

UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL
ÁREA DO CONHECIMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

EFEITOS DO EXTRATO AQUOSO DE CASCA DE JABUTICABA
(*Plinia trunciflora* (O. Berg) Kausel) EM MODELO DE DIABETES *IN*
VIVO

CAROLINE CALLONI

Caxias do Sul

2019

CAROLINE CALLONI

**EFEITOS DO EXTRATO AQUOSO DE CASCA DE JABUTICABA
(*Plinia trunciflora* (O. Berg) Kausel) EM MODELO DE DIABETES *IN*
*VIVO***

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul, visando à obtenção de grau de Doutor em Biotecnologia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a Mirian Salvador

Co orientador: Prof. Dr. Matheus Parmegiani Jahn

Caxias do Sul

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Universidade de Caxias do Sul
Sistema de Bibliotecas UCS - Processamento Técnico

C163e Calloni, Caroline

Efeitos do extrato aquoso de casca de jabuticaba (*Plinia trunciflora* (O. Berg) Kausel) em modelo de diabetes *in vivo* / Caroline Calloni. – 2019.

141 f. : il. ; 30 cm

Tese (Doutorado) - Universidade de Caxias do Sul, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2019.

Orientação: Mirian Salvador.

Coorientação: Matheus Parmegiani Jahn.

1. Fenóis. 2. Estresse oxidativo. 3. Jabuticaba - Planta. 4. Diabetes. I. Salvador, Mirian, orient. II. Jahn, Matheus Parmegiani, coorient. III. Título.

CDU 2. ed.: 547.562.1

Catalogação na fonte elaborada pela(o) bibliotecária(o)
Paula Fernanda Fedatto Leal - CRB 10/2291

CAROLINE CALLONI

**EFEITOS DO EXTRATO AQUOSO DE CASCA DE
JABUTICABA (*Plinia trunciflora* (O. Berg) Kausel) EM
MODELO DE DIABETES *IN VIVO***

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul, visando à obtenção do título de Doutora em Biotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra Mirian Salvador
Co-orientador: Prof. Dr. Matheus Parmegiani Jahn

TESE APROVADA EM 15 DE MARÇO DE 2019.

Orientadora: Prof^a. Dr^a Mirian Salvador

Co-orientador: Prof. Dr. Matheus Parmegiani Jahn

Prof. Dr. Diogo Losch Oliveira

Prof. Dr. Alex Sander da Rosa Araujo

Profa. Dra. Joséli Schwambach

Dedico este trabalho, com todo meu amor e carinho, ao
meu pai, Adenir Calloni, a minha mãe, Carmem
Bernardi Calloni, a minha irmã, Raquel Calloni e ao
meu namorado, Jucimar Zacaria.

“I don't know what I may seem to the world, but as to myself, I seem to have been only like a boy playing on the sea-shore and diverting myself in now and then finding a smoother pebble or a prettier shell than ordinary, whilst the great ocean of truth lay all undiscovered before me.”

Isaac Newton

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora, **Profª Drª Mirian Salvador**, por ter guiado meus passos, não só durante os 4 anos de doutorado, mas também durante os 11 anos nos quais estive realizando pesquisa científica no Laboratório de Estresse Oxidativo e Antioxidantes. Muito do que sou hoje como profissional, devo a ela. Minha gratidão por todos os ensinamentos, pela paciência e pelo incentivo.

Ao meu coorientador, **Prof. Dr. Matheus Parmegiani Jahn**, por ter confiado e acreditado em meu potencial para a realização deste trabalho e por todos os momentos de orientação muito produtivos.

Aos professores **Dr. Leandro Tasso** e **Drª Joseli Schwambach** pelo acompanhamento crítico e sugestões feitas a esse trabalho.

A professora **Marli Camassola**, pelo precioso auxílio na realização deste trabalho.

Ao professor **Dr. Sidnei Moura e Silva**, a **Drª Fabiana Agostini** e a aluna de doutorado **Pauline Fagundes Rosales** pela disponibilidade em auxiliar na realização deste trabalho.

A técnica do Laboratório de Fisiologia da UCS, **Simone Maria Andriolo Gross** pelo auxílio, apoio, paciência e ensinamentos durante a realização dos tratamentos com os animais.

A todos os bolsistas de iniciação científica do Laboratório de Fisiologia da UCS, em especial a **Geórgia Chedid Costi** e ao **Keoma Silva** pela disponibilidade em auxiliar na realização deste trabalho.

A todos os **professores e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia**, por contribuírem grandemente com o meu crescimento e com minha formação acadêmica.

Às agências de fomento **CAPES, FAPERGS e CNPq** e à **Universidade de Caxias do Sul** pelo apoio e suporte financeiro que possibilitaram a realização deste trabalho.

Aos bolsistas de iniciação científica do Laboratório de Estresse Oxidativo e Antioxidantes, **Luana Soares Martínez, Daniela Gil e Douglas Machado** por terem sido minhas mãos direita e esquerda durante esses 4 anos. Minha gratidão a eles por não terem medido esforços para que esse trabalho fosse realizado, disponibilizando seu precioso tempo, mesmo em finais de semana e feriados. Minha gratidão por compartilharem seu entusiasmo, por fazerem parte da minha formação, por me proporcionarem muitos momentos de orgulho e também pelo companheirismo e amizade.

A todo o grupo de bolsistas, mestrandos, doutorandos e funcionários do **Laboratório de Estresse Oxidativo e Antioxidantes** pelo auxílio e colaboração, pelas trocas de experiências, pelos momentos de descontração e de boa convivência.

Aos meus pais, **Carmem B. Calloni e Adenir A. Calloni**, e minha irmã, **Raquel Calloni**, pelo amor e apoio incondicionais, pelos conselhos, pela paciência e por compreenderem meus muitos momentos de ausência em virtude da minha dedicação ao doutorado.

Ao **Jucimar Zacaria**, meu grande companheiro, pela paciência, pelo apoio, por ser meu conselheiro, por me escutar, por todo o amor e por também compreender meus momentos de ausência.

MUITO OBRIGADA!

SUMÁRIO

LISTA DE QUADROS E TABELAS	XI
LISTA DE FIGURAS.....	XII
LISTA DE ABREVIATURAS	XIII
RESUMO	XIV
ABSTRACT	XVI
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	4
2.1. ESTRESSE OXIDATIVO	4
2.2. DIABETES MELLITUS E ESTRESSE OXIDATIVO	9
2.3. SIRTUÍNAS E DIABETES MELLITUS	13
2.4. ANTIOXIDANTES	16
2.4.1. COMPOSTOS FENÓLICOS.....	17
2.4.2. COMPOSTOS FENÓLICOS E DIABETES.....	25
2.5. PLINIA SP.	28
2.5.1. DESCRIÇÃO BOTÂNICA	28
2.5.2. COMPOSIÇÃO NUTRICIONAL, FITOQUÍMICA E ATIVIDADE BIOLÓGICA	31
3. OBJETIVO GERAL	41
3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	41
4. RESULTADOS	43
4.1. Artigo 1: Jabuticaba (<i>Plinia trunciflora</i> (O. Berg) Kausel) improves the lipid profile and immune system and reduces oxidative stress of streptozotocin-induced diabetic rats	44
4.2. Artigo 2 Jabuticaba (<i>Plinia trunciflora</i> (O. Berg) Kausel) protects liver of diabetic rats against mitochondrial dysfunction and oxidative stress through modulation of SIRT3 expression	73
5. DISCUSSÃO GERAL	97

6. CONCLUSÕES	112
7. PERSPECTIVAS.....	114
8. REFERÊNCIAS.....	115
9. ANEXOS.....	140
9.1. Anexo I.....	140
9.2. Anexo II	141

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Tabela 1. Principais classes de flavonoides, suas estruturas básicas e principais representantes de cada classe.....	20
Tabela 2. Composição centesimal da polpa e casca de jabuticaba crua.....	31
Quadro 1. Principais atividades biológicas relatadas na literatura para as diferentes espécies de jabuticaba.....	38

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Cadeia de transporte de elétrons (CTE) mitocondrial, geração de ERO e defesas antioxidantes	5
Figura 2. Principais fontes endógenas e exógenas na geração de radicais livres e espécies reativas de oxigênio e antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos.....	7
Figura 3. Principais classes de compostos fenólicos e exemplos de estruturas que compõem essas classes.....	18
Figura 4. Estrutura básica de um flavonoide.....	19
Figura 5. Estruturas químicas das principais agliconas (antocianidinas) de antocianinas.....	22
Figura 6. Estruturas químicas dos flavonóis e alguns representantes mais comuns.....	24
Figura 7. Características estruturais que definem a ação antioxidante de flavonoides.....	24
Figura 8. Imagem de uma jabuticabeira (<i>Plinia</i> sp.).....	29
Figura 9. Folhas (A), flores (B) e frutos (jabuticabas) (C) de <i>Plinia</i> sp.....	30

LISTA DE ABREVIATURAS

ABTS ⁺⁺	2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)
ALT	Alanina Aminotransferase
AST	Aspartato Aminotransferase
ATP	Trifosfato de Adenosina
CAT	Catalase
CI	Complexo I
CII	Complexo II
CIII	Complexo III
CIV	Complexo IV
CT	Colesterol Total
CTE	Cadeia de Transporte de Elétrons
DM	Diabetes mellitus
DM1	Diabetes mellitus tipo I
DM2	Diabetes mellitus tipo II
DPPH [•]	2,2-difenil-1-picrilhidrazil
ERO	Espécies Reativas do Oxigênio
FADH ₂	Dinucleótido de flavina e adenina
GPx	Glutathione peroxidase
GSH	Glutathione reduzida
GSR	Glutathione reductase
GSSG	Glutathione oxidada
HDLc	Colesterol HDL
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
JPE	Extrato de Casca de Jabuticaba (<i>Jabuticaba Peel Extratct</i>)
NADH	Dinucleótido de nicotinamida e adenina
RL	Radicais Livres
SIRT	Sirtuína
SOD	Superóxido Dismutase
STZ	Estreptozotocina
TG	Triglicerídeos
VLDL	Lipoproteína de muito baixa densidade

RESUMO

O diabetes é uma doença multifatorial caracterizada pela presença de hiperglicemia em consequência da deficiência de insulina ou da resistência de tecidos periféricos a esse hormônio. A hiperglicemia crônica presente no diabetes tem sido relacionada ao desenvolvimento de estresse oxidativo, o qual, por sua vez, tem papel importante no início e progressão das complicações da doença. Por isso, tem-se investigado os efeitos de compostos fenólicos na prevenção das complicações relacionadas ao diabetes. Neste contexto, a jabuticaba (*Plinia trunciflora*) ganha cada vez mais destaque, já que é uma fruta nativa do Brasil, rica em compostos fenólicos, que se concentram principalmente na casca. Assim, este estudo teve como objetivo avaliar a composição química do extrato aquoso de casca de *P. trunciflora* e o seu efeito sobre marcadores metabólicos e hematológicos, função mitocondrial e estresse oxidativo de ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina. A composição química foi determinada através de análise de cromatografia líquida de alta eficiência. Já para a avaliação dos efeitos biológicos, 24 ratos Wistar machos foram divididos em 4 grupos, sendo um grupo controle de ratos saudáveis, um grupo de ratos saudáveis que receberam extrato (0,5 g/kg) por gavagem, um grupo controle de diabéticos e um grupo de diabéticos que recebeu extrato (0,5 g/kg) por gavagem. Após 30 dias de tratamento, os ratos foram eutanasiados e o sangue e o fígado foram coletados para as avaliações. Os ensaios de cromatografia mostraram a presença de compostos como ácido gálico e ferrúlico, catequina, epicatequina, epigallocatequina, epigallocatequina galato, rutina, quercetina, miricitina e naringina no extrato. Foi possível observar uma redução significativa dos níveis séricos de triglicerídeos, colesterol total e não-HDL nos ratos diabéticos tratados com o extrato, além de um aumento no colesterol HDL, tanto no grupo de ratos saudáveis quanto no grupo de diabéticos que receberam extrato. Após o tratamento, houve também a restaura-

ção da contagem de linfócitos e leucócitos totais nos ratos diabéticos. Além disso, o tratamento com o extrato melhorou a capacidade antioxidante total do soro, tanto nos ratos saudáveis quanto nos ratos diabéticos, e foi capaz de reduzir os danos oxidativos a lipídeos e proteínas e modular as enzimas antioxidantes, tanto no soro quanto no fígado do grupo de ratos diabéticos. Observou-se ainda que o extrato foi capaz de modular a atividade dos complexos I, II e III da cadeia de transporte de elétrons mitocondrial e a expressão da proteína sirtuína 3. Juntos, estes resultados demonstram o potencial do extrato de *P. trunciflora* na modulação das alterações metabólicas, hematológicas e de estresse oxidativo induzidas pelo diabetes, tornando-o, desta forma, uma alternativa com potencial para a prevenção das complicações relacionadas a essa doença.

Palavras-chave: Compostos fenólicos, Estresse Oxidativo, Mitocôndria, Lipídeos, SIRT3

ABSTRACT

Diabetes is a multifactorial disease characterized by the presence of hyperglycaemia as a consequence of insulin deficiency or the resistance of peripheral tissues to this hormone. The chronic hyperglycemia present in diabetes has been related to the development of oxidative stress, which, in turn, plays an important role in the onset and progression of the complications of the disease. Therefore, the effects of phenolic compounds have been investigated in the prevention of complications related to diabetes. In this context, jabuticaba (*Plinia trunciflora*) gains more prominence, since it is a fruit native to Brazil, rich in phenolic compounds, which concentrate mainly on the peel. Therefore, the aim of this study was to evaluate the chemical composition of the aqueous extract of *P. trunciflora* peel and its effect on metabolic and hematological markers, mitochondrial function and oxidative stress of diabetic rats induced by streptozotocin. The chemical composition was determined by high performance liquid chromatography analysis. Twenty-four male Wistar rats were divided into four groups: a control group of healthy rats, a group of healthy rats receiving extract (0.5 g/kg) by gavage, a control group of diabetics and a group of diabetics who received extract (0.5 g/kg) by gavage. After 30 days of treatment, rats were euthanized and blood and liver were collected for evaluation. The chromatographic assays showed the presence of compounds such as gallic and ferrulic acid, catechin, epicatechin, epigallocatechin, epigallocatechin gallate, rutin, quercetin, myricetin and naringin in the extract. It was possible to observe a significant reduction in serum triglycerides, total and non-HDL cholesterol in the diabetic rats treated with the extract, as well as an increase in HDL cholesterol, both in the group of healthy rats and in the group of diabetics who received extract. After treatment, lymphocytes and total leukocytes were also restored in diabetic rats. In addition, treatment with the extract improved the total antioxidant capacity of serum in both healthy and diabetic rats. Extract

was also able to reduce oxidative damage to lipids and proteins and modulate antioxidant enzymes in both serum and liver of diabetic group. It was also observed that the extract was able to modulate the activity of the complexes I, II and III of the mitochondrial electron transport chain and the expression of the sirtuin 3 protein. Together, these results demonstrate the potential of the *P. trunciflora* extract in the modulation of the metabolic, hematological and oxidative stress changes induced by diabetes, thus making it an alternative with potential for the prevention of complications related to this disease.

Key words: Phenolic Compounds, Oxidative Stress, Lipids, Mitochondria, SIRT3

1. INTRODUÇÃO

O Diabetes Mellitus (DM) é uma desordem metabólica complexa que se caracteriza por uma incapacidade do organismo em controlar os níveis de glicose sanguínea. O DM pode ser dividido em dois principais tipos, de acordo com a etiologia. O DM tipo 1 (DM1) é caracterizado pela ausência de produção de insulina e ocorre principalmente em consequência da destruição autoimune das células β -pancreáticas. Por outro lado, o DM tipo 2 (DM2) ocorre em decorrência da resistência dos tecidos periféricos à ação da insulina e compreendem a maior parte dos casos da doença.

O número de pacientes diagnosticados com DM aumentou expressivamente nas últimas décadas, o que a torna uma doença epidêmica e, consequentemente, um grande problema de saúde pública. Segundo a Federação Internacional do Diabetes, em 2015 existia uma estimativa de que a cada 11 adultos, 1 apresentava DM, o que representa cerca de 415 milhões de pessoas. As projeções indicam que esses números continuarão aumentando, sendo que se espera que cerca de 642 milhões de pessoas sejam diagnosticadas com DM até 2040. No Brasil, existiam, em 2015, cerca de 12 milhões (6,1 %) de pessoas diagnosticadas com DM, sendo que neste mesmo ano ocorreram 62.466 mortes atribuídas a doença. Além disso, no mundo, estima-se que existam cerca de 174,8 milhões de casos não diagnosticados da doença.

Independentemente do tipo de DM, a hiperglicemia é uma das principais alterações iniciais da doença, sendo que o aumento da glicemia frequentemente ocorre anos antes do diagnóstico. Além disso, estudos demonstram que a hiperglicemia induz o aumento de estresse oxidativo, o qual, por sua vez, é um dos principais responsáveis pelo desenvolvimento das complicações relacionadas ao DM. Essas complicações incluem nefropatia, neuropatia, retinopatia e as doenças cardiovasculares e cerebrovasculares. As alterações no perfil lipídico, comuns de ocorrerem em pacientes diabéticos, podem contri-

buir para o risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares, as quais são uma das principais causas de morte nestes pacientes. Além disso, outra complicação comum em pacientes com DM é a maior ocorrência de alguns tipos de infecções, como, por exemplo, cistite, pneumonia, tuberculose, infecções de pele e mucosas.

O tratamento do diabetes visa retardar o aparecimento de complicações da doença e impedir sua progressão, principalmente mediante o controle glicêmico. Entretanto, sabe-se que entre 40 e 60 % dos pacientes com DM apresentam controle glicêmico deficiente, o que aumenta consideravelmente o estresse oxidativo e os riscos de desenvolvimento de complicações. Neste contexto, a busca por tratamentos alternativos, que auxiliem na diminuição dos danos oxidativos relacionados ao DM, tem aumentado substancialmente. Os compostos fenólicos, produtos naturais largamente distribuídos em frutas e vegetais e que estão presentes na dieta humana, são amplamente estudados devido à sua capacidade de prevenir os danos oxidativos.

A jabuticaba é uma fruta nativa do Brasil, rica em compostos fenólicos. Três espécies têm distribuição natural e são cultivadas no país, sendo elas a *Plinia trunciflora* (O. Berg) Kausel, a *Plinia cauliflora* (Mart.) Kausel e a *Plinia jaboticaba* (Vell.) Kausel. Nos últimos anos, a jabuticaba despertou interesse científico em relação aos possíveis efeitos benéficos a saúde. De fato, estudos já demonstraram que as espécies *P. cauliflora* e *P. jaboticaba* apresentam importantes atividades biológicas, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, como atividade antioxidante, anti-inflamatória, antiproliferativa, antifúngica, dentre outras, as quais são atribuídas principalmente aos flavonóis e antocianinas que estão concentrados em sua grande maioria na casca da fruta. Entretanto, existem poucos estudos sobre caracterização química e efeitos biológicos da espécie *P. trunciflora*. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a composição química e os efeitos do extrato aquoso de casca de jabuticaba (*Plinia trunciflora* (O. Berg) Kausel) sobre marcadores metabólicos,

hematológicos, função mitocondrial e estresse oxidativo em modelo *in vivo* de diabetes induzido por estreptozotocina.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. ESTRESSE OXIDATIVO

Em organismos aeróbicos cerca de 85 a 90% do oxigênio celular é consumido pelas mitocôndrias para a produção de energia na forma de trifosfato de adenosina (ATP). Em consequência do metabolismo aeróbico, são formados, como subprodutos, os radicais livres (RL) (Pamplona & Constantini, 2011; Sisein, 2014). Os RL são átomos, moléculas ou íons que apresentam pelo menos um elétron não emparelhado na camada de valência o que os torna instáveis e, desta forma, apresentam capacidade de reagir oxidando outros átomos ou moléculas (Ferrari *et al.*, 2011; Halliwell & Gutteridge, 2015). Frequentemente os RL derivados do O_2 são incluídos na denominação de espécies reativas de oxigênio (ERO), as quais incluem, além dos RL, outras moléculas não apresentam elétrons desemparelhados, mas que são da mesma forma reativas e capazes de gerar outras ERO (Carocho & Ferreira, 2013; Panth *et al.*, 2016).

Dentre as ERO estão incluídos RL como os radicais ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), hidroxil ($HO^{\cdot}$), alcóxil ($RO^{\cdot}$) e peróxil ($RO_2^{\cdot}$), assim como as espécies não radicalares, por exemplo, o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o oxigênio singlet (1O_2), o ácido hipocloroso (HOCl) e o ozônio (O_3) (Lü *et al.*, 2010; Halliwell & Gutteridge, 2015).

O principal mecanismo de formação de RL é através da redução do O_2 , que inicia uma cascata de formação de outros RL e ERO. A adição de um elétron a molécula de O_2 leva a geração de $O_2^{\cdot-}$, o qual pode ser rapidamente degradado pela enzima antioxidante superóxido dismutase (SOD), gerando H_2O_2 e O_2 . O H_2O_2 gerado a partir da reação catalisada pela SOD, por sua vez, pode ser decomposto a H_2O e O_2 pelas enzimas catalase (CAT) ou glutathione peroxidase (GPx). Por outro lado, o H_2O_2 pode ser convertido no radical $HO^{\cdot}$, na presença de metais de transição reduzidos, como o ferro (Fe^{+2}), através da reação de Fenton; assim como o $O_2^{\cdot-}$ pode reagir com o $NO^{\cdot}$ resultando na formação de de peroxinitrito ($ONOO^-$) (Figura 1) (Pisoschi & Pop, 2015).

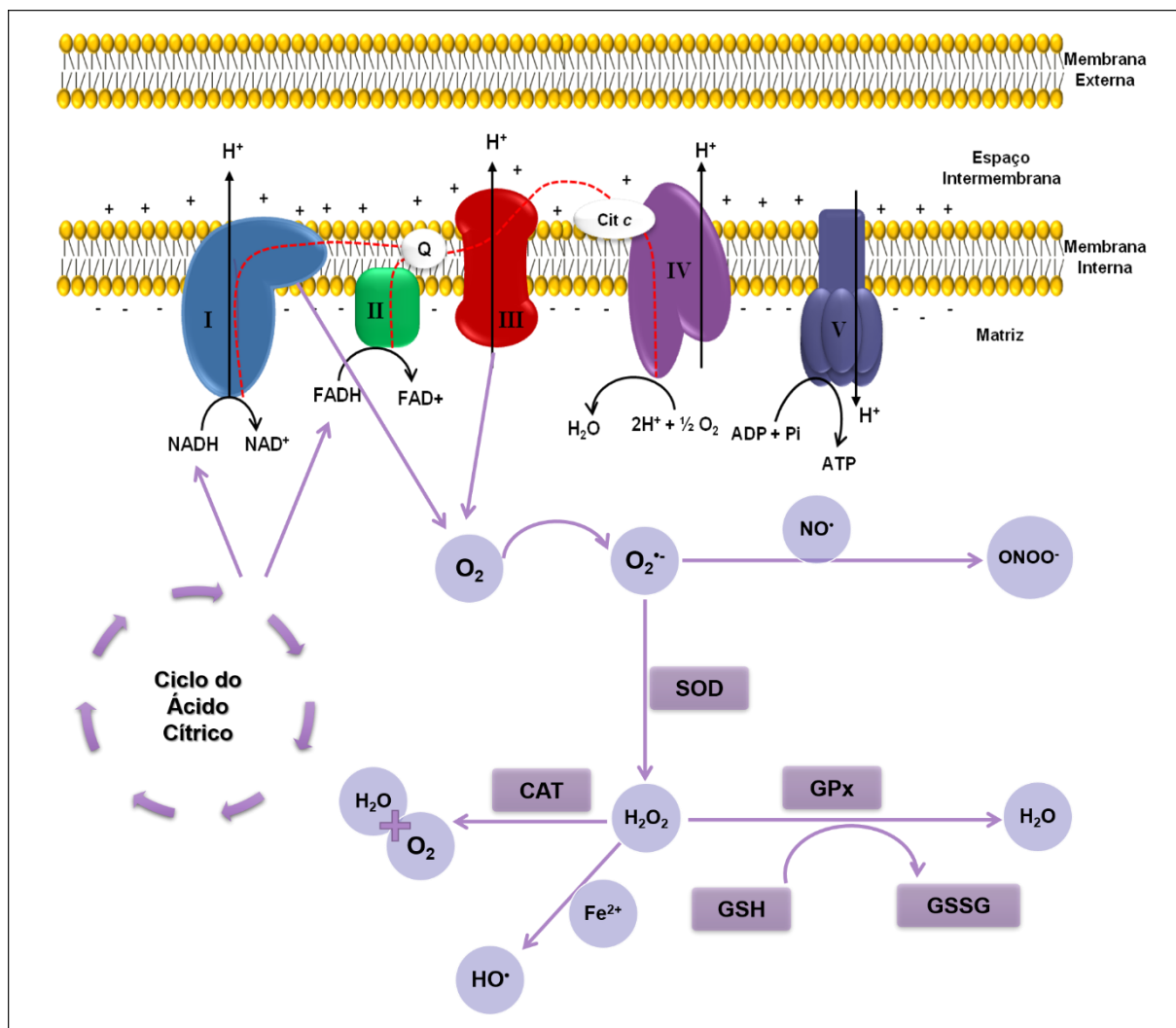


Figura 1. Cadeia de transporte de elétrons (CTE) mitocondrial, geração de ERO e defesas antioxidantes. A CTE é constituída por quatro complexos protéicos (I-IV) e pela ATP sintase (V) localizados na membrana interna da mitocôndria. O complexo I oxida o NADH a NAD^+ e o complexo II converte o FADH_2 a FAD^+ , ambos gerados no ciclo do ácido cítrico. Os prótons (H^+) atravessam a membrana mitocondrial interna através dos complexos I, III e IV (setas em preto), formando um gradiente eletroquímico. Os elétrons entregues nos complexos I e II são transferidos a coenzima Q (ubiquinona) e, subsequentemente, transferidos ao complexo III, citocromo c (Cit c) e, finalmente, ao complexo IV (o fluxo de elétrons através da cadeia está representado pela linha tracejada em vermelho). Do complexo IV, os elétrons são transferidos ao O_2 que, juntamente com H^+ forma H_2O . No complexo V, o gradiente de prótons formado impulsiona a geração de ATP. Elétrons do complexo I e III podem reagir com o O_2 formando $\text{O}_2^{\bullet-}$. A enzima antioxidante SOD, presente na matriz mitocondrial, degrada o $\text{O}_2^{\bullet-}$ a H_2O_2 que, por sua vez, pode difundir através das membranas mitocondriais e ser decomposto pela enzima CAT ou pela GPx a H_2O e O_2 . Alternativamente, o $\text{O}_2^{\bullet-}$ pode reagir com o $\text{ON}^{\bullet}$ formando o $\text{ONOO}^{\bullet}$ ou, através da reação de Fenton, reagir com metais de transição, como o Fe^{2+} formando $\text{HO}^{\bullet}$. Fonte: adaptado de Pamplona & Constanti, 2011.

A geração de ERO pode ocorrer tanto através do metabolismo endógeno quanto ser induzida por fatores exógenos. A maior fonte endógena de geração de ERO é a mitocôndria, onde o $O_2^{\cdot-}$ é formado a partir do escape de elétrons da cadeia de transporte de elétrons (CTE) (Figura 1) (Rigoulet *et al.*, 2011; Droese & Brandt, 2012). Estudos têm demonstrado que alterações da atividade dos complexos I (NADH:ubiquinona redutase) e III (Citocromo-c redutase) leva ao aumento na geração de $O_2^{\cdot-}$ (Carrasco-Pozo *et al.*, 2011; Carrasco-Pozo *et al.*, 2012; Sandoval-Acuña *et al.*, 2014). Outras fontes endógenas de geração de ERO são as enzimas microssomais, como citocromo P450, e o metabolismo de lipídeos nos peroxissomos, os quais geram principalmente H_2O_2 . Células fagocitárias do sistema imune, como neutrófilos e macrófagos, apresentam um mecanismo de defesa contra micro-organismos invasores que utiliza ERO formadas através da ativação da enzima NADPH oxidase presente na membrana dessas células. Outras enzimas capazes de gerar ERO incluem a citocromo-c oxidase e a xantina oxidase (Pisoschi & Pop, 2015).

Além da geração endógena contínua de ERO, alguns fatores externos que podem induzir a formação intracelular destas moléculas incluem a exposição a irradiação ionizante (ultravioleta, raios-X e gama), poluentes atmosféricos, como dióxido de nitrogênio (NO_2), fármacos e seus metabólitos, constituintes do tabaco, etanol e pesticidas (Phaniendra *et al.*, 2015).

Em condições fisiológicas normais, as células são capazes de manter a homeostase do seu estado redox através da geração e eliminação de ERO. Além disso, diversas evidências demonstram o papel das ERO na sinalização celular de vários processos fisiológicos normais, tais como regulação da proliferação e de sobrevivência celular (Ma, 2010; Shadel & Horvath, 2015).

Um aumento na formação de ERO ou uma alteração dos mecanismos celulares de eliminação dessas moléculas devido a estímulos exógenos ou alterações metabólicas endógenas pode levar a um distúrbio da homeostase redox da célula, conduzindo, desta

forma, a um estado de estresse oxidativo. Nesta situação, as ERO podem reagir com componentes celulares, como lipídeos, proteínas e nucleotídeos, oxidando-os e resultando em disfunção destas moléculas (Figura 2) (Pisoschi & Pop, 2015).

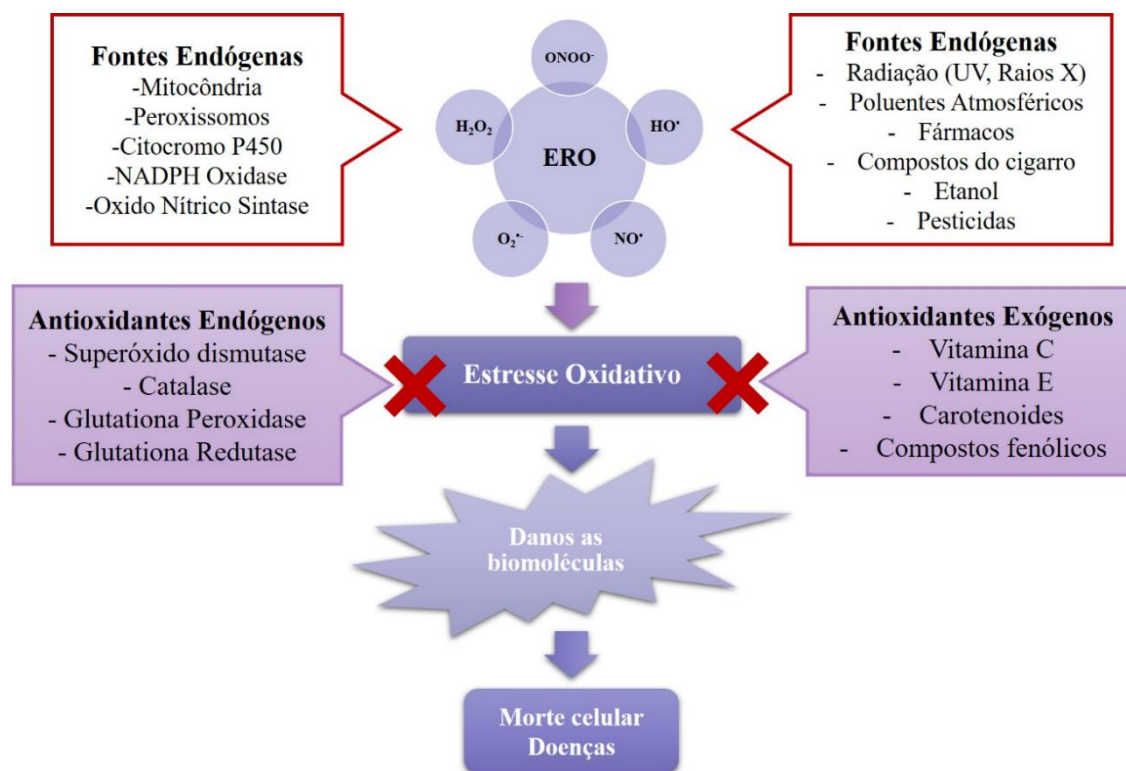


Figura 2. Principais fontes endógenas e exógenas na geração de radicais livres e espécies reativas de oxigênio e antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos. Fonte: adaptado de Morry *et al.*, 2017.

Os lipídios são as moléculas mais suscetíveis à modificação oxidativa, especialmente aqueles presentes nas membranas, como os ácidos graxos poli-insaturados dos fosfolipídios. A peroxidação lipídica é iniciada através da reação de um RL com a cadeia lateral de um ácido graxo, removendo um átomo de hidrogênio de um carbono metílico. Quanto mais ligações duplas estiverem presentes nas moléculas de ácidos graxos, mais fácil de remover átomos de hidrogênio e, consequentemente, formar um radical, o que faz com que os ácidos graxos monoinsaturados e saturados sejam mais resistentes a ação dos RL do que os ácidos graxos poli-insaturados. A peroxidação lipídica gera radicais que podem reagir com moléculas lipídicas subsequentes e propagar uma rea-

ção em cadeia que, como resultado final, produz aldeídos, incluindo o malondialdeído e o 4-hidroxi-2-nonenal, os quais também são tóxicos e causam danos ao DNA e às proteínas (Phaniendra *et al.*, 2015; Gaschler & Stockwell, 2017).

A oxidação de proteínas pode ocorrer de três diferentes formas, por exemplo, pela modificação oxidativa de um aminoácido específico, clivagem peptídica mediada por espécies reativas e formação de ligações cruzadas das proteínas com produtos da peroxidação lipídica. As ERO podem induzir danos oxidativos em resíduos de aminoácidos específicos, tais como lisina, prolina, treonina e arginina, originando derivados carbonilo. A presença de grupos carbonila em proteínas tem sido considerada como o marcador de oxidação de proteínas mediada por ERO. Os danos oxidativos a proteínas podem afetar a função de receptores, enzimas, anticorpos e proteínas de transporte (Fedorova *et al.*, 2013; Phaniendra *et al.*, 2015).

O dano induzido pelos RL ao DNA pode causar alterações como a produção de sítios de base livre, deleções, modificação de bases, *frameshift*, quebras de cadeias, *cross-links* e rearranjos cromossômicos. A oxidação do DNA pode produzir mutações e prejudicar vias de transcrição e tradução, comprometendo, assim, a síntese de proteínas (Carocho & Ferreira, 2013).

O estresse oxidativo e os danos as biomoléculas por ele causados vêm sendo largamente associados à fisiopatologia de diversas doenças, tais como câncer, doenças cardiovasculares, como aterosclerose e acidente vascular cerebral, hipertensão arterial, inflamação, obesidade, desordens neurológicas, doenças neurodegenerativas, como Alzheimer e Parkinson, além do DM (Phaniendra *et al.*, 2015).

2.2. DIABETES MELLITUS E ESTRESSE OXIDATIVO

As doenças crônicas não transmissíveis, dentre as quais pode-se citar o DM, são a principal causa de mortalidade e de incapacidade prematura na maioria dos países em desenvolvimento, incluindo o Brasil (Malta *et al.*, 2014, WHO, 2018).

O DM é uma doença metabólica crônica grave, de etiologia múltipla, caracterizada por um elevado nível de glicose no sangue (hiperglicemia), e que apresenta alterações no metabolismo de carboidratos, proteínas e lipídios. O DM pode ser resultante de defeitos na secreção de insulina, em consequência da destruição das células β pancreáticas, sendo classificado desta forma como DM do tipo 1 (DM1). Já no DM do tipo 2 (DM2) ocorre alteração na ação da insulina, como resultado da perda da sensibilidade de tecidos alvos ao hormônio (Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes, 2018).

O DM1 é um distúrbio autoimune crônico que tipicamente se manifesta na infância e adolescência e, embora seja menos comum, ele ainda representa cerca de 5 % a 10 % de todos os casos diagnosticados de DM. Já o DM2 é o mais comum, sendo responsável por cerca de 90 a 95 % de todos os casos da doença. O número de pessoas com DM2 está crescendo rapidamente em todo o mundo. Esse aumento está associado ao envelhecimento da população, ao desenvolvimento econômico, ao aumento da urbanização, as dietas menos saudáveis e à redução da atividade física (Ferranti *et al.*, 2014; National Diabetes Statistics Report, 2017).

O DM é uma doença de grande preocupação para saúde pública, já que a sua incidência e prevalência vêm crescendo de forma proeminente nos últimos anos, já sendo considerada uma epidemia mundial. A prevalência de DM no Brasil aumentou 69 % entre 1990 e 2015, passando de 3,6 % para 6,1 %, sendo que em 2015 existiam aproximadamente 12 milhões de pessoas vivendo com DM no país. Além disso, um total de 62.466 mortes foram atribuídas ao DM em 2015 no Brasil (Duncan *et al.*, 2017).

Conforme os últimos dados publicados pela Federação Internacional do Diabetes, estimou-se que em 2015 haviam 415 milhões de pessoas, com idade entre 20 e 79 anos, com diagnóstico de DM no mundo. Foram 5 milhões de mortes atribuídas ao DM naquele ano. Espera-se, para 2040, que o número de pessoas entre 20 e 79 anos com DM aumente para 642 milhões. Além de a doença limitar a qualidade de vida dos indivíduos acometidos, acarreta altos custos para o controle e tratamento, sendo que em 2015 houve um gasto total estimado de cerca de 673 bilhões de dólares com a doença no mundo (Ogurtsova *et al.*, 2017).

A presença de hiperglicemia crônica pode levar ao desenvolvimento de danos celulares, principalmente naqueles tecidos não sensíveis a sinalização de insulina, tais como o rim, o sistema nervoso e o endotélio vascular, os quais estão constantemente expostos aos altos níveis de glicose. As complicações relacionadas ao DM incluem as condições microvasculares e macrovasculares. As anormalidades relacionadas aos vasos sanguíneos de menor calibre manifestam-se como retinopatia, nefropatia e neuropatia. As complicações macrovasculares afetam médios e grandes vasos, nos quais há espessamento da parede das artérias devido ao acúmulo de material graxo como colesterol e triglicerídeos (TG), em conjunto com uma resposta inflamatória crônica da parede das artérias, levando, desta forma, ao desenvolvimento de aterosclerose. Além da aterosclerose, as principais complicações macrovasculares do DM incluem, ainda, a doença arterial coronariana e a doença cerebrovascular (Fowler, 2011; Blake & Trounce, 2013). As alterações macrovasculares do DM estão diretamente relacionadas a presença de dislipidemia, ou seja, aumento dos níveis séricos de colesterol total (CT), LDL e TG e redução dos níveis de HDL, o que ocorre comumente no DM devido as alterações no metabolismo dos lipídeos (Chapman *et al.*, 2011; Schofield *et al.*, 2016). Existe uma associação positiva entre doença cardiovascular aterosclerótica e níveis séricos de CT e TG tanto no DM1 quanto no DM2 (Howard *et al.*, 2000; West *et al.*, 1983).

Atualmente, evidências suportam o papel do estresse oxidativo na patogênese do DM e suas complicações (Pitocco *et al.*, 2013; Ullah *et al.*, 2016). O aumento da formação de ERO pode levar a danos oxidativos às enzimas e à maquinaria celular devido à sua capacidade de danificar lipídios, proteínas e DNA (Ullah *et al.*, 2016). Estudos têm demonstrado o papel da hiperglicemia na geração de estresse oxidativo, o que levaria à disfunção endotelial em vasos sanguíneos de pacientes com DM (Hoffman, 2015; Incalza *et al.*, 2018). O aumento nos níveis de glicose, juntamente com a dislipidemia, em pacientes que sofrem de DM, leva ao desenvolvimento de macroangiopatias e, conseqüentemente, a aterosclerose (Ullah *et al.*, 2016).

Vários estudos têm demonstrado a presença de perturbação da função mitocondrial durante o DM, tanto em estados de deficiência de insulina, quanto em resistência à insulina (Raza *et al.* 2011; Zhang *et al.* 2011; Blake & Trounce, 2013). Acredita-se que a superprodução de ERO ligada ao aumento da fosforilação oxidativa possa ser um processo chave relacionado às lesões celulares causadas pela hiperglicemia no DM. De fato, sob altos níveis de glicose intracelular, a disponibilidade do substrato é aumentada, impulsionando a oxidação do piruvato e o ciclo do ácido cítrico. Esse processo levaria a um aumento de NADH e FADH₂, o que, por sua vez, levaria a um aumento do gradiente de prótons através da membrana mitocondrial interna para além de seu limite. Desta forma, acredita-se que aumento do gradiente de prótons leva a um bloqueio na transferência de elétrons e isso propicia um aumento do escape de elétrons CTE, que por sua vez, reduzem o O₂, formando o radical O₂^{•-} e dando início a cascata de formação de outras ERO (Brownlee, 2001; Blake & Trounce, 2013). O aumento de geração do radical O₂^{•-} levaria a uma ativação de vias alternativas como a via do poliol, a formação de produtos de glicação avançada, a atividade da proteína quinase C e o fluxo da via da hexosamina. Estudos têm demonstrado que a ativação destas vias está relacionada ao desenvolvimento de complicações do DM. Além disso, a produção aumen-

da de radical $O_2^{\bullet}$ poderia induzir danos ao DNA mitocondrial (Brownlee, 2001).

