



Faculdade de Engenharia de Alimentos

Universidade Estadual de Campinas
Faculdade de Engenharia de Alimentos
Departamento de Alimentos e Nutrição



UNICAMP

Curso de Pós-Graduação em Alimentos e Nutrição

Área de Nutrição Experimental e Aplicada à Tecnologia de Alimentos

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DA CASCA DE JABUTICABA LIOFILIZADA SOBRE
O GANHO DE PESO, PERFIL LIPÍDICO E RESISTÊNCIA À INSULINA EM
CAMUNDONGOS ALIMENTADOS COM DIETA HIPERLIPÍDICA.**

NATHALIA ROMANELLI VICENTE DRAGANO

PROF. DR. MÁRIO ROBERTO MARÓSTICA JÚNIOR

Orientador

Campinas

2011

NATHALIA ROMANELLI VICENTE DRAGANO

Bióloga

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DA CASCA DE JABUTICABA LIOFILIZADA SOBRE
O GANHO DE PESO, PERFIL LIPÍDICO E RESISTÊNCIA À INSULINA EM
CAMUNDONGOS ALIMENTADOS COM DIETA HIPERLIPÍDICA.**

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 Experimental e
Aplicada à Tecnologia de
Alimentos.

Orientador:

Prof. Dr. Mário Roberto Maróstica Júnior

Campinas

2011

BANCA EXAMINADORA

Este exemplar corresponde à redação final da dissertação defendida por Nathalia Romanelli Vicente Dragano aprovado pela comissão julgadora em 03 de março de 2011.

Prof. Dr. Mário Roberto Maróstica Júnior

Orientador

Profa. Dra. Alessandra Gambero

Membro

Prof. Dr. Dennys Esper Corrêa Cintra

Membro

Profa. Dra. Lilia Zago Ferreira dos Santos

Membro

Prof. Dr. Márcio Alberto Torsoni

Membro

DEDICO

Aos meus queridos pais, *Cássia* e *Hélvio*, e ao *Ciro*, pelo imenso amor, incentivo constante e compreensão incondicional a minha dedicação à pesquisa científica.

"Fora da mente humana, e à maneira de um impulso livre, produz-se a criação da ciência. Esta se renova, assim como as gerações, graças a uma atividade que constitui o melhor jogo do "homo ludens": a ciência é, no mais estrito e melhor dos sentidos, uma gloriosa diversão."

Jacques Barzun

AGRADECIMENTOS

À Deus, por sua presença constante na minha vida, por me amparar nos momentos difíceis e pelo auxílio nas minhas escolhas. Agradeço por me proporcionar força para lutar, saúde para trabalhar, estudar, viver e sorrir, hoje e sempre.

À Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP e ao Departamento de Alimentos e Nutrição da Faculdade de Engenharia de Alimentos pela oportunidade em realizar mais esta etapa da minha formação acadêmica.

À FAPESP e ao CNPq pelo suporte financeiro.

Ao Prof. Mário por ter acreditado em mim e pela oportunidade de trabalharmos juntos. Agradeço-o, sobretudo pelo incentivo e compreensão ao longo desta jornada.

À querida Anne, minha eterna gratidão não caberia nestas linhas. Companheira incansável. Meus sinceros agradecimentos pelo estímulo constante, pelo convívio diário e pela enriquecedora troca de conhecimentos profissionais e pessoais. Pela sinceridade, competência e amizade sempre demonstradas, na alegria dos bons momentos e na ansiedade das horas difíceis, dando-me forças para que eu continuasse persistindo. Você se fez essencial nessa importante etapa da minha vida!

Ao Dennys, obrigada por todos os ensinamentos desde o início deste trabalho, por ter me apresentado um novo mundo de expectativas e por ter entrado em ‘*nossas*’ vidas. Pelo exemplo de profissionalismo e dedicação. Sua paixão pela Ciência é contagiante!

Ao Prof. Lício Augusto Velloso meus sinceros agradecimentos por abrir as portas do Laboratório de Sinalização Celular e pela oportunidade de conviver em ambiente de grande qualidade científica contribuindo, assim, para meu crescimento experimental e acadêmico.

Aos Animais Experimentais meu respeito e gratidão. *“Vítimas solicitadas pela ciência para o benefício da humanidade que com tanta dignidade, fizeram-se imensamente humildes, enquanto ajudavam-nos a entender a vida e a arte de vivê-la”.*

À Luciana Azevedo, minha eterna orientadora. Muito obrigada por guiar meus primeiros passos no caminho da Ciência. Seus ensinamentos foram fundamentais para a condução deste trabalho.

Ao Luciano Bruno que me conduziu a este caminho. Muito Obrigada!

A todos os colegas do Laboratório de Sinalização Celular, em especial, a Andrezza, Carol, Carina, Dani Razolli, Érika Anne, Jose, Lelê e Lucas, muito obrigada pela valiosa cooperação, pelo convívio agradável e pela paciência em ensinar detalhes das práticas. Vocês são pessoas íntegras e sempre, de forma totalmente despretensiosa dispostas a ajudar.

À Alice por dar os primeiros e grandes passos nos estudos com a casca de jabuticaba.

À Cinthia pela maneira bastante agradável com que nos relacionamos, aprendemos, construímos e solidificamos a nossa amizade. Exemplo de determinação, seriedade e compromisso com a pesquisa.

À Glaucia, por enfrentarmos juntas essa jornada, compartilhando as mesmas emoções e desafios. Obrigada pela amizade e pelos momentos de diversão fora dos laboratórios. Vamos em frente!

Ao Diogo que acompanhou de perto todo esse caminho mesmo ‘sem querer’. Agradeço muito por todas as caronas e pela companhia nos momentos de descontração.

Aos colegas da Pós-Graduação em Alimentos e Nutrição pelos bons momentos compartilhados.

Aos técnicos de laboratório e funcionários da Pós-Graduação, muito obrigada pela prestatividade e eficiência com que me atenderam todas as vezes que necessitei.

Agradeço especialmente...

Aos meus queridos pais por abrirem a porta do meu futuro, iluminando meu caminho com a luz mais brilhante que poderiam encontrar: o estudo. Por serem não somente pais, mas amigos e companheiros fiéis mesmo nas horas em que meus ideais pareciam distantes e inatingíveis. Por compartilharem e alimentarem todos os meus sonhos sempre. Ainda há muito pela frente, ainda há muito a descobrir e a presença de vocês é fundamental.

Ao meu irmão Ricardo que, do seu jeito, manifesta seu apoio e carinho.. Toda a minha força e garra para vencer eu devo a você. Sinto sua falta desde o dia que deixamos de conviver diariamente. Você nunca saberá o tamanho da saudade que senti...

Ao meu namorado Ciro pelo apoio incessante, amor incondicional e por sonhar comigo. Desculpe-me pelos momentos nos quais pude estar presente apenas em pensamentos.

Aos primos Clayton, Dayse e Dudu. Serei eternamente grata por me receberem de braços abertos e por tornarem-se minha mais nova família. Agradeço também

por suas palavras de encorajamento, suprimento afetivo e cuidado constantes. Enfim, pela alegria que representam para mim.

À Helena por cuidar tão bem de mim. Pelo carinho de cada gesto e por todos os lanches nas tardes que passei em frente ao computador. Exemplo de mulher batalhadora e de honestidade. Muito obrigada.

Às demais pessoas amigas, que direta ou indiretamente, contribuíram não somente com nesse trabalho, mas em toda a minha vida. Peço-lhes desculpas ao não mencioná-las, por limitações alheias à minha vontade. A todos esses talentos o meu muito obrigado.

CERTEZA

De tudo ficaram três coisas:

A certeza de que estamos sempre começando

A certeza de que precisamos continuar

A certeza de que seremos interrompidos antes de terminar

Portanto devemos:

Fazer da interrupção um novo caminho

Da queda, um passo de dança

Do medo, uma escada

Do sonho, uma ponte

Da procura, um encontro

Fernando Pessoa

SUMÁRIO

RESUMO	2
CAPÍTULO 1	3
1. INTRODUÇÃO	3
2. REVISÃO DE LITERATURA	5
2.1 OBESIDADE: EPIDEMIOLOGIA, CONCEITO E IMPLICAÇÕES.	5
2.2 OBESIDADE, RESISTÊNCIA À INSULINA E INFLAMAÇÃO.	7
2.3 ANTOCIANINAS: CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS, PROPRIEDADES BIOLÓGICAS E METABOLISMO.	14
2.4 O PAPEL DAS ANTOCIANINAS NO TRATAMENTO E CONTROLE DA OBESIDADE.	16
2.5 JABUTICABA (MYRCIARIA SSP)	19
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	22
3. OBJETIVOS	28
OBJETIVO GERAL	28
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
CAPÍTULO 2	29
FREEZE-DRIED JABOTICABA PEEL POWDER IMPROVES INSULIN SENSITIVITY IN HIGH-FAT FED MICE.	29
ABSTRACT	30
INTRODUCTION	31
MATERIALS AND METHODS	33
RESULTS	40
DISCUSSION	49
LITERATURE CITED	55
CONCLUSÃO	59
ANEXO	60
COMPROVANTE DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL	60

RESUMO

Estudos recentes demonstraram que as antocianinas podem suprimir o desenvolvimento da obesidade e de distúrbios metabólicos associados. A jabuticaba é uma fruta tipicamente brasileira que apresenta concentrações relativamente elevadas de antocianinas, particularmente em sua casca. Neste estudo, os efeitos da casca de jabuticaba liofilizado (rica em cianidina-3-glicosídeo e delphinidina-3-glucosídeo) na modulação da obesidade foram avaliados. Para tal, camundongos foram alimentados com dieta hiperlipídica, rica em gordura saturada, durante as quatro primeiras semanas e após receberam a mesma dieta hiperlipídica suplementada com a casca de jabuticaba liofilizada nas concentrações 1, 2 ou 4% (g/g) por 6 semanas adicionais. A suplementação, em todas as doses testadas, não protegeu os animais contra o ganho de peso, hiperleptinemia e intolerância a glicose induzidos pela dieta hiperlipídica. Entretanto, demonstramos, por meio do teste de intolerância a insulina, que todos os tratamentos com a casca de jabuticaba liofilizada foram eficazes na reversão do quadro de resistência à insulina já estabelecido no grupo alimentado com dieta hiperlipídica não suplementada. Este efeito foi acompanhado por uma maior fosforilação em tirosina do IR, IRS-1 e pela maior fosforilação das proteínas Akt e FoxO, após estímulo com insulina, no tecido adiposo e fígado dos camundongos tratados. Além disso, observou-se uma atenuação da inflamação local evidenciada por meio da menor expressão da IL-1 β e da fosforilação da proteína I κ B- α no tecido adiposo e fígado dos animais tratados com a casca quando comparados com o grupo controle alimentado com dieta hiperlipídica. Estes resultados sugerem que a casca de jabuticaba liofilizada pode exercer uma ação protetora contra as patologias associadas à obesidade.

CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO

Durante a segunda metade do século XX, populações de vários países do mundo passaram por mudanças comportamentais que levaram ao aumento do consumo de alimentos com alta densidade energética e à redução da atividade física. Tais modificações tiveram consequências marcantes no incremento da prevalência da obesidade e de doenças associadas como resistência à insulina, diabetes tipo 2 e doenças cardiovasculares, que exercem forte influência no perfil de morbi-mortalidade da população (VELLOSO, 2006).

Evidências epidemiológicas sugerem que dietas ricas em frutas e vegetais podem desempenhar um papel importante na prevenção de várias doenças crônicas não transmissíveis. Esta capacidade tem sido associada principalmente à presença de compostos bioativos, dentre estes podemos destacar as antocianinas, maior grupo de pigmentos solúveis encontrados no reino vegetal (SCHRÖDER, 2007; CEFALU et al, 2008).

As antocianinas são compostos fenólicos pertencentes à família dos flavonóides. Diversos estudos já comprovaram que estes pigmentos exibem efeitos biológicos múltiplos com benefícios potenciais à saúde humana e animal (HE e GIUSTI, 2010). Trabalhos mais recentes demonstraram que as antocianinas, assim como frutas e extratos ricos nesses compostos, podem suprimir o desenvolvimento da obesidade e desordens metabólicas associadas *in vivo*.

O maior interesse na caracterização dos mecanismos fisiopatológicos envolvidos com a gênese da obesidade, aliados à necessidade de se desenvolverem métodos terapêuticos mais eficientes e seguros, servem como base para o avanço das pesquisas em Nutrição que visam a identificar alimentos e compostos bioativos capazes de intervir no desenvolvimento desta epidemia mundial.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Obesidade: Epidemiologia, Conceito e Implicações.

A obesidade é reconhecida hoje como um dos mais importantes problemas de saúde pública em todo o mundo devido a sua contribuição para o aumento significativo de morte prematura e invalidez precoce, uma vez que esta condição está intimamente relacionada a um maior risco para o desenvolvimento de uma série de doenças crônicas não transmissíveis, como resistência à insulina, diabetes tipo 2, hipertensão arterial sistêmica, dislipidemia aterogênica, doença hepática gordurosa não-alcoólica, doenças cardiovasculares e certos tipos de câncer (KOPELMAN, 2000; GALIC et al., 2010).

