

UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

**JABUTICABA (*Plinia trunciflora* (O. Berg) Kausel): COMPOSIÇÃO
QUÍMICA, ATIVIDADE ANTIOXIDANTE *IN VITRO* E REDUÇÃO
DO ESTRESSE OXIDATIVO/NITROSATIVO VIA MODULAÇÃO
DA FUNÇÃO MITOCONDRIAL EM CULTURA DE
FIBROBLASTOS HUMANOS (MRC-5)**

CAROLINE CALLONI

Caxias do Sul

2014

CAROLINE CALLONI

JABUTICABA (*Plinia trunciflora* (O. Berg) Kausel): COMPOSIÇÃO QUÍMICA, ATIVIDADE ANTIOXIDANTE *IN VITRO* E REDUÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO/NITROSATIVO VIA MODULAÇÃO DA FUNÇÃO MITOCONDRIAL EM CULTURA DE FIBROBLASTOS HUMANOS (MRC-5)

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

Orientadora: Prof^a Dr^a Mirian Salvador

Co-orientador: Prof. Dr. Sidnei Moura e Silva

Caxias do Sul

2014

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

C163j Calloni, Caroline, 1987-
Jabuticaba (*Plinia trunciflora* (O. Berg) Kausel) : composição química, atividade antioxidante *in vitro* e redução do estresse oxidativo/nitrosativo via modulação da função mitocondrial em cultura de fibroblastos humanos (MRC-5) / Caroline Calloni. – 2014.
xiii, 86 f. : il. ; 30 cm

Apresenta bibliografia.
Dissertação (Mestrado) - Universidade de Caxias do Sul, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2014.
Orientadora: Profa. Dra. Mirian Salvador. Coorientador: Prof. Dr. Sidnei Moura e Silva.

1. Análise química qualitativa - Jabuticaba. 2. Fenóis - Compostos fenólicos. 3. Antioxidantes. 4. Espectrometria de massa. 5. *Plinia trunciflora*. I. Título.

CDU 2.ed.: 543.061:582.776.2

Índice para o catálogo sistemático:

1. Análise química qualitativa - Jabuticaba	543.061:582.776.2
2. Fenóis - Compostos fenólicos	547.562.1
3. Antioxidantes	66.094.3-097.8
4. Espectrometria de massa	543.51
5. <i>Plinia trunciflora</i>	582.776.2

Catalogação na fonte elaborada pela bibliotecária
Roberta da Silva Freitas – CRB 10/1730

CAROLINE CALLONI

JABUTICABA (*Plinia trunciflora* (O. Berg) Kausel): COMPOSIÇÃO QUÍMICA,
ATIVIDADE ANTIOXIDANTE *IN VITRO* E REDUÇÃO DO ESTRESSE
OXIDATIVO/NITROSATIVO VIA MODULAÇÃO DA FUNÇÃO MITOCONDRIAL
EM CULTURA DE FIBROBLASTOS HUMANOS (MRC-5)

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

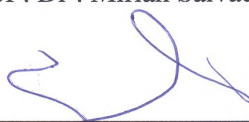
Orientadora Prof^ª. Dr^ª. Mirian Salvador

Co-orientador Prof. Dr. Sidnei Moura e Silva

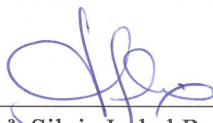
DISSERTAÇÃO APROVADA EM 10 DE NOVEMBRO DE 2014.



Prof^ª. Dr^ª. Mirian Salvador



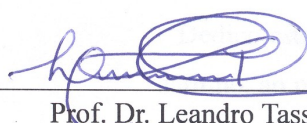
Prof. Dr. Sidnei Moura e Silva



Prof^ª. Dr^ª. Silvia Isabel Rech Franke



Prof^ª. Dr^ª. Patricia Pereira



Prof. Dr. Leandro Tasso

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

“I am among those who think that science has great beauty. A scientist in his laboratory is not only a technician: he is also a child placed before natural phenomena which impress him like a fairy tale.”

