

KÉLLEN WANESSA COUTINHO VIANA

**EFEITO DO CONSUMO DO EXTRATO FENÓLICO DA CASCA DE
JABUTICABA (*Plinia jaboticaba* (VELL.) O. BERG) NA PREVENÇÃO DA
ATEROSCLEROSE E DA DOENÇA HEPÁTICA GORDUROSA NÃO
ALCOÓLICA EM COELHOS ALIMENTADOS COM DIETA
HIPERCOLESTEROLEMIANTE**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2017

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

V614e
2017

Viana, Kéllen Wanessa Coutinho, 1989-
Efeito do consumo do extrato fenólico da casca de jaboticaba (*Plinia jaboticaba* (Vell.) O. Berg) na prevenção da aterosclerose e da doença hepática gordurosa não alcoólica em coelhos alimentados com dieta hipercolesterolemiantes / Kéllen Wanessa Coutinho Viana. – Viçosa, MG, 2017.
ix, 103f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexo.

Orientador: Paulo César Stringheta.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Tecnologia de alimentos. 2. Jaboticaba. 3. Fenóis.
4. Aorta. 5. Fígado. 6. Colesterol. 7. Colesterol no sangue.
8. Stress oxidativo. I. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Tecnologia de Alimentos. Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos.
II. Título.

CDD 22 ed. 664.804

KÉLLEN WANESSA COUTINHO VIANA

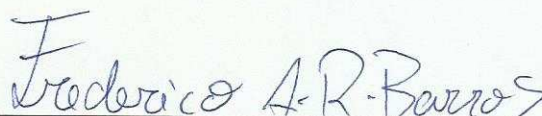
**EFEITO DO CONSUMO DO EXTRATO FENÓLICO DA CASCA DE
JABUTICABA (*Plinia jaboricaba* (VELL.) O. BERG) NA PREVENÇÃO DA
ATEROSCLEROSE E DA DOENÇA HEPÁTICA GORDUROSA NÃO
ALCOÓLICA EM COELHOS ALIMENTADOS COM DIETA
HIPERCOLESTEROLEMIANTE**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

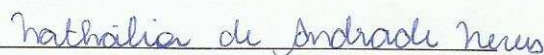
APROVADA: 10 de outubro de 2017.



Monique Renon Eller



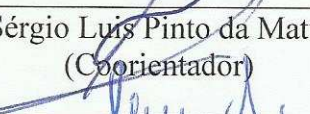
Frederico Augusto Ribeiro de Barros
(Coorientador)



Nathália de Andrade Neves



Adriana Corrêa Mendonça


Sérgio Luis Pinto da Matta
(Coorientador)
Paulo Cesar Stringheta
(Orientador)

*Aos meus amados pais, Delza e José Augusto,
que tanto lutaram pela minha educação,*

DEDICO

*“Eu tentei 99 vezes e falhei, mas
na centésima tentativa eu consegui,
nunca desista de seus objetivos mesmo
que esses pareçam impossíveis, a
próxima tentativa pode ser a vitoriosa. ”*

(Albert Einstein)

AGRADECIMENTOS

A Deus, agradeço por todas as bênçãos, todas as oportunidades concedidas e por sempre colocar pessoas tão especiais em meu caminho.

A minha família, base de tudo que sou. Aos meus pais, Delza e José Augusto, obrigada por todos os sacrifícios que fizeram para que eu chegasse até aqui. Vocês são a minha maior referência de força e de amor. A vocês serei eternamente grata. A minha irmã, Karen, agradeço o incentivo e por sempre estar ao meu lado.

A Universidade Federal de Viçosa e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos pela oportunidade e pela estrutura oferecida para realização deste trabalho. À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

Ao meu orientador, Dr. Paulo Cesar Stringheta, agradeço pela confiança em meu trabalho, pelo incentivo, pelos ensinamentos, por sempre acreditar que eu conseguiria e pela amizade construída ao longo desses anos.

Ao Dr. Sérgio Luis Pinto da Matta, meu coorientador, agradeço pela paciência em me ensinar, por sempre se mostrar disponível, por seus ensinamentos, por ter me acolhido como orientada e por ter cedido, tão gentilmente, o seu laboratório.

Ao Dr. Frederico Augusto Ribeiro de Barros, meu coorientador, agradeço pela parceria, pelos incentivos e pela confiança em meu trabalho.

Aos demais membros da banca, Dr^a Monique Renon Eller, Dr^a Adriana Corrêa Mendonça e Dr^a Nathália de Andrade Neves pela disponibilidade de participação na banca e pelas valiosas contribuições para melhoria do trabalho.

Aos queridos companheiros do laboratório de Corantes Naturais e Compostos Bioativos, o meu mais sincero muito obrigada. Obrigada Juliana, Thaís, Eliana, Mariana, Luciana, Elder, Danielle, Rita e Natália, pelo apoio, pelas discussões, pelo conhecimento compartilhado e, principalmente, pela amizade de todos esses anos. Ao Matheus, pelo seu comprometimento e competência. Agradeço, em especial, ao Jeferson, por ter abraçado meu trabalho como se fosse dele; eu não conseguiria sem você meu amigo.

Aos colegas do Laboratório de Biologia Estrutural agradeço a acolhida, a paciência e os ensinamentos. Agradeço à Fernanda, especialmente, por ter trabalhado junto comigo.

Aos veterinários Ítalo, Adriana, Andres, German e Javier pela prontidão e cuidado com os animais. Ao Rafael pelo auxílio com a ração.

Aos meus queridos amigos Adeline, Driene, Marcela e Jeferson, obrigada pelo companheirismo e companhia constante nesses anos, e por serem minha família em Viçosa.

A todos os professores e funcionários do Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa, pelos momentos compartilhados durante o mestrado e o doutorado.

Agradeço à Dr^a Nísia Andrade Villela Dessimoni Pinto, minha orientadora na graduação, que me inspirou e incentivou a seguir nesse caminho.

Enfim, a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para minha formação pessoal e intelectual e auxiliaram no desenvolvimento desse trabalho, meus sinceros agradecimentos.

RESUMO

VIANA, Kéllen Wanessa Coutinho, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, outubro de 2017. **Efeito do consumo do extrato fenólico da casca de jaboticaba (*Plinia jaboticaba* (Vell.) O. Berg) na prevenção da aterosclerose e da doença hepática gordurosa não alcoólica em coelhos alimentados com dieta hipercolesterolemiantes.** Orientador: Paulo Cesar Stringheta. Coorientadores: Sérgio Luis Pinto da Matta e Frederico Augusto Ribeiro de Barros.

As doenças cardiovasculares e a doença hepática gordurosa não alcoólica têm sido apontadas como problemas de saúde pública. O estresse oxidativo, desencadeado pela dieta hipercolesterolemiantes, exerce papel fundamental na patogênese dessas doenças. A casca da jaboticaba (*Plinia jaboticaba* (Vell.) O. Berg) contém elevado teor de compostos fenólicos, dentre os quais se destacam as antocianinas, que comprovadamente previnem o estresse oxidativo e, por isso, têm sido extensamente estudados. Este trabalho avaliou o efeito da ingestão do extrato fenólico concentrado da casca de jaboticaba (EFCJ) nos marcadores bioquímicos, nos biomarcadores do estresse oxidativo e no desenvolvimento de esteatose e aterosclerose em coelhos. Neste ensaio, 36 coelhos, Nova Zelândia, machos, foram divididos em 6 grupos: ração controle, ração hipercolesterolemiantes (RH), RH + 0,4 mg de EFCJ·kg·dia⁻¹, RH + 0,8 mg de EFCJ·kg·dia⁻¹, RH + 0,8 mg de EFCJ·kg·dia⁻¹ em dias alternados e RH + 0,3 mg de sinvastatina·kg·dia⁻¹. Os animais foram tratados por um período de 50 dias e, ao fim dos tratamentos, foram coletados sangue, fígado e aorta. O EFCJ mostrou ser uma boa fonte de compostos fenólicos totais e antocianinas, exibindo capacidade de neutralizar radicais livres pelos métodos ABST e DPPH. A suplementação com o EFCJ melhorou o perfil dos lipídios plasmáticos; reduziu os níveis de lipase e de gama glutamiltransferase; atenuou os índices aterogênico e de risco coronariano; preveniu a peroxidação lipídica e estimulou a atividade de enzimas antioxidantes no fígado e aorta dos animais. Além disso, o EFCJ atenuou a esteatose hepática e a formação de placa de ateroma nos animais. Assim, o consumo diário do EFCJ minimiza os danos provocados por uma dieta com alta concentração de colesterol, prevenindo o desenvolvimento e progressão da aterosclerose e da DHGNA.

ABSTRACT

VIANA, Kéllen Wanessa Coutinho, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, October, 2017. **Jaboticaba peel phenolic extract on the prevention of atherosclerosis and non-alcoholic fatty liver disease in rabbits fed a hypercholesterolemic diet.** Advisor: Paulo Cesar Stringheta. Co-Advisors: Sérgio Luis Pinto da Matta and Frederico Augusto Ribeiro de Barros.

Cardiovascular diseases and non-alcoholic fatty liver disease have been identified as public health issues. Oxidative stress, triggered by hypercholesterolemic diet, plays a fundamental role in the pathogenesis of these diseases. Jaboticaba (*Plinia jaboticaba* (Vell.) O. Berg) peel has a high content of phenolic compounds, among which anthocyanins, which are proven to prevent oxidative stress, have been extensively studied. This work evaluated the effect of jaboticaba peel phenolic extract (JPFE) on biochemical markers, oxidative stress biomarkers and development of steatosis and atherosclerosis in rabbits. In this trial, 36 rabbits, New Zealand, males, were divided into 6 groups: control diet, hypercholesterolemic diet (HD), HD + 0.4 mg JPFE·kg·day⁻¹, HD + 0.8 mg JPFE·kg·day⁻¹, HD + 0.4 mg JPFE·kg·day⁻¹ on alternate days and HD + 0.3 mg simvastatin·kg·day⁻¹. Animals were treated for 50 days and, at the end of the treatments, blood, liver and aorta were collected. JPFE showed to be a good source of phenolic compounds and anthocyanins, exhibiting the ability to neutralize free radicals by the ABST and DPPH methods. JPFE supplementation improved plasma lipid profile; reduced lipase and gamma glutamyltransferase levels; attenuated atherogenic index and coronary risk index; prevented lipid peroxidation and stimulated antioxidant enzymes activities in the liver and aorta of the animals. In addition, JPFE attenuated hepatic steatosis and atheroma plaque formation. Thus, the daily intake of JPFE can minimize the damage caused by a high cholesterol diet, preventing the development and progression of atherosclerosis and NAFLD.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1 Metabolismo do Colesterol	4
2.2 Aterosclerose	7
2.3 Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica	10
2.4 Compostos Fenólicos na Prevenção de Doenças Cardiovasculares e da Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica	13
2.5 Jabuticaba	16
3 OBJETIVOS	21
3.1 Objetivo Geral	21
3.2 Objetivos Específicos	21
4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	22
ARTIGO I	29
1 Introdução	32
2 Material e métodos	33
2.1 Amostras de jabuticaba	33
2.2 Obtenção do extrato fenólico concentrado da casca de jabuticaba (EFCJ).....	34
2.3 Caracterização química do EFCJ	34
2.3.1 Determinação do conteúdo de compostos fenólicos totais.....	34
2.3.2 Determinação do conteúdo de antocianinas	34
2.3.3 Análises cromatográficas	35
2.3.3.1 Purificação do extrato.....	35
2.3.3.2 Identificação e quantificação de antocianinas por HPLC- MS.....	36
2.3.4 Ensaio antioxidante <i>in vitro</i>	37
2.4 Ensaio biológico	37
2.4.1 Animais e dietas	37
2.4.2 Coleta de sangue e tecido	38
2.4.3 Análise dos parâmetros bioquímicos.....	38
2.4.4 Avaliação de biomarcadores do estresse oxidativo e peroxidação lipídica.....	39
2.4.5 Avaliação histológica da aorta	41
2.5 Análises Estatísticas	41
3 Resultados e Discussão	42
3.1 Caracterização Química do EFCJ.....	42
3.2 Efeito da suplementação com EFCJ no perfil lipídico plasmático e índice aterogênico	44
3.3 Efeito da suplementação com EFCJ nos biomarcadores do estresse oxidativo e peroxidação lipídica.....	51
3.4 Avaliação Histopatológica da Aorta.....	54
4 Conclusões	58
5 Referências Bibliográficas	58

ARTIGO II	64
1 Introdução.....	67
2 Material e métodos	68
2.1 Amostras de jabuticaba	68
2.2 Obtenção do extrato fenólico concentrado da casca de jabuticaba (EFCJ).....	68
2.3 Ensaio biológico	69
2.3.1 Animais e dietas	69
2.3.2 Coleta de sangue e tecido	70
2.3.3 Medidas biométricas	70
2.3.4 Análise dos parâmetros bioquímicos.....	70
2.3.5 Avaliação de biomarcadores do estresse oxidativo e peroxidação lipídica.....	71
2.3.6 Avaliação histológica e morfológica do fígado.....	72
2.4 Análises estatísticas	74
3 Resultados e discussão	75
3.1 Efeito da suplementação com EFCJ na ingestão alimentar e nas medidas biométricas	75
3.2 Efeito da suplementação com EFCJ nos indicadores bioquímicos das funções hepática e pancreática.....	77
3.3 Efeito da Suplementação com EFCJ nos Indicadores Bioquímicos da Função Renal.....	80
3.4 Efeito da suplementação com EFCJ nos biomarcadores do estresse oxidativo e peroxidação lipídica.....	82
3.5 Efeito da suplementação com EFCJ nos parâmetros histopatológicos e morfológicos do fígado	85
4 Conclusões.....	93
5 Referências bibliográficas	93
CONCLUSÕES GERAIS	102

1 INTRODUÇÃO GERAL

Dislipidemia caracteriza a condição patológica em que as concentrações plasmáticas de colesterol total (CT), lipoproteínas de baixa densidade (LDL-c) e de alta densidade (HDL-c) e triacilglicerol (TAG), encontram-se desreguladas. Os baixos níveis de HDL-c e níveis elevados de TAG e LDL-c estão associados ao aumento da incidência de doenças cardiovasculares (DCV) (LEMIEUX et al., 2015). Essa condição está relacionada, ainda, com síndrome metabólica, obesidade e doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) (KOLEVA et al., 2015; ODA, 2017; YANG et al., 2016).

Evidências epidemiológicas têm relacionado fatores como inatividade física e dieta pouco saudável ao desenvolvimento dessas doenças, que, nos últimos anos, têm sido apontadas como problemas de saúde pública. Particularmente, as DCV são consideradas a principal causa de morte no mundo, perfazendo 31 % dos óbitos ao redor do globo (WHO, 2017). Em adição, a DHGNA é cada vez mais reconhecida como a principal causa de doença hepática em todo o mundo, sendo mais prevalente em países cujo padrão dietético inclui alimentação rica em carboidratos e gorduras saturadas (YOUNOSSI et al., 2016). Diante dessas estatísticas, investigações acerca dos determinantes clínicos dessas patologias e o interesse em terapias preventivas vêm sendo intensificados.

O consumo de frutas tem sido inversamente relacionado com o desenvolvimento de doenças crônicas como obesidade, DCV, resistência à insulina, DHGNA e câncer (BASU et al., 2009; JIA et al., 2017; PALA et al., 2017; WU et al., 2006), o que é frequentemente atribuído ao conteúdo de fitoquímicos, especialmente compostos fenólicos, desses alimentos. A habilidade desses compostos, presentes na polpa, sementes e casca dos frutos, de combater os danos decorrentes do estresse oxidativo pode ser considerada a principal justificativa para seu efeito preventivo (CHEN et al., 2010; VERGANI et al., 2017).

Estresse oxidativo é caracterizado pelo desequilíbrio entre a geração de espécies reativas ao oxigênio (ROS, que incluem radicais livres, íons oxigênio e peróxido) e o sistema endógeno de defesa antioxidante, de modo a sobrecarregá-lo. O mecanismo de defesa celular é composto por um sistema redox integrado que compreende as enzimas antioxidantes superóxido dismutase, catalase, glutatona

redutase e glutathiona-s-transferase (LI; HORKE; FÖRSTERMANN, 2014). Como ROS podem reagir prontamente com lipídios, proteínas e DNA, a produção excessiva dessas moléculas em sistemas biológicos exerce papel significativo na patogênese de diferentes doenças como aterosclerose, obesidade e DHGNA (JIANG et al., 2017; SANTOS et al., 2017).

Nesse contexto, as frutas vermelhas se destacam em virtude do seu conteúdo de compostos fenólicos e, principalmente, de antocianinas, que são responsáveis pela sua cor. A ingestão desses compostos tem sido relacionada com redução do estresse oxidativo em diferentes órgãos, redução das concentrações de lipídios plasmáticos, diminuição de esteatose hepática e prevenção de depósito lipídico na aorta (LIU et al., 2008; ZHU et al., 2012; GRAF et al., 2013; TANG et al., 2014).

A jabuticaba (*Plinia jaboticaba* (Vell.) O. Berg) é uma baga globosa com diâmetro entre 2 cm e 3,5 cm, cuja casca madura varia de coloração entre vermelho, roxo-escuro e preto. O fruto é amplamente consumido *in natura*, mas sua elevada perecibilidade limita sua comercialização (MACHADO; COUTINHO; CAETANO, 2007). Cerca de 30 compostos fenólicos já foram previamente isolados ou detectados nesses frutos, sendo as antocianinas os constituintes majoritários dessa classe de compostos (INADA et al., 2015; PLAZA et al., 2016). A maior parte desses fenólicos encontra-se na casca dos frutos (PLAZA et al., 2016), o que fez despertar um interesse especial nessa parte da jabuticaba.

Estudos sobre o efeito benéfico da casca de jabuticaba indicam que a sua ingestão pode auxiliar no controle e progressão de algumas enfermidades. Já foi reportado que o seu consumo pode minimizar o estresse oxidativo resultante da obesidade em alguns órgãos de ratos Sprague–Dawley (BATISTA et al., 2014) e aumentar a resistência à insulina e a concentração plasmática de HDL-C-c na mesma linhagem de animais experimentais (LENQUISTE et al., 2012). Andrade et al. (2015) demonstraram que o extrato da casca de jabuticaba foi capaz de induzir hipotensão associada e relaxamento vascular dependente do endotélio em ratos Wistar. Ainda, Plaza et al. (2016) vincularam a ingestão da casca de jabuticaba à diminuição dos níveis de glicose e insulina em adultos saudáveis. Apesar desses benefícios comprovados, a casca de jabuticaba ainda é subutilizada e usualmente descartada durante o consumo. A sua utilização para a produção de um extrato rico em compostos fenólicos, então, mostra-se interessante.

Considerando que compostos fenólicos podem exercer efeito protetor no desenvolvimento da aterosclerose e da c e que, até essa data, nenhum trabalho sobre o efeito dos polifenóis da casca de jabuticaba na progressão dessas doenças foi divulgado, este estudo objetivou avaliar os efeitos do extrato concentrado da casca de jabuticaba no metabolismo lipídico, na inibição da progressão da aterosclerose e no desenvolvimento da DHGNA em coelhos submetidos à dieta hipercolesterolemiantes.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Metabolismo do Colesterol

Constituinte vital das membranas celulares, o colesterol é precursor de hormônios esteroides, dos ácidos biliares, da vitamina D, além de atuar na fluidez da membrana e na ativação de enzimas aí situadas. Pode ser adquirido através da biossíntese endógena ou absorvido pela dieta e, uma vez no interior do corpo, é submetido a diferentes meios de transporte e armazenamento (PETER e KUBOW, 2009).

A biossíntese *de novo* do colesterol pode ocorrer em todas as células nucleadas, e as hepáticas constituem a fonte de síntese mais expressiva. Os passos da biossíntese do colesterol envolvem uma via complexa com aproximadamente 21 etapas. Em linhas gerais, acetil-CoA é convertida a 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA, que por sua vez é convertido a mevalonato. Isopentil pirofosfato (IPP) é produzido por meio da conversão de mevalonato com concomitante liberação de CO₂. IPP é, então, convertido a esceleno, precursor direto da molécula de colesterol (NELSON e COX, 2008; PLATT et al., 2014).

O colesterol advindo da dieta, por ser hidrofóbico, requer uma série de processos específicos que possibilitem a sua absorção no meio hidrossolúvel do intestino. Além de ser ingerido em menor quantidade em comparação com outros lipídios, o colesterol é absorvido com menor eficiência, o que está associado à sua baixa solubilidade micelar (PETER e KUBOW, 2009).

Uma vez absorvidos, os lipídios são transportados pela corrente sanguínea através de agregados proteicos e lipídicos, as chamadas lipoproteínas. Essas estruturas são compostas por triacilglicerois (TAG), colesterol e seus ésteres e fosfolipídios e, suas proteínas (apolipoproteínas ou apoproteínas) são capazes de aumentar tanto a solubilidade dessas partículas como o seu reconhecimento por enzimas e receptores. As principais classes de lipoproteínas são os quilomícrons (QM), lipoproteína de densidade muito baixa (VLDL-c), lipoproteína de densidade intermediária (IDL-c), lipoproteína de baixa densidade (LDL-c) e lipoproteína de alta densidade (HDL-c) (NELSON e COX, 2008; PETER e KUBOW, 2009, SBC,

2013). O transporte interno de lipídios pode ser dividido em endógeno e exógeno, dependendo se a origem dos compostos é interna ou dietética, respectivamente.

O sistema exógeno inicia-se nas células intestinais com a organização dos lipídios absorvidos da dieta em QM, moléculas que circulam pelo sistema linfático e alcançam a circulação sistêmica pela veia cava superior. Pela ação da lipase lipoproteica, os triacilglicerois no interior dos quilomícrons são hidrolisados, o que resulta em movimento de ácidos graxos para os tecidos e na produção de partículas remanescentes de quilomícrons. Os remanescentes de quilomícrons, compostos por ésteres de colesterol, apo-E e apo-B₄₈, são removidos da circulação por receptores localizados nas células hepáticas e são utilizados na formação de VLDL-c (PETER e KUBOW, 2009; SBC, 2013).

O sistema endógeno tem início com a formação, nos hepatócitos, de VLDL-c, cuja composição inclui TAG, ésteres de colesterol, fosfolipídios e lipoproteínas (apo-B₁₀₀, apo-C_{II}, apo-E). As partículas de VLDL-c são secretadas na circulação e, assim como os QM, sofrem ação da lipase lipoproteica, liberando ácidos graxos que podem ser utilizados como fonte de energia, na síntese de outros lipídios ou, ainda, armazenados nos tecidos. As partículas residuais desse processo são chamadas de VLDL-c remanescentes e são removidas da circulação sanguínea por receptores específicos no fígado. Cerca de metade das VLDL-c remanescentes não são retiradas do plasma e, após a remoção de outras moléculas de TAG, dão origem às IDL-c. O processo catabólico continua e, pela ação da lipase hepática, mais TAG são removidos e ocorre a formação das LDL-c (PETER e KUBOW, 2009, LIEBERMAN e MARKS, 2012; SBC, 2013).

As LDL-c são as lipoproteínas responsáveis pelo transporte de colesterol para os tecidos extra-hepáticos e as concentrações sanguíneas dessas moléculas estão associadas ao risco de doenças cardíacas em geral. É composta principalmente por colesterol e seus ésteres, tem conteúdo de TAG apenas residual, e uma única apolipoproteína, a apo-B₁₀₀. Aproximadamente 60 % das LDL-c são transportadas para o fígado e captadas através da interação da apo-B₁₀₀ com receptores específicos (LDL-R) na membrana celular. Os 40 % restantes dessas partículas são transportados para os tecidos periféricos que contenham LDL-R, o que permite a internalização e utilização do colesterol presente nas LDL-c para produção de hormônios esteroides, síntese de membranas e de vitamina D, por exemplo. Uma elevação anormal dos níveis sanguíneos de LDL-c pode provocar um processo de

saturação nos receptores de células hepáticas e não hepáticas, tornando as partículas de LDL-c disponíveis para a captação por macrófagos, o que pode, no decorrer do processo, iniciar a formação de placa de ateroma (PETER e KUBOW, 2009, LIEBERMAN e MARKS, 2012; SBC, 2013).

O sistema de transporte endógeno inclui também o transporte reverso de colesterol, realizado pela lipoproteína HDL-c. As HDL-c são originadas no fígado, no intestino e no plasma e possuem em sua composição as apolipoproteínas apo-A_I e apo- A_{II}. Essas partículas são responsáveis por captar o colesterol presente nos tecidos transportando-o para o fígado para metabolismo e excreção, processo particularmente benéfico para o tecido vascular pela redução das concentrações desse lipídeo no subendotélio. Inicialmente, o colesterol captado é esterificado por ação da lecitina-colesterolaciltransferase (LCAT), o que é essencial para sua estabilização e transporte pela partícula de HDL-c. O complexo de receptores da caixa ATP-ligante (ABC-A1) facilita o efluxo do colesterol das células para as HDL-c que, uma vez transportado para o fígado, é captado pelos receptores SR-B1 (PETER e KUBOW, 2009, LIEBERMAN e MARKS, 2012; SBC, 2013). As HDL-c podem exercer efeito protetor contra o processo aterogênico, também, por algumas ações que protegem o leito vascular, tais como a remoção de lipídios oxidados das LDL-c, a inibição da fixação de moléculas de adesão e monócitos ao endotélio e a estimulação da liberação de óxido nítrico (SBC, 2013).

A Figura 1 resume o sistema de transporte e metabolismo de lipídios que envolve as vias de transporte exógenas e endógenas.

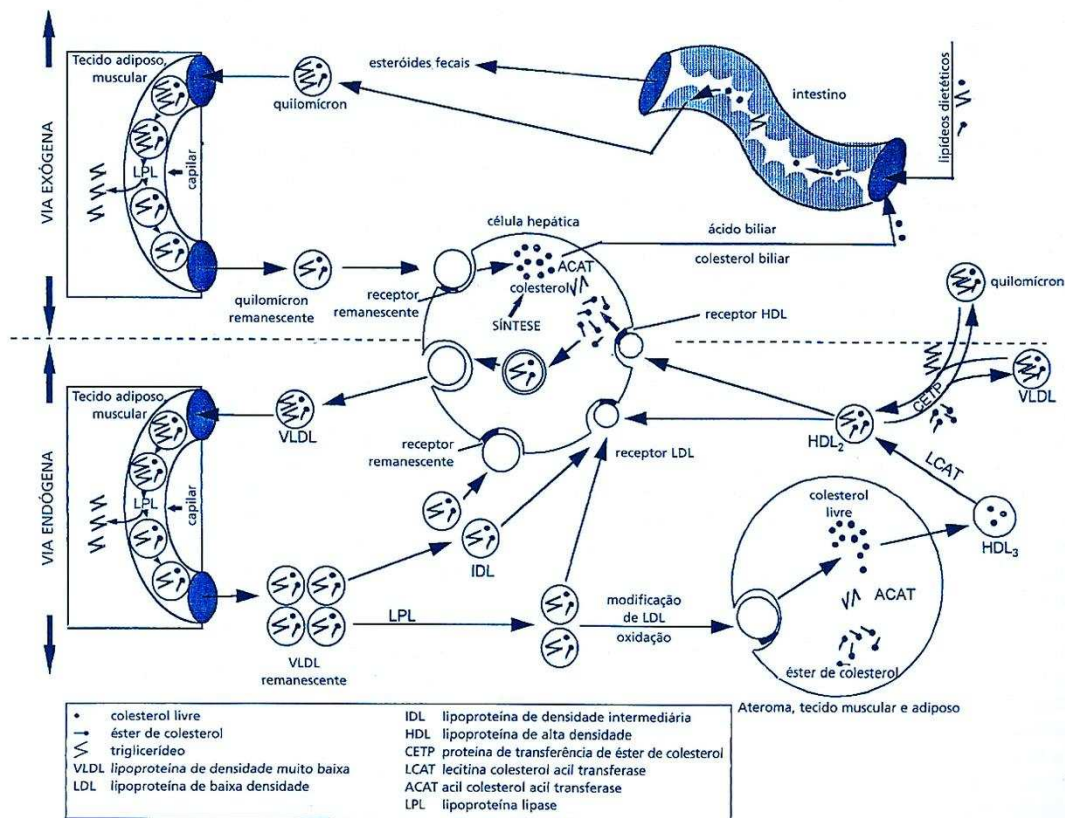


Figura 1 – Vias exógenas e endógenas do transporte de lipídios. Fonte: Peter e Kubow (2009).

2.2 Aterosclerose

As Doenças Cardiovasculares (DCV) representam a principal causa de falecimento no mundo, perfazendo 31 % das mortes ao redor do globo. Cerca de 82 % dos óbitos ocorrem em países de média e baixa renda e 37 % desse total são causadas por DCV (OMS, 2017).

De uma maneira geral, a aterosclerose é considerada a base fisiopatológica para os eventos cardiovasculares. As consequências clínicas da formação de placa de ateroma, como o infarto do miocárdio e o acidente vascular encefálico, associam-se intimamente com determinados fatores de risco cardiovascular, como hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia, diminuição do HDL-c, hipertensão arterial sistêmica, diabetes mellitus e obesidade (SBC, 2013).

A aterosclerose é uma doença inflamatória crônica, complexa, que ocorre em resposta à agressão endotelial e é caracterizada pelo acúmulo de lipídios e outras

entidades químicas, acometendo principalmente a camada íntima de artérias de médio e grande calibre (ROSS, 1999; WANG et al., 2012).

O endotélio saudável (Figura 2A) possui certos mecanismos que atuam na proteção contra a aterosclerose, que envolvem regulação do tônus vascular e da inflamação. As células liberam óxido nítrico (NO) para induzir vasodilatação em resposta aos estimulantes (como agregação plaquetária), para reduzir a expressão de moléculas de adesão (impedir a infiltração de macrófagos) e, também, para diminuir a proliferação de células musculares lisas (DEANFIELD et al., 2007; SIMA et al., 2009; VANHOUTTE, 2009; WANG et al., 2012).

A formação da placa de ateroma tem início com a agressão endotelial vascular, derivada de um conjunto de reações a diversos agressores, dentre eles o excesso de radicais livres, alterações genéticas, a elevação da concentração de homocisteína e de partículas LDL-c no plasma e a presença de LDL-c oxidada (LDL-c-ox) no interior da célula endotelial (ROSS, 1999; CARDOSO et al., 2011; SBC, 2013; WANG et al. 2012). Uma vez acometidas, as células adquirem um fenótipo pró-inflamatório, expressando receptores de quimiocinas, diminuindo a produção de NO, e desregulando proteínas de junção (WANG et al., 2012).

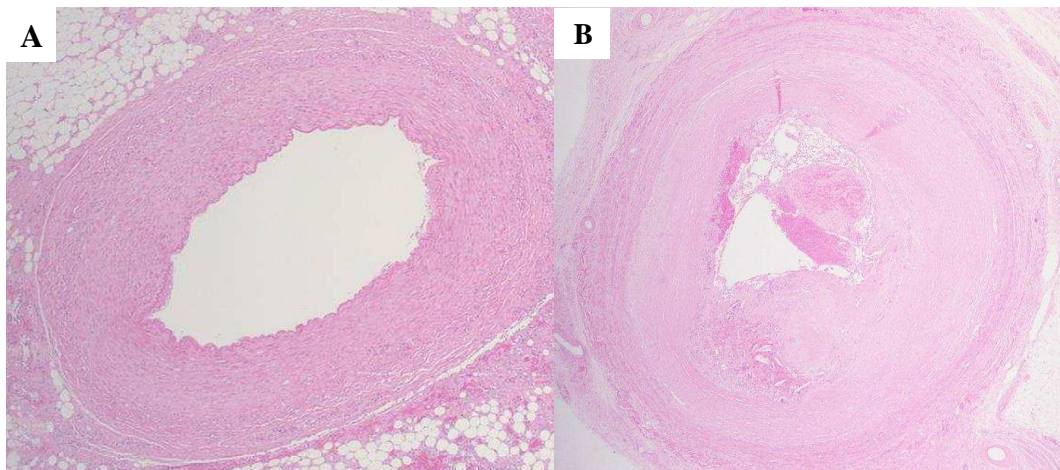


Figura 2 – (A) Artéria coronária normal; (B) Artéria com placa aterosclerótica. Fonte: Adaptado de Wang et al. (2012).

A alta concentração de LDL-c no plasma é a principal responsável pela injúria do endotélio e células musculares lisas adjacentes (CATAPANO e FERRENCE, 2015). Em linhas gerais, ocorre um aumento da permeabilidade da

íntima das artérias às lipoproteínas plasmáticas, favorecendo a retenção das mesmas no espaço subendotelial. O colesterol e fosfolípidios dentro dessas lipoproteínas são susceptíveis a oxidação por enzimas, tais como lipoxigenase, mieloperoxidase, NADPH oxidase e óxido nítrico sintase. Esse processo dá origem às LDL-c-ox, que são citotóxicas, o que resulta em dano epitelial e necrose. A presença das LDL-c-ox estimula a produção de moléculas de adesão leucocitária na superfície endotelial, responsáveis pela atração de monócitos e linfócitos. Os monócitos migram para o espaço subendotelial e se diferenciam em macrófagos, que, por meio de receptores *scavengers*, captam as LDL-c-ox. Esses macrófagos repletos de lipídios são chamados de células espumosas e são o principal componente das estrias gordurosas, lesões macroscópicas iniciais da aterosclerose. A partir daí essas células secretam citocinas, que amplificam a inflamação, e enzimas proteolíticas, capazes de degradar colágeno e outros componentes teciduais locais, mecanismos responsáveis pela progressão da placa aterosclerótica. Além disso, os linfócitos T também atuam se diferenciando e produzindo citocinas que modulam o processo inflamatório local. A resposta inflamatória, então, estimula a migração e proliferação de células musculares lisas da camada média arterial para a íntima, que passam a produzir não só citocinas e fatores de crescimento, mas também matriz extracelular, originando a placa aterosclerótica (ROSS,1999; MCLAREN et al., 2011; MOORE e TABAS, 2011; WANG et al., 2012; SBC, 2013).

As placas ateroscleróticas completamente desenvolvidas podem ser consideradas estáveis ou instáveis. As placas estáveis crescem de maneira mais lenta e caracterizam-se por escassas células inflamatórias, núcleos lipídico e necrótico em menores proporções e predomínio de colágeno. As instáveis desenvolvem atividade inflamatória intensa, com elevada atividade proteolítica, núcleos lipídico e necrótico proeminentes e capa fibrótica tênue. A ruptura dessa capa expõe material lipídico altamente trombogênico, levando à formação de um trombo sobrejacente. Esse processo, também conhecido por aterotrombose, é um dos principais determinantes das manifestações clínicas da aterosclerose (WANG et al., 2012; SBC, 2013). A Figura 3 ilustra o processo de formação da placa aterosclerótica.

