, reforço de memória e proteção do tecido cerebral fetal (Brito, Araújo, Alves, Carkeet, Clevidence e Novotn, 2007).

Dentre as frutas nativas do Brasil e ricas em antocianinas, encontra-se a jabuticaba, que é originária do Centro-Sul, podendo ser encontrada desde o Estado do Pará até o Rio Grande do Sul, mas é nos Estados de São Paulo, Rio de Janeiro, Minas Gerais e Espírito Santo que ocorrem as maiores produções. Dentre as espécies atualmente conhecidas, destaca-se a *Myrciaria cauliflora* (DC) Berg (jabuticaba paulista ou jabuticaba ponhem ou jabuticaba assú) e a *Myrciaria jabuticaba* (Vell.) Berg (jabuticaba sabará) que produzem frutos apropriados tanto para a indústria como para consumo in natura (Donadio, 2000; Mattos, 1983).

O fruto apresenta de 3-4 cm de diâmetro com uma a quatro sementes grandes, com uma espessa casca roxa que recobre uma palpa gelatinosa, doce e branca. Os frutos nascem diretamente sobre o tronco principal e os ramos da planta, com uma aparência distinta de frutificação. Comum nos mercados brasileiros, as jabuticabas são largamente consumidas frescas e sua popularidade tem sido comparada à da uva nos Estados Unidos (Reynertson, Yang, Jiang, Basile, Kennelly, 2008). Porém, poucos estudos relatam sua composição e atividade antioxidante *in vitro*.

Ao longo do tempo, e também nos dias atuais, as diferentes metodologias empregadas para avaliar a capacidade antioxidante *in vitro* de frutos e extratos resultaram divergências e conseqüentemente, resultados não comparáveis. As variações no preparo da amostra, bem como a metodologia escolhida podem afetar os resultados, assim, este é um problema que merece a atenção dos pesquisadores. A capacidade antioxidante pode ser expressa por meio de diferentes parâmetros, e estes devem ser avaliados de maneira combinada (Hogan et al., 2010)

Diante do exposto, o presente trabalho teve por objetivos identificar e quantificar antocianinas de jabuticaba utilizando HPLC-PDA (Cromatografia líquida de alta eficiência) e LC-ESI-MS/MS Q-TOF (cromatografia líquida acoplada a espectrômetro de massas), além de verificar o potencial funcional das cascas de jabuticabas liofilizadas, determinando as diferentes formas de antocianinas (totais, monoméricas), compostos fenólicos totais e capacidade antioxidante (radicais ABTS e DPPH, e Orac).

2. Material e Métodos

2.1. O fruto

Os frutos de jabuticaba (*Myrciaria jaboticaba* Vell berg) foram adquiridos de um mercado local de Campinas, durante a safra de setembro de 2008. Os frutos foram lavados e despulpados manualmente, as cascas foram congeladas a -18°C (Soares, Welter, Kuskoski, Gonzaga e Fett, 2008) em pacotes de 500 gramas.

2.2. Preparo das cascas de jabuticabas liofilizadas

As cascas previamente congeladas a -18°C foram liofilizadas em liofilizador Liobras a 30°C e $300\ \mu\text{Hg}$ por 95 h. A produção do liofilizado foi feita pela trituração da casca em processador industrial Sire Cutter, e posteriormente em Micro Moinho (Marconi) (Kalt et al., 2008). O produto liofilizado (um pó de casca de jabuticaba) foi armazenado a -80°C .

2.3. Determinação dos macronutrientes

O teor de proteína foi determinado por Kjeldahl (AOAC, 1975), de umidade e cinzas (Instituto Adolfo Lutz, 1985) e lipídios (Bligh & Dyer, 1959) açúcares totais pelo método de Lane & Eynon (1923).

2.4. Determinação de antocianinas totais por espectrofotometria

Para a determinação de antocianinas totais, foi utilizado o método de Lees & Francis (1972) com algumas adaptações (Figura 1). Cem miligramas do pó liofilizado de casca de jabuticaba foram homogeneizados em solução extratora (etanol 95%: HCl 1,5N, 85:15 v/v) e estocadas por 12h a 4°C . As amostras foram filtradas e os resíduos lavados exaustivamente com a solução extratora até a remoção completa dos pigmentos, sendo que o volume total de solução extratora gasto foi de 25 mL. Cem microlitros do extrato filtrado foram transferidos para um balão volumétrico de 5mL, completado com a solução extratora e deixado em repouso no escuro por 2h à 25°C . A absorbância foi medida a 535nm em espectrofotômetro as determinações foram efetuadas em triplicata.

2.5. Determinação de antocianinas monoméricas por espectrofotometria

As antocianinas totais foram quantificadas de acordo com o método descrito por WROLSTAD, 1976 e modificado e citado por Abe, Da Mota, Lajolo, Genovese (2007). Para as medidas de absorbância foi utilizado o espectrofotômetro modelo DU-70 (Beckman). A amostra liofilizada (0,2 g) foi triturada em Ultra-Turrax (Polytron®-Kinematica GnbH, Kriens-Luzern, Suíça) com 20 mL de metanol: ácido clorídrico (99,9:0,1 v.v⁻¹) e centrifugada a 2000 g por 15 minutos (4 °C). Uma alíquota do sobrenadante foi diluída com tampão cloreto de potássio 0,025 M, pH=1,0, em proporções variando entre 5 e 25 vezes, de acordo com a coloração da amostra. A leitura da absorbância foi realizada a 510 nm, considerando a absorbância máxima para cianidina-3-glicosídeo, e a 700 nm para descontar a turbidez da amostra. Outra alíquota da amostra foi diluída com a mesma proporção em solução tampão acetato de sódio 0,4 M, pH 4,5, e as leituras realizadas nos mesmos comprimentos de onda. A absorbância foi então calculada, usando-se a seguinte fórmula:

$$A = (A_{510 \text{ nm}} - A_{700 \text{ nm}})_{\text{pH} = 1,0} - (A_{510 \text{ nm}} - A_{700 \text{ nm}})_{\text{pH} = 4,5} \quad (2)$$

O conteúdo de antocianinas (mg.100 g⁻¹) foi calculado como cianidina-3-glicosídeo (PM = 449,2) através da fórmula:

$$C(\text{mg.100g}^{-1}) = A.PM.FD \div \epsilon.1$$

em que ϵ = absorvidade molar (26900 mol.L⁻¹) e 1 = espessura da cubeta (cm), PM=Peso molecular e FD= fator de diluição.

2.6. Determinação de compostos fenólicos totais por espectrofotometria

A quantificação de compostos fenólicos foi realizada de acordo com metodologia descrita por Swain e Hillis (1959), citada por Roesler, Malta, Carrasco, Holanda e Pastore (2007) utilizando o reagente de Folin-Ciocalteu. A casca de jabuticabas liofilizada foi dissolvida em metanol, a fim de se obter uma concentração de 0,5 mg.sólidos.mL⁻¹. Esta solução foi deixada em ultrassom por 2 horas e filtrada em membrana aceto-celulose.. Uma alíquota de 0,5 mL da solução metanólica de extrato (concentração 0,5 mg.sólidos.mL⁻¹) foi adicionada de 2,5 mL de solução aquosa do reativo Folin-Ciocalteu a 10% e 2,0 mL de carbonato de sódio a 7,5%. A mistura foi incubada por 5 minutos em banho-maria a 50 °C e, posteriormente, a absorbância foi medida usando-se branco como referência. O branco foi preparado substituindo a amostra por água na reação. Os resultados foram expressos em equivalentes de ácido gálico (mg EAG/100g amostra seca) usando curva padrão de ácido gálico dissolvido em água destilada, nas concentrações de 0,02 a 0,12 mg/mL. A quantificação dos compostos fenólicos nos extratos de frutas foi realizada em triplicata.

2.7. Extração de antocianinas para identificação por Espectrometria de Massas e quantificação por CLAE (Cromatografia líquida de alta eficiência)

2.7.1. Descrição da metodologia de preparo das amostras de jabuticaba para análise de antocianinas.

Um grama da casca de jabuticaba liofilizada foi pesado e colocado em um tubo de centrífuga. A amostra foi extraída com 15 mL de metanol / água /

ácido acético (85:15:0.5, v / v, MeOH). A amostra foi então agitada em vórtex por 30 segundos e mantido em ultrassom 5min. O tubo foi agitado e mantido em temperatura ambiente por 10 minutos, sendo agitado em vórtex durante 30 s após 5 min. O tubo foi então centrifugado a 4550g por 10 min e o sobrenadante removido. A amostra foi extraída uma mais vez com 10 mL de MeOH/H₂O/AcAc utilizando o mesmo procedimento, e os sobrenadantes foram combinados. A solução foi filtrada em filtro Teflon de 0,22 µm (Wu, Gu, Prior, Mckey, 2004).

2.7.2. Descrição da metodologia para análise de antocianinas por espectrometria de massas

A identificação de antocianinas de casca de jabuticaba foi realizada a partir do extrato supracitado. Cinco microlitros do extrato foram diluídos em 995µl de metanol: H₂O (1:1) e 0,1% de ácido fórmico.

Para ESI, um espectrômetro de massas Q-TOFmas (Micromass, Manchester, Reino Unido) foi utilizado. As condições gerais foram: temperatura da fonte 100 ° C, a tensão capilar de 3 kV de tensão e cone de 35 V. As medições foram realizadas por infusão direta com uma taxa de fluxo de 10 µl.min⁻¹, utilizando uma bomba (Harvard Apparatus). Espectros de massa foram adquiridos e acumulou mais de 60 espectros, sendo estes submetidos a varredura no intervalo entre 100 e 1000 m / z.

2.7.3. Descrição da metodologia para análise de antocianinas por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a arranjo de diodos (HPLC-PDA)

O método de CLAE para quantificação de antocianina foi baseado em Favaro (2007), com algumas modificações. As análises foram conduzidas em um HPLC (Waters 2996) sistema equipado com um detector de arranjo de diodos (Waters 515), software Empower. A separação de antocianinas foi feita com uma coluna C18 (ODS2, comprimento = 25,0 cm, diâmetro interno = 4,6 mm, tamanho de partícula = 5 μm e tamanho de poro = 100 Å, Varian, Microsorb MV). A fase móvel utilizada foi água deionizada: acetonitrila: ácido fórmico (81:9:10 v/v/v) . A eluição foi isocrática e em fase reversa, e o volume de vazão de fase móvel de 1, 0 m L min⁻¹ ,o volume de injeção foi de 20 μL , o tempo de eluição de 40 min e a detecção feita em 520, 525 e 540 nm. O pico de identificação de cada antocianina foi com base na comparação do tempo de retenção relativo (TR), porcentagem área do pico, e os dados espectrais com os padrões de antocianina. Posteriormente, para os estudos de quantificação de ACYS individuais por HPLC foram utilizados 3 padrões de ACYS, cianidina-3-O-glicosídeo, cianidina-3-O-galactosídeo e delphinidina 3-O- glicosídeo adquiridos da empresa Extrasynthese. As curvas padrões para todas as antocianinas foram determinadas utilizando os padrões descritos acima utilizando as mesmas condições cromatográficas descritas acima.

Para a quantificação de antocianinas nas frutas, o liofilizado das cascas de jabuticaba foi extraído conforme o item 2.7.1, o extrato foi diluído, filtrado em filtros (0,45 μm) e aplicado em cromatógrafo utilizando-se as mesmas condições cromatográficas utilizadas descritas.

2.8. Determinação da capacidade de seqüestrar radicais livres utilizando método ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity)

O ensaio para determinação da capacidade antioxidante nas amostras foi realizado a partir do extrato etanólico. O pó liofilizado foi dissolvidos em etanol, a fim de se obter uma concentração de $10 \text{ mg.sólidos.mL}^{-1}$ e deixado em equipamento de ultrassom por 30 minutos. Os reagentes foram colocados em poços de microplacas onde ocorreu a reação. Para o ensaio, foram adicionados $20 \mu\text{L}$ de extrato (com concentração final de $0,6 \text{ mg.mL}^{-1}$), $120 \mu\text{L}$ de fluoresceína em tampão fosfato de potássio (pH 7,4) na concentração final de $0,378 \mu\text{g/mL}$ (preparada a partir de uma solução estoque de $3,87 \text{ mg/mL}$) e $60 \mu\text{L}$ de AAPH (2,2'-azobis (2-methylpropionamidine) dihydrochloride, 108 mg.mL^{-1} , em água). A solução de AAPH foi preparada minutos antes de ser colocada na placa. Para o branco, o extrato foi substituído por tampão fosfato de potássio. Como padrão foi utilizado Trolox em tampão fosfato de potássio ($0,1$; $1,0$; 10 ; 25 ; 50 ; 80 e $100 \mu\text{M}$). Após a adição de todos os reagentes na placa, foi realizada a leitura da fluorescência, a cada 1 minuto, por 80 minutos. Foram utilizados os seguintes filtros: emissão 520 nm e excitação 485 nm . O extrato foi determinado em triplicata. As leituras da fluorescência foram utilizadas para os devidos cálculos (Dávalos, Gómez-Cordovés, Bartolomé, 2004).

2.9. Determinação da capacidade de seqüestrar radicais livres por DPPH

O ensaio de DPPH foi realizado de acordo com metodologia proposta por Roesler, Malta, Carrasco e Pastore (2007) com algumas adaptações para o volume. O pó liofilizado foi dissolvidos em etanol, a fim de se obter uma concentração de $10 \text{ mg sólidos.mL}^{-1}$ e deixado em equipamento de ultrassom

por 30 minutos. A partir desse extrato etanólico, soluções etanólicas com diferentes concentrações foram preparadas. Em uma microplaca transparente foram pipetados 250 µL de solução de DPPH (0,004% m.v⁻¹), e 50 µL do extrato em diferentes concentrações. A placa foi incubada 30 minutos à temperatura ambiente no escuro. O mesmo procedimento foi adotado para o ácido gálico, para efeito comparativo. O controle foi preparado conforme procedimento acima, sem adição de extrato, e etanol foi utilizado para correção da linha de base. A solução de DPPH foi preparada diariamente e estocada em frascos escuros, mantidas no escuro a 4 °C até o momento das determinações. O percentual de decréscimo na absorbância foi medido a 517 nm em leitor de placa da marca Novostar BMG LABTECH. Para cada concentração e a capacidade de seqüestrar radicais livres foi calculada com base no decréscimo da absorbância observada. A capacidade de seqüestrar radical livre foi expressa como percentual de inibição de oxidação do radical e calculado conforme fórmula abaixo:

$$\% \text{ Inibição} = ((ADPPH - A_{\text{Extrato}})/ADPPH) * 100 \quad (1)$$

Onde ADPPH é a absorbância da solução de DPPH e Extrato é a absorbância da amostra em solução. O Extrato foi calculado com base na diferença da absorbância da solução de amostra em teste com seu branco. O valor de IC₅₀ é definido com a concentração final em mg.mL⁻¹ do extrato seco requerido para decrescer a concentração inicial de DPPH em 50%.

2.10 Determinação da capacidade de seqüestrar radicais livres por ABTS

O teste foi realizado baseado nos relatos de Rufino et al.(2007) e Le, Chiu e Ng (2007) com modificações. Preparou-se uma solução catiônica de ABTS (2,2'-azinobis-3-etil-benzotiazolina-6-sulfonado), misturando 5 mL de solução de ABTS 7,0mM e 88µL da solução de persulfato de potássio 2,45mM. Esta reagiu por 12 horas, em temperatura ambiente e ausência de luz. Após formado o radical ABTS•+, adicionou-se água ultrapura à solução até obter um valor de absorbância de 0,700 ($\pm 0,05$) a 754nm em leitor de placa da marca Novostar BMG LABTECH. A determinação da absorbância das amostras foi realizada em temperatura ambiente, 23°C (± 1), após 6 minutos de reação. Trolox foi utilizado como antioxidante de referência. Para preparo do extrato, o pó de cascas de jabuticabas liofilizado foi dissolvido em etanol, a fim de se obter uma concentração de 10 mg sólidos.mL⁻¹ e deixado em equipamento de ultrassom por 30 minutos. A partir desse extrato etanólico, soluções etanólicas com diferentes concentrações foram preparadas. Em uma microplaca transparente de 96 poços, foram pipetados 250 µL de solução de ABTS e 50 µL do extrato em diferentes concentrações.

3. Resultados e discussão

3.1 Determinações do percentual das frações (polpa/semente e casca), rendimento do pó liofilizado e determinação dos macronutrientes

A porcentagem média de casca em relação ao fruto foi de 28.94% ± 4.31 , sendo que a porcentagem de polpa e sementes observada foi de 66.82% ± 4.92 . O peso médio do fruto foi de 5.63 g ± 1.00 , e o rendimento médio do processo de liofilização foi de 20.5%.

A determinação da composição centesimal de pó liofilizado de casca de jabuticaba encontra-se na Figura 2. Observa-se pelos dados que o pó é constituído principalmente de açúcares e água, e em menores proporções, fibras e cinzas. Donadio (2000) encontrou valores semelhantes para o fruto inteiro, sendo 3,4% de cinzas, 4% de proteína bruta, e 4,52% de fibra bruta. Os outros componentes, principalmente água e açúcares diferiram bastante, pois este autor trabalhou com o fruto inteiro e in natura.

<Figura 2>

3.2 Determinações dos compostos bioativos presentes na casca de jabuticaba liofilizada e sua atividade antioxidante

A Tabela 3 apresenta os teores de compostos bioativos identificados na casca de jabuticaba liofilizada e sua atividade anti-radical.

< Figura 3>

O alto teor de compostos fenólicos totais ($556,3 \text{ gGAE.kg}^{-1}$) encontrados no pó liofilizado de casca de jabuticaba no presente estudo (Figura 3) foi reportado por poucos autores, por ser um fruto brasileiro ainda pouco estudado. Calculando-se este valor proporcional para a casca de jabuticaba fresca e para a jabuticaba inteira fresca, teríamos, respectivamente, um valor proporcional de 114 e $32,15 \text{ gGAE.kg}^{-1}$.