Marie Curie

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora, professora **Mirian Salvador**, por ter sido, no melhor sentido da palavra, minha orientadora, por ter guiado meus passos durante esses dois anos, por ter sempre exigido o melhor de mim e acreditado em meu potencial e, finalmente, por me mostrar que encontrar um resultado que não era esperado pode ser muito ruim ou muito bom, só depende do ponto de vista. Minha gratidão!

Ao meu co-orientador, professor **Sidnei Moura e Silva**, por aceitar fazer parte deste trabalho, por ceder seu precioso tempo para auxiliar minhas dúvidas e questionamentos e por ter acreditado e confiado em mim e no meu trabalho.

Aos professores **Jomar Pereira Laurino e Leandro Tasso**, pelo acompanhamento crítico e pelas sugestões a este trabalho.

Agradecimento especial à professora **Dr^a. Neiva Monteiro de Barros**, por ter se mostrado muito prestativa em auxiliar durante momento de dificuldade.

Aos **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 **Luana Soares Martínez, Fábio de Siqueira Marcon e Rafaela Dall Agnol** por terem sido minhas mãos direita e esquerda durante a realização deste trabalho. Minha gratidão pelo empenho, dedicação, disponibilização de tempo, por compartilharem seu entusiasmo, por fazerem parte da minha formação, por me proporcionarem muitos momentos de orgulho e também pelo companheirismo e amizade.

Ao colega **Gustavo Scola**, pela paciência e disponibilização de seu tempo para me transmitir o seu conhecimento, até mesmo de longe. Desde os meus tempos de iniciação científica é um grande exemplo de pesquisador.

A todo o grupo do Laboratório de Estresse Oxidativo e Antioxidantes, **Cátia Branco, Luciana Santos, Bruna Postingher, Natália Stedile, Gabriela Gambato, Émilin Dreher de Lima, Adriana Stolfo, Camila Dallavechia de Col, Kelly Todescato, Tiago Selau Rodrigues, Elisa Pavão e Juliane Sene** pelo auxílio e colaboração, pelas trocas de experiências, pelos momentos de descontração e de boa convivência, pela amizade e por tornarem a rotina do mestrado mais leve.

A minha irmã, **Raquel Calloni**, que desde sempre é meu melhor exemplo de dedicação, empenho, força e superação. Meu maior exemplo de pesquisadora. Que me ensinou a sempre dar o meu melhor em tudo, me ensina até hoje a ser mais humana e a tratar todos com cordialidade e bondade. Minha eterna gratidão!

Aos meus pais, **Adenir A. Calloni e Carmem B. Calloni**, por terem me proporcionado a possibilidade de uma ótima formação acadêmica e pessoal. Por não medirem esforços para que nossos sonhos fossem possíveis. Por preocuparem-se com nossa felicidade e bem estar. Por sempre apoiarem minhas decisões e incentivarem a dar o melhor de mim. Por estarem presentes como uma base forte e segura. E por serem meu maior exemplo de pessoas íntegras e por me ensinarem bons valores.

Ao **Jucimar Zacaria**, por estar presente, quase como um anjo, para me socorrer nos momentos mais difíceis e por dividir e comemorar comigo as alegrias e conquistas. Minha gratidão pela paciência para ouvir minhas reclamações e frustrações. Por ser também meu exemplo de dedicação e integridade de caráter. Por dividir comigo seus conhecimentos e me ajudar com minhas dúvidas. Por ser um grande companheiro, amigo, porto seguro... Muito Obrigada!

ÍNDICE

LISTA DE TABELAS	VIII
LISTA DE FIGURAS	IX
LISTA DE ABREVIATURAS	X
RESUMO	XI
ABSTRACT	XIII
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	3
2.1 Estresse Oxidativo e Nitrosativo	3
2.2 Antioxidantes.....	8
2.2.1 Compostos Fenólicos.....	9
2.2.2 Metodologias para Avaliação de Compostos Fenólicos e Atividade Antioxidante	15
2.3 <i>Plinia sp.</i>	19
2.3.1 Descrição Botânica	19
2.3.2 Produção Comercial	21
2.3.3 Composição Nutricional, Fitoquímica e Atividade Biológica	22
3. OBJETIVO.....	29
3.1 Objetivo Geral	29
3.2 Objetivos Específicos	29
4. RESULTADOS	31
5. DISCUSSÃO GERAL	58
6. CONCLUSÕES.....	67
7. PERSPECTIVAS	68
8. REFERÊNCIAS	69
9. ANEXOS.....	85
9.1. Anexo I	85
9.2. Anexo II.....	86