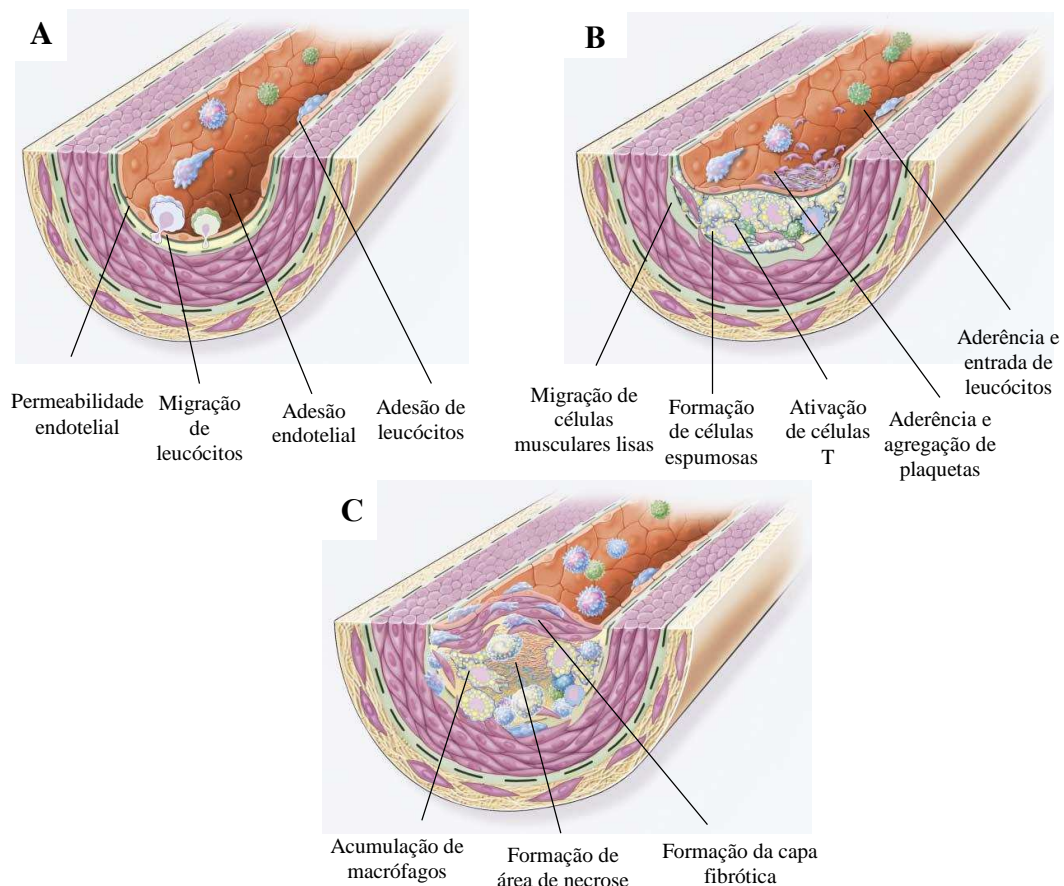


Figura 3 – Formação da placa de ateroma. (A) Disfunção endotelial: Migração de leucócitos e adesão na camada íntima; (B) Formação da célula em espuma e migração de células musculares lisas; (C) Formação da capa fibrosa. Adaptado de Ross (1999).

2.3 Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica

A doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) é a doença hepática mais comum e prevalente em todo o mundo (YOUNOSSI et al., 2016) e é caracterizada por depósito de lipídios nos hepatócitos de indivíduos que não consomem álcool. Pode evoluir para esteatohepatite não alcoólica (NASH), fibrose, cirrose e, em casos mais graves, carcinoma hepatocelular, além de aumentar o risco de doenças metabólicas (BRUNT et al., 2011; MCPHERSON et al., 2015; YANG et al., 2016). DHGNA é uma parte da síndrome metabólica, particularmente na obesidade, hiperlipidemia e diabetes. Devido à alta prevalência, predominantemente no Oriente Médio, América do Sul e África, e às comorbidades

associadas a essa doença, a DHGNA tem sido considerada como problema de saúde pública (YOUNOSSI et al., 2016).

A sua patogênese, embora não completamente elucidada, envolve a interação complexa entre múltiplos fatores, os quais compõem a teoria mais aceita atualmente, a dos múltiplos *hits*. Dentre esses fatores, destacam-se resistência à insulina, acúmulo de lipídios nos hepatócitos, estresse oxidativo e disfunção mitocondrial (CARR; ORANU; KHUNGAR, 2016). A contribuição do padrão dietético para o desenvolvimento da doença é considerável. No geral, pacientes com DHGNA consomem elevadas quantidades de gorduras saturadas, colesterol, carboidratos e menores teores de ácidos graxos poli-insaturados, fibras e antioxidantes (PIMENTEL; LAI, 2016).

A deposição excessiva de lipídios em mais de 5 % dos hepatócitos, evidente na biópsia como gotículas de gordura no citoplasma, é considerada o primeiro episódio (primeiro *hit*) que desencadeia a doença. Esse acúmulo ocorre em virtude de alguns mecanismos principais: lipólise excessiva de depósitos de gordura superficial e visceral, aumento da síntese hepática *de novo*, comprometimento da beta oxidação de ácidos graxos, síntese ou secreção reduzida de VLDL e aumento da ingestão dietética (PIMENTEL; LAI, 2016). O excesso de carboidratos, a partir de fontes alimentares ou de gliconeogênese, também estimula a síntese hepática de ácidos graxos (BASARANOGLU; ORMECI, 2014).

A deposição lipídica eventualmente induz a superprodução de espécies reativas de oxigênio (ROS), dando origem ao estresse oxidativo. Esse aumento na produção de ROS provoca peroxidação lipídica, cujos produtos intermediários, como malondialdeído e 4-hidroxinonenal, são agentes pró-inflamatórios e ativam fibroblastos, favorecendo a fibrogênese. Assim, estresse oxidativo induz inflamação e fibrose (múltiplos *hits*), responsáveis pela evolução das lesões hepáticas (BASARANOGLU; ORMECI, 2014; KATSIKI; MIKHAILIDIS; MANTZOROS, 2016; ROLO; TEODORO; PALMEIRA, 2012). Além disso, estresse oxidativo contribui para a resistência à insulina (BAI et al., 2015), considerada um dos principais fatores de risco para o acúmulo de lipídios e fibrose hepáticos (BYRNE; TARGHER, 2015), e promove a poliploidização patológica, uma alteração genética importante e um dos eventos iniciais da DHGNA, que pode contribuir para o desenvolvimento do carcinoma hepatocelular (GENTRIC et al., 2015).

Em adição à esses fatores, um crescente número de evidências relata a microbiota intestinal como um novo fator ambiental que contribui para o desenvolvimento da DHGNA (HENAO-MEJIA et al., 2012; PORRAS et al., 2017; SHEN et al., 2017). Em linhas gerais, na DHGNA a microbiota intestinal encontra-se alterada e ocorre aumento da permeabilidade intestinal, a partir da qual as bactérias obtêm acesso à circulação sistêmica e liberam citocinas inflamatórias, que promovem esteatose hepática e inflamação (BASHIARDES et al., 2016; HENAO-MEJIA et al., 2012; LV; CHENG; WANG, 2017; PORRAS et al., 2017; SCARPELLINI et al., 2015; SHEN et al., 2017). A Figura 4 ilustra a patogênese da DHGNA.

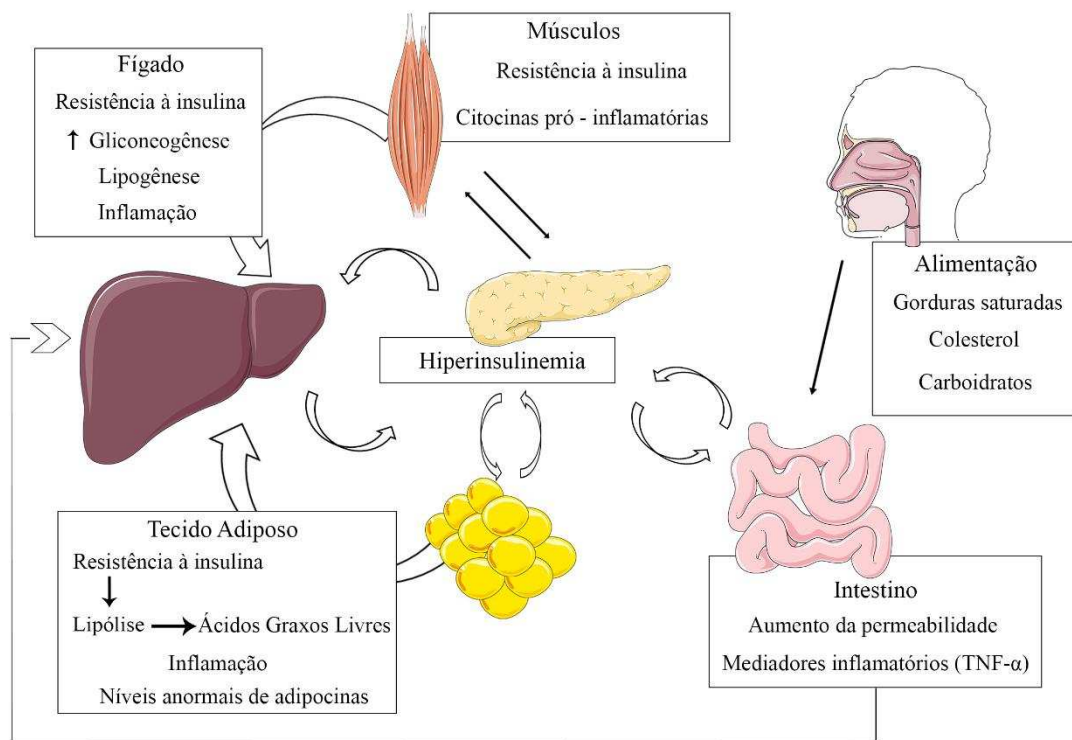


Figura 4 – Patogênese da doença hepática gordurosa não alcoólica. Fonte: Adaptado de Carr; Oranu; Khungar (2016).

Dentre os achados clínicos na DHGNA, a hepatomegalia leve ou moderada é um dos mais frequentes. Em pacientes portadores da doença, a avaliação de parâmetros bioquímicos demonstra hiperlipidemia, hiperglicemia, hiperinsulinemia, menor sensibilidade à insulina. Além disso, as concentrações

séricas das enzimas aspartato amino transferase (AST), alanina amino transferase (ALT), fosfatase alcalina e gamma-glutamil transferase (γ -GT) encontram-se aumentadas. Geralmente, a relação AST/ALT é < 1 , mas a inversão dessa relação para AST/ALT > 1 pode sugerir progressão da DHGNA para cirrose (BASARANOGLU; ORMECI, 2014; CHARATCHAROENWITTHAYA; LINDOR; ANGULO, 2012). Os pacientes com DHGNA podem, ainda, apresentar o espectro completo de anormalidades histopatológicas da doença, variando de esteatose benigna à cirrose, e níveis séricos normais de aminotransferases, acompanhados da elevação em 1,5 vezes nas concentrações de fosfatase alcalina e γ -GT (BASARANOGLU; ORMECI, 2014; NEUMAN; COHEN; NANAU, 2014). Já foi demonstrado também que os níveis séricos de ALT flutuam durante o curso da doença (CHARATCHAROENWITTHAYA; LINDOR; ANGULO, 2012).

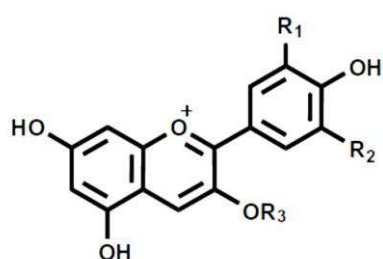
2.4 Compostos Fenólicos na Prevenção de Doenças Cardiovasculares e da Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica

Compostos fenólicos são compostos originados do metabolismo secundário de plantas e exercem a função de defesa nesses vegetais. Em humanos, representam um dos mais importantes grupos de substâncias não nutrientes da dieta e são considerados antioxidantes mais potentes que as vitaminas C e E (KONDAKÇI et al., 2013; QUIÑONES; MIGUEL; ALEIXANDRE, 2013). O termo “compostos fenólicos” se refere, quimicamente, a compostos que possuem um anel aromático com um grupo hidroxila, enquanto que “polifenóis” podem ter um ou mais anéis aromáticos com mais de um grupo hidroxila. No entanto, esses dois termos são frequentemente utilizados indistintamente na literatura científica com sinônimos (ZHANG; TSAO, 2016).

Os principais compostos fenólicos encontrados em alimentos podem ser categorizados em flavonoides, lignanos, ácidos fenólicos e stilbenos (TANGNEY; RASMUSSEN, 2013), dentro os quais as antocianinas têm chamado atenção nos últimos anos.

Antocianinas constituem o maior grupo de pigmentos hidrossolúveis difundido no reino vegetal, sendo responsáveis pelas nuances de azul, roxo, vermelho e laranja em muitas flores, frutas e folhas. Pertencem à classe dos

flavonoides e, fundamentalmente, são glicosídeos polihidroxilados ou polimetoxilados ou acilglicosídeos de antocianidinas, derivados do cátion flavilium (2-fenilbenzopirilum). Já foram identificadas, após isolamento a partir de extratos de plantas, mais de 700 estruturas de antocianinas, dentre as quais seis agliconas ocorrem com mais frequência: pelargonidina, peonidina, cianidina, malvidina, petunidina e delphinidina (Figura 5) (FERNANDES et al., 2013).



Antocianina	R ₁	R ₂
Delphinidina	OH	OH
Petunidina	OCH ₃	OH
Malvidina	OCH ₃	OCH ₃
Cianidina	OH	H
Peonidina	OCH ₃	H
Pelargonidina	H	H

Figura 5 - Representação da estrutura geral de antocianinas (forma flavilium). R₃ é um açúcar. Adaptado de Fernandes et al. (2013).

Evidências epidemiológicas levam a crer que exista uma associação entre o consumo de uma dieta rica em polifenóis e a diminuição do risco de DCV (MINK et al., 2007; MCCULLOUGH et al., 2012; CASSIDY et al., 2013 e DEL RIO et al., 2013). Um estudo acompanhou, por 16 anos, 34.489 mulheres saudáveis no período pós menopausa e foi observada uma associação inversa entre o consumo de antocianinas, DCV e doença arterial coronariana (MINK et al., 2007). Um outro trabalho encontrou correlação inversa entre um alto consumo de flavonoides (512 mg/dia versus 94 mg/dia) e o risco de morte por DCV em cerca de 100.000 homens e mulheres com aproximadamente 70 anos, monitorados por 7 anos (MCCULLOUGH et al., 2012).

A associação entre o consumo de polifenóis e a prevenção da DHGNA também já foi estabelecida. Guo et al. (2014) observaram que o consumo diário de suco de bayberry, que contém altas concentrações de polifenóis, pode proteger adultos entre 18 e 25 anos contra a DHGNA, melhorando o estado antioxidante do plasma e inibindo as respostas inflamatórias e apoptóticas envolvidas na doença.

Em outro estudo, a suplementação diária com 500 mg de resveratrol, por 12 semanas, em pacientes portadores de DHGNA, resultou em redução significativa das concentrações da enzima hepática ALT, de citocinas inflamatórias, da atividade do fator nuclear κ B, e do grau de esteatose hepática (FAGHIHZADEH et al., 2014).

Estresse oxidativo e inflamação exercem um papel fundamental na formação e progressão da aterosclerose e da DHGNA. A habilidade dos compostos fenólicos em limitar dano oxidativo e inflamatório constitui o principal mecanismo de ação que pode justificar sua atuação na prevenção dessas doenças (KRUGER et al., 2014; RAFIEI; OMIDIAN; BANDY, 2017). Estudos *in vitro* e *in vivo* demonstraram que polifenóis atuam sequestrando radicais superóxidos (O_2^-), radicais hidroxil e espécies reativas de oxigênio em geral, além de suprimir a peroxidação lipídica e restaurar a atividade de antioxidantes endógenos (ALI; ALMAGRIBI; AL-RASHIDI, 2015; CHEN et al., 2010; RAFIEI; OMIDIAN; BANDY, 2017; VERGANI et al., 2017; YI et al., 2010, 2012). Além disso, esses compostos promovem um aumento adaptativo de enzimas antioxidantes, como superóxido dismutase e catalase, inibem enzimas formadoras de ROS, como lipoxigenases e NADPH oxidase, e reduzem a resposta inflamatória através da interferência com a cascata inflamatória (ALVAREZ-SUAREZ et al., 2014; BRÄUNLICH et al., 2013; CHIANG et al., 2006; KNAUP et al., 2009; RAJASEKARAN; KALAIIVANI, 2011; ZHANG; TSAO, 2016). Dessa forma, podem prevenir a oxidação de LDL-c e, conseqüentemente, a lesão oxidativa às células endoteliais e, ainda, prevenir danos hepáticos provocados por radicais livres em excesso que, eventualmente, ativam a cascata de inflamatória que desencadeia a DHGNA.

Os mecanismos pelos quais compostos fenólicos exercem efeito protetor contra o processo inflamatório incluem modulação e regulação de moléculas pró-inflamatórias como moléculas de adesão e citocinas, modulação da atividade de enzimas pró-inflamatórias como a óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e a cicloxigenase, e modulação da expressão de genes pró-inflamatórios (GARCÍA-LAFUENTE et al., 2009; KRUGER et al., 2014; ABOONABI e SINGH, 2015; APPEL et al., 2015; JUNG et al., 2015). Ademais, já foi demonstrado que polifenóis promovem diminuição das concentrações séricas de LDL-c, LDL-c-ox, colesterol e glicose, diminuição da peroxidação lipídica, aumento das concentrações de HDL-C e da capacidade antioxidante do plasma, além de diminuir a progressão de fibrose

e de esteatose no tecido hepático (LIU et al., 2008; RUEL et al., 2008; BASU et al., 2009; QIN et al., 2009; ALVAREZ-SUAREZ et al., 2014; WANG et al., 2015; SONG et al., 2016).

As evidências disponíveis na literatura científica sugerem que frutas ricas em antocianinas e outros compostos fenólicos podem atuar na proteção contra DCV e DHGNA. Nesse contexto destaca-se a jabuticaba, fruto originalmente brasileiro, que representa uma importante fonte de nutrientes e de compostos fitoquímicos como as antocianinas.

2.5 Jabuticaba

A jabuticabeira é uma espécie frutífera nativa do Brasil, encontrada desde o estado do Pará até o Rio Grande do Sul, com ocorrência mais ampla nos estados do Sudeste. Pertence ao gênero *Plinia*, composto por pelo menos nove espécies, dentre as quais destacam-se a *Plinia cauliflora* (Mart.) Kausel e a *Plinia jaboticaba* (Vell.) O. Berg, popularmente conhecidas como “jabuticaba paulista” e “jabuticaba sabará”, respectivamente (GBIF, 2017; DONADIO, 2000). Os frutos, carregados diretamente no tronco e galhos da árvore, são produzidos uma ou, mais raramente, duas vezes ao ano, geralmente entre os meses de agosto e novembro, e amadurecem dentro de 40 a 60 dias.

A jabuticaba, fruto da jabuticabeira, é uma baga globosa com diâmetro entre 2 cm e 3,5 cm, cuja casca madura varia de coloração entre vermelho, roxo-escuro e preto. A polpa, de cor branca, é caracterizada como mucilaginosa, agridoce e pode conter entre 1 a 4 sementes (WU; LONG; KENNELLY, 2013). O fruto é amplamente consumido *in natura*, mas o seu processamento é comum e dá origem a produtos como geleia, licor, sorvete, aguardente, vinho de jabuticaba e vinagre (INADA et al., 2015). A elevada perecibilidade dos frutos limita sua comercialização, uma vez que, em apenas 2 dias após a colheita, ocorre perda de água, deterioração física e microbiológica, e fermentação da polpa, resultando em uma rápida alteração da aparência e do sabor (DONADIO, 2000; WU; LONG; KENNELLY, 2013).

Apesar de pequenas diferenças entre as variedades, os frutos de jabuticaba possuem em sua composição água, carboidratos (principalmente glicose e frutose),

proteínas, fibras, minerais (especialmente K, P e Mg), vitaminas (ácido ascórbico em maior quantidade) e compostos fenólicos (CLERICI; CARVALHO-SILVA, 2011; RUFINO et al., 2010, 2011; ALEZANDRO et al., 2013; WU; LONG; KENNELLY, 2013; GURAK et al., 2014; INADA et al., 2015; LENQUISTE et al., 2015). Cerca de 30 compostos fenólicos já foram previamente isolados ou detectados nesses frutos (WU; LONG; KENNELLY, 2013), sendo as antocianinas os constituintes majoritários dessa classe de compostos, atingindo entre 732, 77 mg·100 g⁻¹ e 2599,3 mg·100 g⁻¹ dependendo do método de avaliação (LEITE-LEGATTI et al., 2012; BATISTA et al., 2014; LENQUISTE et al., 2015). A maior parte desses fenólicos encontra-se na casca dos frutos (INADA et al., 2015); o que faz despertar um interesse especial a essa parte da jabuticaba, apesar de que, usualmente, elas são descartadas quando o fruto é consumido.

A casca da jabuticaba contém elevados teores de polifenóis que contribuem para seu potente potencial antioxidante (BATISTA et al., 2014; INADA et al., 2015). Cianidina-3-glucosídeo e delphinidina-3-glicosídeo são as antocianinas encontradas em maior quantidade, perfazendo cerca de 1970 mg·100·g⁻¹ e 630 mg·100·g⁻¹, respectivamente. (LEITE et al., 2011; LEITE-LEGATTI et al., 2012; LENQUISTE et al., 2012), mas já foi relatada a presença de peonidina-3-glicosídeo e sua aglicona (WU; LONG; KENNELLY, 2013). Dentre os flavonoides não antocianínicos, quercetina destaca-se como componente majoritário (54,96 mg·100 g⁻¹ a 115,7 mg·100·g⁻¹) (WU et al., 2012; WU; LONG; KENNELLY, 2013; BATISTA et al., 2014). Além desses fenólicos, pyranocianina B, isoquercitrina, quercimeritrina, quercitrina, rutina, mircitrina, ácido cinâmico, ácido O-cumárico, ácido protocatecuico, protocatecuato de metila, ácido gálico e ácido elágico já foram identificados (REYNERTSON et al., 2006, 2008; ABE; LAJOLO; GENOVESE, 2012; WU et al., 2012; ALEZANDRO; GRANATO; GENOVESE, 2013; BORGES; CONCEIÇÃO; SILVEIRA, 2014; INADA et al., 2015). Em adição, um novo depsídeo (fenólico composto por duas ou mais unidades de aromáticos monocíclicos ligados por uma ligação éster), chamado jaboticabin, foi isolado na espécie *Plinia cauliflora* (REYNERTSON et al., 2006; WU et al., 2013).

O fruto da jabuticabeira, em especial sua casca, ainda foi pouco explorado do ponto de vista científico, principalmente em relação ao potencial efeito benéfico do seu consumo *in vivo*. Alguns estudos, no entanto, foram desenvolvidos com o intuito de avaliar o potencial da jabuticaba. Leite et al. (2011) investigaram o efeito

da ingestão de casca de jabuticaba em pó, por 28 dias, no potencial antioxidante do plasma de ratos Wistar e observaram um aumento significativo da capacidade antioxidante plasmática quando administrados 1 e 2 % do pó, correspondendo a, respectivamente, 259,93 mg·100·g⁻¹ e 519. 7 mg·100·g⁻¹ de antocianinas.

Em outro estudo, ratos machos da linhagem Sprague–Dawley alimentados por um período de 42 dias com dieta hiperlipídica acrescida de diferentes proporções de casca de jabuticaba em pó evidenciaram diminuição do dano oxidativo gerado pela obesidade em diferentes órgãos. Os autores ainda relataram que a ingestão de dietas com 2 % e 4 % do pó de jabuticaba foi capaz de aumentar o status antioxidante do plasma, fígado e cérebro dos animais (BATISTA et al., 2014). Esse mesmo grupo de pesquisa reportou que o consumo de dietas acrescidas de 1 %, 2 % e 4% de casca de jabuticaba por 60 dias reduziu a concentração de insulina sérica e aumentou a resistência à insulina à medida que se elevou a concentração do pó da casca do fruto. Além disso, dietas com 2 % de casca de jabuticaba foram capazes de elevar as concentrações séricas de HDL-C em 41,65 % (LENQUISTE et al., 2012).

Nesse mesmo contexto, Alezandro et al. (2013) estudaram o efeito da ingestão diária, durante 40 dias, por gavagem, do fruto inteiro de jabuticaba em pó (1 g·Kg peso corporal⁻¹ e 2 g·Kg peso corporal⁻¹) em ratos diabéticos. A administração do fruto resultou em diminuição do colesterol plasmático em 32 % e de triacilglicerois em 50 %, em ambas doses testadas, além de aumentar a capacidade antioxidante no plasma e diminuir a peroxidação lipídica em 22 % no plasma e 10 % – 17 % no cérebro dos animais. Um outro trabalho avaliou os efeitos vaso relaxante e hipotensivo do extrato da casca de jabuticaba em ratos machos da linhagem Wistar e foi observado que, na concentração de compostos fenólicos igual a 120 µg·ml⁻¹, o extrato foi capaz de induzir hipotensão associada e relaxamento vascular dependente do endotélio (LOBO DE ANDRADE et al., 2015).

Os dados disponíveis na literatura, ainda que escassos, levam a crer que a jabuticaba, especialmente a sua casca, pode exercer efeito protetor no desenvolvimento de DCV e DHGNA, principalmente em virtude do seu conteúdo de compostos fenólicos e o efeito desses no estresse oxidativo, nas concentrações plasmáticas de lipídios, na pressão sanguínea e na inflamação (Tabela 1).

Tabela 1 – Efeitos biológicos do consumo de jabuticaba descritos na literatura.

Atividade Biológica	Forma de apresentação do fruto	Tipo de Ensaio	Resultados	Referência
Antioxidante plasmático	Casca de jabuticaba em pó	<i>In vivo</i> com ratos saudáveis da linhagem Wistar	Elevação do potencial antioxidante do plasma	Leite et al. (2011)
Aumento da resistência à insulina e dos níveis de HDL	Casca de jabuticaba em pó	<i>In vivo</i> com ratos obesos da linhagem Sprague–Dawley	Elevação da concentração sérica de HDL, redução dos níveis séricos de insulina e melhoria da resistência à insulina	Lenquiste et al. (2012)
Diminuição dos níveis séricos de glicose e HDL	Casca de jabuticaba em pó	<i>In vivo</i> com ratos saudáveis da linhagem Wistar	Diminuição das concentrações plasmáticas de glicose, triglicerídeos, colesterol total e HDL	
Melhora do perfil lipídico e redução do estresse oxidativo	Fruto inteiro em pó	<i>In vivo</i> com ratos diabéticos	Diminuição da concentração sérica de colesterol, triglicerídeos e da peroxidação lipídica no plasma e cérebro, além de aumento da capacidade antioxidante do plasma e da atividade das enzimas do sistema de defesa antioxidante.	Alezandro et al. (2013)
Efeito protetor contra resistência insulínica associada à obesidade	Casca de jabuticaba em pó	<i>In vivo</i> com camundongos da linhagem Swiss	Redução da resistência à insulina	Dragano et al. (2013)
Diminuição do estresse oxidativo e de lipídios circulantes no plasma	Casca de jabuticaba em pó	<i>In vivo</i> com ratos obesos da linhagem Sprague–Dawley	Prevenção da peroxidação no fígado e aumento do status antioxidante no plasma, fígado, cérebro e rins	Batista et al. (2014)
Aumento do status antioxidante e diminuição dos níveis de glicose	Casca de jabuticaba em pó	Ensaio clínico com mulheres e homens saudáveis	Aumento da capacidade antioxidante do plasma e diminuição dos níveis de glicose e insulina	Plaza et al. (2016)

Ainda não existem na literatura relatos da avaliação do consumo de compostos fenólicos da casca da jabuticaba no desenvolvimento e progressão da aterosclerose e da DHGNA, o que estimulou a realização do presente trabalho. Assim, o estudo do efeito da ingestão da jabuticaba no desenvolvimento dessas doenças pode gerar informações relevantes que auxiliarão no entendimento das propriedades protetoras desse fruto.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar os efeitos da ingestão do extrato fenólico concentrado da casca de jaboticaba (*Plinia jaboticaba* (Vell.) O. Berg) na inibição da progressão da aterosclerose e da doença hepática gordurosa não alcoólica em coelhos submetidos à dieta hipercolesterolemiantes.

3.2 Objetivos Específicos

- Obter um extrato da casca de jaboticaba rico em compostos fenólicos e, especialmente, antocianinas;
- Caracterizar o extrato fenólico quanto ao conteúdo de compostos fenólicos totais, antocianinas e capacidade antioxidante;
- Identificar e quantificar, no extrato fenólico da casca de jaboticaba, polifenóis por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE);
- Avaliar o efeito do extrato fenólico da casca de jaboticaba, administrado durante 50 dias, sobre os parâmetros bioquímicos (lipídios, proteínas e enzimas plasmáticas) de coelhos alimentados com dieta hipercolesterolemiantes;
- Avaliar o efeito do extrato fenólico da casca de jaboticaba, administrado durante 50 dias, sobre enzimas que compõem o sistema de defesa antioxidante (superóxido dismutase, catalase e glutatona-S-transferase) nos tecidos hepático e aórtico de coelhos alimentados com dieta hipercolesterolemiantes;
- Avaliar o efeito do extrato fenólico da casca de jaboticaba, administrado durante 50 dias, nas alterações histológicas e morfométricas do tecido hepático de coelhos alimentados com dieta hipercolesterolemiantes;
- Avaliar o efeito do extrato fenólico da casca de jaboticaba, administrado durante 50 dias, nas alterações histológicas e morfométricas do tecido aórtico em coelhos alimentados com dieta hipercolesterolemiantes.

4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABE, L. T.; LAJOLO, F. M.; GENOVESE, M. I. Potential dietary sources of ellagic acid and other antioxidants among fruits consumed in Brazil: Jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba* (Vell.) Berg). **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 92, n. 8, p. 1679–1687, 2012.
- ABOONABI, A.; SINGH, I. Chemopreventive role of anthocyanins in atherosclerosis via activation of Nrf2–ARE as an indicator and modulator of redox. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 72, p. 30–36, 2015.
- ALEZANDRO, M. R. et al. Comparative study of chemical and phenolic compositions of two species of jaboticaba: *Myrciaria jaboticaba* (Vell.) Berg and *Myrciaria cauliflora* (Mart.) O. Berg. **Food Research International**, v. 54, n. 1, p. 468–477, 2013
- ALEZANDRO, M. R.; GRANATO, D.; GENOVESE, M. I. Jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba* (Vell.) Berg), a Brazilian grape-like fruit, improves plasma lipid profile in streptozotocin-mediated oxidative stress in diabetic rats. **Food Research International**, v. 54, n. 1, p. 650–659, 2013.
- ALI, H. M.; ALMAGRIBI, W.; AL-RASHIDI, M. N. Antiradical and reductant activities of anthocyanidins and anthocyanins, structure–activity relationship and synthesis. **Food Chemistry**, v. 194, p. 1275–1282, 2015.
- ALVAREZ-SUAREZ, J. M. et al. One-month strawberry-rich anthocyanin supplementation ameliorates cardiovascular risk, oxidative stress markers and platelet activation in humans. **The Journal of nutritional biochemistry**, v. 25, n. 3, p. 289–94, 2014.
- APPEL, K. et al. Chokeberry (*Aronia melanocarpa* (Michx.) Elliot) concentrate inhibits NF- κ B and synergizes with selenium to inhibit the release of pro-inflammatory mediators in macrophages. **Fitoterapia**, v. 105, p. 73–82, 2015.
- BAI, J. et al. Oxidative stress contributes to abnormal glucose metabolism and insulin sensitivity in two hyperlipidemia models. **International Journal of Clinical and Experimental Pathology**, v. 8, n. 10, p. 13193–13200, 2015.
- BASARANOGLU, M.; ORMECI, N. Nonalcoholic fatty liver disease: Diagnosis, pathogenesis, and management. **The Turkish Journal of Gastroenterology**, v. 25, n. 2, p. 127–132, 2014.
- BASHIARDES, S. et al. Non-alcoholic fatty liver and the gut microbiota. **Molecular Metabolism**, v. 5, n. 9, p. 782–794, 2016.
- BASU, A. et al. Freeze-dried strawberry powder improves lipid profile and lipid peroxidation in women with metabolic syndrome: baseline and post intervention effects. **Nutrition Journal**, v. 7, p. 1–7, 2009.
- BATISTA, Â. G. et al. Intake of jaboticaba peel attenuates oxidative stress in tissues and reduces circulating saturated lipids of rats with high-fat diet-induced obesity. **Journal of Functional Foods**, v. 6, p. 450–461, 2014.
- BORGES, L. L.; CONCEIÇÃO, E. C.; SILVEIRA, D. Active compounds and medicinal properties of *Myrciaria* genus. **Food Chemistry**, v. 153, p. 224–233, 2014.

- BRÄUNLICH, M. et al. Extracts, anthocyanins and procyanidins from *Aronia melanocarpa* as radical scavengers and enzyme inhibitors. **Nutrients**, v. 5, n. 3, p. 663–678, 2013.
- BRUNT, E. M. et al. The NAS and the Histopathologic Diagnosis of NAFLD: Distinct Clinicopathologic Meanings. **Hepatology**, v. 53, n. 3, p. 810–820, 2011.
- BYRNE, C. D.; TARGHER, G. NAFLD: A multisystem disease. **Journal of Hepatology**, v. 62, n. S1, p. S47–S64, 2015.
- CARDOSO, L. M. et al. Efeitos biológicos das antocianinas no processo aterosclerótico Resumo Biological effects of anthocyanins on the atherosclerotic process. **Revista Colombiana de Ciencias Químico - Farmacéuticas**, v. 40, n. 1, p. 116–138, 2011.
- CARR, R. M.; ORANU, A.; KHUNGAR, V. Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Pathophysiology and Management. **Gastroenterology Clinics of North America**, v. 45, n. 4, p. 639–652, 2016.
- CASSIDY, A. et al. A high anthocyanin intake is associated with a reduced risk of myocardial infarction in young and middle-aged women. **Circulation**, 127, n. 2, p. 188–196, 2013.
- CATAPANO, A. L.; FERENCÉ, B. A. IMPROVE-IT and genetics reaffirm the causal role of LDL in Cardiovascular Disease. **Atherosclerosis**, v. 241, n. 2, p. 498–501, 2015.
- CHARATCHAROENWITTHAYA, P.; LINDOR, K. D.; ANGULO, P. The Spontaneous Course of Liver Enzymes and Its Correlation in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. **Digestive Diseases and Sciences**, n. 57, p. 1925–1931, 2012.
- CHEN, C. Y. et al. Delphinidin attenuates stress injury induced by oxidized low-density lipoprotein in human umbilical vein endothelial cells. **Chemico-biological interactions**, v. 183, n. 1, p. 105–12, 2010.
- CHIANG, A. N. et al. Antioxidant effects of black rice extract through the induction of superoxide dismutase and catalase activities. **Lipids**, v. 41, n. 8, p. 797–803, 2006.
- CLERICI, M. T. P. S.; CARVALHO-SILVA, L. B. Nutritional bioactive compounds and technological aspects of minor fruits grown in Brazil. **Food Research International**, v. 44, n. 7, p. 1658–1670, 2011.
- DEL RIO, D. et al. Dietary (Poly)phenolics in Human Health: Structures, Bioavailability, and Evidence of Protective Effects Against Chronic Diseases. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 18, n. 14, p. 1818–1892, 2013.
- DEANFIELD, J. E.; HALCOX, J. P.; RABELINK, T. J. Endothelial function and dysfunction: Testing and clinical relevance. **Circulation**, v. 115, n. 10, p. 1285–1295, 2007.
- DONADIO, L. C. Jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba* (Vell.) Berg). Jaboticabal: FUNEP, 2000. 55p
- DRAGANO, N. R. V. et al. Freeze-dried jaboticaba peel powder improves insulin sensitivity in high-fat-fed mice. **British Journal of Nutrition**, n. 110, p. 447–455, 2013.