Reynertson (2007), trabalhando com fruto inteiro e seco, encontrou um valor de $31,63 \pm 0,1 \text{ gGAE.kg}^{-1}$ de peso seco, ou seja, um valor bem abaixo do encontrado no presente estudo, porém, justificado pela ausência de compostos

fenólicos na polpa e por esta encontrar-se em grandes proporções no fruto. Roesler, et al. (2007), analisando fenólicos em casca seca de frutas do cerrado, encontrou valores de $99,18 \pm 3.93$ e $209,37 \pm 3.57$ gGAE.kg⁻¹ para casca de banana de galinha e pequi, respectivamente, porém, essas frutas tem predomínio de compostos fenólicos, mas não são fontes de antocianina. Soares, Welter, Kuskoski, Gonzaga e Fett (2008), trabalhando com casca de uva das cultivares Isabel e Niagra, encontrou valores de 2,19 a 12,4 gGAE.kg⁻¹, respectivamente. Um estudo feito com pó de diversas espécies de Blueberry, encontrou valores de $12,00 \pm 0.77$ a 14.81 ± 1.58 gGAE.kg⁻¹ (Dai et al., 2009). O conteúdo de compostos fenólicos de cinco cultivares de uvas produzidas em Minas Gerais foram determinados através do método de Folin-Ciocalteu variando entre 0.65 ± 0.01 e $3,90 \pm 0.3$ gGAE.kg⁻¹ de amostra base úmida (Abe et al., 2007).

O conteúdo de antocianinas monoméricas encontrado no pó liofilizado de casca de jabuticaba ($1514,82 \pm 45,51$ mg cyd 3-glu .100g⁻¹), também apresenta-se maior que os valores normalmente encontrados na literatura. Reynertson (2007), encontrou para o fruto inteiro, 278 ± 17 mg cyd 3-glu.100g⁻¹. Essa variação deve-se principalmente a diferença na metodologia, pois este autor trabalhou com o fruto inteiro, além disso, existem diferenças na composição das frutas devido as condições climáticas, estágio de maturação e cultivar, além disso, sendo um fruto nativo brasileiro, era de se esperar que o fruto produzido no Brasil possuísse uma composição diferenciada.

Em estudo brasileiro utilizando um fruto silvestre rico em antocianina, o baguaçu (*Eugenia umbelliflora* Berg), Kuskoski, Asuero, Morales e Fett (2006), encontraram um valor de $596 \pm 30,8$, mg cyd 3-glu.100g⁻¹, porém essa análise

foi feita em polpa da fruta, diferente do estudo em questão, onde foi utilizado o pó liofilizado.

Em um trabalho realizado por Dai et al. (2009) com diferentes espécies de Blackberry, que são consideradas as frutas com maiores concentrações de antocianina, o maior valor encontrado foi de $788 \pm 23 \text{ mg cyd 3-glu} \cdot 100\text{g}^{-1}$,

Diversos estudos com frutas apresentam o valor total de antocianinas calculado de acordo com o método pH diferencial, que utilizam o metanol acidificado com HCl como solvente extrator. A partir do cálculo proposto por Lees e Francis (1972) obteve-se um menor teor de antocianinas totais ($732,77 \pm 22,42 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$) em comparação com as antocianinas monoméricas ($1514,82 \pm 45,51$), este fato é justificado pois coeficiente proposto para o cálculo por FRANCIS (13) refere-se ao suco de “cranberry” em etanol acidificado, cuja antocianina majoritária é peonidina 3-galactosídeo, seguida da cianidina 3-galactosídeo (Wu e Prior, 2005) o que pode explicar esta diferença no teor antociânico. Outra explicação seria que o solvente utilizado no método, etanol 95 %/ HCl 1,5N (85:15), não garante a total extração de antocianinas, pois o metanol é 20 % mais eficiente que etanol e 73 % mais eficiente que água, em termos de extração de antocianinas, segundo Metivier, Francis & Clydesdale (1980).

O valor de IC₅₀ para a casca de jabuticaba liofilizada utilizando o teste do DPPH foi de $45,38 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ (Figura 4). Reynertson (2007), encontrou para o extrato metanólico de jabuticaba um IC₅₀ $35 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$. Eibond, Reynertson, Luo, Basile e Kennelly, (2004) trabalhando com extrato metanólico purificado de jabuticaba, encontraram um valor de IC 50 de $6.2 \pm 0.7 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$. Valores baixos de IC 50 indicam quão maior é o potencial antioxidante. Sendo assim, os valor

encontrados no presente estudo indicam um menor potencial antioxidante quando comparado aos outros estudos, porém, o tipo de extração e o solvente extrator utilizados foram diferentes. No estudo, foi utilizado etanol e a casca de jabuticabas liofilizada não passou por nenhum tipo de purificação prévia.

<Figura 4>

Utilizando a metodologia do radical ABTS, encontrou-se um valor de $9458 \mu\text{MTEAC.g}^{-1}$ de amostra seca. Dai et al. (2009), trabalhando com diversas espécies de blueberryes encontraram valores de $64,40 \mu\text{MTEAC.g}^{-1} \pm 78.02 \mu\text{MTEAC.g}^{-1}$. Rufino et al.(2010) encontraram para a amostra seca de jabuticaba, um valor de $138 \pm 3.1 \mu\text{MTEAC.g}^{-1}$. Este valor muito acima do esperado condiz com o alto teor de antocianinas e compostos fenólicos totais encontrados na casca e acima descritos. No entanto, Ferreira (2008), encontrou para amora preta, um valor de TEAC de $2209,7 \pm 68,4 \mu\text{M.g}^{-1}$.

O valor do ensaio ORAC encontrado para o extrato do pó liofilizado de casca de jabuticaba foi de $25514,24 \mu\text{MTE.g}^{-1}$ de matéria seca. Uma publicação do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos, de 2010, apresenta uma lista com o poder antioxidante de 326 alimentos, baseada nos valores de ORAC (U.S. Department of Agriculture, 2010). De acordo com esta lista, o fruto que apresenta composição fenólica mais próxima da jabuticaba, seria o açaí, que possui $997 \mu\text{MTE.g}^{-1}$. Ou, Hampsch-Woodill e Prior (2001), desenvolvendo a validação para o método de Orac, encontrou para o extrato seco de blueberry um valor 10 vezes menor de $2792 \mu\text{MTE.g}^{-1}$ e para o extrato liofilizado de casca de uva, um valor de $15675 \mu\text{MTE.g}^{-1}$, porém neste

estudo, foi utilizado como solvente extrator uma solução acetona: água (50:50). Utilizando esse mesmo solvente, Schauss et al. (2006), encontrou para o pó liofilizado de açáí, um valor de $997 \mu\text{MTE.g}^{-1}$. O tipo de solvente utilizado é uma questão relevante ao se discutir estes resultados, pois o método de extração, a temperatura de extração e o processamento após a extração são fatores que podem influenciar dramaticamente o resultado final. Sabe-se também, que a genética, a época de colheita e as condições ambientais podem influenciar significativamente o conteúdo de metabólitos secundários de plantas (Wu et al., 2004). Além disso, o fruto da jabuticaba é pouco estudado e não foi encontrado resultados deste ensaio realizados anteriormente com pó liofilizado de jabuticaba. Muitos estudos realizaram o ensaio de Orac considerando a fruta fresca, assim, proporcionalmente, teríamos um valores de $5230,4 \mu\text{MTE.g}^{-1}$ e $1511 \mu\text{MTE.g}^{-1}$ para a casa de jabuticaba fresca e a fruta integral fresca, respectivamente.

As análises cromatográficas das antocianinas da casca liofilizada de jabuticaba revelaram a presença de dois compostos (Figura 5): delphinidina-3-glicosídeo e cianidina-3-glicosídeo, confirmadas pela comparação dos tempos de retenção com os de padrões autênticos e também pela cromatografia acoplada a espectrômetro de massas (LC-ESI-MS/MS Q-ToF) (Figura 6). As antocianinas identificadas no pó liofilizado de casca de jabuticaba, bem como a ordem de eluição, estavam acordo com a encontrada por Terzi (2004), porém, este estudo brasileiro identificou também a peonidina-3-glicosídeo. Reynertson et al. (2006), identificou em jabuticabas cianidina-3-glicosídeo e peonidina-3-glicosídeo, porém estes dois autores não descreveram o gênero utilizado,

podendo ser este um fator determinante na constituição dos micronutrientes encontrados no fruto.

<Figura 5, 6>

Como já discutido por diversos autores, a jabuticaba poderia ser considerada uma berry brasileira, sendo assim, sua composição de antocianinas é bem semelhante às berries, mais especificamente, blackberry, na qual foram identificadas delphinidina-3- glicosídeo e cianidina-3-glicosídeo (Dugo, Mondello, Errante, Zappia, e Dugo, 2001).

A figura 7 apresenta os resultados da quantificação de antocianinas de casca de jabuticaba encontradas nesse trabalho. O conteúdo de antocianinas totais quantificado por CLAE foi de $2599,3 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$ do pó liofilizado, sendo que a cianidina 3-glicosídeo (pico 2), foi a antocianina dominante (75,6% do total de antocianina) (Figura 6).

<Figura 7>

Reynertson (2007) utilizando o fruto inteiro e seco, encontrou valores de $433 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$ para a cianidina-3-glicosídeo e $81 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$ para a delphinidina-3 glicosídeo. Considerando que ele trabalhou com o fruto inteiro, se fizéssemos o cálculo estimado, encontraríamos em nosso estudo $567 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$ para a cianidina-3-glicosídeo e $186,6 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$ para a delphinidina-3 glicosídeo.

Favaro (2007) em seu trabalho com jabuticabas inteiras, encontrou um valor de 25 mg de antocianinas a cada 100g da fruta inteira e fresca, um valor 100 vezes menor que o encontrado para o pó liofilizado, porém, este autor

trabalhou com uma forma de extração diferente e quantificou na fruta inteira e fresca, assim, fazendo um cálculo proporcional, a quantidade de antocianina para a fruta inteira e fresca seria de $154 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$.

Brito, et al. (2007), também trabalhando com frutas tropicais ricas em antocianinas, encontraram para o jambolão uma ampla variedade de antocianinas: delphinidina, petunidina, peonidina, e malvidina todos apresentando-se como diglucosídeos. O composto principal na jambolão foi 3,5 delphinidina -- diglucosídeo ($256 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$ de peso seco), seguido por Petunidina 3,5-diglucosídeo ($245 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$), 3,5-Malvidina diglucosídeo ($166 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$), 3-5 peonidina deglucosídeo ($75 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$), e cianidina 3,5-diglucosídeo ($29 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$). Neste mesmo estudo, os autores analisaram a Jussara e foram identificadas como principais antocianinas, cianidina 3-glicosídeo ($1358 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ de peso seco) e cianidina 3-rutinosídeo ($1565 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$).

4. Conclusão

Neste estudo, a casca de jabuticaba liofilizada mostrou uma grande capacidade antioxidante comprovada por todos os métodos antioxidantes analisados, pela quantidade de compostos fenólicos encontrada e principalmente pela concentração de cianidina-3-o --glicosídeo e delphinidina-3- o glicosídeo. Porém, mais estudos são necessários para identificar a segurança e a eficácia do pó liofilizado de casca de jabuticaba em estudos *in vivo*.

Agradecimentos

Ao suporte financeiro do CNPq (número de processo 133001/2008-3).

Figura 1

Comparação da metodologia de Lees e Francis (1972) adaptada para o pó liofilizado.

	Metodologia original	Metodologia adaptada
Fruta	100 g	0,1 g do pó
Volume de solvente	500 ml	25 ml
Diluição da amostra	2 ml/100 ml	0,1 ml/ 5ml

*Quantidade do pó liofilizado de casca de jabuticaba

Figura 2

Composição centesimal do pó liofilizado de casca de jabuticaba.

Componentes (%m.m ⁻¹)	Desvio	
	Teor (%)	padrão
Água	22,72	0,23
Lipídeos	1,27	0,07
Cinzas	3,01	0,07
Proteína bruta	3,90	0,12
Fibra Bruta	6,45	0,28
Acúcares redutores	40,95	0,57
Acúcares redutores totais	59,04	0,99
Sacarose	17,18	Nd

Cada valor foi obtido por meio da média $\pm$ desvio padrão de pelo menos três replicatas; n.d. = não determinado

Figura 3

Teores de compostos bioativos e atividade antiradical encontrados no pó liofilizado de casca de jabuticaba.

	Concentração ^a
compostos fenólicos totais	556,28±20,37 gGAE ^b .kg ⁻¹
antocianinas totais	732,77±22,42mg.100g ⁻¹
antocianinas monoméricas	1514,82±45,51 mg cyd 3-glu ^c .100g ⁻¹
atividade anti-radical DPPH	45,38 µg.ml ⁻¹
atividade anti-radical ABTS	9457,74±54,29 µMTEAC.g ^{-1d}
atividade anti-radical Orac	25514,25±3037,24 µMTE.g ^{-1d}

a Média de análises em triplicata

b valores expressos em equivalente de ácido gálico

c cianidina 3- glicosídeo

d equivalente de Trolox

Figura 4

Percentual da atividade antioxidante em função da concentração de fenóis totais do extrato etanólico de casca de jabuticaba pelo ensaio de DPPH

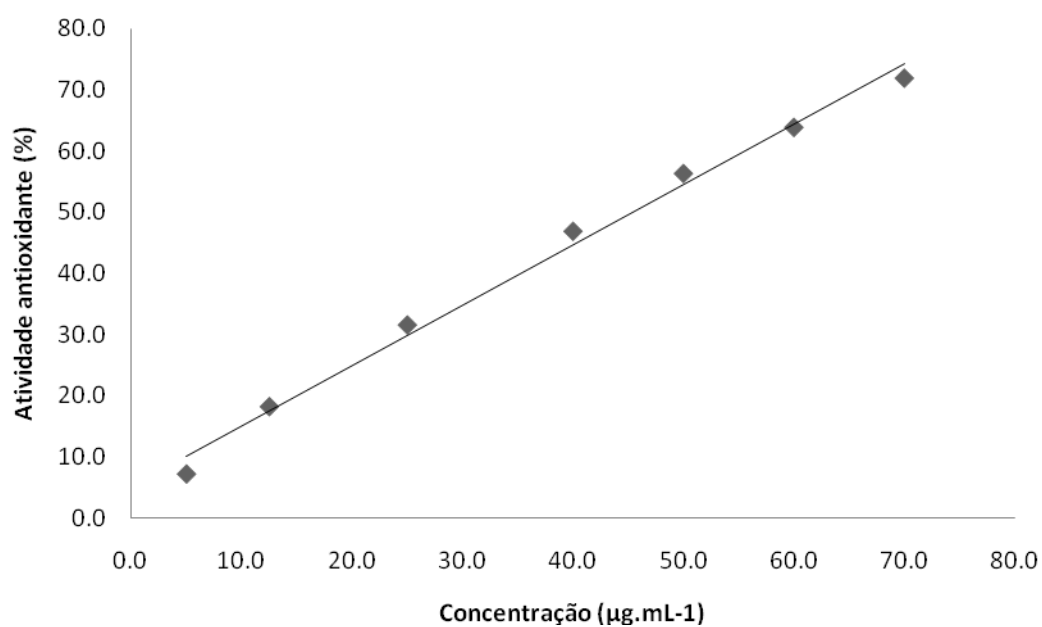


Figura 5

Cromatograma obtido a partir do extrato do pó liofilizado de casca de jabuticaba. Condições cromatográficas: coluna C18; fase móvel água deionizada: acetonitrila:ácido fórmico 81:9:10 (v/v/v); volume de injeção 20 µL e detecção espectrofotométrica em 520, 525 e 540 nm. Consulte a Figura 7 para a identificação de cada pico.

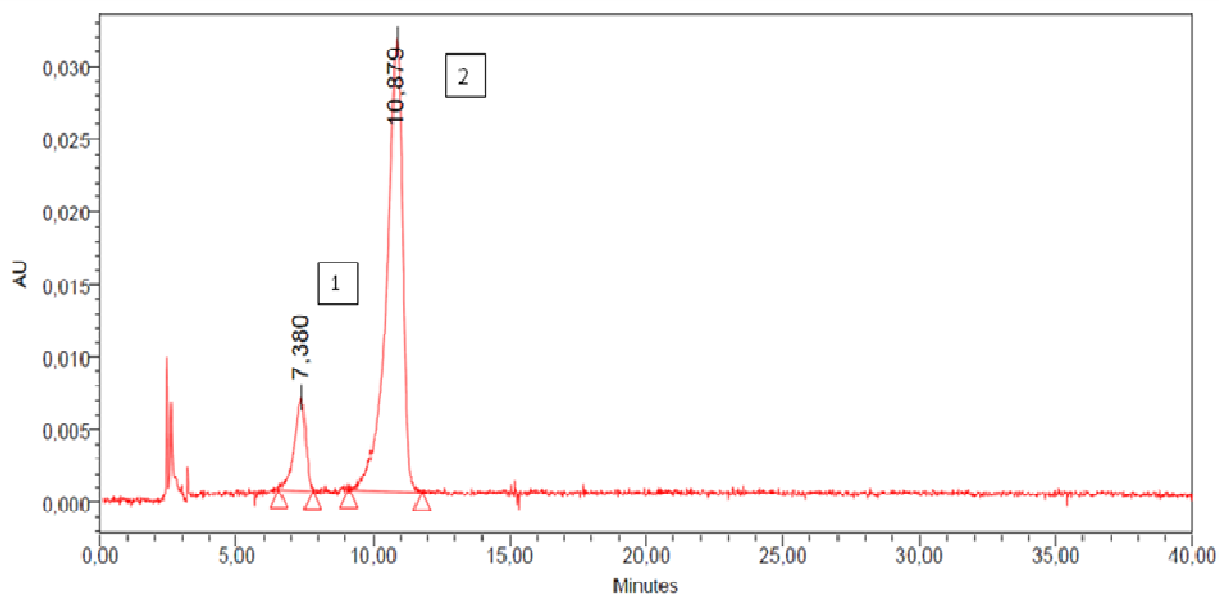


Figura 6. Espectros de massas (MS/MS), para identificação de antocianinas em pó liofilizado de casca de jabuticaba.