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Principais componentes do sistema de defesa antioxidante.....	9
Tabela 2. Principais classes de compostos fenólicos, suas estruturas básicas e principais representantes de cada classe.....	12
Tabela 3. Composição centesimal de jabuticaba crua (<i>P. cauliflora</i>) por 100 gramas de parte comestível.....	22
Tabela 4. Principais atividades biológicas relatadas na literatura para jabuticaba.	28

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Cadeia de transporte de elétrons (CTE) mitocondrial, geração de ERO e ERN e defesas antioxidantes.....	4
Figura 2. Efeitos biológicos de ERO/ERN.....	6
Figura 3. Estrutura básica de um flavonoide.....	11
Figura 4. Estruturas químicas das principais agliconas (antocianidinas) de antocianinas.....	13
Figura 5. Estruturas químicas dos flavonóis e alguns representantes mais comuns.....	14
Figura 6. Características estruturais que definem a ação antioxidante de flavonoides.....	15
Figura 7. Microscopia da linhagem de fibroblastos de pulmão humano (MRC-5) com baixa densidade (A) e alta densidade (B) de crescimento.....	17
Figura 8. Imagem de uma jabuticabeira (<i>Plinia</i> sp.).....	20
Figura 9. Folhas (A), flores (B) e frutos (jabuticabas) (C) de <i>Plinia</i> sp.....	20
Figura 10. Estrutura química dos depsídeos jabuticabina (metil 2-[(3,4-diidroxibenzoiloxi)-4,6-diidroxifenil] acetato,1) (1) e ácido 2-O-(3,4-diidroxibenzoil)-2,4,6-triidroxifenil acético) (2).....	25

LISTA DE ABREVIATURAS

ABTS ^{•+}	2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)
ATP	Trifosfato de adenosina
CAT	Catalase
CTE	Cadeia de Transporte de Elétrons
DPPH [•]	2,2-difenil-1-picrilhidrazil
ECJ	Extrato de Casca de Jaboticaba
ERN	Espécies Reativas do Nitrogênio
ERO	Espécies Reativas do Oxigênio
GPx	Glutathione peroxidase
GSH	Glutathione reduzida
GSR	Glutathione reductase
GSSG	Glutathione oxidada
JPE	Jaboticaba peel extract
MRC-5	Fibroblastos de pulmão humano
MTT	3-[4,5-dimetiltiazol-2-il] -2,5-difeniltetrazólio
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NOS	Óxido nítrico sintase
RL	Radicais livres
SOD	Superóxido dismutase
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

RESUMO

A jabuticaba (*Plinia* sp.), uma fruta nativa do Brasil, tem despertado grande interesse científico devido ao seu conteúdo de fitonutrientes e seus benefícios à saúde, sendo considerada um alimento funcional. Estudos demonstraram que a jabuticaba é rica em compostos fenólicos, principalmente antocianinas e flavonóis. Esses compostos vêm sendo relacionados à redução da incidência de doenças que apresentam o estresse oxidativo e nitrosativo em sua fisiopatologia, como doenças cardiovasculares, diabetes e o câncer. Recentemente, estudos têm demonstrado que a disfunção mitocondrial está presente como um fator determinante no desenvolvimento e progressão do estresse oxidativo e nitrosativo e que compostos fenólicos teriam a capacidade de regular essa disfunção. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a composição de macronutrientes, o conteúdo de compostos fenólicos totais e antocianinas da casca e da polpa de jabuticaba (*P. trunciflora*). Paralelamente, determinou-se a composição química do extrato de casca de jabuticaba (ECJ), através de espectrometria de massas, e a sua atividade antioxidante *in vitro* através dos ensaios de DPPH[•] e ABTS^{•+}. Além disso, avaliou-se a capacidade do ECJ em reduzir o estresse oxidativo/nitrosativo e modular a função mitocondrial, a qual foi determinada através da atividade do complexo I da cadeia de transporte de elétrons e da biossíntese de ATP, na linhagem celular de fibroblastos de pulmão humano (MRC-5) tratados com H₂O₂. Os resultados demonstraram que o principal macronutriente presente tanto na casca quanto na polpa da jabuticaba são carboidratos. A casca apresentou maior conteúdo de fibras totais em relação à polpa. Além disso, os compostos fenólicos apresentaram-se em maior quantidade na casca da jabuticaba, sendo que a maior parte destes compostos encontrados na casca são antocianinas. A análise de espectrometria de massas do ECJ permitiu a identificação de cianidina-3-*O*-glicosídeo, canferol, ácido hexadecanóico e ácido octadecanóico. O ECJ apresentou atividade antioxidante *in vitro* nos dois ensaios