- FAGHIHZADEH, F. et al. Resveratrol supplementation improves inflammatory biomarkers in patients with nonalcoholic fatty liver disease. **Nutrition Research**, v. 34, n. 10, p. 837–843, 2014.
- FERNANDES, I. et al. Bioavailability of anthocyanins and derivatives. **Journal of Functional Foods**, p. 1–13, 2013.
- GARCÍA-LAFUENTE, A. et al. Flavonoids as anti-inflammatory agents: Implications in cancer and cardiovascular disease. **Inflammation Research**, v. 58, n. 9, p. 537–552, 2009.
- GBIF. Global Biodiversity Information Facility. GBIF Backbone Taxonomy. Checklist Dataset, 2017.
- GENTRIC, G. et al. Oxidative stress promotes pathologic polyploidization in nonalcoholic fatty liver disease. v. 125, n. 3, p. 981–992, 2015.
- GRAF, D. et al. Anthocyanin-Rich Juice Lowers Serum Cholesterol, Leptin, and Resistin and Improves Plasma Fatty Acid Composition in Fischer Rats. **PLoS ONE**, v. 8, n. 6, p. 1–5, 2013.
- GUO, H. et al. Effects of bayberry juice on inflammatory and apoptotic markers in young adults with features of non-alcoholic fatty liver disease. **Nutrition**, v. 30, n. 2, p. 198–203, 2014
- GURAK, P. D. et al. Jaboticaba Pomace Powder Obtained as a Co-product of Juice Extraction: A Comparative Study of Powder Obtained from Peel and Whole Fruit. **Food Research International**, v. 62, p. 786–792, 2014.
- HENAO-MEJIA, J. et al. Inflammasome-mediated dysbiosis regulates progression of NAFLD and obesity. **Nature**, v. 482, n. 7384, p. 179–185, 2012.
- INADA, K. O. P. et al. Screening of the chemical composition and occurring antioxidants in jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba*) and jussara (*Euterpe edulis*) fruits and their fractions. **Journal of Functional Foods**, v. 17, p. 422–433, 2015.
- JIA, M. et al. Beneficial Effects of Apple Peel Polyphenols on Vascular Endothelial Dysfunction and Liver Injury in High Choline-Fed Mice. **Food & Function**, *in press*, 2017.
- JIANG, Y. et al. Effects of the ethanol extract of black mulberry (*Morus nigra* L.) fruit on experimental atherosclerosis in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 200, p. 228–235, 2017.
- JUNG, H. et al. Anthocyanins in Rubus fruits and antioxidant and anti-inflammatory activities in RAW 264.7 cells. **Food Science and Biotechnology**, v. 24, n. 5, p. 1879–1886, 2015.
- KATSIKI, N.; MIKHAILIDIS, D. P.; MANTZOROS, C. S. Non-alcoholic fatty liver disease and dyslipidemia: An update. **Metabolism: Clinical and Experimental**, v. 65, n. 8, p. 1109–1123, 2016.
- KNAUP, B. et al. Anthocyanins as lipoxygenase inhibitors. **Molecular nutrition & food research**, v. 53, n. 5, p. 617–24, 2009.
- KOLEVA, D. I. et al. Atherogenic Index of Plasma, Castelli Risk Indexes and Leptin/Adiponectin Ratio in Women with Metabolic Syndrome. **International Journal of Pharmaceutical**, v. 6, p. 2348–262, 2015.

- KONDAKÇI, E. et al. Novel pro-oxidant activity assay for polyphenols, vitamins C and E using a modified CUPRAC method. **Talanta**, v. 115, p. 583–589, 15 out. 2013.
- KRUGER, M. J. et al. Proanthocyanidins, anthocyanins and cardiovascular diseases. **Food Research International**, v. 59, p. 41–52, 2014.
- LEITE-LEGATTI, A. V. et al. Jaboticaba peel: Antioxidant compounds, antiproliferative and antimutagenic activities. **Food Research International**, v. 49, n. 1, p. 596–603, 2012.
- LEITE, A. V. et al. Antioxidant potential of rat plasma by administration of freeze-dried jaboticaba peel (*Myrciaria jaboticaba* Vell Berg). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 6, p. 2277–2283, 2011.
- LEMIEUX, I. et al. Total cholesterol/HDL-C cholesterol ratio vs LDL-C cholesterol/HDL-C cholesterol ratio as indices of ischemic heart disease risk in men: the Quebec Cardiovascular Study. **Archives of Internal Medicine**, v. 161, p. 2685–2692, 2015.
- LENQUISTE, S. A. et al. Freeze-dried jaboticaba peel added to high-fat diet increases HDL-C-cholesterol and improves insulin resistance in obese rats. **Food Research International**, v. 49, n. 1, p. 153–160, 2012.
- LENQUISTE, S. A. et al. Jaboticaba peel and jaboticaba peel aqueous extract shows in vitro and in vivo antioxidant properties in obesity model. **Food Research International**, v. 77, p. 162–170, 2015.
- LI, H.; HORKE, S.; FÖRSTERMANN, U. Vascular oxidative stress, nitric oxide and atherosclerosis. **Atherosclerosis**, v. 237, n. 1, p. 208–219, 2014.
- LIEBERMAN, M. A.; MARKS, A. D. Marks's Basic Medical Biochemistry. LWW; 4 ed, 2012.
- LIU, L. K. et al. Mulberry anthocyanin extracts inhibit LDL-C oxidation and macrophage-derived foam cell formation induced by oxidative LDL-C. **Journal of Food Science**, v. 73, n. 6, 2008.
- LOBO DE ANDRADE, D. M. et al. Vasorelaxant and Hypotensive Effects of Jaboticaba Fruit (*Myrciaria cauliflora*) Extract in Rats. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, v. 2015, p. 1–8, 2015.
- LV, G.; CHENG, N.; WANG, H. The Gut Microbiota, Tumorigenesis, and Liver Diseases. **Engineering**, v. 3, n. 1, p. 110–114, 2017.
- MACHADO, N. P.; COUTINHO, E. F.; CAETANO, E. R. Embalagens plásticas e refrigeração na conservação pós-colheita de jaboticaba. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 29, n. 1, p. 166–168, 2007.
- MCCULLOUGH, M. L. et al. Flavonoid intake and cardiovascular disease mortality in a prospective cohort of US adults. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 1 – 4, p. 454–464, 2012.
- MCLAREN, J. E. et al. Cytokines, macrophage lipid metabolism and foam cells: Implications for cardiovascular disease therapy. **Progress in Lipid Research**, v. 50, n. 4, p. 331–347, 2011.
- MCPHERSON, S. et al. Evidence of NAFLD progression from steatosis to fibrosing-steatohepatitis using paired biopsies: Implications for prognosis and clinical

- management. **Journal of Hepatology**, v. 62, n. 5, p. 1148–1155, 2015.
- MINK, P. J. et al. Flavonoid intake and cardiovascular disease mortality: a prospective study in postmenopausal women. **The American journal of clinical nutrition**, v. 85, n. 3, p. 895–909, 2007.
- MOORE, K. J.; TABAS, I. Macrophages in the Pathogenesis of Atherosclerosis. **Cell**, v. 145, n. 3, p. 341–355, 2011.
- NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger principles of biochemistry**. New York: W. H. Freeman , 2008, 1158 p.
- NEUMAN, M. G.; COHEN, L. B.; NANAU, R. M. Biomarkers in nonalcoholic fatty liver disease. **Canadian journal of gastroenterology & hepatology**, v. 28, n. 11, p. 607–18, 2014.
- ODA, E. LDL-C cholesterol was more strongly associated with percent body fat than body mass index and waist circumference in a health screening population. **Obesity Research & Clinical Practice**, *in press*, 2017.
- PALA, D. et al. Açai (*Euterpe oleracea* Mart.) dietary intake affects plasma lipids, apolipoproteins, cholesteryl ester transfer to high-density lipoprotein and redox metabolism: a prospective study in women. **Clinical Nutrition**, *in press*, 2017.
- PETER, J. H.; KUBOW, S. Lipídeos, esteróis e seus metabólitos. In: SHILS et al. **Nutrição Moderna na Saúde e na Doença**. 2. ed. Barueri: Manole, 2009, cap. 5.
- PLATT, F. M. et al. Disorders of cholesterol metabolism and their unanticipated convergent mechanisms of disease. **Annual Review of Genomics and Human Genetics**, v. 15, p. 173–94, 2014.
- PLAZA, M. et al. Characterization of antioxidant polyphenols from *Myrciaria jaboticaba* peel and their effects on glucose metabolism and antioxidant status: A pilot clinical study. **Food Chemistry**, v. 211, p. 185–197, 2016.
- PIMENTEL, C. F. M. G.; LAI, M. Nutrition Interventions for Chronic Liver Diseases and Nonalcoholic Fatty Liver Disease. **Medical Clinics of North America**, v. 100, n. 6, p. 1303–1327, 2016.
- PORRAS, D. et al. Protective effect of quercetin on high-fat diet-induced non-alcoholic fatty liver disease in mice is mediated by modulating intestinal microbiota imbalance and related gut-liver axis activation. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 102, p. 188–202, 2017.
- QIN, Y. et al. Anthocyanin supplementation improves serum LDL-and HDL-cholesterol concentrations associated with the inhibition of cholesteryl ester transfer protein in dyslipidemic subjects. **American journal of clinical nutrition**, v. 90, n. 2, p. 485–492, 2009.
- QUIÑONES, M.; MIGUEL, M.; ALEIXANDRE, A. Beneficial effects of polyphenols on cardiovascular disease. **Pharmacological Research**, v. 68, n. 1, p. 125–131, 2013.
- RAFIEI, H.; OMIDIAN, K.; BANDY, B. Comparison of dietary polyphenols for protection against molecular mechanisms underlying nonalcoholic fatty liver disease in a cell model of steatosis. **Molecular Nutrition & Food Research**, *in press*, 2017.
- RAJASEKARAN, A.; KALAIVANI, M. Antioxidant activity of aqueous extract of *Monascus* fermented Indian variety of rice in high cholesterol diet fed-Streptozotocin

- diabetic rats, an in vivo study. **International Journal of Current Scientific Research**, v. 1, n. 2, p. 35–38, 2011.
- REYNERTSON, K. A. et al. Bioactive depsides and anthocyanins from jaboticaba (*Myrciaria cauliflora*). **Journal of Natural Products**, v. 69, n. 8, p. 1228–1230, 2006.
- REYNERTSON, K. A. et al. Quantitative analysis of antiradical phenolic constituents from fourteen edible Myrtaceae fruits. v. 109, p. 883–890, 2008.
- ROLO, A. P.; TEODORO, J. S.; PALMEIRA, C. M. Role of oxidative stress in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 52, n. 1, p. 59–69, 2012.
- ROSS, R. Inflammation or Atherogenesis. **The New England Journal of Medicine**, v. 340, n. 2, p. 115–126, 1999.
- RUEL, G. et al. Low-calorie cranberry juice supplementation reduces plasma oxidized LDL and cell adhesion molecule concentrations in men. **The British Journal of Nutrition**, v. 99, n. 2, p. 352–359, 2008.
- RUFINO, M. D. S. M. et al. Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. **Food Chemistry**, v. 121, n. 4, p. 996–1002, 2010.
- RUFINO, M. S. M. et al. Free radical scavenging behavior of ten exotic tropical fruits extracts. **Food Research International**, v. 44, n. 7, p. 2072–2075, 2011.
- SANTOS, I. B. et al. Supplementation with *Vitis vinifera* L. skin extract improves insulin resistance and prevents hepatic lipid accumulation and steatosis in high-fat diet-fed mice. **Nutrition Research**, v. 43, p. 69–81, 2017.
- SCARPELLINI, E. et al. The human gut microbiota and virome: Potential therapeutic implications. **Digestive and Liver Disease**, v. 47, n. 12, p. 1007–1012, 2015.
- SHEN, F. et al. Gut microbiota dysbiosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. **Hepatobiliary & Pancreatic Diseases International**, v. 16, n. 4, p. 375–381, 2017.
- SIMA, A. V.; STANCU, C. S.; SIMIONESCU, M. Vascular endothelium in atherosclerosis. **Cell and Tissue Research**, v. 335, n. 1, p. 191–203, 2009.
- SONG, H. et al. Dietary sweet cherry anthocyanins attenuates diet-induced hepatic steatosis by improving hepatic lipid metabolism in mice. **Nutrition**, v. 32, n. 7–8, p. 827–833, 2016.
- TANG, X. et al. Purified Anthocyanins from Bilberry and Black Currant Attenuate Hepatic Mitochondrial Dysfunction and Steatohepatitis in Mice with Methionine and Choline Deficiency. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2014.
- TANGNEY, C. C.; RASMUSSEN, H. E. Polyphenols, inflammation, and cardiovascular disease. **Current Atherosclerosis Reports**, v. 15, n. 5, p. 1–16, 2013.
- VANHOUTTE, P. M. Endothelial dysfunction: the first step toward coronary arteriosclerosis. **Circulation Journal**, v. 73, n. April, p. 595–601, 2009.
- VERGANI, L. et al. Polyphenolic extract attenuates fatty acid-induced steatosis and

oxidative stress in hepatic and endothelial cells. **European Journal of Nutrition**, p. 1–13, 2017.

WANG, T. et al. Atherosclerosis: Pathogenesis and pathology. **Diagnostic Histopathology**, v. 18, n. 11, p. 461–467, 2012.

WANG, H. J. et al. Resveratrol appears to protect against oxidative stress and steroidogenesis collapse in mice fed high-calorie and high-cholesterol diet. **Andrologia**, v. 47, n. 1, p. 59–65, 2015.

WHO. World Health Organization. **Cardiovascular disease**, 2017. Disponível em <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/>>.

WU, S. B. et al. Metabolite profiling of jaboticaba (*Myrciaria cauliflora*) and other dark-colored fruit juices. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 30, p. 7513–7525, 2012.

WU, S. B.; LONG, C.; KENNELLY, E. J. Phytochemistry and health benefits of jaboticaba, an emerging fruit crop from Brazil. **Food Research International**, v. 54, n. 1, p. 148–159, 2013.

WU, L. et al. Antioxidant and antiproliferative activities of red pitaya. **Food Chemistry**, v. 95, p. 319–327, 2006.

YANG, K. C. et al. Association of Non-alcoholic Fatty Liver Disease with Metabolic Syndrome Independently of Central Obesity and Insulin Resistance. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 27034, 2016.

YI, L. et al. Structural requirements of anthocyanins in relation to inhibition of endothelial injury induced by oxidized low-density lipoprotein and correlation with radical scavenging activity. **FEBS letters**, v. 584, n. 3, p. 583–90, 2010.

YI, L. et al. Differential suppression of intracellular reactive oxygen species-mediated signaling pathway in vascular endothelial cells by several subclasses of flavonoids. **Biochimie**, v. 94, n. 9, p. 2035–2044, 2012.

YOUNOSSI, Z. M. et al. Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease—Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. **Hepatology**, v. 64, n. 1, p. 73–84, 2016.

ZHANG, H.; TSAO, R. Dietary polyphenols, oxidative stress and antioxidant and anti-inflammatory effects. **Current Opinion in Food Science**, v. 8, p. 33–42, 2016.

ZHU, W. et al. The anthocyanin cyanidin-3-O- β -glucoside, a flavonoid, increases hepatic glutathione synthesis and protects hepatocytes against reactive oxygen species during hyperglycemia: Involvement of a cAMP-PKA-dependent signaling pathway. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 52, n. 2, p. 314–327, 2012.

ARTIGO I

**EXTRATO FENÓLICO DA CASCA DE JABUTICABA MELHORA O
PERFIL LIPÍDICO SÉRICO E PREVINE A PROGRESSÃO DE
ATEROSCLEROSE EM COELHOS ALIMENTADOS COM DIETA
HIPERCOLESTEROLEMIANTE.**

Extrato fenólico da casca de jabuticaba melhora o perfil lipídico sérico e previne a progressão de aterosclerose em coelhos alimentados com dieta hipercolesterolemiantes.

Kéllen Wanessa Coutinho Viana^{1*}, Sérgio Luis Pinto da Matta², Frederico Augusto Ribeiro de Barros¹, Jeferson dos Santos Silva¹, Mateus Hubner de Andrade Valle¹, Fernanda Carolina Ribeiro Dias², Paulo Cesar Stringheta¹

¹ Laboratório de Corantes Naturais e Compostos Bioativos, Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

²Laboratório de Biologia Estrutural, Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Viçosa.

**Corresponding author*. Endereço: Laboratório de Corantes Naturais e Compostos Bioativos, Avenida P H Rolfs, s/n, Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, 36570-000, Brasil. Tel.: +553138993808. E-mail: kellen.viana@ufv.br

Resumo

Avaliou-se o efeito da administração de diferentes doses do extrato fenólico da casca de jabuticaba (EFCJ) no perfil lipídico sérico, nos biomarcadores do estresse oxidativo e na progressão da aterosclerose em coelhos hipercolesterolêmicos. O EFCJ mostrou-se uma boa fonte de polifenóis, dentre os quais cianidina-3-glicosídeo é o componente majoritário. A capacidade antioxidante do EFCJ correlacionou-se positivamente com o conteúdo de fenólicos, indicando que os efeitos obtidos no ensaio *in vivo* podem ser atribuídos a esses compostos. Para este ensaio, 36 coelhos foram divididos em 6 grupos: ração controle, ração hipercolesterolemiantes (RH), RH + 0,4 mg de EFCJ·kg·dia⁻¹, RH + 0,8 mg de EFCJ·kg·dia⁻¹, RH + 0,4 mg de EFCJ·kg·dia⁻¹ em dias alternados e RH + 0,3 mg de sinvastatina·kg·dia⁻¹. O EFCJ melhorou o perfil dos lipídios plasmáticos, atenuou os índices aterogênico e de risco coronariano, preveniu a peroxidação lipídica e estimulou a atividade de enzimas antioxidantes na aorta. Além disso, demonstrou-se pela primeira vez que o EFCJ atenuou a progressão da aterosclerose. O consumo diário da casca de jabuticaba ou do seu extrato fenólico, então, exerce efeito cardioprotetor e previne o dano oxidativo gerado pela dieta rica em colesterol.

Palavras-chave: *Plinia jabuticaba* (Vell.) O. Berg, estresse oxidativo, cardioprotetor, aorta, peroxidação lipídica, colesterol.

Highlights

- O extrato fenólico da casca de jabuticaba melhorou o perfil lipídico plasmático de coelhos em dieta hipercolesterolemiantes.
- Os índices aterogênico e de risco coronariano foram atenuados pela ingestão do extrato fenólico.
- A administração do extrato fenólico preveniu estresse oxidativo na aorta dos animais.
- O extrato fenólico preveniu a progressão de aterosclerose nos animais.

1 Introdução

As Doenças Cardiovasculares (DCV) representam a principal causa de morte no mundo e, de modo geral, a aterosclerose, é considerada a base fisiopatológica para os eventos vasculares adversos, que incluem infarto do miocárdio, angina instável e acidente vascular encefálico (WHO, 2017). Aterosclerose é uma doença inflamatória crônica, caracterizada pelo acúmulo de lipídios e outros compostos químicos, que acomete, principalmente, a camada íntima de artérias de médio e grande calibre (Ozaki & Almeida, 2013).

Hipercolesterolemia, especialmente altos níveis de lipoproteínas de baixa densidade (LDL-c) no plasma, é tida como o primeiro passo para o desenvolvimento da aterosclerose (Yanni et al., 2015). Além disso, estresse oxidativo tem sido implicado no desenvolvimento e progressão dessa doença (Jiang, Dai, Nie, Yang, & Zeng, 2017). Acredita-se que o dano provocado por espécies reativas ao oxigênio (ROS), originados em demasia pelo estresse oxidativo, às moléculas de LDL-c em excesso, seja responsável pelas fases iniciais da doença aterosclerótica (Liu, Lee, Shih, Chyau, & Wang, 2008). Assim, a redução dos níveis séricos de colesterol total e LDL-c, associada à diminuição do estresse oxidativo, tornam-se etapas primárias na prevenção de aterosclerose e, conseqüentemente, de DCV.

A associação entre aterosclerose e eventos oxidativos levou à hipótese de que antioxidantes dietéticos podem inibir o desenvolvimento da doença, modulando a oxidação de LDL-c e de fatores inflamatórios (Somacal et al., 2015; Kong, Luo, Li, Zhou, & He, 2013). Nesse contexto, os compostos fenólicos destacam-se como a maior classe de antioxidantes encontrados em alimentos de origem vegetal. Já foi demonstrado que polifenóis atuam por meio do aumento da concentração plasmática de lipoproteínas de alta densidade (HDL-c) (Batista et al., 2014), da diminuição da concentração sérica de insulina (Plaza et al., 2016), triacilglicerol (Benn et al., 2015), colesterol (Jiang, Dai, Nie, Yang, & Zeng, 2017) e LDL-c, e redução da susceptibilidade das LDL-c à oxidação (Chen et al., 2010), além de reduzir biomarcadores do estresse oxidativo e promover aumento adaptativo de enzimas antioxidantes, como superóxido dismutase, catalase, glutatona-s-transferase e glutatona redutase (Jia, Ren, Nie, & Yang, 2017).

A jabuticaba (*Plinia jaboticaba* (Vell.) O. Berg) é uma fruta originalmente brasileira e caracteriza-se como uma baga globosa, cuja casca madura varia de

coloração entre vermelho, roxo-escuro e preto. Nos últimos anos, em virtude da sua composição fenólica, a jabuticaba tem despertado interesse da comunidade científica (Wu, Long, & Kennelly, 2013). Os compostos fenólicos encontram-se em maior concentração na casca do fruto, com destaque para as antocianinas, que são os pigmentos responsáveis pela sua coloração (Inada et al., 2015).

O consumo da casca de jabuticaba tem sido vinculado à melhora do perfil lipídico plasmático (Alejandro, Granato, & Genovese, 2013), diminuição dos níveis de glicose e insulina (Plaza et al., 2016), ao aumento da resistência à insulina e da concentração plasmática de HDL-c (Lenquiste, Batista, Marineli, Dragano, & Maróstica, 2012), hipotensão e relaxamento vascular (Lobo de Andrade et al., 2015) e, ainda, à redução do estresse oxidativo em diferentes órgãos (Batista et al., 2014). Esses efeitos são atribuídos aos compostos fenólicos e outros componentes, como fibras, presentes nessa parte do fruto (Batista et al., 2013; Wu, Long & Kennelly, 2013). Embora a casca de jabuticaba seja fonte de polifenóis, comprovadamente benéficos à saúde humana (Plaza et al., 2016), ainda é subutilizada, uma vez que é usualmente descartada durante o consumo. A sua utilização para a produção de um extrato rico em compostos fenólicos, então, mostra-se interessante.

Considerando que compostos fenólicos podem exercer efeito protetor no desenvolvimento da aterosclerose e que, até essa data, nenhum trabalho sobre o efeito dos polifenóis da casca de jabuticaba na progressão dessa doença foi divulgado, este estudo objetivou avaliar os efeitos do consumo do extrato concentrado da casca de jabuticaba no metabolismo lipídico e na prevenção da aterosclerose em coelhos submetidos à dieta hipercolesterolemiantes.

2 Material e métodos

2.1 Amostras de jabuticaba

Os frutos de jabuticaba (*Plinia jaboticaba* (Vell.) O. Berg) foram obtidos no pomar da Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, Brasil (latitude 20° 45' 14" S, longitude 42° 52' 55" W), durante a safra de 2015. Após a colheita, foram selecionados, higienizados com água corrente e mantidos em ultra freezer a -80 °C até o momento do processamento.

2.2 Obtenção do extrato fenólico concentrado da casca de jabuticaba (EFCJ)

As cascas dos frutos, obtidas por descascamento manual, foram pesadas e maceradas numa solução aquosa de etanol 70 % (1:2 m·v⁻¹), e o sistema foi acidificado a pH 2 com ácido fosfórico. A extração dos compostos fenólicos foi realizada sob refrigeração (5 °C), por 24 h (Silva, Stringheta, Teófilo & Oliveira, 2013). Após filtração (Whatman n° 1), o extrato foi concentrado à temperatura máxima de 40 °C em evaporador rotativo à vácuo (RV 10 Digital V, IKA, Alemanha), até eliminação completa do etanol, e o pH ajustado para 4, para utilização no ensaio biológico. O EFCJ foi mantido ao abrigo da luz, em ultra freezer a -80 °C até o momento das análises.

2.3 Caracterização química do EFCJ

Todas as determinações no EFCJ foram realizadas em triplicata para cada repetição (3).

2.3.1 Determinação do conteúdo de compostos fenólicos totais

O conteúdo de compostos fenólicos totais no EFCJ foi determinado pelo método adaptado de Singleton & Rossi (1965), utilizando o reativo de Folin-Ciocalteu. A absorvância das amostras foi medida a 760 nm em espectrofotômetro Shimadzu (UV-VIS 1601 PC, Quioto, Japão) e os resultados expressos em equivalente de ácido gálico (mg AGE·100 mL⁻¹).

2.3.2 Determinação do conteúdo de antocianinas

Antocianinas totais foram quantificadas de acordo com o método proposto por Fuleki & Francis (1968), com algumas adaptações. As leituras espectrofotométricas (Shimadzu UV-VIS 1601 PC, Quioto, Japão) foram realizadas a 535 nm. O conteúdo dos pigmentos foi calculado em função do coeficiente de extinção molar ($\epsilon = 26,900 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) da cianidina-3-glicosídeo, antocianina presente em maior concentração na casca da jabuticaba.

O conteúdo de antocianinas monoméricas também foi determinado, segundo o método do pH diferencial (Lee, Durst, & Wrolstad, 2005). O EFCJ foi diluído em soluções tampão cloreto de potássio $0,025 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, $\text{pH} = 1,0$, e acetato de sódio $0,4 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, $\text{pH} = 4,5$. As amostras ficaram em repouso, no escuro, por 20 min e, então, a absorvância foi medida em 520 e 700 nm em espectrofotômetro Shimadzu UV-VIS 1601 PC, Quioto, Japão). A absorvância foi calculada pela Eq. (1):

$$A = (A_{520 \text{ nm}} - A_{700 \text{ nm}})_{\text{pH}1.0} - (A_{520 \text{ nm}} - A_{700 \text{ nm}})_{\text{pH}4.5} \quad (1)$$

O teor de antocianinas monoméricas ($\text{mg}\cdot 100\cdot\text{mL}^{-1}$) foi expresso em cianidina-3-glicosídeo ($\text{PM} = 449.2 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$), segundo Eq. (2).

$$C = A \times \text{PM} \times \text{FD} \times 10^3 / \epsilon \times l \quad (2)$$

Em que A = absorvância, PM = peso molecular; FD = fator de diluição, ϵ = coeficiente de extinção molar ($26.900 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$), 10^3 = fator de conversão de gramas para miligramas, l = caminho ótico (cm).

2.3.3 Análises cromatográficas

2.3.3.1 Purificação do extrato

Previamente às análises cromatográficas, o EFCJ foi submetido à extração em fase sólida em cartucho Sep-Pak C18 (Waters Corporation, Milford, MA, USA) para remoção de possíveis interferentes, segundo metodologias adaptadas de Pacheco-palencia, Hawken & Talcott (2007) e Willemse, Stander & Villiers (2013). O cartucho foi condicionado com 50 mL de metanol acidificado (0,01 % de HCl) e 50 mL de água destilada acidificada (0,01 % de HCl). Em seguida, uma alíquota de 20 ml do EFCJ foi eluída no cartucho. Foram eluídos 50 mL de água acidificada para remoção de componentes hidrossolúveis. Uma fração predominantemente composta por antocianinas foi separada por meio da eluição de 50 mL de metanol acidificado (0,01 % de HCl).

Os solventes foram evaporados sob vácuo à temperatura de 35 °C e o EFCJ foi ressuspensos em volume conhecido de solução tampão ácido cítrico 0,5 M (pH = 3). A fração do EFCJ ressuspensa foi, então, filtrada em unidades filtrantes com porosidade de 0,45 µm (Merck Millipore, Darmstadt, Alemanha) para remover possíveis partículas em suspensão.

2.3.3.2 Identificação e quantificação de antocianinas por HPLC- MS

A análise de antocianinas no EFCJ foi realizada em sistema Agilent 1100 Series (Agilent, Santa Clara, CA, USA) equipado com um sistema de detecção tipo DAD (G1315B), armadilha de elétrons LC/MSD Trap VL (G2445C VL), sistema de espectroscopia de massas de ionização por eletrospray (ESI-MSn) e coluna de fase reversa Zorbax Eclipse XDB-C18 (2,1 x 150 mm, partículas de 3,5 µm, Agilent, Santa Clara, CA, USA) termostabilizada a 40°C. As análises foram conduzidas conforme metodologia descrita por Rebello et al. (2013). Foram utilizadas duas fases móveis, acetonitrila/água/ácido fórmico (3:88,5:8,5, v·v·v⁻¹ - fase móvel A) e acetonitrila/água/ácido fórmico (50:41,5:8,5, v·v·v⁻¹ - fase móvel B), a um fluxo de 0,19 mL·min⁻¹, conforme gradiente de eluição descrito a seguir: 0 min (97 % A e 3 % B), 20 min (72 % A e 28 % B), 34 min (57 % A e 43 % B), 36 min (100 % B), 42 min (100 % B), 45 min (97 % A e 3 % B).

Para a identificação das antocianinas foi utilizado o detector ESI/MS-MS no modo positivo de ionização, seguindo os parâmetros: gás N₂ com fluxo de 8 L·min⁻¹ e temperatura de 325 °C, nebulização com N₂ a 50 psi. A ionização e fragmentação foi otimizada pela inserção direta de soluções padrão de malvidina 3,5-diglicosídeo, no modo positivo de ionização. A identificação dos pigmentos foi baseada nos dados espectroscópicos (UV-Vis e MS/Ms) e a quantificação foi realizada através da comparação de seus dados cromatográficos a 520 nm com curvas analíticas obtidas utilizando-se padrões analíticos, em condições cromatográficas idênticas.

2.3.4 Ensaio antioxidante *in vitro*

A capacidade antioxidante do EFCJ foi determinada pelos ensaios ABTS⁺, e DPPH. O ensaio ABTS⁺ foi baseado no método desenvolvido por Re et al. (1999), com algumas modificações. A solução do radical foi preparada pela reação de soluções estoque 7 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ de ABTS⁺ (2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)) e 2,45 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ de persulfato de potássio na proporção 1:1, incubadas à temperatura ambiente e na ausência de luz, por 16 horas. Etanol (80 % v.v⁻¹) foi adicionado até a solução atingir absorvância de $0,700 \pm 0,050$, a 734 nm. A solução de ABTS⁺ foi adicionada à amostra, diluída em 5 concentrações crescentes, ou às soluções padrões de Trolox, para a construção da curva analítica. A reação ocorreu em ausência de luz, por 6 min.

O ensaio DPPH• foi realizado segundo metodologias propostas por Brand-Williams, Cuvelier, & Berset (1995) e Sánchez-Moreno, Larrauri, & Saura-Calixto (1998). Foram homogeneizados 3,9 mL da solução de DPPH• (60 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ em metanol) e 0,1 mL do extrato ou padrão de Trolox em diferentes concentrações. O decréscimo na absorvância foi monitorado à 517 nm por 60 min. Os resultados foram expressos como IC₅₀, concentração em $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ do extrato exigida para diminuir ou inibir em 50 % a concentração inicial de DPPH.

2.4 Ensaio biológico

2.4.1 Animais e dietas

Trinta e seis coelhos Nova Zelândia, machos, pesando $3,45 \pm 0,28$ kg, com 90 dias de vida, foram obtidos no Centro de Cunicultura do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa. O experimento foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEUA/UFV), protocolo número 34/2016, e seguiu todas as recomendações éticas exigidas pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório. Os animais foram acondicionados em gaiolas individuais (45 x 52 x 60 cm), e mantidos em ambiente com controle de temperatura e umidade, e ciclos de luz (claro/escuro) de 12 h.

Após 15 dias de adaptação às condições laboratoriais, os coelhos foram divididos aleatoriamente em 6 grupos (n = 6), com acesso à água *ad libitum* e 120 g de ração (Tabela 1).

Tabela 1 – Planejamento alimentar e tratamentos dos animais experimentais.

Grupos	Tratamentos
Grupo controle (G1)	Ração comercial padrão
Grupo controle positivo (G2)	Ração hipercolesterolemiantes (RH)
Grupo controle negativo (G6)	RH + 0,3 mg de sinvastatina·kg·dia ⁻¹
Grupo G3	RH + 0,4 mg de EFCJ·kg·dia ⁻¹
Grupo G4	RH + 0,8 mg de EFCJ·kg·dia ⁻¹
Grupo G5	RH + 0,8 mg de EFCJ·kg·dia ⁻¹ em dias alternados

A suplementação com EFCJ e com sinvastatina foi realizada por gavagem oral e os animais dos grupos G1 e G2 receberam o mesmo volume de água destilada. A ração hipercolesterolemiantes foi produzida pelo enriquecimento de ração comercial padrão (Soma Nutrição Animal, Rio Pomba, Brasil) com 1 % de colesterol cristalino (m·m⁻¹) (Sigma-Aldrich, USA). Após 50 dias de tratamento (Medina et al., 2014), os coelhos foram eutanasiados com anestesia terminal (xilazina 5 mg·kg⁻¹ e quetamina 20 mg·kg⁻¹) por via muscular e foram realizadas as coletas de sangue e tecido.