A terapia medicamentosa do DM é essencial e foca justamente na normalização da glicemia. O tratamento inclui o uso de insulina em pacientes com DM1 e o uso de medicamentos hipoglicemiantes e, em alguns casos, também o uso de insulina, para pacientes com DM2. O uso de insulina é feito através da administração subcutânea, sendo os tipos de insulinas mais comuns a NPH (Insulina Humana Recombinante), que apresenta efeito prolongado, e a insulina regular, a qual apresenta ação rápida. Dentre os medicamentos disponíveis para o controle do DM2 estão a classe das biguanidas, a qual inclui a metformina, a classe das sulfonilureias, a qual inclui, por exemplo, a glibenclamida, a classe das tiazolidinedionas, que inclui, por exemplo, a rosiglitazona, a classe dos inibidores da dipeptidil peptidase-4 (DPP-4), na qual está incluído, por exemplo a sitagliptina, a classe dos inibidores do co-transportador de sódio-glicose 2 (SGLT2), que tem como exemplo a dapagliflozina, e a classe dos agonistas do peptídeo-1 semelhante ao glucagon (GLP-1), como a liraglutida (Chamberlain *et al.*, 2016).

Apesar das diversas alternativas disponíveis para o tratamento do DM, entre 40 e 60 % dos pacientes com a doença apresentam controle glicêmico deficiente, o que aumenta consideravelmente o estresse oxidativo e os riscos de desenvolvimento de complicações (Bi *et al.*, 2010; Mastura *et al.*, 2011; Alzaheb & Altemani, 2018). Além disso, alguns estudos têm demonstrado que mesmo com o controle glicêmico, o estresse oxidativo ainda pode persistir. Estudo de Gadjeva *et al.* (2017) comparou os níveis de marcadores de estresse oxidativo em grupos de indivíduos com DM2, sendo um grupo com bom controle glicêmico, um grupo com controle glicêmico deficiente e um grupo de indivíduos saudáveis. Foi observado que tanto o grupo com bom controle glicêmico quanto o grupo com controle glicêmico deficiente apresentaram altos níveis de produção de ERO, evidenciando que mesmo com a normalização dos níveis de glicose, o estresse oxidativo pode persistir. Além disso, Dal *et al.* (2015) demonstraram que ratos diabéticos

induzidos por estreptozotocina apresentaram produção de ERO aumentada no fígado depois de 4 semanas de terapia com insulina. Adicionalmente, estudo de Costantino *et al.* (2017) demonstrou que há um remodelamento epigenético em pacientes diabéticos, o que leva à hipermetilação da proteína p66, por exemplo, uma proteína chave na regulação do estresse oxidativo mitocondrial. Assim, mesmo após a regulação dos níveis séricos de glicose, o estresse oxidativo continua a ocorrer. Portanto, considerando este contexto, é essencial a busca de alternativas para o tratamento do estresse oxidativo relacionado ao DM e, desta forma, evitar as possíveis complicações.

2.3.SIRTUÍNAS E DIABETES MELLITUS

As sirtuínas (*silent information regulators* - SIRT) são um grupo de enzimas com atividade de desacetilases que fazem parte da classe III de desacetilases de histonas. Essas enzimas promovem a remoção de grupos acetil de resíduos de lisina de várias proteínas alvo como, por exemplo, fatores de transcrição, histonas, enzimas específicas incluindo superóxido dismutase de manganês e coativador do receptor ativado por proliferador de peroxissomo 1 α (PGC-1 α) e outras proteínas diversas que têm papéis importantes na homeostase celular (Li *et al.*, 2015). A atividade desacetilase dessas enzimas é dependente de nicotinamida adenina dinucleotídeo oxidado (NAD⁺) como cofator (Turkmen *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2015). Desta forma, através da desacetilação, as SIRT regulam uma diversidade de proteínas importantes, que, por sua vez, modulam uma ampla variedade de processos relacionados ao metabolismo de carboidratos, proteínas e lipídios, homeostase mitocondrial e mecanismos relacionados a morte celular, como a apoptose (Guarente, 2011; Turkmen *et al.*, 2014).

As SIRT existem em um grande número de organismos, desde bactérias até mamíferos, sendo, portanto, evolutivamente conservadas (Busconi *et al.*, 2009; Houtkooper *et al.*, 2012). Em humanos são conhecidas sete diferentes SIRT (SIRT1-7)

que apresentam diferentes localizações subcelulares. As SIRT1 e SIRT2 são encontradas no citoplasma e no núcleo (Feldman *et al.*, 2015), as SIRT3, SIRT4 e SIRT5 são encontradas na mitocôndria (Fischer *et al.*, 2012; Laurent *et al.*, 2013; Feldman *et al.*, 2015) e as SIRT6 e SIRT7 são encontradas no núcleo (Pan *et al.*, 2011).

A SIRT3 de mamíferos é expressa em uma variedade de tecidos. Estudos realizados em diferentes tecidos de camundongo mostram alta expressão da proteína nos rins, cérebro e coração, seguidos por fígado e testículos, e uma menor expressão no pulmão, ovário, baço e timo. Em tecidos humanos observa-se um padrão de expressão semelhante (Jin *et al.*, 2009; Nogueiras *et al.*, 2012). A SIRT3, a mais estudada dentre as sirtuínas, localizada na mitocôndria, desacetila várias proteínas mitocondriais, dentre elas os complexos da CTE, desta forma, desempenhando papel na regulação da produção de ATP. A SIRT3 regula também a enzima antioxidante MnSOD, desempenhando papel importante na regulação do estresse oxidativo (Nogueiras *et al.*, 2012).

Um estudo demonstrou que a SIRT3 desacetila uma ou mais proteínas do complexo I (CI) da CTE, incluindo a NDUFA9. A atividade do CI é inibida em camundongos com SIRT3 desativada, com consequente redução dos níveis de ATP. Por outro lado, a atividade deste complexo é potencializada em mitocôndrias que foram expostas a níveis aumentados de SIRT3 (Bause & Haigis, 2013). Além disso, a SIRT3 liga-se e desacetila diretamente o complexo II (CII) da CTE regulando a sua atividade enzimática. Observou-se que ratos com SIRT3 silenciada apresentam hiperacetilação do CII em lisados mitocondriais, levando a diminuição da atividade deste complexo em comparação com tecidos de tipo selvagem (Finley *et al.*, 2011).

Em estudo utilizando imunoprecipitação de lisados mitocondriais de músculo de ratos do tipo selvagem ou com SIRT3 silenciada identificou-se uma subunidade do complexo III (CIII) como um alvo potencial de SIRT3 (Bause & Haigis, 2013). Se a interação de SIRT3 com esta subunidade do CIII resulta na regulação da atividade enzi-

mática, permanece a ser determinada. Adicionalmente, um estudo utilizando experimentos *in vitro*, com cultura de células, e *in vivo*, com tecidos de ratos, demonstrou que as proteínas F1 alfa, beta, gama e a proteína que confere sensibilidade à oligomicina da ATP sintase contêm grupos acetil-lisinas específicas para SIRT3 que são conservadas de forma evolutiva. Estes resultados sugerem que a SIRT3 desempenha um papel importante na regulação da síntese de ATP nas mitocôndrias e, portanto, é um regulador potencial do metabolismo energético mitocondrial (Vassilopoulos *et al.*, 2014).

Diversos estudos suportam o envolvimento de alterações da expressão de SIRT3 na patogênese de doenças como, por exemplo, vários tipos de câncer (Liu *et al.*, 2014; Cui *et al.*, 2015; Torrens-Mas *et al.*, 2017; Huang *et al.*, 2017) doenças cardiovasculares (Porter *et al.*, 2014; He *et al.*, 2016) e doenças neurodegenerativas (Liu *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2016) além de doenças metabólicas como o DM (Caton *et al.*, 2013; Turkmen *et al.*, 2014; Zhou *et al.*, 2017).

Em estudo de Hirschey *et al* (2011) foi demonstrado que uma dieta com alto teor de gordura induz hiperacetilação de proteínas mitocondriais em hepatócitos de camundongos em virtude da regulação negativa de SIRT3 mitocondrial. Em decorrência disso, observou-se desenvolvimento de forma mais proeminentes de obesidade, resistência à insulina, hiperlipidemia e esteato-hepatite nos camundongos com SIRT3 silenciada em comparação com camundongos selvagens.

Também foi demonstrado que os níveis diminuídos de SIRT3 no músculo esquelético de camundongos diabéticos induzidos por estreptozotocina (STZ) e de ratos obesos induzidos por dieta rica em gordura eram um componente importante da patogênese do DM2. Os camundongos com SIRT3 silenciada exibiram diminuição do consumo de oxigênio e aumento do estresse oxidativo devido à disfunção mitocondrial via hiperacetilação do CI e CIII da CTE mitocondrial (Jing *et al.*, 2011).

Além disso, estudos relacionam alterações na expressão de SIRT3 com desenvolvimento de complicações relacionadas ao DM. Estudo de Yu *et al.* (2017) demonstrou que a deficiência de SIRT3 leva à exacerbação da disfunção cardíaca relacionada ao DM. Adicionalmente, outro estudo mostrou que a perda de expressão de SIRT3 foi associada com a viabilidade diminuída em células endoteliais de pacientes com DM e quando SIRT3 foi silenciada, houve uma diminuição da viabilidade de células endoteliais expostas a condições de alta glicose (Liu *et al.*, 2015). Desta forma, SIRT3 pode ser um alvo promissor para o desenvolvimento de novas estratégias de tratamento do DM e suas complicações. Entretanto, é essencial que antes a influência das SIRT no DM seja completamente compreendida.

2.4.ANTIOXIDANTES

Halliwell e Gutteridge (1999) inicialmente definiram um antioxidante como sendo qualquer composto que, quando presente em baixas concentrações em comparação com aquelas de um substrato oxidável, é capaz de retardar ou inibir significativamente a oxidação do substrato. Entretanto, em 2015, os mesmos autores trouxeram uma nova definição, mais simples, que diz que um antioxidante é qualquer substância que retarda, previne ou remove os danos oxidativos de uma molécula alvo (Halliwell e Gutteridge, 2015).

Considerando que a geração de ERO está diretamente relacionada ao metabolismo energético aeróbio, os organismos desenvolveram diversas formas de defesas antioxidantes numa tentativa de minimizar os danos oxidativos. Essas defesas antioxidantes podem ser divididas em dois grandes grupos: as enzimáticas e as não-enzimáticas.

Fazem parte das defesas antioxidantes enzimáticas a superóxido dismutase (SOD - EC1.15.1.1), a catalase (CAT - EC 1.11.1.6) e a glutatona peroxidase (GPx - EC

1.11.1.9). A SOD é a enzima responsável por converter o $O_2^{\cdot -}$ em H_2O_2 . Nos mamíferos, as principais isoformas de SOD são a citosólica e a extracelular, as quais utilizam cobre (Cu) e zinco (Zn) como cofatores, e a mitocondrial, que usa manganês (Mn) como cofator (Phaniendra *et al.*, 2015). O H_2O_2 gerado na reação da SOD é substrato para as enzimas CAT ou GPx. A CAT é uma enzima presente principalmente nos peroxissomos e nas mitocôndrias e catalisa a reação de conversão de H_2O_2 em H_2O e O_2 (Pisoschi *et al.*, 2015). As GPx são hidroperoxidases redutoras dependentes de selênio que atuam doando elétrons para reduzir peróxidos, gerando H_2O (Lubos *et al.*, 2011). Essas três enzimas, GPx, CAT e SOD, atuam como uma linha primária de defesa antioxidante (Pisoschi & Pop., 2015).

A linha de defesa antioxidante secundária é composta por outras enzimas como a glutathiona redutase (GR - EC 1.6.4.2), a qual converte a glutathiona de sua forma oxidada (GSSG) para a forma reduzida (GSH) e a glicose-6-fosfato desidrogenase (EC 1.1.1.49), que regenera o NADPH (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato) para manter um ambiente redutor necessário para a atividade da GR (Carocho & Ferreira, 2013; Pisoschi & Pop., 2015).

Apesar de serem eficientes, as defesas antioxidantes endógenas muitas vezes não são suficientes frente ao estresse oxidativo e os danos por ele causados, fazendo com que a participação de antioxidantes obtidos através da dieta seja importante para a manutenção do equilíbrio redox. Dentre os antioxidantes exógenos não enzimáticos destacam-se principalmente as vitaminas C e E, os carotenoides, como o β -caroteno, e os compostos fenólicos (Carocho & Ferreira, 2013; Pisoschi *et al.*, 2015).

2.4.1. COMPOSTOS FENÓLICOS

Os compostos fenólicos são metabólitos secundários produzidos principalmente por plantas e constituem um dos maiores grupos de produtos naturais amplamente distri-

buídos no reino vegetal (Lin *et al.*, 2016). Esses compostos são sintetizados nas plantas, em parte, como uma resposta ao estresse biótico ou abiótico, tais como a ação de agentes patogênicos, ataque de insetos e radiação ultravioleta. Participam ainda de processos germinativos de sementes, bem como do desenvolvimento e reprodução das plantas. Além disso, esses compostos estão envolvidos na coloração de sementes e flores, o que atrai diferentes polinizadores ou disseminadores (Cheynier *et al.*, 2013).

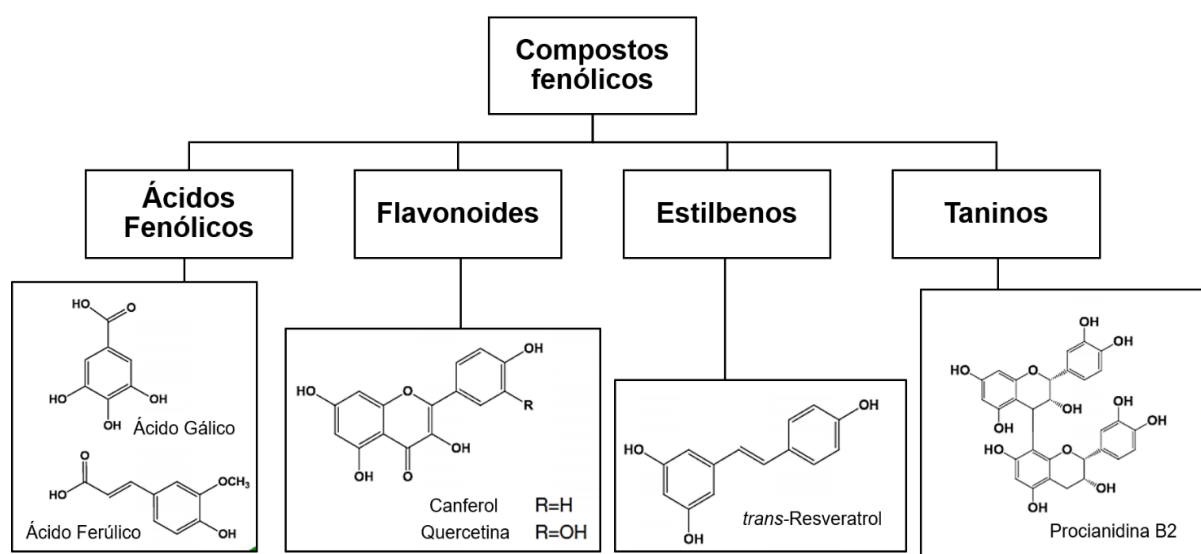


Figura 3. Principais classes de compostos fenólicos e exemplos de estruturas que compõem essas classes. Fonte: adaptado de Zhang & Tsao, 2016.

Os compostos fenólicos são sintetizados a partir de duas vias metabólicas principais, a via do ácido chiquímico e a via do ácido malônico. Na via do ácido chiquímico são formados principalmente fenilpropanoides, já a via do ácido malônico, são produzidos principalmente fenóis simples (Giada, 2013). Essas vias fornecem precursores que levam à elaboração de milhares de compostos, os quais podem ser categorizados em diversas classes como, por exemplo, ácidos fenólicos, estilbenos, taninos e flavonoides (Figura 3) (Zhang & Tsao, 2016).

Ácidos fenólicos incluem substâncias contendo um anel fenólico e pelo menos uma função de ácido carboxílico orgânico. Esses compostos são subdivididos em dois

subgrupos, os ácidos hidroxibenzoicos e hidroxicinâmicos. O grupo dos ácidos hidroxibenzóicos inclui os ácidos gálico, *p*-hidroxibenzóico, protocatecuico, vanílico e sirínico, que apresentam uma estrutura comum C6-C1. Os ácidos hidroxicinâmicos, por outro lado, são compostos aromáticos com uma cadeia lateral de três carbonos (C6-C3), sendo os mais comuns os ácidos cafeico, ferúlico, *p*-cumárico e sinápico (Russell & Duthie, 2011; Goleniowski *et al.*, 2013).

Os taninos, compostos de peso molecular relativamente alto, constituem um dos grupos mais importante de compostos fenólicos e podem ser subdivididos em taninos hidrolisáveis e condensados. Os taninos hidrolisáveis são ésteres de ácido gálico e elágico (galotaninos e elagitaninos), enquanto que os taninos condensados, também conhecidos como proantocianidinas, são polímeros formados pela ligação de dois ou mais monômeros de flavan-3-ol, como por exemplo catequina e epicatequina (Giada, 2013).

Os estilbenos são um pequeno grupo de fenilpropanóides, classificados como não flavonoides, que apresentam uma estrutura C6-C2-C6. Esses compostos representam um componente alimentar extremamente menor, sendo o principal estilbeno conhecido o resveratrol, que ocorre como isômeros *cis* e *trans*, bem como conjugados, incluindo o *trans*-resveratrol-3-*O*-glicosídeo. As uvas e vinhos tintos representam uma fonte com diversidade de derivados de estilbenos (Del Rio *et al.*, 2013).

Por sua vez, o grupo dos flavonoides engloba pelo menos 6000 moléculas, sendo um dos maiores e mais estudados grupos de compostos fenólicos. Os flavonoides são compostos de baixo peso molecular, contendo quinze átomos de carbono dispostos na configuração C6-C3-C6 (Hichri *et al.*, 2011; Panche *et al.*, 2016). Essencialmente, essa estrutura é composta por dois anéis aromáticos A e B, contendo um ou mais grupos hidroxila ligados, unidos por uma ponte de três carbonos, geralmente sob a forma de um anel heterocíclico C (Figura 4).

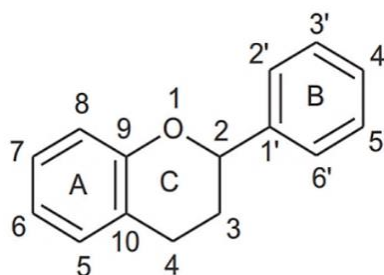
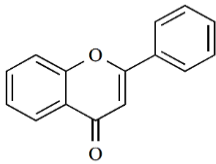
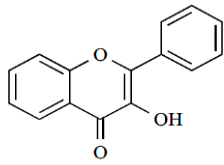
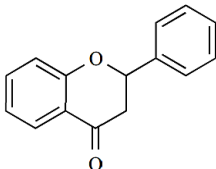
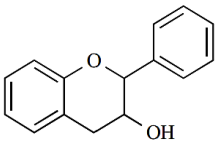
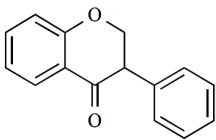
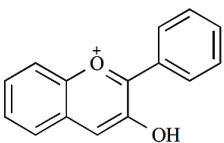
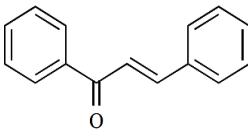


Figura 4. Estrutura básica de um flavonoide. Fonte: adaptado de Del Rio *et al.*, 2013.

Os flavonóides podem ocorrer em suas fontes naturais nas formas livre (aglicona) ou na forma hidroxilada, metoxilada e/ou glicosilada. Este grupo é subdividido basicamente em flavonas, flavonóis, flavanonas, flavan-3-óis, isoflavonas, antocianinas e chalconas (Tabela 1), dependendo do carbono do anel C no qual o anel B está ligado e do grau de insaturação e oxidação do anel C (Gonzalez-Paramás *et al.*, 2011; Panche *et al.*, 2016). Os flavonoides são os compostos fenólicos mais amplamente distribuídos em alimentos de origem vegetal sendo, portanto, constituintes importantes da dieta humana. Alimentos como cacau, café, chá verde, vinho e frutas, especialmente as frutas vermelhas e as frutas cítricas, são particularmente ricos em flavonoides (Tsao, 2010; Del Rio *et al.*, 2013). Apresentando também um papel importante na aparência visual de alimentos, os flavonoides funcionam como pigmentos, e são relevantes ainda para os sabores e aromas. A concentração de flavonoides em alimentos pode variar em várias ordens de grandeza devido à influência de fatores como o clima, a espécie, a variedade, o grau de maturação e o armazenamento pós-colheita (Skrovankova *et al.*, 2015).

Dentro do grupo dos flavonoides, as antocianinas compreendem um importante grupo de pigmentos solúveis em água, sendo responsáveis pela grande diversidade de cores presentes em flores e frutas, variando desde tons de laranja e vermelho até roxo e azul (Panche *et al.*, 2016). Estruturalmente, as antocianinas compreendem uma aglicona, denominada antocianidina, ligada a uma ou mais unidades de açúcar. As antocianinas ge-

Tabela 1. Principais classes de flavonoides, suas estruturas básicas e principais representantes de cada classe.

Classe	Estrutura Básica	Principais Compostos
Flavona		Apigenina e luteolina
Flavonol		Quercetina, canferol e miricetina
Flavanona		Hesperidina e naringenina
Flavan-3-ol (Monômeros)		(Epi)catequina e (epi)gallocatequina
Isoflavonas		Genisteína e daidzeína
Antocianinas		Cianidina, delphinidina, malvidina, pelargonidina, petunidina e peonidina
Chalcona		Ploretina, arbutina e buteina

Fonte: adaptado de Panche *et al.* (2016).

ralmente encontradas em frutos são glicosiladas na posição 3-OH (3-O-monoglicosídeos) e, em menor extensão, em ambas as posições 3 e 5-OH-OH (3,5-O-diglicosídeos) (Jaakola, 2013; Fernandes *et al.*, 2014). Apesar das antocianidinas (Figura 5) mais comuns serem apenas seis, existe o relato de mais de 539 antocianinas isoladas de plantas (Andersen & Jordheim, 2005; Fernandes *et al.*, 2014). Nas frutas as antocianinas são encontradas principalmente nas partes externas da hipoderme (casca). entre as antocianinas conhecidas, a cianidina é a mais comumente encontrada em frutas (Jaakola, 2013).

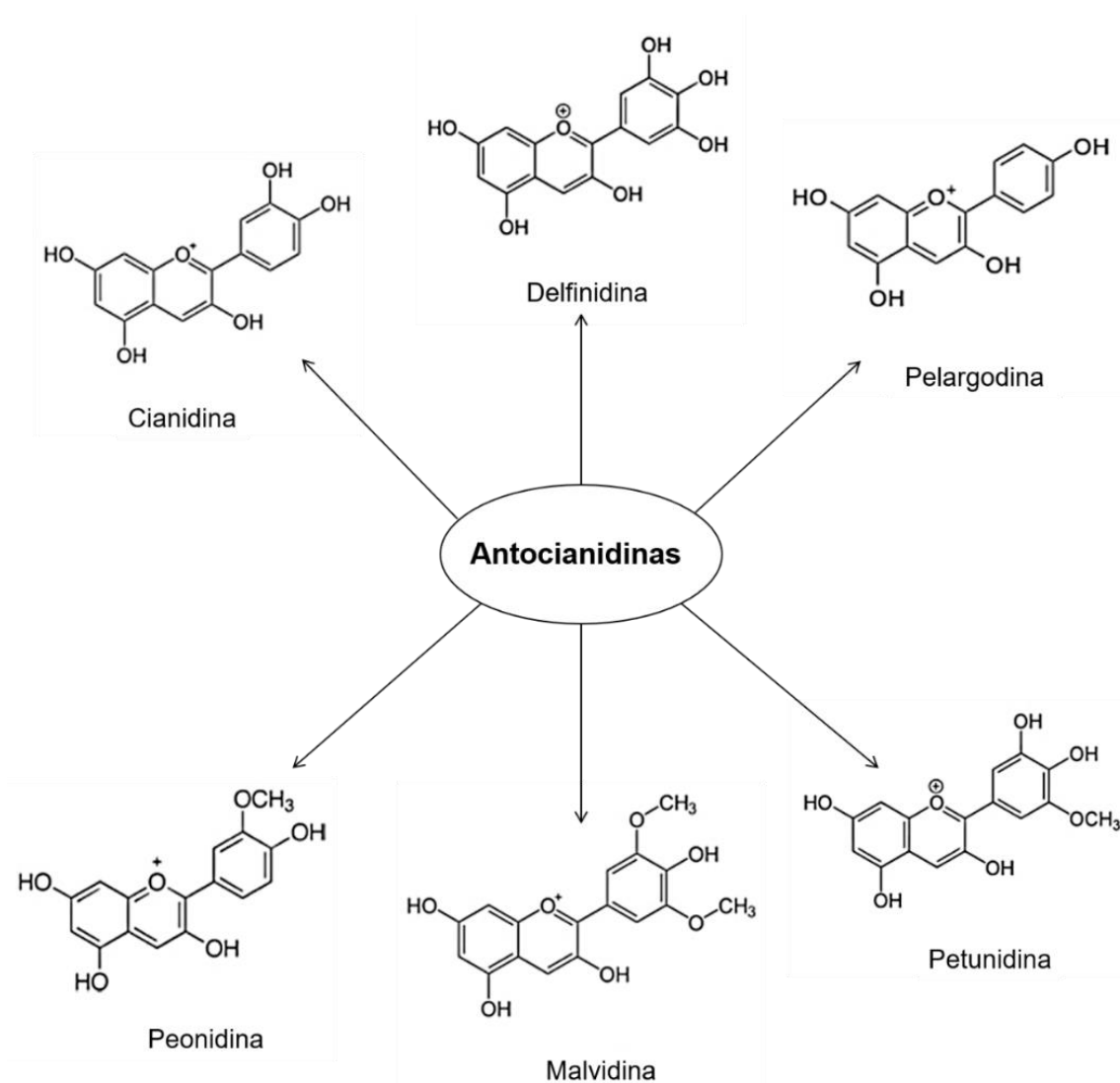


Figura 5. Estruturas químicas das principais agliconas (antocianidinas) de antocianinas.
Fonte: adaptado de Khoo *et al.* (2017)

Os flavonóis, outra classe de flavonoides, são flavonas substituídas na posição C-3 por uma hidroxila. Esses compostos são os flavonóides mais amplamente distribuídos em alimentos, sendo componentes comuns de frutas, legumes e algumas bebidas e apresentando cores que variam do branco ao amarelo. A maioria dos flavonóis ocorre naturalmente conjugados com um ou mais açúcares. Os flavonóis mais encontrados em alimentos são o canferol, a quercetina e a miricetina (Figura 6) (Simões *et al.*, 2010). Estes compostos acumulam-se principalmente nos tecidos externos (pele e folhas), em virtude de sua biossíntese ser estimulada pela luz (Manach *et al.*, 2004).

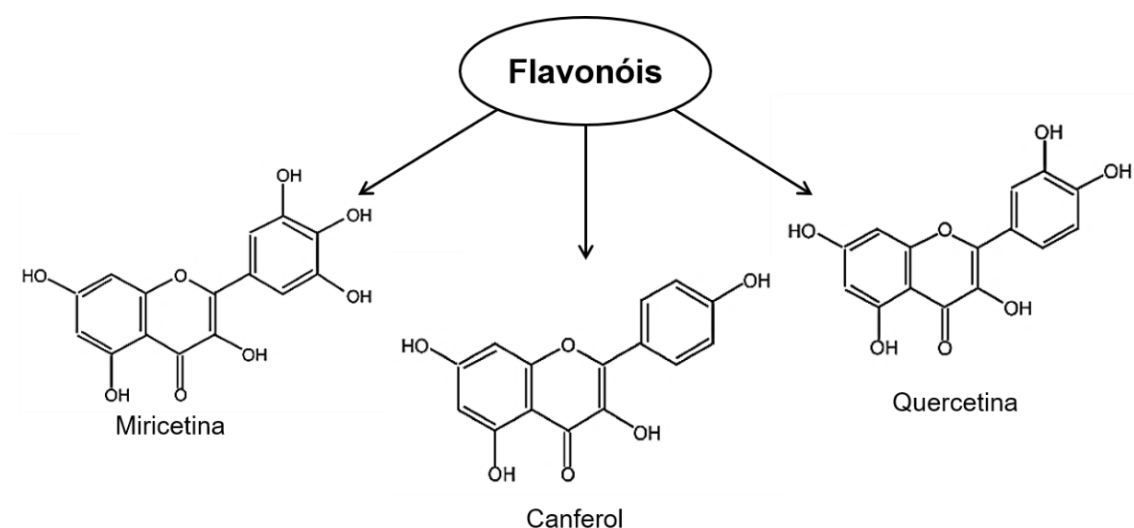


Figura 6. Estruturas químicas dos flavonóis e alguns representantes mais comuns. Fonte: adaptado de Kim *et al.* (2006).

O estudo dos compostos fenólicos tem indicado uma variedade de propriedades biológicas, sendo a atividade antioxidante a mais estudada delas. A estrutura destes compostos é um fator determinante nessa atividade. O grau de hidroxilação e as posições dos grupos hidroxil (-OH) no anel B, em particular uma estrutura *orto*-diidroxil do anel B (grupo catecol), resulta em maior atividade e a presença de grupos -OH nas posições 3', 4', e 5' do anel B (um grupo de pirogalol) tem sido associada a um aumento da atividade antioxidante dos flavonoides em comparação com aqueles que têm um único

grupo -OH. A ligação dupla entre C-2 e C-3, combinado com um 3-OH, no anel C, também melhora a capacidade dos flavonoides em reduzir RL (Figura 7) (Fraga *et al.*, 2010). Portanto, os compostos fenólicos podem complementar e contribuir para as funções de vitaminas e enzimas antioxidantes, como defesas contra o estresse oxidativo.

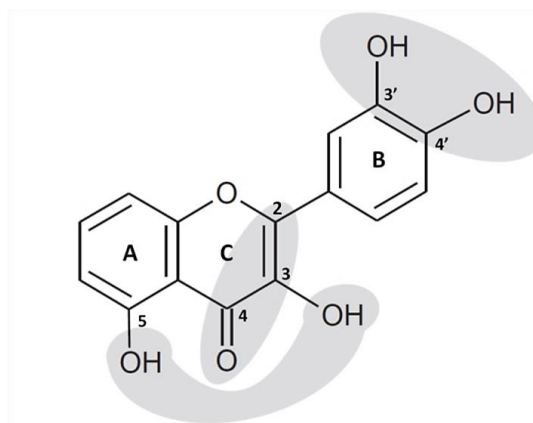


Figura 7. Características estruturais que definem a ação antioxidante de flavonoides. As áreas destacadas mostram os três critérios necessários para a atividade antioxidante máxima de flavonoides: um grupo catecol no anel B (3'- e 4'- OH), a ligação dupla entre os carbonos 2 e 3 conjugado com 4-ceto do anel C e as hidroxilas em 3 e 5 dos anéis C e A, respectivamente. Fonte: adaptado de Fraga *et al.*, 2010.

Apesar do potencial como antioxidantes, o efeito direto desses compostos de reduzir ERO tem sido bastante questionado, já que as concentrações atingidas na circulação são consideradas muito baixas para possibilitar uma ação antioxidante direta (Hollman *et al.*, 2011; Kim *et al.*, 2014). Desta forma, estudos têm sugerido que compostos fenólicos podem exercer ação antioxidante através de outros mecanismos, tais como modulação da expressão e/ou atividade de moléculas relacionadas a formação ou remoção de ERO, tais como complexos da CTE e enzimas antioxidantes (Lagoa *et al.*, 2011; Tsuji *et al.*, 2013).

Adicionalmente, além da atividade antioxidante, estudos têm demonstrado ainda que os compostos fenólicos apresentam capacidade anti-inflamatória (Bak *et al.*, 2013; Rocha *et al.*, 2015), anti-proliferativa (Duo *et al.*, 2012; Ouhtit *et al.*, 2014), antimicro-

biana (Tohma *et al.*, 2016; Camargo *et al.*, 2017) e podem ser reguladores do metabolismo (Kalea *et al.*, 2010; Razavi *et al.*, 2013). Além disso, a alta ingestão de frutas e verduras ricas em compostos fenólicos tem sido associada a riscos reduzidos de doenças crônicas, incluindo câncer, doenças cardiovasculares e o DM (Bahadoran *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2014; Cao *et al.*, 2018).

2.4.2. COMPOSTOS FENÓLICOS E DIABETES

Considerando as evidências que demonstram a participação do estresse oxidativo na patogênese e no desenvolvimento de complicações do DM, estudos têm buscado investigar o efeito dos compostos fenólicos na prevenção ou tratamento desta doença. Uma ampla gama de estudos tem suportado o potencial dos compostos fenólicos para proteger contra os efeitos prejudiciais associados ao DM (Asgar, 2013; Bahadoran *et al.*, 2013; Suganya *et al.*, 2016; Cao *et al.*, 2018).

Os benefícios dos compostos fenólicos sobre o DM e suas complicações podem estar relacionados a diferentes mecanismos de ação, dentre eles, inibição das enzimas responsáveis pela digestão de carboidratos ou inibição da absorção de glicose no intestino. Estudos já demonstraram a capacidade de compostos fenólicos presentes em frutas como, por exemplo, morangos, framboesas, mirtilos e groselhas negras, em inibir as enzimas alfa-amilase e alfa-glicosidase (McDougall *et al.*, 2005). Estudo de Alezandro *et al.* (2013) demonstrou que extrato de jabuticaba também apresenta potencial de inibição das enzimas alfa-amilase e alfa-glicosidase.

Outro mecanismo dos compostos fenólicos na melhora do DM está relacionado a inibição do transporte de glicose no intestino. Estudo com extratos de maçã e de morango demonstrou que houve uma inibição da absorção e transporte de glicose em células intestinais Caco-2, através da inibição do transportador de glicose do tipo 2 (GLUT2) (Manzano & Williamson, 2010). Adicionalmente, estudos têm demonstrado

que esses compostos podem diminuir a liberação de glicose pelo fígado e aumentar a captação de glicose nos tecidos através da modulação da sinalização intracelular. Estudo com semente de soja preta, rica em antocianinas e procianidinas, demonstrou que houve diminuição dos níveis de glicose plasmática e melhora da sensibilidade à insulina no músculo esquelético e fígado de camundongos com DM tipo 2. Esses efeitos observados foram atribuídos a regulação positiva de GLUT4 no músculo e pela inibição da gliconeogênese no fígado (Kurimoto *et al.*, 2013). Estudos com extrato de jabuticaba (*M. jabuticaba*) também demonstraram o potencial em melhorar a resistência à insulina (Lenquist *et al.*, 2012; Plaza *et al.*, 2016).

A capacidade antioxidante dos compostos fenólicos pode ainda proteger contra o estresse oxidativo amplamente relacionado as complicações do DM. Estudo com chocolate contendo alto teor de compostos fenólicos foi capaz de proteger contra disfunção endotelial induzida por hiperglicemia aguda e estresse oxidativo em indivíduos com DM2 (Mellor *et al.*, 2013). Além disso, um estudo randomizado duplo-cego cruzado, no qual os indivíduos receberam suplementação de extrato de semente de uva, demonstrou que houve melhora significativa dos marcadores de inflamação, glicemia e de estresse oxidativo em pacientes com DM2 obesos com alto risco de eventos cardiovasculares, o que sugere que o extrato pode ter um papel terapêutico na diminuição do risco cardiovascular nestes pacientes (Kar *et al.*, 2009). Neste mesmo contexto, estudos têm demonstrado a capacidade dos compostos fenólicos em reduzir os níveis de lipídios séricos, o que pode ser protetor contra doenças cardiovasculares relacionadas ao DM. Esse efeito dos compostos fenólicos tem sido atribuído a capacidade de inibição de transportadores intestinais de colesterol (Nekohashi *et al.*, 2014), inibição de enzimas digestivas, como lipase pancreática (Sugiyama *et al.*, 2007), inibição da solubilidade de micelas (Su *et al.*, 2015) e, ainda, capacidade de regular a expressão de PPAR- α , um fator

de transcrição que modula o metabolismo energético no fígado, tecido adiposo e músculo (Kim *et al.*, 2010).

Adicionalmente, Lee *et al.* (2015) demonstraram que cianidina-3-glicosídeo, isolada de amora, é citoprotetora frente a apoptose induzida por glicose em células β -pancreáticas. A geração de ERO, a fragmentação do DNA e a taxa de apoptose foram efetivamente diminuídas, após a suplementação com cianidina-3-glicosídeo, apoiando a hipótese de que o efeito antidiabético das antocianinas está associado à diminuição do estresse oxidativo e ao aumento do sistema de defesa antioxidante.

A disfunção mitocondrial tem sido relacionada ao desenvolvimento de estresse oxidativo no DM, sendo considerada um ponto chave para o desenvolvimento de complicações. Por isso, estudos têm focado na investigação dos efeitos dos compostos fenólicos na atividade mitocondrial. Estudo com galangina, um flavonoide natural, em ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina, demonstrou que esse composto foi capaz de diminuir os níveis de estresse oxidativo através do aumento dos antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos e da melhora da função dos complexos III e IV da CTE mitocondrial (Aloud *et al.*, 2018). Além disso, estudo com procianidinas B2 de semente de uva demonstrou que esses compostos são capazes de modular a atividade dos complexos da CTE mitocondrial em fígado de ratos diabéticos, aumentando a atividade dos complexos I, III e IV (Yin *et al.*, 2017).

Diversos estudos têm demonstrado a capacidade de compostos como o canferol, a quercetina, a cianidina-3-O-glicosídeo, em restaurar a função mitocondrial, evitando o desenvolvimento do estresse oxidativo e a morte celular (Suematsu *et al.*, 2011; Min *et al.*, 2011; Filomeni *et al.*, 2012). Além disso, estudo recente em nosso laboratório demonstrou a capacidade do extrato de casca de jabuticaba (*Plinia trunciflora*), que contém compostos fenólicos como canferol e cianidina-3-O-glicosídeo, em restaurar a função do complexo I da CTE e, desta forma, reduzir os danos oxidativos em cultura de

células (Calloni *et al.*, 2015). Apesar disso, os mecanismos subjacentes à interação dos compostos fenólicos com a mitocôndria e os seus consequentes efeitos benéficos relacionados ao DM permanecem por ser elucidados.

2.5. *Plinia* sp.

2.5.1. DESCRIÇÃO BOTÂNICA

A jabuticabeira (*Plinia* sp.) é uma árvore frutífera nativa do Brasil, pertencente à família Myrtaceae. Esta família compreende cerca de 4.620 espécies distribuídas em 140 gêneros, com ocorrência em regiões tropicais e subtropicais do mundo, principalmente na Austrália e América Central e do Sul (Mabberly, 1997; Sobral *et al.*, 2012). Fazem parte desta família, por exemplo, plantas dos gêneros *Psidium*, *Eugenia* e *Plinia*, aos quais pertencem árvores frutíferas de grande importância, como a goiabeira (*Psidium guajava*), a pitangueira (*Eugenia uniflora*) e também a jabuticabeira (*Plinia* sp.). São conhecidas, dentro do gênero *Plinia* sp., cerca de nove espécies de jabuticaba, uma dessas espécies é considerada extinta, cinco delas foram encontradas apenas em locais de pesquisa e bancos de germoplasma e apenas três tem distribuição natural e são cultivadas no Brasil, sendo elas *Plinia trunciflora* (O. Berg) Kausel, conhecida como jabuticaba de cabinho; *Plinia cauliflora* (DC.) Berg, conhecida como jabuticaba paulista, ponhema ou assú; e *Plinia jaboticaba* (Vell.) Berg, conhecida como sabará. A nomenclatura do gênero das jabuticabeiras sofreu alteração, passando a ser chamada de *Plinia* e não mais *Myrciaria*. Entretanto, as duas denominações podem ser consideradas sinônimos.