utilizados. Nas células MRC-5 o ECJ foi capaz de evitar significativamente a diminuição da atividade do complexo I da cadeia de transporte de elétrons e atenuou a diminuição na biossíntese de ATP induzida pelo H₂O₂. Concomitantemente, o ECJ foi capaz de minimizar o aumento da peroxidação lipídica, os níveis de óxido nítrico e a perda da viabilidade induzida pelo H₂O₂ nas células MRC-5. Estes dados mostram, pela primeira vez, a capacidade do ECJ em reduzir danos oxidativos/nitrosativos via modulação da função mitocondrial em células de mamíferos. Além disso, esses achados representam um avanço em relação ao entendimento dos mecanismos de ação dos compostos fenólicos e colaboram como uma alternativa para o desenvolvimento de possíveis tratamentos de doenças que apresentam a disfunção mitocondrial e o estresse oxidativo/nitrosativo em sua fisiopatologia.

Palavras-chave: Jabuticaba, *Plinia trunciflora*, compostos fenólicos, antioxidantes, mitocôndria

ABSTRACT

Jaboticaba (*Plinia* sp.), a native fruit from Brazil, has attracted scientific interest due to its phytonutrient content and potential health benefits, and therefore it has been considered a functional food. Studies have shown that jaboticaba is a rich source of phenolic compounds, mainly anthocyanins and flavonols. Phenolic compounds are natural products that hold important biological activities and have been reported to reduce the incidence of disease associated with oxidative and nitrosative stress in their pathophysiology, such as cardiovascular diseases, diabetes and cancer. Recent studies have shown that mitochondrial dysfunction is a key factor in development and progression of oxidative and nitrosative stress. Moreover, studies have observed the ability of phenolic compounds to modulate mitochondrial function. Thus the aim of this study was to evaluate the macronutrient composition, the total phenolic content and anthocyanins content in jaboticaba (*P. trunciflora*) peel and pulp. Simultaneously, it was determined the chemical composition of the jaboticaba peel extract (JPE) by mass spectrometry, and its *in vitro* antioxidant activity through the DPPH[•] and ABTS^{•+} assays. The ability of JPE to reduce oxidative/nitrosative stress and modulate mitochondrial function, assessed by complex I activity and ATP biosynthesis, in human lung fibroblasts cells (MRC 5) challenged with H₂O₂ were also determined. Results evidenced that the majority of macronutrients present in both peel and pulp are carbohydrates. Jaboticaba peel showed higher fiber content than the pulp. Phenolic compounds are also present in higher quantity in the peel, and almost all phenolic compounds present in the peel are anthocyanins. Mass spectrometry analysis of the JPE allowed the identification of cyanidin-3-O-glucoside, kaempferol, hexadecanoic acid and octadecanoic acid compounds. The JPE presented *in vitro* antioxidant activity, through DPPH[•] and ABTS^{•+} assays. In MRC-5 cells, JPE was able to prevent the decrease in complex I activity and attenuated the decrease in ATP levels induced by

H₂O₂. The ECJ was also able to minimize the increased in lipid peroxidation and nitric oxide levels, and prevented the cell viability loss induced by H₂O₂. These results show for the first time, the ability of JPE to reduce oxidative/nitrosative damage via modulation of mitochondrial function in mammalian cells. Furthermore, these findings represent an advance over the understanding of the mechanisms of action of phenolic compounds and collaborate as an alternative for the development of potential treatments for diseases with mitochondrial dysfunction and oxidative/nitrosative stress in their pathophysiology.