Em relação às tendências ao longo do tempo, a prevalência da obesidade começou a aumentar progressivamente no início do último século, mas somente nas últimas duas décadas as taxas de prevalência tornaram-se alarmantes tanto em países desenvolvidos quanto em países em desenvolvimento. A natureza global da epidemia da obesidade foi formalmente reconhecida pela Organização Mundial de Saúde em 1997 (CABALLERO, 2007). Estimativas recentes indicam que em 2030 existirão, aproximadamente, 2,16 bilhões de adultos com sobrepeso e 1,12 bilhões de obesos em todo o mundo (KELLY et al., 2009; WHO, 2009).

Seguindo a tendência mundial, a prevalência de sobrepeso e obesidade no Brasil também têm aumentado de forma contínua e intensa de acordo com estudos de larga escala realizados no país (*Estudo Nacional sobre Despesa Familiar*, 1974-1975; *Pesquisa Nacional sobre Saúde e Nutrição*, 1989 e *Pesquisa*

de Orçamentos Familiares, 2002-2003; Pesquisa de Orçamentos Familiares, 2008-2009). Dados da última pesquisa mostram que o excesso de peso atingiu aproximadamente metade da população de adultos. A situação e a evolução da prevalência da obesidade no País reproduzem, em linhas gerais, o quadro descrito para a prevalência do excesso de peso. A obesidade cresceu mais de quatro vezes entre os homens, de 2,8% em 1973-74 para 12,4% em 2008-09 e mais de duas vezes entre as mulheres, onde as taxas passaram de 8% para 16,9%. O problema alcança significância em todas as faixas etárias, classes econômicas e regiões do País. Além disso, foi observado que, nos últimos seis anos, a frequência de pessoas com excesso de peso tem aumentado em mais de um ponto percentual ao ano, isto indica que, se essa tendência se mantiver, em cerca de dez anos, o excesso de peso poderá alcançar dois terços da população adulta do Brasil; magnitude idêntica à encontrada na população dos Estados Unidos (*Pesquisa de Orçamentos Familiares, 2008-2009*).

A obesidade é resultante da quebra do equilíbrio entre ingestão e gasto energético, prevalecendo, sutilmente, o primeiro sobre o segundo, o que resulta num estado de balanço energético positivo, promovendo aumento nos estoques de energia e, conseqüentemente, no peso corporal (FLIER, 2004; CABALLERO, 2007). Tal desequilíbrio se deve à interação complexa entre diversos fatores genéticos, metabólicos, hormonais e ambientais, ainda não totalmente esclarecidos. Assim, a obesidade não é considerada uma doença singular, e sim um grupo heterogêneo de condições com múltiplas e causas que, em última análise, refletem no fenótipo obeso (PEREIRA *et al*, 2003).

O aumento da prevalência da obesidade está relacionado com a mudança no estilo de vida das populações, ao longo dos anos, o que é expresso por meio da modificação dos padrões alimentares e de atividade física resultantes da industrialização, urbanização e desenvolvimento econômico. A adoção de padrões comportamentais que priorizam atividades profissionais sedentárias, e o aumento do consumo e da disponibilidade de alimentos altamente energéticos, ricos em açúcares e gorduras, sobretudo as saturadas, são os principais fatores ambientais associados ao progressivo aumento da prevalência desta doença nos dias atuais (POPKIN et al. 2006; MCALLISTER et al. 2009).

2.2 Obesidade, Resistência à Insulina e Inflamação.

Nas últimas décadas observou-se um aumento surpreendente do conhecimento científico a respeito dos fenômenos fisiopatológicos decorrentes do acúmulo de gordura corporal.

Originalmente considerado um depósito passivo de energia, atualmente, o tecido adiposo é considerado um órgão endócrino ativo, que se comunica com o sistema nervoso central e com tecidos periféricos por meio da secreção de substâncias, chamadas adipocinas, que regulam múltiplos processos metabólicos, homeostase energética e resposta imuno-inflamatória (FRANSSEN et al, 2008). Alterações nos níveis fisiológicos destas adipocinas representam um fator crítico para o desenvolvimento das comorbidades associadas à obesidade (RITCHIE e CONNEL, 2007; SINGH et al, 2009).

As primeiras evidências que comprovaram a função endócrina do tecido adiposo aconteceram no início dos anos 90. Em 1994, Friedman e colaboradores identificaram e caracterizaram o hormônio leptina, cujo nome deriva do grego *leptos* (magro), produto do gene *Ob* (ZHANG et al, 1994) . A leptina é um hormônio produzido pelo tecido adiposo branco em quantidade diretamente proporcional à massa total deste tecido. Este hormônio é, sem dúvida, o mais importante sinal periférico responsável por estabelecer uma conexão entre os sítios de estoque de energia e o sistema nervoso central; por esta razão, a leptina é considerada uma molécula-chave na regulação da homeostase energética e controle da ingestão alimentar, juntamente com a insulina, considerada o segundo mais importante sinalizador periférico para o hipotálamo (Velloso, 2006). Os efeitos metabólicos da leptina não se limitam ao hipotálamo; a leptina atua em vários tecidos periféricos, como fígado, músculo esquelético, pâncreas e o próprio tecido adiposo onde estimula a oxidação de ácidos graxos, captação de glicose, inibe a deposição ectópica de TG, reduz os efeitos lipogênicos da insulina e regula a resposta imune (VÁZQUEZ-VELA et al, 2008; LAGO et al, 2009; MAURY et al, 2009).

Outro estudo identificou que, além das proteínas envolvidas na regulação do metabolismo, o tecido adiposo também secreta o fator de necrose tumoral (TNF- α), uma citocina pró-inflamatória. Em 1993, Hotamisligil et al., além de evidenciarem que o TNF- α tinha sua expressão aumentada no tecido adiposo de camundongos obesos, verificaram também que a administração de TNF- α recombinante em cultura de células ou em animais reduz a sensibilidade à

insulina. Adicionalmente, os mesmos pesquisadores demonstraram que camundongos obesos que apresentam TNF- α não funcionante ou que não expressam receptores de TNF- α apresentam melhora da sensibilidade à insulina, quando comparados aos camundongos controles.

Estudos posteriores evidenciaram que, além do TNF- α , outros mediadores da inflamação e citocinas, como as interleucinas 1 beta (IL1- β) e 6 (IL-6), têm sua expressão aumentada no tecido adiposo e em outros tecidos em modelos experimentais de obesidade e em humanos, demonstrando que um estado de inflamação crônica subclínica está associado à obesidade, e que contribui para o desenvolvimento da resistência à insulina (WELLEN e HOTAMISLIGIL, 2005).

O tecido adiposo de camundongos e humanos obesos é caracterizado por um acúmulo de macrófagos que é diretamente proporcional à magnitude da massa adiposa (WEISBERG et al, 2003). Os macrófagos são usualmente recrutados em locais com dano tecidual e contribuem para o aumento dos níveis de citocinas pró-inflamatórias (MAURY et al, 2009).

Atualmente, é sabido que citocinas pró-inflamatórias também prejudicam a sinalização de leptina e insulina em diversos tecidos, inclusive no hipotálamo.

A interferência nos sinais emitidos no hipotálamo pelos hormônios reguladores da fome prejudica a homeostase local, o que por sua vez culmina no desarranjo contínuo da ingestão alimentar, perpetuando a falta de controle na ingestão alimentar e o estabelecimento da obesidade e suas decorrências (SKALICKY et al., 2008).

A insulina é um hormônio polipeptídico anabólico produzido pelas células β pancreáticas, cuja síntese e secreção são ativadas pelo aumento dos níveis circulantes de glicose e aminoácidos após as refeições. A insulina atua em vários tecidos periféricos, incluindo músculo, fígado e tecido adiposo, sendo um componente essencial para o metabolismo de carboidratos, lipídeos e proteínas (GRUNDY, 2004). Este hormônio exerce suas ações por meio da sua ligação com o receptor de insulina (IR), em seguida, este receptor se autofosforila e fosforila vários substratos da família do receptor de insulina (IRS), iniciando uma cascata sinalizadora que desencadeia suas atividades metabólicas.

A resistência à insulina pode ser definida como um fenômeno biológico no qual há uma diminuição da capacidade da insulina endógena ou exógena em estimular a utilização celular de glicose e manter normais as respostas metabólicas com ela relacionadas (DIAS et al, 2008). Entretanto, a RI tem como mecanismo compensador a hiperinsulinemia, resultante da capacidade adaptativa das células β , que mantêm a homeostase glicêmica; porém quando há falência nestas células, surge então a intolerância à glicose e, posteriormente, o estabelecimento da Diabetes Mellito tipo 2 (OLEFSKY et al, 2010). Defeitos na via de sinalização em nível dos pré-receptores, receptores e/ou pós-receptores são alguns dos possíveis mecanismos que atuam na gênese da RI (MILNAR et al, 2007).

Várias serina/treonina quinases que são ativadas por citocinas pró-inflamatórias e altos níveis de ácidos graxos livres (AGL) contribuem para a inibição da sinalização da insulina através da fosforilação do IRS-1 em serina,

incluindo a JNK (c-Jun NH2-terminal quinase) e IKK β (quinase β do inibidor do NF- κ B) (AGUIRRE et al., 2000; AKIRA et al., 2006).

A ativação da JNK leva à fosforilação em serina dos substratos tradicionais do receptor de insulina (IRSs), o que contribui para resistência à transdução do sinal da insulina por meio desta via (DEMPSEY et al., 2003). A outra via pró-inflamatória que pode ser ativada tanto pelo TNF- α quanto pela IL-1 β é a IKK/I κ B/NF κ B. A IKK β pode bloquear a sinalização da insulina por pelo menos dois mecanismos. Primeiramente, a IKK β pode induzir a fosforilação direta em serina dos IRSs. Além disso, a IKK β pode fosforilar o inibidor do NF- κ B (I κ B) que culmina na dissociação do complexo I κ B/NF κ B, levando a ativação do NF κ B e sua translocação para o núcleo, onde este promove a expressão de vários genes controladores de moléculas pró e antiinflamatórias, alguns dos quais induzem resistência à ação da insulina (SCHENK et al., 2008; BASTOS et al., 2009).

A resposta inflamatória presente na obesidade é decorrente da interação entre o sistema metabólico e o sistema imune inato, pois estas são as mesmas quinases que são ativadas na resposta imune inata pelos *Toll-like receptors* (TLRs). O sistema de resposta imunológica mediada por *Toll* representa uma família evolucionariamente conservada do sistema de defesa do hospedeiro (MEDZHITOV et al, 1997).

Os TLRs são proteínas transmembranas responsáveis pela detecção da invasão do organismo por patógenos. Tais receptores são expressos em várias células do sistema imune, incluindo macrófagos, células dendríticas, linfócitos B e tipos específicos de linfócitos T. A expressão dos TLRs também é observada em

outros tipos de células como adipócitos, células endoteliais e células do epitélio intestinal (TAKEDA et al., 2003).

Atualmente existem 12 membros da família dos TLRs identificados em mamíferos. O TLR-4 é um subtipo de TLRs que é responsável pelo reconhecimento de lipopolissacarídeo (LPS) de bactérias gram-negativas. Da mesma forma com que os receptores TLR-4 reconhecem estruturas lipídicas presentes em agentes invasores, ácidos graxos oriundos do consumo dietético podem também ser reconhecidos por este sistema, desencadeando a ativação da via do sistema imune, mesmo na ausência de patógenos (LEE et al, 2001; SHI et al., 2006; MILANSKI et al, 2009).

Portanto, alguns ácidos graxos ao se ligarem a esse receptor de membrana celular, acionam proteínas de resposta inflamatória, incluindo a JNK e IKK β , que bloqueiam a ação da insulina e atuam no desenvolvimento da resistência à insulina (Figura 1).