No Brasil as jabuticabeiras estão distribuídas no Centro, Sul e Sudeste do país, com pontos secundário de dispersão no Paraguai e Argentina (Citadin *et al.*, 2010). As espécies *P. cauliflora* e *P. jaboticaba* são as mais importantes do ponto de vista comercial, sendo que a *P. jaboticaba* ocupa a maior área de cultivo entre todas as espécies do país,

principalmente nos Estados de Minas Gerais e São Paulo, que possuem alguns pomares comerciais (Mattos, 1983).

Estas três espécies de jabuticaba cultivadas no Brasil compartilham entre si características muito semelhantes, o que leva, muitas vezes, a certa dificuldade em relação à identificação botânica. Em geral, *Plinia* sp. apresenta-se como uma árvore de tamanho médio, podendo chegar até 12 metros de altura. Apresenta copa com grande número de ramificações nos galhos, que se iniciam perto do chão e se inclinam para cima e para fora (Figura 8). As folhas da planta são opostas, lanceoladas ou elípticas, arredondadas na base pontudas no ápice (Figura 9A). O tronco é liso e a casca descama anualmente (Morton, 1987).

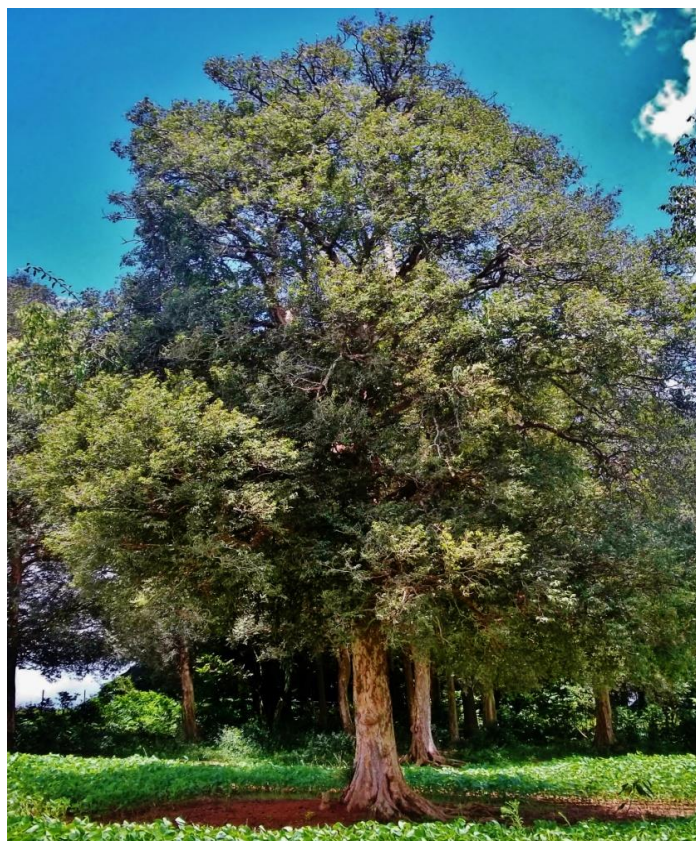


Figura 8. Imagem de uma jabuticabeira (*Plinia* sp.).
Fonte: arquivo pessoal do autor.

As frutas, que também são muito similares entre as três espécies, conhecidas comumente como jabuticabas (do tupi, “iapoti’kaba”, que significa “fruta em botão”),

apresentam-se em forma de bagas globulares, com casca espessa, de coloração roxa, que cobre uma polpa branca, de sabor agri-doce e textura gelatinosa, a qual pode conter entre 1 e 4 sementes (Meletti, 2000). Apesar de muito semelhantes à primeira vista, trabalho de Danner (2009) demonstrou que existem diferenças entre as frutas das três espécies, sendo que as frutas de *P. trunciflora* apresentam peso e diâmetro maior em relação as demais espécies. Além disso, *P. trunciflora* apresenta maior proporção de sementes em relação a polpa e casca mais espessa que as outras espécies (Danner *et al.*, 2009).

As flores e frutos (Figura 9B e 9C) nascem diretamente no tronco e nos galhos principais da árvore, o que confere uma aparência distinta à planta. As jabuticabeiras frutificam uma ou duas vezes ao ano, entre agosto e setembro e janeiro e fevereiro (podem ocorrer variações nos períodos de frutificação, dependendo da espécie e do clima) e seus frutos amadurecem rapidamente, completando seu desenvolvimento entre 40 a 46 dias (Gomes, 1980; Wilbank *et al.*, 1983; Morton, 1987; Andersen & Andersen, 1988).

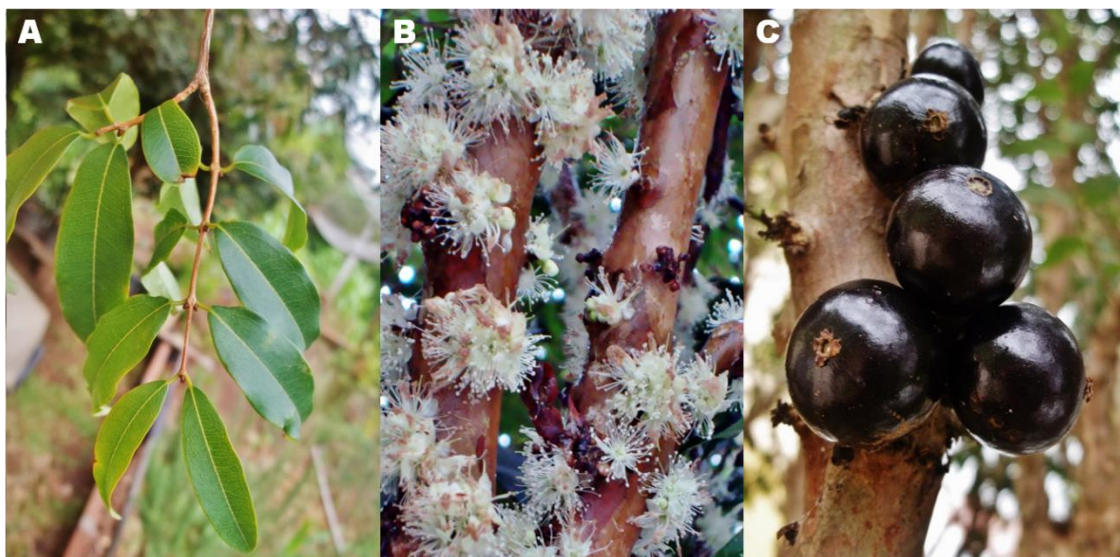


Figura 9. Folhas (A), flores (B) e frutos (jabuticabas) (C) de *Plinia* sp. Fonte: arquivo pessoal do autor.

Apesar de produzir um grande número de frutas em uma única árvore, entre 50 e 200 quilos por planta, depois de colhida a jabuticaba é muito perecível, apresentando

uma vida útil de cerca de três dias. Isso ocorre, provavelmente, em decorrência do elevado teor de água e açúcares. Em consequência disso, a fruta é bastante utilizada na fabricação de geleias, sucos, vinhos, licores e vinagres (Brunini *et al.*, 2004; Balerdi *et al.*, 2006).

2.5.2. COMPOSIÇÃO NUTRICIONAL, FITOQUÍMICA E ATIVIDADE BIOLÓGICA

Os frutos frescos de *Plinia* sp. apresentam uma grande variedade de nutrientes como carboidratos, sais minerais e vitaminas. As frutas contêm quantidades consideráveis de potássio e fósforo, além de ácido ascórbico (vitamina C), presente em quantidades importantes na polpa da fruta (Lorenzi *et al.*, 2000; Oliveira *et al.*, 2003; Rufino *et al.* 2011). A casca é especialmente rica em fibras alimentar (Tabela 2), além de apresentar maior conteúdo de compostos fenólicos (Leite-Legatti *et al.*, 2012).

Tabela 2. Composição centesimal da polpa e casca de jabuticaba crua.

Nutrientes	Polpa/100g	Casca/100g
Calorias (Kcal)	58,0	ND
Proteína (g)	0,60	1,00 ± 0,03
Lipídeos (g)	0,10	0,25 ± 0,01
Carboidratos (g)	15,30	11,54 ± 0,01
Fibra alimentar (g)	2,30	8,45 ± 0,01
Umidade (%)	83,60	75,18 ± 0,85
Cinzas (g)	0,40	0,58 ± 0,01
Cálcio (mg)	8,0	ND
Ferro (mg)	0,10	ND
Fósforo (mg)	15,0	ND
Potássio (mg)	130,0	700,70 ± 81,20
Vitamina C (mg)	16,20	8,60 ± 0,20

ND – Não determinado. Fonte: adaptado da Tabela brasileira de composição de alimentos (2011), Calloni *et al.*, (2015) e Inada *et al.*, (2015)

Existem alguns relatos do uso empírico da jabuticaba, como a utilização do chá da casca da *P. cauliflora* no tratamento da asma, anginas, disenterias e infecções cutâneas (Meletti, 2000).

Nos últimos anos o interesse científico no estudo da jabuticaba (*Plinia* sp.) cresceu substancialmente se considerado o número de novas publicações, principalmente em relação a sua composição química e as atividades biológicas (Wu *et al.*, 2013; Ribeiro *et al.*, 2018).

Os estudos realizados com *P. cauliflora* e *P. jaboticaba* demonstram que estas espécies de jabuticabas são ricas em compostos fenólicos, sendo que a maior parte destes compostos encontra-se concentrada na casca (Santos *et al.*, 2010; Abe *et al.*, 2012; Santacruz *et al.*, 2012; Wu *et al.*, 2012; Neves *et al.*, 2018).

No extrato metanólico da jabuticaba (*P. cauliflora*) liofilizada, foram identificados cerca de 22 compostos fenólicos incluindo ácido gálico, ácido elágico, ácido cinâmico, isoquercitrina, quercetina, rutina, jabuticabina, além de antocianinas, como delfinidina-3-O-glicosídeo e cianidina-3-O-glicosídeo (Reynertson *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2012). Além disso, Santacruz *et al.* (2012) também identificaram a presença das antocianinas delfinidina-3-O-glicosídeo e cianidina-3-O-glicosídeo no extrato metanólico da casca da mesma espécie de jabuticaba.

Quando comparado o perfil fenólico de *P. jaboticaba* (Vell.) Berg e de *P. cauliflora* (Mart.) O. Berg, foi demonstrado que existe diferença na composição fenólica entre as duas espécies, sendo que o extrato metanólico da casca de *P. cauliflora* apresentou maior conteúdo de antocianinas e derivados de quercetina quando comparado com o extrato metanólico de *P. jaboticaba*, que apresentou maior quantidade de proantocianidinas. Entretanto, não foi observada diferença no conteúdo de ácido elágico entre as duas espécies. Foi observada ainda diferença na composição fitoquímica em relação ao período de maturação da fruta (*P. jaboticaba*), sendo que a quantidade de anto-

cianinas aumenta na casca conforme aumenta o grau de maturação. Já o conteúdo de proantocianidinas e ácido elágico cai conforme aumenta o índice de maturação da fruta. Em relação aos derivados de quercetina, não foram observadas grandes variações durante o amadurecimento (Abe *et al.*, 2011; Alezandro *et al.*, 2013).

Em estudo recente de Neves *et al.* (2018), os quais também avaliaram a composição química da casca de quatro diferentes espécies de jaboticaba, sendo elas *P. trunciflora*, *P. cauliflora*, *P. jaboticaba* e *P. phitrantha*, foram identificados um total de 49 compostos, sendo 17 deles derivados de quercetina, 3 flavonoides derivados de miricetina, 18 derivados de ácido elágico e 12 derivados de ácido 3-O-metilelágico. Este mesmo estudo demonstrou que os compostos identificados não se apresentaram uniformemente distribuídos entre as diferentes espécies de jaboticaba, sendo que apenas miricetina-3-galactosídeo, quercetina-3-galactosídeo, quercetina-3-pentosídeo, ácido elágico livre, ácido elágico glicosídeo e ácido elágico-raminosídeo foram encontrados em todas as espécies.

Além disso, um depsídeo, denominado jaboticabina, foi identificado pela primeira vez no extrato metanólico de *P. cauliflora*, juntamente com o depsídeo ácido 2-O-(3,4-dihidroxibenzoil)-2,4,6-trihidroxiphenil acético (Reynertson *et al.*, 2006). Esses dois compostos apresentaram capacidade de inibir em 47,3 % e 70,3 %, respectivamente, a produção de interleucina-8 na linhagem de células epiteliais de vias aéreas (SEA) expostas a um extrato de cigarro, sugerindo uma atividade anti-inflamatória e um possível papel terapêutico para o tratamento da doença pulmonar obstrutiva crônica. Além disso, as antocianinas cianidina-3-O-glicosídeo e delphinidina-3-O-glicosídeo também apresentaram a mesma capacidade de inibição da produção de interleucina-8, em 96 % e 36,4 %, respectivamente. Essa interleucina é uma citocina implicada em alguns cânceres e em uma variedade de condições inflamatórias, como artrite reumatoide e doenças do coração e pulmões (Reynertson *et al.*, 2006). A jaboticabina, o ácido 2-O-(3,4-dihidroxi-

benzoil)-2,4,6-trihidroxiphenil acético e a delfinidina-3-glicosídeo apresentaram ainda citotoxicidade em três linhagens humanas de câncer de cólon (HT29, HCT116 e SW480). A citotoxicidade destes três compostos foi muito semelhante ao composto 5-fluoracil, uma droga utilizada no tratamento de câncer (Reynertson *et al.*, 2006).

Outro estudo com a espécie *P. jaboticaba*, avaliou os extratos polar (etanólico) e apolar (diclorometano) da casca liofilizada da fruta, em relação a sua atividade antiproliferativa em dez diferentes linhagens de células tumorais humanas. Observou-se que o extrato polar foi eficiente em inibir significativamente o crescimento apenas da linhagem de células de leucemia (K-562), enquanto que o extrato apolar foi eficiente em inibir o crescimento tanto das células de leucemia quanto de células tumorais de próstata (PC-3). Estes mesmos extratos não demonstraram citotoxicidade em uma linhagem não tumoral de macaco (VERO) (Leite-Legatti *et al.*, 2012). Além disso, Wang *et al.* (2014) testaram diferentes partes da jaboticaba (*M. cauliflora*) para identificar as frações que apresentam atividade anticarcinogênica mais efetiva. Para tanto, células de carcinoma bucal humano foram tratadas com extratos (aquoso ou etanólico) de semente, caule e casca da jaboticaba. Os resultados demonstraram que o extrato aquoso de semente foi o mais eficiente em reduzir a proliferação celular, através da indução de apoptose pela regulação negativa da proteína survivina e, deste modo, ativando a clivagem mediada por caspase da proteína Bid.

As atividades mutagênica e antimutagênica do extrato polar de casca de *P. jaboticaba* também foram avaliadas. Para isso, foi determinada a frequência de micronúcleos em células da medula óssea de camundongos que receberam extrato por gavagem, durante 15 dias. Observou-se que o extrato não induziu danos ao DNA, ou seja, não apresentou efeito mutagênico. Porém, não foi capaz de reduzir os danos ao DNA induzidos pelo composto ciclofosfamida, não apresentando, portanto, atividade antimutagênica (Leite-Legatti *et al.*; 2012). Adicionalmente, estudo de Silva *et al.* (2016)

avaliou os efeitos do co, pré e pós tratamento de ratos com extrato de semente de jabuticaba (*M. cauliflora*) e/ou ciclofosfamida sobre a presença de micronúcleos e danos ao DNA (ensaio de cometa). Os resultados mostraram que o extrato sozinho não apresentou efeito genotóxico para células de medula óssea. Além disso, observou-se que tanto o pré, quanto co e pós tratamento com o extrato foram capazes de diminuir a frequência de micronúcleos induzidos por ciclofosfamida, demonstrando, desta forma, atividade antigenotóxica do extrato.

A atividade anti-hiperlipidêmica da jabuticaba também já foi demonstrada. Após a suplementação de 1 ou 2 g por kg de peso de um pó de jabuticaba (*P. jaboticaba*) durante 40 dias, observou-se que os níveis de colesterol e de triglicerídeos plasmáticos dos ratos diabéticos diminuíram em 32 % e 50 %, respectivamente. Além disso, esse mesmo estudo demonstrou que houve diminuição na peroxidação lipídica no plasma (22 %) e no cérebro (10-17 %) destes ratos. Adicionalmente, a capacidade antioxidante plasmática dos ratos, avaliada através do ensaio FRAP (*Ferric Reducing Ability of Plasma*), aumentou cerca de 2 vezes após essa mesma suplementação (Alezandro *et al.*, 2013). Lage *et al.* (2014) também demonstraram que a farinha de jabuticaba adicionada a alimentação de ratos saudáveis foi capaz de reduzir os níveis de colesterol total e aumentar os níveis de colesterol HDL. Adicionalmente, o estudo mostrou que os ratos que receberam a farinha de jabuticaba apresentaram menor atividade das enzimas aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT) e uma diminuição da esteatose hepática, além de reduzir a peroxidação lipídica no fígado.

Outra atividade biológica da jabuticaba (*M. jaboticaba*) estudada foi a capacidade de melhorar a resistência à insulina. Em estudo com ratos que receberam dieta hiperlipídica adicionada de pó de casca de jabuticaba liofilizada, observou-se a redução da insulina plasmática e de HOMA-IR (*Homeostatic model assessment of insulin resistance*). Além disso, os ratos que receberam o pó de jabuticaba liofilizada apresenta-

ram aumento nos níveis de colesterol HDL (Lenquiste *et al.*, 2012). Dragano *et al.* (2013) avaliaram os efeitos do pó de casca de jabuticabaca liofilizada (*M. jaboticaba*) em parâmetros metabólicos em um modelo de ratos obesos induzido por dieta hiperlipídica. A suplementação por 6 semanas foi eficiente na correção da resistência à insulina induzida pela dieta, que pode estar associada, pelo menos em parte, à redução da inflamação no fígado dos ratos tratados. Em estudo com humanos, o efeito do consumo de pó de jabuticaba (*M. jaboticaba*) na capacidade antioxidante do plasma e no perfil glicêmico foi avaliado em um estudo cruzado controlado por placebo. A capacidade antioxidante sérica foi maior quando os indivíduos consumiram a refeição teste contendo jabuticaba e a insulina sérica diminuiu após a segunda refeição, 4 h após o consumo da casca de jabuticaba (Plaza *et al.*, 2016).

Dois estudos demonstraram atividade vasodilatadora em artérias isoladas de ratos para duas espécies diferentes de jabuticaba, *M. jaboticaba* e *M. cauliflora*, sendo uma na forma de bebida fermentada e outra na forma de extrato hidroalcoólico, respectivamente (De Sá *et al.*, 2014; Andrade *et al.*, 2016). Além disso, a atividade anti-hipertensiva do extrato hidroalcoólico de *M. cauliflora* também foi demonstrada. Ratos hipertensos que receberam o extrato por quatro semanas apresentaram pressão arterial sistólica menor, sendo que essa redução foi atribuída a menor produção de óxido nítrico. No mesmo estudo, as hipertrofias renais e cardíacas também foram atenuadas após o tratamento (Souza *et al.*, 2017).

Além das atividades biológicas acima relatadas, a atividade antioxidante foi uma das mais estudadas para a jabuticaba. A atividade antioxidante *in vitro* da jabuticaba foi demonstrada em diversos estudos, avaliada através de ensaios como DPPH[•] (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) (Abe *et al.*, 2011; Haminiuk *et al.*, 2011; Rufino *et al.*, 2011; Leite-Legatti *et al.*, 2012; Wu *et al.*, 2012; Calloni *et al.*, 2015), ABTS^{•+} (2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (de Assis *et al.*, 2009; Leite-Legatti *et al.*, 2012; Wu

et al., 2012), FRAP (*ferric reducing antioxidante power*) e branqueamento do β -caroteno (Rufino *et al.*, 2010) e ORAC (*oxygen radical absorbance capacity*) (Leite *et al.*, 2011). Além disso, a atividade antioxidante *in vivo* de extratos da jabuticaba também foi relatada. Em estudo com ratos foi avaliado o efeito da ingestão de casca de jabuticaba liofilizada (*P. jaboticaba*), rica em antocianinas (delfinidina-3-O-glicosídeo e cianidina-3-O-glicosídeo), no potencial antioxidante do plasma. Foi observado que a adição de 1 e 2 % da mesma casca de jabuticaba liofilizada na dieta normal de ratos saudáveis melhora a capacidade antioxidante sérica, avaliada através dos ensaios TEAC (*trolox equivalence assay*) e ORAC (Leite *et al.*, 2011).

Apesar de existirem diversos estudos demonstrando as atividades biológicas da jabuticaba, a maioria deles têm se focado principalmente nas espécies *P. cauliflora* e *P. jaboticaba*, em função de serem as espécies com maior produção e comercialização no Brasil. Isso faz com que existam poucos estudos em relação à caracterização química e atividades biológicas da *P. trunciflora*. Dentre as poucas atividades biológicas estudadas para esta espécie, estão atividade antioxidante (Calloni *et al.*, 2015), antidepressiva (Sacchet *et al.*, 2015), antibacteriana e antifúngica (Lago *et al.*, 2011).

No Quadro 1 estão apresentadas, de forma resumida, as principais atividades biológicas da jabuticaba já estudadas. Pode-se observar que *P. jaboticaba* foi a espécie utilizada na maioria dos estudos e a principal parte da planta estudada foi a casca da fruta. É importante notar também que a maior parte dos estudos encontrou resultados consistentes e promissores no que diz respeito aos mais variados efeitos biológicos, principalmente em relação à atividade antioxidante, anti-hiperlipidêmica, hepatoprotetora, melhora da resistência à insulina, antifúngica e antibacteriana.

Quadro 1. Principais atividades biológicas relatadas na literatura para as diferentes espécies de jaboticaba

Atividades biológicas	Espécie	Parte da planta ou compostos	Modelo/Grupo de estudo	Efeito observado	Referências
Anti-inflamatória	<i>P. cauliflora</i>	Jaboticabina, Cianidina-3-glicosídeo, Delfinidina-3-glicosídeo	Cultura de células do epitélio respiratório (SAE)	Inibição da produção de interleucina-8	Reynertson <i>et al.</i> , 2006
Citotoxicidade em células tumorais	<i>P. cauliflora</i>	Jaboticabina, Cianidina-3-glicosídeo, Delfinidina-3-glicosídeo	Cultura de células tumorais de cólon (HT29, HCT116, SW480)	Efeito citotóxico para as linhagens tumorais testadas	Reynertson <i>et al.</i> , 2006
Antioxidante	<i>M. jaboticaba</i>	Casca liofilizada	Ratos	Aumento da capacidade antioxidante plasmática	Leite <i>et al.</i> , 2011
Antibacteriana e fungicida	<i>P. trunciflora</i>	Óleo essencial das folhas	Bactérias Gran-positivas e leveduras	Redução do crescimento de <i>Streptococcus equi</i> , <i>Staphylococcus epidermidise</i> , <i>Candida albicans</i> e <i>Cryptococcus</i>	Lago <i>et al.</i> , 2011
Antibacteriana	<i>P. cauliflora</i>	Extrato da fruta e das folhas	Linhagens bacterianas	Atividade antibacteriana (<i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella sp.</i> , e <i>Shigella sp.</i>)	Souza-Moreira <i>et al.</i> , 2011
Melhora da resistência à insulina	<i>M. jaboticaba</i>	Casca de jaboticaba liofilizada	Ratos	Aumento do colesterol HDL, redução de insulina plasmática e melhora da resistência à insulina	Lenquiste <i>et al.</i> , 2012
Mutagênica/antimutagênica	<i>P. jaboticaba</i>	Extrato da casca	Células da medula óssea de camundongos	Não mutagênico. Não foi observado efeito antimutagênico	Leite-Legatti <i>et al.</i> , 2012
Antiproliferativa	<i>P. jaboticaba</i>	Extrato polar da casca (etanol 80 %) Extrato apolar da casca (diclorometano)	Cultura de células tumorais de próstata (PC-3) e de leucemia (K-562)	Inibição do crescimento celular. O extrato apolar foi efetivo na linhagem tumoral de próstata (PC-3). Extrato polar foi efetivo em linhagem de leucemia (K-562)	Leite-Legatti <i>et al.</i> , 2012
Antidiabética	<i>P. jaboticaba</i>	Extrato da fruta	Ratos obesos	Inibição de α -amilase e α -glicosidase	Alezandro <i>et al.</i> , 2013

Quadro 1. Principais atividades biológicas relatadas na literatura para as diferentes espécies de jaboticaba. Continuação.

Atividades biológicas	Espécie	Parte da planta ou compostos	Modelo/Grupo de estudo	Efeito observado	Referências
Anti-hiperlipidêmica	<i>M. jaboticaba</i>	Jaboticaba liofilizada	Ratos	Redução de colesterol e triglicerídeos plasmáticos, aumento da atividade antioxidante do plasma, diminuição da peroxidação lipídica no plasma e no cérebro e modulação da atividade de enzimas antioxidantes	Alezandro et al., 2013
Antifúngica	<i>P. cauliflora</i>	Extrato etanólico de folhas	Fungos	A fração rica em tanino de <i>P. cauliflora</i> tem a capacidade de interferir com a camada rica em glicoproteínas externas de <i>C. albicans</i>	Souza-Moreira et al., 2013
Melhora da resistência à insulina	<i>M. jaboticaba</i>	Casca liofilizada	Ratos	Reduziu a resistência à insulina através da melhorando a transdução de sinal através do receptor de insulina	Dragano et al., 2013
Antiproliferativa	<i>M. cauliflora</i>	Extrato aquoso de sementes	Linhagem de carcinoma de células escamosas oral humanas (HSC-3)	Efeito antiproliferativo através da indução de apoptose pela inibição da expressão de proteínas	Wang et al., 2014
Anti-hiperlipidêmica e hepatoprotetora	<i>P. jaboticaba</i>	Farinha de casca	Ratos	Diminuição dos níveis de colesterol total, aumento de colesterol HDL, redução das enzimas AST e ALT, diminuição da esteatose hepática e da peroxidação lipídica no fígado	Lage et al., 2014
Antioxidante e vasodilatadora	<i>M. jaboticaba</i>	Bebidas fermentadas	Aorta isolada de ratos	Apresentou atividade antioxidante e vasodilatadora <i>in vitro</i>	De Sá et al., 2014
Antioxidante <i>in vivo</i>	<i>M. jaboticaba</i>	Casca de jaboticaba liofilizada e extrato aquoso	Ratos obesos	Redução de peroxidação lipídica no soro e no plasma. Aumento de CAT no fígado	Lequiste et al., 2015
Antioxidante e antidepressiva	<i>P. trunciflora</i>	Fruta inteira/ extrato aquoso acidificado	Ratos	No nível comportamental, o extrato reduziu o tempo de imobilidade no teste da suspensão da cauda em ratos	Sacchet et al., 2015

Quadro 1. Principais atividades biológicas relatadas na literatura para as diferentes espécies de jaboticaba. Continuação.

Atividades biológicas	Espécie	Parte da planta ou compostos	Modelo/Grupo de estudo	Efeito observado	Referências
Antioxidante e modulação da atividade mitocondrial	<i>P. trunciflora</i>	Extrato aquoso da casca	Linhagem de fibroblastos humanos (MRC-5)	Atividade antioxidante <i>in vitro</i> . Prevenção de danos oxidativos a lipídeos e modulação da atividade do complexo I da cadeia de transporte de elétrons	Calloni <i>et al.</i> , 2015
Anti-nefropatia	<i>M. cauliflora</i>	Extrato aquoso da fruta inteira	Camundongos	Redução da atrofia glomerular, da deposição de sacarídeos e formação de colágeno IV nos rins de camundongos diabéticos	Wu <i>et al.</i> , 2016
Vasodilatador	<i>M. cauliflora</i>	Extrato hidroalcoólico da fruta sem sementes	Aorta isolada de ratos	Induz vasodilatação através da ativação de canais de K ⁺ e inibição do influxo de Ca ⁺	Andrade <i>et al.</i> , 2016
Antigenotóxico e reparo do DNA	<i>M. cauliflora</i>	Extrato de semente	Camundongos	Efeito antigenotóxico e auxílio no reparo do DNA	Silva <i>et al.</i> , 2016
Melhora da resistência à insulina	<i>M. jaboticaba</i>	Extrato da casca	Humanos	Aumentou a capacidade antioxidante no soro e diminuiu os níveis de glicose e insulina	Plaza <i>et al.</i> , 2016
Anti-hipertensivo	<i>M. cauliflora</i>	Extrato hidroalcoólico de jaboticaba sem sementes	Ratos	Efeito hipotensivo em ratos hipertensivos, através do aumento da viabilidade de óxido nítrico. Atenuou hipertrofia renal e cardíaca	Souza <i>et al.</i> , 2017
Antibacteriana	<i>P. jaboticaba</i>	Casca/ extratos aquoso, metanólico, etanólico e acetona	Linhagens bacterianas	Inibição do crescimento de bactérias pelos extratos metanólicos, etanólicos e acetona	Machado <i>et al.</i> , 2018
Cicatrizante	<i>P. jaboticaba</i>	Casca/ extratos aquoso, metanólico, etanólico e acetona	Ratos	Extrato etanólico apresentou proteção contra inflamação de feridas e auxiliou na cicatrização mais rápida, em ratos	Machado <i>et al.</i> , 2018
Antiobesidade	<i>P. jaboticaba</i>	Extrato da fruta inteira	Camundongos	Proteção contra o ganho de peso impedindo o crescimento do tecido adiposo. Atenuação da hiperglicemia e hiperinsulinemia	Moura <i>et al.</i> , 2018
Modulação da microbiota intestinal	<i>P. jaboticaba</i>	Extrato aquoso de casca	Ratos	O extrato alterou a microbiota intestinal, aumentando desde a contagem de <i>Lactobacillus</i> , <i>Bifidobacterium</i> e <i>Enterobacteriaceae</i>	Da Silva-Maia <i>et al.</i> , 2018

3. OBJETIVO GERAL

Avaliar a composição química e os efeitos do extrato aquoso de casca de jabuticaba (*Plinia trunciflora* (O. Berg) Kausel) sobre marcadores metabólicos, hematológicos, função mitocondrial e estresse oxidativo em modelo *in vivo* de diabetes induzido por estreptozotocina.

3.1.OBJETIVOS ESPECÍFICOS

3.1.1.Determinar a composição química do extrato aquoso de casca de jabuticaba (*Plinia trunciflora* (O. Berg) Kausel);

3.1.2.Avaliar os efeitos do extrato de *P. trunciflora* sobre glicemia e perfil lipídico (colesterol total, HDL e não-HDL e triglicerídeos) em ratos saudáveis e diabéticos induzidos por estreptozotocina;

3.1.3.Analisar a função hepática, através da determinação dos níveis séricos das enzimas hepáticas AST e ALT, dos ratos saudáveis e diabéticos induzidos por estreptozotocina após o tratamento extrato de *P. trunciflora*;

3.1.4.Avaliar a função renal, através da determinação dos níveis séricos de ureia e creatinina, em ratos saudáveis e diabéticos induzido por estreptozotocina após o tratamento com extrato de *P. trunciflora*;

3.1.5.Determinar os efeitos do extrato de *P. trunciflora* sobre o perfil hematológico (contagem de células sanguíneas) em ratos saudáveis e diabéticos induzidos por estreptozotocina;

3.1.6.Quantificar os níveis de danos oxidativos a lipídios e a proteínas no soro e no fígado dos ratos saudáveis e diabéticos induzido por estreptozotocina após o tratamento com extrato de *P. trunciflora*;

3.1.7. Mensurar a atividade dos complexos I, II, III e IV da cadeia de transporte de elétrons no fígado dos ratos saudáveis e diabéticos induzidos por estreptozotocina após o tratamento com extrato de *P. trunciflora*;

3.1.8. Avaliar a atividade das enzimas antioxidantes, superóxido dismutase e catalase, no soro e no fígado dos ratos saudáveis e diabéticos induzido por estreptozotocina após o tratamento com extrato aquoso de casca de *P. trunciflora*;

3.1.9. Determinar a capacidade antioxidante total do soro dos ratos saudáveis e diabéticos induzidos por estreptozotocina após o tratamento com extrato aquoso de casca de *P. trunciflora*.

3.1.10. Avaliar a expressão da proteína SIRT3 no fígado dos ratos saudáveis e diabéticos induzidos por estreptozotocina após o tratamento com extrato aquoso de casca de *P. trunciflora*.

4. RESULTADOS

Os resultados desta tese estão apresentados na forma de dois artigos científicos, os quais serão submetidos para publicação a revistas científicas internacionais:

ARTIGO 1: Jabuticaba (*Plinia trunciflora* (O. Berg) Kausel) improves the lipid profile and immune system and reduces oxidative stress of streptozotocin-induced diabetic rats.

ARTIGO 2: Jabuticaba (*Plinia trunciflora* (O. Berg) Kausel) protects liver of diabetic rats against mitochondrial dysfunction and oxidative stress through the modulation of SIRT3 expression.

4.1. Artigo 1

Jabuticaba (*Plinia trunciflora* (O. Berg) Kausel) improves the lipid profile and immune system and reduces oxidative stress of streptozotocin-induced diabetic rats

Caroline Calloni^a, Luana Soares Martines^a, Daniela Gil^a, Douglas Machado^a, Pauline Fagundes Rosales^b, Fabiana Agostini^b, Sidnei Moura e Silva^b, Matheus Parmegiani Jahn^c, Mirian Salvador^{a*}

^aLaboratório de Estresse Oxidativo e Antioxidantes, Instituto de Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul (UCS), 95070-560, Caxias do Sul-RS, Brazil.

^bLaboratório de Produtos Naturais e Sintéticos, Instituto de Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul (UCS), 95070-560, Caxias do Sul-RS, Brazil.

^cLaboratório de Fisiologia e Farmacologia, Universidade de Caxias do Sul (UCS), 95070-560, Caxias do Sul-RS, Brazil.

*Corresponding author: Laboratório de Estresse Oxidativo e Antioxidantes (Bloco 38), Instituto de Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul. Rua Francisco Getúlio Vargas, 1130. CEP: 95070-560. Caxias do Sul-RS, Brasil.

Telephone: +55 54 32182105. E-mail address: msalvado@ucs.br

Abstract

Chronic hyperglycemia may lead to oxidative stress, which plays an important role in the pathogenesis of diabetes mellitus (DM) complications. Studies have shown the ability of phenolic compounds to prevent oxidative stress and, in this way, prevent damage caused by DM. Jabuticaba (*Plinia trunciflora*) is a native fruit of Brazil, it is rich in phenolic compounds, which are concentrated mainly on the peel. In this study, the effect of jabuticaba peel extract (JPE - 0.5 g/kg) on serum lipid levels, immune system and oxidative stress parameters of streptozotocin-induced diabetic rats were evaluated. The administration of JPE for 30 days was able to reduce total cholesterol (25 %), triglycerides (50 %) and non-HDL cholesterol levels (40 %) in diabetic rats. JPE showed ability to inhibit the enzyme pancreatic lipase. Furthermore, JPE induced increase in HDL cholesterol levels in both healthy (20 %) and DM rats (17 %). The induction of DM led to a deregulation of the antioxidant enzymes, superoxide dismutase and catalase, and JPE was able to modulate these enzymes, in addition to increasing the total antioxidant capacity of the serum. Additionally to modulating antioxidant defenses, JPE was able to decrease oxidative damage to lipids and proteins. Furthermore, DM led to a significant reduction in the number of lymphocytes and leukocytes, and JPE supplementation was able to restore the normal level of these cells, modulating the immune system of the animals. Thus, these findings demonstrate the potential of the JPE to be used with a coadjuvant treatment option in the complications of DM.

Key words: *Plinia trunciflora*, oxidative stress, lipids, immune system, phenolic compounds.

1. Introduction

Diabetes Mellitus (DM) has become a worldwide epidemic, with prevalence increasing in recent decades. According to data from the International Diabetes Federation (2017) [1], the prevalence of global DM doubled in 15 years, and in 2015 there were about 415 million (8.8 %) of people with DM worldwide. The projections indicate an increase of 10.4 % in 2040, which means that there will be about 642 million people with DM in the world. In this way, DM becomes a public health problem, generating large expenditures for global public health [2] [3].

DM is defined as a group of metabolic diseases characterized by the presence of high blood glucose levels as a result of problems in insulin production, insulin use, or both. Within this group of diseases, those with the highest prevalence in the population include type 1 and type 2 diabetes [2] [4] [5] [6].

Regardless of the type of diabetes, long term hyperglycemia is a common factor that can trigger cellular damage and consequently complications, especially in those cells that are continually exposed to high blood glucose levels, such as endothelial cells [7] [8]. DM complications include micro and macrovascular damage. Microvascular complications consist of retinopathy, nephropathy and neuropathy. Macrovascular complications include cardiovascular diseases such as atherosclerosis, heart attacks, strokes and insufficiency in blood flow to legs [9]. In addition, lipid metabolism disorders are frequently observed in diabetic patients, with an increase in triglycerides (TG), total cholesterol (TC) and LDL cholesterol (LDL-c) levels, which contributes to the risk of macrovascular complications [10]. Furthermore, among the complications of diabetes, it is also possible to mention changes in the immune system due to hyperglycemia, which leads to immunosuppression and an increased risk of infections [11] [12] [13] [14].

Nowadays, evidence have been reported that support the role of oxidative stress in the pathogenesis of diabetes complications. It is believed that in the onset and progression of late diabetic complication, free radicals have got a major role due to their ability to damage lipids, proteins and DNA [15]. In this context, the number of studies investigating the ability of phenolic compounds to prevent or decrease the complications of DM has increased, mostly due to the capacity of these compounds in reducing the damage caused by oxidative stress. Studies have shown that phenolic compounds, such as anthocyanins and flavonoids, have the ability to decrease cardiac function complications through the regulation of lipid metabolism, attenuation of oxidative damage, improvement of the endothelial function and vascular tone [16] [17], in addition to reduction of oxidative damage to the retina [18], liver and kidneys [19].

The jabuticabeiras (*Plinia* sp.) are plants native to Brazil, which belong to the Myrtaceae family. Among the known species of jabuticabeiras, three main species are naturally distributed and are grown in Brazil, being *Plinia trunciflora*, *Plinia cauliflora* and *Plinia jabotiaba*. The fruits of these species grow directly on the trunk and main branches of the tree, and when ripe, they have a purple peel and white pulp with bittersweet taste and gelatinous texture. Jabuticaba is consumed in the in natura form, however, being very perishable, it is usually used in the manufacture of jellies, juices, wines, liqueurs and vinegars [20]. In traditional medicine, *P. cauliflora* peel tea has been reported for the treatment of diseases such as asthma, angina, dysentery, and cutaneous infections [21]. Among the three species of jabuticaba, few studies have focused on the investigation of the biological activities and chemical composition of *Plinia trunciflora*. The biological activities already studied are antidepressant capacity in Swiss male mice and antioxidant activity in vitro [22] [23]. Considering that there are few studies using *P. trunciflora* and the need for alternative therapies for frequent complications of diabetes,

this study aimed to investigate the effect of the aqueous peel extract of *Plinia trunciflora* on metabolic, hematological and oxidative stress parameters in streptozotocin-induced diabetic rats.

2. Material and Methods

2.1. Chemicals

Biochemistry Kits (Gold Analisa Diagnóstico Ltda.): alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase, high density lipoprotein cholesterol (HDL), total cholesterol, glucose, urea, creatinine and tryglycerides. Streptozotocin (STZ), dinitrophenylhydrazine (DNPH), thiobarbituric acid (TBA), trichloroacetic acid (TCA), hydrolyzed 1,1,3,3-tetramethoxypropane (TMP), Trolox, ABTS•+ (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid), hydrogen peroxide (H₂O₂) were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). All the chemicals were of analytical grade.

2.2. Plant Material and Extract Preparation

Jaboticaba (*P. trunciflora*) fruits were collected in Caxias do Sul (29°10'55.31"S; 51°12'9.70"O) and Veranópolis (28°56'26.00"S; 51°32'35.11"O), Rio Grande do Sul, Brazil, in 2017. Voucher specimens were identified by the herbarium of the University of Caxias do Sul, RS (HUCS40706). In addition, access authorization (A1009E) was obtained from the National Genetic Patrimony Management System (SISGEN), and collection authorization (n° 38096-3) from the Biodiversity Authorization and Information System (SISBIO). The extract preparation was performed as described by Calloni et al. (2015) [23]. Briefly, peel was manually separated from pulp and seeds. The pulp and seeds were discarded. For the extract preparation, the peels were ground in a

Wiley mill and then mixed with distilled water (5 % w/v) and extracted under reflux (100 °C) for 15 min. Subsequently, the extract was filtered on filter paper and jabuticaba peel extract (JPE) was lyophilized (LIOBRAS model L-101) and stored at -80 °C until the tests.