Keywords: Jaboticaba, *Plinia trunciflora*, phenolic compounds, antioxidants, mitochondria

1. INTRODUÇÃO

A *Plinia trunciflora* (O. Berg) Kausel, assim como a *Plinia cauliflora* (Mart.) Kausel e a *Plinia jaboticaba* (Vell.) Kausel, são espécies de jabuticabeiras que apresentam distribuição natural e são cultivadas no Brasil. Essas três espécies, que pertencem a família Myrtaceae, têm ocorrência principalmente no sul e sudeste do País e apresentam características muito semelhantes entre si (Lorenzi *et al.*, 2000; Sobral *et al.*, 2012). Os frutos destas espécies, denominados jabuticaba, crescem diretamente no tronco e galhos principais da árvore e, quando maduros, apresentam casca de coloração roxa, quase negra, e polpa branca com sabor agridoce e textura gelatinosa. A jabuticaba é muito consumida na forma *in natura*, entretanto, por ser muito perecível, é normalmente utilizada na fabricação de geleias, sucos, vinhos, licores e vinagres (Wilbank *et al.*, 1983). Na medicina tradicional, há relatos do uso do chá de casca de *P. cauliflora* para o tratamento de doenças como asma, angina, disenteria e infecções cutâneas (Morton, 1987).

Nos últimos anos, a jabuticaba (*Plinia* sp.) tem despertado grande interesse científico em relação aos possíveis efeitos benéficos à saúde e seu potencial como alimento funcional. Esse interesse é devido, principalmente, aos fitonutrientes presentes na fruta, em especial os compostos fenólicos. De fato, estudos já demonstraram que a jabuticaba, especificamente as espécies *P. cauliflora* e *P. jaboticaba*, apresenta importante atividade biológica, notadamente atividade antioxidante, a qual tem sido atribuída principalmente aos flavonóis e antocianinas que estão concentrados em sua grande maioria na casca da fruta (Reynertson *et al.*, 2006; Leite-Legatti *et al.*, 2012; Wu *et al.*, 2012).

Os compostos fenólicos são produtos naturais largamente distribuídos em frutas e vegetais e são, portanto, parte integrante da dieta humana (Del Rio *et al.*, 2013). São conhecidos por apresentarem diversos efeitos biológicos, incluindo as atividades

anti-inflamatória, antiaterogênica, vasodilatadora, antimicrobiana e, principalmente, antioxidantes. Os compostos fenólicos podem exercer atividade antioxidante através da redução direta de espécies reativas do oxigênio/nitrogênio (ERO/ERN), ou de forma indireta, como por exemplo, através da modulação dos complexos transportadores de elétrons da cadeia mitocondrial (Fraga *et al.*, 2010; Sandoval-Acuña *et al.*, 2014).

A mitocôndria é considerada a principal fonte intracelular de geração de ERO e uma disfunção mitocondrial pode levar a um incremento na geração de ERO/ERN, com consequentes danos às biomoléculas (Murphy, 2009). Recentemente, estudos têm demonstrado a presença de disfunção mitocondrial na fisiopatologia de doenças como Parkinson, desordem bipolar, tumorigênese e progressão e invasão do câncer (Sharma *et al.*, 2011; Taddei *et al.*, 2012; Subramaniam & Chesselet, 2013). Embora existam, ainda, poucos estudos, aparentemente alguns compostos fenólicos, incluindo a quercetina, a luteolina, o canferol, a cianidina-3-*O*-glicosídeo e a delphinidina-3-*O*-glicosídeo, são capazes de interagir com os complexos transportadores de elétrons e, assim, reduzir os danos oxidativos/nitrosativos (Sharma *et al.*, 2011; Taddei *et al.*, 2011; Subramaniam & Chesselet, 2013; Scola *et al.*, 2013; Carrasco-Pozo *et al.*, 2012; Xie *et al.*, 2012). Desta forma, considerando este contexto, a identificação de compostos fenólicos presentes na *P. trunciflora*, espécie de jabuticaba até então menos estudada, e o estudo de seu efeito/mecanismo antioxidante pode contribuir para o entendimento do mecanismo de ação de compostos fenólicos, colaborando para a definição de novas estratégias terapêuticas para o tratamento destas doenças.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Estresse Oxidativo e Nitrosativo