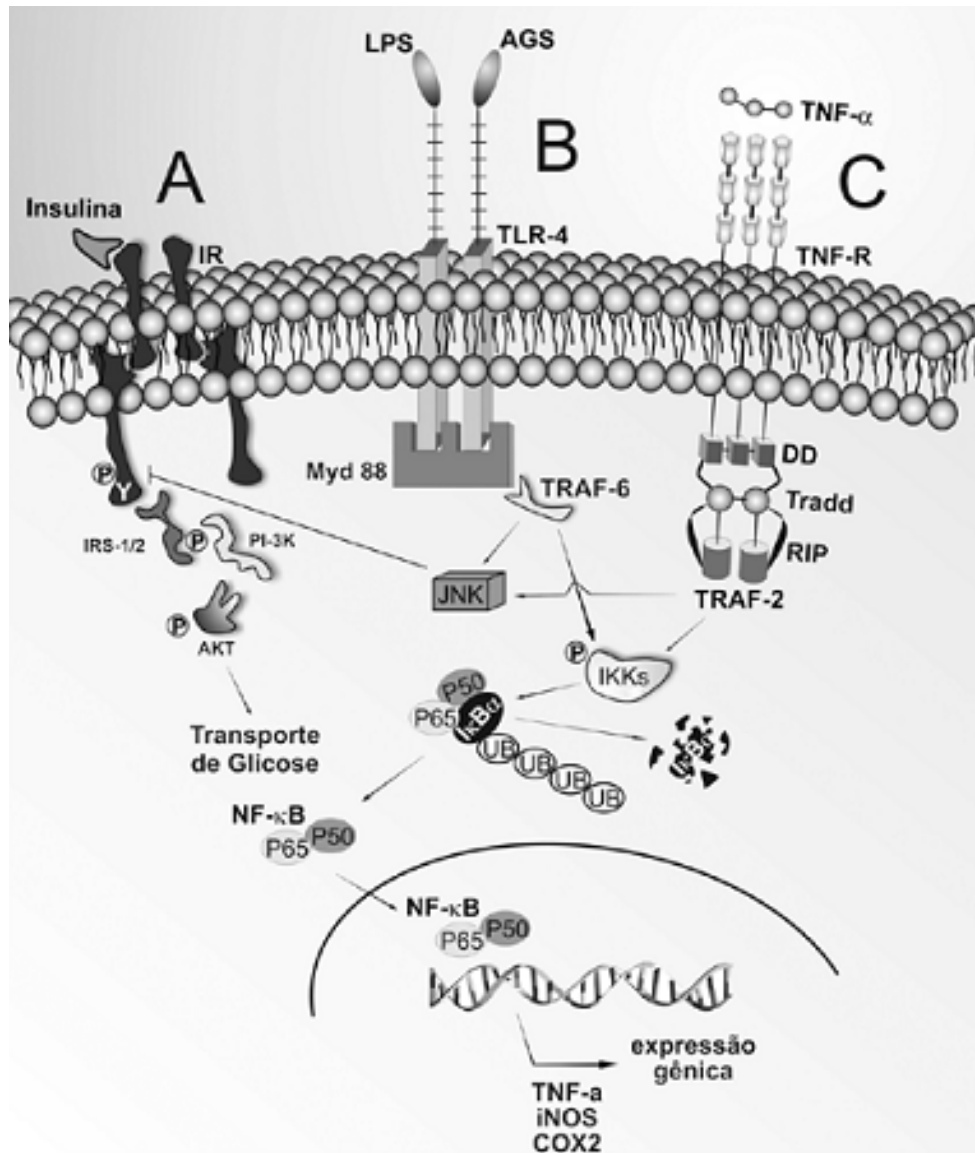


Figura 1. Resistência à Insulina e Inflamação. A ativação de serina/quinases na obesidade, especialmente IKK β e JNK, ressalta a sobreposição das vias metabólicas e inflamatórias: essas são as mesmas quinases ativadas na resposta imune inata pelo TLR (*toll-like receptor*) em resposta ao LPS e aos ácidos graxos (AGS). (A) Via de sinalização da insulina; (B) Via de sinalização do TLR-4; e (C) Via de sinalização do TNF- α . FONTE: Pauli et al, 2009.

2.3 Antocianinas: Características químicas, Propriedades Biológicas e Metabolismo.

O padrão dietético desempenha um papel importante na etiologia e prevenção de várias doenças crônicas não transmissíveis. Evidências epidemiológicas sugerem que dietas ricas em frutas e vegetais estão associadas à menor prevalência de obesidade, diabetes tipo 2 e doenças cardiovasculares (KIEC et al., 2008; ESPÍN et al., 2007).

As antocianinas (do grego *anthos* = flor; *kianos* = azul) são metabólitos secundários de plantas responsáveis pela pigmentação vermelha, azul e violeta de diferentes tecidos vegetais, tais como, flores, frutos, folhas, sementes e raízes (LIEBERMAN et al., 2007). Na alimentação humana, estes compostos estão disponíveis em diversas frutas como amoras, cerejas, pêssegos, uvas, romãs, ameixas assim como muitas verduras de cor escura, como rabanete, feijão preto, cebola roxa, berinjela, repolho roxo e batata doce, representando componentes substanciais da fração não energética da dieta humana (BOBBIO et al., 2000; BRITO et al., 2007; HE e GIUSTI, 2010).

Quimicamente, as antocianinas pertencem à grande classe dos compostos fenólicos e são classificadas como flavonóides devido à estrutura característica de sua cadeia carbônica ($C_6-C_6-C_6$), na qual os dois anéis aromáticos estão separados por um anel heterocíclico intermediário. São moléculas glicosiladas, polihidroxi ou polimetóxi derivadas do cátion 2-fenilbenzopirilium, também conhecido por cátion flavílico, e apresentam uma rica diversidade estrutural, devido a diferenças no número de grupos hidroxila na molécula, grau de metilação

destes grupos hidroxila, natureza, número e posição de moléculas de açúcares ligadas aos anéis aromáticos, bem como a natureza e o número de ácidos alifáticos ou aromáticos anexado aos açúcares (MCGUIE e WALTON, 2007). A figura 2 ilustra a estrutura genérica de algumas antocianinas.

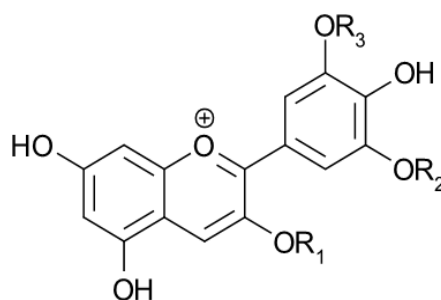


Figura 2. Estrutura genérica das antocianinas a partir do esqueleto das antocianidinas (agliconas). Onde R_1 : H ou substituinte glicosídico; R_2 e R_3 : H ou CH_3

Os interesses da comunidade científica em relação aos aspectos bioquímicos e efeitos biológicos das antocianinas aumentaram substancialmente durante a última década em razão de inúmeras evidências que demonstram seu amplo potencial terapêutico. A propriedade melhor descrita das antocianinas é a sua atividade antioxidante, a qual está intimamente relacionada com outros efeitos promotores da saúde, como redução do risco de doenças cardiovasculares, prevenção de certos tipos de câncer e de sua progressão, inibição da agregação plaquetária, ação antiinflamatória e moduladora da resposta imune, proteção contra *déficits* neuronais associados com o envelhecimento e doenças neurodegenerativas (TALAVERA et al, 2005; HE et al, 2010).

A atividade biológica das antocianinas está intimamente relacionada com a sua biodisponibilidade de forma que a quantidade deste composto presente nos alimentos não reflete, necessariamente, a quantidade absorvida e metabolizada pelo organismo (McGUIE e WALTON, 2007; BIESALKI et al., 2009).

Em geral, as antocianinas são absorvidas rapidamente no estômago e intestino delgado após a ingestão, sobretudo na sua forma glicosilada intacta. Após a absorção, elas entram na circulação sistêmica após passagem pelo fígado. Neste órgão, uma parte destes compostos pode ser metabolizada por reações de metilação e/ou glucoronidação, que são consideradas as duas rotas majoritárias no metabolismo das antocianinas. Além destas conversões enzimáticas, estes pigmentos podem ser degradados pela microflora intestinal em moléculas de açúcar, ácidos fenólicos e aldeídos e são, posteriormente, absorvidos no cólon (HE e GIUSTI, 2010; SHIPP e ABDEL-AAL, 2010).

Entretanto, o entendimento dos fatores que levam à liberação destes compostos da matriz do alimento, a extensão da absorção dos mesmos e o modo por meio do qual a diversidade estrutural e, a consequente grande quantidade de metabólitos gerados afetam sua biodisponibilidade e eficácia biológica, ainda não foram completamente esclarecidos.

2.4 O papel das Antocianinas no Tratamento e Controle da obesidade.

Nos últimos anos, observou-se um avanço substancial no conhecimento científico sobre os compostos biotivos presentes em alimentos e seus efeitos no

tratamento e prevenção da obesidade. Dentre os fitoquímicos que são conhecidos por exercerem efeitos anti-obesidade *in vivo* encontram-se as antocianinas.

Neste sentido, alguns estudos têm demonstrado que as antocianinas, provenientes de frutos e vegetais ricos neste composto, podem não só suprimir o desenvolvimento da obesidade, mas também melhorar diversos parâmetros metabólicos associados, *in vivo*.

O primeiro trabalho, neste sentido, foi realizado por Tsuda e colaboradores (2003). Estes pesquisadores comprovaram que o corante de milho roxo (*Purple corn color*), rico em cianidina 3-*O*- β -glicosídeo, reduziu o ganho de peso, os níveis séricos de glicose e insulina e ainda normalizou a expressão de TNF- α no tecido adiposo de camundongos alimentados com dieta hiperlipídica. Em trabalhos subsequentes, estes autores mostraram, por meio da técnica de *Microarray*, que a cianidina 3-*O*- β -glicosídeo, modula expressão de adipocinas devido ao aumento na expressão de adiponectina e leptina, diminuição na expressão de IL-6 e do inibidor da ativação de plasminogênio 1 (PAI-1), além de modular a expressão de genes relacionados com o metabolismo lipídico em adipócitos isolados de ratos e de humanos (TSUDA et al., 2004; 2005; 2006).

Paralelamente, Jayaprakasan et al. (2006) demonstraram que as antocianinas purificadas de *Cornelian cherry*, quando adicionadas à dieta hiperlipídica (0,01%) melhoraram a obesidade e resistência à insulina em camundongos. O tratamento com antocianinas, durante oito semanas, reduziu 24% do ganho de peso, independente do consumo, melhorou a tolerância a glicose e diminuiu a acumulação de lipídios no fígado.

Em outro estudo, a dieta hiperlipídica foi suplementada com 10% de soja negra ou com 0,04% de antocianinas isoladas da casca da soja. Ambos os tratamentos reduziram significativamente o ganho de peso e melhoraram o perfil lipídico dos ratos por meio da diminuição do colesterol total e triglicérides e aumento dos níveis séricos de HDL colesterol (KNOW et al., 2007).

Ao contrário, outro grupo de pesquisadores (PRIOR et al., 2008) observou que a suplementação de dietas hiperlipídicas com *Blueberries* ou com morangos inteiros liofilizados (10%) promoveu maior ganho de peso e adiposidade; no entanto, os animais alimentados com as antocianinas purificadas destes frutos exibiram menor ganho de peso quando comparados ao grupo controle. Em estudos subseqüentes, estes pesquisadores demonstraram também que o tratamento tanto com o fruto inteiro liofilizado quanto com as antocianinas purificadas de *Raspberry* também não alteraram o desenvolvimento da obesidade induzida por dieta hiperlipídica (PRIOR et al., 2010).

Em 2008, Sasaki e colaboradores sugeriram que a cianidina-3-*O*- β -glicosídeo, purificada do corante de milho roxo, melhora a sensibilidade a insulina e hiperglicemia por meio da diminuição da expressão da proteína 4 transportadora de retinol (RBP4) e aumento da expressão do transportador de glicose 4 (GLUT4) no tecido adiposo de camundongos diabéticos tratados com a antocianina (0,02% dieta) em questão. Este efeito foi também acompanhado pela expressão diminuída de marcadores inflamatórios, como o TNF- α e a proteína quimiotática de monócitos 1 (MCP-1).

Resultados similares foram obtidos por De Furia et al, 2009. Em seu estudo, camundongos foram alimentados com dieta hiperlipídica acrescida de 4% de *Blueberry* liofilizada. Embora a suplementação não tenha reduzido o ganho de peso e adiposidade induzida pela dieta, foram observadas melhoras na resistência à insulina, hiperglicemia e na inflamação do tecido adiposo devido à menor expressão de genes relacionados à inflamação e à menor infiltração de macrófagos neste tecido.

Seymour e colaboradores (2009), também observaram uma diminuição do estado pró-inflamatório crônico associado à obesidade. Neste estudo, a suplementação da dieta hiperlipídica com *Tart Cherries* inteiras e liofilizadas (1%) foi associada com expressão reduzida da atividade do NFκB, TNF-α e IL-6.

Assim, as informações disponíveis na literatura são cada vez mais favoráveis à ação anti-obesogênica das antocianinas; porém, ainda não são completamente entendidos os mecanismos pelos quais estes pigmentos são capazes de modular as complexas vias metabólicas que atuam na gênese da obesidade.

2.5 Jabuticaba (*Myrciaria* spp)

A jabuticabeira (*Myrciaria* spp.) é uma árvore frutífera nativa do Brasil, encontrada em extensa faixa do país, desde o Pará até o Rio Grande do Sul, porém exibe maior ocorrência e produtividade nos estados da região Sudeste (SATO e CUNHA, 2007). A frutificação ocorre duas vezes por ano, de janeiro a fevereiro e de novembro a dezembro, sendo esta última a safra de maior

produção. 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, branca e intensamente doce.

Dentre as espécies atualmente conhecidas, destaca-se a *Myrciaria cauliflora* (DC) Berg (jabuticaba Paulista ou Açu) e a *Myrciaria jaboticaba* (Vell) Berg (jabuticaba Sabará), sendo esta última a mais apreciada e doce das jabuticabas além de ocupar a maior área cultivada no Brasil (DONADIO, 2000; MATTOS, 1983).