2.3. Animals

All the procedures performed were in accordance with the CONCEA (National Council for Control of Animal Experimentation) and SBCAL (Brazilian Society of Science in Laboratory Animals) and the experimental protocol were approved by the Ethics Committee for Animals Research of the University of Caxias do Sul (001/2017). Twenty-four male Wistar rats weighing about 355.85 ± 36 g were obtained from Center for Reproduction and Experimentation of Laboratory Animals of the Federal University of Rio Grande do Sul. The animals were housed in plastic cages (three animals in each), received water and pelleted food *ad libitum* and kept under standard laboratory conditions of temperature (23 ± 2 °C) and 12 h light-dark cycle in the Laboratory of Physiology and Pharmacology of the University of Caxias do Sul.

2.4. Diabetes Induction

Diabetes mellitus induction was performed by an intraperitoneal streptozotocin injection (STZ, Sigma Chemical Company) in a 65 mg/kg dose [24]. The STZ was diluted in sodium citrate buffer (0.01 mol/L - pH 4.5) and citric acid (0.01 mol/L - pH 4.5) and injected soon after dilution. Control animals received the same volume of buffer (2 mL/kg). After 72 hours, glycemia was measured with an ACCU-CHEK glycosimeter and rats with blood glucose levels above 200 mg/dL were considered diabetic [25] [26].

2.5. Experimental Design and Samples

For the JPE administration, the lyophilized extract was dissolved in water and was administrated once a day by gavage, for 30 days. After de DM induction, the animals were divided into four groups, as follow: *Control group* ($n = 6$): animals receiving water; *JPE group* ($n = 6$): animals receiving JPE (0.5 g/kg); *DM group* ($n = 5$): diabetic animals receiving water; *DM + JPE group* ($n = 6$): diabetic animals receiving JPE (0.5 g/kg). Animals were weighed every week and dose of JPE (0.5 g/kg) was adjusted considering the current weight of each animal. At the end of treatments, there was loss of one mouse from the DM group.

After the treatments, fasted animals were euthanized by decapitation. The truncal blood of the rats was collected in specific test tubes to determine biochemical and oxidative stress parameters (blood without anticoagulant) and hematological profile (blood with anticoagulant EDTA). In the blood collected for the biochemical and oxidative stress evaluation, serum and formed elements separation was performed by centrifugation (Routine Centrifuge 420R, Hettich, Germany) at $3000 \times g$ for 10 minutes. Serum was frozen at -80°C for further analysis.

2.6. Biochemical Analysis

The concentration of glucose, TC, TG, HDL-cholesterol (HDLc), urea, creatinine, and the hepatic enzymes alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) were determined by using commercial kits (Gold Analisa Diagnóstico Ltda.) in Mindray BS-120 automatic biochemical analyzer. Non-HDL cholesterol levels were determined by calculating the difference between total cholesterol and HDLc content. Results of glucose, TC, TG, HDLc, non-HDLc, urea and creatinine are expressed as mg/dL. Results of hepatic enzymes are expressed as U/L.

2.7. Pancreatic Lipase Inhibition

In order to explain the effect of the JPE on the decrease of serum triglycerides, the inhibition capacity of the JPE on the pancreatic lipase was evaluated. For this, it was used lipase Liquiform kit (LabTest) with some adaptations. Briefly, the reagent 1 (containing buffer, colipase, activator, surfactant and sodium azide) was added to a cuvette with lipase solution (lipase from porcine pancreas - Sigma) and different concentrations of JPE (5, 10, 25 and 50mg/mL). The reaction was initiated by adding reagent 2 (containing buffer, 1-2-O-dilauryl-rac-glycerol-3-glutaric acid (6-methylresorufin) ester, surfactant and sodium azide) and the spectrophotometric reading was started immediately at 570 nm. Two values of absorbance were obtained at two different times, 80 and 190 min. The results are expressed as IC₅₀, i.e., the amount of JPE required to inhibit 50 % of pancreatic lipase.

2.8. Hematological Profile

The hematological profile was evaluated by counting the number of erythrocytes, platelets, total leukocytes, granulocytes, monocytes and lymphocytes. The analyzes were performed using the Mindray Hematology Analyzer (BC-2800 VET). The results are expressed as number of cells per microliter.

2.9. Oxidative Damage Parameters

Oxidative damage was measured in serum lipid and proteins. Lipoperoxidation were evaluated through the measurement of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), which is based on the colorimetric reaction of malondialdehyde (MDA) and other aldehydes, the final products of lipoperoxidation [27]. Results are expressed as nmol of MDA/mg of protein. Oxidative damage to proteins was measured by determination of

the carbonyl group by a reaction with dinitrophenylhydrazine (DNPH), according to Levine *et al.* (1990) [28]. DNPH reacts with protein carbonyls to form hydrazones that can be measured spectrophotometrically. The results were expressed as nmol of DNPH/mg of protein. The determination of the total proteins was performed by the Bradford method [29].

2.10. Antioxidant enzymes

The activity of the antioxidant enzymes Superoxide Dismutase (SOD) and Catalase (CAT) were determined in rat serum. SOD activity was determined by measuring the inhibition of self-catalytic adrenochrome formation rate at 480 nm. Results are expressed as USOD (units of SOD)/mg of protein. One unit is defined as the amount of enzyme that inhibits the rate of adrenochrome formation in 50 % [30]. CAT activity was measured according to the methods described by Aebi (1984) [31]. The assay measures the decomposition rate of H_2O_2 at 240 nm. Results are expressed as mmol H_2O_2 /min/mg protein. All absorbances were measured in spectrophotometer (SHIMADZU, model UV-1700).

2.11. Serum Antioxidant Capacity

The antioxidant capacity of the serum was evaluated through the Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC), which evaluates the sample ability to scavenge the ABTS radical [32]. For the assay, serum sample was added to the $ABTS^{•+}$ solution and the absorbance was read exactly 6 min after the initial mixing. A calibration curve with different concentrations of Trolox (0.5 to 2.5 mM) was built. The results were expressed as mM of Trolox equivalents.

2.12. Statistical Analysis

Data were determined to be parametrical or non-parametrical by using the Shapiro-Wilk test. Parametric data are presented as mean and standard error and it were submitted to one-way analysis of variance (ANOVA) with Tukey post-hoc test or Student's t-test. Non-parametric data are presented as median and interquartile range and it were submitted to statistical analysis using the Kruskal Wallis test. A statistical significance of $p < 0.05$ was considered. The software SPSS 22.0 (SPSS Inc., Chicago, IL) was used for all the statistical analysis.

3. Results

As expected, the animals in DM group, which received intraperitoneal STZ injection, showed a significant increase in serum glucose levels. The treatment of diabetic rats with the JPE did not changed serum glucose levels. Besides, no alteration was observed in serum glucose levels in healthy rats receiving JPE, which maintained the same levels as control animals (Figure 1).

Disturbance in lipid profile are often observed in DM. Therefore, to assess the lipid profile of the rats, serum levels of TC, HDLc, non-HDL cholesterol and TG were determined. As expected, TC and TG levels were significantly increased in the DM group. The treatment with the JPE for 30 days was able to significantly reduce TC and TG levels by 25 % and 50 %, respectively. No changes were observed in the levels of both biomarkers in the healthy rats that received the JPE (Figure 2 A and B). In addition to the ability to reduce levels of TC and TG, it was possible to observe that treatment with the JPE was able to induce a significant increase of HDLc levels, of about 20 % and 17 %, in both healthy and diabetic rats, respectively (Figure 2 C). The levels of non-HDL cholesterol, which corresponds to the sum of all atherogenic lipoproteins, including

IDL and LDL, were significantly increased in DM group animals and the daily administration of the JPE for 30 days caused the decrease in these values in about 40 %. The administration of the JPE to the healthy animals did not modify the levels of this parameter (Figure 2 D).

For the assessment of hepatic function, serum levels of AST and ALT enzymes were determined. In the healthy animals that received the JPE, no change in the levels of both enzymes was observed, which may demonstrate that the JPE is not hepatotoxic (Figure 3 A and B). On the other hand, in the DM group, a significant increase in the levels of the ALT enzyme was observed and the treatment with the JPE did not altered the levels of this biomarker (Figure 3 A). Meanwhile, a different behavior was observed for the AST enzyme, which had no alteration in the DM group nor in the DM group treated with JPE (Figure 3 B).

Renal function, which is frequently altered in DM, was also assessed through serum urea and creatinine levels. It was possible to observe that urea levels showed a significant increase in DM group. The treatment of the diabetic rats with the JPE did not alter the levels of this biomarker. Moreover, the levels of urea in the healthy rats treated with the JPE were not altered, maintaining the same levels of the control group (Figure 3C). The creatinine levels were not altered between the treatment groups (Figure 5 D).

To investigate a possible mechanism involved in the reduction of serum lipids, the ability of the JPE to inhibit pancreatic lipase enzyme activity was evaluated. It was observed that the JPE was able to inhibit the activity of the enzyme, presenting an IC_{50} of $1,70 \pm 0,18$ %.

The evaluation of hematological parameters in rats' blood demonstrated that induction of DM led to a significant reduction in the number of total lymphocytes and leukocytes, which could make the animals more susceptible to infections. Interestingly,

the number of total lymphocytes and leukocytes was restored to baseline number when diabetic animals received the JPE. The other hematological parameters were not modified between the different treatments (Table 1).

It has been demonstrated that cells exposed to high doses of glucose present increased oxidative damage. Lipid peroxidation and protein carbonylation are two important oxidative stress biomarkers. It was observed that oxidative damage to lipids and proteins induced by hyperglycemia in DM group were significantly reduced by the supplementation of the JPE, with a decrease of 30% in lipid peroxidation and 60 % in oxidative damage to proteins. (Figure 4 A and B).

Oxidative damage to biomolecules may be the result of a deregulation of antioxidant defenses, thus, the activity of antioxidant enzymes SOD and CAT were evaluated. It was observed that DM induced a deregulation of antioxidant defenses, with SOD activity increased in the DM group and, inversely, CAT activity was decreased in the same group. On the other hand, treatment with the JPE was able to modulate the activities of antioxidant enzymes, leading to a decrease in SOD activity and an increase in CAT activity (Figure 5A and B). In addition, diabetic rats showed a significant reduction of about 60 % in total serum antioxidant capacity and this reduction was attenuated by JPE supplementation, with an increase of 40 %. Additionally, healthy rats that received JPE also showed a significant increase of about 20 % in the total serum antioxidant capacity (Figure 5C).

4. Discussion

Plant extracts have been extensively studied for their biological activities and their potential for the development of new drugs for the treatment of diseases [33]. In this con-

text, jabuticaba appears as a promising fruit, which is rich in phenolic compounds, found mainly in the peel [34] [35]. Among the biological activities already studied for phenolic compounds in *P. trunciflora*, its effect on the immune system, metabolic profile and oxidative damage in diabetes model has not been investigated. Thus, this study was performed to evaluate the effect of JPE on the metabolic and hematological profile and on the parameters of oxidative stress of diabetic rats.

DM was induced in rats by the administration of intraperitoneal injection of STZ. Structurally, STZ is an analog of glucose and N-acetyl nitrosamine, in this way, this causes it to be actively absorbed by the pancreatic β cells through the glucose transporters 2 and it causes β -cell death [36] [37]. As expected, the results demonstrated that there was a significant increase in glycemia in the rats that received the STZ injection. Diabetic rats receiving JPE presented the same glycemic levels as the DM group rats. It is important to note that because the damage caused by STZ in β -pancreatic cells is quite extensive, it is very difficult for any substance to reverse the cell death caused by it.

The liver is among the primary organs susceptible to the effects of insulin deficiency and consequent hyperglycemia and oxidative stress. Among the complications related to diabetes, liver damage is among the most common [38] [39]. In insulin deficiency there is stimulation of lipolysis and an increase of the mobilization of peripheral free fatty acids, and their increased hepatic uptake enhances very low-density lipoprotein and triglycerides synthesis. Therefore, an increased hepatic production of triglyceride is the main causes of hepatic steatosis in type 1 diabetes (DM1) [38]. In this study, to evaluate liver damage, the levels of enzymes AST and ALT were determined. Elevated serum levels of ALT are an indicator of hepatocellular damage and have been used as a marker of non-alcoholic hepatic steatosis, which has a high prevalence in DM1

[40]. AST is usually used together with ALT for detection of hepatic damage. The results of this study demonstrated that ALT levels were increased in the DM groups and the treatment of this group with JPE did not cause alteration at these levels. On the other hand, no change in AST enzyme levels was observed either in the DM group or in the DM group receiving JPE. The magnitude of ALT elevation is generally higher than AST due to hepatocellular injury because of the longer half-life of ALT and the larger fraction of AST bound to mitochondria, which may possibly explain the results found in our study [41]. No change was observed in the AST and ALT levels of the healthy rats that received the JPE, which indicates that the JPE is not hepatotoxic.

In addition to liver damage, DM is the most common cause of kidney failure. Even when diabetes is controlled, the disease can lead to chronic kidney disease and kidney failure [42] [43]. Simple tests for determination of urea and serum creatinine can be used to monitor renal function, since during renal disease these substances are not adequately excreted and accumulate in the blood. In this study it was observed that urea levels were increased in 33 % in the diabetic rats, indicating a possible renal damage. JPE supplementation did not decrease urea levels in diabetic animals. On the other hand, creatinine levels were normal in diabetic rats. Considering that creatinine levels are directly related to the amount of muscle mass and there is a significant loss of muscle mass in untreated DM1, the decrease in muscle mass of the rats may have led to lower creatinine formation [44]. Additionally, the duration of DM may also influence the creatinine levels, and 30 days could be a short time to induce significant renal damage that could lead to altered creatinine levels.

Insulin is a central hormone in the control of lipid metabolism, since it is known to induce the storage of TG in adipose tissue and, consequently, decreases the secretion of free fatty acids from adipose tissue to plasm. Furthermore, it promotes the removal of

LDL cholesterol from the circulation by increasing the expression and activity of LDL receptors [10]. In this context, insulin deficiency of DM1 causes a deregulation of lipid metabolism, leading to reduced lipoprotein lipase activity at the luminal surface of the capillary endothelial cells causing triglyceride-rich lipoproteins (chylomicrons, VLDLs) to increase, leading to hypertriglyceridemia [10]. In addition, untreated DM1 exhibits increased influx of free fatty acids from adipose tissue to the blood. In fact, in this study diabetic animals presented alterations in serum lipid levels, with an increase in both TC and non-HDLc and TG levels. When diabetic animals received JPE, it was observed that there was a significant reduction in TC (25 %) and non-HDLc (40 %) levels as well as TG levels (50 %). The reduction of TG levels induced by JPE is similar to that observed in drugs used in conventional treatments, such as fibrates, which reduce serum TG rates from 30 to 60% [45]. In addition, a study by Sheng et al (2012) [46] has shown that the use of statins in diabetic patients reduces TC levels by 20-28 %, which are similar to those presented by the JPE. Several studies have been investigating and trying to understand the mechanisms involved in the ability of phenolic compounds to reduce serum lipids. A study by Nekohashi et al. (2014) [47] suggests that phenolic compounds like luteolin and quercetin lower plasma cholesterol levels by inhibiting the intestinal cholesterol transporter NPC1L1. In addition, studies have demonstrated the ability of phenolic compounds, such as anthocyanins, to regulate the expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR), a group of nuclear hormone receptors, related to the transcription of genes involved in maintaining adequate lipid and glucose metabolism [48]. Furthermore, studies with phenolic compounds-rich extracts, such as grape seed extract, apple extract, cacao, cranberry and avocado extracts, have demonstrated that these compounds are capable of inhibiting lipid digestion enzymes, such as pancreatic

lipase [49], phospholipase A2 [50], pancreatic cholesterol esterase and thus decrease the absorption of these lipid in the intestine [51]. In this study, we also demonstrated that JPE is able to inhibit the pancreatic lipase enzyme, which may be involved, at least in part, in the reduction of triglyceride levels.

In this study, a significant reduction in the total number of leukocytes and in the number of lymphocytes was also observed in DM rats. Studies have shown that chronic hyperglycemia combined with ketosis or acidosis reduces lymphocyte proliferation by having suppressed stimulation response and increasing oxidative stress and apoptosis in these cells [13] [14] [52]. In addition, researches have been demonstrating defects of diabetic patients neutrophil chemotactic, phagocytic and microbicidal activities [12] [52]. Together, these changes in the immune system can lead to increased susceptibility to infections. In fact, several studies have demonstrated that patients with diabetes present a higher occurrence of common infections when compared to non-diabetic patients, such as cystitis, pneumonia, tuberculosis, skin and mucosal infections [11] [53] [54] [55][56]. This study demonstrated for the first time that when diabetic rats were treated for 30 days with JPE, it was observed that JPE had the potential to prevent the decrease in both lymphocytes and total leukocytes. This effect can be attributed to the phenolic compounds present in JPE, since studies have shown that these compounds have the ability to modulate the immune system [57]. In a study by Karasawa et al. (2011) [58] was shown that date extract supplemented in mice for 30 days induced an increase of immunocompetent cells, including T lymphocytes, natural killer cells, macrophages and dendritic cells in Peyer's patch and spleen. In another study by John et al. (2011) [59], it was shown that phenolic compounds of *Cassia auriculata* improved proliferation of T lymphocytes in aged rats.

Several studies have demonstrated the presence of oxidative stress in DM and it is suggested that oxidative stress is involved both in the pathogenesis and in the development of complications of the disease [7] [60] [61] [62]. In fact, in this study it was observed that diabetic rats showed a significant increase of two important biomarkers of oxidative damage, lipid peroxidation and protein carbonylation. The increase in serum glucose, during DM, may result in the release of large amount of reactive oxygen species (ROS). The main source of ROS generation in DM is the mitochondria, during oxidative phosphorylation. Studies have hypothesized that during hyperglycemia, a large amount of substrate is available leading to an increase in the activity of the electron transport chain, leading, in turn, to an increase in the generation of ROS [7]. Concomitant to the increase in lipid peroxidation and carbonylation of proteins, it was observed a decrease in the total antioxidant capacity of the serum of diabetic rats, an important biomarker of oxidative stress since it defines the synergistic effect between the various antioxidant compounds in the sample. The reduction of the total antioxidant capacity of the serum observed could be explained by a higher requirement of these antioxidant defenses to restore ROS homeostasis lost during DM [63]. In addition, enzymatic antioxidant defenses, SOD and CAT, were deregulated, with SOD activity being increased and CAT being decreased in the DM group. Increased SOD activity may be a compensatory mechanism in response to prolonged mitochondrial superoxide anion overproduction [64] [65]. The increase in the activity of the SOD enzyme leads to an increase in hydrogen peroxide (H_2O_2) production, which in turn can be converted to H_2O and O_2 by the CAT enzyme. An overproduction of H_2O_2 in addition to CAT's ability to metabolize can cause damage to this enzyme, leading to a decrease in its activity [66]. Omotayo et al., (2010) [66] observed similar behavior of the antioxidant enzymes SOD and CAT in diabetic rats induced by streptozotocin.

Supplementation of JPE in DM group rats was able to significantly increase the total antioxidant capacity of serum and regulate the activity of antioxidant enzymes, leading to a decrease in SOD activity and an increase in CAT activity and, therefore, decreasing oxidative damage to lipids and proteins. Studies with other species of jaboticaba also investigated the ability of this fruit to reduce oxidative damage. Alezandro et al. (2013) [67] demonstrated that serum lipid peroxidation was reduced in streptozotocin induced diabetic rats that received, for 40 days, freeze-dried jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba*) only at a concentration of 2 g/kg. It is important to note that the concentration used in the aforementioned study was 4 times higher than that used in the present study (0.5 g/kg), demonstrating that low concentrations also have significant biological effects. This demonstrates the importance of studying the different species of jaboticaba.

Some studies have shown that even after glycemic control, oxidative stress continues to occur in diabetic patients, and this can be explained in part because a metabolic memory occurs, that is, the oxidative modification of proteins and lipids leads to the propagation of stress oxidative [68] [69] [70] [71] [72]. Thus, even after regulation of serum glucose levels, oxidative stress continues to occur. Therefore, the phenolic compounds present in JPE become a possible alternative of adjuvant treatment to reduce the levels of oxidative stress, to restore immune system and modulate lipid levels in diabetic patients, and, in this way, to avoid related complications.

5. Conclusion

The results presented in this study demonstrated that the supplementation of 0.5 g/kg of JPE during 30 days was able to regulate lipid profile, restore the immune system and modulate the antioxidant defenses, leading to reduction in the oxidative damage in

diabetic rats. These results support the potential of JPE as a possible alternative for adjuvant DM treatment, minimizing disease-related complications. Even so, further studies are needed to better understand the mechanisms related to the health benefits of the JPE.

6. References

- [1] “IDF Diabetes Atlas.” . 7th ed. Brussels, Belgium: International Diabetes Federation, Brussels, Belgium; 2015.
- [2] W. Fan, “Epidemiology in diabetes mellitus and cardiovascular disease,” *Cardiovasc. Endocrinol.*, vol. 6, no. 1, pp. 27–32, 2017.
- [3] D. N. Koye, D. J. Magliano, R. G. Nelson, and M. E. Pavkov, “The Global Epidemiology of Diabetes and Kidney Disease,” *Adv. Chronic Kidney Dis.*, vol. 25, no. 2, pp. 121–132, 2017.
- [4] M. A. Atkinson, G. S. Eisenbarth, and A. W. Michels, “Type 1 diabetes,” *Lancet*, vol. 383, no. 9911, pp. 69–82, 2014.
- [5] A. B. Olokoba, O. A. Obateru, and L. B. Olokoba, “Type 2 diabetes mellitus: A review of current trends,” *Oman Medical Journal*, vol. 27, no. 4, pp. 269–273, 2012.
- [6] S. E. Kahn, M. E. Cooper, and S. Del Prato, “Pathophysiology and treatment of type 2 diabetes: perspectives on the past, present and future,” *Lancet*, vol. 383, no. 9922, pp. 1068–1083, 2015.
- [7] A. Ullah, A. Khan, and I. Khan, “Diabetes mellitus and oxidative stress — A concise review,” *Saudi Pharm. J.*, vol. 24, no. 5, pp. 547–553, 2016.
- [8] M. Lunder, M. Janic, and M. Sabovic, “Prevention of vascular complications in diabetes mellitus patients: focus on the arterial wall,” *Current Vascular Pharmacology*, vol. 16, pp. 5–15, 2018.
- [9] A. Chawla, R. Chawla, and S. Jaggi, “Microvascular and macrovascular complications in diabetes mellitus: Distinct or continuum?,” *Indian J. Endocrinol. Metab.*, vol. 20, no. 4, p. 546, 2016.
- [10] B. Vergès, “Pathophysiology of diabetic dyslipidaemia: where are we?,” *Diabetologia*, vol. 58, no. 5, pp. 886–899, 2015.
- [11] L. M. A. J. Muller *et al.*, “Increased Risk of Common Infections in Patients with Type 1 and Type 2 Diabetes Mellitus,” *Clin. Infect. Dis.*, vol. 41, no. 3, pp. 281–288, 2005.
- [12] T. C. Alba-Loureiro *et al.*, “Neutrophil function and metabolism in individuals with diabetes mellitus,” *Brazilian J. Med. Biol. Res.*, vol. 40, pp. 1037–1044, 2007.

- [13] R. Rubinstein, A. M. Genaro, A. Motta, G. Cremaschi, and M. R. Wald, “Impaired immune responses in streptozotocin-induced type I diabetes in mice. Involvement of high glucose,” *Clin. Exp. Immunol.*, vol. 154, no. 2, pp. 235–246, 2008.
- [14] Y. D. Muller *et al.*, “Immunosuppressive Effects of Streptozotocin-Induced Diabetes Result in Absolute Lymphopenia and a Relative Increase of T-Regulatory Cells,” *Diabetes*, vol. 60, no. 9, pp. 2331–2340, 2011.
- [15] D. Ziegler, S. Buchholz, C. Sohr, and J. N. M. Roden, “Oxidative stress predicts progression of peripheral and cardiac autonomic nerve dysfunction over 6 years in diabetic patients,” *Acta Diabetol.*, vol. 52, no. 1, pp. 65–72, 2015.
- [16] B. Tugcu, S. A. Nacaroglu, A. Gedikbasi, M. Uhri, N. Acar, and H. Ozdemir, “Protective effect of pomegranate juice on retinal oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats,” *Int J Ophthalmol.*, vol. 10, no. 11, pp. 1662–1668, 2017.
- [17] Y. Chen *et al.*, “Purple rice anthocyanin extract protects cardiac function in STZ-induced diabetes rat hearts by inhibiting cardiac hypertrophy and fibrosis,” *J. Nutr. Biochem.*, vol. 31, pp. 98–105, 2016.
- [18] Y. Song, L. Huang, and J. Yu, “Effects of blueberry anthocyanins on retinal oxidative stress and in inflammation in diabetes through Nrf2 / HO-1 signaling,” *J. Neuroimmunol.*, vol. 301, pp. 1–6, 2016.
- [19] H. Iskender, E. Dokumacioglu, T. Mazlum, and I. Ince, “The effect of hesperidin and quercetin on oxidative stress , NF- k B and SIRT1 levels in a STZ-induced experimental diabetes model,” *Biomed. Pharmacother.*, vol. 90, pp. 500–508, 2017.
- [20] I. Citadin, M. A. Danner, and S. A. Z. Sasso, “Jaboticabeiras,” *Rev. Bras. Frutic.*, vol. 32, no. 2, pp. 857–1166, 2007.
- [21] J. F. Morton, *Jaboticabas. In: Fruits of warm climates*. Miami, FL, 1987.
- [22] C. Sacchet *et al.*, “Antidepressant-Like and Antioxidant Effects of *Plinia trunciflora* in Mice,” *Evidence-based Complement. Altern. Med.*, vol. 2015, pp. 1–9, 2015.
- [23] C. Calloni, R. D. Agnol, L. S. Martínez, F. de Siqueira Marcon, S. Moura, and M. Salvador, “Jaboticaba (*Plinia trunciflora* (O. Berg) Kausel) fruit reduces oxidative stress in human fibroblasts cells (MRC-5),” *Food Res. Int.*, vol. 70, pp. 15–22, Apr. 2015.
- [24] B. L. Furman, “Streptozotocin-Induced Diabetic Models in Mice and Rats,” *Curr. Protoc. Pharmacol.*, vol. 70, p. 5.47.1-5.47.20, 2015.
- [25] A. L. Al-Malki and H. A. El Rabey, “The Antidiabetic Effect of Low Doses of *Moringa oleifera* Lam. Seeds on Streptozotocin Induced Diabetes and Diabetic Nephropathy in Male Rats,” *Biomed Res. Int.*, vol. 2015, pp. 1–13, 2015.
- [26] M. Radenković, M. Stojanović, and M. Prostran, “Experimental diabetes induced by alloxan and streptozotocin: The current state of the art,” *J. Pharmacol. Toxicol. Methods*, vol. 78, pp. 13–31, 2016.
- [27] E. D. Wills, “Mechanisms of lipid peroxide formation in animal tissues.”

Biochem. J., vol. 99, no. 3, pp. 667–676, Jun. 1966.

- [28] E. R. Levine, R. L., Garland, D., Oliver, C. N., Amici, A., Climent, .I, Lenz, A. G., Ahn, B.W., Shaltiel, S., Stadtman, “Determination of Carbonyl Content in Oxidatively Modified Protein,” *Methods Enzym.*, vol. 186, no. 1983, pp. 464–478, 1990.
- [29] M. M. Bradford, “A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding,” *Anal. Biochem.*, vol. 254, pp. 248–254, 1976.
- [30] J. V Bannister and L. Calabrese, “Assays for superoxide dismutase,” *Methods Biochem Anal.*, vol. 32, pp. 279–312, 1987.
- [31] H. Aebi, “Catalase In Vitro,” *Methods Enzym.*, vol. 105, no. 1947, pp. 121–126, 1984.
- [32] R. Re, N. Pellegrini, A. Proteggente, A. Pannala, M. Yang, and C. Rice-Evans, “Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay,” *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 26, no. 98, pp. 1231–1237, 1999.
- [33] R. A. Khan, “Natural products chemistry: The emerging trends and prospective goals,” *Saudi Pharm. J.*, vol. 26, no. 5, pp. 739–753, 2018.
- [34] L. T. Abe, F. Lajolo, and M. I. Genovese, “Potential dietary sources of ellagic acid and other antioxidants among fruits consumed in Brazil : Jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba* (Vell .) Berg),” *J Sci Food Agric*, vol. 92, no. 8, pp. 1679–1687, 2012.
- [35] S. Wu, C. Long, and E. J. Kennelly, “Phytochemistry and health benefits of jaboticaba, an emerging fruit crop from Brazil,” *Food Res. Int.*, vol. 54, pp. 148–159, 2013.
- [36] C. O. Eleazu, K. C. Eleazu, S. Chukwuma, and U. N. Essien, “Review of the mechanism of cell death resulting from streptozotocin challenge in experimental animals, its practical use and potential risk to humans,” *J. Diabetes Metab. Disord.*, vol. 12, no. 1, pp. 1–7, 2013.
- [37] J. Wu and L. J. Yan, “Streptozotocin-induced type 1 diabetes in rodents as a model for studying mitochondrial mechanisms of diabetic β cell glucotoxicity,” *Diabetes, Metab. Syndr. Obes. Targets Ther.*, vol. 8, pp. 181–188, 2015.
- [38] A. A. Al-Hussaini, N. M. Sulaiman, M. D. AlZahrani, A. S. Alenizi, and M. Khan, “Prevalence of hepatopathy in type 1 diabetic children,” *BMC Pediatr.*, vol. 12, pp. 1–8, 2012.
- [39] J. Mohamed, A. H. Nazratun Nafizah, A. H. Zariyantey, and S. B. Budin, “Mechanisms of diabetes-induced liver damage: The role of oxidative stress and inflammation,” *Sultan Qaboos Univ. Med. J.*, vol. 16, no. 2, pp. 132–141, 2016.
- [40] S. E. Regnell and Å. Lernmark, “Hepatic steatosis in type 1 diabetes,” *Rev. Diabet. Stud.*, vol. 8, no. 4, pp. 454–467, 2011.
- [41] A. C J and A.D.Aulbach, “Biomarkers in Nonclinical Drug Developmen,” in *A Comprehensive Guide to Toxicology in Nonclinical Drug Development. 2 ed. Academic press.*, 2017, pp. 447–471.
- [42] P. K. Dabla, “Renal function in diabetic nephropathy,” *World J. Diabetes*, vol. 1,

no. 2, p. 48, 2010.

- [43] P. Piscitelli *et al.*, “Predictors of chronic kidney disease in type 1 diabetes: A longitudinal study from the AMD Annals initiative,” *Sci. Rep.*, vol. 7, no. 1, pp. 1–9, 2017.
- [44] S. S. Patel *et al.*, “Serum creatinine as a marker of muscle mass in chronic kidney disease: Results of a cross-sectional study and review of literature,” *J. Cachexia. Sarcopenia Muscle*, vol. 4, no. 1, pp. 19–29, 2013.
- [45] A. A. Faludi, M. C. O. Izar, J. F. K. Saraiva, A. P. M. Chacra, H. T. Bianco, A. Afiune Neto, et al. Atualização da Diretriz Brasileira de Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose – 2017. *Arq. Bras. Cardiol.* vol. 109 no.1, pp. 1-76, 2017.
- [46] X. Sheng and M. J. Murphy, “Effect of statins on total cholesterol concentrations and cardiovascular outcomes in patients with diabetes mellitus : a population-based cohort study,” pp. 1201–1208, 2012.
- [47] M. Nekohashi *et al.*, “Luteolin and quercetin affect the cholesterol absorption mediated by epithelial cholesterol transporter Niemann-Pick C1-Like 1 in Caco-2 cells and rats,” *PLoS One*, vol. 9, no. 5, pp. 1–9, 2014.
- [48] A. Domínguez-Avila, G. A. González-Aguilar, E. Alvarez-Parrilla, and L. A. de la Rosa, “Modulation of PPAR expression and activity in response to polyphenolic compounds in high fat diets,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 17, no. 7, pp. 1–17, 2016.
- [49] H. M. M. Hassan, “Inhibitory Effects of Red Grape Seed Extracts on Pancreatic - amylase and Lipase,” *Glob. J. Biotechnol. Biochem.*, vol. 9, no. 4, pp. 130–136, 2014.
- [50] Y. Gu, W. J. Hurst, D. A. Stuart, and J. D. Lambert, “Inhibition of Key Digestive Enzymes by Cocoa Extracts 1 and Procyanidins,” *J Agric Food Chem.*, vol. 59, pp. 5305–5311, 2011.
- [51] M. J. Cires, X. Wong, C. Carrasco-Pozo, and M. Gotteland, “The Gastrointestinal Tract as a Key Target Organ for the Health-Promoting Effects of Dietary Proanthocyanidins,” *Front. Nutr.*, vol. 3, no. 57, pp. 1–27, 2017.
- [52] A. K. Daoud, M. A. Tayyar, I. M. Fouda, and N. A. Harfeil, “Effects of diabetes mellitus vs. in vitro hyperglycemia on select immune cell functions,” *J. Immunotoxicol.*, vol. 6, no. 1, pp. 36–41, 2009.
- [53] B. R. Shah and J. E. Hux, “Quantifying the Risk of Infectious diseases in patients with DM,” *Diabetes Care*, vol. 26, no. 2, pp. 510–513, 2003.
- [54] T. Benfield, J. S. Jensen, and B. G. Nordestgaard, “Influence of diabetes and hyperglycaemia on infectious disease hospitalisation and outcome,” *Diabetologia*, vol. 50, no. 3, pp. 549–554, 2007.
- [55] M. Dryden *et al.*, “Pathophysiology and burden of infection in patients with diabetes mellitus and peripheral vascular disease : focus on skin and soft-tissue infections,” vol. 21, pp. 27–32, 2015.
- [56] C. Alves, J. Casqueiro, and J. Casqueiro, “Infections in patients with diabetes mellitus: A review of pathogenesis,” *Indian J. Endocrinol. Metab.*, vol. 16, no. 7, p. 27, 2012.

- [57] S. Ding, H. Jiang, and J. Fang, "Regulation of Immune Cell Functions by Polyphenols," *J. Immunol. Res.*, vol. 2018, pp. 1–7, 2018.
- [58] K. Karasawa, Y. Uzuhashi, M. Hirota, and H. Otani, "A Matured Fruit Extract of Date Palm Tree (*Phoenix dactylifera* L.) Stimulates the Cellular Immune System in Mice," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 59, pp. 11287–11293, 2011.
- [59] C. M. John, P. Sandrasaigaran, C. K. Tong, A. Adam, and R. Ramasamy, "Immunomodulatory activity of polyphenols derived from *Cassia auriculata* flowers in aged rats," *Cell. Immunol.*, vol. 271, no. 2, pp. 474–479, 2011.
- [60] F. Giacco and M. Brownlee, "Oxidative stress and diabetic complications," *Circ. Res.*, vol. 107, no. 9, pp. 1058–1070, 2010.
- [61] S. Bajaj and A. Khan, "Antioxidants and diabetes Decreased antioxidant defenses," *Indian J Endocrinol Metab*, vol. 16, no. 2, pp. 267–271, 2012.
- [62] P. C. Chikezie, O. A. Ojiako, and A. C. Ogbuji, "Oxidative stress in diabetes," *Int. J. Biol. Chem.*, vol. 41, no. 9, pp. 92–109, 2015.
- [63] J. Posuwan *et al.*, "Long-term supplementation of high pigmented rice bran oil (*Oryza sativa* L.) on amelioration of oxidative stress and histological changes in streptozotocin-induced diabetic rats fed a high fat diet; Riceberry bran oil," *Food Chem.*, vol. 138, no. 1, pp. 501–508, 2013.
- [64] Y. Aksoy *et al.*, "Antioxidant enzymes in red blood cells and lymphocytes of ataxia-telangiectasia patients," *Turk. J. Pediatr.*, vol. 46, no. 3, pp. 204–207, 2004.
- [65] N. T. Niture, A. A. Ansari, and S. R. Naik, "Anti-hyperglycemic activity of Rutin in streptozotocin-induced diabetic rats: An effect mediated through cytokines, antioxidants and lipid biomarkers," *Indian J. Exp. Biol.*, vol. 52, no. 7, pp. 720–727, 2014.
- [66] E. O. Omotayo, S. Gurtu, S. A. Sulaiman, M. S. Wahab, S. K.N.S, and S. Salleh, "Hypoglycemic and Antioxidant Effects of Honey Supplementation in Streptozotocin-induced Diabetic Rats," *Int. J. Vitam. Nutr. Res.*, vol. 80, no. 1, pp. 74–82, 2010.
- [67] M. R. Alezandro, D. Granato, and M. I. Genovese, "Jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba* (Vell.) Berg), a Brazilian grape-like fruit, improves plasma lipid profile in streptozotocin-mediated oxidative stress in diabetic rats," *Food Res. Int.*, vol. 54, no. 1, pp. 650–659, 2013.
- [68] S. Dal *et al.*, "Oxidative stress status and liver tissue defenses in diabetic rats during intensive subcutaneous insulin therapy," *Exp. Biol. Med.*, vol. 241, no. 2, pp. 184–192, 2016.
- [69] V. Gadjeva, P. Goycheva, G. Nikolova, and A. Zheleva, "Influence of glycemic control on some real-time biomarkers of free radical formation in type 2 diabetic patients: An EPR study," *Adv. Clin. Exp. Med.*, vol. 26, no. 8, pp. 1237–1243, 2017.
- [70] S. Costantino *et al.*, "Impact of Glycemic Variability on Chromatin Remodeling, Oxidative Stress and Endothelial Dysfunction in Type 2 Diabetic Patients with Target HbA," *Am. Diabetes Assoc.*, vol. 66, no. 9, pp. 2472–2482, 2017.

- [71] R. Rodrigues *et al.*, “Correlations of the glycemic variability with oxidative stress and erythrocytes membrane stability in patients with type 1 diabetes under intensive treatment,” *Diabetes Res. Clin. Pract.*, vol. 144, pp. 153–160, 2018.
- [72] R. Testa, A. R. Bonfigli, F. Prattichizzo, L. La Sala, V. De Nigris, and A. Ceriello, “The ‘Metabolic Memory’ Theory and the Early Treatment of Hyperglycemia in Prevention of Diabetic Complications,” *Nutrients*, vol. 9, no. 5, pp. 1–9, 2017.

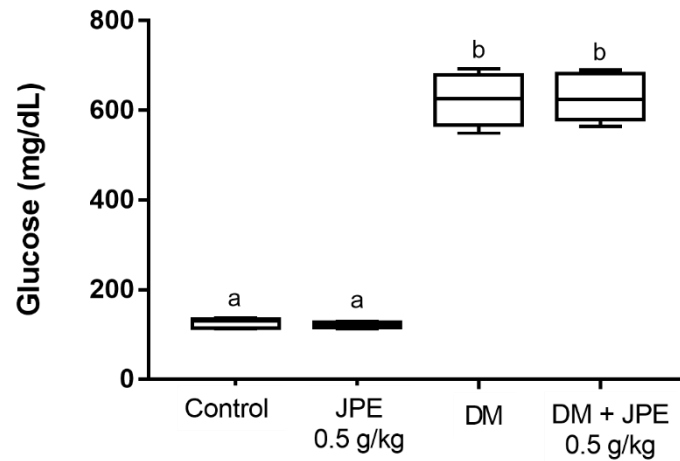


Figure 1. Serum glucose levels in healthy (control group) or diabetic (DM) rats treated with or without 0.5 g/kg of jabuticaba peel extract (JPE). Data are presented as median and interquartile range (n = 5 to 6 rats/group). Different letters indicate significant statistical difference through Kruskal Wallis test. Statistical significance of $p < 0.05$.