2.4.2 Coleta de sangue e tecido

O sangue dos animais foi coletado pela veia marginal da orelha, nos tempos 0, 30 e 50 dias de experimento, após 12 horas de jejum, em tubos heparinizados, sendo centrifugado (12000 x g por 20 min.) para obtenção do plasma, que foi armazenado a -80 °C até o momento das análises bioquímicas. Imediatamente após eutanásia, removeu-se aproximadamente 0,5 cm da aorta torácica para exame histopatológico e outra alíquota foi congelada em nitrogênio líquido e mantida a -80 °C para análises das defesas antioxidantes.

2.4.3 Análise dos parâmetros bioquímicos

As concentrações de colesterol total (CT), lipoproteína de alta densidade (HDL-c), lipoproteína de baixa densidade (LDL-c) e triacilgliceróis (TAG) foram

determinadas no plasma, utilizando-se kits comerciais (Bioclin, Minas Gerais, Brasil), em analisador bioquímico BS200E (Mindray, Shenzhen, China).

O índice aterogênico (IA – Eq. 3) e o índice de risco coronariano (IRC – Eq. 4) foram estudados como marcadores de risco aterogênico, conforme descrito por Koleva, Andreeva-Gateva, Orbetzova, Atanassova, & Nikolova (2015).

$$IA = \frac{\log_{TAG}}{HDL_C} \quad (3)$$

$$IRC = \frac{CT}{HDL_C} \quad (4)$$

2.4.4 Avaliação de biomarcadores do estresse oxidativo e peroxidação lipídica

As amostras de aorta previamente congeladas foram utilizadas no preparo de homogenatos, numa proporção de 150 mg de tecido por 1 mL de solução tampão fosfato (50 mmol·L⁻¹, pH = 7,4), usando um homogeneizador (MA102 / Mini, Marconi, Piracicaba, SP, Brasil). Após centrifugação (12000 x g, 4 °C, 10 min), o sobrenadante foi coletado e utilizado nas análises.

2.4.4.1 Peroxidação lipídica pelo ensaio TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico)

As concentrações de TBARS foram determinadas utilizando-se metodologia adaptada de Wallin, Rosengren, Shertzer, & Camejo (1993) O homogenato (0,2 mL) foi misturado com 0,4 mL da solução de trabalho (TCA - ácido tricloroacético 15 %, TBA - ácido tiobarbitúrico 0,375 % e ácido clorídrico 0,25 mol·L⁻¹). Após aquecimento a 90 ° C por 40 min., as amostras foram resfriadas em banho de gelo por 10 min e, então, centrifugadas (10000 x g, 4 °C, 10 min). A absorvância do sobrenadante foi lida a 532 nm em microplaca de 96 poços (PowerWave HT, Winooski, VT, USA). TBARS foi quantificado por meio de uma curva analítica do padrão malondialdeído (MDA) e os resultados foram expressos em nmol MDA·mg tecido⁻¹.

Atividade de superóxido dismutase (SOD)

A atividade de SOD foi estimada com base no método descrito por Madesh & Balasubramanian (1998), adaptado. Foram adicionados, em microplaca de 96 poços, sequencialmente: 30 μL do homogenato, 99 μL de tampão fosfato de potássio $0,2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 7,0; 6 μL de MTT (3-(4-5 dimethyl thiazol 2-yl) 2,5 diphenyl tetrazolium bromide) $1,5 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ e 15 μL de pirogalol. A mistura foi encubada por 10 min em estufa a 37°C e a reação foi finalizada com a adição de 150 μL de DMSO (dimethyl sulfoxide). A absorvância foi lida em 570 nm (PowerWave HT, Winooski, VT, USA) e expressa em U SOD $\cdot\text{mg}$ proteína $^{-1}$.

2.4.4.2 Atividade de Catalase (CAT)

A atividade de CAT foi avaliada segundo metodologia proposta por Aebi (1984). Para a reação, foram homogeneizados 1 mL de solução de H_2O_2 ($10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) em tampão fosfato de potássio ($0,2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 7,0) e 10 μL das amostras. O decréscimo na absorvância foi monitorado a 240 nm, por 60 seg, em espectrofotômetro Shimadzu (UV-VIS 1601 PC, Quioto, Japão) e os resultados foram expressos em U CAT $\cdot\text{mg}$ proteína $^{-1}$.

2.4.4.3 Atividade de glutationa-s-tranferase (GST)

A atividade de GST em resposta aos tratamentos foi determinada de acordo com Habig, Pabst, & Jakoby (1974). O meio de reação foi constituído de 700 μL tampão fosfato de potássio ($0,2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 7,0), 10 μL de CDNB (1-cloro-dinitro benzeno, $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$), 10 μL de GSH (glutationa reduzida, $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) e 10 μL do homogenato. A reação foi monitorada espectrofotometricamente a 340 nm (Shimadzu UV-VIS 1601 PC, Quioto, Japão) e os resultados foram expressos em $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$.

2.4.5 Avaliação histológica da aorta

2.4.5.1 Inclusão em resina

Os fragmentos de aorta foram fixados em solução de Karnovsky por 24 horas e transferidos para uma solução alcoólica a 70 % (v·v⁻¹). Posteriormente, foram desidratados em série etanólica crescente (80 %, 90 %, 95 % e 100 % v·v⁻¹), com trocas a cada 30 minutos, e incluídos em glicol-metacrilato (Historesin®, Wetzlar, Leica) ao final da série.

Secções de 3 µm de espessura foram obtidas em micrótomo rotativo (Leica, Reichert-Jung 2045, Wetzlar, Alemanha), utilizando-se navalhas de vidro. Para evitar a repetição das análises nas mesmas células, os cortes foram feitos de modo semi-seriado em intervalos regulares de 30 µm. Essas preparações foram coradas com azul de toluidina/borato de sódio 1 % (m·v⁻¹) e montadas com Entellan® (Merck, Darmstadt, Alemanha). As imagens dos cortes histológicos foram obtidas em fotomicroscópio de campo claro (Olympus, AX-70, Tóquio, Japão).

2.4.5.2 Análise Morfométrica

O estudo morfométrico foi conduzido para medir, nos cortes histológicos das artérias, as áreas das placas de aterosclerose formadas no vaso. As análises foram realizadas com auxílio do programa de análises de imagens Image Pro Plus 4.0 (Media Cybernetics, Rockville, EUA).

2.5 Análises Estatísticas

Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão. Para análise estatística, os dados foram submetidos à análise de variância (one-way ANOVA) seguida pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). A contribuição dos compostos fenólicos totais e antocianinas para a capacidade antioxidante do extrato foi obtida por meio da Correlação de Pearson ($p \leq 0,05$). As análises estatísticas foram conduzidas utilizando-se o software estatístico SAS (Cary, NC, USA).

3 Resultados e Discussão

O presente trabalho demonstrou pela primeira vez, até o limite do nosso conhecimento, o efeito protetor da suplementação com compostos fenólicos presentes na casca de jabuticaba na prevenção da aterosclerose em coelhos alimentados com ração hipercolesterolemiantes.

3.1 Caracterização Química do EFCJ

O EFCJ mostrou ser uma boa fonte de antocianinas e compostos fenólicos totais, exibindo capacidade de neutralizar radicais livres pelos métodos avaliados (Tabela 2).

A análise no HPLC-MS revelou duas antocianinas, cianidina-3-O-glicosídeo (pico 2, [M]⁺ *m/z* 449, MS/MS *m/z* 287) e delphinidina-3-O-glicosídeo (pico 1, [M]⁺ *m/z* 465, MS/MS *m/z* 303), dentre as quais cianidina-3-O-glicosídeo foi a majoritária, representando 86,6 % do total dos pigmentos (Fig. 1, Tabela 2).

Tabela 2 – Conteúdo de compostos fenólicos e capacidade antioxidante do extrato fenólico da casca de jabuticaba (EFCJ)

Compostos ou atividade antioxidante	EFCJ
Fenólicos totais	1.033,87 ± 109,46 mg GAE·100 mL ⁻¹
Antocianinas totais	254,8 ± 20,90 mg·100 mL ⁻¹
Antocianinas monoméricas	214,6 ± 61,81 mg·100 mL ⁻¹
<i>Antocianinas individuais</i>	
Cianidina-3-O-glicosídeo	564,52 mg·100 mL ⁻¹
Delphinidina-3-O-glicosídeo	90,73 mg·100 mL ⁻¹
<i>Capacidade Antioxidante</i>	
DPPH	44,02 IC ₅₀ µg·mL ⁻¹
ABTS	83,57 ± 10,48 µmol Trolox·g ⁻¹

Dados apresentados como média ± desvio padrão (n=9). GAE = Equivalente de ácido gálico, IC₅₀ = Concentração inibitória de 50 %.

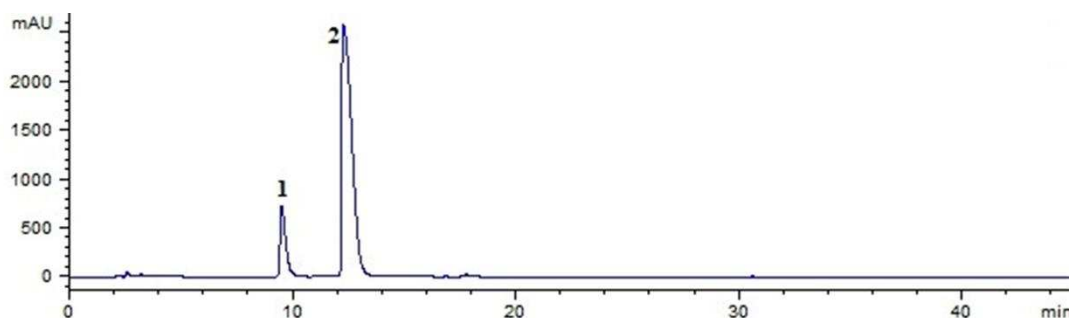


Fig. 1 – Cromatograma do extrato fenólico concentrado da casca de jabuticaba a 520 nm. Os picos 1 e 2 referem-se à, respectivamente, delphinidina-3-O-glicosídeo e cianidina-3-O-glicosídeo.

O conteúdo de antocianinas totais no EFCJ foi maior que o relatado por Silva, Stringueta, Teófilo, & Oliveira (2013) ($60,57 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$) e Lenquiste et al. (2015) ($8,09 \pm 0,72 \text{ mg} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$), embora inferior ao reportado por Batista et al. (2014) ($1737,12 \pm 13,60 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$). Além disso, o teor de fenólicos totais foi superior ao observado por Batista et al. (2014) e Alezandro, Granato, & Genovese (2013).

As antocianinas individuais encontradas neste trabalho já foram previamente identificadas e quantificadas por outros autores em casca de jabuticaba. Leite-Legatti et al. (2012) também descreveram cianidina-3-O-glicosídeo como a antocianina dominante na casca de jabuticaba, perfazendo 75,6 % do total desses pigmentos, seguida de delphinidina-3-O-glicosídeo, que totalizaram, respectivamente, $1963,57 \pm 52,72 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ e $634,75 \pm 1,83 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$. Da mesma maneira, Plaza et al. (2016) obtiveram o perfil fenólico completo da casca de jabuticaba e relataram, dentre 13 compostos identificados, cianidina-3-glicosídeo ($2866,3 \pm 40,1 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g casca}^{-1}$) e delphinidina-3-glicosídeo ($356,3 \pm 1,0 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g casca}^{-1}$) como os presentes em maior concentração. Outros compostos fenólicos não antocianínicos como casuarinin, casuarictin, quercetina e ácido elágico, também já foram previamente identificados na casca de jabuticaba (Plaza et al., 2016). Além desses, já foram relatadas a presença de jaboticabin, kaempferol, rutina e ácido cumárico na casca desse fruto (Reynertson et al., 2006).

Os diferentes métodos de extração, safras e local de coleta dos frutos podem ter sido os responsáveis pelas divergências entre os dados deste trabalho e os encontrados na literatura. Em adição, Alezandro, Dubé, Desjardins, Lajolo, & Genovese (2013) relataram que o conteúdo de antocianinas e de compostos fenólicos

em frutos de jabuticaba variam entre espécies, fase de amadurecimento e partes do fruto, o que pode ter contribuído para as diferenças encontradas.

O EFCJ exibiu elevada capacidade antioxidante *in vitro*, e os resultados de ABTS e DPPH demonstraram alta dependência do conteúdo de compostos fenólicos (ABTS $r = 0,856$, $p < 0,05$; DPPH $r = 0,995$) e antocianinas (ABTS $r = 1,00$, $p < 0,05$; DPPH $r = 0,895$), o que indica que a habilidade do EFCJ em neutralizar radicais livres está correlacionada com o seu conteúdo de antocianinas e outros compostos fenólicos. Comprovadamente, os polifenóis presentes na casca de jabuticaba possuem a capacidade de estabilizar radicais livres e, por isso, exercem efeitos benéficos ao ser ingeridos (Batista et al., 2014; Leite et al., 2011). Plaza et al. (2016) também relataram correlação positiva entre compostos fenólicos da casca de jabuticaba e capacidade antioxidante. Esses autores comprovaram que, embora antocianinas tenham sido encontradas em maior concentração, a maior contribuição para a capacidade antioxidante foi de compostos fenólicos não antocianínicos, especificamente elagitaninos e galotaninos.

Com base nessas considerações, os efeitos encontrados no ensaio *in vivo* podem ser atribuídos aos fenólicos presentes no EFCJ, uma vez que se destacam como antioxidantes exógenos devido à sua capacidade de atenuar o estresse oxidativo (Zhang & Tsao, 2016). Esses compostos atuam neutralizando radicais livres e como coadjuvantes do sistema antioxidante endógeno e, conseqüentemente, reduzindo biomarcadores relacionados a doenças como diabetes (Lenquist et al., 2012), aterosclerose (Yanni et al., 2015) e doenças hepáticas (Song, Lai, Tang, & Zheng, 2016).

3.2 Efeito da suplementação com EFCJ no perfil lipídico plasmático e índice aterogênico

Para avaliar a eficácia da ração em induzir hipercolesterolemia e para determinar os efeitos da suplementação com EFCJ nos lipídios e lipoproteínas plasmáticos, foram medidas as concentrações de CT, TAG, HDL-c e LDL-c antes, aos 30 dias e ao final dos tratamentos (50 dias).

No início do período experimental, as concentrações séricas de CT (Fig. 2A), TAG (Fig. 2D), LDL-c (Fig. 2B) e HDL-c (Fig. 2C) foram estatisticamente

semelhantes entre os grupos. Após 30 dias de tratamento, nos animais alimentados exclusivamente com RH (G2), os níveis plasmáticos de CT, TAG e LDL-C-c excederam os do grupo controle (G1) em, respectivamente, 29, 24 e 30 vezes. Inversamente, ao fim de 50 dias, as concentrações de HDL-c decresceram nos coelhos desse grupo. A dieta enriquecida com 1 % de colesterol foi, portanto, capaz de induzir hipercolesterolemia severa nos animais, caracterizada por concentrações séricas elevadas de LDL-c e diminuição de HDL-c, acompanhada de hipertrigliceridemia (Fig. 2 e 3).

Esses resultados confirmam outros trabalhos com coelhos, nos quais a indução de hipercolesterolemia pela dieta enriquecida com colesterol foi efetiva. De um modo geral, a adição de 0,5 % a 2 % de colesterol à alimentação é suficiente para induzir aumento das concentrações dos lipídios plasmáticos nesses animais, como constado por Baskaran et al. (2015), Sozanski et al. (2014) e Yanni et al. (2015). O coelho é, de fato, capaz de exibir hipercolesterolemia após apenas alguns dias de tratamento e, por isso, é largamente utilizado como modelo experimental para aterosclerose (Yanni, 2004).

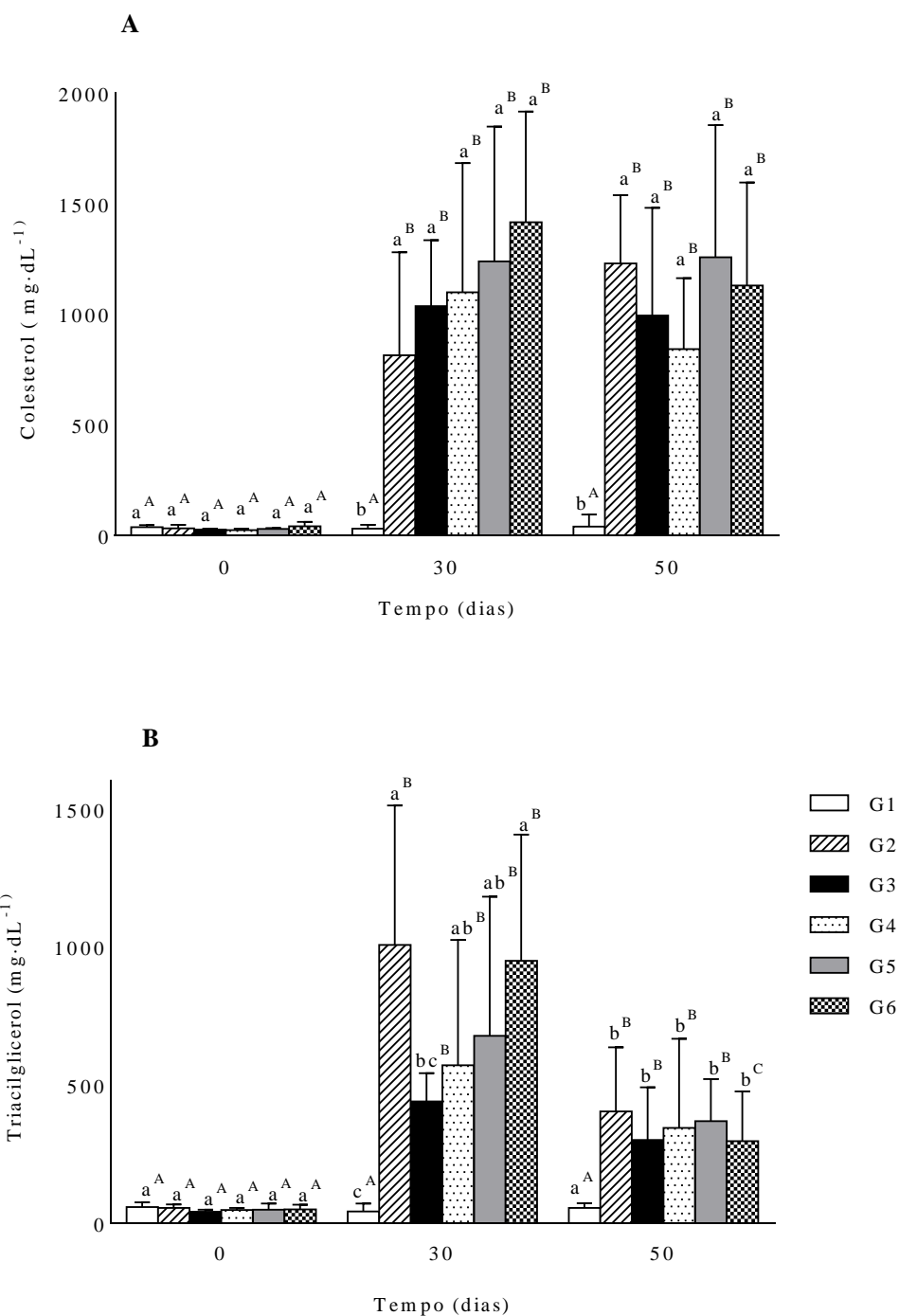


Fig. 2 - Concentrações plasmáticas de colesterol total - CT (A) e triacilglicerol – TAG (B) de coelhos alimentados com ração padrão (G1), ração hipercolesterolemiantes (G2), ração hipercolesterolemiantes + 0,4 mg de EFCJ·kg·dia⁻¹ (G3), ração hipercolesterolemiantes + 0,8 mg de EFCJ·kg·dia⁻¹ (G4), ração hipercolesterolemiantes + 0,8 mg de EFCJ·kg·dia⁻¹ em dias alternados (G5) e ração hipercolesterolemiantes + 0,3 mg de sinvastatina·kg·dia⁻¹ (G6). Os dados estão expressos como média ± desvio padrão (n = 6). Letras minúsculas diferentes acima das colunas indicam diferença estatística entre os grupos experimentais e letras maiúsculas diferentes representam diferença estatística ao longo do tempo em um mesmo grupo, pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

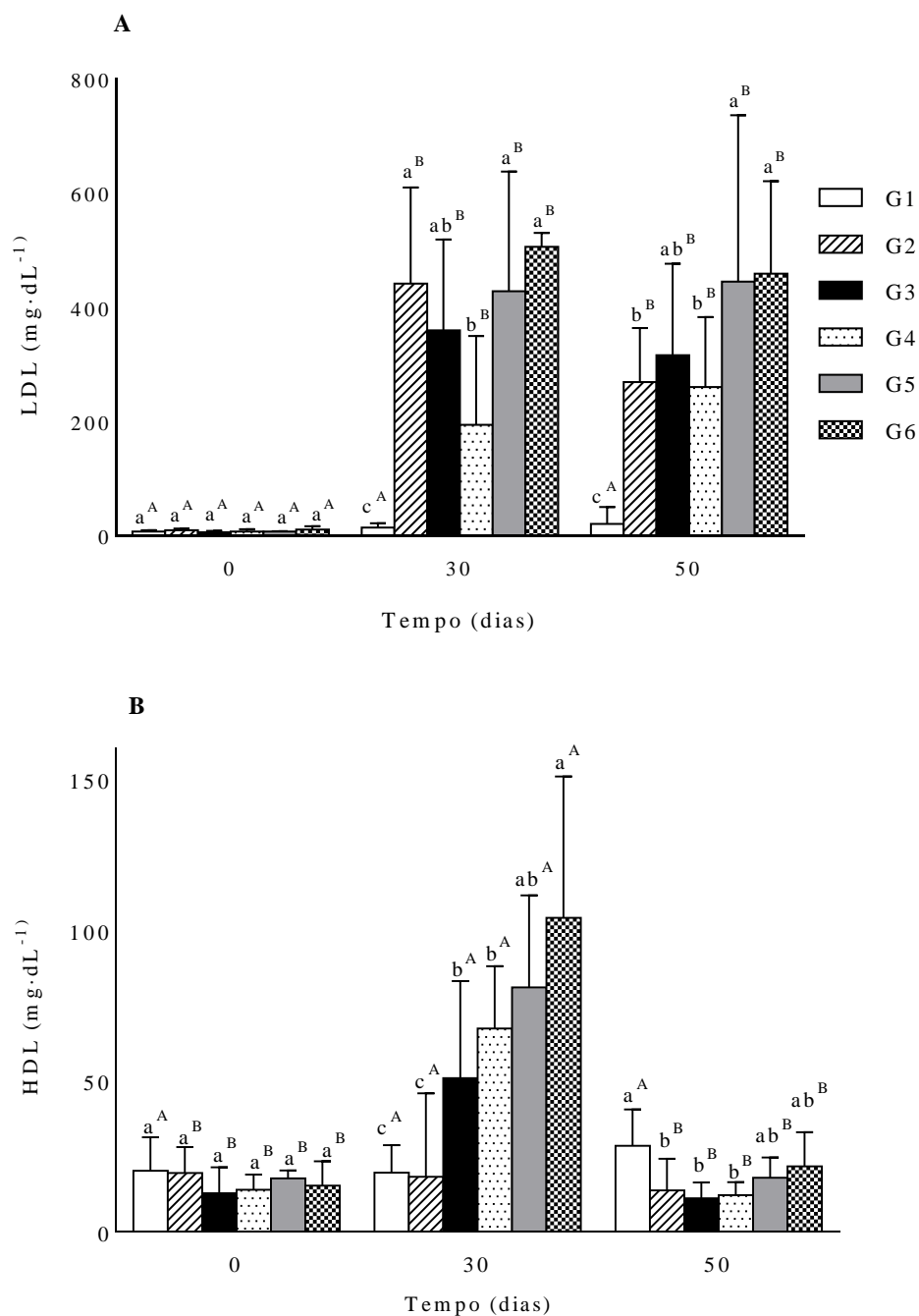


Fig. 3 - Concentrações plasmáticas de LDL-c (A) e HDL-c (B) de coelhos alimentados com ração padrão (G1), ração hipercolesterolemiantes (G2), ração hipercolesterolemiantes + 0,4 mg de EFCJ·kg·dia⁻¹ (G3), ração hipercolesterolemiantes + 0,8 mg de EFCJ·kg·dia⁻¹ (G4), ração hipercolesterolemiantes + 0,8 mg de EFCJ·kg·dia⁻¹ em dias alternados (G5) e ração hipercolesterolemiantes + 0,3 mg de sinvastatina·kg·dia⁻¹ (G6). Os dados estão expressos como média ± desvio padrão (n = 6). Letras minúsculas diferentes acima das colunas indicam diferença estatística entre os grupos experimentais e letras maiúsculas diferentes representam diferença estatística ao longo do tempo em um mesmo grupo, pelo teste de Tukey (p ≤ 0,05).

Uma série de estudos recentes demonstraram que concentrações plasmáticas elevadas de colesterol, em particular LDL-c, estão positivamente correlacionadas com o desenvolvimento de aterosclerose (Kong, Luo, Li, Zhou, & He, 2013; Lin et al., 2017; Ozaki & Almeida, 2013; Sozanski et al., 2014; Subramani et al., 2017). Realmente, está bem estabelecido que o excesso de moléculas de LDL-c no plasma representa o primeiro episódio responsável pela injúria do endotélio (Ozaki & Almeida, 2013). Baskaran et al. (2015) relataram que o aumento da concentração sérica de CT, induzido pela dieta hipercolesterolemia, em 34 vezes, e de LDL-c em 40 vezes, resultou em formação de placa de ateroma e espessamento intimal da aorta em coelhos. Do mesmo modo, Yanni et al. (2015) observaram que a elevação dos níveis plasmáticos de CT e LDL-c em, respectivamente, 21 e 29 vezes, provocou lesões na aorta de coelhos, com consequente desenvolvimento de placas de gordura. Assim, a diminuição da concentração de CT e suas frações no plasma se torna uma estratégia eficaz na prevenção do desenvolvimento e progressão de aterosclerose.

A suplementação diária com 0,4 mg de EFCJ·kg⁻¹ (G3) foi capaz de atenuar, em 30 dias, a elevação das concentrações plasmáticas de TAG em 2,3 vezes, em comparação com o grupo G2 (Fig. 2B). Nenhuma alteração significativa foi evidenciada entre os demais grupos suplementados em 30 ou 50 dias. Ao final do tratamento, as concentrações de TAG reduziram em 32 % no grupo G3 e 69 % no grupo G6 em relação aos seus níveis em 30 dias.

A administração do EFCJ reduziu significativamente a concentração sérica de LDL-c no grupo G4 ao final de 30 dias, em comparação com o grupo G2 (Fig. 3A). A ingestão diária de 0,8 mg de EFCJ·kg⁻¹ (G4) promoveu redução de 44 % em LDL-c no plasma desses animais. Nenhuma alteração significativa foi observada nos demais grupos tratados com EFCJ, em 30 dias de experimento, quando comparados com G2. Ao final de 50 dias, o EFCJ foi ineficiente em prevenir a elevação de LDL-c e, nos grupos G5 e G6, a concentração dessa lipoproteína superou a dos animais no G2.

Após 30 dias de tratamento, a administração do EFCJ foi capaz de elevar HDL-c em todos os grupos experimentais e, nos animais do grupo G5, esse aumento foi estatisticamente semelhante aos animais tratados com sinvastatina (Fig. 3B). Entretanto, no fim do experimento, ocorreu redução na concentração plasmática dessa lipoproteína em todos os coelhos dos grupos G2, G3, G4, G5 e G6.

Esses resultados mostraram claramente que a suplementação diária com EFCJ foi eficiente em melhorar o perfil dos lipídios circulantes no plasma dos coelhos

submetidos à dieta hipercolesterolemiantes. O EFCJ, inclusive, mostrou-se mais eficiente que sinvastatina ($0,3 \text{ mg}\cdot\text{kg}\cdot\text{dia}^{-1}$) em prevenir o aumento dos níveis plasmáticos de LDL-c e TAG. Os compostos fenólicos presentes em grande quantidade no extrato, podem ser os responsáveis por esses efeitos observados, uma vez que têm sido relacionados com a redução das concentrações séricas de colesterol e TAG (Alejandro, Granato, & Genovese, 2013; Araújo et al., 2014), elevação de HDL-c (Lenquiste et al., 2012) e diminuição de LDL-c-oxidada (Pala et al., 2017).

Lenquiste et al. (2012) relataram que a suplementação com casca de jabuticaba em pó elevou a concentração plasmática de HDL-c em 41,65%, em ratos alimentados com dieta rica em gordura, mas nenhuma alteração nos níveis de CT e TAG foi observada. Em outro estudo, a ingestão de 1 % e 4 % de casca de jabuticaba em pó reduziu os níveis séricos de lipídios saturados em ratos obesos (Batista et al., 2014). Esses dados indicam o efeito hipolipemiante da casca de jabuticaba, o que pode ter sido resultado, também, de outros componentes presentes nessa parte do fruto, como as fibras (Wu, Long, & Kennelly, 2013). De fato, Batista et al. (2013) sugeriram que o aumento da excreção fecal de TAG, provocado pela ingestão de casca de jabuticaba, pode ser consequência do seu conteúdo de fibras solúveis. Como foi utilizado um extrato fenólico neste trabalho, o efeito observado no perfil lipídico dos animais pode ser atribuído aos compostos fenólicos presentes no EFCJ.

O efeito hipolipemiante de compostos fenólicos já foi relatado por diversos autores (Graf et al., 2013; Jiang, Dai, Nie & Yang, 2017; Oliveira de Souza et al., 2010), mas os mecanismos subjacentes a esse efeito ainda não estão completamente elucidados. Evidências recentes sugerem que antocianinas podem estimular a excreção de LDL-c pelos enterócitos através do aumento dos níveis de receptores dessa lipoproteína (LDL-R) e da alteração dos genes que regulam o transporte de colesterol (Jiang, Dai, Nie & Yang, 2017). Similarmente, Benn et al. (2015) demonstraram que compostos fenólicos presentes no extrato de groselha-preta reprimiram a expressão de PCSK9, enzima responsável pela degradação de LDL-R, o que resultou na diminuição da concentração plasmática de CT. Ademais, antocianinas podem diminuir as concentrações de LDL-c e aumentar as de HDL-c, sem provocar alterações nos níveis de CT, como ocorreu no presente trabalho, através da inibição da atividade de CETP (Cholesteryl Ester Transfer Protein), uma proteína plasmática que intermedeia a remoção de ésteres de colesterol das moléculas de HDL-c (Qin, Xia, Ma, Hao, & Liu, 2009).

Curiosamente, a concentração de HDL-c diminuiu em todos os animais hipercolesterolêmicos aos 50 dias de tratamento. Além disso, após 30 dias, os níveis de LDL-c e TAG permaneceram estáveis nos animais que consumiram EFCJ. Esses resultados levam a crer que o efeito hipocolesterolêmico do extrato atinge níveis estacionários após 30 dias de administração. Segundo Yanni et al. (2015), a ingestão crônica de compostos fenólicos resulta na diminuição compensatória da absorção, sugerindo o estabelecimento de um mecanismo estável no intestino.

Os índices aterogênico e de risco coronariano aumentaram significativamente nos animais do grupo G2 em comparação com o grupo controle (G1), como consequência das alterações nas concentrações de TGA, CT e HDL-c (Tabela 2). O consumo de colesterol, portanto, aumentou o risco de desenvolvimento de aterosclerose, visto que, como elucidado por Nimmanapalli, Kasi, Devapatla, & Nuttakki (2016), IA e IRC são considerados marcadores preditivos para aterogenicidade mais eficientes que lipídios e lipoproteínas séricos e, por isso, refletem o risco para desenvolvimento de doenças cardiovasculares.

Tabela 3 – Efeito da ingestão de dieta hipercolesterolemiantes e da suplementação com EFCJ no Índice Aterogênico (IA) e no Índice de Risco Coronariano (IRC) de coelhos experimentais.

	Tempo (dias)	IA	IRC
G1	30	0,9 ± 0,5 ^{bA}	4,6 ± 4,3 ^{cA}
	50	0,6 ± 0,2 ^{cA}	1,4 ± 1,3 ^{cA}
G2	30	13,1 ± 6,3 ^{aA}	73,1 ± 45,7 ^{aA}
	50	43,1 ± 2,0 ^{abA}	98,4 ± 86,7 ^{bA}
G3	30	16,4 ± 1,5 ^{aA}	53,9 ± 49,2 ^{abA}
	50	27,8 ± 1,8 ^{bcA}	92,5 ± 38,9 ^{bA}
G4	30	4,4 ± 1,7 ^{bA}	44,0 ± 52,6 ^{abA}
	50	26,4 ± 13,6 ^{bcA}	77,9 ± 48,6 ^{bA}
G5	30	6,5 ± 4,5 ^{abA}	18,0 ± 12,1 ^{bcA}
	50	67,5 ± 78,3 ^{abB}	358,0 ± 330,0 ^{cB}
G6	30	6,7 ± 3,9 ^{abA}	31,6 ± 16,2 ^{abA}
	50	23,4 ± 1,6 ^{bcB}	117,9 ± 75,0 ^{bB}

G1 = ração padrão, G2 = ração hipercolesterolemiantes, G3 = ração hipercolesterolemiantes + 0,4 mg de EFCJ·kg·dia⁻¹, G4 = ração hipercolesterolemiantes + 0,8 mg de EFCJ·kg·dia⁻¹, G5 = ração hipercolesterolemiantes + 0,8 mg de EFCJ·kg·dia⁻¹ de EFCJ em dias alternados e G6 = ração hipercolesterolemiantes + 0,3 mg de sinvastatina·kg·dia⁻¹ por 50 dias. Os dados estão expressos como média ± desvio padrão (n = 6). Letras minúsculas diferentes nas colunas indicam diferença estatística entre os grupos experimentais e letras maiúsculas diferentes nas linhas representam diferença estatística ao longo do tempo em um mesmo grupo, pelo teste de Tukey (p ≤ 0,05).

A suplementação com EFCJ foi eficiente em diminuir ambos índices, IA e IRC, em 30 dias de tratamento (Tabela 3). O IA foi reduzido em 56,8 % nos animais do grupo G3 e o IRC em 75,5 % no grupo G5, em relação aos animais do grupo G2. Em contrapartida, após 50 dias, tanto IA quanto IRC se elevaram nos coelhos do grupo G5, em decorrência da diminuição das concentrações de HDL-c observada nesses animais.