A jabuticaba é utilizada para vários fins culinários e medicinais. Geralmente, o fruto é consumido *in natura* ou utilizado no preparo de geléias e licores. Na medicina popular, sua casca tem sido utilizada no tratamento contra uma variedade de condições inflamatórias, incluindo hemoptise, asma, diarreia e amigdalite (LIMA et al., 2008).

Além disso, a jabuticaba é um fruto bastante interessante do ponto de vista nutricional. A polpa apresenta quantidades consideráveis de vitamina C e minerais, onde se destaca o ferro, cálcio, fósforo e potássio, já a casca, embora normalmente desprezada, é rica em minerais, fibras solúveis e insolúveis e também apresenta quantidades relevantes de antocianinas (OLIVEIRA et al., 2003). Reynertson (2007) determinou o teor de antocianinas do fruto inteiro e os valores encontrados foram de 433 mg para a cianidina-3-*O*- β -glicosídeo e 81mg por 100 g de peso seco para a delphinidina-3-*O*- β -glicosídeo. Estudos realizados em nosso laboratório, para a identificação e quantificação das antocianinas da casca de jabuticaba liofilizada, revelaram a presença de delphinidina-3-*O*- β -

glicosídeo e cianidina-3-*O*- β -glicosídeo, os valores encontrados para estas duas antocianinas foram de 635,3 e 1964 mg/100 de peso seco, respectivamente.

Apesar de existir um consumo pronunciado de jabuticaba, principalmente na região sudeste, há poucos estudos na literatura sobre seus constituintes químicos e propriedades funcionais. Além disso, conhecimentos mais aprofundados dos compostos bioativos presentes na jabuticaba, assim como de possíveis efeitos promotores de saúde são imprescindíveis, uma vez que irão contribuir para um melhor aproveitamento e, conseqüentemente, para a maior valorização econômica desta fruta tipicamente brasileira.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUIRRE, V. et al. The c-Jun NH(2)-terminal kinase promotes insulin resistance during association with insulin receptor substrate-1 and phosphorylation of Ser(307). **The Journal of Biological Chemistry**, v. 275, p.9047-9054, 2000.
- AKIRA, S. et al. Pathogen recognition and innate immunity. **Cell**, v. 124, p. 783-801, 2006.
- BASTOS, D.H.M.; ROGERO, M.M.; ARÊAS, J.A.G. Mecanismos de ação de compostos bioativos dos alimentos no contexto de processos inflamatórios relacionados à obesidade. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 53, p. 646-656, 2009.
- BIESALSKI, H.K. et al. Bioactive compounds: Definition and assessment of activity. **Nutrition**, v. 25, p. 1202–1205, 2009.
- BOBBIO, F.O. et al. Identificação e quantificação da antocianinas do fruto do açaizeiro (*Euterpe oleracea*). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.20, n.3, 2000.
- BRITO, E.S. et al. Anthocyanins present in selected tropical fruits: acerola, jambolão, jussara, and guajiru. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 23, p. 9389–9394, 2007.
- CABALLERO, B. The Global Epidemic of Obesity: An Overview. **Epidemiologic Reviews**, v. 29, p.1–5, 2007.
- CEFALU, W.T. et al. Botanicals and the metabolic syndrome. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 87, p.481S–7S, 2008.
- DEFURIA, J. et al. Dietary Blueberry Attenuates Whole-Body Insulin Resistance in High Fat-Fed Mice by Reducing Adipocyte Death and Its Inflammatory Sequelae. **Journal of Nutrition**, v. 139, n.8, p.1510-1516,2009.
- DEMPSEY, P.W. et al. The signaling adaptors and pathways activated by TNF superfamily. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v.14, p. 193-209, 2003.
- DIAS, J.C.R.; SANTOS, L. C.; COUTINHO, V.F. Aspectos clínicos e nutricionais na síndrome metabólica. **Revista Brasileira de Nutrição Clínica**, v. 24, n.1, p.72-78, 2009.
- DONADIO, L.C. **Jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba* (Vell.)Berg)**. Jaboticabal: FUNEP, 55 p., 2000.

- DUARTE, O.; LUDDERS, P.; HUETE, M. Extending storage life of jaboticaba (*Myrciaria cauliflora* Berg) fruits. **14º Congresso Brasileiro de Fruticultura**, 1996, Curitiba, PR, Resumos..., Curitiba-PR:SBF, p. 556, 1996.
- ESPÍN, J.C.; GARCÍA-CONESA, M.T.; TOMÁS-BARBERÁN, F.A. Nutraceuticals: Facts and fiction. **Phytochemistry**, v. 68, p.2986–3008, 2009.
- FLIER, J.S. Obesity wars: molecular progress confronts an expanding epidemic. **Cell**, v. 16, n.2, p.337-50, 2004.
- FRANSSEN, R. et al. Obesity and Dyslipidemia. **Endocrinology Metabolism Clinics of North America**, v. 37, p.623–633, 2008.
- GALIC, S.; OAKHILL, J.S.; STEINBERG, G.R. Adipose tissue as an endocrine organ. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 316, p.129–139, 2010.
- GRUNDY, S. What is the contribution of obesity to the metabolic syndrome? **Endocrinology Metabolism Clinics of North America**, v. 33, p.267–282, 2004.
- GUTIERREZ, D.A.; PUGLISI, M. J.; HASTY, A.H. Impact of increased adipose tissue mass on inflammation, insulin resistance, and dyslipidemia. **Current Diabetes Reports**, v.9, n.1, p.26–32, 2009.
- HE, J.; GIUSTI, M.M. Anthocyanins: Natural Colorants with Health-Promoting Properties. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 1, p. 163–87, 2010.
- HOTAMISLIGIL, G.S. et al. Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. **Science**, v.259, p. 87-91, 1993.
- IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatísticas). **Pesquisa de Orçamentos Familiares 2008-2009**. Rio de Janeiro: IBGE, 2010. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/condicaodevida/pof/2008_2009_encaa/pof_20082009_encaa.pdf>. Acesso em: Nov. 2010.
- JAYAPRAKASAM B. et al. Amelioration of obesity and glucose intolerance in highfat-fed C57BL/6 mice by anthocyanins and ursolic acid in cornelian cherry (*Cornus mas*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p.243–248, 2006.
- KELLY, T. et al. Global burden of obesity in 2005 and projections to 2030. **International Journal of Obesity**, v. 32, p. 431–1437, 2008.
- KIEC, A.D. et al. Antioxidant phytochemicals against type 2 diabetes. **British Journal of Nutrition**, v. 99, p. ES109–ES117, 2008.

KOPELMAN P. G. Obesity as a medical problem. **Nature**, v. 404, p.635- 643, 2000.

KWON, S. et al. Anti-Obesity and Hypolipidemic Effects of Black Soybean Anthocyanins. **Journal of Medicinal Food**, v. 10, n.3, p. 552-556, 2007.

LAGO, F. et al. Adipokines as novel modulators of lipid metabolism. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 34, n.10, p. 500-510, 2009.

LEE J.Y. et al. Saturated fatty acids, but not unsaturated fatty acids, induce the expression of cyclooxygenase-2 mediated through Toll-like receptor 4. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, p.16683-16689, 2001.

LIEBERMAN, S. The antioxidant Power of purple corn: A research review. **Alternative & Complementary Therapies**, 2007.

LIMA, A.J.B. et al. Caracterização química do fruto jaboticaba (*Myrciaria cauliflora* Berg) e de suas frações. **Archivos Latinoamericanos de Nutricion**, v. 58, n. 4, p. 416-421, 2008.

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

MAURY, E.; BRICHARD, S.M. Adipokine dysregulation, adipose tissue inflammation and metabolic syndrome. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 314, p.1–16, 2010.

MCALLISTER, E.J. et al. Ten Putative Contributors to the Obesity Epidemic. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 49, n.10, p. 868–913, 2009.

MCGHIE T.K.; WALTON M.C. The bioavailability and absorption of anthocyanins: Towards a better understanding. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 51, p. 702-713, 2007.

MEDZHITOV R. et al. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. **Nature**, v.388, p.394-397, 1997.

MESHKANI, R.; ADELI, K. Hepatic insulin resistance, metabolic syndrome and cardiovascular disease. **Clinical Biochemistry**, v. 42, p.1331–1346, 2009.

MILANSKI M. et al. Saturated fatty acids produce an inflammatory response predominantly through the activation of TLR4 signaling in hypothalamus:

implications for the pathogenesis of obesity. **The Journal of Neuroscience**, v.29, p.359-70, 2009.

MLINAR, B. et al. Molecular mechanisms of insulin resistance and associated diseases. **Clinica Chimica Acta**, v.375, p.20-35, 2007.

OLEFSKY, J.M.; GLASS, C.K. Macrophages, Inflammation, and Insulin Resistance. **Annual Review of Physiology**, v. 72, p.219–46, 2010.

OLIVEIRA, A.L. et al. Caracterização tecnológica de jabuticabas Sabará provenientes de diferentes regiões de cultivo. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 25, p. 397-400, 2003.

PAULI, J.R. et al. Novos mecanismos pelos quais o exercício físico melhora a resistência à insulina no músculo esquelético. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabolismo**, v.53, p. 399-408, 2009.

POPKIN, B.M. et al. Measuring the full economic costs of diet, physical activity and obesity-related chronic diseases. **Obesity Reviews**, v. 7, p. 271–293, 2006.

PRIOR, R.L. et al. Whole Berries versus Berry Anthocyanins: Interactions with Dietary Fat Levels in the C57BL/6J Mouse Model of Obesity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p.647–653, 2008.

PRIOR, R.L. et al. Dietary black raspberry anthocyanins do not alter development of obesity in mice fed an obesogenic high-fat diet. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 2010, v. 58, p. 3977-3983, 2010.

REEVES, P.G.; NIELSEN, 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. **Journal of Nutrition**, v.123, p.1939-1951, 1993.

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.

RITCHIE, S.; CONNELL, J. The link between abdominal obesity, metabolic syndrome and cardiovascular disease. **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases**, v. 17, n. 4, p.319-326, 2007.

SASAKI R. et al. Cyanidin 3-glucoside ameliorates hyperglycemia and insulin sensitivity due to downregulation of retinol binding protein 4 expression in diabetic mice. **Biochemical Pharmacology**, v.74, p. 1619-1627, 2007.

SATO A.C.K e CUNHA R.L. Influência da temperatura no comportamento reológico da polpa de jabuticaba. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n.4, p. 890-896, 2007.

SCHENK, S.; SABERI, M.; OLEFSKY, J.M. Insulin sensitivity: modulation by nutrients and inflammation. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 118, p.2992–3002, 2008.

SCHRÖDER, H. Protective mechanisms of the Mediterranean diet in obesity and type 2 diabetes. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 18, p.149–160, 2007.

SEYMOUR, E.M. et al. Regular Tart Cherry Intake Alters Abdominal Adiposity, Adipose Gene Transcription, and Inflammation in Obesity-Prone Rats Fed a High Fat Diet. **Journal of Medicinal Food**, v. 2, n.5, p. 935–942, 2009.

SHI, H. et al. TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 116, p.3015-25, 2006.

SHIPP, J.; ABDEL-AAL, E-S.M. Food Applications and Physiological Effects of Anthocyanins as Functional Food Ingredients. **The Open Food Science Journal**, v. 4,p. 7-22, 2010.

SINGH, B. et al. Metabolic syndrome: A review of emerging markers and management. **Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews**, v. 3, n. 3, p. 240-254, 2009.

SKALICKY, J. et al. Evaluation of oxidative stress and inflammation in obese adults with metabolic syndrome. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v.46, n.4, p. 499-505, 2008.

TALAVÉRA, S. et al. Anthocyanin metabolism in rats and their distribution to digestive area, kidney, and brain. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.53, n.10, p.3902-3908, 2005.

TAKEDA K. et al. Toll-like receptors. **Annual Review of Immunology**, v.21, p.335-376, 2003.

TSUDA, T. et al. Anthocyanin enhances adipocytokine secretion and adipocyte-specific gene expression in isolated rat adipocytes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.316, p.149–57, 2004.

TSUDA, T. et al. Dietary cyanidin 3-O-b-D-glucoside-rich purple corn color prevents obesity and ameliorates hyperglycemia in mice. **Journal of Nutrition**, v.133, p.2125–30, 2003.

TSUDA, T. et al. Gene expression profile of isolated rat adipocytes treated with anthocyanins. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1733, p.137– 147, 2005.

TSUDA, T. et al. Microarray profiling of gene expression in human adipocytes in response to anthocyanins. **Biochemical Pharmacology**, v.71, p.1184–97, 2006.

VÁZQUEZ-VELA, M. et al. White Adipose Tissue as Endocrine Organ and Its Role in Obesity. **Archives of Medical Research**, v. 39, p.715-728, 2008.

VELLOSO L.A. O Controle Hipotalâmico da Fome e da Termogênese – Implicações no Desenvolvimento da Obesidade. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabolismo**, v. 50, n. 2, p.165-176, 2006.

WEISBERG, S.P. et al. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. **Journal of Clinical Investigation**, v. 112, p.1796-1808, 2003.