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) (Figura 1) (Buonocore *et al.*, 2010; Pamplona & Constantini, 2011). Um RL é definido como um átomo, uma molécula ou um íon que apresenta pelo menos um elétron não emparelhado na camada de valência. Em virtude disso, os RL são altamente instáveis e apresentam capacidade de reagir com outras moléculas, ou seja, um RL pode receber elétrons, oxidando um átomo/molécula ou doar um elétron reduzindo, assim, um elemento (Ferrari *et al.*, 2011). Os RL podem ser derivados do oxigênio ou do nitrogênio, compondo, dessa forma, as ERO ou as ERN, respectivamente. As ERO/ERN compreendem moléculas também derivadas do oxigênio ou do nitrogênio que não apresentam elétrons não emparelhados, mas que são da mesma forma altamente reativas e capazes de gerar outras ERO/ERN (Carocho & Ferreira, 2013).

As ERO incluem radicais livres como superóxido ($O_2^{\bullet-}$), hidroxil ($HO^{\bullet}$), alcóxil ($RO^{\bullet}$) e peróxil ($RO_2^{\bullet}$), juntamente com espécies não radicalares, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), oxigênio singlet (1O_2), o ácido hipocloroso ($HOCl$) e o ozônio (O_3). Dentre as ERN estão o óxido nítrico ($ON^{\bullet}$) e o ânion peroxinitrito ($ONOO^{\bullet-}$) (Lü *et al.*, 2010).

A redução do O_2 é um dos principais mecanismos de formação de ERO. O produto inicial é o $O_2^{\bullet-}$, o qual resulta da adição de um simples elétron à molécula de O_2 . O $O_2^{\bullet-}$ formado pode ser rapidamente degradado pela enzima antioxidante superóxido dismutase (SOD), gerando H_2O_2 e O_2 . O H_2O_2 , por sua vez, pode ser decomposto pelas

enzimas catalase (CAT) ou glutationa peroxidase (GPx) a H_2O e O_2 ou, por outro lado, ser convertido no radical $\text{HO}^\bullet$, na presença de metais de transição reduzidos, como o ferro (Fe^{+2}), através da reação de Fenton (Figura 1) (Trachootham *et al.*, 2008; Hekimi *et al.* 2011).