Esses resultados ressaltam os benefícios dos compostos fenólicos presentes na casca da jabuticaba e indicam que o EFCJ exerceu efeito cardioprotetor, ao reduzir as concentrações plasmáticas de TAG e de LDL-c, e aumentar as de HDL-c e, conseqüentemente, reduzir os índices de risco aterogênico e coronariano.

3.3 Efeito da suplementação com EFCJ nos biomarcadores do estresse oxidativo e peroxidação lipídica

A dieta hipercolesterolemiantes ocasionou, no tecido aórtico dos animais alimentados exclusivamente com RH (G2), elevação na concentração de TBARS, um indicador da peroxidação lipídica, acompanhado do decréscimo nas atividades das enzimas do sistema antioxidante endógeno (SOD, CAT e GST) (Fig. 4). Isso indica que a geração de ROS excedeu as defesas antioxidantes e, portanto, induziu estresse oxidativo no tecido aórtico desses animais. De fato, Bai et al. (2015) e Kong, Luo, Li, Zhou, & He (2013) relataram que hipercolesterolemia induzida pela dieta propulsiona a produção de ROS e reduz a atividade das enzimas antioxidantes, o que resulta em estresse oxidativo.

Estresse oxidativo desempenha um papel importante na patogênese da aterosclerose, visto que, como elucidado por Li et al. (2014), a oxidação de moléculas de LDL-c é considerada um dos primeiros eventos do processo aterogênico. Corroborando os resultados do presente trabalho, Somacal et al. (2015) observaram que a dieta hipercolesterolemiantes provocou estresse oxidativo no tecido aórtico de coelhos, o que resultou em lesões ateroscleróticas acentuadas nos animais. Resultados similares foram obtidos por Kong et al. (2013) que, ao induzir aterosclerose em coelhos alimentados com dieta rica em colesterol, observaram aumento da peroxidação lipídica e diminuição de enzimas antioxidantes no plasma dos animais. Sendo assim, o estresse oxidativo no tecido aórtico, aliado às concentrações elevadas de LDL-c no

plasma (Fig. 3A), predispôs os animais hipercolesterolêmicos ao desenvolvimento de aterosclerose.

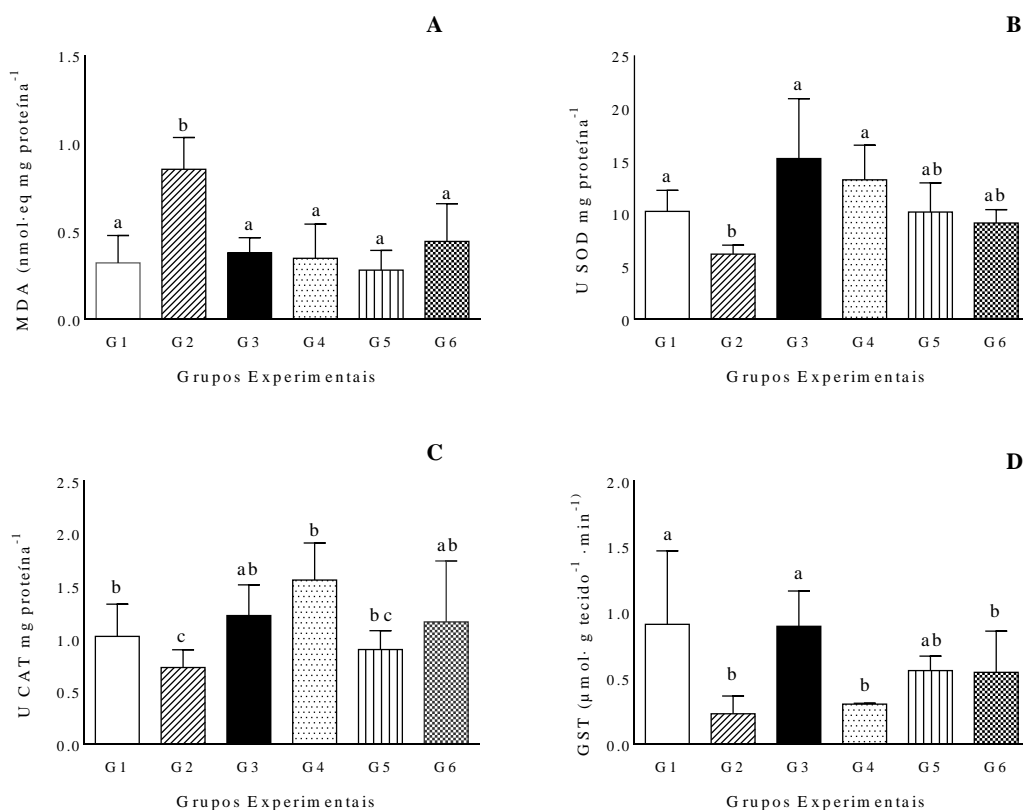


Fig. 4 – Biomarcadores do estresse oxidativo e peroxidação lipídica de coelhos alimentados com ração padrão (G1), ração hipercolesterolemiantes (G2), ração hipercolesterolemiantes + 0,4 mg de EFCJ·kg·dia⁻¹ (G3), ração hipercolesterolemiantes + 0,8 mg de EFCJ·kg·dia⁻¹ (G4), ração hipercolesterolemiantes + 0,8 mg de EFCJ·kg·dia⁻¹ em dias alternados (G5) e ração hipercolesterolemiantes + 0,3 mg de sinvastatina·kg·dia⁻¹ (G6) por 50 dias. Os dados estão expressos como média ± desvio padrão (n = 6). (A) Peroxidação lipídica pelo ensaio TBARS, MDA = malondialdeído. (B) Atividade de superóxido dismutase (SOD). (C) Atividade de catalase (CAT). (D) Atividade de Glutathione-S-Transferase (GST). Letras minúsculas diferentes acima das colunas indicam diferença estatística entre os grupos experimentais pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Como pode ser observado na Fig. 4A, a elevação de TBARS foi efetivamente reduzida pela suplementação com EFCJ, atingindo níveis semelhantes aos animais do grupo controle (G1). Vale destacar que o extrato, nas concentrações testadas, foi tão eficiente quanto sinvastatina em reverter a peroxidação lipídica no tecido aórtico. Conforme demonstrado neste trabalho (Tabela 2), a habilidade das antocianinas e outros compostos fenólicos do EFCJ de estabilizar ROS pode explicar a diminuição da oxidação lipídica no tecido aórtico.

O EFCJ também restaurou as atividades de SOD, CAT e GST nesse tecido. A administração diária de 0,4 mg de EFCJ·kg·dia⁻¹ (G3) manteve as enzimas antioxidantes nos mesmos níveis dos animais controles (G1) e foi mais eficiente que sinvastatina em restaurar SOD e GST. Embora a atividade de GST tenha reduzido nos animais do grupo G4, a atividade de SOD e CAT nesse grupo foi eficientemente recuperada pelo EFCJ.

A suplementação diária com o EFCJ, portanto, preveniu o estresse oxidativo no tecido aórtico dos coelhos que, em conjunto com a redução das concentrações plasmáticas de LDL-c e TAG, indica o efeito protetivo do extrato no desenvolvimento e progressão da aterosclerose. O elevado teor de antocianinas e outros compostos fenólicos no EFCJ foi provavelmente o responsável por esses efeitos. Validando os resultados deste estudo, Jiang, Dai, Nie & Yang (2017) relataram que a administração do extrato de mulberry, composto por antocianinas, flavonoides e outros compostos fenólicos, diminuiu a peroxidação lipídica e impulsionou a atividade de SOD, CAT e glutatona, em ratos alimentados com dieta com alto teor de gordura, o que resultou, junto com a redução de lipídios plasmáticos, em supressão do desenvolvimento da aterosclerose. Em outro estudo, o tratamento com extrato rico em compostos fenólicos, especialmente ácido gálico, rutina e myricetina, reduziu as concentrações de TBARS, ao mesmo tempo que aumentou a atividade de SOD, CAT e glutatona, em ratos consumindo 2 % de colesterol na dieta; o que contribuiu para a redução das lesões ateroscleróticas nesses animais (Dianita et al., 2016).

Batista et al. (2014) demonstraram que os compostos fenólicos presentes na casca de jabuticaba, especialmente ácido gálico, ácido elágico, quercetina e cianidina-O-3-glicosídeo, diminuíram a peroxidação lipídica e restauraram enzimas antioxidantes no plasma, fígado, e rim de ratos consumindo dieta rica em gordura. Da mesma maneira, Lenquiste et al. (2015) observaram que a suplementação com casca de jabuticaba em pó e seu extrato reverteu a peroxidação lipídica induzida pela dieta gordurosa no plasma e fígado de ratos, sendo também observado aumento nas atividades de SOD, CAT e glutatona. O consumo da casca de jabuticaba pode, portanto, evitar o estresse oxidativo em diferentes tecidos, devido ao seu conteúdo de compostos fenólicos.

No presente trabalho, foi demonstrado pela primeira vez, até o limite do nosso conhecimento, que o extrato fenólico da casca de jabuticaba atenua o estresse oxidativo na aorta de coelhos alimentados com colesterol, sugerindo que, além dos

efeitos descritos anteriormente na literatura, os compostos fenólicos presentes nessa parte do fruto podem prevenir o desenvolvimento da aterosclerose.

3.4 Avaliação Histopatológica da Aorta

A análise histológica da aorta revelou formação de placas ateromatosas em todos os animais alimentados com RH (Fig. 5), enquanto que nos coelhos do grupo controle (G1) nenhuma alteração foi observada. Sozanski et al. (2014) e Phil et al. (2013) também observaram o desenvolvimento de placas de ateroma em coelhos que consumiram dieta com 1% de colesterol.

Vários estudos, em animais e humanos, demonstraram que concentrações séricas elevadas de colesterol estão relacionadas com o desenvolvimento da aterosclerose (Lemieux et al., 2015; Nimmanapalli et al., 2016; Phil et al., 2013; Sozanski et al., 2014; Yanni et al., 2015). Particularmente, coelhos hipercolesterolêmicos têm sido amplamente utilizados para estudar aterosclerose, uma vez que refletem os primeiros estágios da doença em humanos (Yanni, 2004).

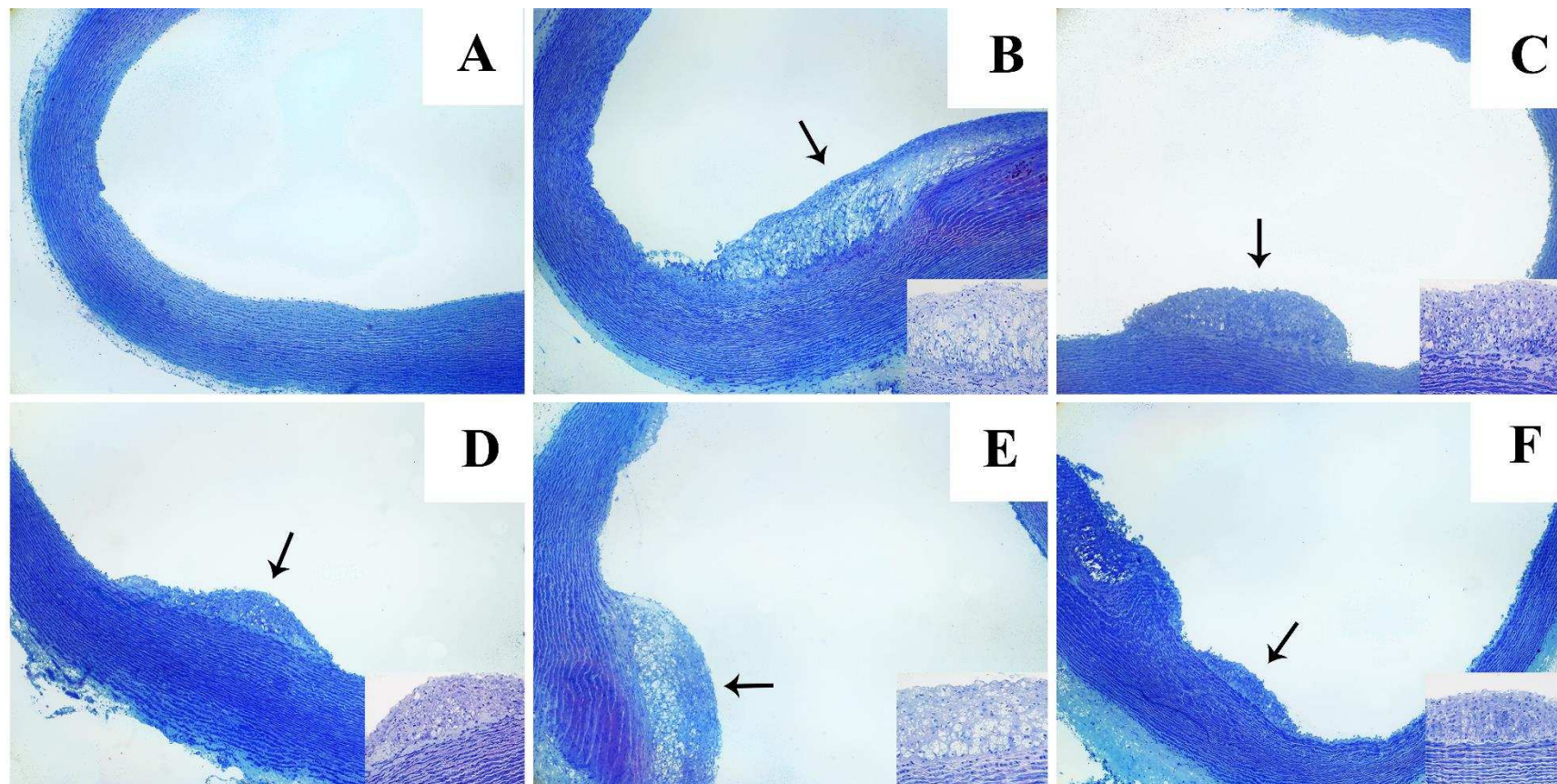


Fig. 4 – Fotomicrografias representativas de corte histológico do tecido aórtico de coelhos tratados com dieta padrão, dieta hipercolesterolemiantes, EFCJ e sinvastatina, mostrando placas ateromatosas (seta) em todos os grupos que receberam dieta hipercolesterolemiantes. Coloração = azul de toluidina - borato de sódio. (A) G1 = dieta padrão, (B) G2 = dieta hipercolesterolemiantes, (C) G3 = dieta hipercolesterolemiantes + 0,4 mg de EFCJ·kg·dia⁻¹, (D) G4 = dieta hipercolesterolemiantes + 0,8 mg de EFCJ·kg·dia⁻¹, (E) G5 = dieta hipercolesterolemiantes + 0,8 mg de EFCJ·kg·dia⁻¹ de EFCJ em dias alternados e (F) G6 = dieta hipercolesterolemiantes + 0,3 mg de sinvastatina·kg·dia⁻¹ por 50 dias.

A suplementação com EFCJ atenuou a progressão das placas de ateroma em todos os grupos experimentais, o que pode ser constatado na Fig. 5. A área da lesão aterosclerótica nos grupos G3, G4, G5 e G6 foi significativamente menor que a observada no grupo G2, representando redução de, respectivamente, 62, 82, 25 e 61 % (Fig. 5). É importante destacar que, nos animais suplementados diariamente com 0,8 mg de EFCJ (G4), a área da lesão foi inferior à exibida pelos coelhos suplementados com sinvastatina.

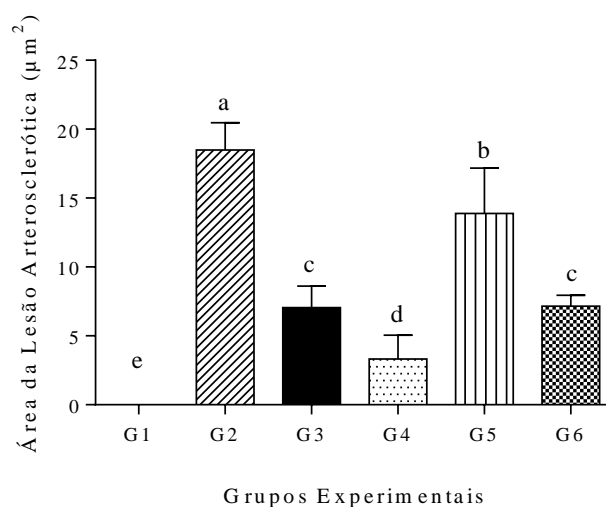


Fig. 5 – Área das placas de ateroma de coelhos alimentados com ração padrão (G1), ração hipercolesterolemiantes (G2), ração hipercolesterolemiantes + 0,4 mg de EFCJ·kg·dia⁻¹ (G3), ração hipercolesterolemiantes + 0,8 mg de EFCJ·kg·dia⁻¹ (G4), ração hipercolesterolemiantes + 0,8 mg de EFCJ·kg·dia⁻¹ em dias alternados (G5) e ração hipercolesterolemiantes + 0,3 mg de sinvastatina·kg·dia⁻¹ (G6) por 50 dias. Os dados estão expressos como média ± desvio padrão (n = 6). Letras minúsculas diferentes acima das colunas indicam diferença estatística entre os grupos experimentais pelo teste de Tukey (p ≤ 0,05).

Em adição ao presente trabalho, numerosos estudos verificaram que compostos fenólicos de diferentes fontes inibem o desenvolvimento de lesões ateroscleróticas. Jiang, Dai, Nie & Yang (2017) constataram que a suplementação com extrato de amora, composto por antocianinas e outros fenólicos, reduziu o espessamento intimal provocado pela dieta com colesterol. Do mesmo modo, Feio et al. (2012) observaram que a administração de extrato de açaí, fonte de antocianinas, diminuiu a área da placa de ateroma no arco torácico e na aorta torácica de coelhos em dieta hipercolesterolemiantes, além de reduzir a espessura das camadas íntima e média. Nesse mesmo contexto, Yanni et al. (2015) comprovaram que a suplementação com uvas desidratadas retardou a formação de

placas no arco aórtico e nas partes abdominal e torácica da aorta, e reduziu o espessamento dos vasos em coelhos submetidos à ração hipercolesterolemia, o que foi atribuído aos compostos fenólicos ácido p-OH-benzoico, ácido protocateico, ácido vanílico, ácido cafeico, ácido cinâmico, ácido ferrúlico e catequina, encontrados no plasma dos animais após 4 e 8 semanas de tratamento.

O efeito protetor dos compostos fenólicos presentes na casca de jabuticaba na prevenção da aterosclerose foi resultante da ação do EFCJ na redução das concentrações plasmáticas de TAG e LDL-c e na elevação dos níveis de HDL-c, bem como na prevenção do estresse oxidativo no tecido aórtico dos animais que o consumiram. As análises histológicas demonstraram que o consumo do EFCJ preveniu a progressão das placas ateromatosas, o que ocorreu em virtude da capacidade do extrato de atenuar estresse oxidativo.

A habilidade dos compostos fenólicos em limitar dano oxidativo e inflamatório pode justificar a atuação do EFCJ na prevenção do desenvolvimento de aterosclerose. De acordo com Liu, Lee, Shih, Chyau & Wang (2008), antocianinas exercem efeito antiaterosclerótico ao inibirem a oxidação de moléculas de LDL-c, além de prevenir a morte prematura de macrófagos e diminuir a formação de células espumosas, formadas a partir da captação de LDL-c-oxidada pelos macrófagos. Além disso, Phil et al. (2013) demonstraram que a suplementação com quercetina promoveu a diminuição das atividades de enzimas pró-inflamatórias, como ciclogenases, lipogênases e óxido nítrico sintase e a redução da concentração de proteína C reativa, um biomarcador específico para doenças cardíacas. Isso resultou em inibição da inflamação e, conseqüentemente, na diminuição das placas ateromatosas e do espessamento da túnica íntima da aorta, em coelhos hipercolesterolêmicos. Foi comprovado ainda que, em coelhos alimentados com colesterol, o kaempferol aliviou a inflamação vascular por meio da diminuição das concentrações plasmáticas das citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-1 β e da regulação negativa da expressão de genes e de moléculas de adesão envolvidos no processo inflamatório, prevenindo aterosclerose (Kong et al., 2013).

Assim, considerando o conteúdo de compostos fenólicos consumido e o peso dos animais, um adulto com 70 Kg, deve ingerir aproximadamente 20 g de casca de jabuticaba por dia para se obter as melhorias no perfil lipídico, estresse oxidativo e histopatologia da aorta observadas nesse trabalho.

4 Conclusões

O extrato fenólico da casca de jaboticaba preveniu a progressão da aterosclerose, melhorou o perfil dos lipídios circulantes no plasma, através da redução de LDL-c e TAG e da elevação de HDL-c, bem como reduziu os índices aterogênico e coronariano. Além disso, exerce propriedade antioxidante, prevenindo a peroxidação lipídica e aumentando a atividade de enzimas antioxidantes endógenas na aorta. Portanto, o consumo diário da casca de jaboticaba e/ou do seu extrato fenólico pode melhorar o perfil lipídico plasmático e impulsionar o sistema de defesa antioxidante em coelhos, protegendo os órgãos contra danos provocados por uma dieta com alta concentração de colesterol.

5 Referências Bibliográficas

- Aebi, H. (1984). Catalase in vitro. *Methods in Enzymology*, 105 (1947), 121–126.
- Alezandro, M. R., Dubé, P., Desjardins, Y., Lajolo, F. M., & Genovese, M. I. (2013). Comparative study of chemical and phenolic compositions of two species of jaboticaba: *Myrciaria jaboticaba* (Vell.) Berg and *Myrciaria cauliflora* (Mart.) O. Berg. *Food Research International*, 54(1), 468–477.
- Alezandro, M. R., Granato, D., & Genovese, M. I. (2013). Jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba* (Vell.) Berg), a Brazilian grape-like fruit, improves plasma lipid profile in streptozotocin-mediated oxidative stress in diabetic rats. *Food Research International*, 54(1), 650–659.
- Araújo, C. R. R., Esteves, E. A., Dessimoni-Pinto, N. A. V., & Batista, Â. G. (2014). *Myrciaria cauliflora* peel flour had a hypolipidemic effect in rats fed a moderately high-fat diet. *Journal of Medicinal Food*, 17(2), 262–267.
- Bai, J., Zheng, S., Jiang, D., Han, T., Li, Y., Zhang, Y., & Liu, W. (2015). Oxidative stress contributes to abnormal glucose metabolism and insulin sensitivity in two hyperlipidemia models. *Int J Clin Exp Pathol*, 8(10), 13193–13200.
- Baskaran, G., Salvamani, S., Azlan, A., Ahmad, S. A., Yeap, S. K., & Shukor, M. Y. (2015). Hypocholesterolemic and antiatherosclerotic potential of basella alba leaf extract in hypercholesterolemia-induced rabbits. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 1-7.
- Batista, Â. G., Lenquiste, S. A., Cazarin, C. B. B., da Silva, J. K., Luiz-Ferreira, A., Bogusz, S., Wang, H. L., de Souza, R. N., Augusto, F., Prado, M. A., Maróstica, M. R. (2014). Intake of jaboticaba peel attenuates oxidative stress

- in tissues and reduces circulating saturated lipids of rats with high-fat diet-induced obesity. *Journal of Functional Foods*, 6, 450–461.
- Batista, Â. G., Lenquiste, S. A., Moldenhauer, C., Godoy, J. T., Reis, S. M. P. M., & Maróstica Júnior, M. R. (2013). Jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba* (Vell.) Berg.) peel improved triglycerides excretion and hepatic lipid peroxidation in high-fat-fed rats. *Revista de Nutrição*, 26(5), 571–581.
- Benn, T., Kim, B., Park, Y.-K., Yang, Y., Pham, T. X., Ku, C. S., Farruggia, C., Harness, E., Smyth, J. A., Lee, J. Y. (2015). Polyphenol-rich blackcurrant extract exerts hypocholesterolaemic and hypoglycaemic effects in mice fed a diet containing high fat and cholesterol. *British Journal of Nutrition*, 113(11), 1697–1703.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*, 28(1), 25–30.
- Chen, C.-Y., Yi, L., Jin, X., Mi, M.-T., Zhang, T., Ling, W.-H., & Yu, B. (2010). Delphinidin attenuates stress injury induced by oxidized low-density lipoprotein in human umbilical vein endothelial cells. *Chemico-Biological Interactions*, 183(1), 105–12.
- Dianita, R., Jantan, I., Jalil, J., & Amran, A. Z. (2016). Effects of *Labisia pumila* var *alata* extracts on the lipid profile, serum antioxidant status and abdominal aorta of high-cholesterol diet rats. *Phytomedicine*, 23(8), 810–817.
- Feio, C. A., Izar, M. C., Ihara, S. S., Kasma, S. H., Martins, C. M., Feio, M. N., Maués, L. A., Borges, N. C., Moreno, R. A., Póvoa, R. M., Fonseca, F. A. (2012). *Euterpe oleracea* (açai) modifies sterol metabolism and attenuates experimentally-induced atherosclerosis. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis*, 19(3), 237–245.
- Fuleki, T., & Francis, F. J. (1968). Quantitative Methods for Anthocyanins. *Journal of Food Science*, 33(1), 72–77.
- Graf, D., Seifert, S., Jaudszus, A., Bub, A., & Watzl, B. (2013). Anthocyanin-rich juice lowers serum cholesterol, leptin, and resistin and improves plasma fatty acid composition in fischer rats. *PLoS ONE*, 8(6), 1–5.
- Habig, W. H., Pabst, M. J., & Jakoby, W. B. (1974). Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *The Journal of Biological Chemistry*, 249(22), 7130–9.
- Inada, K. O. P., Oliveira, A. A., Revorêdo, T. B., Martins, A. B. N., Lacerda, E. C. Q., Freire, A. S., ... Braz, B. F., Santelli, R. E., Torres, A. G., Perrone, D., Monteiro, M. C. (2015). Screening of the chemical composition and occurring antioxidants in jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba*) and jussara (*Euterpe edulis*) fruits and their fractions. *Journal of Functional Foods*, 17, 422–433.
- Jia, M., Ren, D., Nie, Y., & Yang, X. (2017). Beneficial effects of apple peel polyphenols on vascular endothelial dysfunction and liver injury in high choline-fed mice. *Food & Function*, 8(3), 1282–1292.

- Jiang, Y., Dai, M., Nie, W. J., Yang, X. R., & Zeng, X. C. (2017). Effects of the ethanol extract of black mulberry (*Morus nigra* L.) fruit on experimental atherosclerosis in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 200, 228–235.
- Koleva, D. I., Andreeva-Gateva, P. A., Orbetzova, M. M., Atanassova, I. B., & Nikolova, J. G. (2015). Atherogenic index of plasma, castelli risk indexes and leptin/adiponectin ratio in women with metabolic syndrome. *International Journal of Pharmaceutical*, 6, 2348–262.
- Kong, L., Luo, C., Li, X., Zhou, Y., & He, H. (2013). The anti-inflammatory effect of kaempferol on early atherosclerosis in high cholesterol fed rabbits. *Lipids in Health and Disease*, 12, 12-15.
- Lee, J., Durst, R. W., & Wrolstad, R. E. (2005). Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by the pH differential method: Collaborative study. *Journal of AOAC International*, 88(5), 1269–1278.
- Leite, A. V., Malta, L. G., Riccio, M. F., Eberlin, M. N., Pastore, G. M., & Maróstica Júnior, M. R. (2011). Antioxidant potential of rat plasma by administration of freeze-dried jaboticaba peel (*Myrciaria jaboticaba* Vell Berg). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(6), 2277–2283.
- Lemieux, I., Lamarche, B., Couillard, C., Pascot, A., Cantin, B., Bergeron, J., Gilles, R. D., Després, J. P. (2015). Total cholesterol/HDL cholesterol ratio vs LDL cholesterol/HDL cholesterol ratio as indices of ischemic heart disease risk in men: the quebec cardiovascular study. *Archives of Internal Medicine*, 161, 2685–2692.
- Lenquiste, S. A., Batista, A. G., Marineli, R. D. S., Dragano, N. R. V., & Maróstica, M. R. (2012). Freeze-dried jaboticaba peel added to high-fat diet increases HDL-cholesterol and improves insulin resistance in obese rats. *Food Research International*, 49(1), 153–160.
- Lenquiste, S. A., Marineli, R. S., Moraes, É. A., Dionísio, A. P., Brito, E. S. de, & Maróstica, M. R. (2015). Jaboticaba peel and jaboticaba peel aqueous extract shows in vitro and in vivo antioxidant properties in obesity model. *Food Research International*, 77, 162–170.
- Li, H., Horke, S., & Förstermann, U. (2014). Vascular oxidative stress, nitric oxide and atherosclerosis. *Atherosclerosis*, 237(1), 208–219.
- Lin, P., Lee, F., Glenn, C., Chen, K., Kao, G., Sung, P., Chua, S., Ko, S., Chen, Y., Wu, S., Chang, H. (2017). The therapeutic effect of rosuvastatin and propylthiouracil on ameliorating high-cholesterol diet-induced rabbit aortic atherosclerosis and stiffness. *International Journal of Cardiology*, 227, 938–949.
- Liu, L. K., Lee, H. J., Shih, Y. W., Chyau, C. C., & Wang, C. J. (2008). Mulberry anthocyanin extracts inhibit LDL oxidation and macrophage-derived foam cell formation induced by oxidative LDL. *Journal of Food Science*, 73(6), 113-121.

- Lobo de Andrade, D. M., Reis, C. de F., Castro, P. F. S., Borges, L. L., Amaral, N. O., Torres, I. M. S., Rezende, S. G., Gil, E. S., Cardoso, C. E., Pedrino, G. R., Lavorenti, R. M. (2015). Vasorelaxant and Hypotensive Effects of Jaboticaba Fruit (*Myrciaria cauliflora*) Extract in Rats. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 1–8.
- Madesh, M., & Balasubramanian, K. A. (1998). Microtiter plate assay for superoxide dismutase using MTT reduction by superoxide. *Indian Journal of Biochemistry & Biophysics*, 35(3), 184–8.
- Medina, M., Alberto, M. R., Sierra, L., Van Nieuwenhove, C., Saad, S., Isla, M. I., & Jerez, S. (2014). Hypercholesterolemia increases plasma saturated and n-6 fatty acids altering prostaglandin homeostasis and promotes endothelial dysfunction in rabbits. *Lipids*, 49(7), 685–693.
- Nimmanapalli, H. D., Kasi, A. D., Devapatla, P., & Nuttakki, V. (2016). Lipid ratios, atherogenic coefficient and atherogenic index of plasma as parameters in assessing cardiovascular risk in type 2 diabetes mellitus. *International Journal of Research in Medical Sciences*, 4(7), 2863–2869.
- Oliveira de Souza, M., Silva, M., Silva, M. E., de Paula Oliveira, R., & Pedrosa, M. L. (2010). Diet supplementation with acai (*Euterpe oleracea* Mart.) pulp improves biomarkers of oxidative stress and the serum lipid profile in rats. *Nutrition*, 26(7–8), 804–810.
- Ozaki, M. R., & Almeida, E. A. (2013). Experimental and toxicologic pathology evolution and involution of atherosclerosis and its relationship with vascular reactivity in hypercholesterolemic rabbits. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 65(3), 297–304.
- Pala, D., Barbosa, P. O., Silva, C. T., Souza, M. O., Freitas, F. R., Volp, A. C. P., Maranhão, R. C., Freitas, R. N. (2017). Açai (*Euterpe oleracea* Mart.) dietary intake affects plasma lipids, apolipoproteins, cholesteryl ester transfer to high-density lipoprotein and redox metabolism: a prospective study in women. *Clinical Nutrition*, in press.
- Phil, S. B. M., Sc, K. S. K. M., Phil, K. K. M., & Helen Antony. (2013). Quercetin alleviates hypercholesterolemic diet induced inflammation during progression and regression of atherosclerosis in rabbits. *Nutrition*, 29(1), 219–229.
- Plaza, M., Batista, Â. G., Cazarin, C. B. B., Sandahl, M., Turner, C., Ostman, E., & Maróstica Júnior, M. R. (2016). Characterization of antioxidant polyphenols from *Myrciaria jaboticaba* peel and their effects on glucose metabolism and antioxidant status: a pilot clinical study. *Food Chemistry*, 211, 185–197.
- Qin, Y., Xia, M., Ma, J., Hao, Y., & Liu, J. (2009). Anthocyanin supplementation improves serum LDL-and HDL-cholesterol concentrations associated with the inhibition of cholesteryl ester transfer protein in dyslipidemic subjects. *American Journal of Clinical Nutrition*, 90(2), 485–492.

- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved abts radical. *Free Radical Biology & Medicine*, 26(98), 1231–1237.
- Rebello, L. P. G., Lago-Vanzela, E. S., Barcia, M. T., Ramos, A. M., Stringheta, P. C., Da-Silva, R., Castillo-Muñoz, N., Gómez-Alonso, S., Hermosín-Gutiérrez, I. (2013). Phenolic composition of the berry parts of hybrid grape cultivar BRS Violeta (BRS Rubra × IAC 1398-21) using HPLC–DAD–ESI-MS/MS. *Food Research International*, 54(1), 354–366.
- Reynertson, K. A., Wallace, A. M., Adachi, S., Gil, R. R., Yang, H., Basile, M. J., D'Armiento, J., Weinstein, I. B., Kennelly, E. J. (2006). Bioactive depsides and anthocyanins from jaboticaba (*Myrciaria cauliflora*). *Journal of Natural Products*, 69(8), 1228–1230.
- Sánchez-Moreno, C., Larrauri, J. A., & Saura-calixto, F. (1998). A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 270, 270–276.
- Silva, P. I., Stringueta, P. C., Teófilo, R. F., & Oliveira, I. R. N. de. (2013). Parameter optimization for spray-drying microencapsulation of jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba*) peel extracts using simultaneous analysis of responses. *Journal of Food Engineering*, 117(4), 538–544.
- Singleton, V. L., & Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16(3), 144-158.
- Somacal, S., Figueiredo, C. G., Quatrin, A., Ruviaro, A. R., Conte, L., Augusti, P. R., Roehrs, M., Denardin, I. T., Kasten, J., da Veiga, M. L., Duarte, M. M. F., Emanuelli, T. (2015). The antiatherogenic effect of bixin in hypercholesterolemic rabbits is associated to the improvement of lipid profile and to its antioxidant and anti-inflammatory effects. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 403, 243–253.
- Song, H., Lai, J., Tang, Q., & Zheng, X. (2016). Mulberry ethanol extract attenuates hepatic steatosis and insulin resistance in high-fat diet – fed mice. *Nutrition Research*, 36(7), 710–718.
- Sozanski, T., Kucharska, A. Z., Szumny, A., Magdalan, J., Bielska, K., Merwid-Lad, A., Wozniak, A., Dzimira, S., Piorecki, N. Trocha, M. (2014). The protective effect of the *Cornus mas* fruits (*Cornelian cherry*) on hypertriglyceridemia and atherosclerosis through PPAR α activation in hypercholesterolemic rabbits. *Phytomedicine*, 21(13), 1774–1784.
- Subramani, C., Rajakkannu, A., Rathinam, A., Gaidhani, S., Raju, I., & Kartar Singh, D. V. (2017). Anti-atherosclerotic activity of root bark of *Premna integrifolia* Linn. in high fat diet induced atherosclerosis model rats. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 7(2), 123–128.