WELLEN, K.E.; HOTAMISLIGIL, G.S. Inflammation, stress, and diabetes. **Journal of Clinical Investigation**, v. 115, p. 1111-1119, 2005.

ZHANG, Y. et al. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. **Nature**, v. 372, p.425-432, 1994.

3. OBJETIVOS

Objetivo Geral

Os objetivos do presente trabalho foram investigar os efeitos da casca de jabuticaba liofilizada, rica em antocianinas, sobre o ganho de peso, perfil lipídico e resistência à insulina em camundongos *Swiss* alimentados com dieta hiperlipídica.

Objetivos Específicos

- 1) Avaliar e monitorar a ingestão dietética e o ganho de peso em camundongos submetidos às dietas experimentais durante todo o experimento;
- 2) Determinar os níveis séricos de colesterol total, triglicérides e HDL colesterol;
- 3) Determinar os níveis séricos de leptina;
- 4) Analisar a tolerância à glicose, pelo teste de tolerância à glicose (GTT) e a sensibilidade periférica à insulina pelo teste de tolerância à insulina (ITT);
- 5) Avaliar o efeito da suplementação com a casca de jabuticaba liofilizada sobre a transdução do sinal da insulina em fígado e tecido adiposo;
- 6) Avaliar o efeito da suplementação com a casca de jabuticaba liofilizada sobre a expressão de marcadores inflamatórios em fígado e tecido adiposo.

CAPÍTULO 2

**Freeze-dried jaboticaba peel powder improves insulin sensitivity
in high-fat fed mice.**

ABSTRACT

The peel of the native Brazilian fruit jaboticaba, is rich in anthocyanins (ACNs), which are known for its anti-obesity effects in animal models. Here, we evaluated the effects of freeze-dried jaboticaba peel powder on a number of metabolic parameters in a model of experimental obesity.. Mice were initially fed on a high-fat diet (HFD) for four weeks and then switched to a high-fat diet supplemented with freeze-dried jaboticaba peel powder (1, 2 or 4% wt:wt) for additional six weeks. The freeze-dried jaboticaba peel powder exerted no protective effect on HFD-induced weight gain, hyperleptinemia and glucose intolerance. However, the supplementation was effective to reduce insulin resistance as determined by improved signal transduction through the insulin receptor (IR)/insulin receptor substrate-1 (IRS1)/Akt/forkhead box protein (FoxO) pathway and by the attenuation of inflammatory signaling. These results suggest that freeze-dried jaboticaba peel powder may exert a protective role against obesity-associated insulin resistance.

Keywords: Obesity; insulin resistance; jaboticaba; *Myrciaria jaboticaba*; anthocyanins.

INTRODUCTION

Obesity has reached epidemic proportions in the world, with substantial adverse consequences for human health (1). A number of life-threatening diseases such as, type 2 diabetes mellitus, dyslipidemia, cardiovascular diseases, hypertension and certain types of cancer are significantly associated with this condition (2).

Nutritional factors are known to play an important role in the development of a number of diseases. The recent changes in human life-style with the introduction of carbohydrate and fat-rich diet standards is amongst the most important factors leading to the increased prevalence of obesity. Conversely, epidemiological data suggest that increased consumption of fruits, vegetables, legumes, nuts, whole grains and olive oil are favorably associated with the prevention of metabolic diseases including obesity, and by the reduction of cardiovascular disease, hypertension and diabetes (3, 4). The property of some vegetable-derived nutrients to reduce the risk of chronic diseases has been associated, at least in part, to the occurrence of the bioactive non-nutrient compounds which are known to exert a wide range of biological activities (5, 6).

Anthocyanins (ACNs) are an example of such bioactive compounds. They constitute the largest and probably the most important group of water-soluble natural pigments responsible for the vivid blue, purple, and red color of many vegetables and fruits (7). Many reports have shown that anthocyanin exhibits an array of pharmacological properties, such as anti-inflammatory and anticarcinogenic activities, as well as preventive effects on cardiovascular and degenerative diseases. All the

putative health-promoting effects are more or less associated with their potent antioxidant property, related to their chemical characteristics (8).

The recent findings have suggested that the consumption of ACNs may reduce obesity and some of its associated disorders, at least in animal models. Tsuda and coworkers (9) demonstrated that diet supplemented with purple corn color, rich in cyanidin-3-glucoside, significantly suppressed the gain of body weight and also improved the insulin sensitivity and hyperlipidemia in high-fat-fed mice. ACNs from the Cornelian cherry and black soybeans are also reported to effectively reverse the obesity and improve certain metabolic parameters associated with diets high in saturated fats (10, 11). However, additional *in vivo* studies have reported that whole powdered berries in a high-fat diet, compared to purified anthocyanins, were not quite effective in preventing obesity and, actually, they showed a potential to increase obesity on the models used on the study (12, 13).

Jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba*) is an indigenous Brazilian fruit found in extense areas of the country, particularly in the Southeast. The mature fruits are round and have a thick, dark purple, astringent skin that covers a sweet, white, gelatinous flesh. The fruit is widely used in Brazil, where it is mostly consumed fresh and, to a smaller extent, it is used to make jams and liqueurs. Its peel is a rich source of biologically active phenolic compounds, containing high concentrations of anthocyanins, particularly cyanidin-3-glucoside and delphinidin-3-glucoside, similar to other well-studied berries and fruits (14, 15).

The current study was designed to investigate the effect of freeze-dried jaboticaba peel powder on weight loss, glucose tolerance, insulin resistance and lipid profile in high-fat-fed mice. The results show that, although no changes in body mass were achieved, freeze-dried jaboticaba peel powder significantly improved insulin signal transduction and inflammatory signaling.

MATERIALS AND METHODS

Antibodies, chemicals, and buffers. All the reagents for SDS-PAGE and immunoblotting were from Bio-Rad (Richmond, CA, USA). HEPES, phenylmethylsulfonyl fluoride, aprotinin, dithiothreitol, Triton X-100, Tween 20, glycerol, and BSA (fraction V) were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). The human regular insulin (Novolin R) was from Novo Nordisk (Clayton, CN, USA). The antibodies against phospho-insulin receptor β (IR) (#3070, rabbit monoclonal), phospho-insulin receptor substrate (IRS)-1 (#3026, rabbit polyclonal) and phosphorylated- forkhead transcription factor box (FoxO) (#9464, rabbit monoclonal) were from Cell Signaling (Danvers, MA, USA). Anti-phospho-Akt (sc-7985-R, rabbit polyclonal), phospho-inhibitor of NF κ B alpha (I κ B- α) (sc-7977-R, rabbit polyclonal) and interleukin 1 β (IL-1 β) (sc-1252, goat polyclonal) were from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA). Chemicals for Real-time PCR were from Invitrogen (Carlsbad, CA, USA) and Applied Biosystems (Foster City, CA, USA). Intron-skipping primer for IL-1 β (Rn00580432_m1) and Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPD) (#4352339E) was obtained from Applied Biosystems.

Jaboticaba. The jaboticaba fruits (*Myrciaria jaboticaba* Vell berg) were obtained directly from producer (Aguaí, São Paulo State, Brazil), during main harvest season in September 2008.

Preparation of freeze-dried jaboticaba peels. The fruits were manually washed with fresh water and the peels were separated and frozen at -20 °C. The frozen peels were lyophilized and grounded into fine powder by an electrical mill. The freeze-dried powdered was kept in airtight containers and stored at -80 °C until the time of further use.

Animals and diets. Male Swiss inbred strain mice (21 days of age), originally imported from the Jackson Laboratory and currently bred at the University of Campinas Breeding Center were used in the study. The investigation was approved by Ethics Committee for Animal (Permission: 2020-1/2010) and followed the University guidelines for the use of animals in experimental studies. The animals were maintained at 21 ± 3 °C, on a 12 h artificial light/dark cycle and housed in individual cages. They were then randomly divided into five groups with eight animals per treatment (following an initial acclimatization period for 7 days). All groups were balanced for initial body weight. The treatments were Control group (C): mice were fed on normal diet, based on the AIN-93G (16), containing 7% (wt/wt) soybean oil (15); Control High fat group (HF): mice were fed on high-fat diet, containing 4% (wt/wt) soybean oil and 31% (wt/wt) lard; High-fat diet plus 1% (wt/wt) freeze-dried jaboticaba peel powder (HFJ1%); High-fat diet plus 2% (wt/wt) freeze-dried jaboticaba peel powder (HFJ2%) and High-fat diet plus 4% (wt/wt) freeze-dried jaboticaba peel powder (HFJ4%). Mice were initially fed on a high-fat

diet for 4 weeks and then switched to a high-fat diet containing freeze-dried jaboticaba peel powder for an additional 6 weeks. The diets were replaced at intervals of 3 days to prevent oxidation of the fat and the anthocyanins present in freeze-dried jaboticaba peel powder. All diets were balanced for fiber and energy. The concentrations of freeze-dried powder in the diets and ACNs composition and contents were determined according to preliminary studies conducted by our research group (17, *in press*). The composition of the diets, energy densities and ACNs contents are presented in Table 1. Body weight and food intake for each mouse were measured weekly throughout the study.

Table 1. Composition and Energy Density of Modified AIN-93G Diets^a.

Ingredients (g/kg diet)	C	HF	HFJ1%	HFJ2%	HFJ4%
Casein ^b	151.5	151.5	151.5	151.5	151.5
Corn starch	428	251.3	253.3	255.3	259.3
Maltodextrin	142.2	83.4	83.4	83.4	83.4
Sucrose	107.8	63.3	63.3	63.3	63.3
Cellulose	50	50	48	46	42
Soybean oil	70	40	40	40	40
Lard	0	310	310	310	310
Mineral mixture	35	35	35	35	35
Vitamin mixture	10	10	10	10	10
L-Cystine	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0
Choline bitartrate	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
Tert-Butylhydroquinone	0.014	0.014	0.014	0.014	0.014
Jaboticaba peel powder	0	0	10	20	40
<i>Total</i>	1000	1000	1000	1000	1000
Energy density (Kcal/g diet)	3.9	5.5	5.5	5.5	5.5
Anthocyanins (mg/kg diet)					
Cyanidin-3-O-glucoside	0	0	196.4	392.8	785.6
Delphinidin-3-O-glucoside	0	0	63.5	127	254
<i>Total</i>	0	0	259.9	519.8	1039.6

^a The diets were prepared according to the formulation of the American Institute of Nutrition for AIN-93G with modified protein content to 12% according to Goena et al. (18). ^b Amount was calculated based on protein content equal to 79.2%.

Intraperitoneal glucose tolerance test (iGTT) and insulin tolerance test (iITT).

iGTT and iITT were performed on food-deprived (6h) nonanesthetized mice after 9 and 10 weeks of treatment, respectively. Blood glucose levels were measured with Optium™ mini (Abbott Diabetes Care, Alameda, CA, USA) handheld glucometer using appropriate test strips. For iGTT, a solution of 20% glucose (2.0g/kg body weight) was administered into the peritoneal cavity. Blood samples were collected from the tail vein at 30, 60, 90, and 120 min for determination of glucose concentrations. The area under the curve (AUC) was calculated using these values. For iITT, glucose blood levels were sampled 5, 10, 15, 20, 25, and 30 min following Intraperitoneal (ip) injection of human insulin (0.75 U/kg). The rate constant for glucose disappearance during an insulin tolerance test (K_{ITT}) was calculated using the formula $0.693/t_{1/2}$. The glucose $t_{1/2}$ was calculated from the slope of the least-square analysis of the plasma glucose concentrations during the linear decay phase (19).

Collection of Serum, Liver and Adipose tissue. After 11 weeks of consuming the diets, the fasting mice (12h) were anesthetized by an ip injection of ketamin/diazepam (1/1 v/v) and the collection were initiated after the loss of corneal and pedal reflexes. Blood samples were taken from the interior vena cava and the serum was obtained from de coagulated blood by centrifugation at 4000 rpm for 15 min at 4 °C. The serum was immediately frozen at - 80°C until use. The liver and epididymal adipose tissue were removed and processed according to the subsequent analysis.

Determination of Serum Lipid Parameters and leptin levels. The serum triglycerides, total cholesterol and high-density lipoprotein (HDL) cholesterol were assayed enzymatically using commercial kits according to manufacturer's directions (Laborlab, Guarulhos, SP, Brazil). Serum leptin was measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using a commercial assay kit (Mouse leptin ELISA kit, Millipore, Billerica, MA, USA).