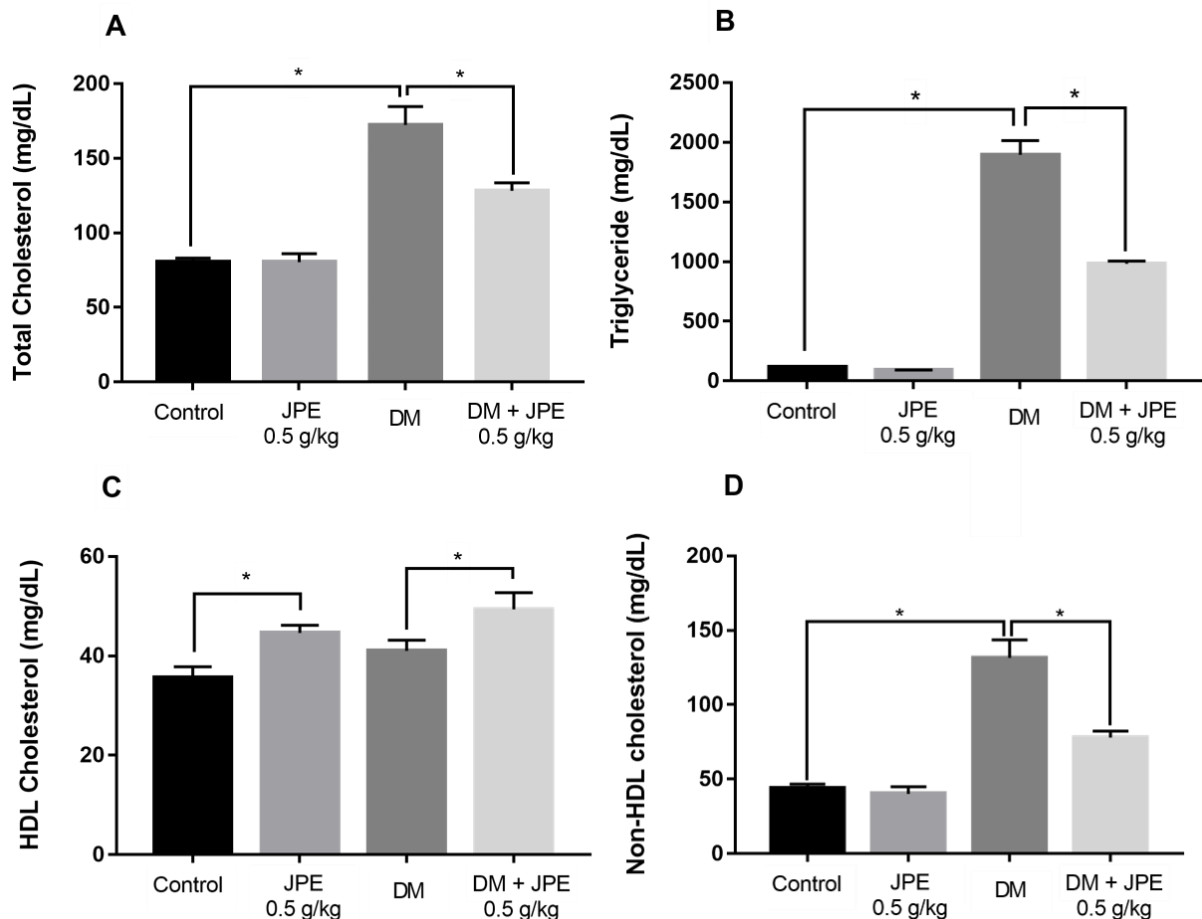


Figure 2. Serum levels of total cholesterol (A), triglycerides (B), HDL (C) and non-HDL cholesterol (D) in healthy (control group) or diabetic rats (DM) treated with or without 0.5 g/kg of jabuticaba peel extract (JPE). Data are presented as mean and standard error (SE). (n = 5 to 6 rats/group). *Asterisk indicate significant statistical difference through Student t test. Statistical significance of $p < 0.05$.

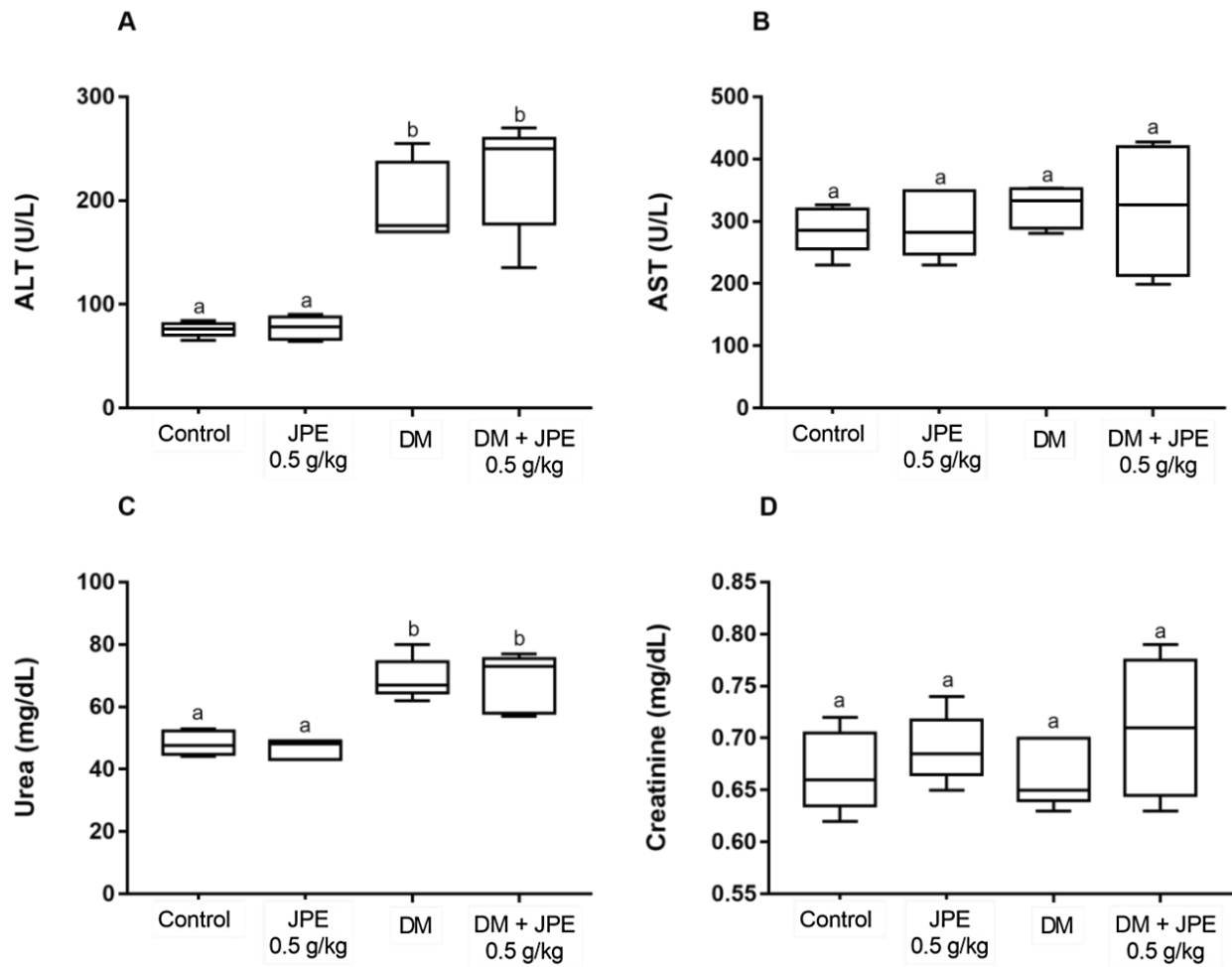


Figure 3. Serum levels of liver enzymes alanine aminotransferase (ALT) **(A)** and aspartate aminotransferase (AST) **(B)** and urea **(C)** and creatinine **(D)** in healthy (control group) or diabetic rats (DM) treated with or without 0.5 g/kg of jabuticaba peel extract (JPE). Data are presented as median and interquartile range (n = 5 to 6 rats/group). Different letters indicate significant statistical difference through Kruskal Wallis test. Statistical significance of $p < 0.05$.

Table 1 – Total number of red and white blood cells and platelets in healthy (control group) or diabetics rats (DM) treated with or without 0.5 g/kg of jabuticaba peel extract (JPE).

Cells	Groups			
	Control	JPE 0.5 g/kg	DM	DM + JPE 0.5 g/kg
Erythrocytes ($10^6/\mu\text{L}$)	9.67 ± 0.09^a	9.32 ± 0.12^a	9.28 ± 0.15^a	9.29 ± 0.19^a
Platelets ($10^3/\mu\text{L}$)	803.00 ± 43.00^a	780.83 ± 54.00^a	557.50 ± 72.30^a	629.67 ± 76.85^a
Leukocytes ($10^3/\mu\text{L}$)	7.60 ± 0.23^a	8.86 ± 0.58^a	4.84 ± 0.37^b	7.36 ± 0.44^a
Lymphocytes ($10^3/\mu\text{L}$)	6.02 ± 0.17^a	6.98 ± 0.47^a	3.38 ± 0.38^b	5.45 ± 0.43^a
Granulocytes ($10^3/\mu\text{L}$)	1.44 ± 0.05^a	1.60 ± 0.10^a	1.28 ± 0.06^a	1.60 ± 0.10^a
Monocytes ($10^3/\mu\text{L}$)	0.18 ± 0.05^a	0.18 ± 0.03^a	0.20 ± 0.02^a	0.25 ± 0.02^a

Data are presented as mean and standard error (SE) (n = 5 to 6 rats/group). Different letters indicate significant statistical difference through analysis of variance (ANOVA) with Tukey post-hoc test. Statistical significance of $p < 0.05$.

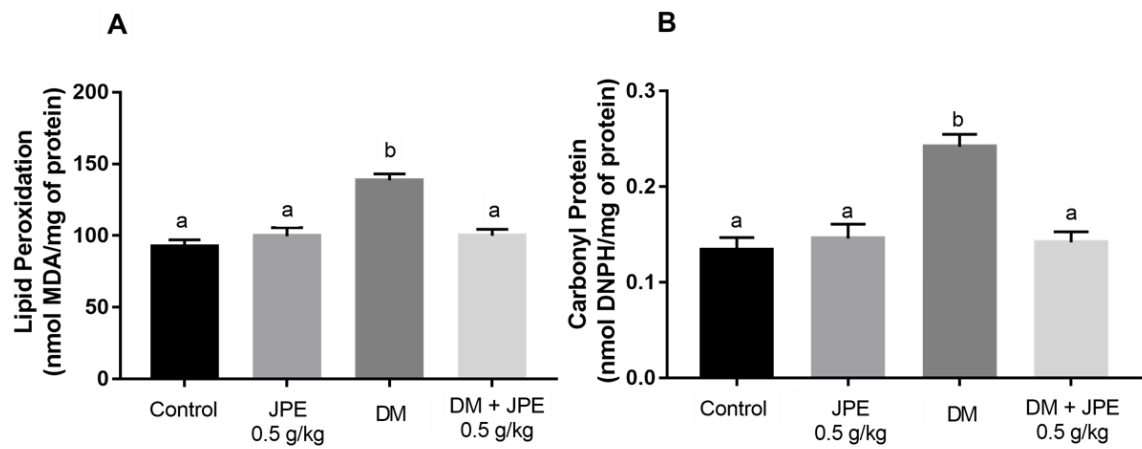


Figure 4. Serum lipid peroxidation (**A**) and carbonyl protein (**B**) in healthy (control group) or diabetic (DM) rats treated with or without 0.5 g/kg of jabuticaba peel extract (JPE). Data are presented as mean and standard error (SE) (n= 5 to 6 rats/group). Different letters indicate significant statistical difference through analysis of variance (ANOVA) with Tukey post-hoc test. Statistical significance of $p < 0.05$.

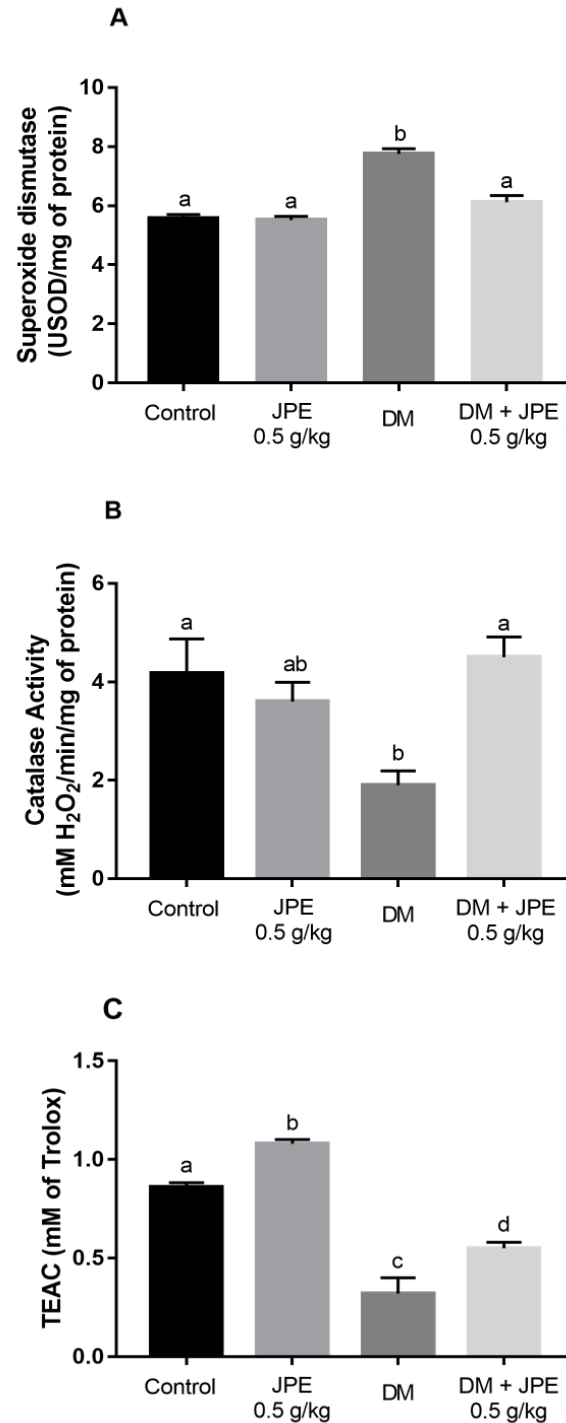


Figure 5. Superoxide dismutase **(A)** and catalase **(B)** activity and Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC) **(C)** in serum of healthy (control group) or diabetic (DM) rats treated with or without 0.5 g/kg of jabuticaba peel extract (JPE). Data are presented as mean and standard error (SE) (n = 5 to 6 rats/group). Different letters indicate significant statistical difference through analysis of variance (ANOVA) with Tukey post-hoc test. Statistical significance of $p < 0.05$.

4.2. Artigo 2

Jabuticaba (*Plinia trunciflora* (O. Berg) Kausel) protects liver of diabetic rats against mitochondrial dysfunction and oxidative stress through the modulation of SIRT3 expression

Caroline Calloni^a, Luana Soares Martínez^a, Daniela Gil^a, Douglas Machado^a, Matheus Parmegiani Jahn^b, Mirian Salvador^a

^aLaboratório de Estresse Oxidativo e Antioxidantes, Instituto de Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul (UCS), 95070-560, Caxias do Sul RS, Brazil.

^bLaboratório de Fisiologia e Farmacologia, Universidade de Caxias do Sul (UCS), 95070-560, Caxias do Sul RS, Brazil

*Corresponding author: Laboratório de Estresse Oxidativo e Antioxidantes (Bloco 38), Instituto de Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul. Rua Francisco Getúlio Vargas, 1130. CEP: 95070-560. Caxias do Sul-RS, Brasil.

Telephone: +55 54 32182105. E-mail address: msalvado@ucs.br

Abstract

The complications generated by hyperglycemia present in diabetes mellitus (DM) have been constantly related to oxidative stress and dysfunction in mitochondrial electron transport chain. Sirtuin 3 (SIRT3), which is present in mitochondria, is responsible for regulating several proteins involved in the metabolic homeostasis and oxidative stress. Studies have suggested alterations in the expression of SIRT3 in diabetes. Considering this context, the objective of this study was to evaluate the effects of jabuticaba (*Plinia trunciflora*) phenolic compounds, a berry native of Brazil, on the function of mitochondrial electron transport chain complexes, SIRT3 protein expression and oxidative stress parameters in liver of diabetic rats induced by streptozotocin. After diabetes induction (streptozotocin 65 mg/kg), diabetic and health rats were treated with jabuticaba peel extract (JPE) by gavage (0.5 g/kg of weight) during 30 days. Subsequently to treatments, it was observed that diabetic rats presented an impairment in activities of complexes I, II and III of electron transport chain along with an overexpression of SIRT3. In addition, an increase in lipid peroxidation and superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) activities was observed in diabetic group. The treatment with JPE was able to recover the activity of the mitochondrial complexes and reduced the expression of SIRT3. Besides that, JPE treatment was able to reduce oxidative damage to lipids and bring the antioxidants enzyme activity to basal levels in diabetic rats. Together, these results demonstrate that JPE is able to reduce oxidative stress related to DM by restoring mitochondrial function through the regulation of SIRT3 expression. Thus, JPE could become a possible alternative for the reduction of the development of complications related to DM.

Key words: Diabetes, Sirtuin, phenolic compounds, electron transport chain.

1. Introduction

Diabetes (DM) is a disease characterized primarily by hyperglycemia. The number of DM cases has increased considerably in the world in recent years. People living with DM have a highest risk of morbidity and mortality when compared to the general population (Ogurtsova, Rocha, Huang, Linnenkamp, & Guariguata, 2017). Chronic exposure to hyperglycemia is responsible for a variety of DM-related complications, including neuropathy, nephropathy, and cardiovascular disease. Although apparently a simple disease, DM seems to be more complex than previously thought, leading to the disorder of several metabolic pathways that may be related to the development of complications (Giacco & Brownlee, 2010; Volpe, Villar-Delfino, Anjos, & Nogueira-Machado, 2018).

Among the main DM-related alterations, oxidative stress has been widely reported and is presumed to occur as a result of mitochondrial dysfunction, with complexes I and II showing increased activity and complex III presenting reduced activity, both in insulin deficiency and in insulin resistance states (Blake & Trounce, 2013; Raza, Prabu, John, & Avadhani, 2011; Zhang et al., 2011). An imbalance in the function of mitochondrial complexes may favor the increased generation of reactive oxygen species (ROS) (Blake & Trounce, 2013; Brownlee, 2001; Tiwari, Pandey, Abidi, & Rizvi, 2013). Increased ROS can interact with lipids, proteins and nucleic acids, leading to loss of membrane integrity, structural or functional changes in proteins and to genetic mutations (Pisoschi & Pop, 2015).

Sirtuins (silent information regulators or SIRTs) are a family of NAD⁺ dependent deacetylase proteins, distributed in various cell compartments, and which exhibit a variety of functions (Li et al., 2015). In mammals, 7 different sirtuins (SIRT1-7) are known. SIRT3, one of the sirtuins found in mitochondrial, regulates many of the mitochondrial

proteins that are involved with metabolic homeostasis, oxidative stress, and cell survival by reversible enzyme deacetylation (Hirschey, Shimazu, Huang, Schwer, & Verdin, 2011). In general, enzymatic activity of SIRT3 substrate proteins is increased following deacetylation, suggesting that protein acetylation suppresses mitochondrial function while SIRT3 activates function (Anderson & Hirschey, 2012). SIRT3 is highly expressed in the brain, heart, kidney, brown adipose tissue and liver (Nogueiras et al., 2012). Studies have observed that SIRT3 expression is down regulated in type 1 DM. Yu et al. (2017) showed that SIRT3 expression was decreased in streptozotocin-induced diabetic rats. In addition, Bagul, Dinda, & Banerjee (2015) demonstrated that the expression of SIRT3 in the cardiac tissue of type I diabetic rats was decreased. In this way, SIRT3 may be a key protein to better understand the mechanisms involved in the pathogenesis of DM and its complications. Therefore, further investigations are required to clearly determine the influence of SIRT3 expression on DM and its influence on the regulation of the electron transport chain, and consequently, on the levels of oxidative stress.

The search for affordable natural products that are useful for the treatment of DM and its complications have increased significantly in recent years, since the costs with conventional DM treatment are expensive and in some cases may not be effective (Newman & Cragg, 2016). In this context, the phenolic compounds have a prominent place, once several studies have associated the pathogenesis of DM with the process of oxidative stress (Maiese, 2015; Ullah, Khan, & Khan, 2016). Phenolic compounds comprise a group of substances widely distributed in plants that have one or more hydroxyl groups attached to aromatic rings (Lin et al., 2016). Several studies have already demonstrated the biological activities of these compounds, among them, antioxidant, anti-inflammatory (Bak, Truong, Kang, Jun, & Jeong, 2013; Rocha et al., 2015), antitumor (Duo, Ying, Wang, & Zhang, 2012; Fantini et al., 2015) and antimicrobial activities

(Camargo et al., 2017; Tohma et al., 2016). Besides that, it is also known that these compounds can act with signals influencing the expression of several proteins, such as SIRT3, and, in this way, modulate the cellular response in the most varied conditions (Kim, Quon, & Kim, 2014).

Jabuticaba (*Myrtaceae*) is a fruit native to Brazil that presents a globular shape, with a thick purple peel and a white, gelatinous and bittersweet flavor (Lorenzi et al., 2000; Sobral et al., 2012). Studies have shown that the three main species of jabuticabas naturally distributed in Brazil (*Plinia jaboticaba*, *Plinia cauliflora* and *Plinia trunciflora*) are rich in phenolic compounds, such as anthocyanins and flavonoids, concentrated mainly in peel (Calloni et al., 2015; Neves, Stringheta, Gómez-alonso, & Hermosín-Gutiérrez, 2018; Wu, Dastmalchi, Long, & Kennelly, 2012). However, few studies have focused on the investigation of phenolic compounds of *P. trunciflora* and their biological activities related to DM. Therefore, the objective of this study was to evaluate the effects *P. trunciflora* peel aqueous extract on the function of the electron transport chain complexes, the expression of SIRT3 and parameters of oxidative stress in the liver of streptozotocin-induced diabetic rats.

2. Material and Methods

2.1. Chemicals

Antibodies were purchased from Santa Cruz Biotechnology. Sucrose was purchased from Vetec Química Fina Ltda. Streptozotocin, sodium citrate, citric acid, Tris, EDTA, albumin, potassium cyanide, NADH, ubiquinone, rotenone, succinate, 2,6-dichlorophenolindofenol, decylubiquinone, ubiquinol, cytochrome c, antimycin A, adrenaline, glycine, hydrogen peroxide, malondialdehyde, butanol and tween-20 were obtained from Sigma (St. Louis, MO, USA). All of the chemicals were of analytical grade.

2.2. Plant Material and Sample Preparation

The collection of the jabuticabas was carried out in the cities of Caxias do Sul (29°10'55.31"S; 51°12'9.70"O) and Veranópolis (28°56'26.00"S; 51°32'35.11"O), Grande do Sul, Brazil, in 2017. Identification of the voucher specimens was performed by the herbarium of the University of Caxias do Sul, RS (HUCS40706). An access authorization (A1009E) was obtained from the Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético (SISGEN) as well as a collection authorization (nº 38096-3) was requested from Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO). Extract preparation was performed according to methodology described by Calloni et al. (2015). Firstly, jabuticaba peels were removed manually and were ground in a Wiley mill. The extraction was performed with distilled water (5 % w/v) under reflux (100 °C) for 15 min. Afterward, jabuticaba peel extract (JPE) was lyophilized (LIOBRAS model L-101) and stored at -80 °C until the tests.

2.3. Animals

Twenty-four male Wistar rats weighing about 355.85 ± 36 g were obtained from Center for Reproduction and Experimentation of Laboratory Animals of the Federal University of Rio Grande do Sul. The animals were housed in plastic cages (three animals in each) and received water and pelleted food *ad libitum* and kept under controlled temperature (23 ± 2 °C) and 12 h light-dark cycle. All the procedures performed were in accordance with the CONCEA (National Council for Control of Animal Experimentation) and SBCAL (Brazilian Society of Science in Laboratory Animals) and the experimental protocol were approved by the Ethics Committee for Animals Research of the University of Caxias do Sul (001/2017).

2.4. Diabetes Induction

Intraperitoneal injection of streptozotocin (65 mg/ml - STZ, Sigma Chemical Company) was used for the induction of DM. (Furman, 2015). The STZ was diluted in sodium citrate buffer (0.01 mol / L pH 4.5) and citric acid (0.01 mol / L pH 4.5) and injected soon after dilution. Control animals received the same volume of buffer (2mL/kg). Blood glucose levels was measured through a glycosimeter (ACCU-CHEK) after 72 h and the animals that presented glycemia greater than 200 mg/dL were considered diabetic (Al-Malki & Rabey, 2015; Radenković, Stojanović, & Prostran, 2016).

2.5. Experimental Design and Samples

For the extract treatment, the animals were divided into four groups containing 6 animals each. The extract dissolved in water was administered once a day by gavage for 30 days. Animals were weighed every week and the dose (0.5 g/kg) of extract was adjusted considering the current weight of each animal. The groups were organized as follow: *Control group* ($n = 6$): animals receiving water; *JPE group* ($n = 6$): animals receiving extract dissolved in water (0.5 g/kg); *DM group* ($n=5$): diabetic animals receiving water; *DM + JPE group* ($n = 6$): diabetic animals receiving extract dissolved in water (0.5 g/kg). After that, the animals were euthanized by decapitation, livers were removed, rinsed of any adhering blood using saline buffer and thereafter were frozen at -80 °C. Prior to analysis, livers were quickly sliced, and fragments were homogenized in appropriate buffers.

2.6. Tissue Homogenization

For the evaluation of the complexes of the ETC activity it was proceeded the extraction of mitochondria from tissue. The separation of mitochondria was performed as described by Frezza, Cipolat, & Scorrano (2007) with some modifications. The liver was homogenized in ice cold buffer containing 0.1 M of Tris–MOPS, 0.1 M of EDTA/Tris and 1 M sucrose, pH 7.4. Subsequently, the samples were centrifuged at $600 \times g$ for 10 min at 4 °C. The supernatant was collected and centrifuged again at $7000 \times g$ for 10 min at 4 °C. The resulting supernatant was discarded, and the pellet washed with 200 μ l of ice-cold sucrose buffer, followed by further centrifugation at $7000 \times g$ and the resulting supernatant was discarded again. The pellet was used for the determination of total proteins by the method of Bradford (1976) and for the determination of the activity of the complexes I to IV of the ETC.

In order to evaluate the activity of the enzymes superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT), oxidative damage to lipids and the expression of SIRT3, the tissue was homogenized in a Potter-Elvehjem pestle and glass tube using ice cold phosphate buffered saline (PBS). Thereafter, the homogenate was centrifuged at $1000 \times g$ for 10 min, at 4°C.

2.7. Activity of The Mitochondrial Electron Transport Chain

The function of the complexes I to IV of ETC were evaluated by spectrophotometric methodology described by Spinazzi, Casarin, Pertegato, Salviati, & Angelini (2012). For this assay, the isolated mitochondria were mixed with a potassium phosphate buffer (0,05 M, pH: 7.5) containing bovine albumin (3 mg/mL) and potassium cyanide (KCN, 300 μ M). The NADH substrate (100 μ M), the electron acceptor ubiquinone (60 μ M) and the specific rotenone inhibitor (10 μ M) were added to evaluate the activity of the complex I (CI) of the ETC. The activity of complex II (CII) was evalua-

ted with the addition of substrate succinate (20 mM), 2,6-dichlorophenolindofenol (80 μ M) and electron acceptor decilubiquinone (DUB, 50 μ M) and 2-thenoyltrifluoroacetone (TTFA, 10 μ M). The substrate ubiquinol (DubH₂, 100 μ M), cytochrome c (75 μ M) as electron acceptor and the specific inhibitor antimycin A (10 μ g/mL) were used to determine the activity of complex III (CIII). For the evaluation of the complex IV (CIV), the cytochrome c reduced was used as the substrate and the KCN (300 μ M) was used as a specific inhibitor. The kinetics was made spectrophotometrically at wavelengths specific to each complex. Results are expressed as nmol/min/mg of protein.

2.8. Immunoblotting Assay

To determine the possible mechanism by which the extract acts modulating the activity of the ETC complexes, expression of the SIRT3 protein was determined. For this, the tissue homogenized in PBS was used. Proteins were denatured and separated on 12 % SDS-PAGE gel. After separation, the proteins were transferred to an Immobilon-P (Milipore®) transfer membrane. Subsequently, the membranes were blocked with 5 % non-fat milk and incubated for 2 hours with the primary antibody. Sirtuin 3 (SIRT3 - 28kDa) (1: 1000) was used as the primary antibody. β -tubulin (55kDa) was used as constitutive protein. After incubation with the primary antibody, the membranes were repeatedly washed with PBS-t (PBS-buffered saline containing 0.1 % Tween-20) for the removal of unbound primary antibody. The membranes were then stained with anti-Rabbit IgG conjugated-peroxidase antibodies (1:2000) for 1 h at room temperature. Membranes were washed repeatedly. Protein detection was performed by using a chemiluminescence protocol (Amersham Bioscience). Protein band images were captured using ImageQuant (LAS 500 - GE Healthcare) and pairwise comparisons of the protein bands on the immunoblot were performed using Image-J 1.45 software.

2.9. Antioxidant enzymes

The activity of the antioxidant enzymes Superoxide Dismutase (SOD) and Catalase (CAT) were determined in tissue homogenized. SOD activity was determined by measuring the inhibition of self-catalytic adrenochrome formation rate at 480 nm, in a reaction medium containing 1 mmol/L adrenaline (pH 2.0) and 50 mmol/L glycine (pH 10.2). This reaction was performed at 30 °C for 3 min (Bannister & Calabrese, 1987). Results are expressed as USOD (units of SOD)/mg of protein. One unit is defined as the amount of enzyme that inhibits the rate of adrenochrome formation in 50 %. CAT activity was measured according to the methods described by Aebi (1984). The assay measures the decomposition rate of H₂O₂ at 240 nm. The reaction was conducted at 30 °C for 1 min. Results are expressed as mM H₂O₂/min/mg of protein. All absorbances were measured in spectrophotometer (SHIMADZU, model UV-1700).

2.10. Lipoperoxidation

Lipoperoxidation were evaluated through the measurement of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), which is based on the colorimetric reaction of malondialdehyde (MDA), one of the final products of lipoperoxidation. Briefly, proteins were precipitated using trichloroacetic acid (5 %). After centrifugation, the pellet was dissolved in sulfuric acid (3 M) and color reagent (containing 0.03 M thiobarbituric acid, 0.1 M sodium bicarbonate and 1.5 M sodium sulfate) and heated to 100 °C. Afterwards, 1.75 mL of butanol was added, centrifuged and the supernatant readout was made spectrometrically at 530 nm (Wills, 1966). Results are expressed as µM of MDA/mg of protein.

2.11. Statistical Analysis

The results were expressed as the mean $\pm$ standard error (SE). The data were determined to be parametrical or non-parametrical by using the Shapiro-Wilk test. Data were submitted to analysis of variance (ANOVA) with Tukey post-hoc test. A statistical significance of $p < 0.05$ was considered. The software SPSS 22.0 (SPSS Inc., Chicago, IL) was used for all of the statistical analysis.

3. Results

Studies have suggested that mitochondrial dysfunction exists in cells exposed to hyperglycemia and that this would be related to the pathogenesis of DM complications. Therefore, in this study the activity of CI to IV of the mitochondrial ETC of liver of healthy and diabetic rats, treated with or without JPE, was evaluated. It was observed that the activity of CI and CII were significantly increased in the DM group when compared to the control group (Figure 1A and B). On the other hand, the activity of CIII was significantly decreased in the DM group, demonstrating that there is a mismatch between the activities of the complexes during DM (Figure 1C). After the treatment with JPE for 30 days, it was observed that there was a modification of the activities of the mitochondrial complexes, with a significant decrease of the activity of the CI and CII and an increase of the activity of the CIII (Figure 1 A, B and C), demonstrating that the JPE is able to modulate, in some way, the activity of the CI to CIII of the mitochondrial ETC. There was no change in the activity of the CIV (Figure 1 D). In addition, no change in the activity of the complexes was observed in healthy rats that received the JPE.

To evaluate the possible mechanism involved in the regulation of mitochondrial activity caused by JPE in DM rats, the expression of SIRT3, a deacetylase located in mitochondria, which regulates the metabolic activity of enzymes and modulates the oxi-

ductive stress in this organelle, was determined. It was possible to observe that there was an overexpression of SIRT3 in the animals of the DM group when compared to the control group. The supplementation of JPE in diabetic rats decrease significantly the overexpression of SIRT3 (Figure 2).

It is known that changes in the activity of the ETC complexes may lead to increased production of reactive oxygen species (ROS) and, in turn, may lead to the development of oxidative damage to biomolecules and an increase in oxidative stress. In this way, the generation of ROS was evaluated indirectly through the determination of the activity of the antioxidant enzymes SOD and CAT. An increase in the activity of SOD and CAT enzymes was observed in rats of the DM group, which may be occurring due to increased ROS production (Figure 3 A and B). Even with increased activity of antioxidant enzymes, there was an increase in lipoperoxidation in the DM group (Figure 3 C), demonstrating that the compensatory increase in antioxidant defenses is not enough to prevent oxidative damage in diabetic rats. On the other hand, when diabetic rats received JPE supplementation, the activity of SOD and CAT enzymes presented values near the basal level concomitantly with a decrease in oxidative damage to lipids (Figure 3 A, B and C).

4. Discussion

Some studies have demonstrated the presence of mitochondrial dysfunction during DM, which can, in turn, lead to oxidative stress (Blake & Trounce, 2013; Sivitz & Yorek, 2010; Wada & Nakatsuka, 2016). Evidence suggests that the mitochondrial electron transport chain function is regulated by the SIRT3 protein (Bause & Haigis, 2013). Investigations have shown that there may be changes in SIRT3 expression in DM, however, there are controversial in results (Bagul, Dinda, & Banerjee, 2015; Yu et al.

2017; Li et al., 2018). In addition, studies have shown that phenolic compounds have the potential to regulate the expression of several proteins, including sirtuins, and thus regulate mitochondrial function and oxidative stress. Therefore, these compounds could be allies in the prevention of complications related to DM.

Jabuticaba (*P. trunciflora*) is a fruit rich in phenolic compounds and some studies have already demonstrated its antioxidant potential (Calloni et al., 2015; Sacchet et al., 2015). Nevertheless, its effect on complexes of the mitochondrial ETC activity and SIRT3 expression of diabetic rats has not been studied.

In fact, this study demonstrated that there is a mitochondrial dysfunction in diabetic animals, with an increase in the activity of CI and CII of the ETC, which may be due to the increase in the influx of electrons in these two complexes. On the contrary, a decrease in the activity of CIII was observed. The activity of CIV did not present alteration in the diabetic group. Other studies have also shown that there is a dysfunction of the ETC of diabetic rats. Raza, Prabu, John, & Avadhani (2011) demonstrated that there is a significant increase in CI and CII activity and a reduction in CIII and CIV activity in the liver of diabetic rats induced by streptozotocin. Zhang et al. (2011) observed a significant reduction in CIII activity of the ETC in the kidney of diabetic mice, accompanied by an overactivity of CI.

When the diabetic rats received the JPE, it was observed that there was a modulation of the activity of the ETC complexes, with a reduction of the activity of the CI and CII, with the values returning to the basal levels. Regarding the CIII, the treatment with JPE induced a significant increase of the activity, showing, in this way, the JPE is able to modulate the ETC activity. Corroborating with our study, Gambato et al. (2018) demonstrated an increase in CI activity in hyperglycemic endothelial cells and the treatment with *Pleurotus albidus* extract, rich in phenolic compounds, was able to bring

CI activity to the basal levels. Regarding the activity of CIII, Mustata et al. (2005) also demonstrated that streptozotocin-induced diabetic rats showed a decrease in the specific activity of CIII in renal cortex and suggests that there may be damage to the CIII proteins through glycation. In addition, studies have shown that aldehydes derived from lipid peroxidation may lead to inhibition of CIII (Musatov & Robinson, 2012; Picklo, Amarnath, McIntyre, Graham, & Montine, 1999). In our study we also observed increased lipid peroxidation in diabetic rats, which could have led to inhibition of CIII.

In order to understand how the regulation of changes in mitochondrial function observed in DM occurs, this study evaluated the SIRT3 expression. SIRT3, a mitochondrial sirtuin, is responsible for regulating several proteins through deacetylation, such as, for example, ETC proteins and enzymes like SOD, and thus regulate the metabolic activity and oxidative stress of this organelle (Bause & Haigis, 2013). In this study, an overexpression of SIRT3 was observed in the diabetic group. Li et al. (2018) also found an overexpression of SIRT3 in hepatocytes of high-fat-diet-induced diabetic rats. This increase in SIRT3 expression may be responsible for the observed increase in ETC CI and CII activity (Bause & Haigis, 2013). Other authors have found a decrease in SIRT3, but in this case it is not clear how to explain the increase in ETC activity. In our study, we showed that SIRT3 appears to regulate CI and CII activity, but apparently not CIII and CIV.

It is not yet clear what could be causing increased expression of SIRT3 in diabetic rats. However, we hypothesized that even with the increased activity of ETC CI and CII, the decrease in CIII activity would lead to a decrease in ATP generation, which in turn, could be signaling the overexpression of SIRT3, being a compensatory response to induce a greater energy production. In fact, Vassilopoulos et al. (2014) study has shown that SIRT3 is sensitive to intracellular ATP levels and regulates the ATP synthase. In addition,

a study by Wu et al. (2017) with streptozotocin-induced diabetic rats demonstrated that in fact there is a decrease in intracellular ATP levels, even with the presence of increased activity in the ETC complexes in the pancreas. Furthermore, in a study by Rato et al. (2014) also showed an increase in the activity of CI concomitant to a decrease in mitochondrial CIII activity, being that this dissociation of activities of the complexes led to the impairment of ATP formation in testicles of pre-diabetic rats.

After treatment with JPE a significant decrease in SIRT3 expression was observed. How the JPE regulates the expression of this protein is not fully elucidated. A study by Li et al. (2018) demonstrated that berberine, an alkaloid, led to decreased SIRT3 expression in hepatocytes of high fat diet rats. In addition, a study by Buler, Aatsinki, Izzi, & Hakkola (2012) has shown that metformin, one of the main drugs used for the treatment of DM, also induces decrease in expression of SIRT3 in primary hepatocyte and liver culture in vivo. It suggests that the regulation of SIRT3 expression would be involved in the mechanisms of action of metformin and, therefore, SIRT3 could be an important target for the treatment of DM.

The alteration in the function of mitochondrial complexes could explain the increase of oxidative stress during DM. In fact, this study also observed an increase in oxidative damage to lipids in the diabetes group, which may be a consequence of an overproduction of superoxide radical ($O_2^{\bullet-}$) from the ETC. The increased substrate available in the hepatic cells of diabetic rats, especially glucose and fatty acids, may lead to an increase in oxidative phosphorylation which, together with the existence of a reduced function of CIII, may lead to increased $O_2^{\bullet-}$ production by increase in the escape of ETC electrons that react with O_2 (Blake & Trounce, 2013; Raza et al., 2011). Therefore, it is suggested that this may be the key process related to cell lesions caused by hyperglycemia.

In this study we also observed an increase in the antioxidant enzymes SOD and CAT in DM group. The overproduction of $O_2^{\cdot-}$ in the mitochondrial ETC of diabetic rats would be responsible for inducing an increase in the activity of the SOD enzyme, which is responsible for disrupting the $O_2^{\cdot-}$ in hydrogen peroxide (H_2O_2). Consequently, increased H_2O_2 production would be responsible for increased CAT enzyme activity. It can be said that in oxidative stress the positive regulation of SOD and CAT activity is not necessarily protective, but rather a compensatory response to eliminate excess $O_2^{\cdot-}$ and H_2O_2 , considering that even increased, the enzyme did not prevent damage to lipids. These data confirm the existence of an increase in the production of reactive oxygen species (ROS) and, consequently, an increase in oxidative stress in diabetic rats.

With the restoration of the activity of the ETC complexes after treatment of the diabetic rats with JPE, it was also observed that there was a decrease in lipid peroxidation and a decrease in the activity of the antioxidant enzymes SOD and CAT. This decrease in the activity of the enzymes can be explained by a probable lower production of $O_2^{\cdot-}$ and, consequently, lower H_2O_2 production, which, in turn, led to a decrease in oxidative damage to lipids. With the lower production of ROS in ETC, the enzymes would be less necessary leading to a decrease in their activity. In addition, it is known that SIRT3 is also responsible for the regulation of SOD through deacetylation. Thus, down regulation of SIRT3 in the DM group treated with JPE may also be responsible for the reduction of SOD activity, since this will be less deacetylated and, therefore, will have less activity.

5. Conclusion

In summary, these findings together demonstrate a novel biological effect for JPE with the potential to regulate the expression of SIRT3 and thereby regulates the function of the mitochondrial electron transport chain and, consequently, reduces oxidative dama-

ge in liver of diabetic rats. In this way, the JPE becomes an important source of phenolic compounds with potential for a possible adjuvant treatment of complications related to DM. Further studies are needed to completely elucidate this mechanism of action.