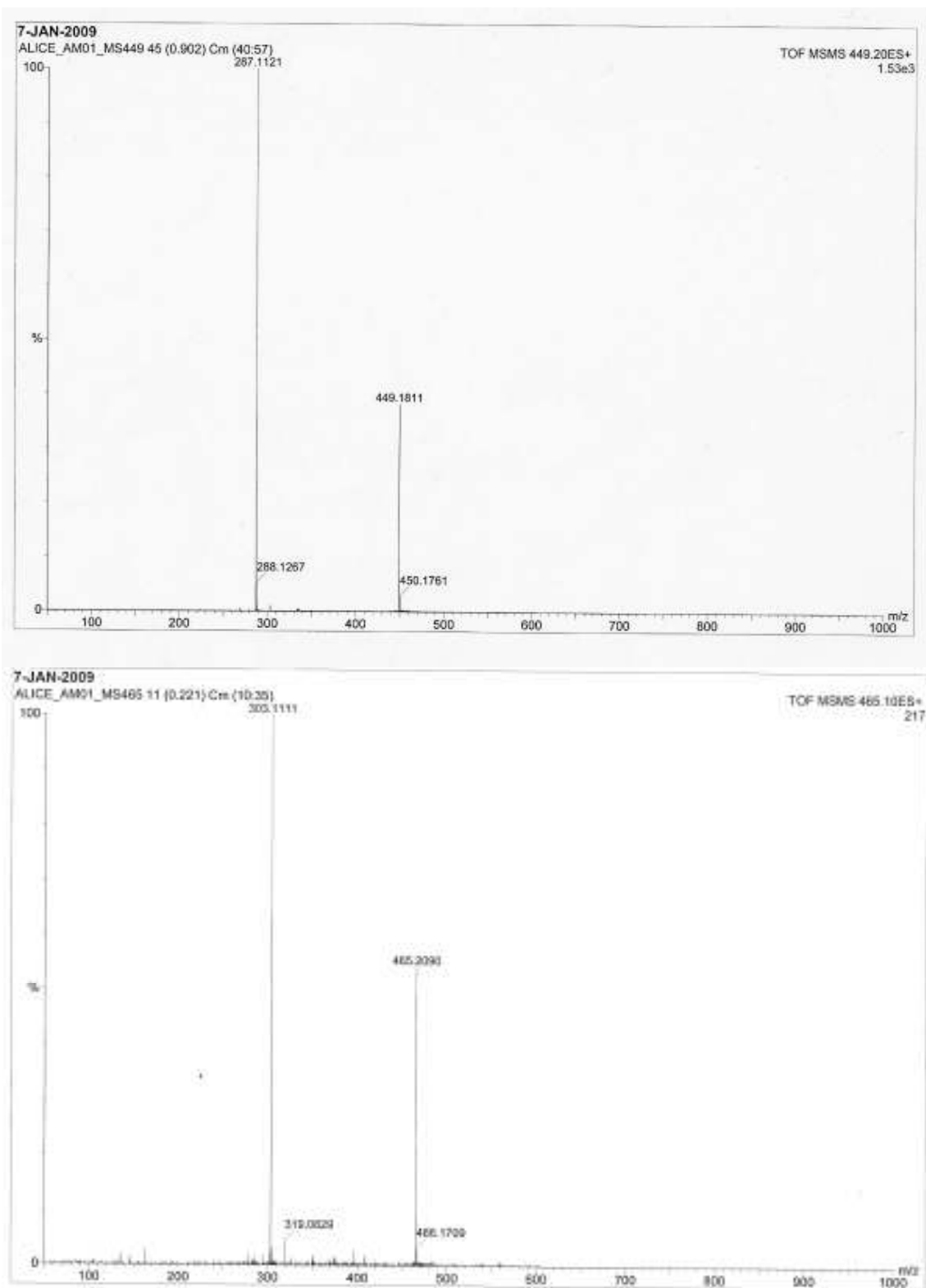


Figura 7. Identificação de antocianinas em casca de jabuticaba.

pico	tR (min)	[M] ⁺ (m/z)	MS/MS (m/z)	antocianina	mg.100 g ⁻¹ de peso	
					seco	fresco
1	7,38	465	303	delfinidina 3-O-glicosídeo	635,3	130,2
2	10,879	449	287	cianidina 3-O-glicosídeo	1964	402,6
total					2599,3	532,9

Referências Bibliográficas

Abe, LT, Da Mota, RV, Lajolo, FM, Genovese, MI (2007). Compostos fenólicos e capacidade antioxidante de cultivares de uvas *Vitis labrusca* L. e *Vitis vinifera*. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 27(2), 394-400.

AOAC (1975). Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 12^aed. Washington: AOAC. Pp1094.

Bhagwat, S, Haytowitz, DB, Holden, JM (2007). USDA Database for the Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) of Selected Foods. Washington: American Institute for Cancer Research Launch Conference.

Bligh, EG, Dyer WJ (1959). A rapid method of total lipid extraction and Purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 37, 911-917.

Brito, ES, Araújo, MCP de, Alves, RE, Carkeet, C, Clevidence, BA e Novotny, JA (2007). Anthocyanins Present in Selected Tropical Fruits: Acerola, Jambolão, Jussara, and Guajiru. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 9389–9394.

Dai, J, Gupte, A, Gates, L, Mumper, RJ (2009). A comprehensive study of anthocyanin-containing extracts from selected blackberry cultivars: Extraction methods, stability, anticancer properties and mechanisms. *Food and Chemical Toxicology*, 47, 837–847.

Dávalos, A, Gómez-Cordovés, C, Bartolomé B (2004). Extending Applicability of the Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC-Fluorescein) Assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 48-54.

Donadio, LC (2000). Jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba* (Vell.)Berg). Jaboticabal: FUNEP, Pp.55.

Duarte, O, Ludders, P, Huete, M (1996). Extending storage life of jaboticaba (*Myrciaria cauliflora* Berg) fruits. ,(Pp. 556), Curitiba-PR: 14 Congresso Brasileiro de Fruticultura.

Dugo, P, Mondello, L, Errante, G, Zappia, G , Dugo, G (2001). Identification of anthocyanins in berries by narrow-Bore high-Performance liquid chromatography with electrospray ionization detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 3987-3992.

Einbond, LS, Reynertson, KA, Luo, X , Basile, MJ, Kennelly, EJ (2004). Anthocyanin antioxidants from edible fruits. *Food Chemistry*, 84 ,23–28.

Favaro, MMA (2007). Extração, estabilidade e quantificação de antocianinas de frutas típicas brasileiras para aplicação industrial como corantes. Campinas: Tese- Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas.

Ferreira, DS. Compostos bioativos em amora-preta e encapsulação do seu extrato antociânico por gelificação térmica com curdlana (2008). Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos), Universidade Estadual de Campinas: Campinas.

Instituto Adolfo Lutz (1985). Normas analíticas do instituto Adolfo Lutz. 3a ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 1.

Kalt, W, Blumberg, JB, McDonald, JE, Vinqvist-Tymchuk, MR, Fillmore, SAE, Graf, BA, O'leary, JM, Milbury, PE (2008). Identification of

anthocyanins in the liver, eye, and brain of blueberry-fed pigs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56 (3), 705-712.

Kuskoski, EM, Asuero, AG, Morales, MT, Fett, R (2006). Frutos tropicais silvestres e polpas de frutas congeladas: atividade antioxidante, polifenóis e antocianinas. *Ciência Rural*, 36 (4), 1283-1287.

Lane, H, Eynon, L (1923). Determination of reducing sugar by means of Fehling's solution with methylene blue as internal indicator. *Journal of the Society of Chemistry Industry, London*, 42, 32T-37T.

Le, K, Chiu, F, Ng, K (2007). Identification and quantification of antioxidants in *Fructus lycii*. *Food Chemistry*, 105, 353–363.

Lees, DH, Francis, FJ (1972). Standardization of pigment analyses in cranberries. *HortScience*, 7 (1), 83- 84.

Mattos, JR (1983). *Frutíferas nativas do Brasil: jaboticabeiras*. Porto Alegre, 92.

Metivier, RP, Francis, FJ, Clydesdale, FM (1980). Solvent extraction of anthocyanins from wine pomace. *Journal Food Science*, 45, 1099-1100.

Ou, B, Hampsch-Woodill, M, Prior, RL (2001). Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 4619-4626

Ou, B, Huang, D, Hampsch-Woodill, M, Flanagan, JA & Deemer, EK (2002). Analysis of antioxidant activities of common vegetables employing oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and ferric reducing antioxidant power

(FRAP) assays: A comparative study. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50, 3122-3128.

Reynertson,KA (2007). Phytochemical analysis of bioactive constituents from edible myrtaceae fruits. New York: Tese-Graduate Faculty in Biology- City University of New York.

Reynertson, KA, Yang, H, Jiang, B, Basile, MJ, Kennelly, EJ (2008). Quantitative analysis of antiradical phenolic constituents from fourteen edible Myrtaceae fruits. Food Chem., 109 (4), 883–890.

Reynertson, KA, Wallace, AM, Adachi, S, Gil, RR, Yang, H, Basile, D'Armiento,J, Weinstein, IB, Kennelly, DJ (2006). Bioactive Depsides and Anthocyanins from Jaboticaba (*Myrciaria cauliflora*).Journal of Natural Products,69, 1228-1230.

Roesler,R, Malta, LM, Carrasco, LC, Holanda, RB, Sousa,CAS, Pastore,GM (2007).Atividade antioxidante de frutas do cerrado. Ciência Tecnologia de Alimentos, 27(1), 53-60.

Roesler,R, Malta, LM, Carrasco, LC, Pastore,GM (2007).Evaluation of the Antioxidante Properties of the Brazilian Cerrado Fruit Annona crassiflora (Araticum). Journal of Food Science, 71 (2), 102-107.

Rufino, MSM, Alves, RE, Brito, ESde, Moraes, SMde, Sampaio, CdeG, Pérez-Jiménez, J, Saura-Calixto, FD (2007). Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre ABTS+. Comunicado técnico on line
www.cnpat.embrapa.br/home/down/index.php?pub/Cot_128...

Rufino, MSM., Alves, RE, Brito, ESde, Pérez-Jiménez, J, Saura-Calixto, FD, Mancini-Filho, J (2010). Bioactive compounds and antioxidant capacities of eighteen non-traditional tropical fruits from Brazil. Food Chemistry . doi: 10.1016/j.foodchem.2010.01.037

Schauss, AG, Wu, X, Prior, RL, Ou, B, Huang, D, Owens, J, Agarwal, A, Jensen, GS, Hart, AN e Shanbrom, E (2006). Antioxidant Capacity and Other Bioactivities of the Freeze-Dried Amazonian Palm Berry, *Euterpe oleracea* Mart. (Acai). Journal of Agricultural and Food Chemistry, 54, 8604-8610.

Shelly Hogan, S, Chung, H, Zhang, L, Li, J, Lee, Y, Dai, Y, Zhou, K (2010). Antiproliferative and antioxidant properties of anthocyanin-rich extract from açai. Food Chemistry, 118, 208–214.

Soares, M, Welter, L, Kuskoski, EM, Gonzaga, L, Fett, R (2008). Compostos fenólicos e atividade antioxidante da casca de uvas niágara e Isabel. Revista Brasileira de Fruticultura, 30(1), 059-064.

Terci, DBL (2004). Aplicações analíticas e didáticas de antocianinas extraídas de frutos. Campinas: Tese- Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas.

U.S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service (2010). Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) of Selected Foods, Release 2. Nutrient Data Laboratory Home Page: <http://www.ars.usda.gov/nutrientdata/orac>

Wu,X, Gu,L, Prior, RL, McKay, S (2004). Characterization of Anthocyanins and Proanthocyanidins in Some Cultivars of *Ribes*, *Aronia*, and *Sambucus* and Their Antioxidant Capacity. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 52 (26), 7846-7856.

Wu, X, Prior, R (2005). 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, 53, 2589-2599.

Capítulo 3

Aumento do potencial antioxidante de plasma de ratos alimentados com casca de jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba* (Vell.) Berg) liofilizada

(Artigo em fase de preparação para envio a revista Journal of Agricultural and Food Chemistry)

Alice Vieira Leite^{a*}, Luciana Gomes Malta^a, Maria Francesca Riccio^b, Marcos Nogueira Eberlin^b,
Gláucia Maria Pastore^a, Mário Roberto Maróstica Júnior^a

^aSchool of Food Engineering, University of Campinas-UNICAMP, P.O. Box 6121, 13083-862 Campinas-SP, Brazil

^bThomson Mass Spectrometry Laboratory, Institute of Chemistry, University of Campinas - UNICAMP, 13083-970 Campinas, SP, Brazil

[*alicevleite@gmail.com](mailto:alicevleite@gmail.com)

Resumo

O efeito da ingestão de pó de casca de jaboticaba liofilizada no potencial antioxidante do plasma de ratos foi investigado em dois experimentos. No primeiro foi realizado um teste de cinética de absorção. Trinta e cinco ratos machos, divididos em 5 grupos, receberam por gavagem 7 mg de antocianinas/ 100 g de peso. A coleta de sangue foi realizada nos tempos 0, 30, 60 e 120 minutos. O potencial antioxidante foi quantificado no plasma por ORAC e TEAC. Neste experimento não ocorreu diferença significativa no potencial antioxidante plasmático quando comparados os diversos tempos. No segundo experimento, 40 ratos machos foram divididos em 4 grupos que consumiram, respectivamente, 0, 1, 2 e 4% de pó de casca de jaboticaba liofilizada acrescido a dieta por 28 dias. Foi observado um aumento no potencial antioxidante plasmático (1.7 vezes pelo método de TEAC e 1.3 vezes por ORAC), porém a concentração de 4% não apresentou efeito antioxidante.

KEYWORDS: Anthocyanins; antioxidant; jaboticaba; *Myrciaria jaboticaba* Vell berg; ORAC; TEAC

1. Introdução

Parte de uma classe comum de fitoquímicos conhecidos como flavonóides, as antocianinas são responsáveis pela cores vermelha, roxo e azul encontradas em muitos vegetais, flores e frutas. A alta ingestão de frutas e vegetais está cada dia mais relacionada à redução do risco de câncer e doenças cardiovasculares e as antocianinas podem contribuir para este efeito. Frutos com um alto conteúdo de antocianinas têm uma elevada capacidade antioxidante e os seus efeitos benéficos podem estar relacionados à sua atividade antioxidante *in vivo*. Porém, ainda é incerto se o consumo de antocianinas contida nos alimentos aumenta significativamente os níveis de antioxidantes *in vivo* (1). A biodisponibilidade de antocianinas tem se mostrado extremamente baixa, e a proporção absorvida pode ser menos de 0,1% da dose ingerida (2). No entanto, muitos estudos utilizam extrato de antocianina purificado e poucos têm investigado os efeitos dos alimentos em sua forma integral na absorção de antocianinas e atividade antioxidante. As antocianinas raramente são ingeridas de forma isolada, mas sim em combinação com outras matrizes de alimentos e outros flavonóides (1). Apesar da atividade antioxidante de antocianinas demonstrada *in vitro*, possível conformação de seus efeitos *in vivo* depende, principalmente, da absorção, metabolismo, distribuição nos tecidos e excreção. Há ainda considerável incerteza sobre o mecanismo preciso da absorção de fenólicos da dieta a partir do trato gastrointestinal. Porém, sabe-se que as antocianinas podem estar presentes no sangue tanto na sua forma glicosilada como na forma aglicona. Contudo, do ponto de vista nutricional, a simples presença de um composto bioativo em alimentos não garante seu efeito biológico. É importante que seja determinada a estabilidade do composto durante a passagem pelo trato gastrintestinal (absorção), distribuição, metabolismo e os efeitos sobre os indicadores de possíveis ações biológicas. Assim, a atividade antioxidante seria um primeiro passo para se presumir sobre possível atividade biológica *in vivo* (3).

Uma gama de ensaios são atualmente utilizados para medir a atividade antioxidante de diversos compostos e alimentos; dentre eles, o ensaio de capacidade de absorção de oxigênio (ORAC) merece destaque. Outras medidas comuns de capacidade antioxidante incluem a redução de íons ferro (FRAP) e o ensaio de equivalência de Trolox (TEAC). Estes ensaios são baseados em diferentes mecanismos que utilizam diferentes fontes de radicais ou oxidantes e,

por consequência, produzem resultados que nem sempre apresentam correlações diretas entre eles (4). O teste ORAC é considerado por alguns como um método preferível, devido à sua importância biológica para determinar antioxidantes *in vivo*, por este motivo tem sido amplamente aplicado na avaliação da capacidade de eliminação de radicais livres do plasma humano, e de animais, proteínas, DNA, além compostos antioxidantes de substâncias puras, plantas e extratos de alimentos (5). Esta metodologia pode simular bem algumas das condições fisiológicas, como a temperatura e o pH sanguíneos. O ensaio de ORAC utiliza o radical peroxila, em parte semelhante a alguns dos radicais de sistemas biológicos, e é o único método que combina o tempo e o grau de inibição na avaliação da capacidade antioxidante (6).

A técnica de TEAC também tem se mostrado eficaz para determinação da atividade antioxidante de alimentos e até mesmo do plasma sanguíneo de ratos e humanos por se tratar de um método simples, que diferente do ORAC, é baseado nas reações de transferência de elétrons (7) e, por esse motivo, foi um dos métodos de escolha para nosso estudo. Dessa forma, objetivo deste estudo foi verificar se o consumo de diferentes proporções de pó de casca de jabuticaba liofilizado na dieta e o tempo de ingestão podem ter efeito antioxidante no plasma de ratos através dos ensaios de TAC e ORAC.

2. Material e Métodos

2.1. O fruto

Os frutos de jabuticaba (*Myrciaria jaboticaba* Vell berg) foram adquiridos de um mercado local de Campinas durante a safra de setembro de 2008. Os frutos foram lavados e despulpados manualmente, as cascas foram congeladas a -18°C (8) em pacotes de 500 gramas.

2.2. Preparo das cascas de jabuticabas liofilizadas

As cascas previamente congeladas a -18°C foram liofilizadas em liofilizador Liobras a 30°C e $300\ \mu\text{Hg}$ por 95 h. A produção do liofilizado foi feita pela trituração da casca em processador industrial Sire Cutter, e posteriormente em Micro Moinho (Marconi) (9). O produto liofilizado (um pó de casca de jabuticaba) foi armazenado a -80°C .

2.3. Determinação dos macronutrientes

O teor de proteína foi determinado por Kjeldahl (10), de umidade e cinzas pelo método do Instituto Adolfo Lutz (11) e lipídios por Bligh & Dyer (12) açúcares totais pelo método de Lane & Eynon (13).

2.4. Extração de antocianinas para identificação por Expectrometria de Massas e quantificação por CLAE (Cromatografia líquida de alta eficiência)

2.4.1. Descrição da metodologia de preparo das amostras de jabuticaba para análise de antocianinas.

Um grama da casca de jabuticaba liofilizada foi pesado e colocado em um tubo de centrífuga. A amostra foi extraída com 15 mL de metanol / água / ácido acético (85:15:0.5, v / v, MeOH). A amostra foi então agitada em vórtex por 30 segundos e mantido em ultrassom 5min. O tubo foi agitado e mantido em temperatura ambiente por 10 minutos, sendo agitado em vórtex durante 30 s após 5 min. O tubo foi então centrifugado a 4550g por 10 min e o sobrenadante removido. A amostra foi extraída uma mais vez com 10 mL de MeOH/H₂O/AcAc utilizando o mesmo procedimento, e os sobrenadantes foram combinados..A solução foi filtrada em filtro Teflon de 0,22 µm (14).