Immunoblotting. For evaluation of cytokine expression, protein activity and insulin signal transduction in liver and adipose tissue, the abdominal cavities of anesthetized mice (n=4) were opened, the portal vein exposed and 100 μ l (10^{-6} mol/liter) of insulin or saline was injected. Fragments (3.0 x 3.0 x 3.0mm) of liver (at 30s) and epididymal adipose tissue (at 2 min) were excised after the infusion of insulin and immediately homogenized in solubilization buffer at 4 °C (1% Triton X-100, 100 mmol/liter Tris-HCl (pH 7.4), 100 mmol/liter sodium pyrophosphate, 100 mmol/liter sodium fluoride, 10 mmol/liter EDTA, 10 mmol/liter sodium orthovanadate, 2.0 mmol/liter phenylmethylsulfonyl fluoride, and 0.1 mg aprotinin/ml). The extracts were centrifuged at 15,000 rpm at 4 °C for 40 min to remove insoluble material, and the supernatant was used as sample. The protein concentration of the samples was determined by the Biuret method. The immunoblotting was performed on tissue extracts as previously described by Thirone et al. (20), with minor modifications. The proteins were separated by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes and blotted with antibodies against phospho-IR, phospho-IRS-1, phospho-Akt, phospho-FoxO, IL-1 β and phospho-IkB- α . Specific bands were labeled by chemiluminescence and visualization was

performed by exposure of the membranes to RX-films. Bands intensities were quantified by digital densitometry (ScionCorp, Frederick, MD, USA) and normalized with β -actin.

RNA extraction and quantitative real-time PCR. Total RNA was extracted using a commercially available acid-phenol reagent Trizol (Invitrogen Corp.). RNA integrity was confirmed by nondenaturing agarose gel electrophoresis. The first-strand cDNA was synthesized using SuperScript III reverse transcriptase and random hexamer primers as described in the manufacturer's protocol (Invitrogen Corp.) The quantitative PCR was run to determine the expression of IL-1 β in the liver of treated mice using primer supplied with commercially available assays from Applied Biosystems. The reference gene was GAPD (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, (Applied Biosystems). Real-time PCR analysis of gene expression was carried out in an ABI Prism 7500 sequence detection system (Applied Biosystems). The optimal concentration of complementary DNA and primers, as well as the maximum efficiency of amplification, was obtained through 5-point, 2-fold dilution curve analysis for each gene. Amplification was performed in a 20 μ L final volume containing 6.25 ng of reverse-transcribed RNA according to the manufacturer's recommendations using the TaqMan PCR master mix. Real-time data were analyzed using the Sequence Detector System 1.7 (Applied Biosystems). Results were expressed as relative transcript amount as previously optimized (21).

Statistical analysis. All results are reported as means $\pm$ SEM. Differences between the treatment groups were evaluated using one-way analysis of variance

(ANOVA). When the ANOVA indicated significance, a Tukey-Kramer post hoc test was performed. $p < 0.05$ was accepted as statistically significant.

RESULTS

Mice were fed on control (n=8) or high-fat diet (n=32) for 4 weeks prior to treatment with freeze-dried jaboticaba peel powder; the initial body mass (23.45 ± 0.9 g) was similar between. As expected, after 11 weeks, body mass and cumulative body mass gain were significantly higher in mice fed on HFD as compared to the low-fat control diet (CD). The addition of freeze-dried jaboticaba peel powder on HFD did not protect against HFD-induced body mass gain, while the cumulative body mass gain in mice fed on HFD plus 2% freeze-dried jaboticaba peel powder (HFJ2%) was significantly greater than HFD treatment alone, 31.62 ± 0.9 g and 23.25 ± 1.40 g, respectively. In all the remaining groups receiving freeze-dried jaboticaba peel powder, body mass was increased as compared to HFD but this was not significant. **(Figures 1a and 1b).**

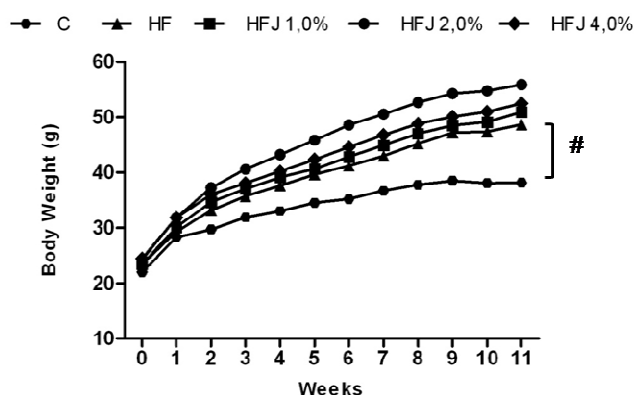
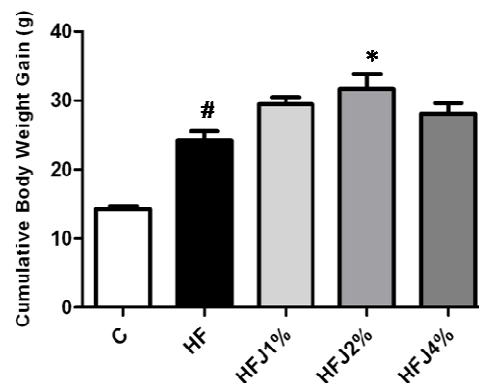
A.**B.**

Figure 1. Body weight trajectories (A) and Cumulative weight gain (B) of mice fed the CD, HFD, HFJ1%, HFJ2% or HJ4% for 11 weeks. Values are means $\pm$ S.E.M., $n = 8$. [#] $p < 0.05$, HF vs C group and ^{*} $p < 0.05$, HF2% vs HF group. No differences were observed between HFJ groups.

The overall food intake (g/mouse/day) did not differ between control and high-fat groups throughout the experiment. However, at fifth week of experiment the HFJ2% group consumed statistically more food (7.33 ± 0.9 g) than all the other groups (4.05 ± 0.16 g) (**Figure 2a**). This may be attributed to the fact that transition to the HFJ2% led to a marked increase in their food consumption, in particular for the first week, perhaps due to novelty or palatability of the diet.

It is important to notice that control mice on CD consumed the same amount of food as mice on HFD by weight, but the energy intake was higher in the HF control and treatments, approximately 23.0 Kcal/mouse/day, whereas the mice on the CD consumed 16.0 Kcal/mouse/day. In mice fed on HFD plus 2% and 4% freeze-dried jaboticaba peel powder the energy intake were significantly greater

than HF group (**Figure 2b**). Thus, the higher energy intake showed to be closely associated with a greater cumulative weight gain throughout the experiment in these treatments.

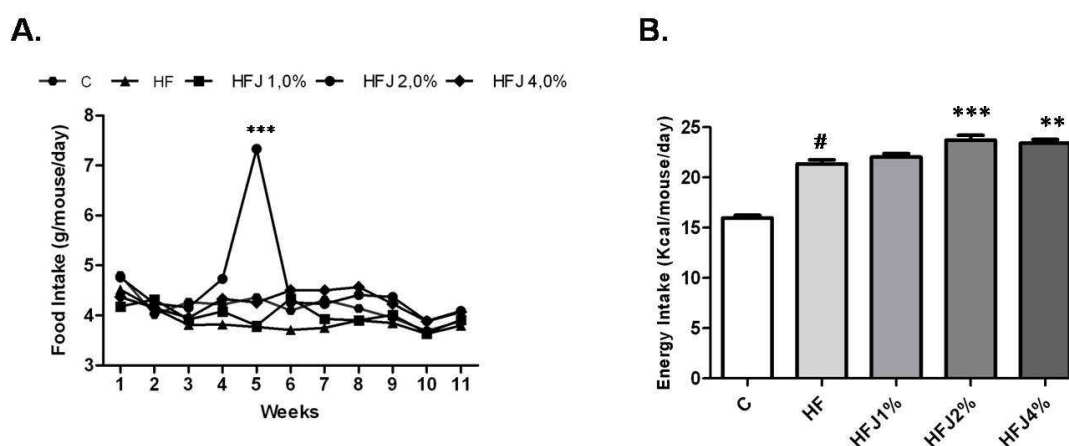


Figure 2. Food intake (g/mouse/day) during the 11-week study period (A). No differences were observed among CD fed mice and HFD fed mice. Except at week 5 when food intake by HF2% was significantly different from all others groups (** $p < 0.001$). Energy intake (Kcal/mouse/day) (B). # $p < 0.05$; *** $p < 0.001$, HF2% vs HF group; ** $p < 0.01$, HF4% vs HF group. Values are means $\pm$ S.E.M., $n = 8$.

Fasting serum triglycerides, total cholesterol and HDL cholesterol were not altered by level of fat or freeze-dried jaboticaba peel powder in the diet (**Table 2**). Serum leptin concentrations were highly correlated with the fat mass, the leptin level was 3.4 fold greater in HFD mice than in CD mice, but the levels were not changed in all treatments with HFD plus freeze-dried jaboticaba peel powder (**Figure 3**).

Table 2. Serum lipids profile of the experimental animals^a.

	Contents (mg/dL)				
	C	HF	HFJ1%	HFJ2%	HFJ4%
Triglycerides	39.68 ± 9.9	52.84 ± 1.8	65.17 ± 8.3	67.07 ± 8.3	67.0 ± 9.0
Cholesterol	236.12 ± 18.1	220.89 ± 17.1	231.36 ± 18.8	233.12 ± 18.1	241.05 ± 13.05
HDL-cholesterol	88.73 ± 6.8	71.52 ± 4.0	65.76 ± 3.2	65.76 ± 4.1	81.71 ± 6.4

^a Values are presented as means ± SEM of eight mice per treatment, except for triglycerides (n=4); data from sacrifice, after a 12 hours fast. No statistic differences were observed (p≥0.05, ANOVA).

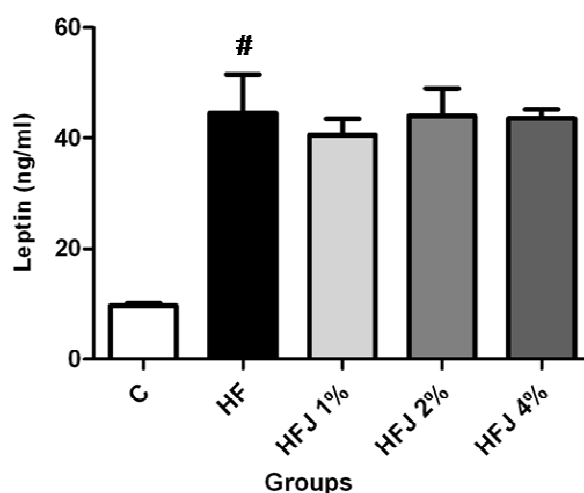


Figure 3. Fasting serum leptin levels of C, HF, HFJ1%, HFJ2% and HJ4% groups. Bars represent means ± S.E.M. of n = 8 mice. [#]p < 0.05, HF vs C group. No differences were observed among the HFJ and HF groups.

iGTT were performed after 5 weeks of dietary treatment to determine the effects of freeze-dried jaboticaba peel powder on glucose tolerance. The basal blood glucose levels, prior to the iGTT, was significantly higher in HF control

compared with control mice, 73.71 ± 5.27 and 130.71 ± 11.06 mg/dL, respectively. In HFJ1%, HFJ2% and HFJ4% groups the average basal blood levels were higher than HF control group (166 ± 11.97 , 140.43 ± 17.67 and 142.71 ± 10.90 mg/dL, respectively), but this was not statistically significant. Similarly, the area under the curve (AUC) values for plasma glucose levels during the iGTT were significantly increased in all HFD groups compared to control group (**Figure 4a**). These results demonstrated that glucose intolerance in control HFD fed mice was not ameliorated by freeze-dried jaboticaba peel powder treatments.

The contribution of insulin sensitivity in the glucose intolerance was investigated by determining the clearance of plasma glucose as a function of time after insulin injection (ITT). This measure of whole body insulin sensitivity can be expressed by constant rate for glucose disappearance (K_{ITT}); larger values indicate greater tissue insulin sensitivity. Notably, mice fed on HFD plus freeze-dried jaboticaba peel powder showed significant increase in K_{ITT} values compared to mice fed the HFD and the K_{ITT} did not differ from the control group (**Figure 4b**). These data suggest that freeze-dried jaboticaba peel powder may prevent HFD induced insulin resistance (IR) in mice.