6. References

- Aebi, H. (1984). Catalase In Vitro. *Methods Enzymol*, 105(1947), 121–126. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(84\)05016-3](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(84)05016-3)
- Al-Malki, A. L., & Rabey, H. A. El. (2015). The Antidiabetic Effect of Low Doses of *Moringa oleifera* Lam. Seeds on Streptozotocin Induced Diabetes and Diabetic Nephropathy in Male Rats. *BioMed Research International*, 2015, 1–13. <https://doi.org/10.1155/2015/381040>.
- Anderson, K. A., & Hirschey, M. D. (2012). Mitochondrial protein acetylation regulates metabolism. *Essays Biochem.*, 52, 1–13. <https://doi.org/10.1042/bse0520023>
- Bagul, P. K., Dinda, A. K., & Banerjee, S. K. (2015). Effect of resveratrol on sirtuins expression and cardiac complications in diabetes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 468(1–2), 221–227. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.10.126>
- Bak, M. J., Truong, V. L., Kang, H. S., Jun, M., & Jeong, W. S. (2013). Anti-inflammatory effect of procyanidins from wild grape (*Vitis amurensis*) seeds in LPS-induced RAW 264.7 cells. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2013, 1–11. <https://doi.org/10.1155/2013/409321>
- Bannister, J. V., & Calabrese, L. (1987). Assays for superoxide dismutase. *Methods Biochem Anal.*, 32, 279–312. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/9780470110539.ch5>
- Bause, A. S., & Haigis, M. C. (2013). SIRT3 regulation of mitochondrial oxidative stress. *Experimental Gerontology*, 48(7), 634–639. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2012.08.007>
- Blake, R., & Trounce, I. A. (2013). Mitochondrial dysfunction and complications associated with diabetes. *Biochimica et Biophysica Acta Journal*, 1840(4), 1404–1412. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.11.007>
- Bradford, M. M. (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*, 254, 248–254. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Brownlee, M. (2001). Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*, 414, 813–820. <https://doi.org/10.1038/414813a>
- Buler, M., Aatsinki, S. M., Izzi, V., & Hakkola, J. (2012). Metformin Reduces Hepatic Expression of SIRT3, the Mitochondrial Deacetylase Controlling Energy Metabolism. *PLoS ONE*, 7(11), 1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0049863>

- Calloni, C., Agnol, R. D., Martínez, L. S., de Siqueira Marcon, F., Moura, S., & Salvador, M. (2015). Jaboticaba (*Plinia trunciflora* (O. Berg) Kausel) fruit reduces oxidative stress in human fibroblasts cells (MRC-5). *Food Research International*, 70, 15–22. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.01.032>
- Camargo, A. C. de, Regitano-d'Arce, M. A. B., Rasera, G. B., Canniatti-Brazaca, S. G., Silva, L. do P., Alvarenga, V. O., ... Shahidi, F. (2017). Phenolic acids and flavonoids of peanut by-products: Antioxidant capacity and antimicrobial effects. *Food Chemistry*, 237, 538–544. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.05.046>
- Duo, J., Ying, G. G., Wang, G. W., & Zhang, L. (2012). Quercetin inhibits human breast cancer cell proliferation and induces apoptosis via Bcl-2 and Bax regulation. *Molecular Medicine Reports*, 5(6), 1453–1456. <https://doi.org/10.3892/mmr.2012.845>
- Fantini, M., Benvenuto, M., Masuelli, L., Frajese, G. V., Tresoldi, I., Modesti, A., & Bei, R. (2015). In vitro and in vivo antitumoral effects of combinations of polyphenols, or polyphenols and anticancer drugs: Perspectives on cancer treatment. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(5), 9236–9282. <https://doi.org/10.3390/ijms16059236>
- Frezza, C., Cipolat, S., & Scorrano, L. (2007). Organelle isolation: Functional mitochondria from mouse liver, muscle and cultured fibroblasts. *Nature Protocols*, 2(2), 287–295. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.478>
- Furman, B. L. (2015). Streptozotocin-Induced Diabetic Models in Mice and Rats. *Current Protocols in Pharmacology*, 70, 5.47.1-5.47.20. <https://doi.org/10.1002/0471141755.ph0547s70>
- Gambato, G., Pavão, E. M., Chilanti, G., Fontana, R. C., Salvador, M., & Camassola, M. (2018). Pleurotus albidus Modulates Mitochondrial Metabolism Disrupted by Hyperglycaemia in EA.hy926 Endothelial Cells. *BioMed Research International*, 19(2018). <https://doi.org/10.1155/2018/2859787>
- Giacco, F., & Brownlee, M. (2010). Oxidative stress and diabetic complications. *Circulation Research*, 107(9), 1058–1070. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.110.223545>
- Hirschey, M. D., Shimazu, T., Huang, J. Y., Schwer, B., & Verdin, E. (2011). SIRT3 regulates mitochondrial protein acetylation and intermediary metabolism. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 76, 267–277. <https://doi.org/10.1101/sqb.2011.76.010850>
- Kim, H. S., Quon, M. J., & Kim, J. a. (2014). New insights into the mechanisms of polyphenols beyond antioxidant properties; lessons from the green tea polyphenol, epigallocatechin 3-gallate. *Redox Biology*, 2(1), 187–195. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2013.12.022>
- Lorenzi, H.; Bacher, I.; Lacerda, M.; Sartori, S. (2000). *Brazilian fruits and cultivated exotics (for consumin in natura)*. Nova Odessa, Brazil: Instituto Plantarum de Estudos da Flora. 667p.
- Li, A., Liu, Q., Li, Q., Liu, B., Yang, Y., & Zhang, N. (2018). Berberine Reduces Pyruvate-driven Hepatic Glucose Production by Limiting Mitochondrial Import of Pyruvate through Mitochondrial Pyruvate Carrier 1. *EBioMedicine*, 34, 243–255.

<https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2018.07.039>

- Li, Y., Liu, T., Liao, S., Li, Y., Lan, Y., Wang, A., ... He, B. (2015). A mini-review on Sirtuin activity assays. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 467(3), 459–466. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.09.172>
- Lin, D., Xiao, M., Zhao, J., Li, Z., Xing, B., Li, X., ... Chen, S. (2016). An overview of plant phenolic compounds and their importance in human nutrition and management of type 2 diabetes. *Molecules*, 21(10), 1–19. <https://doi.org/10.3390/molecules21101374>
- Maiese, K. (2015). New insights for oxidative stress and diabetes mellitus. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2015, 46–49. <https://doi.org/10.1155/2015/875961>
- Musatov, A., & Robinson, N. C. (2012). Susceptibility of mitochondrial electron-transport complexes to oxidative damage. Focus on cytochrome c oxidase. *Free Radical Research*, 46(11), 1313–1326. <https://doi.org/10.3109/10715762.2012.717273>
- Mustata, G. T., Rosca, M., Biemel, K. M., Reihl, O., Smith, M. a, Viswanathan, A., ... Monnier, V. M. (2005). Paradoxical effects of green tea (*Camellia sinensis*) and antioxidant vitamins in diabetic rats: improved retinopathy and renal mitochondrial defects but deterioration of collagen matrix glycoxidation and cross-linking. *Diabetes*, 54(2), 517–526.
- Neves, N. D. A., Stringheta, P. C., Gómez-alonso, S., & Hermosín-Gutiérrez, I. (2018). Flavonols and ellagic acid derivatives in peels of different species of jabuticaba (*Plinia* spp.) identified by HPLC-DAD-ESI/MSn. *Food Chemistry*, 30(252), 61–71. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.01.078>
- Newman, D. J., & Cragg, G. M. (2016). Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. *Journal of Natural Products*, 79(3), 629–661. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.5b01055>
- Nogueiras, R., Habegger, K. M., Chaudhary, N., Finan, B., Banks, A. S., Dietrich, M. O., ... Tschop, M. H. (2012). Sirtuin 1 and Sirtuin 3: Physiological Modulators of Metabolism. *Physiological Reviews*, 92(3), 1479–1514. <https://doi.org/10.1152/physrev.00022.2011>
- Ogurtsova, K., Rocha, J. D., Huang, Y., Linnenkamp, U., & Guariguata, L. (2017). IDF Diabetes Atlas : Global estimates for the prevalence of diabetes for 2015 and 2040. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 128, 40–50. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2017.03.024>
- Omotayo, E. O., Gurtu, S., Sulaiman, S. A., Wahab, M. S., K.N.S, S., & Salleh, S. (2010). Hypoglycemic and Antioxidant Effects of Honey Supplementation in Streptozotocin-induced Diabetic Rats. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*, 80(1), 74–82. <https://doi.org/10.1024/0300-9831/a000008>
- Picklo, M. J., Amarnath, V., McIntyre, J. O., Graham, D. G., & Montine, T. J. (1999). 4-Hydroxy-2(E)-nonenal inhibits CNS mitochondrial respiration at multiple sites. *Journal of Neurochemistry*, 72(4), 1617–1624. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1999.721617.x>

- Pisoschi, A. M., & Pop, A. (2015). The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 97, 55–74. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.04.040>
- Radenković, M., Stojanović, M., & Prostran, M. (2016). Experimental diabetes induced by alloxan and streptozotocin: The current state of the art. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 78, 13–31. <https://doi.org/10.1016/j.vascn.2015.11.004>
- Rato, L., Duarte, A. I., Tomás, G. D., Santos, M. S., Moreira, P. I., Socorro, S., ... Oliveira, P. F. (2014). Pre-diabetes alters testicular PGC1- α /SIRT3 axis modulating mitochondrial bioenergetics and oxidative stress. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1837(3), 335–344. <https://doi.org/10.1016/j.bbabbio.2013.12.008>
- Raza, H., Prabu, S. K., John, A., & Avadhani, N. G. (2011). Impaired mitochondrial respiratory functions and oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats. *International Journal of Molecular Sciences*, 12(5), 3133–3147. <https://doi.org/10.3390/ijms12053133>
- Rocha, J., Eduardo-Figueira, M., Barateiro, A., Fernandes, A., Brites, D., Bronze, R., ... Sepodes, B. (2015). Anti-inflammatory effect of rosmarinic acid and an extract of rosmarinus officinalis in rat models of local and systemic inflammation. *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology*, 116(5), 398–413. <https://doi.org/10.1111/bcpt.12335>
- Sacchet, C., Mocelin, R., Sachett, A., Bevilaqua, F., Chitolina, R., Kuhn, F., ... Piato, A. L. (2015). Antidepressant-Like and Antioxidant Effects of *Plinia trunciflora* in Mice. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2015, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2015/601503>
- Sandoval-Acuña, C., Ferreira, J., & Speisky, H. (2014). Polyphenols and mitochondria: An update on their increasingly emerging ROS-scavenging independent actions. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1(5), 75–90. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2014.05.017>
- Sivitz, W. I., & Yorek, M. A. (2010). Mitochondrial Dysfunction in Diabetes: From Molecular Mechanisms to Functional Significance and Therapeutic Opportunities. *Antioxidants & Redox Signaling*, 12(4), 537–577. <https://doi.org/10.1089/ars.2009.2531>
- Spinazzi, M., Casarin, A., Pertegato, V., Salviati, L., & Angelini, C. (2012). Assessment of mitochondrial respiratory chain enzymatic activities on tissues and cultured cells. *Nature Protocols*, 7(6), 1235–1246. <https://doi.org/10.1038/nprot.2012.058>
- Sobral, M., Proença, C., Souza, M., Mazine, F., Lucas, E. (2012). *Myrtaceae* in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro.
- Tiwari, B. K., Pandey, K. B., Abidi, A. B., & Rizvi, S. I. (2013). Markers of Oxidative Stress during Diabetes Mellitus. *Journal of Biomarkers*, 2013, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2013/378790>
- Tohma, H., Köksal, E., Kılıç, Ö., Alan, Y., Yılmaz, M., Gülçin, İ., ... Alwasel, S. (2016). RP-HPLC/MS/MS Analysis of the Phenolic Compounds, Antioxidant and Antimicrobial Activities of *Salvia* L. Species. *Antioxidants*, 5(38), 1–15. <https://doi.org/10.3390/antiox5040038>

- Ullah, A., Khan, A., & Khan, I. (2016). Diabetes mellitus and oxidative stress — A concise review. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 24(5), 547–553. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2015.03.013>
- Vassilopoulos, A., Pennington, J. D., Andresson, T., Rees, D. M., Bosley, A. D., Fearnley, I. M., ... Gius, D. (2014). SIRT3 Deacetylates ATP Synthase F₁ Complex Proteins in Response to Nutrient- and Exercise-Induced Stress. *Antioxidants & Redox Signaling*, 21(4), 551–564. <https://doi.org/10.1089/ars.2013.5420>
- Volpe, C. M. O., Villar-Delfino, P. H., Anjos, P. M. F. dos, & Nogueira-Machado, J. A. (2018). Cellular death , reactive oxygen species (ROS) and diabetic complications. *Cell Death & Disease*, 9(2), 1–9. <https://doi.org/https://doi.org/10.2337/diabetes.54.2.517>
- Wada, J., & Nakatsuka, A. (2016). Mitochondrial dynamics and mitochondrial dysfunction in diabetes. *Acta Medica Okayama*, 70(3), 151–158. <https://doi.org/10.17925/USE.2010.06.1.20>
- Wills, E. D. (1966). Mechanisms of lipid peroxide formation in animal tissues. *The Biochemical Journal*, 99(3), 667–676.
- Wu, J., Luo, X., Thangthaeng, N., Sumien, N., Chen, Z., Rutledge, M. A., ... Yan, L. J. (2017). Pancreatic mitochondrial complex I exhibits aberrant hyperactivity in diabetes. *Biochemistry and Biophysics Reports*, 11(6), 119–129. <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2017.07.007>
- Wu, S., Dastmalchi, K., Long, C., & Kennelly, E. J. (2012). Metabolite Profiling of Jaboticaba (*Myrciaria cauliflora*) and Other Dark-Colored Fruit Juices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(30), 7513–7525. <https://doi.org/10.1021/jf301888y>
- Yu, L., Gong, B., Duan, W., Fan, C., Zhang, J., Li, Z., ... Wang, H. (2017). Melatonin ameliorates myocardial ischemia/reperfusion injury in type 1 diabetic rats by preserving mitochondrial function: Role of AMPK-PGC-1 α -SIRT3 signaling. *Scientific Reports*, 7(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/srep41337>
- Zhang, H., Zhang, H. M., Wu, L. P., Tan, D. X., Kamat, A., Li, Y. Q., ... Zhang, B. X. (2011). Impaired mitochondrial complex III and melatonin responsive reactive oxygen species generation in kidney mitochondria of db/db mice. *Journal of Pineal Research*, 51(3), 338–344. <https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2011.00894.x>

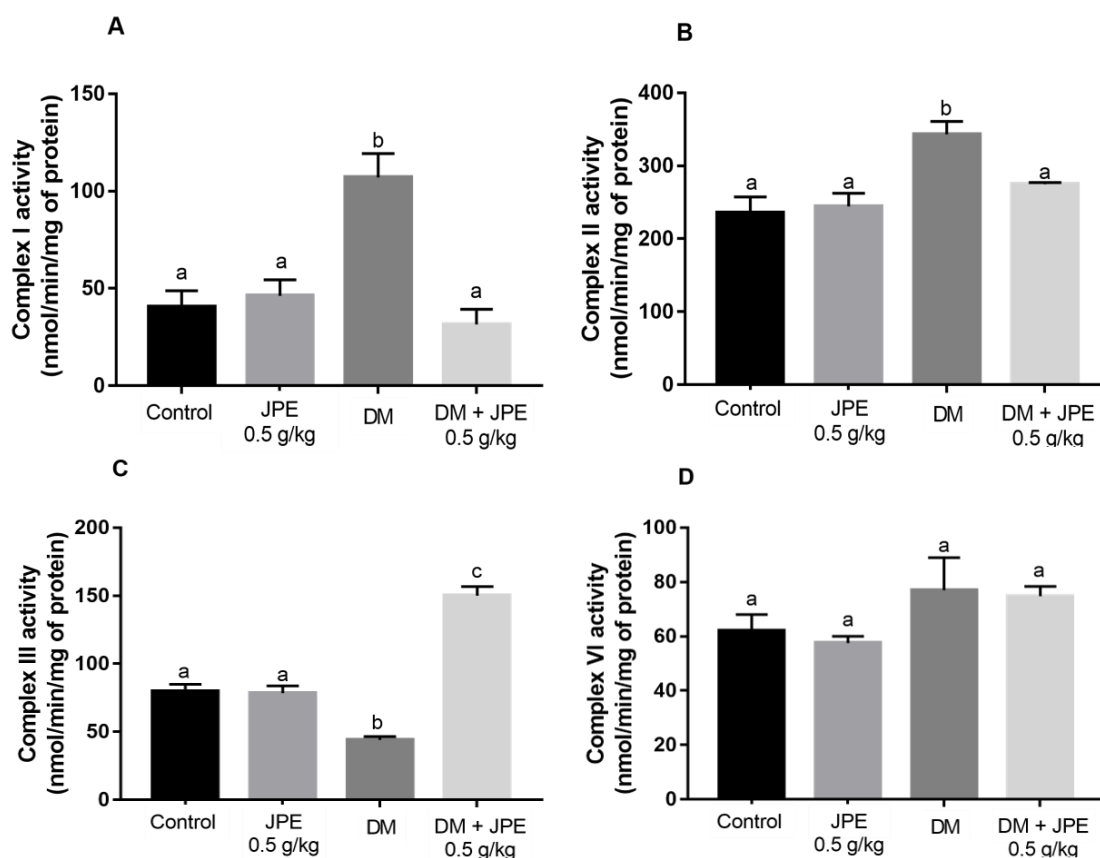


Figure 1. Activity of complexes I (A), II (B), III (C) and IV (D) of the liver mitochondrial electron transport chain of healthy (control group) and diabetic rats (DM) treated with or without 0.5 g/kg jabuticaba peel extract (JPE). Data are presented as mean and standard error (SE) (n = 5 to 6 rats/group). Different letters indicate significant statistical difference through analysis of variance (ANOVA) with Tukey post-hoc test. Statistical significance of $p < 0.05$.

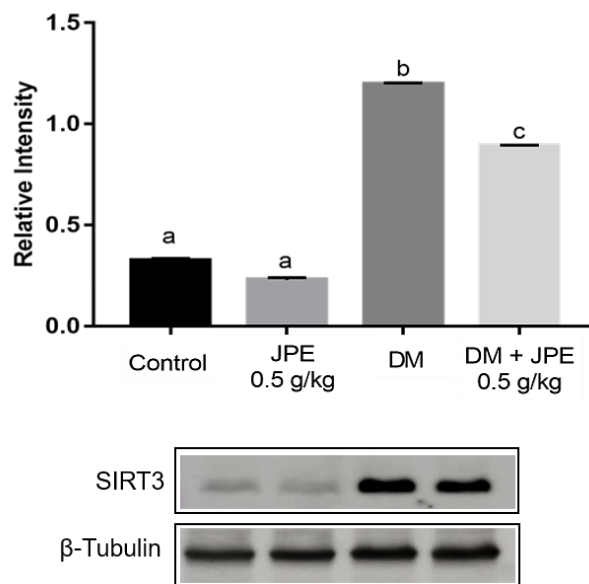


Figure 2. Expression of SIRT3 in liver of healthy (control group) or diabetic (DM) rats treated with or without 0.5 g/kg of jabuticaba peel extract (JPE). Data are presented as mean and standard error (SE) of at least three replicates. Different letters indicate significant statistical difference through analysis of variance (ANOVA) with Tukey post hoc test. Statistical significance of $p < 0.05$.

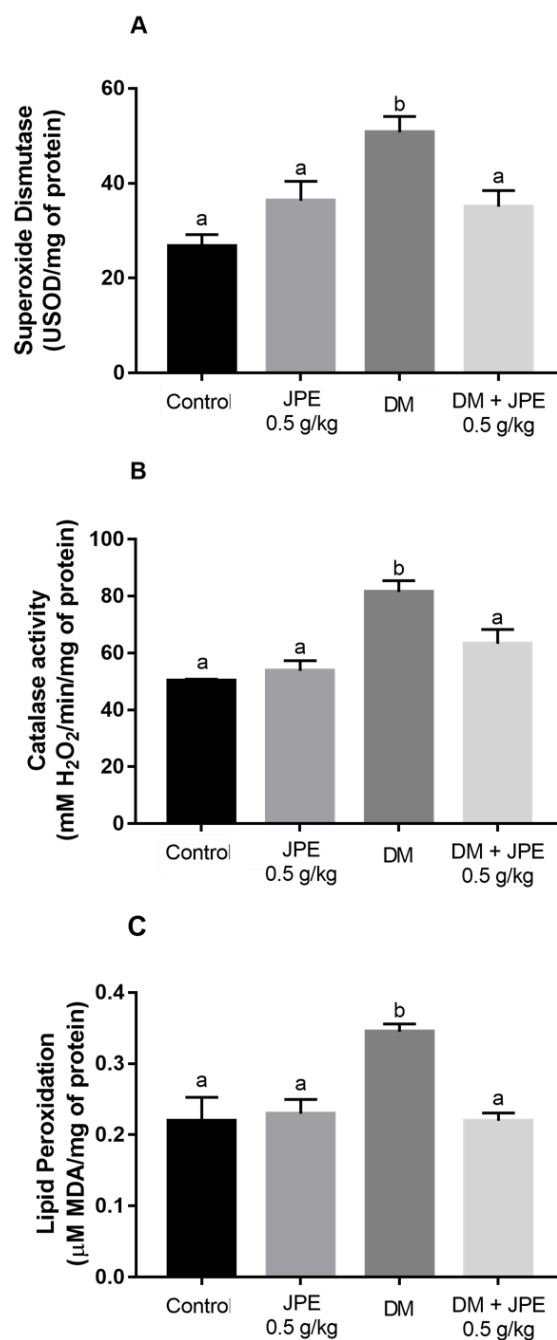


Figure 3. Superoxide dismutase (A) and catalase (B) activity and lipid peroxidation levels (C) in liver of healthy (control group) or diabetic (DM) rats treated with or without 0.5 g/kg of jabuticaba peel extract (JPE). Data are presented as mean and standard error (SE) (n = 5 to 6 rats/group). Different letters indicate significant statistical difference through analysis of variance (ANOVA) with Tukey post-hoc test. Statistical significance of $p < 0.05$.

5. DISCUSSÃO GERAL

A prevalência de DM tem aumentado significativamente no Brasil e no mundo nos últimos anos, o que a torna uma doença epidêmica (Duncan *et al.*, 2017; Ogurtsova *et al.*, 2017). A hiperglicemia é uma característica comum do DM, independente da causa, se por uma deficiência de insulina ou uma resistência a ação do hormônio. E justamente por não apresentar sintomatologia significativa, um dos grandes problemas relacionados a doença são as alterações que se desenvolvem de forma lenta e gradativa em diversos órgãos e tecidos. Independentemente do tipo de DM, a hiperglicemia crônica é o principal fator de risco para o desenvolvimento de complicações (Marcovecchio, 2017).

Estudos já demonstraram que a hiperglicemia pode levar ao desenvolvimento de estresse oxidativo, principalmente em células não insulino dependente, as quais estão constantemente expostas a altos níveis de glicose. Isso faz com que essas células sejam as mais suscetíveis a alterações e, conseqüentemente, mais propensas a apresentarem complicações relacionadas ao DM (Ullah *et al.*, 2016; Lunder *et al.*, 2018). Alguns estudos inclusive indicam que mesmo após o controle glicêmico, o estresse oxidativo pode persistir (Dal *et al.*, 2016; Gadjeva *et al.*, 2017; Costantino *et al.*, 2017; Testa *et al.*, 2017; Rodrigues *et al.*, 2018). Com isso, tem aumentado o interesse pelos compostos fenólicos como possíveis compostos com capacidade de proteger contra os danos oxidativos e, desta forma, minimizar o desenvolvimento de complicações do DM.

A jabuticaba é considerada um alimento funcional por conter além de macronutrientes e micronutrientes, fitonutrientes em quantidades significativas, sobretudo compostos fenólicos, os quais se concentram principalmente na casca. Além disso, estudos já demonstraram diversas atividades biológicas importantes para essa fruta, principalmente das espécies *P. cauliflora* e *P. jaboticaba*. Entretanto, poucos estudos investigaram o potencial biológico da espécie *P. trunciflora*. Portanto, considerando este

contexto, este estudo buscou avaliar a composição química e os efeitos do extrato aquoso de casca de jabuticaba (JPE) (*P. trunciflora*) em marcadores bioquímicos, hematológicos, função mitocondrial, expressão de SIRT3 e parâmetros de estresse oxidativo no soro e no fígado de ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina.

Para o estudo dos efeitos do JPE sobre parâmetros metabólicos e de estresse oxidativo relacionados ao DM, foram utilizados ratos machos nos quais o DM foi induzido por meio de injeção intraperitoneal de estreptozotocina (STZ). A STZ é um antibiótico de amplo espectro que possui propriedade diabetogênica. Essa propriedade é caracterizada pela destruição seletiva das células β pancreáticas, já que a STZ é reconhecida pelo GLUT2, abundante neste tipo de células. Assim, a STZ causa deficiência de insulina pela morte das células β e, conseqüente hiperglicemia, polidipsia e poliúria, que imitam o DM1 humano (Wu & Huan, 2008; Wu & Yan, 2015). Por isso, a STZ é amplamente utilizada para indução de diabetes experimental em roedores (Szkudelski, 2001; Radenković, 2016). Após a indução do DM com STZ, os ratos receberam 0,5g/kg de peso de JPE, administrado através de gavagem, durante 30 dias.

Nossos resultados mostraram que após a indução do DM com STZ, houve um aumento significativo da glicemia dos ratos, sendo que ao final dos 30 dias de tratamento, os ratos com DM apresentaram níveis de glicose cerca de 5 vezes mais altos em relação aos animais saudáveis. Após os 30 dias de tratamento com o JPE nos ratos com DM, não foi observada alteração da hiperglicemia. Este resultado era esperado, já que, considerando a concentração de STZ utilizada e os níveis de glicose sérica nos ratos diabéticos, seria muito difícil reverter esse efeito.

Dentre as principais complicações que podem ser desenvolvidas em consequência da hiperglicemia presente no DM estão as alterações da função renal. Indivíduos com DM têm chances quase 2 vezes maiores de desenvolver doença renal do que aqueles sem DM

(Ene-Iordache *et al.*, 2016). Estudos demonstram que o estresse oxidativo está associado a disfunção e morte de células endoteliais glomerulares e que essa alteração está relacionada com a doença renal no DM (Daehn *et al.*, 2017). Para a avaliação da função renal, os níveis de creatinina e ureia são amplamente utilizados, já que os rins são a via de excreção desses compostos e, quando há doença renal, esses marcadores se acumulam no soro. Em nosso estudo, observou-se que apenas um dos marcadores de função renal avaliados, a ureia, apresentou-se significativamente aumentada no soro dos ratos diabéticos, sendo que houve um aumento de cerca de 33 % nestes níveis em relação aos animais saudáveis. A suplementação com JPE não alterou os níveis de ureia dos ratos com DM. Por outro lado, os níveis de creatinina apresentaram uma tendência a aumentar. Entretanto, não foi observada diferença estatística significativa entre os valores apresentados pelos animais com DM e os animais do grupo controle. Da mesma forma, a suplementação com JPE não alterou os níveis deste marcador nos ratos diabéticos. Considerando que os níveis de creatinina estão diretamente relacionados à quantidade de massa muscular e há uma perda significativa de massa muscular no DM1 não tratado, a diminuição na massa muscular dos ratos pode ter levado a uma menor formação de creatinina (Patel *et al.*, 2013). Além disso, o tempo de duração do DM também pode influenciar os níveis de creatinina já que pode levar anos para que ocorra o desenvolvimento de nefropatia diabética (Lim, 2014). Desta forma, um mês poderia ser um período curto para induzir a nefropatia diabética e alterar dos níveis de creatinina de forma proeminente.

Além dos rins, o fígado está entre os principais órgãos suscetíveis aos efeitos do estresse oxidativo induzido pela hiperglicemia, o que, por sua vez, pode levar à lesão do tecido hepático e, consequentemente, a disfunção do órgão (Mohamed *et al.*, 2016). As

alterações hepáticas são mais proeminentes em pacientes que apresentam DM1 com controle glicêmico ineficiente (Al-Hussaini *et al.*, 2012; Barros *et al.*, 2017). Estudos indicam que o DM está associado a uma variedade de alterações hepáticas, como, por exemplo, doença hepática gordurosa não alcoólica e elevação anormal de enzimas hepáticas (Mohamed *et al.*, 2016). No DM1, a deficiência de insulina induz a ativação da lipase hormônio sensível no tecido adiposo, o que leva a um aumento da lipólise e consequente liberação de ácidos graxos livres na circulação e que, posteriormente poderão acumular no fígado, causando dano. Além disso, os níveis de enzimas hepáticas podem apresentar-se alterados. Portanto, para a avaliação da função hepática, este estudo determinou os níveis das enzimas AST e ALT. Foi observado um aumento significativo dos níveis plasmáticos da enzima ALT, de cerca de três vezes o valor apresentado pelo grupo controle, demonstrando que o DM induziu algum grau de dano hepático. O tratamento dos ratos diabéticos com JPE apresentou uma tendência em induzir a diminuição dos níveis da enzima, entretanto, não foi observada diferença estatística significativa. Por outro lado, em relação aos níveis da enzima AST, foi observada uma resposta distinta, ou seja, os ratos diabéticos não apresentaram elevação significativa dos níveis desta enzima. Adicionalmente, o tratamento dos ratos com DM com o JPE também não causou modificações dos níveis séricos desta mesma enzima. A magnitude da elevação da ALT é geralmente maior do que a AST, isso porque, a meia-vida da ALT é mais longa e AST tem maior fração mitocôndrial (Aulbach & Amuzie, 2017). Além disso, geralmente pacientes com esteatose hepática não alcoólica apresentam níveis de ALT elevados de forma mais proeminente do que os níveis de AST (Mohamed *et al.*, 2016), o que explica, ao menos parcialmente, os resultados encontrados em nosso estudo. Os ratos saudáveis que receberam JPE não apresentaram alteração dos níveis das enzimas AST e ALT, demonstrando que o JPE não foi hepatotóxico.

Além dos danos renais e hepáticos, conforme já citado anteriormente, a deficiência de insulina, característica de DM1, também acarreta grandes alterações no metabolismo de lipídeos. A falta de insulina leva à uma redução da atividade da enzima lipase lipoproteica na superfície luminal das células endoteliais capilares, fazendo com que as lipoproteínas ricas em triglicérides (quilomícrons, VLDLs) concentrem-se no plasma, levando à hipertrigliceridemia (Vergès, 2015). Além disso, o DM1 não tratado exibe um aumento no influxo de ácidos graxos livres do tecido adiposo para o sangue, devido a ativação da enzima lipase hormônio sensível deste tecido pela ausência de insulina. Adicionalmente a isso, a deficiência de insulina diminui a expressão de receptores de colesterol LDL, o que também leva a maior concentração desta molécula no plasma (Duvillard *et al.*, 2003). Assim, em nosso estudo os níveis de triglicerídeos (TG), colesterol total (CT), colesterol HDL e não-HDL foram determinados. Observou-se um aumento significativo dos níveis de TG, CT e não-HDL no soro dos ratos diabéticos. A suplementação com JPE durante 30 dias foi capaz de reduzir de forma significativa em cerca de 50, 25 e 40 % níveis de TG, CT e não-HDL, respectivamente. A redução dos níveis de TG induzida pelo JPE é semelhante à observada em fármacos utilizados em tratamentos convencionais, como, por exemplo, os fibratos, que reduzem as taxas séricas de TG de 30 a 60 % (Faludi *et al.*, 2017). Além disso, um estudo realizado por Sheng *et al* (2012) mostrou que o uso de estatinas em pacientes diabéticos reduz os níveis de CT em 20-28 %, valores semelhantes aos apresentados pelo JPE. Além disso, o JPE foi capaz de induzir aumento dos níveis de HDL, tanto nos ratos saudáveis quanto nos ratos diabéticos, em cerca de 20 e 17 %, respectivamente. Diversos estudos têm demonstrado a capacidade de compostos fenólicos em reduzir os níveis de lipídios plasmáticos e vários mecanismos têm sido propostos para esse efeito. Estudo de Nekohashi *et al.* (2014) sugere que compostos fenólicos como a luteolina e a quercetina diminuem os níveis de colesterol

plasmático ao inibir o transportador de colesterol intestinal NPC1L1 em cultura de células Caco-2 e em ratos. Diversos estudos demonstraram ainda a capacidade de compostos fenólicos em inibir enzimas digestivas como lipase pancreática, fosfolipase A2, colesterol esterase pancreática e, assim, diminuir a absorção de lipídios no intestino (Sugiyama *et al.*, 2007; Adisakwattana *et al.*, 2010; Gu *et al.*, 2011; Hassan, 2014; Cires *et al.*, 2017). Além disso, estudos têm demonstrado a capacidade de compostos fenólicos de inibir a solubilidade de micelas do colesterol e, desta forma, inibir a absorção deste lipídeo (Su *et al.*, 2015; Ogawa *et al.*, 2016). Nosso estudo também demonstrou a capacidade do JPE em inibir a enzima lipase pancreática o que poderia explicar, ao menos em parte, a redução de triglicerídeos plasmáticos induzida pelo JPE. Alezandro *et al.* (2013) atribui a redução dos lipídeos plasmáticos, observada nos ratos diabéticos tratados com jaboticaba liofilizada (*M. jaboticaba*), à presença de fibras. Entretanto, cabe ressaltar que o JPE utilizado em nosso estudo não contém fibras. Portanto, o efeito de redução de lipídeos plasmáticos observado em nosso estudo pode ser atribuído, ao menos em parte, aos polifenóis presentes no JPE.

Estudos também já demonstraram a capacidade de compostos fenólicos obtidos a partir de diferentes fontes, como chá verde, azeitonas, arroz e frutas, de reduzir colesterol e triglicerídeos plasmáticos através da regulação da expressão de genes, como o de PPAR- α , fatores de transcrição que modulam o metabolismo energético no fígado, tecido adiposo e músculo (Kim *et al.*, 2010; Jang *et al.*, 2012; Tian *et al.*, 2013; Kim *et al.*, 2014).

A dislipidemia é um fator de risco já bastante conhecido para doenças cardiovasculares. Além disso, essas doenças são a principal complicação e causa de mortalidade em pacientes diabéticos (Leon & Maddox, 2015). Desta forma, considerando o potencial dos compostos fenólicos em regular digestão, absorção e metabolismo de lipídeos, esses compostos podem ser uma alternativa para a prevenção de uma das princi-

pais complicações relacionadas ao DM.

Além das alterações relacionadas ao DM já mencionadas, estudos têm demonstrado que pacientes com diabetes apresentam maior ocorrência de infecções comuns como cistite, pneumonia, tuberculose, infecções de pele e mucosas (Shah & Hux, 2003; Muller *et al.*, 2005; Benfield *et al.*, 2007; Casqueiro *et al.*, 2012; Dryden *et al.*, 2015). Este fato pode estar relacionado a alterações do sistema imune durante o DM. Em nosso estudo observou-se uma diminuição significativa da contagem de linfócitos e leucócitos totais nos animais do grupo DM. De fato, outros estudos têm demonstrado que a hiperglicemia crônica em conjunto com cetoacidose leva a redução da proliferação de linfócitos por suprimir a resposta de estimulação e aumentar o estresse oxidativo e a apoptose nessas células (Rubinstein *et al.*, 2008; Daoud *et al.*, 2009; Muller *et al.*, 2011). Adicionalmente, pesquisas têm demonstrado defeitos nas atividades quimiotáticas, fagocíticas e microbicidas de neutrófilos em indivíduos com DM (Alba-Loureiro *et al.*, 2007; Daoud *et al.*, 2009). Em nosso estudo, quando os ratos diabéticos foram tratados com JPE, observou-se um aumento significativo da contagem de linfócitos e leucócitos, fazendo com que o número de células retornasse para valores semelhantes aos do grupo controle. Esse efeito do JPE sobre as células do sistema imune pode ser atribuído, ao menos em parte, aos compostos fenólicos presentes no extrato. Alguns poucos estudos demonstraram que estes compostos apresentam essa capacidade. Karasawa *et al.* (2011) mostraram que o extrato de tâmaras administrado em camundongos por 30 dias induziu um aumento de células imunocompetentes, incluindo linfócitos T, células natural killer (NK), macrófagos e células dendríticas na placa de Peyer e no baço. Em outro estudo de John *et al.* (2011), foi demonstrado que os compostos fenólicos de *Cassia auriculata* melhoraram a proliferação de linfócitos T em ratos idosos. Além disso, 14 dias de suplementação com sucos ricos em flavonoides e antocianinas, obtidos através de uma

mistura de frutas, aumentou a proliferação de linfócitos *ex vivo* e atividade das células NK em humanos (Bub *et al.*, 2003; Ding *et al.*, 2018).

Considerando que foram obtidos resultados promissores em relação ao efeito do JPE sobre a hiperlipidemia e na restauração do sistema imune de ratos diabéticos, esses resultados deram origem a um depósito de patente (ANEXO I)

Uma série de estudos já demonstrou a presença de estresse oxidativo durante o DM (Giacco & Brownle, 2010; Bajaj & Khan, 2012; Chikezie *et al.*, 2015; Ullah *et al.*, 2016). De fato, em nosso estudo também foi observada a presença de estresse oxidativo aumentado nos ratos diabéticos, através do aumento significativo de danos oxidativos a proteínas e lipídios, tanto no soro quanto no fígado. Além disso, observou-se uma desregulação da atividade das enzimas antioxidantes SOD e CAT. No soro dos ratos diabéticos, a enzima SOD apresentou-se aumentada, demonstrando, de forma indireta, que pode ter ocorrido um aumento da produção de O_2^- , levando a uma resposta adaptativa da enzima numa tentativa de eliminar o excesso de O_2^- . Outros estudos já levantaram essa hipótese, sendo que Aksoy *et al.* (2004) e Niture *et al.* (2014) afirmam que o aumento de SOD pode ser um mecanismo compensatório em resposta ao aumento prolongado de superprodução de O_2^- . O aumento da atividade de SOD pode levar a um aumento na geração de H_2O_2 , o qual, por sua vez, é degradado pela enzima CAT. Neste estudo, foi observada uma diminuição da atividade da enzima CAT no soro dos animais diabéticos, o que pode ser responsável, em parte, pelo aumento do estresse oxidativo. Uma superprodução de H_2O_2 , além da capacidade de metabolização de CAT, pode causar danos a essa enzima e, conseqüentemente, levar a uma diminuição em sua atividade (Omotayo *et al.*, 2010). Por outro lado, observou-se que ambas as enzimas se apresentaram aumentadas no fígado dos ratos diabéticos. Desta forma, parece que o aumento da atividade da SOD e CAT não é necessariamente protetora, mas sim uma res-

posta compensatória para eliminar o excesso de O_2^- e H_2O_2 , considerando que, mesmo aumentadas, as enzimas não preveniram os danos oxidativos aos lipídios, os quais apresentaram-se aumentados também no fígado dos ratos diabéticos.

Tem sido indicado que a principal fonte de geração de EROs durante o DM é a mitocôndria. Autores como Raza *et al.* (2011) e Blake & Trounce (2013) afirmam que o aumento de substratos energéticos disponíveis nas células hepáticas de ratos diabéticos, principalmente glicose e ácidos graxos, pode levar a um aumento da fosforilação oxidativa na CTE. O aumento do fluxo de elétrons da CTE juntamente com uma disfunção dos complexos mitocondriais levaria a um aumento da produção de O_2^- , através do escape de elétrons da cadeia, os quais reagem com o O_2 . De fato, o presente estudo observou uma disfunção da atividade dos complexos da CTE no fígado, sendo que os ratos diabéticos apresentaram um aumento significativo da atividade dos CI e II e uma diminuição significativa da atividade do CIII em relação ao grupo controle. A atividade do CIV não apresentou alterações. Outros estudos também mostraram que há uma disfunção da CTE de ratos diabéticos. Raza *et al.* (2011) demonstraram que há um aumento significativo na atividade de CI e CII e uma redução na atividade de CIII e CIV no fígado de ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina. Zhang *et al.* (2011) também observaram uma redução significativa na atividade do CIII da CTE no rim de camundongos diabéticos, acompanhados por uma hiperatividade do CI. A atividade do CIII reduzida em conjunto com os CI e CII aumentados pode ser a principal causa do aumento de geração de O_2^- e, conseqüentemente, a causa da alteração da atividade das enzimas antioxidantes e do aumento dos danos oxidativos observados em nosso estudo.