- Wallin, B., Rosengren, B., Shertzer, H. G., & Camejo, G. (1993). Lipoprotein oxidation and measurement of thiobarbituric acid reacting substances formation in a single microtiter plate: its use for evaluation of antioxidants. *Analytical Biochemistry*, 208(1), 10–15.
- WHO. World Health Organization. Cardiovascular diseases. (2017). <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/> Accessed 13.07.17.
- Wu, S. B., Long, C., & Kennelly, E. J. (2013). Phytochemistry and health benefits of jaborcaba, an emerging fruit crop from Brazil. *Food Research International*, 54(1), 148–159.
- Yanni, A. E. (2004). The laboratory rabbit: an animal model of atherosclerosis research. *Laboratory Animals*, 38(3), 246–56.
- Yanni, A. E., Efthymiou, V., Lelovas, P., Agrogiannis, G., Kostomitsopoulos, N., & Karathanos, V. T. (2015). Effects of dietary Corinthian currants (*Vitis vinifera* L., var. Apyrena) on atherosclerosis and plasma phenolic compounds during prolonged hypercholesterolemia in New Zealand White rabbits. *Food & Function*, 6(3), 963–971.
- Zhang, H., & Tsao, R. (2016). Dietary polyphenols, oxidative stress and antioxidant and anti-inflammatory effects. *Current Opinion in Food Science*, 8, 33–42.

ARTIGO II

**EXTRATO FENÓLICO DA CASCA DE JABUTICABA ATENUA
ESTRESSE OXIDATIVO E ALIVIA ESTEATOSE HEPÁTICA EM
COELHOS ALIMENTADOS COM DIETA
HIPERCOLESTEROLEMIANTE**

Extrato fenólico da casca de jabuticaba atenua estresse oxidativo e alivia esteatose hepática em coelhos alimentados com dieta hipercolesterolemiantes

Kéllen Wanessa Coutinho Viana^{1*}, Sérgio Luis Pinto da Matta², Frederico Augusto Ribeiro Barros¹, Jeferson Santos Silva¹, Mateus Hubner de Andrade Valle¹, Fernanda Carolina Ribeiro Dias², Paulo Cesar Stringheta¹

¹ Laboratório de Corantes Naturais e Compostos Bioativos, Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

² Laboratório de Biologia Estrutural, Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Viçosa.

* *Corresponding author*. Endereço: Laboratório de Corantes Naturais e Compostos Bioativos, Avenida P H Rolfs, s/n, Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, 36570-000, Brasil. Tel.: +553138993808. E-mail: kellen.viana@ufv.br

Resumo

Avaliou-se o efeito da administração de diferentes doses do extrato fenólico da casca de jaboticaba (EFCJ) nos biomarcadores séricos das funções hepáticas, pancreática, renal e do estresse oxidativo, e no desenvolvimento de esteatose hepática em coelhos. Neste ensaio, 36 coelhos foram divididos em 6 grupos: ração controle, ração hipercolesterolemiantes (RH), RH + 0,4 mg de EFCJ·kg·dia⁻¹, RH + 0,8 mg de EFCJ·kg·dia⁻¹, RH + 0,4 mg de EFCJ·kg·dia⁻¹ em dias alternados e RH + 0,3 mg de sinvastatina·kg·dia⁻¹. O consumo do EFCJ reduziu os níveis de lipase e de gama glutamiltransferase, preveniu a peroxidação lipídica e estimulou a atividade de enzimas antioxidantes no fígado dos animais. Além disso, demonstramos pela primeira vez que a suplementação com EFCJ atenua a esteatose no tecido hepático de coelhos. O consumo diário da casca de jaboticaba ou do seu extrato fenólico previne o dano oxidativo e pancreático gerado pela dieta hipercolesterolemiantes e previne o desenvolvimento da doença hepática gordurosa não alcoólica em coelhos.

Palavras-chave: *Plinia jaboticaba* (Vell.) O. Berg, hepatoprotetor, fígado, colesterol, doença hepática gordurosa não alcoólica, polifenóis.

Highlights

- A suplementação com extrato fenólico da casca de jaboticaba preveniu dano hepático e pancreático em coelhos.
- O extrato fenólico atenuou o estresse oxidativo no fígado dos coelhos.
- O extrato fenólico atenuou esteatose hepática nos animais.
- O extrato fenólico preveniu o desenvolvimento da doença hepática gordurosa não alcoólica.

1 Introdução

A doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) é considerada a doença do fígado mais comum ao redor do mundo e é mais prevalente em países desenvolvidos, cujo padrão dietético inclui alimentação rica em carboidratos e gorduras saturadas (Younossi et al., 2016). Esteatose hepática caracteriza os estágios iniciais da doença, que pode evoluir para esteatohepatite não alcoólica, fibrose, cirrose e, em casos mais graves, carcinoma hepatocelular (Brunt et al., 2011). Além disso, DHGNA está associada com obesidade, síndrome metabólica e doenças cardiovasculares (Misra, Khashab, & Chalasani, 2009; Yang et al., 2016).

A patogênese da DHGNA é multifatorial, mas acredita-se que o acúmulo de lipídios no fígado, causado pelo desequilíbrio entre absorção, síntese hepática e excreção, seja o primeiro episódio que desencadeia a doença (Carr, Oranu, & Khungar, 2016). A deposição lipídica eventualmente induz a superprodução de espécies reativas de oxigênio (ROS), dando origem ao estresse oxidativo que, juntamente com inflamação, é considerado o segundo episódio responsável pela evolução das lesões hepáticas (Rolo, Teodoro, & Palmeira, 2012). Baseado nessas evidências, a inibição do depósito de lipídios e do desenvolvimento de estresse oxidativo é uma medida efetiva para prevenir o desenvolvimento da DHGNA.

Um crescente número de evidências sugere que o consumo de alimentos ricos em compostos fenólicos pode prevenir a progressão das lesões relacionadas com a DHGNA, principalmente devido à sua capacidade de neutralizar radicais livres. Já foi demonstrado que polifenóis exercem efeitos anti-esteatose, diminuindo o acúmulo de lipídios e inflamação nos hepatócitos, além de reduzir o estresse oxidativo, o que contribui para a proteção contra a DHGNA (Jia, Ren, Nie, & Yang, 2017; Arjinajarn, Chueakula & Pongchaidecha, 2017; Freitas et al., 2016; Benn et al., 2015; Guerra et al., 2015). Além disso, esses compostos atuam na diminuição das concentrações séricas de insulina (Plaza et al., 2016), triacilglicerol (Benn et al., 2015) e colesterol (Jiang, Dai, Nie, Yang, & Zeng, 2017).

Nesse contexto, a jaboticaba (*Plinia jaborcaba* (Vell.) O. Berg), conhecida como a “berrie” brasileira, tem despertado atenção nos últimos anos devido aos efeitos benéficos vinculados à sua ingestão, relacionados, principalmente, ao seu conteúdo de compostos fenólicos (Alejandro, Dubé, Desjardins, Lajolo, & Genovese, 2013; Alejandro, Granato, & Genovese, 2013; Batista et al., 2014;

Lenquiste, Batista, Marineli, Dragano, & Maróstica, 2012; Lobo de Andrade et al., 2015), presentes principalmente em sua casca (Plaza et al., 2016). Apesar do seu elevado conteúdo de compostos fenólicos e do potencial benéfico desses componentes, a casca desse fruto ainda é subutilizada, e, usualmente, é descartada durante o consumo.

A ingestão da casca de jabuticaba tem sido vinculada à redução do estresse oxidativo resultante da obesidade (Batista et al., 2014), melhoria do perfil lipídico plasmático (Alezandro, Granato, & Genovese, 2013), hipotensão e relaxamento vascular (Lobo de Andrade et al., 2015) e diminuição dos níveis de glicose e insulina (Plaza et al., 2016). No entanto, até essa data, nenhum trabalho sobre os efeitos do consumo dos compostos fenólicos presentes na casca de jabuticaba na progressão da DHGNA foi divulgado.

Considerando os benefícios do consumo de polifenóis na DHGNA e do potencial da casca da jabuticaba, o objetivo deste estudo foi investigar os efeitos dos compostos fenólicos presentes na casca da jabuticaba, mediante administração de diferentes doses do seu extrato, no desenvolvimento da DHGNA induzida pela dieta em coelhos.

2 Material e métodos

2.1 Amostras de jabuticaba

Os frutos de jabuticaba (*Plinia jaboticaba* (Vell.) O. Berg) foram obtidos no pomar da Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, Brasil (latitude 20° 45' 14" S, longitude 42° 52' 55" W), durante a safra de 2015. Após a colheita, foram selecionados, higienizados com água corrente e mantidos em ultra freezer a -80 °C até o momento do processamento.

2.2 Obtenção do extrato fenólico concentrado da casca de jabuticaba (EFCJ)

As cascas dos frutos, obtidas por descascamento manual, foram pesadas e maceradas numa solução aquosa de etanol 70 % (1:2 m.v⁻¹), e o sistema foi

acidificado a pH 2 com ácido fosfórico. A extração dos compostos fenólicos foi realizada sob refrigeração (5 °C), por 24 h (Silva, Stringheta, Teófilo & Oliveira, 2013). Após filtração (Whatman nº 1), o extrato foi concentrado à temperatura máxima de 40 °C em evaporador rotativo à vácuo (RV 10 Digital V, IKA, Alemanha), até eliminação completa do etanol, e o pH ajustado para 4, para utilização no ensaio biológico. O EFCJ foi mantido ao abrigo da luz, em ultra freezer a -80 °C até o momento das análises.

2.3 Ensaio biológico

2.3.1 Animais e dietas

Trinta e seis coelhos Nova Zelândia, machos, pesando $3,45 \pm 0,28$ kg, com 90 dias de vida, foram obtidos no Centro de Cunicultura do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa. O experimento foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEUA/UFV), protocolo número 34/2016, e seguiu todas as recomendações éticas exigidas pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório. Os animais foram acondicionados em gaiolas individuais (45 x 52 x 60 cm), e mantidos em ambiente com controle de temperatura e umidade, e ciclos de luz (claro/escuro) de 12 h.

Após 15 dias de adaptação às condições laboratoriais, os coelhos foram divididos aleatoriamente em 6 grupos ($n = 6$), com acesso à água *ad libitum* e 120 g de ração (Tabela 1).

Tabela 1 – Planejamento alimentar e tratamentos dos animais experimentais.

Grupos	Tratamentos
Grupo controle (G1)	Ração comercial padrão
Grupo controle positivo (G2)	Ração hipercolesterolemiantes (RH)
Grupo controle negativo (G6)	RH + 0,3 mg de sinvastatina·kg·dia ⁻¹
Grupo G3	RH + 0,4 mg de EFCJ·kg·dia ⁻¹
Grupo G4	RH + 0,8 mg de EFCJ·kg·dia ⁻¹
Grupo G5	RH + 0,8 mg de EFCJ·kg·dia ⁻¹ em dias alternados

A suplementação com EFCJ e com sinvastatina foi realizada por gavagem oral e os animais dos grupos G1 e G2 receberam o mesmo volume de água destilada. A ração hipercolesterolemia foi produzida pelo enriquecimento de ração comercial padrão (Soma Nutrição Animal, Rio Pomba, Brasil) com 1 % de colesterol cristalino ($m \cdot m^{-1}$) (Sigma-Aldrich, USA). Após 50 dias de tratamento (Medina et al., 2014), os coelhos foram eutanasiados com anestesia terminal (xilazina $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ e quetamina $20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) por via muscular e foram realizadas as coletas de sangue e tecido.

2.3.2 Coleta de sangue e tecido

O sangue dos animais foi coletado pela veia marginal da orelha, nos tempos 0, 30 e 50 dias de experimento, após 12 h de jejum, em tubos heparinizados. Em seguida, o sangue foi centrifugado ($12000 \times g$ por 20 min.) para obtenção do plasma, que foi armazenado a -80°C até o momento das análises bioquímicas. Após eutanásia, o fígado foi dissecado, lavado com solução salina, pesado em balança analítica e amostras dos órgãos foram rapidamente coletadas. Parte das alíquotas foi congelada imediatamente em nitrogênio líquido e mantida a -80°C para análises das defesas antioxidantes e parte foi fixada em solução fixadora de Karnovsky para as análises histopatológicas.

2.3.3 Medidas biométricas

O consumo alimentar dos animais foi monitorado diariamente e o peso, a cada 10 dias. O índice hepatossomático (IHS) foi obtido pela relação entre o peso do fígado e o peso corporal no dia da eutanásia ($IHS = \text{Peso fígado} / \text{Peso corporal} \times 100$).

2.3.4 Análise dos parâmetros bioquímicos

As concentrações de proteínas totais (PT), ureia, creatinina, albumina, aspartato amino transferase (AST), alanina amino transferase (ALT), gama

glutamyltransferase (γ -GT), fosfatase alcalina (ALP) e lipase foram determinadas no plasma, utilizando-se kits comerciais (Bioclin, Minas Gerais, Brasil), em analisador bioquímico BS200E (Mindray, Shenzhen, China).

2.3.5 Avaliação de biomarcadores do estresse oxidativo e peroxidação lipídica

As amostras de fígado previamente congeladas foram utilizadas no preparo de homogenatos, numa proporção de 100 mg de tecido por 1 mL de solução tampão fosfato (50 mmol·L⁻¹, pH = 7,4), usando um homogeneizador (MA102 / Mini, Marconi, Piracicaba, SP, Brasil). Após centrifugação (12000 \times g, 4 °C, 10 min), o sobrenadante foi coletado e utilizado nas análises.

2.3.5.1 Peroxidação lipídica pelo ensaio TBARS (Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico)

As concentrações de TBARS foram determinadas utilizando-se metodologia adaptada de (Wallin, Rosengren, Shertzer, & Camejo, 1993). O homogenato do fígado (0,2 mL) foi misturado com 0,4 mL da solução de trabalho (TCA - ácido tricloroacético 15 %, TBA - ácido tiobarbitúrico 0,375 % e ácido clorídrico 0,25 mol·L⁻¹). Após aquecimento a 90 °C por 40 min., as amostras foram resfriadas em banho de gelo por 10 min e, então, centrifugadas (10000 \times g, 4 °C, 10 min). A absorvância do sobrenadante foi lida a 532 nm em microplaca de 96 poços (PowerWave HT, Winooski, VT, USA). TBARS foi quantificado por meio de uma curva analítica do padrão malondialdeído (MDA) e os resultados foram expressos em nmol MDA·mg tecido⁻¹.

2.3.5.2 Atividade de superóxido dismutase (SOD)

A atividade de SOD foi estimada com base no método descrito por Madesh & Balasubramanian (1998), adaptado. Foram adicionados, em microplaca de 96 poços, sequencialmente: 30 μ L do homogenato, 99 μ L de tampão fosfato de potássio 0,2 mol·L⁻¹, pH 7,0; 6 μ L de MTT (3-(4-5 dimethyl thiazol 2-yl) 2,5

diphenyl tetrazolium bromide) $1,5 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ e $15 \text{ }\mu\text{L}$ de pirogalol. A mistura foi encubada por 10 min em estufa a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ e a reação foi finalizada com a adição de $150 \text{ }\mu\text{L}$ de DMSO (dimethyl sulfoxide). A absorvância foi lida em 570 nm (PowerWave HT, Winooski, VT, USA) e expressa em $\text{U SOD}\cdot\text{mg proteína}^{-1}$.

2.3.5.3 Atividade de catalase (CAT)

A atividade de CAT foi avaliada segundo metodologia proposta por Aebi (1984). Para a reação, foram homogeneizados 1 mL de solução de H_2O_2 ($10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) em tampão fosfato de potássio ($0,2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 7,0) e $10 \text{ }\mu\text{L}$ das amostras. O decréscimo na absorvância foi monitorado a 240 nm , por 60 seg, em espectrofotômetro Shimadzu (UV-VIS 1601 PC, Quioto, Japão) e os resultados foram expressos em $\text{U CAT}\cdot\text{mg proteína}^{-1}$.

2.3.5.4 Atividade de glutationa-s-tranferase (GST)

A atividade de GST em resposta aos tratamentos foi determinada de acordo com Habig, Pabst, & Jakoby (1974). O meio de reação foi constituído de $700 \text{ }\mu\text{L}$ tampão fosfato de potássio ($0,2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 7,0), $10 \text{ }\mu\text{L}$ de CDNB (1-cloro-dinitro benzeno, $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$), $10 \text{ }\mu\text{L}$ de GSH (glutationa reduzida, $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) e $10 \text{ }\mu\text{L}$ do homogenato. A reação foi monitorada espectrofotometricamente a 340 nm (Shimadzu UV-VIS 1601 PC, Quioto, Japão) e os resultados foram expressos em $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$.

2.3.6 Avaliação histológica e morfológica do fígado

2.3.6.1 Inclusão em resina

Os fragmentos de fígado foram fixados em solução de Karnovsky por 24 horas e transferidos para uma solução alcoólica a $70 \text{ } \%$ ($\text{v}\cdot\text{v}^{-1}$). Posteriormente, foram desidratados em série etanólica crescente ($80 \text{ } \%$, $90 \text{ } \%$, $95 \text{ } \%$ e $100 \text{ } \%$ $\text{v}\cdot\text{v}^{-1}$),

com trocas a cada 30 min, e incluídos em glicol-metacrilato (Historesin®, Wetzlar, Leica) ao final da série.

Secções de 3 µm de espessura foram obtidas com o auxílio de um micrótomo rotativo (Leica, Reichert-Jung 2045, Wetzlar, Alemanha), utilizando-se navalhas de vidro. Para evitar a repetição das análises nas mesmas células, os cortes foram feitos de modo semi-seriado em intervalos regulares de 30 µm. Essas preparações foram coradas com azul de toluidina/borato de sódio 1 % (m·v⁻¹) e montadas com Entellan® (Merck, Darmstadt, Alemanha). As imagens dos cortes histológicos foram obtidas em fotomicroscópio de campo claro (Olympus, AX-70, Tóquio, Japão).

2.3.6.2 Morfometria e estereologia hepática

As alterações morfológicas no tecido hepático foram examinadas pelo método morfométrico, utilizando um sistema de grade de 330 pontos (intersecção entre duas linhas perpendiculares), observando-se um total de 3300 pontos por animal, em aumento de 200 x. O estudo morfométrico foi conduzido para quantificação dos elementos constituintes do fígado nos cortes histológicos, destacando-se hepatócitos, capilares sinusoides, núcleo e citoplasma de hepatócitos, células de Kupffer, diâmetro e volume nuclear, volume citoplasmático, volume total dos hepatócitos e constituintes histopatológicos, com destaque para infiltrados inflamatórios, gotículas de gordura e células degeneradas.

A proporção volumétrica (%) dos componentes foi estimada utilizando-se a seguinte relação:

$$\frac{P_C}{P_T} \times 100 \quad (1)$$

em que P_C = número de pontos sobre a estrutura de interesse e P_T = total de pontos de teste na área histológica. Para gotículas de gordura, P_T é o total de pontos sobre hepatócitos (Cupertino et al., 2013; Novaes et al., 2012).

O desenvolvimento de esteatose foi avaliado semiquantitativamente utilizando-se uma escala de 5 graus: grau 0, se a porcentagem de gordura nos

hepatócitos for < 5 %; grau 1, se ≥ 5 % e < 25 %; grau 2, se ≥ 25 % e < 50 %; grau 3, se ≥ 50 % e < 75 %; e grau 4, se ≥ 75 % (Turlin et al., 2009).

Para análise estereológica foram medidos os diâmetros 50 núcleos esféricos de hepatócitos por animal, que foram utilizados para cálculo dos volumes nuclear, citoplasmático e celular, conforme Eq. 2, 3 e 4.

$$Volume\ Nuclear = \frac{4}{3} \times \pi r^3 \quad (2)$$

$$Volume\ Citoplasmático = \frac{\% \text{ citoplasma} \times \text{volume nuclear}}{\% \text{ núcleos}} \quad (3)$$

$$Volume\ Celular(\text{hepatócito}) = \text{volume nuclear} + \text{volume citoplasmático} \quad (4)$$

Todas as análises morfométricas e estereológicas foram realizadas com auxílio do programa de análises de imagens Image Pro Plus 4.0 (Media Cybernetcs, Rockville, EUA).

2.4 Análises estatísticas

Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão. Para análise estatística, os dados foram submetidos à análise de variância (one-way ANOVA) seguida pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$), utilizando-se o software estatístico SAS (2003).

3 Resultados e discussão

3.1 Efeito da suplementação com EFCJ na ingestão alimentar e nas medidas biométricas

A dieta hipercolesterolemia não provocou variações significativas no peso corporal dos animais (Fig. 1A). Contudo, o consumo de ração foi menor pelos animais que receberam dieta acrescida de colesterol (Fig. 1B).

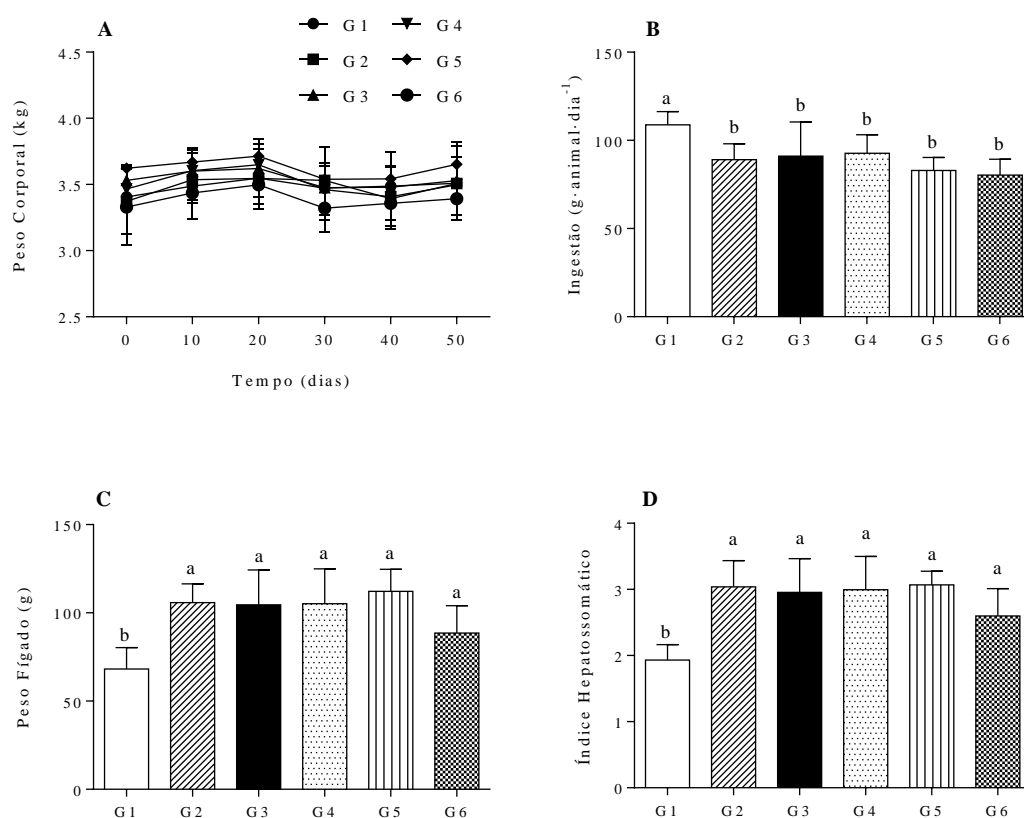


Fig. 1 – Variação do peso corporal ao longo do tempo (A), ingestão alimentar (B), peso do fígado (C) e índice hepatossomático (D) de coelhos alimentados com ração padrão (G1), ração hipercolesterolemia (G2), ração hipercolesterolemia + 0,4 mg de EFCJ·kg·dia⁻¹ (G3), ração hipercolesterolemia + 0,8 mg de EFCJ·kg·dia⁻¹ (G4), ração hipercolesterolemia + 0,8 mg de EFCJ·kg·dia⁻¹ em dias alternados (G5) e ração hipercolesterolemia + 0,3 mg de sinvastatina·kg·dia⁻¹ (G6). Os dados estão expressos como média ± desvio padrão (n = 6). Letras diferentes acima das colunas indicam diferença estatística ($p \leq 0,05$) pelo teste de Tukey.

A menor ingestão de ração pelos animais alimentados com RH ocorreu em virtude do mecanismo homeostático normal, em que o consumo de alimentos é controlado para regular a ingestão energética, como descrito por Sampey et al. (2011). Dessa forma, o peso corporal dos coelhos permaneceu sem alterações significativas durante o tempo do experimento. Essa mesma tendência de ingestão foi observada em outros trabalhos com ratos submetidos a dieta com alto teor de gordura (Lenquiste et al., 2015; Natal et al., 2017; Reynés, García-Ruiz, Díaz-Rúa, Palou, & Oliver, 2014). Entretanto, em alguns casos, foi observado aumento no peso dos animais como consequência do maior aporte calórico da dieta (Natal et al., 2017; Lenquiste et al., 2015; Batista et al., 2014).

No presente estudo, a administração do EFCJ não acarretou mudanças no peso corporal ou ingestão da dieta (Fig. 1 A e B). O peso corporal é, segundo Natal et al. (2017), uma das variáveis menos sensíveis aos tratamentos, cujas alterações são observadas tardiamente em relação a outros marcadores como os celulares e biomoleculares. De maneira similar, trabalhos recentes reportaram que a suplementação com casca de jabuticaba não alterou o peso corporal ou o consumo de ração em ratos obesos e saudáveis (Batista et al., 2014; Leite et al., 2011; Lenquiste et al., 2012; Wu, Hung, Shin, Wang, & Huang, 2016).

Os coelhos alimentados com RH exibiram hepatomegalia, caracterizada pela elevação do peso do fígado e do índice hepatossomático, em relação aos animais do grupo controle (G1) (Fig. 1 C e D). Essa condição indica acúmulo de lipídios decorrente do consumo excessivo de colesterol, o que pôde ser comprovado pelas análises histológicas do órgão (Fig. 3). Corroborando os resultados deste trabalho, acúmulo de gordura no fígado e hepatomegalia foram observados em ratos (Guerra et al., 2015; Natal et al., 2017; Zhou et al., 2015) e coelhos (Papadomichelakis, Zoidis, & Fegeros, 2012) submetidos à dieta rica em gordura. Papadomichelakis, Zoidis, & Fegeros (2012) demonstraram que alterações no conteúdo de colesterol e na composição de ácidos graxos dietéticos determinam em grande parte o peso do fígado e essa alteração é uma característica proeminente em animais que desenvolvem DHGNA, como observado por Wu, Zhang, Zheng, & Jiang (2014).

A suplementação com EFCJ não impediu o incremento no peso dos fígados dos animais (Fig. 1 C e D). Esse resultado reforça o descrito por Lenquiste et al. (2012), indicando que a adição de casca de jabuticaba à dieta com alto teor de

gordura não inibiu o aumento do peso dos fígados em ratos. Por outro lado, Alezandro, Granato, & Genovese (2013) observaram redução do peso desse órgão em ratos diabéticos suplementados com jabuticaba em pó, o que pode ter sido resultado, também, de outros componentes presentes no fruto, como as fibras insolúveis (Wu, Long, & Kennelly, 2013).

3.2 Efeito da suplementação com EFCJ nos indicadores bioquímicos das funções hepática e pancreática

Para avaliar os efeitos da dieta hipercolesterolemia e da ingestão do EFCJ no fígado e pâncreas dos animais, foram determinadas as concentrações séricas de AST, ALT, ALP, γ -GT e lipase.

Nos coelhos alimentados com colesterol, as concentrações de γ -GT encontraram-se elevadas a partir de 30 dias de tratamento, o que indica dano hepático causado pela dieta (Tabela 1). Esse aumento é comumente observado em resposta ao consumo de dietas ricas em gorduras e colesterol, como constatado por Ishak, Ismail, Hamid, Ahmad, & Abd Ghafar (2013) e Li et al. (2014).

De acordo com o elucidado por Dufour et al (2000), a concentração sérica de γ -GT é um marcador usual da função hepática e, quando elevada, indica injúria no fígado. Conforme demonstrado por Charatcharoenwitthaya, Lindor, & Angulo (2012), essa enzima é um indicador sensível do acúmulo de lipídios nos hepatócitos e inflamação celular, como visto em pacientes com DHGNA. Além disso, a elevação de γ -GT tem sido relacionada com o risco de síndrome metabólica (Kunutsor, Apekey, & Seddoh, 2015), com a mortalidade por doença renal crônica (Caravaca-Fontán et al., 2017), disfunção endotelial (Arinc et al., 2013), diabetes (Ndrepepa et al., 2016), doença arterial coronariana (Ndrepepa et al., 2017) e estresse oxidativo (Contreras-Zentella & Hernández-Muñoz, 2016).

Tabela 1 – Efeito da ingestão de dieta hipercolesterolemiant e da suplementação com EFCJ nas concentrações plasmáticas de AST, ALT, ALP, γ -GT e lipase de coelhos experimentais.

Parâmetros	Tempo (dias)	G1	G2	G3	G4	G5	G6
AST (U·L ⁻¹)	0	88,40 ± 42,53 ^{aA}	67,22 ± 44,58 ^{aA}	40,84 ± 10,86 ^{aA}	49,21 ± 17,02 ^{aA}	70,42 ± 31,41 ^{aA}	49,35 ± 23,65 ^{aA}
	30	56,38 ± 23,77 ^{aA}	65,01 ± 10,50 ^{aA}	80,89 ± 24,80 ^a	53,65 ± 51,63 ^{aA}	92,67 ± 71,16 ^{aA}	114,66 ± 89,09 ^{aA}
	50	64,63 ± 57,57 ^{aA}	83,61 ± 39,31 ^{aA}	88,57 ± 27,14 ^a	86,38 ± 39,63 ^{aA}	71,43 ± 33,25 ^{aA}	95,32 ± 53,46 ^{aA}
ALT (U·L ⁻¹)	0	79,58 ± 30,36 ^{aA}	31,08 ± 15,90 ^{cA}	30,85 ± 12,02 ^{cA}	31,20 ± 12,95 ^{cA}	55,65 ± 17,33 ^{bA}	28,38 ± 7,08 ^{cA}
	30	49,83 ± 23,28 ^{aA}	39,71 ± 13,36 ^{aA}	39,68 ± 15,89 ^{aA}	31,49 ± 18,35 ^{aA}	62,57 ± 35,63 ^{aA}	55,64 ± 10,29 ^{aA}
	50	67,31 ± 9,96 ^{aA}	30,11 ± 16,24 ^{aA}	25,72 ± 28,06 ^{aA}	31,49 ± 12,13 ^{aA}	29,34 ± 30,34 ^{aA}	55,73 ± 33,61 ^{aA}
ALP (U·L ⁻¹)	0	104,29 ± 37,91 ^{aA}	106,31 ± 41,35 ^{aA}	108,72 ± 59,72 ^{aA}	88,64 ± 24,42 ^{aA}	85,02 ± 16,24 ^{aA}	82,48 ± 30,88 ^{aA}
	30	88,89 ± 65,80 ^{aA}	92,81 ± 31,79 ^{aA}	76,77 ± 29,88 ^{aA}	94,68 ± 68,03 ^{aA}	114,94 ± 55,23 ^{aA}	128,76 ± 37,04 ^{aA}
	50	88,99 ± 40,78 ^{aA}	110,69 ± 82,14 ^{aA}	133,32 ± 32,17 ^{aA}	178,17 ± 119,30 ^{aA}	128,63 ± 60,51 ^{aA}	111,44 ± 23,88 ^{aA}
γ -GT (U·L ⁻¹)	0	4,74 ± 2,10 ^{aA}	4,51 ± 8,96 ^{aC}	4,75 ± 1,58 ^{aB}	4,59 ± 1,39 ^{aA}	5,71 ± 2,25 ^{aB}	4,98 ± 2,03 ^{aB}
	30	3,77 ± 3,38 ^{cA}	27,63 ± 6,90 ^{aB}	17,17 ± 11,29 ^{abcA}	12,09 ± 13,32 ^{bcA}	25,90 ± 18,17 ^{abA}	9,69 ± 4,97 ^{cAB}
	50	9,61 ± 3,75 ^{cA}	49,01 ± 9,25 ^{aA}	21,5 ± 9,9 ^{bcA}	12,13 ± 10,88 ^{cA}	36,54 ± 4,75 ^{abA}	20,40 ± 14,24 ^{bcA}
Lipase (U·L ⁻¹)	0	227,89 ± 48,34 ^{aA}	219,02 ± 77,59 ^{aB}	213,77 ± 27,4 ^{aB}	219,64 ± 35,64 ^{aB}	208,81 ± 93,94 ^{aC}	229,19 ± 73,35 ^{aB}
	30	272,3 ± 56,74 ^{bA}	857,3 ± 466,83 ^{aA}	407,1 ± 118,64 ^{bB}	298,0 ± 193,69 ^{bB}	844,7 ± 549,72 ^{abB}	538,2 ± 189,82 ^{abB}
	50	345,2 ± 310,51 ^{cA}	1254,1 ± 453,23 ^{bA}	1624,4 ± 367,65 ^{abA}	1535,4 ± 232,23 ^{abA}	1960,8 ± 497,26 ^{aA}	1199,9 ± 555,55 ^{bA}

G1 = ração padrão, G2 = ração hipercolesterolemiant e, G3 = ração hipercolesterolemiant e + 0,4 mg de EFCJ·kg·dia⁻¹, G4 = ração hipercolesterolemiant e + 0,8 mg de EFCJ·kg·dia⁻¹, G5 = ração hipercolesterolemiant e + 0,8 mg de EFCJ·kg·dia⁻¹ de EFCJ em dias alternados e G6 = ração hipercolesterolemiant e + 0,3 mg de sinvastatina·kg·dia⁻¹ por 50 dias. AST = aspartato amino transferase, ALT = alanina amino transferase, ALP = fosfatase alcalina, γ -GT = gama glutamiltransferase. Os dados estão expressos como média ± desvio padrão (n = 6). Letras minúsculas diferentes nas linhas indicam diferença estatística entre os grupos experimentais e letras maiúsculas diferentes na coluna representam diferença estatística ao longo do tempo em um mesmo grupo, pelo teste de Tukey (p ≤ 0,05).