2.4.2. Descrição da metodologia para análise de antocianinas por espectrometria de massas

A identificação de antocianinas de casca de jabuticaba foi realizada a partir do extrato supracitado. Cinco microlitros do extrato foram diluídos em 995µl de metanol: H₂O (1:1) e 0,1% de ácido fórmico.

Para ESI, um espectrômetro de massas Q-TOFmas (Micromass, Manchester, Reino Unido) foi utilizado. As condições gerais foram: temperatura da fonte 100 ° C, a tensão capilar de 3 kV de tensão e cone de 35 V. As medições foram realizadas por infusão direta com uma taxa de fluxo de 10 µl.min⁻¹, utilizando uma bomba (Harvard Apparatus). Espectros de massa foram adquiridos e acumulou mais de 60 espectros, sendo estes submetidos a varredura no intervalo entre 100 e 1000 m / z.

2.4.3. Descrição da metodologia para análise de antocianinas por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a arranjo de diodos (HPLC-PDA)

O método de CLAE para quantificação de antocianina foi baseado em Favaro (15), com algumas modificações. As análises foram conduzidas em um HPLC (Waters 2996) sistema equipado com um detector de arranjo de diodos (Waters 515), software Empower. A separação de antocianinas foi feita com uma coluna C18 (ODS2, comprimento = 25,0 cm, diâmetro interno = 4,6 mm, tamanho de partícula = 5 µm e tamanho de poro = 100 Å, Varian, Microsorb MV). A fase móvel utilizada foi água deionizada: acetonitrila: ácido fórmico (81:9:10 v/v/v). A eluição foi isocrática e em fase reversa, e o volume de vazão de fase móvel de 1,0 mL min⁻¹, o volume de injeção foi de 20 µL, o tempo de eluição de 40 min e a detecção feita em 520, 525 e 540 nm. O pico de identificação de cada antocianina foi com base na comparação do tempo de retenção relativo (TR), porcentagem área do pico, e os dados espectrais com os padrões de antocianina. Posteriormente, para os estudos de quantificação de ACYS individuais por HPLC foram utilizados 3 padrões de ACYS, cianidina-3-O-glicosídeo, cianidina-3-O-galactosídeo e delfinidina 3-O-glicosídeo adquiridos da empresa Extrasynthese. As curvas padrões para todas as antocianinas foram determinadas utilizando os padrões descritos acima utilizando as mesmas condições cromatográficas descritas acima.

Para a quantificação de antocianinas nas frutas, o liofilizado das cascas de jabuticaba foi extraído conforme o item 4.7.1, o extrato foi diluído, filtrado em filtros (0,45 µm) e aplicadas em cromatógrafo utilizando-se as mesmas condições cromatográficas utilizadas descritas.

2.5. Ensaios Biológicos - Administração de pó de casca de jabuticaba em ratos

2.5.1. Testes de cinética absorção de compostos fenólicos de pó liofilizado de casca jabuticaba utilizando as análises antioxidantes no plasma

Foram utilizados 35 ratos machos adultos da linhagem Wistar SPF, com peso médio de 242,05±8,29 g, procedentes do Centro Multidisciplinar para Investigação na Área de Ciência de Animais de Laboratório (CEMIB) da UNICAMP, distribuídos em 5 grupos de 7 animais cada, com administração de ração comercial durante os 7 primeiros dias para adaptação e posterior divisão dos grupos. Os animais foram mantidos durante todo o experimento em temperatura controlada (22 ± 2 °C), com períodos alternados de claro e escuro de 12 horas.

Após jejum de 24 h, conforme descrito por Suda et al. (16), os ratos foram pesados para cálculo da quantidade de pó de casca de jabuticabas a ser administrada. O pó casca de

jabuticaba foi dissolvido em água destilada em uma concentração tal que proporcionou ingestão de 7 mg de antocianinas/100 g de peso corpóreo. A solução aquosa foi administrada por gavagem. Para a determinação da cinética de absorção, cada grupo foi eutanasiado em 15, 30, 60 e 120 minutos após a administração da solução de pó liofilizado de casca de jabuticaba, por decapitação, sendo que o grupo controle recebeu água por gavagem. O plasma foi obtido pela centrifugação do sangue e armazenado em freezer ultra low (-80°C) para análises posteriores.

O experimento foi conduzido em conformidade com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal- CEE/Unicamp. Universidade Estadual de Campinas, Brasil (Protocolo n °1628-1).

2.5.2. Ensaios “*in vivo*” para estudo da atividade antioxidante de pó liofilizado de casca de jabuticaba

Para este ensaio, foram utilizados 32 ratos machos adultos, da linhagem Wistar SPF (peso individual de aproximadamente 250g), divididos em 4 grupos de 8 animais cada. Os animais foram mantidos em gaiolas individuais e receberam ração AIN – 93M (17), acrescida de pó de cascas de jabuticaba. Os grupos teste, com 8 animais cada, receberam dieta adicionada de 0, 10, 20 e 40 g de pó de cascas de jabuticaba/kg de dieta ,conforme pode ser verificado na Tabela 1. Quantidades suficientes de sacarose foram adicionadas às dietas para que os açúcares estivessem presentes na mesma concentração encontrada no pó liofilizado de casca de jabuticaba (Tabela 1)(18). Os grupos foram denominados de G0, o grupo controle, G1 o que recebeu 1%, G2 o que recebeu 2% e G4 o que recebeu 4% do pó liofilizado de casca de jabuticaba por kg de dieta. O grupo controle (8 animais) não teve adição do pó na dieta. O tratamento teve duração de 28 dias para todos os grupos. Os animais foram mantidos durante todo o experimento em temperatura controlada (22 ± 2 °C), com períodos alternados de claro e escuro de 12 horas.

Todos os animais foram pesados a cada 2 dias e a ração consumida foi quantificada .

Posteriormente, os animais foram eutanasiados por decapitação, o sangue foi coletado em tubos heparinizados e o plasma foi obtido por centrifugação. As amostras de plasma foram armazenadas em freezer ultra low para posteriores análises de atividade antioxidante.

O experimento foi conduzido em conformidade com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal- CEE/Unicamp, Universidade Estadual de Campinas, Brasil (Protocolo n °1627-1).

<Tabela 1>

2.6. Preparo do plasma para os ensaios antioxidantes

As amostras de plasma armazenadas a -70 °C foram descongeladas lentamente e agitadas em vórtex. Para este preparo, foi utilizada a metodologia proposta por Prior et al. (19), com algumas adaptações. Cinquenta microlitros de plasma foram transferidos para um ependorf, e adicionados de 100µL de etanol e 50µL de água destilada. Essa solução foi agitada por 30 seg. em vórtex e posteriormente foram adicionados 200 µL de ácido metafosfórico (0,75 mol.L⁻¹) . Novamente a mistura foi agitada por 30 seg. em vórtex e centrifugada por 5 minutos a 14000 rpm e 10 °C.

O sobrenadante foi removido e estocado a -70 ° para análise do radical ABTS. Para a análise de Orac, 80 µL do sobrenadante foram diluídos com 420 uL de tampão fosfato (0.075M) de pH 7,4.

2.7. Determinação da capacidade de seqüestrar radicais livres utilizando o método ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity)

O ensaio para determinação da capacidade antioxidante nas amostras foi realizado a partir do plasma preparado em microplacas. Para o ensaio, foram adicionados 20 µL da solução de plasma (com concentração final de 0.027 µL de plasma por µL de solução) 120 µL de fluoresceína em tampão fosfato de potássio (pH 7,4) na concentração final de 0,378 µg/mL (preparada a partir de uma solução estoque de 3,87 mg/mL) e 60 µL de AAPH (2,2'-azobis (2-methylpropionamidine) dihydrochloride, 108 mg. mL⁻¹, em água . A solução de AAPH foi

preparada minutos antes de ser colocada na placa. Para o branco, o extrato foi substituído por tampão fosfato de potássio. Como padrão foi utilizado Trolox em tampão fosfato de potássio (0,1; 1,0; 10; 25; 50; 80 e 100 μ M). Após a adição de todos os reagentes na placa, foi realizada a leitura da fluorescência, a cada 1 minuto, por 80 minutos. Foram utilizados os seguintes filtros: emissão 520 nm e excitação 485 nm. O extrato foi determinado em triplicata. As leituras da fluorescência foram utilizadas para os devidos cálculos (20).

2.8 Determinações da capacidade de seqüestrar radicais livres por ABTS

O teste foi realizado baseado nos autores Rufino et al. (21) e Le, Chiu e Ng (22) com modificações. Preparou-se uma solução catiônica de ABTS (2,2'-azinobis-3-etil-benzotiazolina-6-sulfonado), misturando 5 mL de solução de ABTS 7,0mM e 88 μ L da solução de persulfato de potássio 2,45mM. Esta reagiu por 12 horas, em temperatura ambiente e ausência de luz. Posteriormente, se adicionou água miliQ à solução até obter um valor de absorbância de 0,700 ($\pm$ 0,05) a 754nm em leitor de placa da marca Novostar BMG LABTECH. A determinação da absorbância das amostras foi realizada em temperatura ambiente, 23°C ($\pm$ 1), após 6 minutos de reação. Como padrão desse ensaio foi utilizado como antioxidante de referência o Trolox. . Para preparo da amostra, foi utilizada a solução de plasma (concentração final de 0.125 μ L de plasma por μ L de solução). Em uma microplaca transparente de 96 poços, foram adicionadas 250 μ L de solução de ABTS e 50 μ L da solução de plasma.

2.9. Análise dos resultados

No primeiro momento, fez-se a análise de variância para verificar a significância dos tratamentos para cada variável e em seguida aplicou-se a análise de regressão, por se tratar de uma variável quantitativa (concentração).

Realizou-se a análise de regressão para modelar a relação entre a variável analisada e a concentração da substância. Utilizou-se nível de significância de 5% para estimar os parâmetros do modelo das regressões. Para as variáveis analisadas optou-se pelo ajuste do modelo linear e do modelo quadrático, o critério de escolha entre os modelos foi o coeficiente de determinação (R^2) e se os parâmetros estimados eram significativos ou não. Os pacotes estatísticos Microsoft Excel (23) SAS (24) e Sisvar (25) foram utilizados.

3. Resultados e discussão

3.1 Determinações do percentual das frações (polpa/semente e casca), rendimento do pó liofilizado, determinação dos macronutrientes e identificação e quantificação de antocianinas

A porcentagem média de casca em relação ao fruto foi de $28.9\% \pm 4.92$, sendo que a porcentagem de polpa e sementes observada foi de $66.82\% \pm 4.92$. O peso médio do fruto foi de $5.63 \text{ g} \pm 1.00$, e o rendimento médio do processo de liofilização foi de 20.5% .

A determinação da composição centesimal de pó liofilizado de casca de jabuticaba encontra-se na Tabela 2. Observa-se pelos dados que o pó é constituído principalmente de açúcares e água, e em menores proporções, fibras e cinzas. Donadio (26) encontrou valores semelhantes para o fruto inteiro, sendo $3,4\%$ de cinzas, 4% de proteína bruta, e $4,52\%$ de fibra bruta. Os outros componentes, principalmente água e açúcares diferiram bastante, pois este autor trabalhou com o fruto inteiro e in natura.

<Tabela 2>

A análise cromatográfica das antocianinas da casca liofilizada de jabuticaba revelou a presença de dois compostos (Figura 1): delphinidina-3-glicosídeo e cianidina-3-glicosídeo, confirmadas pela comparação dos tempos de retenção com os de padrões autênticos e também pela cromatografia acoplada a espectrômetro de massas (LC-ESI-MS/MS Q-ToF) (Figura 2).

<Figura 1-2>

A Tabela 3 apresenta os resultados da quantificação de antocianinas de casca de jabuticaba encontradas nesse trabalho. O conteúdo de antocianinas totais quantificado por CLAE foi de $2599,3 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$ do pó liofilizado, sendo que a cianidina 3-glicosídeo (pico 2), foi a antocianina dominante ($75,6\%$ do total de antocianina) (Figura 6).

<Tabela 3>

3.2 Ganhos de peso

Considerando os animais que ingeriram ração experimental, não houve nenhuma diferença significativamente estatística entre a ingestão de ração de G0, G1, G2 e G4. Na Tabela 4, pode-se verificar a ingestão de antocianinas em mg/ 100 g de peso. As análises indicaram que o não houve nenhuma diferença no ganho de peso entre animais que não consumiram o pó e entre que consumiram as diferentes dietas. Além disso, não foi observada nenhuma diferença estatística no peso do fígado do grupo controle e dos grupos experimentais. O mesmo resultado foi encontrado também por Tsuda (27), que trabalharam com ratos alimentados com dietas adicionadas de Cyanidin 3-O- β -D-Glucoside purificada (95%), a mesma antocianina predominante na jabuticaba.

<Tabela 4>

3.3 Testes de cinética absorção de compostos fenólicos de pó liofilizado de casca jabuticaba utilizando as análises antioxidantes no plasma

3.3.1 Atividade anti-radical ABTS e ORAC

Não houve diferença significativa entre as concentrações aplicadas para a resposta das variáveis ABTS e ORAC, para nenhum dos tempos aplicados, 0, 15, 30, 60 e 120 minutos, considerando uma ingestão de 7 mg/ 100 g de peso do animal. Os parâmetros do modelo não apresentaram significância tanto no efeito linear quanto para o efeito quadrático. Suda et al.(28), trabalhando com absorção de antocianinas aciladas provenientes de batata doce roxa, encontrou um aumento de 1.5 vezes na atividade antioxidante plasmática de ratos, 30 minutos após a ingestão por gavagem de 14,63 mg of Pn 3-Cafâsop-5-glc equivalent/100 g de peso corporal. Neste caso, sugere-se que a dose não foi suficiente para se verificar efeito, ou o tempo deveria ser mais fragmentado para que esta diferença fosse verificada.

3.4 Ensaios “*in vivo*” para estudo da atividade antioxidante de pó liofilizado de casca de jabuticaba

3.4.1 Ensaio de ABTS

Os resultados da análise de ABTS do plasma dos ratos tratados com ração adicionada das cascas de jabuticaba em diferentes concentrações são apresentados na Figura 3. As estimativas dos parâmetros bem como o teste de hipótese associado, indicaram que o efeito linear e o intercepto devem compor o modelo selecionado para descrever o ABST.

De acordo com a Figura 3, pode-se perceber uma tendência quadrática crescente, ou seja, à medida que a concentração do pó de casca de jabuticaba liofilizada acrescido a dieta é aumentada, os níveis de ABTS aumentam até a dose ideal, a partir desse ponto os valores voltam a decrescer mesmo com os níveis de concentração aumentando. A dose ideal para esse tipo de estudo é de 23 g de casca de jabuticaba liofilizada por kg de dieta, o teor de TAC estimado é de 22,78 Eq trolox. μL^{-1} de acordo com o modelo ajustado. Neste caso, a capacidade antioxidante aumentou 1.7 vezes quando comparado ao grupo controle.

3.4.2 Ensaio de ORAC

O coeficiente de variação obtido foi consideravelmente satisfatório indicando uma boa precisão para o experimento. O valor de R^2 foi de 99,69 % sendo um indicativo de bom ajuste para o modelo selecionado, conforme pode ser verificado na Figura 4.

< Figura 4 >

Verificamos que há uma tendência quadrática no comportamento da resposta antioxidante em função da concentração de casca de jabuticabas liofilizadas nas dietas (significância de 0.05%)

A dose para se atingir máxima capacidade antioxidante foi de 2% (20 g de casca de jabuticaba liofilizada por kg de ração), com valor de ORAC plasmático estimado de 22,96 Eq trolox. μL^{-1} .

Neste caso, a capacidade antioxidante aumentou 1.3 vezes quando comparado ao grupo controle. Tsuda et al. (27) trabalhando com dieta de Cianidina 3-O- β -D-Glucoside

purificada para ratos, e utilizando a metodologia de peroxidação lipídica no plasma para análise de potencial antioxidante, conclui que o grupo alimentado com cianidina teve um aumento da resistência à oxidação no soro. Este estudo analisou também antioxidantes fisiológicos do plasma e as frações de colesterol e concluiu que a ação antioxidante da Cianidina 3-O- β -D-Glucoside purificada parece ser devido a um efeito antioxidante direto.

Mazza et al.(29), constataram a capacidade antioxidante aumentada em humanos após o consumo de uma refeição experimental rica em gordura e acrescida de pó liofilizado de blueberries, quando medida pelo ensaio ORAC, mas, este potencial não sofreu aumento quando medido por TEAC (Capacidade antioxidante equivalente a Trolox). Cao et al. (30) também encontraram um aumento da capacidade antioxidante plasmática pelo ensaio ORAC, ao avaliar seres humanos que ingeriram 10 porções de frutas e vegetais diariamente. O aumento de 3 vezes na capacidade antioxidante do plasma de humanos também foi ressaltada por Mertens-Talcott et al.(31) em trabalho realizado com polpa de açaí.

No estudo em que foi avaliada a capacidade antioxidante plasmática após consumo de suco de Blackberry com leite e com água, percebeu-se que em ambos os testes utilizados, DPPH e Orac, ocorreu um aumento na capacidade antioxidante. No entanto, pelo teste de Orac, quando comparados o tempo inicial e 4 h após consumo de suco de Blackberry com água, houve um aumento de 23% na capacidade antioxidante (3).

Hassiomotto et al. (2) trabalhando com metabolismo e atividade antioxidante de amora preta em ratos, relatou que apenas 0,11% do total de antocianina ingerido foi absorvido, porém, foi suficiente para aumentar a capacidade antioxidante do plasma avaliados pelo método de oxidação do ácido linoléico. O máximo valor de atividade antioxidante encontrado foi alcançado após 15 e 30 minutos da administração do extrato rico em antocianina, com 44 ± 5 e $40 \pm 5\%$ de inibição, respectivamente, correspondente ao valor mais elevado de concentração cianidina total no plasma. Depois 1 a 4 horas de administração, a capacidade antioxidante do plasma diminuiu, mas era ainda maior ($\pm 30\%$) do que o nível basal ($-3,8\% \pm 1,2\%$). Suda et al. (16), também avaliando atividade antioxidante, porém em ratos que receberam extrato concentrado de batata doce roxa, encontraram um aumento do potencial antioxidante plasmático (1.5 vezes maior), após 30 minutos decorridos da administração. Esse aumento foi diretamente relacionado com as antocianinas identificadas no plasma.