Quando os ratos diabéticos foram tratados com o JPE, observou-se que este foi capaz de modular a atividade da CTE, já que houve diminuição da atividade dos CI e CII, com os valores retornando ao nível basal e, por outro lado, um aumento da atividade do

CIII. Corroborando com nossos dados, Gambato *et al.* (2018) demonstraram um aumento na atividade do CI em células endoteliais expostas a hiperglicemia e o tratamento com extrato de *Pleurotus albidus*, rico em compostos fenólicos, foi capaz de fazer com que a atividade do CI retornasse aos níveis basais. Estudo de Pajuelo *et al.* (2012), demonstrou que o extrato de proantocianidinas de semente de uva foi capaz de modular a atividade mitocondrial do tecido adiposo marrom de ratos com obesidade induzida através da dieta. Os mecanismos exatos através dos quais os compostos fenólicos levam à redução da atividade dos CI e CII não estão totalmente compreendidos. Concomitantemente com a regulação da atividade dos complexos da CTE, observou-se que o JPE também modulou a atividade das enzimas antioxidantes, reduzindo a atividade de SOD e aumentando a atividade de CAT no soro e reduzindo a atividade das duas enzimas no fígado. A diminuição da atividade das enzimas pode ser explicada por uma redução na produção de O_2^- na CTE o que, conseqüentemente, levou a uma menor geração de H_2O_2 . De fato, foi observado em nosso estudo uma redução nos danos oxidativos a lipídios e a proteínas, tanto no soro quanto no fígado dos ratos que receberam a suplementação de JPE. Estudo de Omotayo *et al.* (2009) também demonstrou que a suplementação de ratos diabéticos com mel induziu uma diminuição na atividade da enzima SOD nos rins, concomitantemente com a redução dos níveis de malondialdeído, marcador de peroxidação lipídica. A diminuição da atividade das enzimas antioxidantes após o tratamento com o JPE poderia ser também uma resposta compensatória, já que houve um aumento da capacidade antioxidante total do plasma.

Estudos têm demonstrado que a ação dos compostos fenólicos *in vivo* vai muito além da sua capacidade direta de reduzir RL, já que as concentrações plasmáticas e intracelulares destes compostos são consideradas muito baixas para possibilitar esse efeito. Assim, a capacidade antioxidante destes compostos poderia ser explicada por di-

versos outros mecanismos, incluindo a modulação da expressão de proteínas (Serrano *et al.*, 2016). Em uma tentativa de compreender os mecanismos envolvidos com a modulação dos complexos mitocondriais e redução do estresse oxidativo observada nos ratos tratados com JPE, a expressão da proteína SIRT3 foi avaliada no tecido hepático destes animais. SIRT3 é uma proteína presente nas mitocôndrias responsável por regular várias proteínas através da desacetilação, como, por exemplo, proteínas da CTE e enzimas como a SOD, e assim regular a atividade metabólica e o estresse oxidativo nessa organela (Bause & Haigis, 2013). Os resultados mostraram uma superexpressão de SIRT3 no fígado dos ratos do grupo DM e o tratamento com o JPE resultou em uma redução significativa da expressão desta proteína. Li *et al.* (2018) também encontraram uma superexpressão de SIRT3 em hepatócitos de ratos diabéticos induzidos por dieta rica em gordura.

Considerando que SIRT3 é responsável pela regulação dos complexos mitocondriais, este aumento na expressão de SIRT3 corrobora com o aumento observado na atividade do CI e CII da CTE e o aumento da atividade de SOD (Bause & Haigis, 2013). Por outro lado, a superexpressão de SIRT3 não explica a redução da atividade do CIII. Portanto, nossa hipótese é que pode haver dano oxidativo especificamente nas proteínas deste complexo. Mustata *et al.* (2005) também demonstraram que ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina mostraram diminuição da atividade do CIII mitocondrial no córtex renal e sugerem que pode haver dano às proteínas através da glicação. Além disso, estudos mostraram que os aldeídos derivados da peroxidação lipídica podem levar à inibição do CIII (Picklo *et al.*, 1999). Mesmo assim, é importante que mais estudos sejam realizados para compreender essa alteração específica de atividade do CIII.

A causa do aumento da expressão de SIRT3 nos ratos diabéticos não está totalmente clara, já que a literatura apresenta dados controversos como, por exemplo, a expressão de SIRT3 diminuída neste mesmo modelo. No entanto, levantamos outra hipótese, de que a redução da atividade do CIII, mesmo com um aumento da atividade dos CI e CII, levaria a um comprometimento da produção de ATP através da fosforilação oxidativa, o que poderia sinalizar a superexpressão de SIRT3, sendo portanto, uma resposta compensatória para regular a produção de energia. De fato, Vassilopoulos *et al.* (2014) mostraram que a SIRT3 é sensível aos níveis de ATP intracelular e regula a atividade da ATP sintase. Além disso, um estudo de Wu *et al.* (2017) com ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina demonstraram que, de fato, há uma diminuição nos níveis de ATP intracelular mesmo com a presença de atividade aumentada nos complexos CTE no pâncreas. Além disso, em um estudo de Rato *et al.* (2014) também foi demonstrado um aumento na atividade do CI concomitante a uma diminuição na atividade do CIII, sendo que esta dissociação das atividades dos complexos levou ao comprometimento da formação de ATP nos testículos de ratos pré-diabéticos.

Neste estudo o JPE reduziu a expressão de SIRT3 nos ratos diabéticos e essa redução pode ser responsável, ao menos em parte, pela modulação dos complexos da CTE e, consequentemente, pela melhora dos parâmetros de estresse oxidativo. Um estudo de Li *et al.* (2018) demonstrou que a berberina, um alcalóide, levou a uma redução da expressão de SIRT3 em hepatócitos de ratos com dieta hiperlipídica. Além disso, estudo de Buler *et al.* (2012) mostrou que a metformina, um dos principais fármacos utilizados para o tratamento de DM, também induz redução da expressão de SIRT3 em cultura primária de hepatócitos e no fígado *in vivo*, sugerindo que a regulação da expressão de SIRT3 estaria envolvida nos mecanismos de ação deste fármaco.

Estudos têm demonstrado que a casca de jaboticabas, tanto da espécie *P. jaboticaba* quanto *P. cauliflora*, é especialmente rica em flavonóis, antocianinas e derivados de ácido elágico (Reynertson *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2012; Leite-Legattiet *al.*, 2012; Neves *et al.*, 2018). Entretanto, a composição química da espécie *P. trunciflora* ainda é pouco estudada. Assim, para a caracterização química do JPE, foi realizado fracionamento em coluna aberta, de acordo com metodologia descrita por Li *et al.* (2017). Para tanto, utilizou-se como fase estacionária a sílica gel 60 (0.063-0.2mm - Merck) e como eluente foi utilizado um gradiente de diferentes proporções de clorofórmio e metanol (CHCl₃/MeOH) (40:1, 30:1, 20:1, 15:1, 8:1, 6:1, 4:1, 2:1, 1:1, 1:2 e 0:1). O fracionamento inicial resultou em 58 frações. Após, realizou-se cromatografia de camada delgada (CCD) utilizando-se como fase estacionária cromatofolha de alumínio (Alugram Xtra Sil G - Sílica Gel 60), com indicador UV254 e como fase móvel uma mistura de diferentes proporções de acetato de etila, ácido fórmico, ácido acético e água (100:11:11:26 v/v) e como revelador uma solução metanólica de difenilboriloxietilamina (NP). As frações que mostraram mobilidade cromatográfica semelhante foram reunidas, resultando, ao final, em 6 subfrações (SF1-6). Posteriormente, as diferentes subfrações foram submetidas a análise de HPLC (HP modelo 1100). As análises foram realizadas em equipamento HPLC marca HP modelo 1100, coluna Lichrospher RP₁₈ (5µm) equipado com detector UV a 210nm e sistema quaternário de bombas. A análise em fase reversa foi constituída de: solvente A – água Milli-Q com 1% de ácido fosfórico e solvente B – Acetonitrila. O sistema de bombeamento da fase móvel foi gradiente, com 90% do solvente A de 0 a 5min, 60% de A de 5 a 40min e 90% de A de 45 a 50min. O fluxo padrão foi mantido a 0,5 mL/min de acordo com Morelli (2010). As amostras foram filtradas em membranas de Nylon de 0,45µm de diâmetro de poro. Os compostos fenólicos foram identificados de acordo com sua ordem de eluição e por comparação de seu tempo de retenção com aqueles

de seus padrões puros. A quantificação foi realizada pelo método de padronização externa, através da correlação da área (mAU*s) do pico do composto à curva padrão realizada com cada padrão avaliado (ácido gálico, epigallocatequina, catequina, epicatequina, epigallocatequina galato, rutina, vitexina, ácido ferulico, naringina, hesperidina, miricitina, resveratrol, quercetina e apigenina). O resultado está expresso em µg/mL de extrato.

Foi possível identificar a presença de 10 compostos fenólicos, dentre eles dois ácidos fenólicos, o ácido gálico, presente em todas as subfrações, e ferúlico, presente na SF1 e 2. Além disso, quatro flavan-3-óis também foram identificados, dentre eles, a catequina, presente nas SF1, 2, 5 e 6, epicatequina, presente nas SF1 e 5, epigallocatequina, presente nas SF3, 5 e 6, e epigallocatequina galato, presente apenas na SF1. Adicionalmente, três flavonóis foram identificados, dentre eles rutina e quercetina, presentes nas SF1 e 2, e miricitina, presente apenas na SF2. Por fim, uma flavanona, a naringina, foi identificada na SF1. Dentre os compostos indentificados, ácido gálico e ferúlico estão presentes em maior quantidade no JPE (ANEXO II). Estudo anterior de nosso laboratório já havia identificado canferol e cianidina-3-O-glicosídeo no JPE, através da análise por espectrometria de massas com ionização por electrospray (ESI-MS) (Calloni *et al.*, 2015). Além disso, estudo de Sacchet *et al* (2015), com extrato aquoso da fruta inteira, também da espécie de *P. trunciflora*, indentificou 5 antoncianinas diferentes, entre elas cianidina e malvidina e suas formas glicosiladas, além de delphinidina 3-O-glusídeo. Alezandro *et al.* (2013) já haviam relatado a presença de monômeros e dímeros de proantocianidinas na casca de outras espécies de jaboticaba (*M. jaboticaba* e *M. cauliflora*). Os flavonóis, rutina, quercetina e miricitina, também já haviam sido identificados para a espécie *M. cauliflora*, em estudo de Reynertson *et al.* (2006). Já o

composto naringina não havia sido relatado em nenhum outro estudo de composição química da jabuticaba.

Juntos, os resultados apresentados neste estudo demonstram os importantes efeitos biológicos do JPE como a capacidade hipolipemiante, a capacidade de modulação do sistema imune, modulação dos complexos mitocondriais através da regulação de SIRT3 e redução de parâmetros de estresse oxidativo em modelo *in vivo* de diabetes. Assim, o JPE torna-se uma fonte importante de compostos fenólicos com potencial alternativa para um possível tratamento das complicações causadas pelo DM. Obviamente, mais estudos são necessários para elucidar completamente os mecanismos de ação sugeridos neste estudo.

6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste estudo permitem concluir que:

- 1.1. A análise de cromatografia líquida de alta eficiência permitiu a indentificação de 10 compostos fenólicos, dentre eles dois ácidos fenólicos (ácido gálico e ferúlico), quatro flavan-3-óis, (catequina, epicatequina, epigallocatequina e epigallocatequina galato), três flavonóis (rutina, quercetina e miricitina) e uma flavanona (naringina);
- 1.2. O tratamento dos ratos diabéticos com JPE não causou alteração sobre os níveis séricos de glicose, ureia, creatinina e das enzimas hepáticas AST e ALT;
- 1.3. O JPE foi capaz de induzir a redução significativa dos níveis de triglicerídeos e colesterol total e não-HDL dos ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina;
- 1.4. O JPE apresentou capacidade de inibição da enzima lipase pancreática;
- 1.5. Tanto os ratos saudáveis quanto os ratos diabéticos tratados com JPE apresentaram um aumento significativo dos níveis de colesterol HDL;
- 1.6. O JPE restaurou a contagem de linfócitos e leucócitos totais nos ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina;
- 1.7. O tratamento com JPE foi capaz de modular a atividade das enzimas antioxidantes SOD e CAT, tanto no soro quanto no fígado, dos ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina;
- 1.8. O JPE foi capaz de evitar dos danos oxidativos a lipídeos e a proteínas tanto no soro quanto no fígado dos ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina;
- 1.9. A suplementação de JPE melhorou a capacidade antioxidante total do soro, tanto dos ratos saudáveis quanto dos ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina;

- 1.10. O JPE foi capaz de modular a função mitocondrial, através da diminuição da atividade dos complexo I e II e do aumento da atividade do complexo III da CTE no fígado de ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina;
- 1.11. O JPE induziu uma diminuição da expressão da proteína SIRT3 no fígado dos ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina;

7. PERSPECTIVAS

Como continuidade deste trabalho, seria importante:

- 1.1 Determinar a composição química do JPE através de espectrometria de massas;
- 1.2. Avaliar os parâmetros de estresse oxidativo nos demais tecidos, como cérebro, rim e músculo esquelético, dos ratos saudáveis e diabéticos tratados ou não com JPE;
- 1.3. Determinar marcadores de inflamação no soro e nos tecidos dos ratos saudáveis e diabéticos tratados ou não com JPE;
- 1.4. Avaliar a expressão de outras sirtuínas, como SIRT1, tanto no fígado quanto no cérebro, rim e músculo esquelético dos ratos saudáveis e diabéticos tratados ou não com JPE;
- 1.5. Avaliar histopatologicamente os tecidos hepáticos e pancreático dos ratos saudáveis e diabéticos tratados ou não com JPE.
- 1.6. Determinar a toxicidade do JPE utilizando-se modelo de zebrafish.

8. REFERÊNCIAS

- Abe, L. T.; Lajolo, F. M.; Genovese, M. I. (2012). Potential dietary sources of ellagic acid and other antioxidants among fruits consumed in Brazil: Jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba* (Vell.) Berg). **J. Sci. Food Agr.** 92: 1679–1687.
- Adisakwattana, S.; Moonrat, J.; Srichairat, S.; Chanasit, C.; Tirapongporn, H.; Chanathong, B.; Ngamukote, S.; Sapwarobol, S. (2010) Lipid-Lowering mechanisms of grape seed extract (*Vitis vinifera* L) and its antihyperlipidemic activity. **J. Med. Plant. Res.** 4: 2113–2120.
- Aksoy, Y.; Sanal, Ö.; Metin, A.; Tezcan, I.; Ersoy, F.; Ögüş, H.; Özer, N. (2004) Antioxidant enzymes in red blood cells and lymphocytes of ataxia-telangiectasia patients. **Turk. J. Pediatr.** 46(3): 204–207.
- Alba-Loureiro, T.C.; Munhoz, C.D.; Martins, J.O.; Cerchiaro, G.A.; Scavone, C.; Curi, R.; Sannomiya, P. (2007) Neutrophil function and metabolism in individuals with diabetes mellitus. **Braz. J. Med. Biol. Res.** 40: 1037–1044.
- Alezandro, M. R.; Dubé, P.; Desjardins, Y.; Lajolo, F. M.; Genovese, M. I. (2013). Comparative study of chemical and phenolic composition of two species of jaboticaba: *Myrciaria jaboticaba* (Vell.) Berg and *Myrciaria cauliflora* (Mart.) O. Berg. **Food Res. Int.** 54 (1): 468-77.
- 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 Res. Int.** 54(1): 650-59.
- Al-Hussaini, A. A.; Sulaiman, N. M.; AlZahrani, M. D.; Alenizi, A. S.; Khan, M. (2012) Prevalence of hepatopathy in type 1 diabetic children. **BMC Pediatrics.** 12: 1–8.
- Aloud, A. A.; Veeramani, C.; Govindasamy, C.; Alsaif, M. A.; Al-Numair, K. S. (2018) Galangin, a natural flavonoid reduces mitochondrial oxidative damage in streptozotocin- induced diabetic rats. **Redox Rep.** 23(6): 29–34.
- Alzaheb, R. A.; Altemani, A. H. (2018) The prevalence and determinants of poor glycemic control among adults with type 2 diabetes mellitus in Saudi Arabia. **Diabetes Metab. Syndr. Obes.** 11: 15–21.

- Andersen, O. M.; Jordheim, M. (2005). The anthocyanins. In O. M. Andersen & K. R. Markham (Eds.). **Flavonoids: Chemistry, biochemistry and applications**. CRC Press. 471–552p.
- Andersen, O.; Andersen, V.U. (1988). **As Frutas Silvestres Brasileiras**. 3 ed. Rio de Janeiro: Globo. 203p.
- Andrade, D. M. L.; Borges, L. L.; Torres, I. M. S.; Conceição, E. C. da; Rocha, M. L. (2016) Jaboticaba-induced endothelium-independent vasodilating effect on isolated arteries. **Arq. Bras. Cardiol.** 107(3): 223-229.
- Asgar, A. (2013) Anti-diabetic potential of phenolic compounds: A review. **Int. J. Food. Prop.** 16(1): 91–103.
- Aulbach, A.D.; Amuzie, C.J. (2017) Biomarkers in Nonclinical Drug Development, in **A Comprehensive Guide to Toxicology in Nonclinical Drug Development**. 2 ed. Academic press. 447p.
- Bahadoran, Z.; Mirmiran, P; Azizi, F. (2013) Dietary polyphenols as potential nutraceuticals in management of diabetes: A review. **J. Diabetes Metab. Disord.** 12(1): 1-9.
- Bajaj, S.; Khan, A. (2012) Antioxidants and diabetes decreased antioxidant defenses. **Indian J. Endocrinol. Metab.** 16(2): 267-271.
- Bak, M. J.; Truong, V. L.; Kang, H. S.; Jun, M.; Jeong, W. S. (2013) Anti-inflammatory effect of procyanidins from wild grape (*Vitis amurensis*) seeds in LPS-induced RAW 264.7 cells. **Oxid. Med. Cell Longev.** 2013: 1-11.
- Balerdi, C. F.; Rafie, R.; Crane, J. (2006). Jaboticaba (*Myrciaria cauliflora*, Berg.) a delicious fruit with an excellent market potential. **Proc. Fla. State Hort. Soc.** 119: 66-68.
- Barros, B. S. V.; Santos, D. C.; Pizarro, M. H.; Melo, L. G. N. Gomes, M. B. (2017) Type 1 diabetes and non-alcoholic fatty liver disease: When should we be concerned? a nationwide study in Brazil. **Nutrients.** 9(8): 1-11.
- Bause, A. S.; Haigis, M. C. (2013). SIRT3 regulation of mitochondrial oxidative stress. **Exp. Gerontol.** 48(7): 634–639.

- Benfield, T., Jensen, J. S.; Nordestgaard, B. G. (2007) Influence of diabetes and hyperglycaemia on infectious disease hospitalisation and outcome. **Diabetologia**. 50(3): 549–554.
- Bi, Y.; Zhu, D.; Cheng, J.; Zhu, Y.; Xu, N.; Cui, S.; Li, W.; Cheng, X.; Wang, F.; Hu, Y.; Shen, S.; Weng, J. (2010). The status of glycemic control: A cross-sectional study of outpatients with type 2 diabetes mellitus across primary, secondary, and tertiary hospitals in the jiangsu province of China. **Clin. Ther.** 32(5): 973–983.
- Blake, R.; Trounce, I. A. (2013). Mitochondrial dysfunction and complications associated with diabetes. **Biochim. Biophys. Acta**. 1840(4): 1404–1412.
- Brownlee, M. (2001). Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. **Nature**. 414: 813–820.
- Brunini, M. A.; Oliveira, A. L.; Salandini, C. A. R. (2004). influência de embalagens e temperatura no armazenamento de jaboticaba (Vell Berg) cv Sabará. **Cienc. Tecnol. Aliment.** 24: 378-383.
- Bub, A.; Watzl, B.; Blockhaus, M.; Briviba, K.; Liegibel, U.; Mu, H.; Pool-zobel, B. L.; Rechkemmer, G. (2003). Fruit juice consumption modulates antioxidative status, immune status and DNA damage. **J. Nutr. Biochem.** 14: 90–98.
- Buler, M.; Aatsinki, S. M.; Izzi, V.; Hakkola, J. (2012). Metformin reduces hepatic expression of sirt3, the mitochondrial deacetylase controlling energy metabolism, **PLoS One**, 7(11): 1–10.
- Busconi, M.; Reggi, S.; Fogher, C.; Bavaresco, L. (2009). Evidence of a sirtuin gene family in grapevine (*Vitis vinifera* L.). **Plant Physiol. Biochem.** 47(7): 650–652.
- Calloni, C.; Agnol, R. D.; Martínez, L. S.; Marcon, F. S.; Moura, S.; Salvador, M. (2015). Jaboticaba (*Plinia trunciflora* (O. Berg) Kausel) fruit reduces oxidative stress in human fibroblasts cells (MRC-5), **Food Res. Int.** 70: 15–22.
- Camargo, A. C.; Regitano-d'Arce, M. A. B.; Rasera, G. B.; Canniatti-Brazaca, S. G.; Silva, L. P.; Alvarenga, V. O.; Sant'Ana, A. S.; Shahidi, F. (2017). Phenolic acids and flavonoids of peanut by-products: Antioxidant capacity and antimicrobial effects. **Food Chem.** 237: 538–544.

- Cao, H.; Ou, J.; Chen, L.; Zhang, Y.; Szkudelski, T.; Delmas, D.; Daglia, M.;, Xiao, J. (2018) Dietary polyphenols and type 2 diabetes: Human Study and Clinical Trial. **Crit. Rev. Food Sci. Nutr.** 19:1-9.
- Carocho, M.; Ferreira, I. C. F. R. (2013). A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. **Food Chem. Toxicol.** 51(1): 15–25.
- Carrasco-Pozo, C., Gotteland, M.; Speisky, H. (2011). Apple peel polyphenol extract protects against indomethacin-induced damage in Caco-2 cells by preventing mitochondrial Complex I inhibition. **J. Agric. Food Chem.** 59(21): 11501–11508.
- Carrasco-Pozo, C.; Pastene, E.; Vergara, C.; Zapata, M.; Sandoval, C.; Gotteland, M. (2012). Stimulation of cytosolic and mitochondrial calcium mobilization by indomethacin in Caco-2 cells: modulation by the polyphenols quercetin, resveratrol and rutin. **Biochim. Biophys. Acta.** 1820(12): 2052–61.
- Casqueiro, J., Casqueiro, J.; Alves, C. (2012). Infections in patients with diabetes mellitus: A review of pathogenesis. **Indian J. Endocrinol. Metab.** 16(7): 27-36.
- Caton, P. W.; Richardson, S. J.; Kieswich, J.; Bugliani, M.; Holland, M. L.; Marchetti, P.; Morgan, N. G.; Yaqoob, M. M.; Holness, M. J.; Sugden, M. C. (2013). Sirtuin 3 regulates mouse pancreatic beta cell function and is suppressed in pancreatic islets isolated from human type 2 diabetic patients. **Diabetologia.** 56(5): 1068–1077.
- Chamberlain, J. J.; Rhinehart, A. S.; Shaefer, C. F.; Neuman, A. (2016). Diagnosis and management of diabetes: Synopsis of the 2016 American Diabetes Association standards of medical care in diabetes. **Ann. Intern. Med.** 164(8): 542–552.
- Chapman, M. J.; Ginsberg, H. N.; Amarenco, P.; Andreotti, F.; Borén, J.; Catapano, A. L.; Descamps, O. S.; Fisher, E.; Kovanen, P. T.; Kuivenhoven, J. A.; Lesnik, P.; Masana, L.; Nordestgaard, B. G.; Ray, K. K.; Reiner, Z.; Taskinen, M. R.; Tokgözoğlu, L.; Tybjaerg-Hansen, A.; Watts, G. F. (2011). Triglyceride-rich lipoproteins and high-density lipoprotein cholesterol in patients at high risk of cardiovascular disease: evidence and guidance for management. **Eur. Heart J.** 32(11):1345-1361.

- Cheynier, V.; Comte, G.; Davies, K. M.; Lattanzio, V.; Martens, S. (2013). Plant phenolics: Recent advances on their biosynthesis, genetics, and ecophysiology. **Plant Physiol. Biochem.** 72: 1–20.
- Chikezie, P. C.; Ojiako, O. A.; Ogbuji, A. C. (2015). Oxidative stress in diabetes. **Int. J. Biol. Chem.** 41(9): 92–109.
- Cires, M. J.; Wong, X.; Carrasco-Pozo, C.; Gotteland, M. (2017). The gastrointestinal tract as a key target organ for the health-promoting effects of dietary proanthocyanidins. **Front Nutr.** 3(57): 1-27.
- Citadin, I; Danner, M. A; Sasso, S. A. Z. (2010). Jabuticabeiras. **Rev. Bras. de Frut.** 32(2): 343-656.
- Costantino, S.; Paneni, F.; Battista, R.; Castello, L.; Capretti, G.; Chiandotto, S.; Tanese, L.; Russo, G.; Pitocco, D.; Lanza, G.; Volpe, M.; Lüscher, T. F.; Cosentino, F. (2017). Impact of glycemic variability on chromatin remodeling, oxidative stress and endothelial dysfunction in type 2 diabetic patients with target HbA1c levels. **American Diabetes Association.** 66(9): 2472-2482.
- Cui, Y.; Qin, L.; Wu, J.; Qu, X.; Hou, C.; Sun, W.; Li, S.; Vaughan, A. T. M.; Li, J. J.; Liu, J. (2015). SIRT3 enhances glycolysis and proliferation in SIRT3-expressing gastric cancer cells. **PLoS One.** 10(6): 1–17.
- da Silva-Maia, J. K.; Batista, A. G.; Correa, L. C.; Lima, G. C.; Bogusz Junior, S.; Maróstica Junior, M. R. (2018). Aqueous extract of berry (*Plinia jaboticaba*) byproduct modulates gut microbiota and maintains the balance on antioxidant defense system in rats. **J. Food Biochem.** 92 (1): 1333-1343.
- Daehn, I.; Qi, H.; Casalena, G.; Shi, S.; Yu, L.; Ebefors, K.; Yezhou, S.; Zhang, W. D'Agati, V.; Schlondorff, D.; Haraldsson, B.; Böttinger, E. (2017). Glomerular endothelial mitochondrial dysfunction is essential and characteristic of diabetic kidney disease susceptibility. **Diabetes.** 66(3): 763–778.
- Dal, S.; Jeandidier, N.; Seyfritz, E.; Bietiger, W.; Peronet, C.; Moreau, F.; Pinget, M.; Maillard, E.; Sigrist, S. (2016). Oxidative stress status and liver tissue defenses in diabetic rats during intensive subcutaneous insulin therapy. **Exp. Biol. Med.** 241(2): 184-192.

- Danner, M. A. (2009). Diagnóstico ecogeográfico e caracterização morfogênética de jabuticabeiras. **Dissertação de Mestrado**. Pós-Graduação em Agronomia, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, Brasil.
- Daoud, A. K.; Tayyar, M. A.; Fouda, I. M.; Harfeil, N. A. (2009). Effects of diabetes mellitus vs. in vitro hyperglycemia on select immune cell functions. **J. Immunotoxicol.** 6(1): 36–41.
- De Assis, S. A., Velloso, J. C. R., Brunetti, I. L., Khalil, N. M., Leite, K. M. D. S. C., Martins, A. B. G. M., et al. (2009). Antioxidant activity, ascorbic acid and total phenol of exotic fruits occurring in Brazil. **Int. J. Food Sci. Nutr.** 60: 439-448.
- De Ferranti, S. D.; De Boer, I. H.; Fonseca, V.; Fox, C. S.; Golden, S. H.; Lavie, C. J.; Magge, S. N.; Marx, N.; McGuire, D. K.; Orchard, T. J.; Zinman, B.; Eckel, R. H. (2014). Type 1 diabetes mellitus and cardiovascular disease a scientific statement from the american heart association and american diabetes association. **Diabetes Care.** 37(13): 2844–2863.
- De Sá, L. Z. C. M.; Castro, P. F.S.; Lino, F. M. A.; Bernardes, M. J. C.; Viegas, J. C. J.; Dinis, T. C. P.; Santana, M. J.; Romao, W.; Vaz, B. G.; Lião, L. M.; Ghedini, P. C.; Rocha, M. L.; Gil, E. S. (2014). Antioxidant potential and vasodilatory activity of fermented beverages of jabuticaba berry (*Myrciaria jaboticaba*). **J. Funct. Foods.** 8:169–179.
- Del Rio, D.; Rodriguez-Mateos, A.; Spencer, J. P. E.; Tognolini, M.; Borges, G.; Crozier, A. (2013). Dietary (poly)phenolics in human health: structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases. **Antioxid. Redox Signal.** 18(14): 1818–92.
- Ding, S.; Jiang, H.; Fang, J. (2018). Regulation of immune cell functions by polyphenols. **J. Immunol. Res.** 2018:1–7.
- Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes (2018) *Diretrizes 2017-2018*. Available at: <https://www.diabetes.org.br/profissionais/images/2017/diretrizes/diretrizes-sbd-2017-2018.pdf>.
- Domínguez-Avila, A.; González-Aguilar, G. A.; Alvarez-Parrilla, E.; Rosa, L. A. (2016). Modulation of PPAR expression and activity in response to polyphenolic compounds in high fat diets. **Int. J. Mol. Sci.** 17(7): 1–17.

- 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. **Br. J. Nutr.** 110(3): 447–455.
- Drose S.; Brandt U. (2012). Molecular Mechanisms of Superoxide Production by the Mitochondrial Respiratory Chain. In: Kadenbach B. (eds) **Mitochondrial Oxidative Phosphorylation. Advances in Experimental Medicine and Biology**, vol 748. Springer, New York, NY.
- Dryden, M.; Baguneid, M.; Eckmann, C.; Corman, S.; Stephens, J.; Solem, C.; Li, J.; Charbonneau, C.; (2015). Pathophysiology and burden of infection in patients with diabetes mellitus and peripheral vascular disease : focus on skin and soft-tissue infections. **Clin. Microbiol. Infect.** 21: 27- 32.
- Duncan, B. B.; Schmidt, M. I.; Cousin, E.; Moradi-Lakeh, M.; Passos, V. M. A.; França, E. B.; Marinho, F.; Mokdad, A. H. (2017). The burden of diabetes and hyperglycemia in Brazil-past and present: Findings from the Global Burden of Disease Study 2015. **Diabetol. Metab. Syndr.** 9(1): 1–12.
- Duo, J.; Ying, G. G.; Wang, G. W.; Zhang, L. (2012) Quercetin inhibits human breast cancer cell proliferation and induces apoptosis via Bcl-2 and Bax regulation. **Mol. Med. Rep.** 5(6): 1453–1456.
- Duvillard, L.; Florentin, E.; Lizard, G.; Petit, J. M.; Galland, F.; Monier, S. (2003) Cell surface expression of LDL receptor is decreased in type 2 diabetic patients and is normalized by insulin therapy. **Diabetes Care.** 26(5): 1540–1544.
- Ene-Iordache, B.; Perico, N.; Bikbov, B.; Carminati, S.; Remuzzi, A.; Perna, A.; Islam, N.; Bravo, R. F.; Aleckovic-Halilovic, M.; Zou, H.; Zhang, L.; Gouda, Z.; Tchokhonelidze, I.; Abraham, G.; Mahdavi-Mazdeh, M.; Gallieni, M.; Codreanu, I.; Togtokh, A.; Sharma, S. K.; Koirala, P. Upreti, S.; Ulasi, I.; Remuzzi, G.; (2016). Chronic kidney disease and cardiovascular risk in six regions of the world (ISN-KDDC): A cross-sectional study. **Lancet Glob. Health.** 4(5): 307-319.
- Faludi, A. A.; Izar, M. C. O.; Saraiva, J. F. K.; Chacra, A. P. M.; Bianco, H. T.; Afiune Neto, A. et al. (2017). Atualização da Diretriz Brasileira de Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose – 2017. **Arq. Bras. Cardiol.** 109 (1):1-76.

- Fedorova, M.; Bollineni, R. C.; Hoffmann, R. (2013). Protein carbonylation as a major hallmark of oxidative damage: update of analytical strategies. **Mass Spectrom. Rev.** 20(3): 1–19.
- Feldman, J. L.; Dittenhafer-Reed, K. E.; Kudo, N.; Thelen, J. N.; Ito, A.; Yoshida, M.; Denu, J. M. (2015). Kinetic and structural basis for acyl-group selectivity and NAD⁺-dependence in Sirtuin-catalyzed deacylation. **Biochemistry.** 54(19): 3037–3050.
- Fernandes, I.; Fariaa, A.; Calhau, C.; Freitas, V.; Mateus, N.; (2014). Bioavailability of anthocyanins and derivatives. **J. Funct. Foods.** 7: 54–66.
- Ferrari, C. K. B.; Souto, P. C. S.; França, E. L.; Honório-França, A. C.; (2011). Oxidative and nitrosative stress on phagocytes' function: from effective defense to immunity evasion mechanisms. **Arch. Immunol. Ther. Exp.** 59(6): 441–448.
- Filomeni, G.; Graziani, I.; Zio, D.; Dini, L.; Centonze, D.; Rotilio, G. (2012). Neuroprotection of kaempferol by autophagy in models of rotenone-mediated acute toxicity: Possible implications for Parkinson's disease. **Neurobiol. Aging.** 33(4): 767–785.
- Finley, L. W. S.; Haas, W.; Desquirit-Dumas, V.; Wallace, D. C.; Procaccio, V.; Gygi, S. P.; Haigis, M. C. (2011). Succinate dehydrogenase is a direct target of sirtuin 3 deacetylase activity. **PLoS One.** 6(8): 4–9.
- Fischer, F.; Gertz, M.; Suenkel, B.; Lakshminarasimhan, M.; Schutkowski, M.; Steegborn, C. (2012). Sirt5 Deacylation Activities Show Differential Sensitivities to Nicotinamide Inhibition. **PLoS One.** 7(9): 1–9.
- Fowler, M. J. (2011). Microvascular and macrovascular complications of diabetes. **Clin. Diabetes.** 26(2): 77–82.
- Fraga, C. G.; Galleano, M.; Verstraeten, S. V.; Oteiza, P. I. (2010). Basic biochemical mechanisms behind the health benefits of polyphenols. **Mol. Aspects Med.** 31(6): 435–45.
- Furman, B. L. (2015). Streptozotocin-induced diabetic models in mice and rats. **Curr. Protoc. Pharmacol.** 70(9): 5.47.1–5.47.20.

- Gadjeva, V.; Goycheva, P.; Nikolova, G.; Zheleva, A. (2017). Influence of glycemic control on some real-time biomarkers of free radical formation in type 2 diabetic patients: An EPR study. **Adv. Clin. Exp. Med.** 26(8): 1237–1243.
- Gambato, G.; Pavão, E. M.; Chilanti, G.; Fontana, R. C.; Salvador, M.; Camassola, M.; (2018). *Pleurotus albidus* Modulates Mitochondrial Metabolism Disrupted by Hyperglycaemia in EA.hy926 Endothelial Cells. **BioMed Res. Int.** 2018: 1-10.
- Gaschler, M. M.; Stockwell, B. R. (2017). Lipid peroxidation in cell death. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 482(3): 419–425.
- Giacco, F.; Brownlee, M. (2010). Oxidative stress and diabetic complications. **Circ. Res.** 107:1058-1070.
- Giada, M. L. R. (2013). Food phenolic compounds: main classes, sources and their antioxidant power. In **Oxidative Stress and Chronic Degenerative Diseases - A Role for Antioxidants**. InTech Publisher. 87p.
- Goleniowski, M.; Bonfill, M.; Cusido, R.; Palazon, J. (2013). Phenolic Acids, in **Natural Products: Phytochemistry, Botany and Metabolism of Alkaloids, Phenolics and Terpenes**. 1–4242p.
- Gomes, R.P. (1980). **Fruticultura brasileira**. São Paulo: Nobel S.A. 266p.
- Gonzalez-Paramas, M.; Santos-Buelga, C.; Duenas, M.; Gonzalez-Manzano, S.; (2011). Analysis of flavonoids in foods and biological samples. **Mini-Rev. Med. Chem.** 11(14): 1239–1255.
- Gu, Y.; Hurst, W. J.; Stuart, D. A.; Lambert, J. D. (2011). Inhibition of key digestive enzymes by cocoa extracts and procyanidins, **J. Agric. Food Chem.** 59: 5305-5311.
- Guarente, L. (2011). Sirtuins, aging, and medicine. **N. Engl. J. Med.** 364: 2235–2244.
- Halliwell, B.; Gutteridge, J. M. C. (1999). **Free radicals in biology and medicine**. Oxford University Press, New York, 897p.
- Halliwell, B.; Gutteridge, J. M. C. (2015). **Free radicals in biology and medicine**. 5 ed. New York: Oxford Univ.Press. 851p.

- Haminiuk, C. W. I.; Plata-Oviedo, M. S. V.; Guedes, A. R.; Stafussa, A. P.; Bona, E.; Carpes, S. T. (2011). Chemical, antioxidant and antibacterial study of Brazilian fruits. **J. Food Sci. Technol.** 46: 1529-1537.
- Hassan, H. M. M. (2014) Inhibitory Effects of red grape seed extracts on pancreatic - amylase and lipase. **Global J. Biotech. Biochem.** 9(4): 130–136.
- He, X.; Zeng, H.; Chen, J. (2017). Ablation of SIRT3 causes coronary microvascular dysfunction and impairs cardiac recovery post myocardial ischemia. **Int J Cardiol.** 215: 349–357.
- Hichri, I.; Barrieu, F.; Bogs, J.; Kappel, C.; Delrot, S.; Lauvergeat, V.; (2011). Recent advances in the transcriptional regulation of the flavonoid biosynthetic pathway. **J. Exp. Bot.** 62(8): 2465–83.
- Hirschey, M. D.; Shimazu, T.; Jing, E.; Grueter, C. A.; Collins, A. M.; Aouizerat, B.; Stančáková, A.; Goetzman, E.; Lam, M. M.; Schwer, B.; Stevens, R. D.;
- Hoffman, R. P. (2015). Hyperglycemic endothelial dysfunction: Does it happen and does it matter? **J. Thorac. Dis.** 7(10): 1693–1695.
- Hollman, P. C. H.; Cassidy, A.; Comte, B.; Heinonen, M.; Richelle, M.; Richling, E.; Serafini, M.; Scalbert, A.; Sies, H.; Vidry, S. (2011). The biological relevance of direct antioxidant effects of polyphenols for cardiovascular health in humans is not established. **J. Nutr.** 141(5): 989–1009.
- Houtkooper, R. H.; Pirinen, E.; Auwerx, J. (2012). Sirtuins as regulators of metabolism and healthspan. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.** 13(4): 225–238.
- Howard, B. V.; Robbins, D. C.; Sievers, M. L.; Lee, E. T.; Rhoades, D.; Devereux, R. B.; Cowan, L. D.; Gray, R. S.; Welty, T. K.; Go, O. T.; Howard, W. J. (2000). LDL cholesterol as a strong predictor of coronary heart disease in diabetic individuals with insulin resistance and low LDL: the Strong Heart Study. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.** 20:830–835.
- Huang, S.; Chen, X.; Zheng, J.; Huang, Y.; Song, L.; Yin, Y.; Xiong, J. (2017). Low SIRT3 expression contributes to tumor progression, development and poor prognosis in human pancreatic carcinoma. **Pathol. Res. Pract.** 213(11): 1419–1423.