A administração do EFCJ foi capaz de evitar a elevação de γ -GT nos animais do grupo G4 e diminuir os seus níveis no grupo G3 em comparação a G2 (Tabela 1), o que indica que o EFCJ exerceu ação protetiva no fígado. Song et al. (2016) obtiveram resultados parecidos em camundongos hipercolesterolêmicos suplementados com extrato de amora, sugerindo efeito hepatoprotetor do extrato devido à redução dos níveis séricos de ALT e AST e de CT e TG no fígado. Similarmente, a administração diária de açaí diminuiu as concentrações plasmáticas de ALT e hepáticas de TG (Guerra et al., 2015) em animais submetidos à dieta rica em gorduras. Os autores relacionaram esses efeitos protetores ao conteúdo de compostos bioativos dessas frutas, conhecidas como fontes naturais de compostos fenólicos, flavonoides e, principalmente, de antocianinas.

Apesar do aumento de γ -GT, os valores de AST, ALT e ALP foram estatisticamente similares entre os grupos experimentais (Tabela 1). Essas enzimas são consideradas indicadoras de dano hepatocelular inespecífico e, em portadores da DHGNA, suas concentrações séricas geralmente encontram-se elevadas (Neuman, Cohen & Nanau, 2014). Charatcharoenwitthaya, Lindor, & Angulo (2012), entretanto, observaram que em pacientes com DHGNA, os níveis de aminotransferases e AST flutuam durante o curso da doença e que, em alguns casos, as concentrações dessas enzimas estão normalizadas.

Essa mesma tendência foi encontrada por outros pesquisados em animais alimentados com dieta hipercolesterolemiantes. Csonka et al. (2017) descreveram que, em ratos, a adição de 2 % de colesterol à dieta, por 12 semanas, induziu a elevação dos níveis plasmáticos de ALP, mas não de ALT e ASP. Em coelhos que consumiram dieta com 1 % de colesterol por 8 e 12 semanas, a dieta não provocou alterações nas concentrações de AST e ALT (Kainuma et al., 2006). Contudo, em alguns casos, as concentrações séricas de AST, ALT e ALP se elevam em resposta ao excesso de colesterol na dieta. El-Agamy (2017) por exemplo, reportou que em coelhos alimentados com dieta acrescida de 0,5 % colesterol, os níveis dessas enzimas se elevaram em 4 e 8 semanas de tratamento. Resultados semelhantes foram obtidos por Subramani et al. (2017) em ratos submetidos à dieta suplementada com 2 % de colesterol, cujos níveis séricos de AST, ALT e ALP aumentaram após 30 dias.

A concentração de lipase aumentou drasticamente ao longo do experimento nos animais do grupo G2 (Tabela 1). Segundo Csonka et al. (2017), essa enzima é

considerada um marcador específico de dano pancreático e sua secreção em excesso no plasma ocorre especificamente em resposta à injúria no pâncreas que, no presente estudo, foi induzida pela dieta hipercolesterolemiantes. De fato, dieta rica em gordura ou colesterol tem sido relacionada com lesão pancreática (Matsuda et al., 2014; Zhang et al., 2010). A suplementação diária com EFCJ (G3 e G4) foi eficiente em prevenir a elevação de lipase nos primeiros 30 dias de tratamento (Tabela 1). O consumo do EFCJ, portanto, protegeu o pâncreas contra os efeitos nocivos da dieta com excesso de colesterol, em 30 dias.

Estudos recentes relacionaram compostos fenólicos, como flavonoides e antocianinas, à inibição da atividade de lipase pancreática (Kim et al., 2016; S. Liu et al., 2013; Takahashi et al., 2015; Yao, Xu, Zhang, & Lu, 2013). A inibição dessa enzima tem sido considerada uma das estratégias mais importantes para o tratamento de dislipidemias induzidas pela dieta e obesidade, uma vez que a sua inibição resulta em menor digestão e absorção de gorduras dietéticas (de la Garza, Milagro, Boque, Campión, & Martínez, 2011). Isso pode explicar a diminuição das concentrações de lipase, aos 30 dias, no plasma dos coelhos suplementados diariamente com o EFCJ. Alejandro, Granato, & Genovese, (2013), inclusive, demonstraram que jabuticaba inibiu a atividade de lipase em ratos diabéticos, o que foi atribuído aos compostos fenólicos presentes no fruto.

3.3 Efeito da Suplementação com EFCJ nos Indicadores Bioquímicos da Função Renal

Possíveis alterações renais decorrentes da ingestão da dieta hipercolesterolemiantes e do EFCJ foram avaliadas pela medida das concentrações plasmáticas de PT, ureia, creatinina e albumina. Como exposto na Tabela 2, o tratamento não resultou em modificações nos níveis de PT, ureia e creatinina entre os grupos experimentais.

Tabela 2 – Efeito da ingestão de dieta hipercolesterolemiant e da suplementação com EFCJ nas concentrações plasmáticas de proteínas totais, albumina, ureia e creatinina em coelhos experimentais.

Parâmetros	Tempo (dias)	G1	G2	G3	G4	G5	G6
Proteínas Totais	0	6,7 ± 1,7 ^{aA}	5,6 ± 0,9 ^{aA}	5,7 ± 0,6 ^{aA}	4,8 ± 0,7 ^{aA}	5, ± 0,75 ^{aA}	5,4 ± 0,8 ^{aA}
	30	4,9 ± 1,0 ^{aA}	7,2 ± 5,2 ^{aA}	5,2 ± 3,3 ^{aA}	10,0 ± 5,8 ^{aA}	8,3 ± 3,6 ^{aA}	7,4 ± 1,3 ^{aA}
	50	7,3 ± 1,1 ^{aA}	3,7 ± 1,2 ^{aA}	4,1 ± 1,0 ^{aA}	6,04 ± 4,0 ^{aA}	6,4 ± 2,7 ^{aA}	6,2 ± 1,3 ^{aA}
Albumina	0	4,8 ± 0,7 ^{aA}	4,2 ± 0,9 ^{aA}	4,5 ± 0,7 ^{aA}	3,8 ± 0,5 ^{aA}	3,9 ± 0,42 ^{aA}	4,2 ± 0,5 ^{aA}
	30	3,7 ± 0,7 ^{aA}	8,5 ± 2,1 ^{bB}	8,3 ± 0,7 ^{bB}	11,2 ± 2,3 ^{bB}	9,4 ± 2,79 ^{bB}	11,6 ± 2,7 ^{bB}
	50	5,0 ± 0,5 ^{aA}	10,5 ± 3,1 ^{bB}	9,1 ± 2,7 ^{bB}	8,8 ± 1,6 ^{bC}	9,5 ± 1,73 ^{bB}	10,0 ± 2,2 ^{bB}
Ureia	0	33,0 ± 5,1 ^{aA}	26,3 ± 5,7 ^{aA}	28,9 ± 5,8 ^{aA}	26,1 ± 3,0 ^{aA}	30,3 ± 1,5 ^{aA}	33,6 ± 8,6 ^{aA}
	30	32,5 ± 7,1 ^{aA}	42,0 ± 8,7 ^{aB}	33,2 ± 7,8 ^{aA}	31,9 ± 1,9 ^{aAB}	36,1 ± 10,7 ^{aA}	39,5 ± 4,6 ^{aA}
	50	45,5 ± 7,2 ^{aA}	41,5 ± 5,4 ^{aB}	37,6 ± 9,1 ^{aA}	37,6 ± 7,9 ^{aB}	32,1 ± 7,6 ^{aA}	30,4 ± 11,4 ^{aA}
Creatinina	0	1,2 ± 0,3 ^{aA}	0,8 ± 0,3 ^{aA}	0,9 ± 0,1 ^{aA}	0,9 ± 0,2 ^{aA}	1,0 ± 0,1 ^{aA}	1,0 ± 0,1 ^{aA}
	30	1,1 ± 0,3 ^{aA}	1,0 ± 0,2 ^{aA}	1,0 ± 0,2 ^{aA}	1,1 ± 0,3 ^{aA}	1,3 ± 0,2 ^{aA}	0,5 ± 0,1 ^{aB}
	50	1,1 ± 0,6 ^{aA}	0,8 ± 0,6 ^{aA}	1,5 ± 0,2 ^{aA}	1,1 ± 0,4 ^{aA}	1,2 ± 0,7 ^{aA}	0,7 ± 0,2 ^{aB}

G1 = ração padrão, G2 = ração hipercolesterolemiant, G3 = ração hipercolesterolemiant + 0,4 mg de EFCJ·kg·dia⁻¹, G4 = ração hipercolesterolemiant + 0,8 mg de EFCJ·kg·dia⁻¹, G5 = ração hipercolesterolemiant + 0,8 mg de EFCJ·kg·dia⁻¹ de EFCJ em dias alternados e G6 = ração hipercolesterolemiant + 0,3 mg de sinvastatina·kg·dia⁻¹ por 50 dias. Os dados estão expressos como média ± desvio padrão (n = 6). Letras minúsculas diferentes nas linhas indicam diferença estatística entre os grupos experimentais e letras maiúsculas diferentes na coluna representam diferença estatística ao longo do tempo em um mesmo grupo, pelo teste de Tukey (p ≤ 0,05).

Nos animais consumindo RH, os valores de albumina foram superiores aos encontrados no grupo controle (G1) (Tabela 2). Prasad (2010) também observou aumento nos níveis de albumina no plasma de coelhos submetidos à dieta rica em colesterol. Em contrapartida, Charatcharoenwitthaya, Lindor, & Angulo (2012) observaram diminuição da concentração de albumina em pacientes com DHGNA. Alterações na concentração sérica dessa proteína são utilizadas como marcadores para avaliar a função hepática, o estado nutricional e a função renal (Carr, Oranu, & Khungar, 2016; Dufour et al., 2000). Geralmente, em patologias hepáticas e renais, os níveis de albumina encontram-se diminuídos (Dufour et al., 2000).

3.4 Efeito da suplementação com EFCJ nos biomarcadores do estresse oxidativo e peroxidação lipídica

Nos animais alimentados exclusivamente com RH (G2), a dieta ocasionou aumento na concentração hepática de TBARS, um indicador da peroxidação lipídica, acompanhado de decréscimo nas atividades das enzimas antioxidantes SOD, CAT e GST (Fig. 2). A dieta hipercolesterolemia, portanto, induziu estresse oxidativo no fígado dos animais.

A ingestão de dieta com alta concentração de colesterol altera o status antioxidante, estimulando a produção de ROS e, conseqüentemente, induzindo peroxidação lipídica. Concomitantemente, esse tipo de dieta é capaz de reduzir a atividade das enzimas endógenas (Jurcevic et al., 2017; Peña-Orihuela et al., 2013)

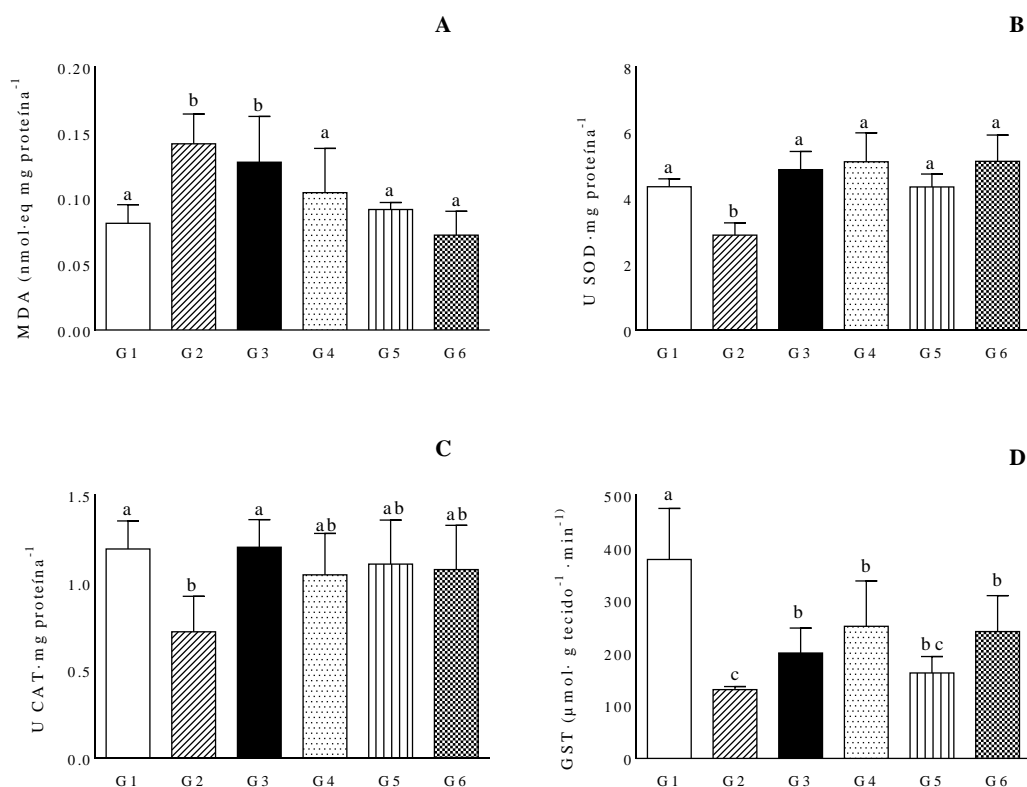


Fig. 2 – Biomarcadores do estresse oxidativo e peroxidação lipídica em coelhos alimentados com ração padrão (G1), ração hipercolesterolemiantes (G2), ração hipercolesterolemiantes + 0,4 mg de EFCJ·kg·dia⁻¹ (G3), ração hipercolesterolemiantes + 0,8 mg de EFCJ·kg·dia⁻¹ (G4), ração hipercolesterolemiantes + 0,8 mg de EFCJ·kg·dia⁻¹ em dias alternados (G5) e ração hipercolesterolemiantes + 0,3 mg de sinvastatina·kg·dia⁻¹ (G6) por 50 dias. Os dados estão expressos como média ± desvio padrão (n = 6). (A) Peroxidação lipídica pelo ensaio TBARS, MDA = malondialdeído. (B) Atividade de superóxido dismutase (SOD). (C) Atividade de catalase (CAT). (D) Atividade de Glutaciona-S-Transferase (GST). Letras minúsculas diferentes acima das colunas indicam diferença estatística entre os grupos experimentais pelo teste de Tukey (p ≤ 0,05).

Em concordância com este estudo, Sozanski et al., (2014) também observaram aumento na concentração de TBARS e depleção das enzimas antioxidantes em coelhos alimentados com ração acrescida de 1 % de colesterol, mostrando que a dieta hipercolesterolemiantes resultou em estresse oxidativo no fígado dos animais.

Animais tratados com excesso de colesterol na alimentação desenvolvem estresse oxidativo em órgãos como cérebro, rins, testículos, coração, músculo e fígado, (Abbas & Sakr, 2013; Bai et al., 2015; Batista et al., 2014; Hur et al., 2014; Peña-Orihuela et al., 2013; Prasad, McNair, Caspar-Bell, & Mabood Qureshi, 2014; H. J. Wang et al., 2015). Entretanto, segundo Bai et al. (2015), o fígado parece ser

um dos órgãos mais afetados, em virtude do seu papel no metabolismo do colesterol (Platt et al., 2014).

Estresse oxidativo é, na verdade, considerado um dos principais eventos moleculares que levam ao desenvolvimento e progressão da DHGNA. Rafiei, Omidian, & Bandy (2017) observaram que o excesso de colesterol no fígado pode levar à produção ROS em excesso e, conseqüentemente, induzir peroxidação lipídica. Em adição, como enfatizado por Rolo et al. (2012), o aumento da produção de ROS pode resultar em disfunção mitocondrial que, eventualmente, estimula a liberação de citocinas pró-inflamatórias, resultando em inflamação. Esses fatores atuam em conjunto para desencadear as lesões hepáticas relacionadas com o desenvolvimento e progressão da DHGNA (Carr, Oranu, & Khungar, 2016).

A elevação de TBARS foi efetivamente reduzida pela suplementação com EFCJ em 26,2 % nos animais do G4 e 35,3 % no grupo G5. Além disso, a administração do EFCJ manteve a atividade de CAT e SOD semelhante aos níveis do grupo controle (G1). Em relação à G2, a atividade de CAT foi superior em 1,7, 1,8 e 1,5 vezes e a de SOD em 1,7, 1,3 e 1,5 vezes nos grupos G3, G4 e G5, respectivamente. A atividade de GST foi reduzida em todos os grupos em RH, embora nos coelhos suplementados com EFCJ esses valores tenham sido maiores (53,28 % em G3 e 91,87 % em G4) que os encontrados nos animais do grupo G2.

Esses resultados realçam o potencial dos compostos fenólicos presentes da casca da jabuticaba e provam que o EFCJ é capaz de melhorar o status antioxidante hepático e pode ser promissor na proteção contra danos oxidativos e na prevenção da peroxidação lipídica. Assim, a redução do estresse oxidativo no tecido hepático pelo EFCJ contribuiu para a prevenção da progressão da DHGNA induzida pela dieta, o que foi confirmado posteriormente pelas análises histológicas (Fig. 3). Vale destacar que, contradizendo trabalhos anteriores (Sadeghi et al., 2017), a suplementação diária com o EFCJ foi tão eficiente quanto sinvastatina em prevenir estresse oxidativo no fígado dos animais.

Batista et al. (2014) e Lenquiste et al. (2015) demonstraram que a suplementação com casca de jabuticaba em pó e seu extrato foi capaz de minimizar os danos oxidativos provocados pela obesidade induzida pela dieta, no plasma, fígado, cérebro e rim de ratos, ao diminuir a peroxidação lipídica e restaurar as enzimas antioxidantes. Esses efeitos foram atribuídos aos compostos fenólicos

presentes na casca do fruto, especialmente ácido gálico, ácido elágico, quercetina e cianidina-O-3-glicosídeo.

Realmente, é amplamente reconhecido que o consumo de compostos fenólicos, um dos maiores grupos de antioxidantes naturais encontrados na dieta humana, pode desempenhar um importante papel na prevenção e no controle de complicações oriundas do estresse oxidativo (Alejandro, Granato, & Genovese, 2013; Benn et al., 2015). No estudo desenvolvido por Santos et al. (2017), a suplementação com extrato da casca de uva, cuja composição inclui elevadas concentrações de polifenóis, reduziu o dano oxidativo no fígado de ratos alimentados com dieta rica em gordura, o que contribuiu para a prevenção de esteatose no órgão. Resultado semelhante foi obtido por Jurcevic et al. (2017), observando que o tratamento com compostos fenólicos presentes no vinho resultou em diminuição da peroxidação lipídica e restauração das atividades de SOD e CAT no fígado de animais que consumiram dieta com 2 % de colesterol.

Jia, Ren, Nie, & Yang (2017) mostraram que a capacidade de compostos fenólicos em interromper a auto-oxidação lipídica está relacionada diretamente com sua habilidade de neutralizar radicais livres, convertendo ROS em compostos estáveis. Além disso, polifenóis podem suprimir o estresse oxidativo ao induzir a atividade das enzimas antioxidantes endógenas por meio da ativação de fatores de transcrição como Nrf2 e AhR e, também, pela redução da resposta inflamatória através da interferência com a cascata inflamatória (NFκB e MAPK) (Zhang & Tsao, 2016). Esses mecanismos podem explicar o efeito protetivo exercido pelo EFCJ no estresse oxidativo induzido pela dieta, no fígado dos coelhos.

3.5 Efeito da suplementação com EFCJ nos parâmetros histopatológicos e morfológicos do fígado

O presente trabalho demonstrou pela primeira vez, até o limite do nosso conhecimento, o efeito protetor dos compostos fenólicos da casca de jabuticaba na prevenção do desenvolvimento da DHGNA.

As observações histológicas demonstraram estrutura hepática normal nos animais do grupo controle (G1), com hepatócitos regularmente organizados em cordões, separados entre si pelos capilares sinusoides, cercando radialmente a veia

central (Fig. 3A). Em contraste, os animais alimentados com RH exibiram notável deposição lipídica, característica de esteatose microvesicular e macrovesicular, acompanhada de infiltração de células inflamatórias e degeneração celular (Fig. 3B). Tais características também foram observadas por Kainuma et al. (2006) avaliando coelhos alimentados com 1% de colesterol como modelo experimental para avaliar a DHGNA induzida pela dieta, visto que os animais exibem aspectos fisiopatogênicos da doença e que, por não apresentarem resistência à insulina ou obesidade, são úteis para avaliar as mudanças fisiopatológicas relacionadas à hipercolesterolemia.

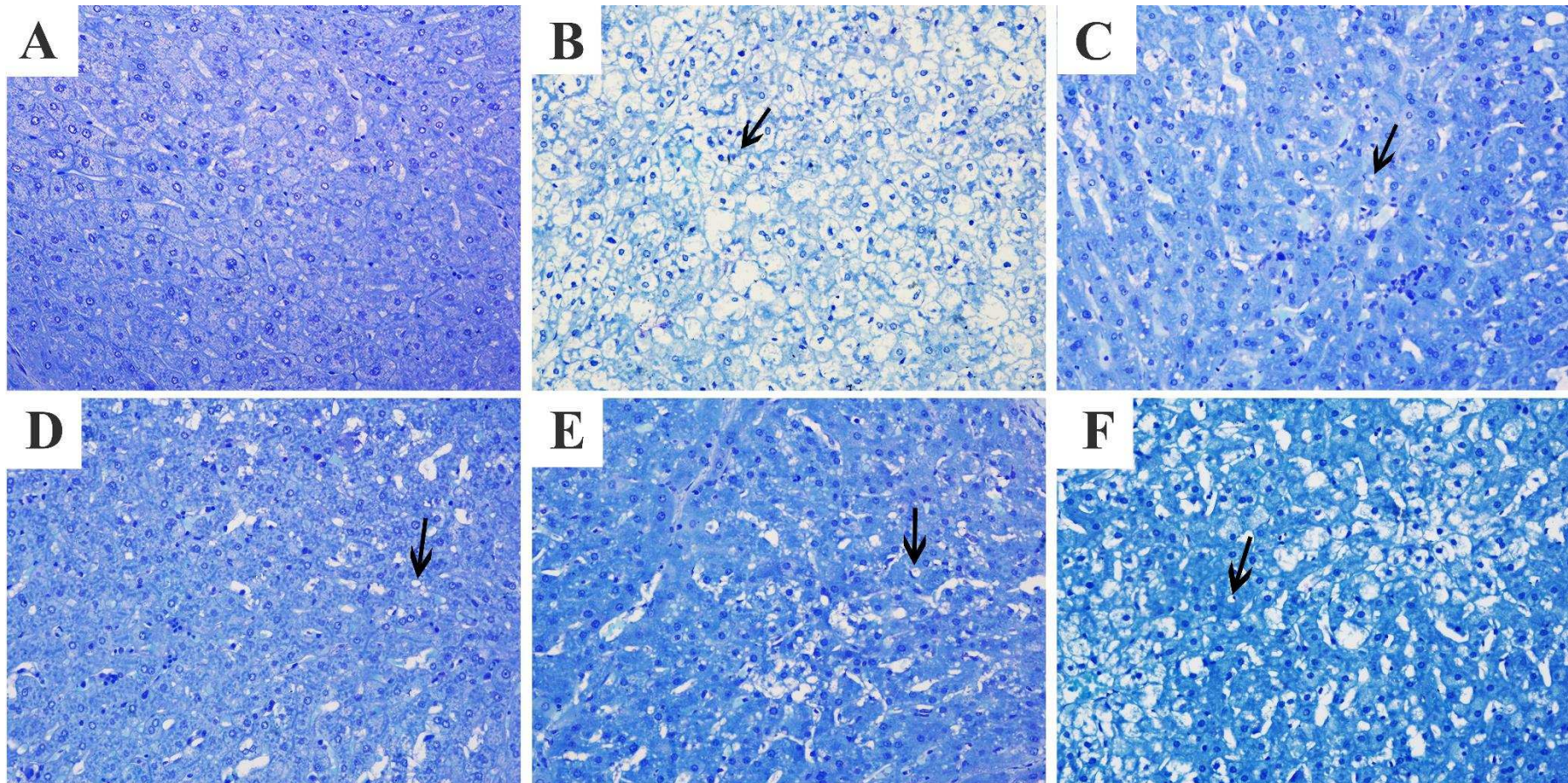


Fig. 3 – Fotomicrografias representativas de corte histológico do tecido hepático de coelhos tratados com dieta padrão, dieta hipercolesterolemiantes, EFCJ e sinvastatina, mostrando gotículas de gordura (seta) em todos os grupos que receberam dieta hipercolesterolemiantes. Coloração = azul de toluidina - borato de sódio. (A) G1 = dieta padrão; (B) G2 = dieta hipercolesterolemiantes; (C) G3 = dieta hipercolesterolemiantes + 0,4 mg de EFCJ·kg·dia⁻¹; (D) G4 = dieta hipercolesterolemiantes + 0,8 mg de EFCJ·kg·dia⁻¹; (E) G5 = dieta hipercolesterolemiantes + 0,8 mg de EFCJ·kg·dia⁻¹ de EFCJ em dias alternados e (F) G6 = dieta hipercolesterolemiantes + 0,3 mg de sinvastatina·kg·dia⁻¹ por 50 dias.

Os animais que consumiram apenas RH (G2) exibiram acúmulo severo de gotículas lipídicas no fígado, o que provocou aumento dos volumes citoplasmático e celular, sem alteração no número de hepatócitos e volume nuclear (Tabela 3, Fig. 3B). Isso evidencia que o aumento do volume celular foi decorrente do incremento de gotículas lipídicas no citoplasma, portanto, a deposição de lipídios foi, de fato, o fator responsável pela hepatomegalia observada nesses animais, em concordância com o descrito por Marcos, Monteiro, & Rocha (2012). O acúmulo hepático de gordura, presente em pelo menos 50 % dos hepatócitos, resultou em esteatose grau 3 em todos os coelhos desse grupo. Além de esteatose, degeneração em balão dos hepatócitos, aumento de infiltrados inflamatórios e aumento do número de células de Kupffer foram constatados nesses animais (Tabela 3, Fig. 4).

Tabela 3 – Efeito da ingestão de dieta hipercolesterolemiant e da suplementação com EFCJ nos parâmetros morfológicos do tecido hepático de coelhos.

Grupos Experimentais	Hepatócitos (%)	Hepatócitos Binucleados (%)	Capilares Sinusoides (%)	Células de Kupffer (%)	Infiltrados Inflamatórios (%)	Células Degeneradas
G1	83,2 ± 2,8 ^a	5,8 ± 1,3 ^a	8,8 ± 2,6 ^a	1,6 ± 1,2 ^b	0,077 ± 0,08 ^b	0,0 ± 0,0 ^c
G2	89,6 ± 2,5 ^a	1,6 ± 0,44 ^b	3,0 ± 0,7 ^{bc}	4,7 ± 1,5 ^a	1,1 ± 1,2 ^a	21,5 ± 12,7 ^a
G3	88,3 ± 4,6 ^a	5,0 ± 1,6 ^a	5,0 ± 2,1 ^b	1,5 ± 0,9 ^b	0,34 ± 0,18 ^b	0,27 ± 0,38 ^c
G4	89,2 ± 2,2 ^a	6,4 ± 1,8 ^a	2,7 ± 0,1 ^{bc}	1,8 ± 0,5 ^b	0,0 ± 0,0 ^b	0,47 ± 0,12 ^c
G5	87,3 ± 3,1 ^a	6,4 ± 2,2 ^a	4,1 ± 2,3 ^{bc}	2,0 ± 0,7 ^b	0,26 ± 0,12 ^b	0,43 ± 0,75 ^c
G6	89,6 ± 1,7 ^a	5,5 ± 1,6 ^a	2,4 ± 0,2 ^c	2,5 ± 0,2 ^b	0,063 ± 0,01 ^b	12,0 ± 5,33 ^b

G1 = ração padrão, G2 = ração hipercolesterolemiant e, G3 = ração hipercolesterolemiant e + 0,4 mg de EFCJ·kg·dia⁻¹, G4 = ração hipercolesterolemiant e + 0,8 mg de EFCJ·kg·dia⁻¹, G5 = ração hipercolesterolemiant e + 0,8 mg de EFCJ·kg·dia⁻¹ de EFCJ em dias alternados e G6 = ração hipercolesterolemiant e + 0,3 mg de sinvastatina·kg·dia⁻¹ por 50 dias. Os dados estão expressos como média ± desvio padrão (n = 6). Letras minúsculas diferentes nas colunas indicam diferença estatística entre os grupos experimentais pelo teste de Tukey (p ≤ 0,05).

Tabela 4 – Efeito da ingestão de dieta hipercolesterolemiant e da suplementação com EFCJ na volumetria do hepatócito no tecido hepático de coelhos.

Grupo	Volume Nuclear	Volume Citoplasmático	Volume Celular
G1	219,7 ± 40,67 ^a	1997 ± 300,4 ^c	2216 ± 300,4 ^c
G2	242,6 ± 52,74 ^a	4295 ± 904,7 ^a	4538 ± 904,7 ^a
G3	225,4 ± 29,24 ^a	3585 ± 1168,0 ^{ab}	3810 ± 1168 ^{ab}
G4	243,3 ± 41,51 ^a	2473 ± 785,0 ^c	2716 ± 785,0 ^c
G5	254,7 ± 39,18 ^a	2717 ± 398,0 ^{bc}	2972 ± 398,0 ^{bc}
G6	229,8 ± 38,27 ^a	1996 ± 518,9 ^c	2225 ± 518,9 ^c

G1 = ração padrão, G2 = ração hipercolesterolemiant e, G3 = ração hipercolesterolemiant e + 0,4 mg de EFCJ·kg·dia⁻¹, G4 = ração hipercolesterolemiant e + 0,8 mg de EFCJ·kg·dia⁻¹, G5 = ração hipercolesterolemiant e + 0,8 mg de EFCJ·kg·dia⁻¹ de EFCJ em dias alternados e G6 = ração hipercolesterolemiant e + 0,3 mg de sinvastatina·kg·dia⁻¹ por 50 dias. Os dados estão expressos como média ± desvio padrão (n = 6). Letras minúsculas diferentes nas colunas indicam diferença estatística entre os grupos experimentais pelo teste de Tukey (p ≤ 0,05).

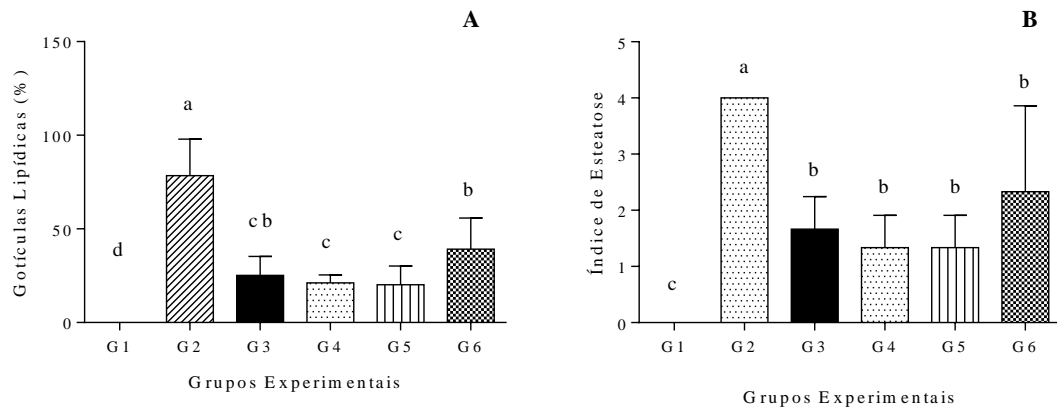


Fig. 4 – Efeito da ingestão de dieta hipercolesterolemia e da suplementação com EFCJ na porcentagem de gotículas lipídicas no tecido hepático (A) e índice de esteatose (B) em coelhos. G1 = dieta padrão, G2 = dieta hipercolesterolemia, G3 = dieta hipercolesterolemia + 1,2 ml de EFCJ, G4 = dieta hipercolesterolemia + 2,4 ml de EFCJ, G5 = dieta hipercolesterolemia + 2,4 ml de EFCJ em dias alternados e G6 = dieta hipercolesterolemia + 0,3 mg de sinvastatina Kg⁻¹ por 50 dias. Os dados estão expressos como média ± desvio padrão (n = 6). Letras minúsculas diferentes acima das colunas indicam diferença estatística entre os grupos experimentais pelo teste de Tukey (p ≤ 0,05).

Esses achados histológicos confirmam o desenvolvimento de DHGNA, cujo diagnóstico, conforme elucidado por Kleiner et al. (2005) e Carr, Oranu, & Khungar (2016), inclui depósito de gordura em mais de 5 % dos hepatócitos, injúria celular em balão e inflamação. A progressão da doença é alimentada pelo processo inflamatório, que ativa as células de Kupffer (Tateya et al., 2011), essenciais para o controle da inflamação (Sampey et al., 2011), o que explica o aumento do número dessas células no fígado dos animais do grupo G2.

Os resultados deste trabalho estão de acordo com os dados divulgados por outros pesquisadores (Al Zarzour et al., 2017; Csonka et al., 2017; Yanni et al., 2015) e comprovam a capacidade da dieta com excesso de colesterol em provocar acúmulo de lipídios no fígado. Rafiei, Omidian, & Bandy (2017) demonstraram que a deposição lipídica pode levar à produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) em excesso e, conseqüentemente, induzir peroxidação lipídica, o que foi demonstrado pela elevação dos níveis de TBARS no tecido hepático dos animais (Fig. 2A). O aumento da produção de ROS pode resultar em disfunção mitocondrial que, eventualmente, estimula a liberação de citocinas pró-inflamatórias, resultando em inflamação, como observado por Rolo, Teodoro, & Palmeira (2012). Esses

fatores atuam em conjunto para desencadear as lesões hepáticas relacionadas com o desenvolvimento e progressão da DHGNA.

O aparecimento de DHGNA foi observado em todos os animais alimentados com RH (Figura 1). Entretanto, a gravidade das alterações degenerativas no tecido hepático foi atenuada pela administração do EFCJ, como evidenciado pela diminuição das gotículas lipídicas e, conseqüentemente, dos volumes citoplasmático e celular, além da redução no número de infiltrados inflamatórios, de células de Kupffer e de células degeneradas (Tabelas 3 e 4; Fig. 3 C, D, E e F).

O grau de esteatose hepática foi significativamente inferior no fígado dos animais dos grupos G3, G4, G5 e G6, em comparação com grupo G2. Em todos os coelhos suplementados com EFCJ esse índice foi ≤ 2 , caracterizando acúmulo de lipídios inferior à 50 % dos hepatócitos. Vale ressaltar que a quantidade de gotículas lipídicas e de células degeneradas foi inferior nos animais tratados com EFCJ em relação aos que receberam sinvastatina, indicando que o extrato foi mais eficiente que o medicamento em atenuar o depósito de gordura no fígado dos coelhos.