Walton et al. (1), trabalhando com pó concentrado de antocianina (32.9% de pureza) em porcos, obtiveram um resultado diferente do encontrado nos outros estudos, pois a atividade antioxidante foi observada apenas para o teste de FRAP e não para o teste de Orac, diferente do que foi observado no presente estudo.

Nos dois ensaios antioxidantes, ABTS e ORAC, o grupo que recebeu uma concentração de 4% de casca liofilizada por quilo de dieta, não apresentou nenhum efeito antioxidante no plasma, assim, conclui-se que os compostos fenólicos podem inibir os processos da oxidação em certos sistemas, mas isso não significa que eles possam proteger as células e os tecidos de todos os tipos de danos oxidativos. Esses compostos podem apresentar atividade pró-oxidante em determinadas condições (32). As células humanas geralmente encontram-se em estado reduzido, mas algum grau de oxidação localizada é necessário para funções importantes, de forma que a sobrecarga de compostos redutores pode influir negativamente em suas funções normais. Um excesso de antioxidantes redutores pode acarretar inibição da proliferação celular, por prevenir o estado transitório de oxidação e diminuir a adaptação ao estresse oxidativo. Pode ainda reduzir metais de transição livres que se tornam potentes catalisadores de reações em cadeia iniciadas por radicais livres Cerqueira (33).

4. Conclusão

Nesse estudo evidenciou-se o aumento significativo ($p = 0.05$) no potencial antioxidante de plasma de ratos tratados com casca de jabuticabas. Os resultados levam a crer que excesso da ingestão de antocianinas de casca de jabuticaba podem levar a decréscimo da atividade antioxidante, o que pode sugerir que a ingestão de antocianinas pode ter um valor ótimo para indivíduos saudáveis.

Agradecimento

Ao suporte financeiro do CNPq (número de processo 133001/2008-3).

Referências

1. Walton, M.C.; Lentle, R.G.; Reynolds, G.W.; Kruger, M.C.; Mcghee, T.K. . Anthocyanin Absorption and Antioxidant Status in Pigs. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, 54, 7940-7946.
2. Hassimotto, N.M.A.; Genovese, M.I.; Lajolo, F.M. Absorption and metabolism of cyanidin-3-glucoside and cyanidin-3-rutinoside extracted from wild mulberry (*Morus nigra* L.) in rats. *Nutrition Research.* **2008**, 28, 198–207.
3. Hassimotto, N.M.; Pinto, M. da S.; Lajolo, F.L. Antioxidant status in humans after consumption of blackberry (*Rubus fruticosus* L.) juices with and without defatted milk. *J. Agric. Food Chem.*, **2008**, 56, 24, 11727-11733.
4. Haytowitz, D.B.; Bhagwat, S.A.; Prior, R.L.; Wu, X.; Gebhardt, S.E.; Holden, J.M. Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) of Selected Food ". **2007**, NDL Home Page. Available: <http://www.ars.usda.gov/nutrientdata>
5. Dávalos, A, Gómez-Cordovés, C, Bartolomé B. Extending Applicability of the Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC-Fluorescein) Assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* **2004**, 52, 48 -54.
6. Prior, R.L.; Hoang, H.; Gu, L.; Wu, X.; Bacchiocca, M.; Howard, L.; Hampsch-Woodill, M.; Huang, D.; Ou, B.; Jacob, R. Assays for Hydrophilic and Lipophilic Antioxidant Capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORACFL)) of Plasma and Other Biological and Food Samples. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, 51, 3273-3279.
7. Huang, D.; Ou, B.; Prior, R.L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, 53, 1841-1856.

8. Soares, M, Welter,L, Kuskoski, EM, Gonzaga,L, Fett, R. Compostos fenólicos e atividade antioxidante da casca de uvas niágara e Isabel. *Revista Brasileira de Fruticultura*. **2008**, 30, 059-064.
9. Kalt, W, Blumberg, JB, Mcdonald, JE, Vinqvist-Tymchuk,MR, Fillmore,SAE,.Graf,BA, O'leary,JM, Milbury,PE. Identification of anthocyanins in the liver, eye, and brain of blueberry-fed pigs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2008**, 56, 705-712.
10. AOAC. Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists. **1975**, 12^aed.Washington: AOAC. Pp1094.
11. Instituto Adolfo Lutz. Normas analíticas do instituto Adolfo Lutz. **1985**, 3a ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 1.
12. Bligh, EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and Purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*. **1959**, 37, 911-917.
13. Lane, H, Eynon, L. Determination of reducing sugar by means of Fehling's solution with methylene blue as internal indicator. *Journal of the Society of Chemistry Industry*. **1923**, 42, 32T-37T.
14. Wu,X.; Gu,L.; Prior, R.L.; McKay, S. Characterization of Anthocyanins and Proanthocyanidins in Some Cultivars of *Ribes*, *Aronia*, and *Sambucus* and Their Antioxidant Capacity. *J. Agric. Food Chem.***2004**, 52, 7846-7856.
15. Favaro, M.M.A. Extração, estabilidade e quantificação de antocianinas de frutas típicas brasileiras para aplicação industrial como corantes. Campinas: Tese- Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas. **2007**,1-105.

16. Suda, I.; Oki, T.; Masuda, M.; Nishiba, Y.; Furuta, S.; Matsugano, K.; Sugita, K.; Terahara, N. Direct Absorption of Acylated Anthocyanin in Purple-Fleshed Sweet Potato into Rats *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 1672-1676.
17. Reeves, P. G.; Nielson, F. H.; Fahey Jr, G. C. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J. Nutr.* **1993**, *123*, 1939-1951.
18. Kalt, W.; Blumberg, J.B.; McDonald, J.E.; Vinqvist-Tymchuk, M.R.; Fillmore, S.A.E.; Graf, B.A.; O'leary, J.M.; Milbury, P.E. Identification of Anthocyanins in the Liver, Eye, and Brain of Blueberry-Fed Pigs. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 705-712.
19. Prior, R. L.; Hoang, H.; Gu, L.; Wu, X.; Bacchiocca, M.; Howard, L.; Hampsch-Woodill, M.; Huang, D.; Ou, B.; Jacob, R. Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORACFL)) of plasma and other biological and food samples. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 3273-3279.
20. Dávalos, A.; Gómez-Cordovés, C.; Bartolomé, B. Extending Applicability of the Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC-Fluorescein) Assay. *J. Agric. Food Chem.*, **2004**, *52*, 48 - 54.
21. Rufino, M.S.M.; Alves, R.E.; Brito, E.S.de; Pérez-Jiménez, J.; Saura-Calixto, F.D.; Mancini-Filho, J. Bioactive compounds and antioxidant capacities of eighteen non-traditional tropical fruits from Brazil. *Food Chemistry*. **2010**. doi: 10.1016/j.foodchem.2010.01.037.
22. Le, K.; Chiu, F.; Ng, K. Identification and quantification of antioxidants in *Fructus lycii*. *Food Chemistry*. **2007**, *105*, 353-363.
23. Microsoft .Excel 2007, version 12.0: Microsoft Corporation, **2007**.
24. SAS INSTITUTE. SAS System: SAS/STAT version 9.1 (software). Cary, **2003**.

25. FERREIRA, D. F. Análise estatística por meio do SISVAR (Sistema para Análise de Variância) para Windows versão 4.0. In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45., São Carlos. Anais... São Carlos: UFSCar, **2000**, 255-258.

26. Donadio, L.C. Jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba* (Vell.)Berg. Jaboticabal: FUNEP. **2000**, Pp.55.

27. Tsuda, T.; Horio, F.; Osawa, T. Dietary cyanidin 3-O- β -D-glucoside increases ex vivo oxidation resistance of serum in rats. *Lipids*.**1998**, 33, 583-588.

28. Suda,I.; OKI,T.; Masuda, M.; Nishiba, Y.; Furuta, S.; Matsugano, K.; Sugita, K.; Terahara, N. Direct absorption of acylated anthocyanin in purple-fleshed sweet potato into rats. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, 50, 1672-1676.

29. Mazza,G.; Kay, C.D.; Cottrell, T.; Holub, B.J. . Absorption of anthocyanins from blueberries and serum antioxidant status in human subjects.*J. Agric. Food Chem.* **2002**, 50, 7731-7737.

30. Cao, G.;Booth, S.L.;Sadowski, J.A.;Prior, R.L. Increases in human plasma antioxidant capacity after consumption of controlled diets high in fruit and vegetables. *Am J Clin Nutr.***1998**, 68, 1081–1087.

31. Mertens-Talcott,S.U.; Rios, J.;Jilma-Stohlawetz,P.;Pacheco-Palencia, L.A.; Meibohm,B.; Talcott,S.T.; Derendorf, H. Pharmacokinetics of anthocyanins and antioxidant effects after the consumption of anthocyanin-rich açai juice and pulp (*Euterpe oleracea* Mart.) in human healthy volunteers. *J. Agric. Food Chem.***2008**, 56, 7796-7802.

32. Decker, E.A. Phenolics: prooxidants or antioxidants? *Nutrition Reviews.***1997**, 55, 396-407.

33. Cerqueira, F.M.; Marisa Helena Gennari de Medeiros,M.H.G. de M.; Augusto, O. Antioxidantes dietéticos: controvérsias e perspectivas. *Quim. Nova*, **2007**, 30, 441-449.

Tabela 1

Composição da dieta experimental

Ingredientes	quantidade, g/kg de dieta			
	0	10	20	40
pó liofilizado de casca de jabuticaba	0	10	20	40
Amido	465,7	465,7	465,7	465,7
Dextrina	155	155	155	155
Caseína	142	142	142	142
sacarose	100	93,1	86,2	72,4
Fibra	50	50	50	50
óleo de soja	40	40	40	40
mix mineral	35	35	35	35
mix vitamínico	10	10	10	10
L-cistina	1,8	1,8	1,8	1,8
bitartarato de colina	2,5	2,5	2,5	2,5
terc butil	0,008	0,008	0,008	0,008

Dieta elaborada de acordo com a metodologia (17) com algumas adaptações para a utilização do pó de casca de jabuticaba liofilizada.

Tabela 2

Composição centesimal do pó liofilizado de casca de jabuticaba

Componentes (%m.m ⁻¹)	Teor (%)	DP
Água	22,72	0,23
Lipídeos	1,27	0,07
Cinzas	3,01	0,07
Proteína bruta	3,90	0,12
Fibra Bruta	6,45	0,28
Acúcares redutores	40,95	0,57
Acúcares redutores totais	59,04	0,99
Sacarose	17,18	Nd

Figura 1

Cromatograma obtido a partir do extrato do pó liofilizado de casca de jabuticaba. Condições cromatográficas: coluna C18; fase móvel água deionizada: acetonitrila:ácido fórmico 81:9:10 (v/v/v); volume de injeção 20 µL e detecção espectrofotométrica em 520, 525 e 540 nm. Consulte a Figura 7 para a identificação de cada pico.

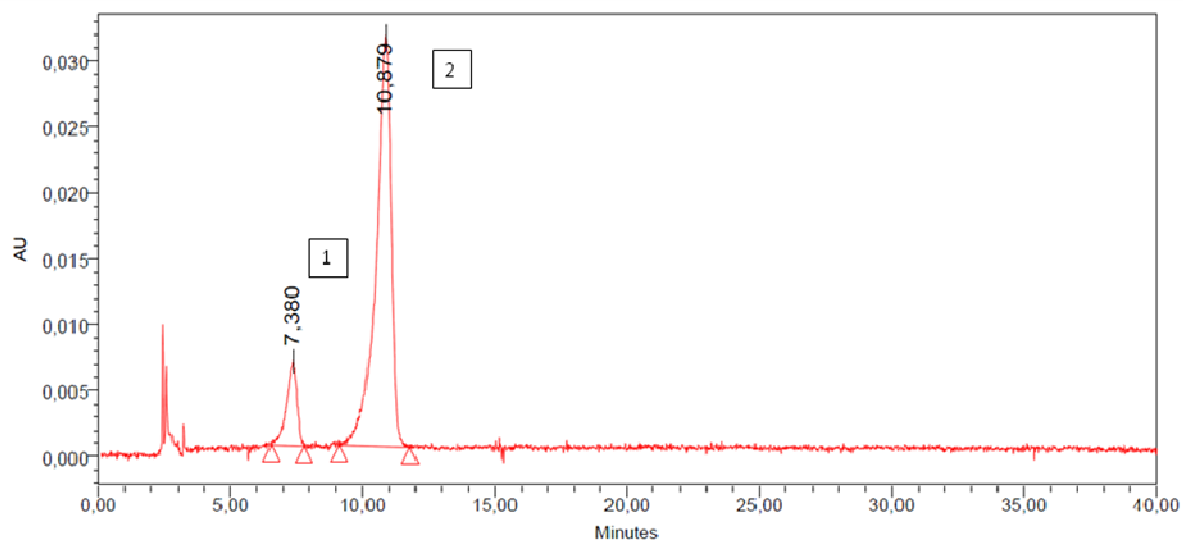


Figura 2 Espectros de massas (MS/MS), para identificação de antocianinas em pó liofilizado de casca de jabuticaba

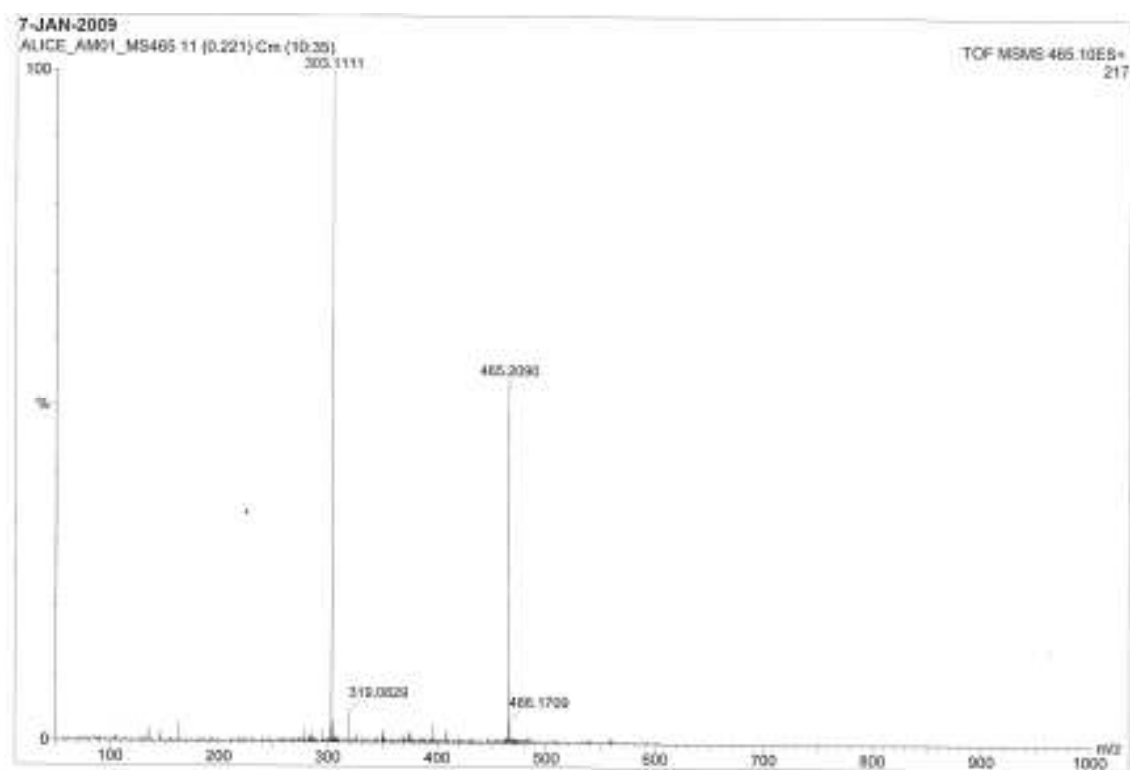
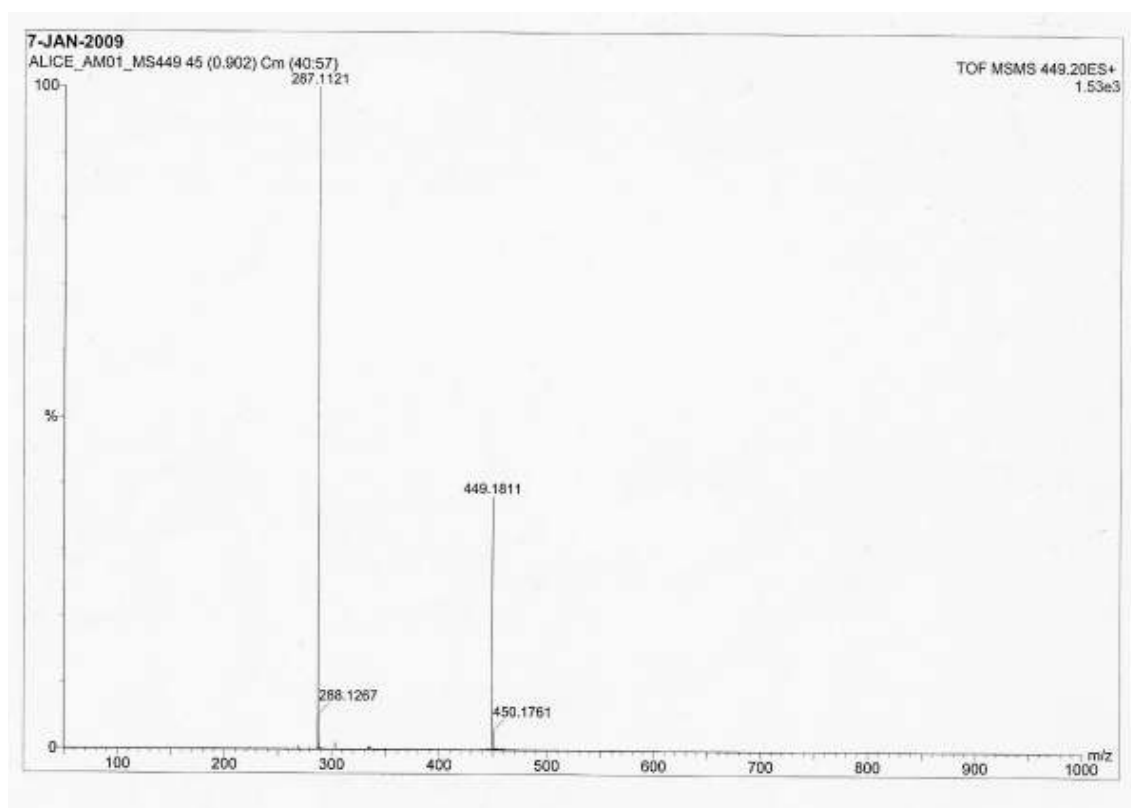