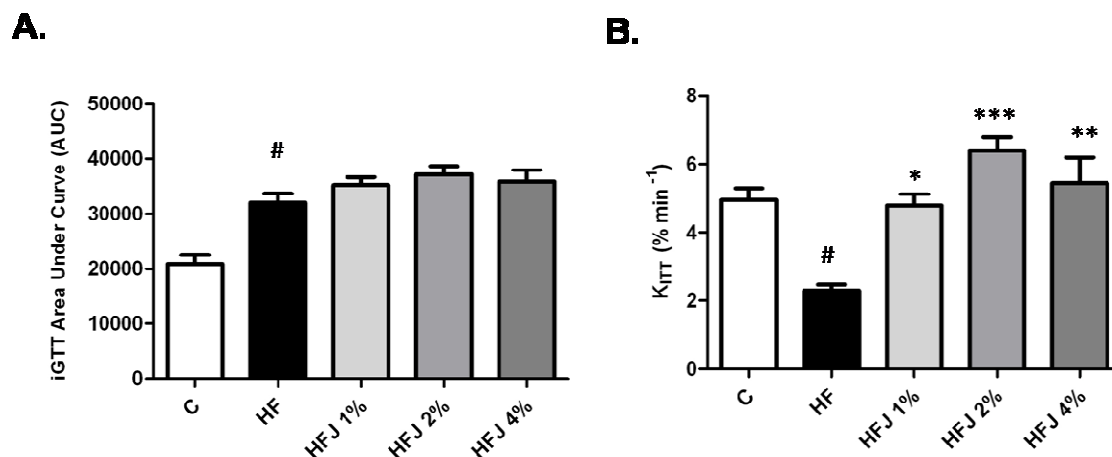
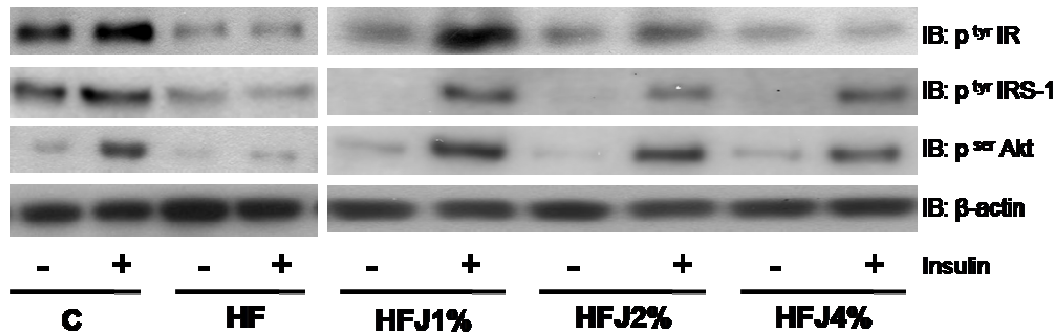


Figure 4. Glucose areas under curves during intraperitoneal glucose tolerance test (iGTT [AUC]) (A) and K_{ITT} during intraperitoneal insulin tolerance test (B) were determined in C, HF, HFJ1%, HFJ2% and HJ4% groups after 10 and 11 weeks of the experiment, respectively. Bars represent means $\pm$ S.E.M. of $n = 6$ mice. [#] $p < 0.05$, HF vs C group; ^{*} $p < 0.05$, HF1% vs HF group; ^{***} $p < 0.001$, HF1% vs HF group; ^{**} $p < 0.01$, HF4% vs HF group.

In order to evaluate candidate mechanisms responsible for the enhancement of insulin sensitivity of the freeze-dried jaboticaba peel powder treatments, we examined insulin signaling through the IR/IRS1/Akt/FoxO pathway in liver and adipose tissue of mice. Impairment in all steps of the insulin signaling cascade was detected in HF control group. As shown in **Figure 5**, significant improvement in insulin signal transduction was observed through the increased insulin-mediated tyrosine phosphorylation of IR, IRS-1 and Akt in liver and adipose tissue and in threonine phosphorylation of FoxO in liver of mice treated with freeze-dried jaboticaba peel powder when compared with HF control mice.

A. Adipose tissue



B. Liver

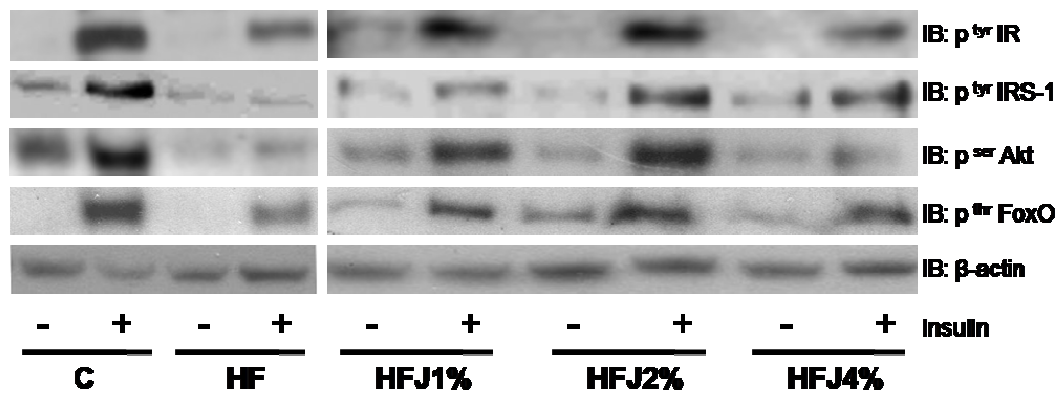


Figure 5. Representative immunoblots of insulin signaling proteins in adipose tissue (A) and liver (B) of C, HF, HFJ1%, HFJ2% and HFJ4% groups before (-) or after (+) insulin stimulation. Tissues extracts from mice were prepared and immunoblotted (IB) with respective antibodies, as described in *Materials and Methods*. The membrane was stripped and immunoblotted with anti-β-actin antibody and used as loaded protein (lower panels in figures A and B).

Because previous studies have shown that chronic activation of intracellular proinflammatory pathways within the insulin target cells might contribute to the obesity-related insulin resistance we decided to evaluate whether freeze-dried jaboticaba peel powder can modulate HFD-induced inflammation. Remarkably, the protein and mRNA expression of the cytokine IL-1β in adipose tissue and liver of

HFJ1% and HFJ4% groups were significantly reduced, in HFJ2% group, we also observed this trend but it was not significantly different from HF control group (**Figures 6a and 6b**). This effect was accompanied by a significant decrease in phosphorylated-IkB α protein levels in liver of all mice treated with freeze-dried jaboticaba peel powder (**Figure 6c**).

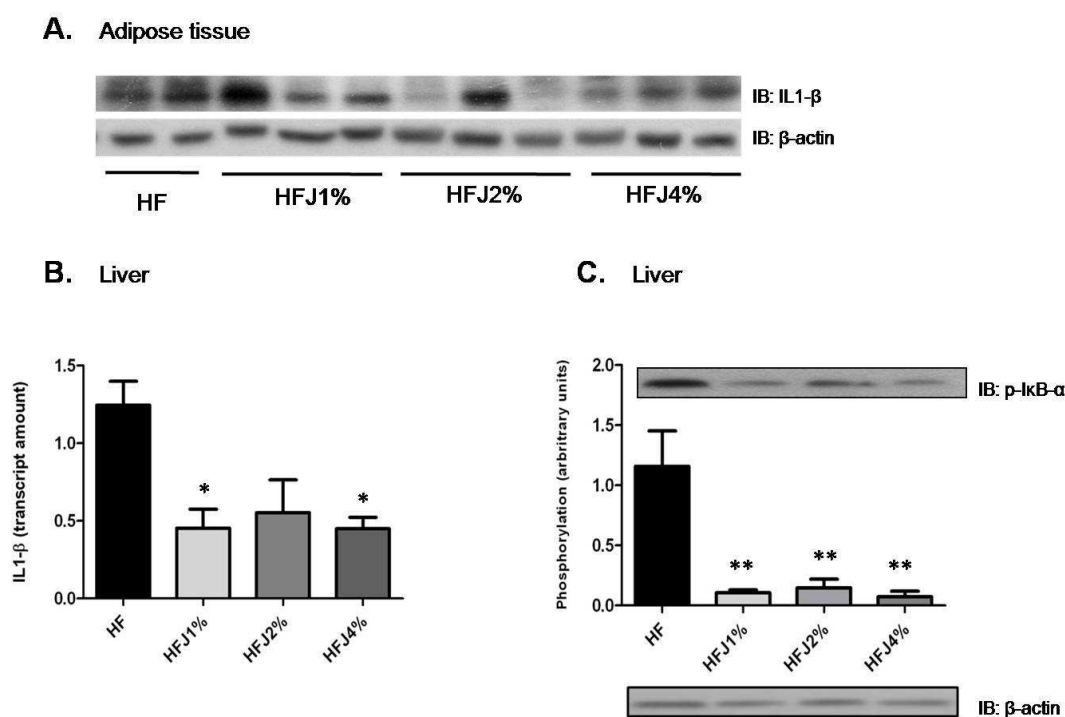


Figure 6. Immunoblot analysis of IL-1 β in adipose tissue (A) extracts of C, HF, HFJ1%, HFJ2% and HJ4% groups. The membrane was stripped and immunoblotted with anti- β -actin antibody and used as loaded protein (lower panel in figure A). Transcript amount of IL-1 β in liver of HF, HFJ1%, HFJ2% and HJ4% groups (B) was determined by real-time PCR, as described in *Materials and Methods*. Bars represent means $\pm$ S.E.M, n=4; *p < 0.05 vs HF group. The phosphorylation of IkB in liver of HF, HFJ1%, HFJ2% and HJ4% groups (C) was determined by immunoblot (representative blot). The results of scanning

densitometry are expressed as arbitrary units. Bars represent means $\pm$ S.E.M. B, n=4; **p < 0.01 vs HF group.

DISCUSSION

Recently, much attention has been focused on natural bioactive phytochemicals present in foods that may provide desirable health benefits beyond basic nutrition and play important roles in the prevention of chronic disorders and metabolic diseases including obesity. The potential of bioactive components to treat or prevent obesity is under intense exploration, and this represents an attractive and alternative strategy for developing future of more safe anti-obesity approaches (22, 23).

Although in recent years, emerging reports have been evidenced the importance of anthocyanins as dietary antioxidants for prevention of oxidative damage, several studies gradually focused on its beneficial effects in preventing obesity and diabetes (24).

The present study demonstrated that supplementation of HFD with freeze-dried jaboticaba peel powder did not produce a significant protection against dietary saturated fat induced increase in body weight gain and in fact, tended to increase cumulative weight gain, accompanied by no difference in food and energy intake. We also observed no changes in serum lipids contents and leptin levels in mice fed on the freeze-dried jaboticaba peel-enriched diets. Similarly, recent studies have also reported that whole freeze-dried powders of concord grapes, blueberry and black raspberry were ineffective in preventing obesity and, in some cases, it could increase body weight gain and adiposity relative to HF fat fed control (25, 12, 13). However, purified ACNs from various sources, including purple

corn, Cornelian cherry, black soybean coats, blueberries and strawberries, have been shown positive responses in HFD-induced obesity, such as decrease in body weight gain, improvement in lipid profile, hyperleptinemia and hyperglycemia to levels similar to mice fed control diet (9-12). Reasons for the differential response between whole foods and purified extracts of ACNs are still not fully elucidated. The possible therapeutic effects of anthocyanins are certainly dependent on sufficient bioavailability and not on the exact amount of ACNs consumed (26). Possibly other components present in whole food matrix may reduce the rate of absorption and bioactivity of ACNs counteracting in some way to prevent any protective effect against obesity.

The freeze-dried jaboticaba peel powder supplementation did not attenuate HFD-induced hyperglycemia as well, which was reflected in a larger incremental area under the curve iGTT_[AUC] of the plasma glucose. The pathogenesis of glucose intolerance is complex and is mainly a function of the interplay between insulin sensitivity and endocrine pancreatic function (27). In this study, in an attempt to clarify whether impaired insulin secretion or decreased insulin sensitivity is the primary defect of hyperglycemia after intraperitoneal glucose load, we evaluated the insulin sensitivity by the iITT method. We demonstrated that mice fed on HFJ diets for 6 weeks were protected from IR based on significant increase in K_{ITT} when compared with HFD control group. The K_{ITT} value reflects the rate of glucose removal by increased glucose uptake in insulin-sensitive tissues, particularly skeletal muscle, and suppression of hepatic glucose production in response to exogenous insulin.

The molecular action and mechanisms of the ACNs responsible for amelioration of insulin sensitivity and prevention of obesity are not fully understood. Possible suggested mechanisms have included improvement of insulin sensitivity via up-regulation of glucose transporter 4 (GLUT 4) accompanied by down-regulation of retinol binding protein 4 (RBP4) in type 2 diabetic mice (28) and by inhibition of the inflammatory adipocytokines expression [interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor- α (TNF- α) and monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1)] and decreased nuclear factor κ B (NF κ B) activity in white adipose tissue in high-fat-fed mice (25, 29).

To address the molecular action and possible mechanisms by which freeze-dried jaboticaba peel powder treatments ameliorates insulin sensitivity, we evaluated key molecular steps of the insulin signaling machinery in liver and adipose tissue of treated mice.

The effects of insulin on cell metabolism are mediated by a heterotetrameric receptor expressed in a number of tissues such as liver, adipose and skeletal muscle cells. Binding of insulin to its receptor initiates a cascade of events such as receptor autophosphorylation on tyrosine residues and tyrosine phosphorylation of insulin receptor substrate (IRS) proteins that subsequently activate the downstream signalling pathways. Tyrosine phosphorylation of IRS1 leads to the phosphorylation and activation of Akt, which plays an essential role in translocation of GLUT4 to facilitate the transport of glucose into cells. Akt also mediates the inhibitory effects of insulin on hepatic glucose output by induce phosphorylation of transcriptional factors FoxO that results in nuclear export of FoxO proteins,

transcriptional inactivation and consequently inhibition of key gluconeogenic enzymes, phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) and the glucose-6 phosphatase (G6Pase) (30).

Our results showed that the impaired signal transduction through IR/ IRS1/ Akt/FoxO pathway was completely restored in liver and adipose tissue from freeze-dried jaboticaba peel powder treated mice compared to HFD mice. Enhanced insulin signaling was demonstrated in our study by increased tyrosine phosphorylation of IR, IRS1 and Akt and in threonine phosphorylation of FoxO.