Ying et al. (2013) observaram, em ratos consumindo dieta com excesso de colesterol, menor acúmulo de gotículas lipídicas no tecido hepático dos grupos tratados com quercetina, além de diminuição dos infiltrados inflamatórios e de fibrose. De maneira similar, a suplementação com extrato de açaí, rico em compostos fenólicos, teve impacto positivo na redução da hipertrofia de hepatócitos, infiltrados inflamatórios e esteatose microvesicular no fígado de ratos alimentados com dieta rica em gordura (Freitas et al., 2016). A suplementação dietética com uvas desidratadas, em coelhos alimentados com ração hipercolesterolemiantes, também resultou em redução da esteatose e da degeneração em balão de hepatócitos sendo esses efeitos atribuídos aos compostos fenólicos ácido p-OH-benzoico, ácido protocateico, ácido vanílico, ácido cafeico, ácido cinâmico, ácido ferrulico e catequina, encontrados no plasma dos animais após 4 e 8 semanas de tratamento.

Assim, a capacidade do EFCJ em atenuar os danos hepáticos provocados pela dieta hipercolesterolemiantes pode ser atribuída ao seu elevado conteúdo de antocianinas e outros compostos fenólicos. Diversos estudos com modelos *in vivo* e *in vitro* descrevem a utilização de compostos fenólicos como estratégia terapêutica ou preventiva no desenvolvimento da DHGNA, devido aos efeitos benéficos desses compostos no estresse oxidativo (Arjinajarn, Chueakula, &

Pongchaidecha, 2017; Yanni et al., 2015), esteatose (Song, Wu, et al., 2016; Zhou et al., 2015), inflamação (Bhaswant et al., 2015), e biogênese mitocondrial (Rafiei et al., 2017).

Souza et al. (2010) demonstraram que a administração de extrato de açaí diminuiu esteatose hepática em ratos submetidos à dieta rica em colesterol. Os autores atribuíram esses efeitos à cianidina-3-glicosídeo e cianidina 3- rutinosídeo, antocianinas que representam a maior classe de compostos fenólicos presentes no fruto de açaí. De fato, antocianinas podem atenuar a inflamação e reduzir estresse oxidativo, além de diminuir a progressão de fibrose e de esteatose no tecido hepático (Song, Wu, et al., 2016; Tang et al., 2014).

Além de antocianinas, outros compostos fenólicos como quercetina, ácido cafeico e ácido protocateico, também presentes na casca de jabuticaba (Plaza et al., 2016), previnem o desenvolvimento e progressão da DHGNA, como reportado por Vergani et al. (2017). Kobori et al. (2011) evidenciaram, em animais alimentados com dieta enriquecida com gordura e colesterol, que o fígado é o principal órgão que acumula quercetina e seus metabólitos, e que esse composto primeiramente reduz o estresse oxidativo e evita a redução da expressão de PPAR α para, posteriormente, reduzir o acúmulo de lipídios no órgão. Adicionalmente, Rafiei, Omidian, & Bandy (2017) demonstraram que os compostos fenólicos catequina, quercetina, resveratrol, ácido cafeico e ácido protocateico atuam na diminuição da geração de ROS, aumento do número de mitocôndrias, diminuição da inflamação e do acúmulo de gordura no fígado, prevenindo, assim, danos aos hepatócitos provocados por lipídios em excesso.

Alguns trabalhos foram desenvolvidos para avaliar os efeitos do consumo da casca de jabuticaba e de seu extrato em animais obesos, diabéticos ou alimentados com dieta com alta concentração de gordura. Esses trabalhos relataram que a ingestão da casca de jabuticaba promoveu melhora do perfil lipídico plasmático e prevenção da peroxidação lipídica no fígado e plasma (Lenquiste et al., 2015; Araújo et al., 2014; Batista et al., 2014; Alezandro et al., 2013; Lenquiste et al., 2012), além de redução dos níveis séricos de insulina e melhoria da resistência à insulina (Dragano et al., 2013). O presente trabalho foi o primeiro, até esta data, a estudar os efeitos da suplementação do extrato fenólico da casca de jabuticaba na prevenção do desenvolvimento da DHGNA. Os resultados deste estudo fornecem

evidências de que o consumo do EFCJ previne o desenvolvimento de alterações no tecido hepático provocadas pelo consumo de dieta rica em colesterol.

4 Conclusões

A suplementação com extrato fenólico da casca de jaboticaba diminuiu as concentrações plasmáticas de γ -GT e lipase, evitou a peroxidação lipídica e restaurou as atividades das enzimas antioxidantes endógenas no fígado de coelhos alimentados com dieta hipercolesterolemiantes. Além disso, o extrato reduziu o depósito de gordura no fígado dos animais. O consumo diário do extrato fenólico da casca de jaboticaba pode, portanto, atenuar estresse oxidativo e acúmulo de lipídios no fígado e, assim, prevenir o desenvolvimento da doença hepática gordurosa não alcoólica em coelhos. É importante ressaltar que o extrato fenólico da casca de jaboticaba foi mais eficiente que sinvastatina em atenuar o acúmulo de lipídios no fígado dos coelhos.

5 Referências bibliográficas

- Abbas, A. M., & Sakr, H. F. (2013). Simvastatin and vitamin E effects on cardiac and hepatic oxidative stress in rats fed on high fat diet. *Journal of Physiology and Biochemistry*, 69(4), 737-50.
- Aebi, H. (1984). Catalase in vitro. *Methods in Enzymology*, 105 (1947), 121–126.
- Al Zarzour, R. H., Ahmad, M., Asmawi, M. Z., Kaur, G., Ahmed Saeed, M. A., Al-Mansoub, M. A., Saghir, S. A. M., Usman, N. S., Al-Dulaimi, D. W., Yam, M. F. (2017). Phyllanthus niruri standardized extract alleviates the progression of non-alcoholic fatty liver disease and decreases atherosclerotic risk in Sprague-Dawley rats. *Nutrients*, 9(7), 1–19.
- Alezandro, M. R., Dubé, P., Desjardins, Y., Lajolo, F. M., & Genovese, M. I. (2013). Comparative study of chemical and phenolic compositions of two species of jaboticaba: *Myrciaria jaboticaba* (Vell.) Berg and *Myrciaria cauliflora* (Mart.) O. Berg. *Food Research International*, 54(1), 468–477.
- Alezandro, M. R., Granato, D., & Genovese, M. I. (2013). Jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba* (Vell.) Berg), a Brazilian grape-like fruit, improves plasma lipid profile in streptozotocin-mediated oxidative stress in diabetic rats. *Food Research International*, 54(1), 650–659.

- Araújo, C. R. R., Esteves, E. A., Dessimoni-Pinto, N. A. V., & Batista, Â. G. (2014). Myrciaria cauliflora Peel Flour Had a Hypolipidemic Effect in Rats Fed a Moderately High-Fat Diet. *Journal of Medicinal Food*, 17(2), 262–267.
- Arinc, H., Sarli, B., Baktir, A. O., Saglam, H., Demirci, E., Dogan, Y., Kurtul, S., Karaman, H., Karaman, A. (2013). Serum gamma glutamyl transferase and alanine transaminase concentrations predict endothelial dysfunction in patients with non-alcoholic steatohepatitis. *Upsala Journal of Medical Sciences*, 118, 1–7.
- Arjinajarn, P., Chueakula, N., & Pongchaidecha, A. (2017). Anthocyanin-rich Riceberry bran extract attenuates gentamicin-induced hepatotoxicity by reducing oxidative stress, inflammation and apoptosis in rats. *Biomedicine et Pharmacotherapy*, 92, 412–420.
- Bai, J., Zheng, S., Jiang, D., Han, T., Li, Y., Zhang, Y., & Liu, W. (2015). Oxidative stress contributes to abnormal glucose metabolism and insulin sensitivity in two hyperlipidemia models. *Int J Clin Exp Pathol*, 8(10), 13193–13200.
- Batista, Â. G., Lenquiste, S. A., Cazarin, C. B. B., da Silva, J. K., Luiz-Ferreira, A., Bogusz, S., Wang, H. L., de Souza, R. N., Augusto, F., Prado, M. A., Maróstica, M. R. (2014). Intake of jaboticaba peel attenuates oxidative stress in tissues and reduces circulating saturated lipids of rats with high-fat diet-induced obesity. *Journal of Functional Foods*, 6, 450–461.
- Benn, T., Kim, B., Park, Y.-K., Yang, Y., Pham, T. X., Ku, C. S., Farruggia, C., Harness, E., Smyth, J. A., Lee, J.Y. (2015). Polyphenol-rich blackcurrant extract exerts hypocholesterolaemic and hypoglycaemic effects in mice fed a diet containing high fat and cholesterol. *British Journal of Nutrition*, 113(11), 1697–1703.
- Bhaswant, M., Fanning, K., Netzel, M., Mathai, M. L., Panchal, S. K., & Brown, L. (2015). Cyanidin 3-glucoside improves diet-induced metabolic syndrome in rats. *Pharmacological Research*, 102, 208–217.
- Brunt, E. M., Kleiner, D. E., Wilson, L. A., Belt, P., Brent, A., & Neuschwander-Tetri. (2011). The NAS and the histopathologic diagnosis of NAFLD: distinct clinicopathologic meanings. *Hepatology*, 53(3), 810–820.
- Caravaca-Fontán, F., Azevedo, L., Bayo, M. Á., Gonzales-Candia, B., Luna, E., & Caravaca, F. (2017). High levels of both serum gamma-glutamyl transferase and alkaline phosphatase are independent predictors of mortality in patients with stage 4–5 chronic kidney disease. *Nefrologia*, 37(3), 1–9.
- Carr, R. M., Oranu, A., & Khungar, V. (2016). Nonalcoholic fatty liver disease: pathophysiology and management. *Gastroenterology Clinics of North America*, 45(4), 639–652.
- Charatcharoenwitthaya, P., Lindor, K. D., & Angulo, P. (2012). The spontaneous course of liver enzymes and its correlation in nonalcoholic fatty liver disease. *Digestive Diseases and Sciences*, 57, 1925–1931.

- Contreras-Zentella, M. L., & Hernández-Muñoz, R. (2016). Is liver enzyme release really associated with cell necrosis induced by oxidant stress? *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016, 1-12.
- Csonka, C., Baranyai, T., Tizslavicz, L., Fébel, H., Szűcs, G., Varga, Z. V., Sárközy, M., Puskás, L. G., Antal, O., Siska, A., Földesi, I., Ferdinandy, P., Czakó, L., Csont, T. (2017). Isolated hypercholesterolemia leads to steatosis in the liver without affecting the pancreas. *Lipids in Health and Disease*, 16(1), 144. z
- Cupertino, M. C., Costa, K. L. C., Santos, D. C. M., Novaes, R. D., Condessa, S. S., Neves, A. C., Oliveira, J. A., Matta, S. L. P. (2013). Long-lasting morphofunctional remodelling of liver parenchyma and stroma after a single exposure to low and moderate doses of cadmium in rats. *International Journal of Experimental Pathology*, 94(5), 343–351.
- de la Garza, A. L., I Milagro, F., Boque, N., Campión, J., & Martínez, J. A. (2011). Natural Inhibitors of Pancreatic Lipase as New Players in Obesity Treatment. *Planta Med*, 773–785.
- Dragano, N. R. V., Marques, A. Y. C., Cintra, D. E. C., Solon, C., Morari, J., Leite-Legatti, A. V., Velloso, L. A., Maróstica-Júnior, M. R. (2013). Freeze-dried jaboticaba peel powder improves insulin sensitivity in high-fat-fed mice. *The British Journal of Nutrition*, 110(3), 447–55.
- Dufour, D. R., Lott, J. A., Nolte, F. S., Gretch, D. R., Koff, R. S., & Seeff, L. B. (2000). Diagnosis and monitoring of hepatic injury. I. Performance characteristics of laboratory tests. *Clinical Chemistry*, 46(12), 2027–2049.
- El-Agamy, D. (2017). Nilotinib attenuates endothelial dysfunction and liver damage in high-cholesterol-fed rabbits. *Human & Experimental Toxicology*, 1-15.
- Freitas, R. B., Novaes, R. D., Gonçalves, R. V., Mendonça, B. G., Santos, E. C., Ribeiro, A. Q., Lima, L. M., Fietto, L. G., Peluzio, M. C. G., Leite, V. (2016). Euterpe edulis extract but not oil enhances antioxidant defenses and protects against nonalcoholic fatty liver disease induced by a high-fat diet in rats. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016.
- Guerra, J., Silva, P., Cristina, I., Emerich, M., Abreu, D., Pereira, R. R., Silva, M., Cardoso, L. M., Pinheiro-Sant'Ana, H. M., Lima, W. G., Lúcia, M. (2015). Dietary açai attenuates hepatic steatosis via adiponectin-mediated effects on lipid metabolism in high-fat diet mice, *Journal of Functional Foods*, 14, 192–202.
- Habig, W. H., Pabst, M. J., & Jakoby, W. B. (1974). Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *The Journal of Biological Chemistry*, 249(22), 7130–9.
- Hur, S. J., Nam, K. C., Min, B., Du, M., Seo, K. Il, & Ahn, D. U. (2014). Effects of dietary cholesterol and its oxidation products on pathological lesions and cholesterol and lipid oxidation in the rabbit liver. *BioMed Research International*, 2014, 5986-12.

- Ishak, N. A., Ismail, M., Hamid, M., Ahmad, Z., & Abd Ghafar, S. A. (2013). Antidiabetic and hypolipidemic activities of *Curculigo latifolia* fruit: Root extract in high fat fed diet and low dose STZ induced diabetic rats. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013, 1-12.
- Jia, M., Ren, D., Nie, Y., & Yang, X. (2017). Beneficial effects of apple peel polyphenols on vascular endothelial dysfunction and liver injury in high choline-fed mice. *Food & Function*, 8(3), 1282-1292.
- Jiang, Y., Dai, M., Nie, W.J., Yang, X.-R., & Zeng, X.C. (2017). Effects of the ethanol extract of black mulberry (*Morus nigra* L.) fruit on experimental atherosclerosis in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 200, 228–235.
- Jurcevic, I. L., Dora, M., Guberovic, I., Petras, M., Brncic, S. R., & Dikic, D. (2017). Polyphenols from wine lees as a novel functional bioactive compound in the protection against oxidative stress and hyperlipidaemia. *Food Technology and Biotechnology*, 55(1), 109–116.
- Kainuma, M., Fujimoto, M., Sekiya, N., Tsuneyama, K., Cheng, C., Takano, Y., Terasawa, K., Shimada, Y. (2006). Cholesterol-fed rabbit as a unique model of nonalcoholic, nonobese, non-insulin-resistant fatty liver disease with characteristic fibrosis. *Journal of Gastroenterology*, 41(10), 971–980.
- Kim, G. N., Shin, M. R., Shin, S. H., Lee, A. R., Lee, J. Y., Seo, B. II, Kim, M. Y., Kim, T. H., Noh, J. S., Rhee, M. H., Roh, S. S. (2016). Study of antiobesity effect through inhibition of pancreatic lipase activity of diospyros kaki fruit and citrus unshiu peel. *BioMed Research International*, 2016.
- Kleiner, D. E., Brunt, E. M., Van Natta, M., Behling, C., Contos, M. J., Cummings, O. W., Ferrell, L. D., Liu, Y. C., Torbenson, M. S., Unalp-Arida, A., Yeh, M., McCullough, A. J., Sanyal, A. J. (2005). Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*, 41(6), 1313–1321.
- Kobori, M., Masumoto, S., Akimoto, Y., & Oike, H. (2011). Chronic dietary intake of quercetin alleviates hepatic fat accumulation associated with consumption of a Western-style diet in C57/BL6J mice. *Molecular Nutrition and Food Research*, 55(4), 530–540.
- Kunutsor, S. K., Apekey, T. A., & Seddoh, D. (2015). Gamma glutamyltransferase and metabolic syndrome risk: a systematic review and dose-response meta-analysis. *International Journal of Clinical Practice*, 69(1), 136–144.
- Leite, A. V., Malta, L. G., Riccio, M. F., Eberlin, M. N., Pastore, G. M., & Maróstica Júnior, M. R. (2011). Antioxidant potential of rat plasma by administration of freeze-dried jaboticaba peel (*Myrciaria jaboticaba* Vell Berg). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(6), 2277–2283.
- Lenquiste, S. A., Batista, A. G., Marineli, R. D. S., Dragano, N. R. V., & Maróstica, M. R. (2012). Freeze-dried jaboticaba peel added to high-fat diet increases HDL-cholesterol and improves insulin resistance in obese rats. *Food Research International*, 49(1), 153–160.
- Lenquiste, S. A., Marineli, R. S., Moraes, É. A., Dionísio, A. P., Brito, E. S. de, & Maróstica, M. R. (2015). Jaboticaba peel and jaboticaba peel aqueous extract

shows in vitro and in vivo antioxidant properties in obesity model. *Food Research International*, 77, 162–170.

- Leung, C., Herath, C. B., Jia, Z., Andrikopoulos, S., Brown, B. E., Davies, M. J., ... Angus, P. W. (2016). Dietary advanced glycation end-products aggravate non-alcoholic fatty liver disease. *World Journal of Gastroenterology*, 22(35), 8026–8040. <https://doi.org/10.3748/wjg.v22.i35.8026>
- Li, G., Wu, X., Lu, W., Ai, R., Chen, F., & Tang, Z. (2014). Effect of atorvastatin on the expression of gamma-glutamyl transferase in aortic atherosclerotic plaques of apolipoprotein E-knockout mice. *BMC Cardiovascular Disorders*, 14(1), 145.
- Liu, S., Li, D., Huang, B., Chen, Y., Lu, X., & Wang, Y. (2013). Inhibition of pancreatic lipase, α -glucosidase, α -amylase, and hypolipidemic effects of the total flavonoids from *Nelumbo nucifera* leaves. *Journal of Ethnopharmacology*, 149(1), 263–269.
- Lobo de Andrade, D. M., Reis, C. de F., Castro, P. F. S., Borges, L. L., Amaral, N. O., Torres, I. M. S., Rezende, S. G., Gil, E. S., Cardoso, C. E., Pedrino, G. R., Lavorenti, R. M. (2015). Vasorelaxant and Hypotensive Effects of Jaboticaba Fruit (*Myrciaria cauliflora*) Extract in Rats. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 1–8.
- Madesh, M., & Balasubramanian, K. A. (1998). Microtiter plate assay for superoxide dismutase using MTT reduction by superoxide. *Indian Journal of Biochemistry & Biophysics*, 35(3), 184–8.
- Marcos, R., Monteiro, R. A. F., & Rocha, E. (2012). The use of design-based stereology to evaluate volumes and numbers in the liver: A review with practical guidelines. *Journal of Anatomy*, 220(4), 303–317.
- Matsuda, A., Makino, N., Tozawa, T., Shirahata, N., Honda, T., Ikeda, Y., Sato, H., Ito, M., Kakizaki, Y., Akamatsu, M., Ueno, Y., Kawata, S. (2014). Pancreatic fat accumulation, fibrosis, and acinar cell injury in the zucker diabetic fatty rat fed a chronic high-fat diet. *Pancreas*, 43(5), 735–743.
- Medina, M., Alberto, M. R., Sierra, L., Van Nieuwenhove, C., Saad, S., Isla, M. I., & Jerez, S. (2014). Hypercholesterolemia increases plasma saturated and n-6 fatty acids altering prostaglandin homeostasis and promotes endothelial dysfunction in rabbits. *Lipids*, 49(7), 685–693.
- Misra, V. L., Khashab, M., & Chalasani, N. (2009). Nonalcoholic fatty liver disease and cardiovascular risk. *Current Gastroenterology Reports*, 11(1), 50–55.
- Natal, D. I. G., Rodrigues, K. C. da C., Moreira, M. E. de C., de Queiróz, J. H., Benjamin, L. dos A., dos Santos, M. H., Sant'Ana, H. M. P., Martino, H. S. D. (2017). Bioactive compounds of the Ubá mango juices decrease inflammation and hepatic steatosis in obese Wistar rats. *Journal of Functional Foods*, 32, 409–418.
- Ndrepepa, G., Colleran, R., Lutert, A., Braun, S., Kufner, S., Hieber, J., & Fusaro, M. (2016). Prognostic value of gamma-glutamyl transferase in patients with diabetes mellitus and coronary artery disease. *Clinical Biochemistry*, 49(15), 1127–1132.

- Ndrepepa, G., Xhepa, E., Colleran, R., Braun, S., Cassese, S., Fusaro, M., Laugwitz, K. L., Kastrati, A. (2017). Gamma-glutamyl transferase and atrial fibrillation in patients with coronary artery disease. *Clinica Chimica Acta*, 465, 17–21.
- Novaes, R. D., Gonçalves, R. V., Marques, D. C. S., Cupertino, M. do C., Peluzio, M. do C. G., Leite, J. P. V., & Maldonado, I. R. dos S. C. (2012). Effect of bark extract of *Bathysa cuspidata* on hepatic oxidative damage and blood glucose kinetics in rats exposed to paraquat. *Toxicologic Pathology*, 40(1), 62–70.
- Papadomichelakis, G., Zoidis, E., & Fegeros, K. (2012). Dietarily induced changes in liver composition and weight of fattening rabbits. *Livestock Science*, 144(1–2), 190–196.
- Peña-Orihuela, P., Camargo, A., Rangel-Zuñiga, O. A., Perez-Martinez, P., Cruz-Teno, C., Delgado-Lista, J., Yubero-Serrano, E. M., Paniagua, J. A., Tinahones, F. J., Malagon, M. M., Roche, H. M., Perez-Jimenez, F., Lopez-Miranda, J. (2013). Antioxidant system response is modified by dietary fat in adipose tissue of metabolic syndrome patients. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 24(10), 1717–1723.
- Platt, F. M., Wassif, C., Colaco, A., Dardis, A., Lloyd-Evans, E., Bembi, B., & Porter, F. D. (2014). Disorders of cholesterol metabolism and their unanticipated convergent mechanisms of disease. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 15, 173–94.
- Plaza, M., Batista, Â. G., Cazarin, C. B. B., Sandahl, M., Turner, C., Ostman, E., & Maróstica Júnior, M. R. (2016). Characterization of antioxidant polyphenols from *Myrciaria jaboticaba* peel and their effects on glucose metabolism and antioxidant status: a pilot clinical study. *Food Chemistry*, 211, 185–197.
- Prasad, K. (2010). Effects of vitamin E on serum enzymes and electrolytes in hypercholesterolemia. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 335(1–2), 67–74.
- Prasad, K., McNair, E. D., Caspar-Bell, G., & Mabood Qureshi, A. (2014). Vitamin E does not regress hypercholesterolemia-induced oxidative stress in heart. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 391(1–2), 211–216.
- Rafiei, H., Omidian, K., & Bandy, B. (2017). Comparison of dietary polyphenols for protection against molecular mechanisms underlying nonalcoholic fatty liver disease in a cell model of steatosis. *Molecular Nutrition & Food Research*, 61(9).
- Reynés, B., García-Ruiz, E., Díaz-Rúa, R., Palou, A., & Oliver, P. (2014). Reversion to a control balanced diet is able to restore body weight and to recover altered metabolic parameters in adult rats long-term fed on a cafeteria diet. *Food Research International*, 64, 839–848.
- Rolo, A. P., Teodoro, J. S., & Palmeira, C. M. (2012). Role of oxidative stress in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. *Free Radical Biology and Medicine*, 52(1), 59–69.
- Sadeghi, A., Bahramsoltani, R., Rahimi, R., Farzaei, M. H., Farzaei, F., Haghghi, Z. M. S., & Abdollahi, M. (2017). Biochemical and histopathological evidence on beneficial effects of standardized extract from *tragopogon graminifolius* as

- a dietary supplement in fatty liver: role of oxidative stress. *Journal of Dietary Supplements*, 211, 1–10.
- Sampey, B. P., Vanhoose, A. M., Winfield, H. M., Freerman, A. J., Muehlbauer, M. J., Fueger, P. T., Newgard, C. B., Makowski, L. (2011). Cafeteria diet is a robust model of human metabolic syndrome with liver and adipose inflammation: comparison to high-fat diet. *Obesity*, 19(6), 1109–1117.
- Santos, I. B., de Bem, G. F., Cordeiro, V. S. C., da Costa, C. A., de Carvalho, L. C. R. M., da Rocha, A. P. M., Costa, G. F., Ognibene, D. T., Moura, R. S., Resende, A. C. (2017). Supplementation with *Vitis vinifera* L. skin extract improves insulin resistance and prevents hepatic lipid accumulation and steatosis in high-fat diet-fed mice. *Nutrition Research*, 43, 69–81.
- Silva, P. I., Stringueta, P. C., Teófilo, R. F., & Oliveira, I. R. N. de. (2013). Parameter optimization for spray-drying microencapsulation of jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba*) peel extracts using simultaneous analysis of responses. *Journal of Food Engineering*, 117(4), 538–544.
- Song, H., Lai, J., Tang, Q., & Zheng, X. (2016). Mulberry ethanol extract attenuates hepatic steatosis and insulin resistance in high-fat diet – fed mice. *Nutrition Research*, 36(7), 710–718.
- Song, H., Wu, T., Xu, D., Chu, Q., Lin, D., & Zheng, X. (2016). Dietary sweet cherry anthocyanins attenuates diet-induced hepatic steatosis by improving hepatic lipid metabolism in mice. *Nutrition*, 32(7–8), 827–833.
- Souza, M. O., Silva, M., Silva, M. E., Oliveira, R. P., Pedrosa, M. L. Diet supplementation with acai (*Euterpe oleracea* Mart.) pulp improves biomarkers of oxidative stress and the serum lipid profile in rats. *Nutrition*, 26, 804–810.
- Sozanski, T., Kucharska, A. Z., Szumny, A., Magdalan, J., Bielska, K., Merwid-Lad, A., Wozniak, A., Dzimira, S., Piorecki, N. Trocha, M. (2014). The protective effect of the *Cornus mas* fruits (cornelian cherry) on hypertriglyceridemia and atherosclerosis through PPAR α activation in hypercholesterolemic rabbits. *Phytomedicine*, 21(13), 1774–1784.
- Subramani, C., Rajakkannu, A., Rathinam, A., Gaidhani, S., Raju, I., & Kartar Singh, D. V. (2017). Anti-atherosclerotic activity of root bark of *Premna integrifolia* Linn. in high fat diet induced atherosclerosis model rats. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 7(2), 123–128.
- Takahashi, A., Shimizu, H., Okazaki, Y., Sakaguchi, H., Taira, T., Suzuki, T., & Chiji, H. (2015). Anthocyanin-rich phytochemicals from aronia fruits inhibit visceral fat accumulation and hyperglycemia in high-fat diet-induced dietary obese rats. *Journal of Oleo Science*, 1250(12), 1243–1250.
- Tang, X., Shen, T., Jiang, X., Xia, M., Sun, X., Guo, H., & Ling, W. (2014). Purified anthocyanins from bilberry and black currant attenuate hepatic mitochondrial dysfunction and steatohepatitis in mice with methionine and choline deficiency. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(2), 552–61.
- Tateya, S., Rizzo, N. O., Handa, P., Cheng, A. M., Morgan-stevenson, V., Daum, G., Clowes, A. W., Morton, G. J., Schwartz, M. W., Kim, F. (2011). Endothelial

- NO/cGMP/VASP signaling attenuates Kupffer cell activation and hepatic insulin resistance induced by high-fat feeding. *Diabetes*, 60(13), 2792–2801.
- Turlin, B., Ramm, G. A., Purdie, D. M., Lainé, F., Perrin, M., Deugnier, Y., & Macdonald, G. A. (2009). Assessment of hepatic steatosis: comparison of quantitative and semiquantitative methods in 108 liver biopsies. *Liver International*, 29(4), 530–535.
- Vergani, L., Vecchione, G., Baldini, F., Grasselli, E., Voci, A., Portincasa, P., Ferrari, P. F., Aliakbarian, B., Casazza, A. A., Perego, P. (2017). Polyphenolic extract attenuates fatty acid-induced steatosis and oxidative stress in hepatic and endothelial cells. *European Journal of Nutrition*, 1–13.
- Wallin, B., Rosengren, B., Shertzer, H. G., & Camejo, G. (1993). Lipoprotein oxidation and measurement of thiobarbituric acid reacting substances formation in a single microtiter plate: its use for evaluation of antioxidants. *Analytical Biochemistry*, 208(1), 10–15.
- Wang, H. J., Wang, Q., Lv, Z. M., Wang, C. L., Li, C. P., & Rong, Y. L. (2015). Resveratrol appears to protect against oxidative stress and steroidogenesis collapse in mice fed high-calorie and high-cholesterol diet. *Andrologia*, 47(1), 59–65.
- Wu, C. C., Hung, C. N., Shin, Y. C., Wang, C. J., & Huang, H. P. (2016). Myrciaria cauliflora extracts attenuate diabetic nephropathy involving the Ras signaling pathway in streptozotocin/nicotinamide mice on a high fat diet. *Journal of Food and Drug Analysis*, 24(1), 136–146.
- Wu, J., Zhang, H., Zheng, H., & Jiang, Y. (2014). Hepatic inflammation scores correlate with common carotid intima-media thickness in rats with NAFLD induced by a high-fat diet, *BMC Veterinary Research*, 10(1), 1–10.
- Wu, S. B., Long, C., & Kennelly, E. J. (2013). Phytochemistry and health benefits of jaboticaba, an emerging fruit crop from Brazil. *Food Research International*, 54(1), 148–159.
- Yang, K. C., Hung, H. F., Lu, C.W., Chang, H.H., Lee, L.T., & Huang, K.C. (2016). Association of non-alcoholic fatty liver disease with metabolic syndrome independently of central obesity and insulin resistance. *Nature*, 6(1), 1-10.
- Yanni, A. E., Efthymiou, V., Lelovas, P., Agrogiannis, G., Kostomitsopoulos, N., & Karathanos, V. T. (2015). Effects of dietary Corinthian currants (*Vitis vinifera* L., var. *Apyrena*) on atherosclerosis and plasma phenolic compounds during prolonged hypercholesterolemia in New Zealand White rabbits. *Food & Function*, 6(3), 963–971.
- Yao, S.L., Xu, Y., Zhang, Y.Y., & Lu, Y.H. (2013). Black rice and anthocyanins induce inhibition of cholesterol absorption in vitro. *Food & Function*, 4(11), 1602-08.
- Ying, H., Liu, Y., Yu, B., Wang, Z., Zang, J., & Yu, C. (2013). Dietary quercetin ameliorates nonalcoholic steatohepatitis induced by a high-fat diet in gerbils. *Food and Chemical Toxicology*, 52, 53–60.

- Younossi, Z. M., Koenig, A. B., Abdelatif, D., Fazel, Y., Henry, L., & Wymer, M. (2016). Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease: meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. *Hepatology*, 64(1), 73–84.
- Zhang, H., & Tsao, R. (2016). Dietary polyphenols, oxidative stress and antioxidant and anti-inflammatory effects. *Current Opinion in Food Science*, 8, 33–42.
- Zhang, W., Wang, X. P., Yu, Z. W., Wang, L. S., Zhu, Y., Yu, X. F., Wu, K., Zeng, Y., Xu, M. Y. (2010). Hyperlipidemic versus healthy pancreases: A proteomic analysis using an animal model. *IUBMB Life*, 62(10), 781–789.
- Zhou, C., Zhou, J., Han, N., Liu, Z., Xiao, B., & Yin, J. (2015). Beneficial effects of neomangiferin on high fat diet-induced nonalcoholic fatty liver disease in rats. *International Immunopharmacology*, 25(1), 218–228.

5 CONCLUSÕES GERAIS

O extrato fenólico da casca de jabuticaba (EFCJ) é uma boa fonte de antocianinas e compostos fenólicos totais, dentre os quais cianidina-3-glicosídeo é o presente em maior concentração. A capacidade antioxidante do EFCJ correlacionou-se positivamente com o conteúdo de fenólicos, indicando que os efeitos obtidos no ensaio *in vivo* podem ser atribuídos a esses compostos.

O consumo diário do EFCJ, por coelhos alimentados com dieta hipercolesterolemia, foi capaz de diminuir as concentrações plasmáticas de lipoproteínas de baixa densidade (LDL-c), triacilglicerol (TAG), gama glutamiltransferase (γ -GT) e lipase, e de elevar lipoproteínas de alta densidade (HDL-c), bem como reduzir os índices aterogênico e coronariano. Ademais, o extrato exerce propriedade antioxidante, prevenindo a peroxidação lipídica e restaurando as atividades de enzimas antioxidantes endógenas nos tecidos hepático e aórtico dos animais. Infere-se, portanto, que o EFCJ tem ação hipolipemiante e atenua o estresse oxidativo no fígado e aorta de coelhos, protegendo os órgãos dos danos provocados pela hipercolesterolemia.

Vale ressaltar que a suplementação com o EFCJ foi mais eficiente que sinvastatina em prevenir o aumento dos níveis plasmáticos de LDL-c e TAG e em atenuar o acúmulo de lipídios no fígado dos coelhos. Além disso, o consumo do EFCJ foi tão eficiente quanto esse medicamento para prevenir estresse oxidativo no fígado dos animais.

Por fim, comprovou-se, pela primeira vez, que compostos fenólicos da casca de jabuticaba atenuam o acúmulo de lipídios no fígado e aorta de coelhos em dieta com elevado teor de colesterol e, em conjunto com os demais resultados, previnem a progressão da aterosclerose e da doença alcoólica gordurosa não alcoólica.

ANEXO I

CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA/UFV certifica que o processo nº 34/2016, intitulado "Efeito da ingestão do extrato fenólico concentrado da casca de jaboticaba *Plinia cauliflora* no metabolismo lipídico e na inibição da progressão da aterosclerose em coelhos adultos hipercolesterolêmicos", coordenado pelo professor Paulo César Stringheta do Departamento de Tecnologia de Alimentos, está de acordo com a Legislação vigente (Lei Nº 11.794, de 08 de outubro de 2008), as Resoluções Normativas editadas pelo CONCEA/MCTI, a DBCA (Diretriz Brasileira de Prática para o Cuidado e a Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos) e as Diretrizes da Prática de Eutanásia preconizadas pelo CONCEA/MCTI, portanto sendo aprovado por esta Comissão em 14/07/2016, com validade de 12 meses.

CERTIFICATE

The Ethic Committee in Animal Use/UFV certify that the process number 34/2016, named "phenolic concentrated extract ingestion Effect of peel blemish *Plinia cauliflora* in lipid metabolism and inhibition of progression of atherosclerosis in hypercholesterolemic rabbits adults", is in agreement with the a actual Brazilian legislation (Lei Nº 11.794, 2008), Normative Resolutions edited by CONCEA/MCTI, the DBCA (Brazilian Practice Guideline for the Care and Use of Animals for Scientific Purposes and Teaching) and the Guidelines of Practice the Euthanasia recommended by CONCEA/MCTI therefore being approved by the Committee on July 14, 2016 valid for 12 months.


Prof. Atima Clemente Alves Zuanon

Presidente

Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UFV