Tabela 3. Identificação de antocianinas em casca de jabuticaba.

pico	tR (min)	[M] ⁺ (m/z)	MS/MS (m/z)	antocianina	mg.100 g ⁻¹ de peso	
					seco	fresco
1	7,38	465	303	delfinidina 3-O-glicosídeo	635,3	130,2
2	10,879	449	287	cianidina 3-O-glicosídeo	1964	402,6
total					2599,3	532,9

Tabela 4. Ingestão de dieta e antocianinas.

grupos	Ingestão de dieta		Ingestão de casca de jabuticaba		Ingestão de antocianinas	
	g/dia	DP	mg/dia	DP	mg/100 g de peso corpóreo	DP
GO	21,2	1,4	0	0	0	0
G1	21,4	1,1	214	11	1,57	0,13
G2	22,8	1,5	456	30	3,36	0,13
G3	22,1	1,6	884	63	6,53	0,35

Figura 3

Relação entre as concentrações do pó de casca de jabuticaba liofilizada na dieta e a resposta antioxidante pelo ensaio de ASTS

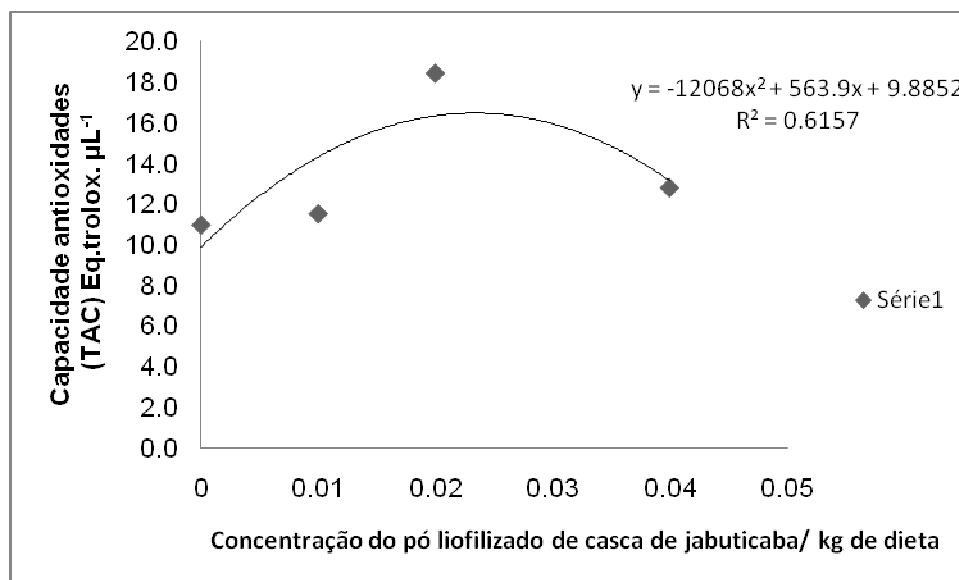
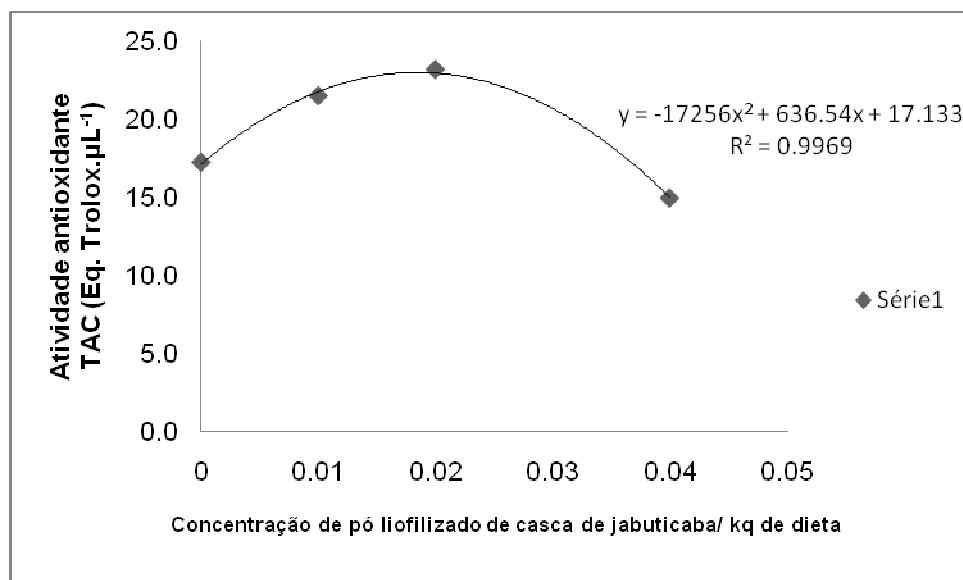


Figura 4

Relação entre as concentrações do pó de casca de jabuticaba liofilizada na dieta e a resposta antioxidante pelo ensaio de Orac





CEEA/Unicamp

Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEA/Unicamp

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 1628-1, sobre "Avaliação do metabolismo e da capacidade antioxidante de antocianinas de jabuticaba (*Myrciaria cauliflora*) em ratos. Estudo da absorção de antocianinas.", sob a responsabilidade de Prof. Dr. Mário Roberto Maróstica Júnior / Alice Vieira Leite, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal – CEEA/Unicamp em .

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 1628-1, entitled "Assessment of metabolism and antioxidant capacity of anthocyanins of jabuticaba (*Myrciaria cauliflora*) in rats. Study of absorption of anthocyanins.", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - Unicamp) on .

Campinas, 25 de setembro de 2008.



Prof. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente



Fátima Alonso
Secretária Executiva

CEEA – Unicamp
Caixa Postal 8109
13083-970 Campinas, SP – Brasil

Telefone: (19) 3521-6359
E-mail: com/et@unicamp.br
<http://www.cb.unicamp.br/ceea/>



CEEA/Unicamp

Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEA/Unicamp

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 1627-1, sobre "Avaliação do metabolismo e da capacidade antioxidante de antocianinas de jabuticaba (*Myrciaria cauliflora*) em ratos", sob a responsabilidade de Prof. Dr. Mário Roberto Maróstica Júnior / Alice Vieira Leite, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal – CEEA/Unicamp em .

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 1627-1, entitled "Assessment of metabolism and antioxidant capacity of anthocyanins of jabuticaba (*Myrciaria cauliflora*) in rats", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - Unicamp) on .

Campinas, 25 de setembro de 2008.



Prof. Dra. Ana Maria A. Guarnido
Presidente



Fátima Alonso
Secretária Executiva

CEEA – Unicamp
Caixa Postal 6109
13063-970 Campinas, SP – Brasil

Telefone: (19) 3521-6359
E-mail: comae@unicamp.br
<http://www.fb.unicamp.br/ceea/>

Capítulo 4

Diminuição da glicose sanguínea, colesterol total e do LDL-colesterol pela adição da casca de jabuticaba (*Myrciaria jaboticaba* (Vell.) Berg) liofilizada à dieta de ratos Wistar adultos

(Artigo em fase de preparação para envio a revista Journal of Food Chemistry)

Alice Vieira Leite^{a*}, Maria Francesca Riccio^b, Marcos Nogueira Eberlin^b, Gláucia Maria Pastore^a, Mário Roberto Maróstica Júnior^a

^aSchool of Food Engineering, University of Campinas-UNICAMP, P.O. Box 6121, 13083-862 Campinas-SP, Brazil

^bThoMSon Mass Spectrometry Laboratory, Institute of Chemistry, University of Campinas - UNICAMP, 13083-970 Campinas, SP, Brazil

*alicevleite@gmail.com

Resumo

Investigou-se o efeito da casca de jabuticaba liofilizada sobre as concentrações plasmáticas de glicose, frações lipídicas, aspartato aminotransferase e alanina aminotransferase em ratos Wistar machos adultos. Os animais distribuídos nos grupos G0, grupo controle, G1, G2 e G4 os grupos que receberam 1, 2 e 4%, respectivamente, do pó liofilizado de casca de jabuticaba adicionada à dieta AIN-93M. A suplementação reduziu as concentrações de glicose nos grupos G1 e G2, porém no grupo G4 esse efeito não foi encontrado. O colesterol total sofreu redução para os animais tratados com 1% de cascas de jabuticabas em relação ao grupo controle, mas os animais tratados com 2 e 4% de casca de jabuticaba sofreram aumento no colesterol total e da fração LDL-colesterol; porém, o valor para colesterol total apresenta-se dentro da faixa normal para ratos Wistar. Os triacilgliceróis e a fração HDL-colesterol não sofreram alterações significativas. Os resultados indicam um possível benefício da suplementação da casca de jabuticaba na redução da glicemia plasmática, dos níveis de LDL e colesterol total e a possível existência de uma dose recomendada.

KEYWORDS: Anthocyanins; antioxidant; jabuticaba; *Myrciaria jaboticaba* (Vell.) berg; plasma lipids, glucose.

1. Introdução

A ingestão de uma dieta rica em antioxidantes e com pouca quantidade de gorduras pode reduzir o risco de obesidade e resistência à insulina. Um número de relatórios recentes indicam que o consumo de frutas e verduras, especialmente aqueles ricos em polifenóis, pode auxiliar na diminuição da incidência de diabetes tipo 2, uma condição associada com a resistência à insulina. Dessa forma, defende-se que o consumo de alimentos com determinadas propriedades poderia auxiliar de forma geral na manutenção da saúde, atuando na regulação, por exemplo, dos níveis de glicose no sangue e influenciar na produção de insulina. Porém, existem poucas evidências clínicas de que os alimentos podem fazer isso. No entanto, estudos demonstram que os antioxidantes, incluindo antocianinas, protegem as células β pancreáticas do estresse oxidativo (Ghosh e Konishi, 2007). Recentemente Jayaprakasam, Vareed, Olson e Nair (2005), verificaram, em estudo *in vitro* com cultura de células pancreáticas, que a cianidina-3-glicosídeo e a delphinidina-3-glicosídeo foram as antocianinas mais eficazes no aumento da secreção de insulina. Zhang, Jayaprakasam, Seeram, Olson, Dewitt e Nair (2004) também relataram no estudo com casca de uva, um aumento da secreção de insulina, sugerindo que o consumo de uva pode contribuir para a redução da incidência de diabetes tipo 2.

As antocianinas (das palavras gregas *anthos*, flor e *kianos*, azul) são pigmentos vegetais responsáveis pela maioria das cores azul, roxa e a maioria das tonalidades de vermelho encontradas em flores, frutos, algumas folhas, caules e raízes de plantas (Markakis, 1982). São compostos solúveis em água e altamente instáveis em temperaturas elevadas (Shahidi e Nacz, 1995) e pertencem à classe mais comum de compostos fenólicos, conhecidos coletivamente como flavonóides, com mais de 8000 flavonóides e 500 estruturas de antocianinas relatadas no ano 2000 (Pietta, 2000). Durante as duas últimas décadas diversos estudos investigaram efeitos protetores provocados pelos compostos fenólicos presentes em várias frutas e legumes. Estes efeitos incluem ação antioxidante, anti-alérgica, anti-inflamatória, anti-viral, anti-proliferativa, anti-mutagênica, anti-microbiana, anti-cancerígena, proteção de danos cardiovasculares e alergia, melhora da microcirculação periférica, prevenção da fragilidade capilar, a prevenção de diabetes (Ghosh et al., 2007).

Em contrapartida, o aumento na formação de radicais livres pode desempenhar um papel importante na carcinogênese, aterosclerose, diabetes, enfisema, cataratas e outras doenças degenerativas. Este aumento de radicais são detectados na maioria dessas patologias. No entanto, em muitos casos, não é fácil para diferenciar se este aumento de radicais é a causa ou consequência da doença. Os radicais livres são mediadores, disparadores ou executores dos mecanismos essenciais de proteção, tais como apoptose, fagocitose e reações de desintoxicação. Entre estes mecanismos, apoptose, que elimina células pré-cancerosas e cancerígenas e células danificadas por vírus (Salganick, 2001).

Assim, existem evidências recentes de que certo nível destas espécies é imprescindível para muitas funções fisiológicas. Por exemplo, o enovelamento de proteínas nascentes no retículo endoplasmático ocorre em um meio mais oxidante que o restante da célula para a formação de pontes dissulfeto. Também, muitos genes são transcritos após oxidação transitória e baixas concentrações de alguns oxidantes estimulam a proliferação celular. Questiona-se até que ponto as estratégias de aumento de defesas antioxidantes por meio de nutrientes seriam benéficas, considerando-se que o excesso consumido poderá, ao longo da evolução, remover a pressão que modela sistemas endógenos, levando a uma sub-regulação ou não expressão de genes envolvidos com a defesa antioxidante endógena (Cerqueira, Medeiros e Augusto, 2007).

Deste modo, as antocianinas parecem estar envolvidas em muitas atividades biológicas que podem impactar positivamente ou negativamente (quando em excesso) na saúde e estas ações podem ser mediadas por suas atividades antioxidantes e /ou ações moduladoras nas células. A maioria dos estudos utiliza modelos "*in vitro*". Os modelos "*in vitro*" são vantajosos por serem mais rápidos e baratos em relação aos modelos "*in vivo*"; entretanto, os últimos podem oferecer vantagens em relação aos primeiros para avaliação de componentes alimentares, como estudo da absorção, metabolismo e outros efeitos fisiológicos de forma mais confiável. Sendo assim, para compreender melhor as propriedades das antocianinas e seus efeitos sobre a saúde, é necessário que se façam mais investigações sobre a absorção e metabolismo desses compostos fenólicos (Felgines, et al. 2008).

De forma geral, poucos estudos têm sido publicados utilizando a jabuticaba, assim, o presente trabalho teve como objetivos investigar se a adição de casca de jabuticaba liofilizada à dieta nas proporções de 1, 2 e 4%, poderia resultar em efeitos nos níveis séricos de glicemia, colesterol total, LDL-colesterol, HDL-colesterol, alanina aminotransferase, aspartato aminotransferase e propor uma dosagem ideal a ser administrada em ratos adultos saudáveis.

2. Material e Métodos

2.1. Preparo das cascas de jabuticabas liofilizadas

Os frutos de jabuticaba (*Myrciaria jaboticaba* (Vell.) Berg) foram adquiridos de um mercado local de Campinas durante a safra de setembro de 2008. Os frutos foram lavados e despulpados manualmente, as cascas foram congeladas a -18°C (Soares, Welter, Kuskoski, Gonzaga, Fett, 2008) em pacotes de 500 gramas. As cascas previamente congeladas a -18°C foram liofilizadas em liofilizador Liobras a 30°C e 300 µHg por 95 h. A produção do liofilizado foi feita pela trituração da casca em processador industrial Sire Cutter, e posteriormente em Micro Moinho (Marconi) (Kalt et al., 2008). O produto liofilizado (um pó de casca de jabuticaba) foi armazenado a -80°C.

2.2. Determinação dos macronutrientes

O teor de proteína foi determinado por Kjeldahl (AOAC, 1975), de umidade e cinzas pelo método do Instituto Adolfo Lutz (1985) e lipídios por Bligh & Dyer (1959) açúcares totais pelo método de Lane & Eynon (1923).

2.3. Extração de antocianinas para identificação por Espectrometria de Massas e quantificação por CLAE (Cromatografia líquida de alta eficiência)

2.3.1. Descrição da metodologia de preparo das amostras de jabuticaba para análise de antocianinas

Um grama da casca de jabuticaba liofilizada foi pesado e colocado em um tubo de centrífuga. A amostra foi extraída com 15 mL de metanol / água / ácido acético (85:15:0.5, v / v, MeOH). A amostra foi então agitada em vórtex por 30 segundos e mantido em ultrassom 5 min. O tubo foi agitado e mantido em temperatura ambiente por 10 minutos, sendo agitado em

vórtex durante 30 s após 5 min. O tubo foi então centrifugado a 4550g por 10 min e o sobrenadante removido. A amostra foi extraída uma mais vez com 10 mL de MeOH/H₂O/AcAc utilizando o mesmo procedimento, e os sobrenadantes foram combinados. A solução foi filtrada em filtro Teflon de 0,22 µm (Wu, Gu, Prior, McKay, 2004).

2.3.2. Descrição da metodologia para análise de antocianinas por espectrometria de massas

A identificação de antocianinas de casca de jabuticaba foi realizada a partir do extrato supracitado. Cinco microlitros do extrato foram diluídos em 995µl de metanol: H₂O (1:1) e 0,1% de ácido fórmico. For ESI, a Q-TOFmas spectrometer (Micromass, Manchester, Reino Unido) was used. The general condicions were: source temperature of 100 ° C, capillary voltage of kV and cone voltage of 35 V. The measurements were performed by direct infusion with a flow rate of 10 µl¹min., using a syringe pump, (Harvard Apparatus). Mass spectra were acquired and accumulated over 60 s and spectra was scanned in the range between 100 e 1000 m/z.

2.3.3. Descrição da metodologia para análise de antocianinas por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a arranjo de diodos (HPLC-PDA)

O método de CLAE para quantificação de antocianina foi baseado em Favaro (2007), com algumas modificações. As análises foram conduzidas em um HPLC (Waters 2996) equipado com um detector de arranjo de diodos (Waters 515), software Empower. A separação de antocianinas foi feita com uma coluna C18 (ODS2, comprimento = 25,0 cm, diâmetro interno = 4,6 mm, tamanho de partícula = 5 µm e tamanho de poro = 100 Å, Varian, Microsorb MV). A fase móvel utilizada foi água deionizada: acetonitrila: ácido fórmico (81:9:10 v/v/v) . A eluição foi isocrática e em fase reversa, e o volume de vazão de fase móvel de 1, 0 m L min⁻¹, o volume de injeção foi de 20 µL, o tempo de eluição de 40 min e a detecção feita em 520, 525 e 540 nm. O pico de identificação de cada antocianina foi com base na comparação do tempo de retenção relativo (TR), porcentagem área do pico, e os dados espectrais com os padrões de antocianina. Posteriormente, para os estudos de quantificação de ACYS individuais por HPLC foram utilizados 3 padrões de ACYS, cianidina-3-O-glicosídeo, cianidina-3-O-galactosídeo e delfinidina-3-O-glicosídeo (Extrasynthese). As curvas padrões para todas as antocianinas

foram determinadas utilizando os padrões descritos acima utilizando as mesmas condições cromatográficas descritas acima.