It is now commonly accepted that obesity is characterized by a broad inflammatory response and many inflammatory mediators, overproduced by expanded adipose tissue, may exhibit impact on insulin action contributing significantly to establishment of insulin resistance. TNF- α , IL-6, IL-1 β , and other cytokines, activate various serine kinases, such as Jun N-terminal kinase (JNK) and inhibitors of nuclear factor kappa B kinase (I κ B), which can phosphorylate IRS proteins and possibly other insulin signaling molecules interfering with normal insulin action, creating a state of cellular insulin resistance (31, 32).

The reactive oxygen species (ROS) and oxidative stress, triggered by hyperglycemia, also plays important role in development of insulin resistance. The increases generation of ROS can lead to the activation of multiple stress-sensitive serine/threonine (Ser/Thr) kinase signaling cascades such as I κ B- β , and others resulting in reduced insulin action (33).

Some reports showed that anthocyanins have a potency of the anti-inflammatory activity and the downregulation of some inflammatory adipocytokines expression can contribute to amelioration of diabetic state (25, 28).

Accordingly, the insulin-sensitizing effect of freeze-dried jaboticaba peel powder in the present study were associated with attenuated inflammation manifested as lower expressions of IL-1 β in adipose tissue and liver accompanied by decreased phosphorylated-IkBa protein levels in liver of all treated mice in a dose-independent manner. Similarly, DeFuria et al. (25) demonstrated that blueberry supplementation can protect against whole-body insulin resistance by inhibiting the early inflammatory events in adipose tissue, induced by a high fat diet in mice.

Furthermore, our previous study demonstrated that freeze-dried jaboticaba peel powder has potency of an antioxidant *in vivo* (17). Taken all these information together, our results suggest that one of the possible mechanisms by which the freeze-dried jaboticaba peel powder exerts a protective role against HFD-induced insulin resistance in mice, may be due to ability of jaboticaba anthocyanins exert their effects as free radical scavengers and/or modulate cellular stress signaling processes during inflammation acting as signaling agents by inhibiting the NFkB signal pathway.

Here, we demonstrated that impaired glucose tolerance observed in mice fed the HFJ diets was not due to insulin resistance. It is well known that dietary antioxidants including anthocyanins protect pancreatic beta cells from glucose-induced oxidative stress (34). Thus, further studies should be done in order to

investigate whether freeze-dried jaboticaba peel powder supplementation may be associated with dysfunction of pancreatic islet β cells and inadequate insulin secretion.

In conclusion, the consumption of high fat diet containing freeze-dried jaboticaba peel powder, rich in cyanidin-3-glucoside and delphinidin-3-glucoside, was not quite as effective in reverse the effects of HFD on body weight and glucose intolerance; however, the supplementation was effective to correct diet-induced insulin resistance by improved insulin signal transduction and reduced inflammation in liver and adipose tissue of treated mice.

LITERATURE CITED

- (1) World Health Organization. *Diet, Nutrition and the Prevention of Chronic Diseases: Report of a WHO Study Group*; Technical Report Series 916; WHO: Geneva, Switzerland, 2003.
- (2) Kopelman, P. G. Obesity as a medical problem. *Nature*. **2000**, *404*, 635-643.
- (3) Hu, F. B. Plant-based foods and prevention of cardiovascular disease: an overview. *Am. J. Clin. Nutr.* **2003**, *78*, 544S-551S.
- (4) Dembinska-Kiec, A.; Mykkaänen, O.; Kiec-Wilk, B.; Mykkaönen, H. Antioxidant phytochemicals against type 2 diabetes. *Brit. J. Nutr.* **2008**, *99*, ES109-ES117.
- (5) Liu, R. H. Health benefits of fruit and vegetables are from additive and synergistic combinations of phytochemicals. *Am. J. Clin. Nutr.* **2003**, *78*, 517S-520S.
- (6) Espín, J. C.; García-Conesa, M. T.; Tomás-Barberán, F, A. Nutraceuticals: Facts and fiction. *Phytochemistry*, **2009**, *68*, 2986-3008.
- (7) Kong, J-M.; Chia, L-S.; Goh, N-K.; Chia, T-F.; Brouillard. Analysis and biological activities of anthocyanins. *Phytochemistry*, **2003**, *64*, 923-933.
- (8) Clifford M. N. Anthocyanins—nature, occurrence and dietary burden. *J Sci Food Agric.* **2000**; *80*, 1063-1072.
- (9) Tsuda, T.; Horio, F.; Uchida, K.; Aoki, H.; Osawa, T. Dietary cyanidin 3-O- β -D-glucoside-rich purple corn color prevents obesity and ameliorates hyperglycemia in mice. *J. Nutr.* **2003**, *133*, 2125–2130.
- (10) Jayaprakasam, B.; Olson, L. K.; Schutzki, R. E.; Tai, M. H.; Nair, M. G. Amelioration of obesity and glucose intolerance in high-fat-fed C57BL/6 mice by anthocyanins and ursolic acid in cornelian cherry (*Cornus mas*). *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 243–248.
- (11) Kwon, S. H.; Ahn, I. S.; Kim, S. O.; Kong, C. S.; Chung, H. Y.; Do, M. S.; Park, K. Y. Anti-obesity and hypolipidemic effects of black soybean anthocyanins. *J. Med. Food* **2007**, *10*, 552–556.

- (12) Prior, R. L.; Wu, X.; Gu, L.; Hager, T. J.; Hager, A.; Howard, L. R. Whole berries versus berry anthocyanins: interactions with dietary fat levels in the C57BL/6J mouse model of obesity. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 647–653.
- (13) Prior, R. L.; Wilkes, S.; Khanal, R. C.; Wu, X.; Gu, L.; Hager, T. J.; Hager, A.; Howard, L. R. Dietary black raspberry anthocyanins do not alter development of obesity in mice fed an obesogenic high-fat diet. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 3977-3983.
- (14) Reynertson, K. A.; Wallace, A. M.; Adachi, S.; Gil, R. R.; Yang, H.; Basile, M. J.; D'Armiento, J.; Weinstein, B.; Kennelly, E. J. Bioactive depsides and anthocyanins from jaboticaba (*Myrciaria cauliflora*). *J. Nat. Prod.* **2006**, *69*, 1228-1230.
- (15) Reynertson, K. A.; Yang, H.; Jiang, B.; Basile, M. J.; Kennelly, E. J. Quantitative analysis of antiradical phenolic constituents from fourteen edible *Myrtaceae* fruits. *Food Chem.* **2008**, *109*, 883-890.
- (16) Reeves, P. G. Components of the AIN-93 diets as improvements in the AIN-76A diet. *J. Nutr.* **1997**, *127*, 838-841.
- (17) Leite, A.; Malta, L.; Riccio, M. F.; Eberlin, M.; Pastore, G.; Maróstica-Júnior, M. R. Antioxidant Potential of Rat Plasma by Administration of Freeze-Dried Jaboticaba Peel (*Myrciaria jaboticaba* Vell Berg). *J. Agric. Food Chem.* **2006**, in press.
- (18) Goena, M.; Marzo, F.; Fernández-González, L.; Tosar, A.; Frühbeck, G.; Santidrián, S. Effect of the raw legume *Vicia ervilha* on muscle and liver protein metabolism in growing rats. *Rev. Esp. Fisiol.* **1989**, *45*, 55-60.
- (19) Bonora, E.; Manicardi, V.; Zavaroni, I.; Coscelli, C.; Butturini, U. Relationships between insulin secretion, insulin metabolism and insulin resistance glucose intolerance. *Diabetes Metab.* **1987**, *13*, 116-121.
- (20) Thirone, A. C. P.; Carvalheira, J. B. C.; Hirata, A. E. ; Velloso, L. A.; Saad, M. J. A. Regulation of cbl-associated protein/cbl pathway in muscle and adipose tissues of two animal models of insulin resistance. *Endocrinology.* **2004**, *145*, 281-293.
- (21) Bertelli, D. F.; Araujo, E. P.; Cesquini, M.; Stoppa, G.R.; Gasparotto-Contessotto, M.; Toyama, M. H.; Felix, J. C. V.; Carvalheira, J. B.; Michelini, L. C.; Chiavegatto, S.; Boschero, A. C.; Saad, M. J. A.; Lopes-Cendes, I.; Velloso, L. A. Phosphoinositide-specific inositol polyphosphate 5-phosphatase IV inhibits inositide trisphosphate accumulation in hypothalamus and regulates food intake and body weight. *Endocrinology.* **2006**, *147*, 5385-5399.

- (22) Meydani, M.; Hasan, S. T. Dietary polyphenols and obesity. *Nutrients*. **2010**, *2*, 737-751.
- (23) Yun, J. W. Possible anti-obesity therapeutics from nature – A review. *Phytochemistry*. **2010**, *71*, 1625-1641.
- (24) He, J.; Giusti, M. M. Anthocyanins: Natural colorants with health-promoting properties. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* **2010**, *1*, 163-187.
- (25) DeFuria, J.; Bennett, G.; Strissel, K. J.; Perfield, J. W.; Milbury, P. E.; Greenberg, A. S.; Obin, M. S. Dietary blueberry attenuates whole-body insulin resistance in high fat-fed mice by reducing adipocyte death and its inflammatory sequelae. *J. Nutr.* **2009**, *139*, 1510-1516.
- (26) McGhie, T. K.; Walton, M. C. The bioavailability and absorption of anthocyanins: Towards a better understanding. *Mol. Nutr. Food Res.* **2007**, *51*, 702-713.
- (27) Båvenholm, P. N.; Pigon, J.; Östenson, C-G.; Efendic, S. Insulin sensitivity of suppression of endogenous glucose production is the single most important determinant of glucose tolerance. *Diabetes*. **2001**, *50*, 1449-1454.
- (28) Sasaki, R.; Nishimura, N.; Hoshino, H.; Isa, Y.; Kadowaki, M.; Ichi, T.; Tanaka, A.; Nishiumi, S.; Fukuda, I.; Ashida, H.; Horio, F.; Tsuda, T. Cyanidin 3-glucoside ameliorates hyperglycemia and insulin sensitivity due to down regulation of retinol binding protein 4 expression in diabetic mice. *Biochem. Pharmacol.* **2007**, *74*, 1619-1627.
- (29) Seymour, E. M.; Lewis, S. K.; Urcuyo-Llanes, D. E.; Tanone, I. I.; Kirakosyan, A.; Kaufman, P. B.; Bolling, S. F. Regular Tart Cherry Intake Alters Abdominal Adiposity, Adipose Gene Transcription, and Inflammation in Obesity-Prone Rats Fed a High Fat Diet. *J Med Food*. **2009**, *12*, 935-942.
- (30) Meshkani, R.; Adeli, K. Hepatic insulin resistance, metabolic syndrome and cardiovascular disease. *Clin. Biochem.* **2009**, *42*, 1331-1346.
- (31) Wellen, K. E.; Hotamisligil, G. S. Inflammation, stress, and diabetes. *J. Clin. Invest.* **2005**, *115*, 1111-1119.
- (32) Olefsky, J. M.; Glass, C. K. Macrophages, inflammation and insulin resistance. *Annu. Rev. Physiol.* **2010**, *72*, 219-246.
- (33) Evans, J. L.; Maddux, B. A.; Goldfine, I. D. The Molecular Basis for Oxidative Stress-Induced Insulin Resistance. *Antioxid. Redox Signal.* **2005**, *7*, 1040-1052.

- (34) Lapidot, T.; Walker, M. D.; Kanner, J. Antioxidant and Prooxidant Effects of Phenolics on Pancreatic β -Cells *in Vitro*. *J. Agric. Food Chem.*, **2002**, *50*, 7220-7225.

CONCLUSÃO

Os resultados deste trabalho permitem concluir que a suplementação da dieta hiperlipídica com casca de jabuticaba liofilizada, durante 6 semanas, não foi eficaz na reversão dos efeitos da dieta hiperlipídica sobre o peso corporal e intolerância à glicose, no entanto, a suplementação reverteu a resistência à insulina por meio da preservação da sinalização da insulina e atenuação da inflamação no fígado e no tecido adiposo dos camundongos tratados. Estes resultados sugerem que a casca de jabuticaba liofilizada pode exercer uma ação protetora contra as patologias associadas à obesidade.

Anexo

Comprovante de Aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal



Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/Unicamp

CERTIFICADO

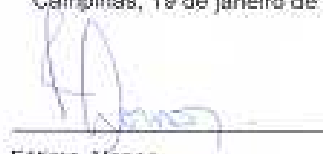
Certificamos que o Protocolo nº 2020-1, sobre "Avaliação do efeito da casca de jabuticaba sobre parâmetros relacionados à síndrome metabólica *in vivo*", sob a responsabilidade de Prof. Dr. Mário Roberto Maróstica Junior / Nathalia Romanelli Vicente Dragano, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/Unicamp em 19 de janeiro de 2010.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 2020-1, entitled "Evaluation of the effect of jabuticaba peel on parameters related to metabolic syndrome *in vivo*", 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 January 19, 2010.

Campinas, 19 de janeiro de 2010.


Prof. Dra. Ana Maria A. Guarnido
Presidente


Fátima Alonso
Secretária Executiva