- 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. **J. Funct. Foods**. 17: 422–433.
- Incalza, M. A.; D'Oria, R.; Natalicchio, A.; Perrini, S.; Laviola, L.; Giorgino, F. (2018). Oxidative stress and reactive oxygen species in endothelial dysfunction associated with cardiovascular and metabolic diseases. **Vasc. Pharmacol**. 100: 1–19.
- Jaakola, L. (2013). New insights into the regulation of anthocyanin biosynthesis in fruits. **Trends Plant Sci**. 18(9): 477–83.
- Jang, H. H.; Park, M. Y.; Kim, H. W.; Lee, Y. M.; Hwang, K. A.; Park, J. H.; Park, D. S.; Kwon, O. (2012). Black rice (*Oryza sativa* L.) extract attenuates hepatic steatosis in c57bl/6 j mice fed a high-fat diet via fatty acid oxidation. **Nutr. Metab**. 9(1): 27.
- Jin, L.; Galonek, H.; Israelian, K.; Choy, W.; Morrison, M.; Xia, Y.; Wang, X.; Xu, Y.; Yang, Y.; Smith, J. J.; Hoffmann, E.; Carney, D. P.; Perni, R. B.; Jirousek, M. R.; Bemis, J. E.; Milne, J. C.; Sinclair, D. A.; Westphal, C. H. (2009). Biochemical characterization, localization, and tissue distribution of the longer form of mouse SIRT3. **Protein Sci**. 18(3): 514–525.
- Jing, E.; Emanuelli, B.; Hirschey, M. D.; Boucher, J. Lee, K. Y.; Lombard, D.; Verdin, E. M.; Kahn, C. R. (2011). Sirtuin-3 (Sirt3) regulates skeletal muscle metabolism and insulin signaling via altered mitochondrial oxidation and reactive oxygen species production. **Proc. Natl. Acad. Sci**. 108(35): 14608–14613.
- John, C. M.; Sandrasaigaran, P.; Tong, C. K.; Adam, A.; Ramasamy, R. (2011). Immunomodulatory activity of polyphenols derived from *Cassia auriculata* flowers in aged rats. **Cell. Immunol**. 271(2): 474–479.
- Kalea, A. Z.; Clark, K.; Schuschke, D. A.; Kristo, A. S.; Klimis-Zacas, D. J. (2010). Dietary enrichment with wild blueberries (*Vaccinium angustifolium*) affects the vascular reactivity in the aorta of young spontaneously hypertensive rats. **J. Nutr. Biochem**. 21(1): 14–22.
- Kar, P.; Laight, D.; Rooprai, H. K.; Shaw, K. M.; Cummings, M. (2009). Effects of grape seed extract in type 2 diabetic subjects at high cardiovascular risk: A double blind

- randomized placebo controlled trial examining metabolic markers, vascular tone, inflammation, oxidative stress and insulin sensitivity. **Diabet. Med.** 26(5): 526–531.
- Karasawa, K.; Uzuhashi, Y.; Hirota, M.; Otani, H. (2011). A matured fruit extract of date palm tree (*Phoenix dactylifera* L.) stimulates the cellular immune system in mice, **J. Agric. Food Chem.** 59: 11287–11293.
- Khoo, H. E.; Azlan, A.; Tang, S. T.; Lim, S. M. (2017). Anthocyanidins and anthocyanins: colored pigments as food, pharmaceutical ingredients, and the potential health benefits. **Food Nutr. Res.** 61(1): 1-20.
- Kim, H. S.; Quon, M. J.; Kim, J. A. (2014). New insights into the mechanisms of polyphenols beyond antioxidant properties: lessons from the green tea polyphenol, epigallocatechin 3-gallate. **Redox Biol.** 2(1): 187–195.
- Kim, H.; Bartley, G.E.; Rimando, A.M.; Yokoyama, W. (2010). Hepatic gene expression related to lower plasma cholesterol in hamsters fed high-fat diets supplemented with blueberry peels and peel extract. **J. Agric. Food Chem.** 58: 3984–3991.
- Kim, J.D.; Liu, L.; Guo, W.; Meydani, M. (2006). Chemical structure of flavonols in relation to modulation of angiogenesis and immune-endothelial cell adhesion. **J. Nutr. Biochem.** 17(3):165-176.
- Kurimoto, Y.; Shibayama, Y.; Inoue, S.; Soga, M.; Takikawa, M.; Ito, C.; Nanba, F.; Yoshida, T.; Yamashita, Y.; Ashida, H.; Tsuda, T. (2013). Black soybean seed coat extract ameliorates hyperglycemia and insulin sensitivity via the activation of AMP-activated protein kinase in diabetic mice. **J. Agric. Food Chem.** 61(23): 5558–5564.
- Lage, F. F.; Simão, A. A.; Guedes, M. N. S.; Ramos, V. O.; Sousa, R. V.; De Corra, A. D. (2014). Jabuticaba [*Plinia jaboticaba* (Vell.) Berg] skins decrease lipid peroxidation: Hepatoprotective and antihyperlipidemic effects. **Afr. J. Biotechnol.** 13(11): 1295–1302.
- Lago, J. H. G.; Souza, E. D.; Mariane, B.; Pascon, R.; Vallim, M. A.; Martins, R. C. C.; Baroli, A. A.; Carvalho, B. A.; Soares, M. G.; Santos, R. T.; Sartorelli, P. (2011). Chemical and biological evaluation of essential oils from two species of Myrtaceae

- *Eugenia uniflora* L. and *Plinia trunciflora* (O. Berg) Kausel. **Molecules**. 16: 9827-9837.
- Lagoa, R.; Graziani, I.; Lopez-Sanchez, C.; Garcia-Martinez, V.; Gutierrez-Merino, C. (2011). Complex I and cytochrome c are molecular targets of flavonoids that inhibit hydrogen peroxide production by mitochondria. **Biochim. Biophys. Acta-Bioenergetics**. 1807(12): 1562–1572.
- Laurent, G.; German, N. J.; Saha, A. K.; Boer, V. C. J.; Koves, T. R.; Dephoure, N.; Fischer, F.; Boanca, G.; Lovitch, S. B.; Sharpe, A. H.; Kurland, I. J.; Gygi, S. P.; Muoio, D. M.; Ruderman, N. B.; Marcia, C. (2013). SIRT4 coordinates the balance between lipid synthesis and catabolism by repressing malonyl CoA decarboxylase. **Mol. Cell**. 50(5): 686–698.
- Lee, J. S.; Kim, Y. R.; Park, J. M.; Kim, Y. E.; Baek, N. I.; Hong, E. K. (2015). Cyanidin-3-glucoside isolated from mulberry fruits protects pancreatic β -cells against glucotoxicity-induced apoptosis. **Mol. Med. Rep.** 11(4): 2723–2728.
- 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). **J. Agri. Food Chem.** 59: 2277–2283.
- Leite-Legatti, A. V., Batista, Â. G., Dragano, N. R. V., Marques, A. C., Malta, L. G., Riccio, M. F., Maróstica, M. R. (2012). Jaboticaba peel: Antioxidant compounds, antiproliferative and antimutagenic activities. **Food Res. Int.** 49(1): 596–603.
- Lenquiste, S. A.; Batista, A. G.; Marineli, R. 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 Res. Int.** 49(1): 153–160.
- Leon, B. M.; Maddox, T. M. (2015). Diabetes and cardiovascular disease: Epidemiology, biological mechanisms, treatment recommendations and future research. **World J. Diabetes**. 6(13): 1246-1258.
- Li, A.; Liu, Q.; Li, Q.; Liu, B.; Yang, Y.; Zhang, N. (2018). Berberine reduces pyruvate-driven hepatic glucose production by limiting mitochondrial import of pyruvate through mitochondrial pyruvate carrier 1. **EBio Medicine**. 34: 243–255.

- Li, J.; Yuan, C.; Pan, L.; Benatrehina, P. A.; Chai, H.; Keller, W. J.; Naman, C. B.; Kinghorn, A. D. (2017). Bioassay-guided isolation of antioxidant and cytoprotective constituents from a maqui berry (*Aristotelia chilensis*) dietary supplement ingredient as markers for qualitative and quantitative analysis. **J. Agric. Food Chem.** 65(39), 8634-8642.
- Li, S. H.; Tian, H. B.; Zhao, H. J.; Chen, L. H.; Cui, L. Q. (2013). The acute effects of grape polyphenols supplementation on endothelial function in adults: meta-analyses of controlled trials. **PLoS One.** 8(7): 1–10.
- Li, Y.; Liu, T.; Liao, S.; Li, Y.; Lan, Y.; Wang, A.; Wang, Y.; He, B. (2015). A mini-review on Sirtuin activity assays. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 467(3): 459-466.
- Lim, A. (2014). Diabetic nephropathy - complications and treatment. **Int. J. Nephrol. Renovasc. Dis.** 7: 361-81.
- Lin, D.; Xiao, M.; Zhao, J.; Li, Z.; Xing, B.; Li, X.; Kong, M.; Li, L.; Zhang, Q.; Liu, Y.; Chen, H.; Qin, W.; Wu, H.; Chen, S. (2016). An overview of plant phenolic compounds and their importance in human nutrition and management of type 2 diabetes. **Molecules.** 21(10): 1-19.
- Lin, Y. L.; Chou, C. H.; Yang, D. J.; Chen, Jr W.; Tzang, B. S.; Chen, Y. C.; (2012). Hypolipidemic and antioxidative effects of noni (*Morinda citrifolia* L.) juice on high- fat/cholesterol-dietary hamsters. **Plant Foods Hum. Nutr.** 67(3): 294–302.
- Liu, C.; Huang, Z.; Jiang, H.; Shi, F. (2014). The sirtuin 3 expression profile is associated with pathological and clinical outcomes in colon cancer patients. **BioMed Res. Int.** 2014: 1-9.
- Liu, G.; Cao, M.; Xu, Y.; Li, Y. (2015). SIRT3 protects endothelial cells from high glucose-induced cytotoxicity. **Int. J. Clin. Exp. Pathol.** 8(1): 353–360.
- Liu, L.; Peritore, C.; Ginsberg, J.; Kayhan, M.; Donmez, G. (2015). SIRT3 attenuates MPTP-induced nigrostriatal degeneration via enhancing mitochondrial antioxidant capacity. **Neurochem. Res.** 40(3): 600–608.
- Lorenzi, H.; Bacher, I.; Lacerda, M.; Sartori, S. (2000). **Brazilian fruits and cultivated exotics (for consumin in natura)**. Nova Odessa, Brazil: Instituto Plantarum de Estudos da Flora. 667p.

- Lü, J-M.; Lin, P. H.; Yao, Q.; Chen, C.; (2010). Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: experimental approaches and model systems. **J. Cell. Mol. Med.** 14(4): 840–60.
- Lubos, E., Loscalzo, J., & Handy, D. E. (2011). Glutathione peroxidase-1 in health and disease: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities. **Antioxid. Redox Signal.** 15(7): 1957-97.
- Lunder, M.; Janic, M.; Sabovic, M. (2018). Prevention of vascular complications in diabetes mellitus patients: focus on the arterial wall. **Curr. Vasc. Pharmacol.** 16: 5-15.
- Ma, Q. (2010). Transcriptional responses to oxidative stress: Pathological and toxicological implications. **Pharmacol. Ther.** 125(3), pp. 376–393.
- Mabberly, D.J. (1997). **The plant book: a portable dictionary of the vascular plants.** 2nd ed. Cambridge University Press: Cambridge, UK, 858p.
- Machado, G. H. A.; Marques, T. R.; de Carvalho, T. C. L.; Duarte, A. C.; de Oliveira, F. C.; Gonçalves, M. C.; Piccoli, R. H.; Corrêa, A. D. (2018). Antibacterial activity and in vivo wound healing potential of phenolic extracts from jaboticaba skin. **Chem. Biol. Drug. Des.** 92(1):1333-1343.
- Malta, D. C.; Moura, L.; Prado, R. R.; Escalante, J. C.; Schmidt, M. I.; Duncan, B. B. (2014). Mortalidade por doenças crônicas não transmissíveis no Brasil e suas regiões, 2000 a 2011. **Epidemiol. Serv. Saúde.** 23(4): 599–608.
- Manach, C.; Scalbert, A.; Morand, C.; Rémésy, C.; Jiménez, L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. **Am. J. Clin. Nutr.** 79: 727–47.
- Manzano, S.; Williamson, G. (2010). Polyphenols and phenolic acids from strawberry and apple decrease glucose uptake and transport by human intestinal Caco-2 cells. **Mol. Nutr. Food Res.** 54(12): 1773–1780.
- Marcovecchio, M. L. (2017). Complications of acute and chronic hyperglycemia. **Endocrinology.** 13(1): 17–21.
- Mastura, I.; Chew, B. H.; Lee, P. Y.; Cheong, A. T.; Sazlina, G.; Jamaiah, H.; Abdul, S.; Syed, R.; Sri, T.; Zaiton, A. (2011). Control and treatment profiles of 70 , 889 adult type 2 diabetes mellitus patients in Malaysia - a cross sectional survey in 2009, **Int. J. Collab. Res. Intern. Med. Public Health.** 3: 98–113.

- Mattos, J. R. (1983). **Fruteiras nativas do Brasil: jaboticabeiras**. Porto Alegre: Nobel, 92p.
- McDougall, G. J.; Shpiro, F.; Dobson, P.; Smith, P.; Blake, A.; Stewart, D. (2005). Different polyphenolic components of soft fruits inhibit α -amylase and α -glycosidase. **J. Agric. Food Chem.** 53(7): 2760–2766.
- Meletti, L. M. M. (2000). **Propagação de frutíferas tropicais**. Guaíba: Agropecuária.
- Mellor, D. D.; Madden, L. A.; Smith, K. A.; Kilpatrick, E. S.; Atkin, S. L. (2013). High-polyphenol chocolate reduces endothelial dysfunction and oxidative stress during acute transient hyperglycaemia in type 2 diabetes: a pilot randomized controlled trial. **Diabet. Med.** 30(4): 478–483.
- Min, J.; Yu, S. W.; Baek, S. H.; Nair, K. M.; Bae, O. N.; Bhatt, A.; Kassab, M.; Nair, M. G.; Majid, A. (2011). Neuroprotective effect of cyanidin-3-O-glucoside anthocyanin in mice with focal cerebral ischemia. **Neurosci. Lett.** 500(3): 157–161.
- Mohamed, J.; Nazratun Nafizah, A. H.; Zariyantey, A. H.; Budin, S. B. (2016). Mechanisms of diabetes-induced liver damage: The role of oxidative stress and inflammation. **Sultan Qaboos Univ. Med. J.** 16(2):132–141.
- Morry, J., Ngamcherdtrakul, W., Yantasee, W. (2017). Oxidative stress in cancer and fibrosis: Opportunity for therapeutic intervention with antioxidant compounds, enzymes, and nanoparticles. **Redox Biol.** 11:240-253.
- Morton, J. (1987). Jaboticabas. In: **Fruits of warm climates**. Miami, FL. 371–374p.
- Moura, M. H. C.; Cunha, M. G.; Alezandro, M. R.; Genovese, M. I. (2018). Phenolic-rich jaboticaba (*Plinia jaboticaba* (Vell.) Berg) extracts prevent high-fat-sucrose diet-induced obesity in C57BL/6 mice. **Food Res. Int.** 107:48-60.
- Muehlbauer, M. J.; Kakar, S.; Bass, N. M.; Kuusisto, J.; Laakso, M.; Alt, F. W.; Newgard, C. B.; Farese, R. V.; Kahn, C. R.; Verdin, E. (2011). SIRT3 deficiency and mitochondrial protein hyperacetylation accelerate the development of the metabolic syndrome. **Mol. Cell.** 44(2): 177–190.
- Muller, L. M. A. J.; Gorter, K. J.; Hak, E.; Goudzwaard, W. L.; Schellevis, F. G.; Hoepelman, A. I. M.; Rutten, G. E. H. M. (2005). Increased risk of common

- infections in patients with type 1 and type 2 diabetes mellitus. **Clin. Infect. Dis.** 41(3): 281–288.
- Muller, Y. D.; Golshayan, D.; Ehrichtiou, D.; Wyss, J. C.; Giovannoni, L.; Meier, R.; Serre-beinier, V.; Yung, G. P.; Morel, P.; Bühler, L. H.; Seebach, J. D. (2011). Immunosuppressive effects of streptozotocin-induced diabetes result in absolute lymphopenia and a relative increase of t regulatory cells. **Diabetes.** 60(9): 2331–2340.
- Mustata, G. T.; Rosca, M.; Biemel, K. M.; Reihl, O.; Smith, M.; Viswanathan, A.; Strauch, C.; Du, Y.; Tang, J.; Kern, T. S.; Lederer, M. O.; Brownlee, M.; Weiss, M. F. ; Monnier, V. M.; (2005). Paradoxical effects of green tea (*Camellia sinensis*) and antioxidant vitamins in diabetic rats: improved retinopathy and renal mitochondrial defects but deterioration of collagen matrix glycoxidation and cross-linking. **Diabetes.** 54(2): 517–526.
- National Diabetes Statistics Report, 2017. (2017). **Centers for Disease Control and Prevention**, pp. 1–20.
- Nekohashi, M.; Ogawa, M.; Ogihara, T.; Nakazawa, K.; Kato, H.; Misaka, T.; Abe, K.; Kobayashi, S. (2014). Luteolin and quercetin affect the cholesterol absorption mediated by epithelial cholesterol transporter Niemann-Pick C1-Like 1 in Caco-2 cells and rats. **PLoS One**, 9(5): 1–9.
- Neves, N. A.; Stringheta, P. C.; Gómez-alonso, S.; Hermosín-gutiérrez, I. (2018). Flavonols and ellagic acid derivatives in peels of different species of jabuticaba (*Plinia* spp.) identified by HPLC-DAD-ESI/MSn. **Food Chem.** 30(252): 61-71.
- Niture, N. T.; Ansari, A. A.; Naik, S. R. (2014). Anti-hyperglycemic activity of Rutin in streptozotocin-induced diabetic rats: An effect mediated through cytokines, antioxidants and lipid biomarkers. **Indian J. Exp. Biol.** 52(7): 720–727.
- Nogueiras, R.; Habegger, K. M.; Chaudhary, N.; Finan, B.; Banks, A. S.; Dietrich, M. O.; Horvath, T. L.; Sinclair, D. A.; Pfluger, P. T.; Tschop, M. H. (2012). Sirtuin 1 and sirtuin 3: physiological modulators of metabolism. **Physiol. Rev.** 92(3): 1479–1514.

- Ogawa, K.; Hirose, S.; Nagaoka, S.; Yanase, E. (2016). Interaction between tea polyphenols and bile acid inhibits micellar cholesterol solubility. **J. Agric. Food Chem.** 64(1): 204–209.
- Ogurtsova, K.; Rocha, J. D.; Huang, Y.; Linnenkamp, U.; Guariguata, L. (2017). IDF Diabetes Atlas: Global estimates for the prevalence of diabetes for 2015 and 2040. **Diabetes Res. Clin. Pract.** 128: 40–50.
- Oliveira A. L., Brunini M. A., Salandini C. A. R., Bazzo F. R. (2003). Caracterização tecnológica de jabuticabas sabará provenientes de diferentes regiões de cultivo. **Rev. Bras. Frutic.** 25: 397-400.
- Omotayo, E. O.; Gurtu, S.; Sulaiman, S. A.; Ab Wahab, M. S.; Sirajudeen, K.N.S.; Salleh, S. (2010) Hypoglycemic and antioxidant effects of honey supplementation in streptozotocin-induced diabetic rats. **Int. J. Vitam. Nutr. Res.** 80(1): 74–82.
- Ouhtit, A.; Gaur, R. L.; Abdraboh, M. Ireland, S. K.; Rao, P. N.; Raj, S. G.; Al-Riyami, H. Shanmuganathan, S.; Gupta, I.; Murthy, S. N.; Hollenbach, A.; Raj, M. H. G. (2014). Simultaneous inhibition of cell-cycle, proliferation, survival, metastatic pathways and induction of apoptosis in breast cancer cells by a phytochemical super-cocktail: Genes that underpin its mode of action. **J. Cancer.** 4(9): 703–715.
- oxidized low-density lipoprotein in patients with mild hyperlipidemia. **J. Med. Food.** 16(3): 255–258.
- Pajuelo, D.; Quesada, H.; Díaz, S.; Fernández-Iglesias, A.; Arola-Arnal, A.; Bladé, C.; Salvadó, J.; Arola, L. (2012). Chronic dietary supplementation of proanthocyanidins corrects the mitochondrial dysfunction of brown adipose tissue caused by diet-induced obesity in Wistar rats. **Br. J. Nutr.** 107(2): 170–178.
- Pamplona, R.; Costantini, D. (2011). Molecular and structural antioxidant defenses against oxidative stress in animals. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.** 301(4): 843-863.
- Pan, P. W.; Feldman, J. L.; Devries, M. K.; Dong, A.; Edwards, A. M.; Denu, J. M. (2011). Structure and biochemical functions of SIRT6. **J. Biol. Chem.** 286(16): 4575–14587.
- Panche, A. N.; Diwan, A. D.; Chandra, S. R. (2016). Flavonoids: An overview. **J. Nutr. Sci.** 5(47): 1–15.

- Panth, N.; Paudel, K. R.; Parajuli, K. (2016). Reactive oxygen species: a key hallmark of cardiovascular disease. **Adv. Med.** 2016: 1–12.
- Patel, S. S.; Molnar, M. Z.; Tayek, J. A.; Ix, J. H.; Noori, N.; Benner, D.; Heymsfield, S.; Kopple, J. D.; Kovesdy, C. P.; Kalantar-Zadeh, K. (2013). Serum creatinine as a marker of muscle mass in chronic kidney disease: Results of a cross-sectional study and review of literature. **J. Cachexia Sarcopenia Muscle.** 4(1): 19–29.
- Phaniendra, A.; Jestadi, D. B.; Periyasamy, L. (2015). Free Radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases. **Indian J. Clin. Biochem.** 30(1): 11–26.
- Picklo, M. J.; Amarnath, V.; McIntyre, J. O.; Graham, D. G.; Montine, T. J. (1999). 4-Hydroxy-2(E)-nonenal inhibits CNS mitochondrial respiration at multiple sites, **J. of Neurochem.** 72(4): 1617–1624.
- Pisoschi, A. M.; Pop, A. (2015). The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. **Eur. J. Med. Chem.** 97: 55–74.
- Pitocco, D.; Tesauro, M.; Alessandro, R.; Ghirlanda, G.; Cardillo, C. (2013). Oxidative stress in diabetes: Implications for vascular and other complications. **Int. J. Mol. Scis.** 14(11): 21525–21550.
- Plaza, M.; Giovana, A.; Baú, C.; Cazarin, B.; Sandahl, M.; Turner, C.; Östman, E.; Maróstica, M. R. J. (2016). Characterization of antioxidant polyphenols from *Myrciaria jaboticaba* peel and their effects on glucose metabolism and antioxidant status : A pilot clinical study. **Food Chem.** 211: 185–197.
- Porter, G. A.; Urciuoli, W. R.; Brookes, P. S.; Nadtochiy, S. M. (2014). SIRT3 deficiency exacerbates ischemia-reperfusion injury: implication for aged hearts. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.** 306(12): 1602–1609.
- Radenković, M.; Stojanović, M.; Prostran, M. (2016). Experimental diabetes induced by alloxan and streptozotocin: The current state of the art. **J. Pharmacol. Toxicol. Methods.** 78: 13–31.
- Rato, L.; Duarte, A. I.; Tomás, G. D.; Santos, M. S.; Moreira, P. I.; Socorro, S.; Cavaco, J. E.; Alves, M. G.; Oliveira, P. F. (2014). Pre-diabetes alters testicular PGC1- α /SIRT3 axis modulating mitochondrial bioenergetics and oxidative stress. **Biochim Biophys Acta Bioenerg.** 1837(3): 335–344.

- Raza, H.; Prabu, S. K.; John, A.; Avadhani, N. G.; (2011). Impaired mitochondrial respiratory functions and oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats. **Int. J. Mol. Sci.** 12(5): 3133–3147.
- Razavi, S.-M.; Gholamin, S.; Eskandari, A.; Mohsenian, N.; Ghorbanihaghjo, A.; Delazar, A. (2013). Red grape seed extract improves lipid profiles and decreases
- Reynertson, A.K.; Wallace, A.M.; Adachi, S.; Gil, R.R.; Yang, H.; Basile, M.J.; D'armiento, J.; Weinstein, B.; Kennelly, E.J. (2006). Bioactive depsides and anthocyanins from Jaboticaba (*Myrciaria cauliflora*). **J. Nat. Prod.** 69: 1228-1230.
- Ribeiro N. C. B. V., Baseggio A. M., Schlegel V. (2018). Jaboticaba: Chemistry and Bioactivity. In: Mérillon JM., Ramawat K. (eds) **Bioactive Molecules in Food**. Reference Series in Phytochemistry. Springer, Cham.
- Rigoulet, M.; Yoboue, E. D.; Devin, A. (2011). Mitochondrial ROS generation and its regulation : mechanisms involved in H₂O₂ signaling. **Antioxid. Redox Signal.** 14(3): 459–468.
- Rocha, J.; Eduardo-Figueira, M.; Barateiro, A.; Fernandes, A.; Brites, D.; Bronze, R.; Duarte, C.; Serra, A. T.; Pinto, R.; Freitas, M.; Fernandes, E.; Silva-Lima, B.; Mota-Filipe, H.; Sepodes, B. (2015). Anti-inflammatory effect of rosmarinic acid and an extract of rosmarinus officinalis in rat models of local and systemic inflammation. **Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.** 116(5): 398–413.
- Rodrigues, R.; de Medeiros, L. A.; Cunha, L. M.; Garrote-Filho, M. S.; Bernardino Neto, M.; Jorge, P. T.; Resende, E. S.; Penha-Silva, N. (2018). Correlations of the glycemic variability with oxidative stress and erythrocytes membrane stability in patients with type 1 diabetes under intensive treatment. **Diabetes Res. Clin. Pract.** 144: 153–160.
- Rubinstein, R.; Genaro, A. M.; Motta, A.; Cremaschi, G.; Wald, M. R. (2008). Impaired immune responses in streptozotocin-induced type I diabetes in mice: Involvement of high glucose. **Clin. Exp. Immunol.** 154(2): 235–246.
- Rufino, M. S. M., Alves, R. E., de Brito, E. S., Pérez-Jiménez, J., Saura-Calixto, F., & Mancini-Filho, J. (2010). Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. **Food Chem.** 121: 996–1002

- Russell, W.; Duthie, G. (2011). Plant secondary metabolites and gut health: The case for phenolic acids. **Proc. Nutr. Soc.** 70(3): 389–396.
- Sacchet, C.; Mocelin, R.; Sachett, A.; Bevilaqua, F.; Chitolina, R.; Kuhn, F.; Boligon, A. A.; Athayde, M. L.; Roman Junior, W. A.; Rosemberg, D. B.; Dal Magro, J.; Conterato, G. M. M.; Piato, A. L. (2015). Antidepressant-like and antioxidant effects of *Plinia trunciflora* in mice. **Evid. Based Complement. Alternat. Med.** 2015: 1–9.
- Salamone, F.; Volti, G. L.; Titta, L.; Puzzo, L.; Barbagallo, I.; La Delia, F.; Zelber-Sagi, S.; Malaguarnera, M.; Pelicci, P. G.; Giorgio, M.; Galvano, F. (2012). Moro orange juice prevents fatty liver in mice. **World J. Gastroenterol.** 18(29): 3862–3868.
- Sandoval-Acuña, C.; Ferreira, J.; Speisky, H. (2014). Polyphenols and mitochondria: An update on their increasingly emerging ROS-scavenging independent actions. **Arch. Biochem. Biophys.** 1(5): 75–90.
- Santacruz, L.; Carriazo, J.G.; Almanza, O.; Osorio, C. (2012). Anthocyanin composition of wild colombian fruits and antioxidant capacity measurement by electron paramagnetic resonance spectroscopy. **J. Agric. Food Chem.** 60: 1397–1404.
- Santos, D. T.; Veggi, P. C.; Meireles, M. A. A. (2010). Extraction of antioxidant compounds from Jabuticaba (*Myrciaria cauliflora*) skins: Yield, composition and economical evaluation. **J. Food Engineering.** 101: 23–31.
- Schofield, J. D.; Liu, Y.; Rao-Balakrishna, P.; Malik, R. A.; Soran, H. (2016). Diabetes Dyslipidemia. **Diabetes Ther.** 7(2): 203–219.
- Serrano, J.; Cassanye, A.; Martín-Gari, M.; Granado-Serrano, A.; Portero-Otín, M. (2016). Effect of dietary bioactive compounds on mitochondrial and metabolic flexibility. **Diseases.** 4(14): 1–15.
- Shadel, G. S.; Horvath, T. L. (2015). Mitochondrial ROS signaling in organismal homeostasis. **Cell.** 163(3): 560–569.
- Shah, B. R.; Hux, J. E. (2003). Quantifying the risk of infectious diseases in patients with DM. **Diabetes care.** 26(2): 510–513.
- Sheng, X., Murphy, M.J., MacDonald, T.M. et al. (2012). Effect of statins on total cholesterol concentrations and cardiovascular outcomes in patients with diabetes mellitus: a population-based cohort study. **Eur. J. Clin. Pharmacol.** 68: 1201.

- Silva, R. M.; Pereira, L. D.; Vêras, J. H.; Vale, C. R.; Chen-Chen, L.; Santos, S. C. (2016). Protective effect and induction of DNA repair by *Myrciaria cauliflora* seed extract and pedunculagin on cyclophosphamide-induced genotoxicity. **Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.** 810: 40–47.
- Simões, C. M. O. (2010). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6º ed. rev. e ampl. Florianópolis: UFSC. 1102 p.
- Sisein, E. A. (2014). Biochemistry of free radicals and antioxidants. **Sch. Acad. J. Biosci.** 2: 110–118.
- Skrovankova, S.; Sumczynski, D.; Mlcek, J.; Jurikova, T.; Sochor, J. (2015). Bioactive compounds and antioxidant activity in different types of berries. **Int. J. Mol. Sci.** 16(10): 24673–24706.
- Sobral, M., Proença, C., Souza, M., Mazine, F., Lucas, E. (2012). *Myrtaceae* in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro.
- Souza, C. G.; Medeiros, D.; Andrade, L.; Bahia, J.; Jordão, R.; Ávila, R. I.; Borges, L. L.; Vaz, B. G.; Valadares, M. C.; Gil, E. De S.; Cardoso, E.; Rocha, M. L. (2017). Radical scavenger capacity of jabuticaba fruit (*Myrciaria cauliflora*) and its biological effects in hypertensive rats. **Oxid. Med. Cell. Longev.** 2017: 1–10.
- Souza-Moreira, T. M.; Severi, J. A.; Lee, K.; Preechasuth, K.; Santos, E.; Gow, N. A.; Munro, C. A.; Vilegas, W.; Pietro, R. C. (2013). Anti-Candida targets and cytotoxicity of casuarinin isolated from *Plinia cauliflora* leaves in a bioactivity-guided study. **Molecules**, 18(7), 8095-8108.
- Souza-Moreira, T.M.; Severi, J. A.; Santos, E.; Silva, V. Y.; Vilegas, W.; Salgado, H.R.; Pietro, R. C. (2011) Chemical and antidiarrheal studies of *Plinia cauliflora*. **J. Med. Food.** 14(12): 1590-1596.
- Su, J.; Wang, H.; Ma, C.; Liu, C.; Rahman, R. T.; Gao, C.; Nie, R. (2016). Hypolipidemic mechanism of gypenosides via inhibition of pancreatic lipase and reduction in cholesterol micellar solubility. **Eur. Food Res. Technol.** 242(3): 305–312.
- Suematsu, N.; Hosoda, M.; Fujimori, K. (2011). Protective effects of quercetin against hydrogen peroxide-induced apoptosis in human neuronal SH-SY5Y cells, **Neurosci. Lett.** 504(3): 223–7.

- Suganya, N.; Bhakkiyalakshmi, E.; Sarada, D. V.L.; Ramkumar, K. M. (2016). Reversibility of endothelial dysfunction in diabetes: Role of polyphenols. **Br. J. Nutr.** 116(2): 223–246.
- Sugiyama, H.; Akazome, Y.; Shoji, T.; Yamaguchi, A.; Yasue, M.; Kanda, T.; Ohtake, Y. (2007). Oligomeric procyanidins in apple polyphenol are main active components for inhibition of pancreatic lipase and triglyceride absorption. **J. Agric. Food Chem.** 55(11): 4604–4609.
- Szapary, P. O., & Rader, D. J. (2001) Pharmacological management of high triglycerides and low high-density lipoprotein cholesterol. **Curr. Opin. Pharmacol.** 1:113-120.
- Szkudelski, T. (2001). The mechanism of alloxan and streptozotocin action in β cells of the rat pancreas, **Physiol. Res.** 50: 536–546.
- Tabela brasileira de composição de alimentos /NEPA – UNICAMP.- 4. ed. rev. e ampl. - Campinas: NEPAUNICAMP, 2011. 161 p.
- Testa, R.; Bonfigli, A. Ri.; Prattichizzo, F.; La Sala, L.; De Nigris, V.; Ceriello, A. (2017). The “metabolic memory” theory and the early treatment of hyperglycemia in prevention of diabetic complications. **Nutrients.** 9(5): 1–9.
- Tian, C.; Ye, X.; Zhang, R.; Long, J.; Ren, W.; Ding, S.; Liao, D.; Jin, X.; Wu, H.; Xu, S.; Ying, C. (2013). Green tea polyphenols reduced fat deposits in high fat-fed rats via erk1/2-PPAR γ -adiponectin pathway. **PLoS One.** 8(1): 53796.
- Tohma, H.; Köksal, E.; Kılıç, Ö.; Alan, Y.; Yılmaz, M.; Gülçin, İ.; Bursal, E.; Alwasel, S. (2016). RP-HPLC/MS/MS Analysis of the phenolic compounds, antioxidant and antimicrobial activities of *Salvia L.* species. **Antioxidants.** 5(38): 1–15.
- Torrens-Mas, M.; Oliver, J.; Roca, Pi.; Sastre-Serra, J. (2017). SIRT3: Oncogene and tumor suppressor in cancer. **Cancers.** 9(7): 1–10.
- Tsao, R. (2010). Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. **Nutrients.** 2(12): 1231–46.
- Tsuji, P. A.; Stephenson, K. K.; Wade, K. L.; Liu, H. Fahey, J. W. (2013). Structure-activity analysis of flavonoids: Direct and indirect antioxidant, and antiinflammatory potencies and toxicities. **Nutr. Cancer.** 65(7): 1014–1025.

- Turkmen, K.; Karagoz, A.; Kucuk, A. (2014). Sirtuins as novel players in the pathogenesis of diabetes mellitus. **World J. Diabetes**. 5(6): 894-900.
- Ullah, A.; Khan, A.; Khan, I. (2016). Diabetes mellitus and oxidative stress - A concise review. **Saudi Pharma. J.** 24(5): 547–553.
- Vassilopoulos, A.; Pennington, J. D.; Andresson, T.; Rees, D. M.; Bosley, A. D.; Fearnley, I. M.; Ham, A.; Flynn, C. R.; Hill, A.; Rose, K. L.; Kim, H-S.; Deng, C. X.; Walker, J. E.; Gius, D. (2014). SIRT3 Deacetylates ATP Synthase F₁ complex proteins in response to nutrient- and exercise-induced stress. **Antioxid. Redox Signal**. 21(4): 551–564.
- Vergès, B. (2015). Pathophysiology of diabetic dyslipidaemia: where are we? **Diabetologia**. 58(5): 886–899.
- Wang, W. H.; Tyan, Y. C.; Chen, Z. S.; Lin, C. G.; Yang, M. H.; Yuan, S. S.; Tsai, W. C. (2014). Evaluation of the antioxidant activity and antiproliferative effect of the jaboticaba (*Myrciaria cauliflora*) seed extracts in oral carcinoma cells. **BioMed Res. Int.** 2014: 1–8.
- West, K. M.; Ahuja, M. M.; Bennett, P. H.; Czyzyk, A.; De Acosta, O. M.; Fuller, J. H.; Grab, B.; Grabauskas, V.; Jarrett, R. J.; Kosaka, K. (1983). The role of circulating glucose and triglyceride concentrations and their interactions with other "risk factors" as determinants of arterial disease in nine diabetic population samples from the WHO multinational study. **Diabetes Care**. 6(4):361-369.
- Wilbank, M. V.; Chalfun, N. N. J.; Andersen, O. O. (1983). The jaboticaba in Brazil. **Proceedings of the Americans Society for Horticultral Science**, Alexandria. 27: 57-69.
- World Health Organization (WHO). **Noncommunicable diseases country profiles 2018**. Geneva: World Health Organization; 2018.
- Wu, J., & Yan, L. J. (2015). Streptozotocin-induced type 1 diabetes in rodents as a model for studying mitochondrial mechanisms of diabetic β cell glucotoxicity. **Diabetes Metab. Syndr. Obes.** 8: 181-188.
- Wu, J.; Luo, X.; Thangthaeng, N.; Sumien, N.; Chen, Z.; Rutledge, M. A.; Jing, S.; Forster, M. J.; Yan, L. J. (2017). Pancreatic mitochondrial complex I exhibits aberrant hyperactivity in diabetes. **Biochem. Biophys. Rep.** 11(6): 119–129.

- Wu, K. K.; Huan, Y. (2008). Streptozotocin-induced diabetic models in mice and rats. **Curr. Protoc. Pharmacol.** 40 (1): 5.47.1-5.47.14.
- Wu, S., Long, C., & Kennelly, E. J. (2013). Phytochemistry and health benefits of jaboticaba, an emerging fruit crop from Brazil. **Food Res. Int.** 54: 148–159.
- Wu, S.B.; Dastmalchi, K.; Long, C.; Kennelly, E.J. (2012). Metabolite profiling of Jaboticaba (*Myrciaria cauliflora*) and other dark-colored fruit juices. **J. Agric. Food Chem.** 60: 7513–7525.
- Yin, M.; Zhang, P.; Yu, F.; Zhang, Z.; Cai, Q.; Lu, W.; Li, B.; Qin, W.; Cheng, M.; Wang, H.; Gao, H. (2017). Grape seed procyanidin B2 ameliorates hepatic lipid metabolism disorders in db/db mice. **Mol. Med. Rep.** 16(3): 2844–2850.
- Yu, L.; Gong, B.; Duan, W.; Fan, C.; Zhang, J.; Li, Z.; Xue, X.; Xu, Y.; Meng, D.; Li, B.; Zhang, M.; Zhang, B.; Jin, Z.; Yu, S.; Yang, Y.; Wang, H. (2017). Melatonin ameliorates myocardial ischemia/reperfusion injury in type 1 diabetic rats by preserving mitochondrial function: Role of AMPK-PGC-1 α -SIRT3 signaling. **Sci. Rep.** 7(1): 1–13.
- Zhang, H.; Tsao, R. (2016). Dietary polyphenols, oxidative stress and antioxidant and anti-inflammatory effects. **Curr. Opin. Food Sci.** 8: 33–42.
- Zhang, H.; Zhang, H. M.; Wu, L. P.; Tan, D. X.; Kamat, A.; Li, Y. Q.; Katz, M. S.; Abboud, H. E.; Reiter, R. J.; Zhang, B. X. (2011). Impaired mitochondrial complex III and melatonin responsive reactive oxygen species generation in kidney mitochondria of db/db mice. **J. Pineal Res.** 51(3): 338–344.
- Zhang, J. Y.; Deng, Y. N.; Zhang, M. Su, H.; Qu, Q. M. (2016). SIRT3 acts as a neuroprotective agent in rotenone-induced parkinson cell model. **Neurochem. Res.** 41: 1761.
- Zhou, Y.; Chung, A. C. K.; Fan, R.; Lee, H. M.; Xu, G.; Tomlinson, B.; Chan, J. C. N.; Kong, A. P. S. (2017). Sirt3 deficiency increased the vulnerability of pancreatic beta cells to oxidative stress-induced dysfunction. **Antioxid Redox Signal.** 27(13): 962–976.

9. ANEXOS

9.1. Anexo I



28/09/2018 870180136095
17:49
29409161810074818

Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2018 070135 5

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 1

Nome ou Razão Social: FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 88648761000103

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

Endereço: Rua Francisco Getúlio Vargas, 1130

Cidade: Caxias do Sul

Estado: RS

CEP: 95070560

País: Brasil

Telefone: 54 3218-2148

Fax:

Dados do Pedido

Natureza Patente: 10 - Patente de Invenção (PI)

Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54): USO DO EXTRATO DE PLINIA TRUNCIFLORA (O. BERG) KAUSEL

Resumo: A presente invenção descreve uso de extrato de Plinia trunciflora (O. Berg) Kausel no preparo de diferentes composições como nutracêutica, farmacêutica, fitoterápica, suplementos alimentares e alimentos funcionais. Especificamente, a presente invenção compreende o uso do extrato para controle de colesterol, triglicerídeos e aumento de leucócitos e linfócitos em condição de hiperglicemia e, ainda mais especificamente, o uso do extrato para preparo de composição farmacêutica para tratar complicações na Diabetes Mellitus. A presente invenção se situa nos campos da farmácia, alimentos, medicina e nutrição.

Figura a publicar: 1

Dados do Procurador

Procurador:

Nome ou Razão Social: Ricardo Amaral Remer

Numero OAB:

Numero API: 1856

9.2. Anexo II

Tabela 1. Concentração de compostos fenólicos das subfrações (SF) do extrato de casca de jabuticaba (*P. trunciflora*) JPE determinada através da análise de HPLC.

Subfrações do JPE	Compostos fenólicos (µg/mL)									
	AcG	Epg	Cat	Epicat	Epg galato	Rut	AcFer	Nar	Mir	Querc
SF1 ACN	0,724 ± 0,021	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SF1 MetOH	18,724 ± 0,051	-	0,471 ± 0,005	0,700 ± 0,011	0,640 ± 0,003	5,964 ± 0,097	19,696 ± 0,174	0,297 ± 0,062	-	0,468 ± 0,012
SF2	38,711 ± 0,449	-	0,264 ± 0,010	-	-	0,808 ± 0,088	10,619 ± 0,070	-	1,395 ± 0,045	0,923 ± 0,067
SF3	1,469 ± 0,025	0,247 ± 0,010	-	-	-	-	-	-	-	-
SF4	0,809 ± 0,020	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SF5	8,730 ± 0,142	0,129 ± 0,016	0,352 ± 0,015	0,594 ± 0,011	-	-	-	-	-	-
SF6	9,144 ± 0,197	0,141 ± 0,008	0,614 ± 0,016	-	-	1,862 ± 0,072	-	-	-	-

AcG:ácido gálico; Epg: epigallocatequina; Cat: catequina; Epicat: epicatequina; Epg galato: epigallocatequina galato; Rut: rutina; AcFer: ácido ferulico; Nar: naringina; Mir: miricetina; Querc: quercetina.