Para a quantificação de antocianinas nas frutas, o liofilizado das cascas de jabuticaba foi extraído conforme o item 4.7.1, o extrato foi diluído, filtrado (filtros de 0,45 µm) e aplicadas em cromatógrafo líquido utilizando-se as mesmas condições cromatográficas utilizadas descritas.

2.4. Ensaios Biológicos - Administração da casca de jabuticaba em ratos

2.4.1 Ensaios “*in vivo*” para estudo da atividade antioxidante da casca de jabuticaba

Para este ensaio, foram utilizados 32 ratos machos adultos, da linhagem Wistar SPF (peso individual de 242,05±8,29 g), divididos em 4 grupos de 8 animais cada. Os animais foram mantidos em gaiolas individuais e receberam ração AIN - 93G (Reeves, Nielson, Fahey Jr, 1993) acrescida das cascas de jabuticaba liofilizadas. Os grupos teste, com 8 animais cada, receberam dieta adicionada de 0, 10, 20 e 40 g de cascas de jabuticaba/kg de dieta, conforme pode ser verificado na Tabela 1. Quantidades suficientes de sacarose foram adicionadas às dietas para que os açúcares estivessem presentes na mesma concentração encontrada no pó liofilizado de casca de jabuticaba (Tabela 1) (Kalt et al., 2008). Os grupos foram denominados de G0, o grupo controle, G1 o que recebeu 1%, G2 o que recebeu 2% e G4 o que recebeu 4% do pó liofilizado de casca de jabuticaba por kg de dieta. O grupo controle (8 animais) não teve adição de jabuticaba na dieta. O tratamento teve duração de 28 dias para todos os grupos. Os animais foram mantidos durante todo o experimento em temperatura controlada (22 ± 2 °C), com períodos alternados de claro e escuro de 12 horas. Todos os animais foram pesados a cada 2 dias e a ração consumida foi quantificada por meio de pesagens. Posteriormente, os animais foram mortos por decapitação, o sangue foi coletado em tubos heparinizados e o plasma foi obtido por centrifugação. As amostras de plasma foram armazenadas em freezer ultra low para posteriores análises de atividade antioxidante.

O experimento foi conduzido em conformidade com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA)

tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal- CEE/Unicamp, Universidade Estadual de Campinas, Brasil (Protocolo n°1627-1).

<Tabela 1>

2.5 Análises sanguíneas

2.5.1 Glicose sérica

A concentração de glicose sérica foi determinada através de método enzimático glicose oxidase-peroxidase, utilizando kit comercial Laborlab (n°02200), conforme descrição do fabricante.

2.5.2 Lipídeos séricos

As determinações dos lipídeos séricos foram realizadas utilizando métodos enzimáticos colorimétricos, utilizando para a quantificação de triacilgliceróis o kit comercial Laborlab n°02700. Para colesterol total, foi utilizado o método enzimático, colesterol oxidase, colorimétrico e de ponto final utilizando o kit comercial Laborlab n°01400, para HDL-colesterol foram utilizados os kits comerciais de colesterol total, conforme descrito acima e HDL Colesterol precipitante, que emprega a precipitação com heparina/Mn⁺⁺, utilizado também o kit comercial Laborlab n°0230. Para LDL-colesterol foram utilizados os kits comerciais de colesterol total, conforme descrito acima e LDL-colesterol precipitante Winer lab., que utiliza um método de precipitação, seguido por um sistema enzimático colesterol oxidase/peroxidase com colorimetria.

2.5.3 ALT (Alanina aminotransferase) e AST (Aspartato aminotransferase)

Para a análise de ALT e AST foi utilizado um método cinético. As leituras foram feitas em espectrofotômetro nos tempos 0, 1, 2, e 3 minutos, utilizando o kit comercial Laborlab n°00200 para ALT e n°00300 para AST.

2.6. Análise dos resultados

Análise de variância foi realizada para verificar a significância dos tratamentos para

cada variável e em seguida aplicou-se a análise de regressão, por se tratar de uma variável quantitativa (concentração). Realizou-se a análise de regressão para modelar a relação entre a variável analisada e a concentração da substância. Utilizou-se nível de significância de 5% para estimar os parâmetros do modelo das regressões. Para as variáveis analisadas optou-se pelo ajuste do modelo linear e do modelo quadrático, o critério de escolha entre os modelos foi o coeficiente de determinação (R^2) e se os parâmetros estimados eram significativos ou não. Os pacotes estatísticos Microsoft Excel, SAS e Sisvar foram utilizados.

3. Resultados e discussão

3.1 Identificação e quantificação de antocianinas no pó de casca de jabuticaba liofilizada

A determinação da composição centesimal da casca de jabuticaba liofilizada é mostrada encontra-se na Tabela 2. Observa-se que a casca é constituída principalmente de açúcares e água, e em menores proporções, fibras e cinzas. Donadio (2000) encontrou valores semelhantes para o fruto inteiro, sendo 3,4% de cinzas, 4% de proteína bruta, e 4,52% de fibra bruta. Os outros componentes, principalmente água e açúcares diferiram bastante, pois este autor trabalhou com o fruto inteiro e *in natura*.

<Tabela 2>

A análise cromatográfica das antocianinas da casca liofilizada de jabuticaba revelou a presença de dois compostos: delphinidina-3-glicosídeo e cianidina-3-glicosídeo, confirmadas pela comparação dos tempos de retenção com os de padrões autênticos e também pela cromatografia acoplada a espectrômetro de massas (LC-ESI-MS/MS Q-ToF). O conteúdo de antocianinas totais quantificado por CLAE foi de 2599,3 mg.100g⁻¹ do pó liofilizado, sendo 1964 mg de cianidina-3-glicosídeo e 633.3 mg de delphinidina-3-glicosídeo.

3.2 Ganho de peso

Considerando os animais que ingeriram ração experimental, não houve nenhuma diferença significativamente estatística entre a ingestão de ração de G0, G1, G2 e G4. Na Tabela 3, pode-se verificar a ingestão de antocianinas em mg/100 g de peso. As análises

indicaram que o não houve nenhuma diferença no ganho de peso entre animais que não consumiram o pó e entre que consumiram as diferentes dietas. Alarcon-Aguilar et al. (2007) observaram em seu estudo uma supressão do peso corporal em animais (obesos e saudáveis) que consumiram 33,64 mg/kg/dia de antocianinas por 60 dias, porém esta redução (9.6%) só foi significativa para o grupo que recebeu dieta hiperlipídica. No presente estudo, a ingestão de antocianinas no grupo G2 também foi de 33,6 mg/kg/dia, porém como os animais eram saudáveis e as dietas normolipídicas (AIN-93M), o efeito no peso não foi significativo, resultado semelhante ao encontrado no estudo supracitado. Não foi observada nenhuma diferença estatística no peso do fígado do grupo controle e dos grupos experimentais. O mesmo foi encontrado também por Tsuda, Horio e Osawa (1998), que trabalharam com ratos alimentados com dietas adicionadas de Cyanidin 3-O- β -D-Glucoside purificada (95%), a mesma antocianina predominante na jabuticaba.

<Tabela 3>

3.3 Glicose sérica

De acordo com a Figura 1, pode-se perceber uma tendência quadrática decrescente, ou seja, à medida que a concentração do pó de casca de jabuticaba aumenta, os níveis de glicemia diminuem a um ponto mínimo, a partir desse ponto os valores de glicemia voltam a subir mesmo com os níveis de concentração aumentando. De acordo com o experimento realizado, a dose ideal para esse tipo de estudo é de 2%, ou seja, quando é aplicada uma concentração de 2% de casca de jabuticabas (o que corresponde a 3,36 mg/100 g peso corpóreo de antocianinas) o valor de glicemia estimado é de 100,41mg.dL⁻¹, 13,96 % menor em relação aos ratos que não receberam casca de jabuticabas, de acordo com o modelo ajustado.

Alarcon-Aguilar et al. (2007) trabalhando com camundongos obesos e saudáveis, que receberam diariamente um extrato aquoso padronizado de *Hibiscus sabdariffa* por 60 dias, encontraram significativa redução da glicemia nos camundongos obesos; porém, nos camundongos saudáveis ocorreu uma redução não significativamente estatística.

Os valores de glicemia para ratos saudáveis encontrados nesse estudo estão de acordo com os valores encontrados por Dantas, Ambiel, Cuman, Baroni, Bersani-Amado,

(2006), que determinaram valores médios de glicemia de $108 \pm 17.4 \text{ mg.dL}^{-1}$. A redução da glicemia dos grupos G1 e G2 foi significativa em relação ao grupo controle.

Jayaprakasam et al. (2005) testou a ação de cianidina-3-glicosídeo, delphinidina-3-glicosídeo, cianidina-3-galactosídeo, e pelargonidina-3-galactosídeo na estimulação da síntese de insulina em uma cultura de células pancreáticas. Os compostos foram testados na presença de duas concentrações de glicose, 4 e 10mM. Os resultados deste estudo indicaram que a cianidina-3-glicosídeos e a delphinidina-3 glicosídeos foram as antocianinas mais eficazes no aumento da secreção de insulina. Esse aumento foi de 1,43 e 1,8 vezes, respectivamente, sendo a delphinidina-3-glicosídeo o composto mais ativo. Esses dados confirmam a redução da glicemia encontrada no presente estudo, ocasionada possivelmente pelo aumento da secreção de insulina nos animais dos grupos que ingeriram o pó de casca liofilizada de jabuticaba, visto que as duas antocianinas encontradas na casca foram as mesmas em destaque no estudo supracitado.

Camundongos diabéticos que receberam 0.2% de cianidina-3-glicosídeo purificada (96%), extraída de milho roxo, tiveram a concentração de glicose no sangue significativamente suprimida apesar de não ter ocorrido diferença estatística no nível de insulina plasmática. O resultado do teste de tolerância à insulina mostrou claramente que a dieta de cianidina-3-glicosídeos melhora a resistência à insulina (Sasaki et al., 2007).

<Figura 1>

3.4 Lipídeos séricos

Na figura 2, observa-se clara redução dos valores de colesterol total para ratos do grupo G1. A ingestão de 1% de casca de jabuticaba (1.57mg de antocianinas/100 g de peso corpóreo) causou uma diminuição de 48.7% no níveis de colesterol total dos animais em relação ao grupo controle. Entretanto, à medida que a concentração da casca de jabuticabas aumenta, os níveis de colesterol total também aumentam, sendo que para a maior concentração, 4% da casca liofilizada, o valor verificado foi de $54,41 \pm 10,18 \text{ mg.dL}^{-1}$, concentração maior que a do grupo controle, o que indicar que a casca de jabuticaba, quando consumida em excesso pode gerar efeitos indesejáveis. Não foram encontradas diferenças significativas nos níveis de HDL-colesterol e triacilgliceróis nos grupos experimentais em

relação ao grupo controle, sendo que a diminuição dos níveis de colesterol para o G1 é devida à variação das concentrações de LDL-colesterol (figura 2). Adição de 1% de casca de jabuticaba à dieta reduz 48.84% a concentração de LDL-colesterol em relação ao controle, entretanto, à medida que a concentração de casca de jabuticaba aumenta, os níveis de LDL-colesterol também aumentam.

<Figura 2>

Apesar de observarmos este aumento no colesterol total, Dantas et al. (2006) trabalhando com valores de referência para ratos Wistar, os mesmos utilizados neste experimento, observaram em 51 animais uma dosagem média de colesterol de $87 \pm 18,1 \text{ mg.dL}^{-1}$, ou seja, um valor bem maior que o encontrado neste experimento.

A suplementação da casca da berinjela à ração do grupo de porcos da índia (*Cavia porcellus*) que receberam dieta AIN- 93, não interferiu nos níveis plasmáticos do colesterol total, da HDL e da LDL-colesterol, indicando ausência de efeito da casca da berinjela, quando as concentrações plasmáticas de colesterol total e da fração LDL não estão elevadas, porém, ao receberem uma dieta hiperlipídica adicionada de casca de berinjela, verificou-se uma redução na fração LDL-colesterol, porém, os triglicerídeos e a fração HDL não foram significativamente diferentes (Cherem, Tramonte, Fett, Dokkum, 2007), o que está de acordo com os resultados do presente estudo.

Know et al.(2007) avaliaram o efeito da adição de antocianinas de soja preta em ratos, quais foram subdivididos em quatro grupos: controle, dieta hiperlipídica, hiperlipídica + 10% de soja preta e hiperlipídica + 0.037% de extrato de antocianinas. Os autores relatam aumento de 28% no HDL-colesterol e redução de 45 e 26% de triglicerídeos e colesterol, respectivamente, em animais alimentados com dieta hiperlipídica adicionada de antocianinas em comparação com o grupo que ingeriu apenas a dieta hiperlipídica. No grupo de recebeu a dita hiperlipídica acrescida de soja preta também ocorreu redução de triglicerídeos e colesterol 23 e 20%, respectivamente, e um aumento de 37% na fração HDL-colesterol.

Rouanet et al. (2010) estudou o efeito de suco de mirtilo, morango e framboesa, chá preto e chá verde na prevenção de aterosclerose em hamsters que receberam uma dieta semi-

purificada e aterogênica. Não foram encontradas diferenças significativas entre o grupo controle e os grupos que receberam as diferentes dietas experimentais, para os parâmetros de colesterol total e HDL-colesterol. Resultado semelhante foi encontrado por Alarcon-Aguilar et al. (2007) trabalhando com camundongos obesos e saudáveis, que receberam extrato aquoso padronizado de *Hibiscus sabdariffa*. Este autor não encontrou diferenças significativas no colesterol plasmático nem nos níveis de triglicerídeos.

Sasaki et al. (2007), trabalharam durante 5 semanas com camundongos diabéticos que receberam 0,2% de cianidina-3-glicosídeo purificada; os resultados revelam que não houve alterações significativas nos níveis de triglicerídeos e colesterol total.

Diante do aumento de colesterol total e da fração LDL-colesterol para os grupos que ingeriram 3,36 e 6,56 mg de antocianinas/100 g de peso, pressupõe-se que deva existir um limite para a dose de ingestão deste composto. Salganik (2001) relata que os efeitos biológicos dos antioxidantes em humanos são ainda muito controversos. Dependendo do estado oxidativo de células, os antioxidantes podem ser protetores ou promotores de certas doenças. Altas doses de antioxidantes podem reduzir o nível de radicais livres necessários às células, causando assim prejuízo no funcionamento fisiológico do organismo. Para Fenech (2002), existe uma necessidade para se estabelecer as RDAs (Recommended Daily Allowance) para os micronutrientes, visto que estes desempenham diversas funções na manutenção da estabilidade genômica. Em nosso estudo, percebemos que doses elevadas de compostos fenólicos podem gerar efeitos indesejáveis, como o aumento da concentração de LDL-colesterol.

3.5 Alanina aminotransferase (ALT) e Aspartato aminotransferase (AST)

Na Figura 3, observa-se uma redução de ALT para o grupo que ingeriu 1% de casca de jabuticaba liofilizada, em relação ao grupo controle, porém para os grupos que receberam as concentrações de 2 e 4% foi observado um pequeno aumento da enzima ALT. A enzima AST apresentou uma tendência de redução, porém não apresentou significância ao nível de 5%.

<Figuras 3>

As aminotransferases (ALT e AST) são enzimas que estão presentes, em altas concentrações, no músculo, fígado e cérebro. A elevação da atividade das aminotransferases no sangue indica necrose ou moléstia, especialmente nesses tecidos. Assim, a elevação dos níveis da ALT é relativamente específica da doença hepatobiliar, apesar dos níveis de AST poderem estar aumentados nas doenças de outros órgãos. Valores mais de 10 vezes acima do limite superior de variação normal refletem habitualmente uma patologia hepática ou biliar. A ALT é encontrada principalmente no citoplasma do hepatócito, enquanto 80% da AST esta presente na mitocôndria. Essa diferença tem auxiliado no diagnóstico e prognóstico de doenças hepáticas. Em dano hepatocelular leve a forma predominante no soro é a citoplasmática, enquanto em lesões graves há liberação da enzima mitocondrial, elevando a relação AST/ALT (Oliveira, Nagem, Ribeiro, 2005). Assim, cabe ressaltar que o aumento discreto de ALT no presente estudo não está relacionado a um possível dano hepático, visto que o nível de AST não foi alterado.

Dantas et al.(2006), utilizaram 42 animais e encontraram como valor de referência para ALT $51 \pm 12.3 \text{ U.L}^{-1}$, ou seja, maior do que no estudo em questão.

Este mesmo aumento na enzima ALT foi verificado por Alarcon-Aguilar et al. (2007) entre o 15º e 45º dias de experimento com ratos obesos que ingeriram um extrato aquoso padronizado de *Hibiscus sabdariffa* por 60 dias; porém no 60º dia, não foi mais relatado este aumento, e para o grupo de animais saudáveis este efeito não foi verificado.

Ribeiro, Oliveira, Nagem, Junior e Pinto (2006), trabalhando com coelhos que receberam uma suplementação de 20 mg de antocianina diariamente e uma mistura de 10 mg de antocianina e 10 mg de naringeninas, não observaram nenhuma alteração nos teores de proteína e albumina plasmáticas, bem como na função hepática, verificado pela atividade das enzimas AST e ALT.

Conclusão

Os resultados obtidos neste estudo demonstram reduções estatisticamente significativas para os níveis de glicemia para os grupos alimentados com 1 e 2 % de casca de jabuticabas na dieta; porém, este resultado não foi encontrado para o grupo de animais que ingeriram 4% do pó de casca de jabuticaba liofilizada adicionado à dieta.

Foi observado redução nos níveis de colesterol total e LDL- colesterol para o grupo alimentado com 1% de casca de jabuticabas, mas houve aumento para os grupos que receberam 2 e 4% de casca de jabuticaba liofilizada adicionada a dieta. Os níveis de triglicerídeos e HDL-colesterol não apresentaram diferença significativa. Embora a enzima hepática ATL tenha apresentado um aumento, não é suficiente para se predizer um dano hepático, pois o mesmo não ocorreu para a enzima AST, além disso, as elevações foram pequenas e os valores parecem estar dentro dos valores de referência para ratos Wistar.

Dessa forma, os resultados deste trabalho pioneiro com compostos fenólicos de jabuticaba nos levam a crer que a ingestão de 1% de casca de jabuticaba adicionada à dieta proporcionou os maiores benefícios ao modelo animal, além disso, reforçam a discussão de que é necessário que se quantifique limites para a ingestão de compostos fenólicos na dieta humana. Portanto, é fundamental o desenvolvimento de novas pesquisas para se avaliar o metabolismo desses compostos *in vivo* bem como definir uma dosagem adequada.

Agradecimentos

Ao suporte financeiro do CNPq (número de processo 133001/2008-3).

Referências

- Alarcon-Aguilar, F.J., Zamilpa, A., Perez-Garcia, M.D.P., Almanza-Perez, J.C., Romero-Núñez, E., Campos-Sepulveda, E.A., Vazquez-Carrillo, L.I., Roman-Ramos, R.(2007). Effect of Hibiscus sabdariffa on obesity in MSG mice. *Journal of Ethnopharmacology*, 114, 66–71.
- AOAC.(1975). Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists. , ed 12., pp. 1094.Washington: AOAC.
- Bligh, E.G., Dyer, W.J.(1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 37, 911-917.
- Cerqueira, F.M. Medeiros, M.H.G. de, Augusto, O.(2007). Antioxidantes dietéticos: controvérsias e perspectivas. *Química Nova*, 30 (2), 441-449.
- Cherem, A.R., Tramonte, V.L.C.G., Fett, R., van Dokkum, W.(2007). Efeito da casca da berinjela (*Solanum melongena*) sobre as concentrações plasmáticas de triglicerídeos, colesterol total e frações lipídicas, em cobaias (*Cavia porcellus*) hiperlipidêmicos. *Rev. Bras. Pl. Med.*, 9 (1), 51-65.
- Dantas, J.A., Ambiel,C.R., Cuman, R.K.N., Baroni, S., Bersani-Amado, C.A. (2006). Valores de referência de alguns parâmetros fisiológicos de ratos do Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá, Estado do Paraná. *Acta Scientiarum. Health Science*, 28 (2), 165-170.
- Donadio, L.C. (2000). Jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba* (Vell.)Berg. (pp.1-55). Jaboticabal: FUNEP.
- Favaro, M.M.A.(2007). Extração, estabilidade e quantificação de antocianinas de frutas típicas brasileiras para aplicação industrial como corantes.(PP.1-105)Campinas: Tese- Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas.
- Felgines,C., Texier,O., Besson, C., Vitaglione, P., Lamaison, J., Fogliano, V., Scalbert, A., Vanella, L., Galvano, F.(2008). Influence of glucose on cyanidin 3-glucoside absorption in rats. *Molecular Nutrition & Food Research*, 52, 959-964.

Fenech, M. (2002). Micronutrients and genomic stability: a new paradigm for recommended dietary allowances (RDAs). *Food and Chemical Toxicology*, 40, 1113–1117.

Ghosh, D., Konishi, T. (2007). Anthocyanins and anthocyanin-rich extracts: role in diabetes and eye function. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, 16 (2), 200-208.

Instituto Adolfo Lutz.(1985). Normas analíticas do instituto Adolfo Lutz. 3 ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz.

Jayaprakasam, B., Vareed,S.K., Olson, L.K., Nair, M.G.(2005). Insulin Secretion by Bioactive Anthocyanins and Anthocyanidins Present in Fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53 (1), 28-31.

Kalt, W., Blumberg, J.B., Mcdonald, J.E., Vinqvist-Tymchuk,M.R., Fillmore,S.A.E.,Graf, B.A., O'leary, J.M., Milbury, P.E.(2008). Identification of anthocyanins in the liver, eye, and brain of blueberry-fed pigs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56 (3) 705-712.

Kwon, S., Ahn, I., Kim, S.K., Kong, C., Chung, H., Do, M., Park, K.(2007). Anti-Obesity and Hypolipidemic Effects of Black Soybean Anthocyanins. *Journal Of Medicinal Food*, 10 (3) 552–556.

Lane, H., Eynon, L. (1923). Determination of reducing sugar by means of Fehling's solution with methylene blue as internal indicator. *Journal of the Society of Chemistry Industry*. 42, 32T-37T.

Markakis, P. (1982).Stability of anthocyanins in foods. In: Markakis, P. (Ed.) *Anthocyanins as food colors*. (pp.163-180) New York: Academic Press.

Oliveira, T.T., Nagem T.J.,Ribeiro, J.N. (2005). Análise sérica das enzimas aspartato aminotransferase, alanina aminotransferase e gama glutamiltranspeptidase de coelhos adultos tratados com extrato bruto de própolis. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, 26 (1), 25-28.

Pietta, P.G. (2000). Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Products*, 63, 1035-1042.

Shahidi, F., Nacz, M. (1995). *Food phenolics: sources, chemistry, effects and applications*.331 p. Lancaster: Technomic.

Reeves, P.G., Nielson, F. H., Fahey Jr, G.C. (1993). AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *Journal of Nutrition*, 123, 1939-1951.

Ribeiro, J.N., Oliveira, T.T.de., Nagem, T.J., Junior, D.B.F., Pinto, A. da S.(2006).Avaliação dos parâmetros sanguíneos de hepatotoxicidade em coelhos normais submetidos a tratamentos com antocianina e antocianina + naringenina. *Revista Brasileira de Análises Clínicas*, 38 (1), 23-27.

Rouanet, J., Décordé, K., Rio,D.D., Auger, C., Borges, G., Cristol, J., Lean,M.E.J., Crozier,A. (2010). Berry juices, teas, antioxidants and the prevention of atherosclerosis in hamsters. *Food Chemistry*, 118, 266–271.

Salganik, R.I. (2001). The Benefits and Hazards of Antioxidants: Controlling Apoptosis and Other Protective Mechanisms in Cancer Patients and the Human Population. *Journal of the American College of Nutrition*, 20 (5), 464S–472S.

Sasaki, A.,Nishimura, N., Hoshino, H., Isa, Y., Kadowaki, M., Ichi, T., Tanaka, A.,Nishiumi, S., Fukuda, I., Ashida, H., Horio, F., Tsuda, T.(2007). Cyanidin 3-glucoside ameliorates hyperglycemia and insulin sensitivity due to downregulation of retinol binding protein 4 expression in diabetic mice. *Biochemical pharmacology*, 74, 1619-1627.

Satué-Gracia, M.T., Heinonen, M., Frankel, E.N. (1997). Anthocyanins as antioxidants on human low-density lipoproteinand lecithin-liposome systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45 (9), 3362-3367.

Soares, M., Welter,L., Kuskoski, E.M., Gonzaga,L., Fett, R.(2008). Compostos fenólicos e atividade antioxidante da casca de uvas niágara e Isabel. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 30 (1), 059-064.

Tsuda, T., Horio, F., Osawa, T. (1998).Dietary cyanidin 3-O-β-D-glucoside increases ex vivo oxidation resistance of serum in rats. *Lipids*, 33 (6), 583-588.

Wu, X., Gu, L., Prior, R.L., McKay, S. (2004). Characterization of anthocyanins and proanthocyanidins in some cultivars of *ribes*, *aronia*, and *sambucus* and their antioxidant capacity. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 52 (26), 7846-7856.

Zhang,Y.,Jayaprakasam, B., Seeram, N.P., Olson, L.K., Dewitt, D., Nair,M.G.(2004). Insulin secretion and cyclooxygenase enzyme inhibition by cabernet sauvignon grape skin compounds. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 52 (2), 228-233.

Tabela 1

Composição da dieta experimental

Ingredientes	quantidade, g/kg de dieta			
pó liofilizado de casca de jabuticaba	0	10	20	40
amido	465,7	465,7	465,7	465,7
Dextrina	155	155	155	155
caseína	142	142	142	142
acúcar	100	93,1	86,2	72,4
fibra	50	50	50	50
óleo de soja	40	40	40	40
mix mineral	35	35	35	35
mix vitamínico	10	10	10	10
L-cistina	1,8	1,8	1,8	1,8
bitartarato de colina	2,5	2,5	2,5	2,5
terc butil	0,008	0,008	0,008	0,008

Tabela 2

Composição centesimal do pó liofilizado de casca de jabuticaba

Componentes (%m.m ⁻¹)	Teor (%)	DP
Água	22,72	0,23
Lipídeos	1,27	0,07
Cinzas	3,01	0,07
Proteína bruta	3,90	0,12
Fibra Bruta	6,45	0,28
Acúcares redutores	40,95	0,57
Acúcares redutores totais	59,04	0,99
Sacarose	17,18	Nd

Tabela 3

Ingestão de dieta e antocianinas.

Grupos	Ingestão de dieta		Ingestão de casca de jabuticaba		Ingestão de antocianinas	
	g/dia	DP	mg/dia	DP	mg/100 g de peso corpóreo	DP
GO	21,2	1,4	0	0	0	0
G1	21,4	1,1	214	11	1,57	0,13
G2	22,8	1,5	456	30	3,36	0,13
G4	22,1	1,6	884	63	6,53	0,35

Figura 1

Relação entre as concentrações do pó de casca de jabuticaba liofilizada na dieta e a resposta glicêmica

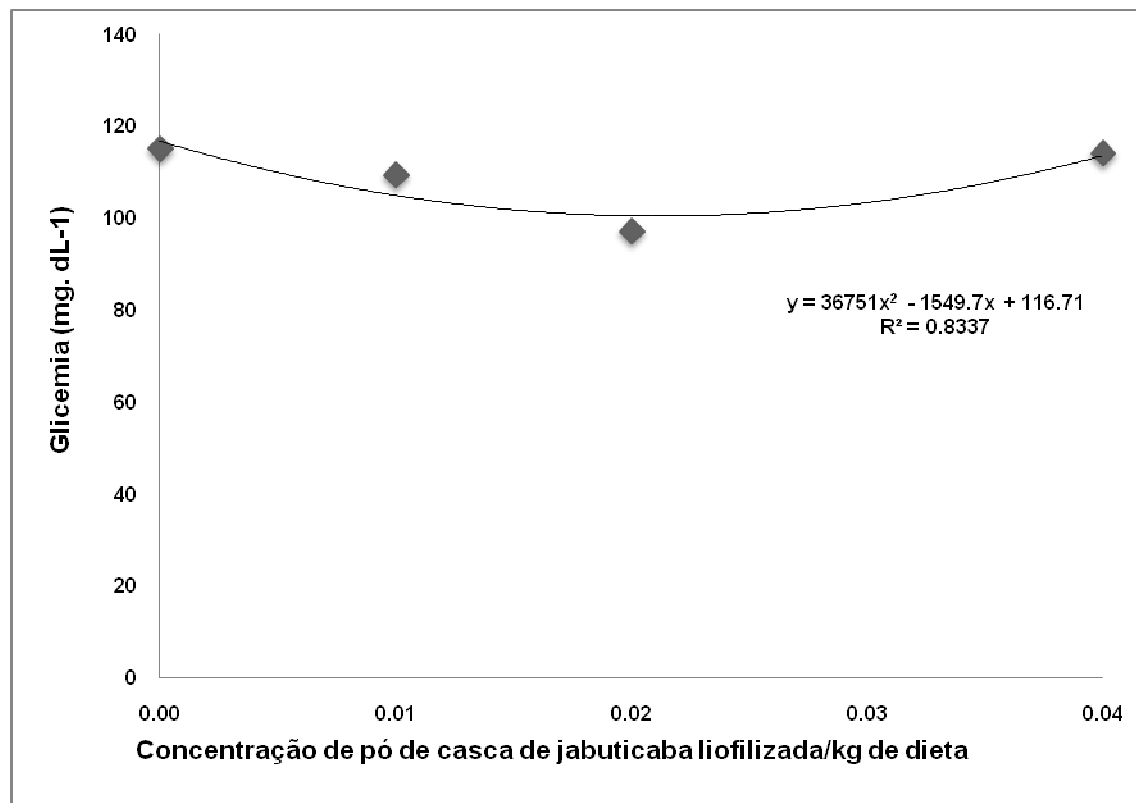
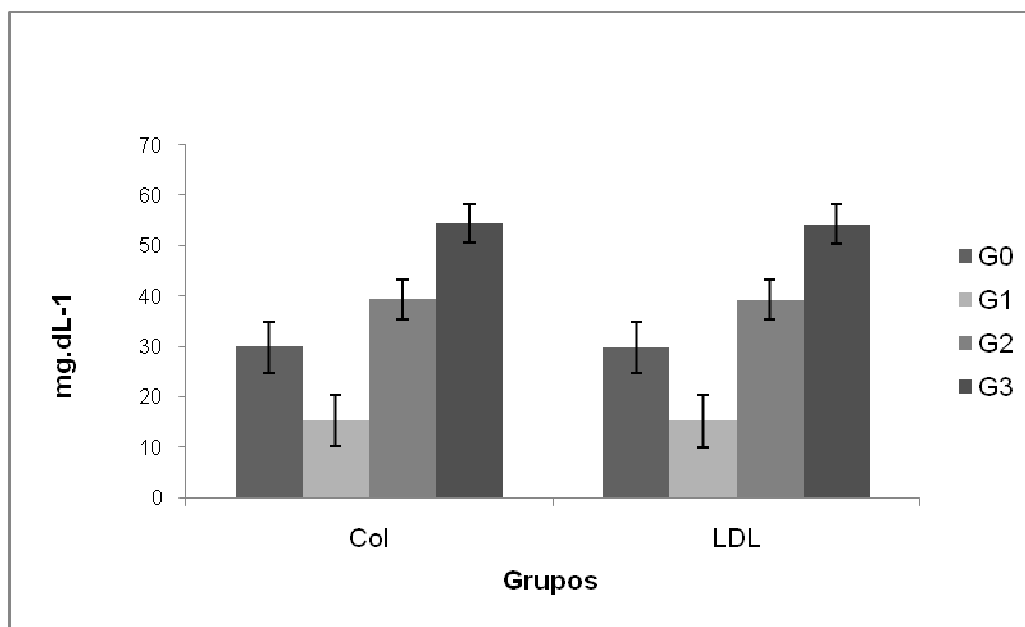


Figura 2

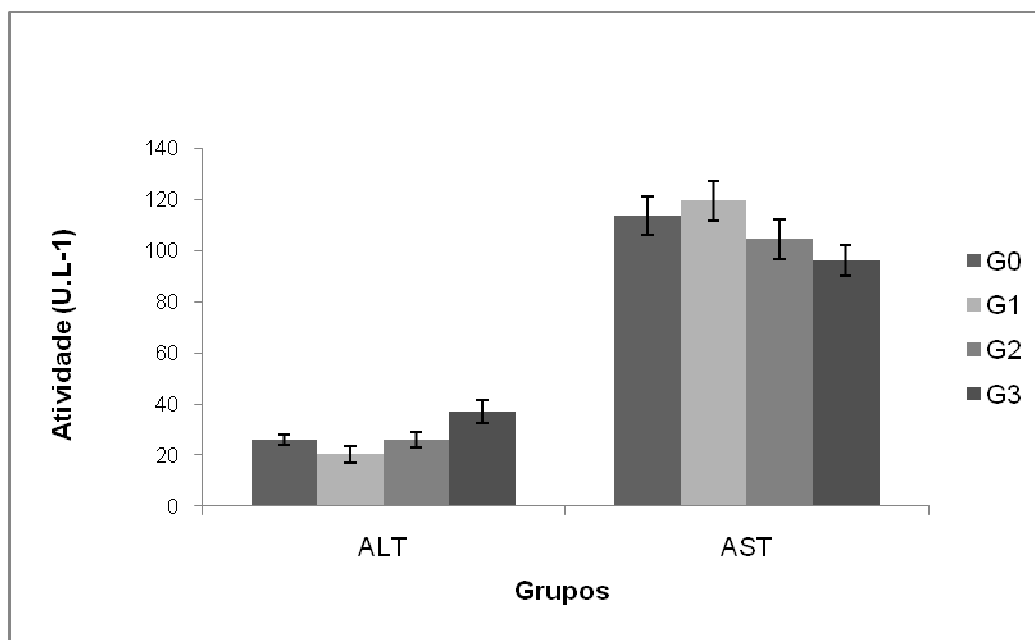
Relação entre as concentrações do pó de casca de jabuticaba liofilizada na dieta e a dosagem de colesterol total plasmático e LDL-colesterol e erro padrão da média



*Dados expressos em média $\pm$ erro padrão da média

Figura 3

Relação entre as concentrações do pó de casca de jabuticaba liofilizada na dieta e a dosagem plasmática da enzima Alanina aminotransferase (ALT) e Aspartato aminotransferase (AST)



*Dados expressos em média $\pm$ erro padrão da média

CONCLUSÃO GERAL

Perante todos os resultados expostos, a casca de jabuticaba liofilizada mostrou uma grande capacidade antioxidante *in vitro*, comprovada por todos os métodos antioxidantes analisados, pela quantidade de compostos fenólicos encontrada e principalmente pela concentração de cianidina-3-o –glicosídeo e delphinidina-3- o glicosídeo. Evidenciou-se o aumento significativo no potencial antioxidante de plasma de ratos tratados com 2% de casca de jabuticaba adicionada a dieta. Este aumento foi de 1.8 vezes quando foi utilizada a metodologia de TEAC e 1.3 vezes para a metodologia de Orac. Reduções estatisticamente significativas foram verificadas para os níveis de glicemia para os grupos alimentados com 1 e 2 % de casca de jabuticabas na dieta; porém, este resultado não foi encontrado para o grupo de animais que ingeriram 4% do pó de casca de jabuticaba liofilizada adicionado à dieta.

Foi observado redução nos níveis de colesterol total e LDL- colesterol para o grupo alimentado com 1% de casca de jabuticabas, mas houve aumento para os grupos que receberam 2 e 4% de casca de jabuticaba liofilizada adicionada a dieta. Os níveis de triglicerídeos e HDL-colesterol não apresentaram diferença significativa. Embora a enzima hepática ATL tenha apresentado um aumento, não é suficiente para se predizer um dano hepático, pois o mesmo não ocorreu para a enzima AST, além disso, as elevações foram pequenas e os valores parecem estar dentro dos valores de referência para ratos Wistar.

Dessa forma, os resultados deste trabalho pioneiro com compostos fenólicos de jabuticaba nos levam a crer que a ingestão de 1% do pó de casca de jabuticaba adicionada à dieta proporcionou os maiores benefícios ao modelo

animal quando utilizados os testes bioquímicos. Para o aumento do potencial antioxidante plasmático, a proporção de 2% foi a responsável pelo melhor desempenho do potencial antioxidante. Os animais que ingeriram 4% de casca de jabuticaba liofilizada acrescida a dieta não apresentaram nenhum efeito benéfico.

Estes dados reforçam a discussão de que é necessário que se quantifique doses superiores e inferiores para a ingestão de compostos fenólicos. Portanto, é fundamental o desenvolvimento de novas pesquisas para se avaliar o metabolismo desses compostos *in vivo* bem como definir uma dosagem adequada e diferenciada para indivíduos saudáveis e indivíduos portadores de processos patológicos.