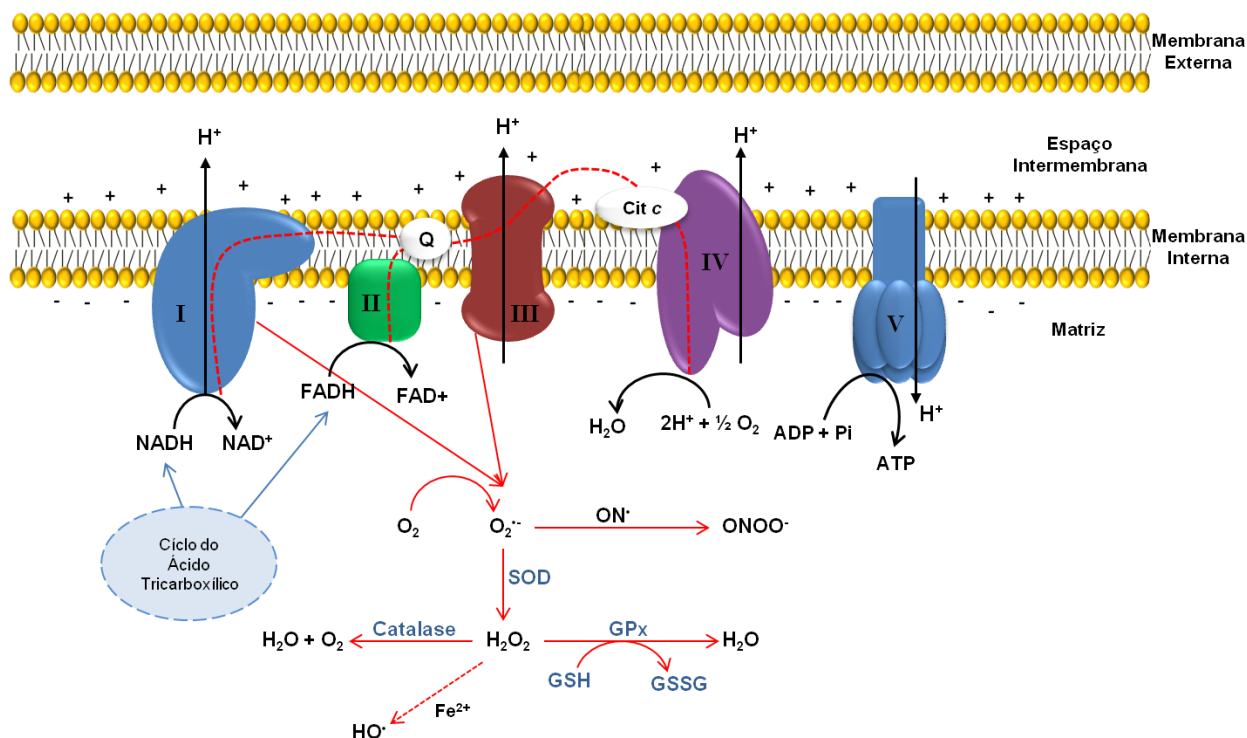


Figura 1. Cadeia de transporte de elétrons (CTE) mitocondrial, geração de ERO e ERN e defesas antioxidantes. A CTE é constituída por quatro complexos protéicos (I-IV) e pela ATP sintase (V) localizados na membrana interna da mitocôndria. O complexo I oxida o NADH a NAD^+ e o complexo II converte o FADH a FAD, ambos gerados no ciclo dos ácidos tricarboxílicos. 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 à 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 ONOO^- 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 maior fonte endógena de geração de ERO é a mitocôndria, onde o $O_2^{\bullet-}$ é formado a partir do escape de elétrons da cadeia de transporte de elétrons (CTE), principalmente nos complexos I (NADH:ubiquinona redutase) e III (Citocromo-c redutase) da CTE (Kussmaul & Hirst, 2006; Rigoulet *et al.*, 2011). Estudos têm demonstrado que a diminuição da atividade dos complexos I e III leva a um aumento na geração de $O_2^{\bullet-}$ (Carrasco-Pozo *et al.*, 2011; Carrasco-Pozo *et al.*, 2012; Sandoval-Acuña *et al.*, 2014) (Figura 1). Outras fontes endógenas de geração de ERO são as enzimas microsossomais, 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 (Trachootham *et al.*, 2008). Além disso, o $ON^{\bullet}$ é formado através de isoformas específicas da enzima óxido nítrico sintase (ONS), as quais incluem as isoformas mitocondrial (mtNOS), neuronal (nNOS), endotelial (eNOS) e a induzível (iNOS). O $ON^{\bullet}$ formado a partir destas isoenzimas pode levar a geração de $ONOO^-$, através da reação com o $O_2^{\bullet-}$. No entanto, a principal via metabólica do $ON^{\bullet}$ envolve sua oxidação rápida a óxidos de nitrogênio superiores, como nitrito (NO_2^-) e nitrato (NO_3^-) (Brown & Borutaite, 2004).

Além da geração endógena contínua de ERO/ERN, existem fatores externos que podem induzir a formação intracelular destas moléculas. Fontes exógenas incluem irradiação (ultravioleta, raios-X e gama), poluentes atmosféricos, como dióxido de nitrogênio (NO_2), fármacos e seus metabólitos, constituintes do tabaco, etanol e pesticidas (Figura 2) (Lobo *et al.*, 2010).

Em condições fisiológicas normais, as células são capazes de manter a homeostase do seu estado redox através da geração e eliminação de ERO/ERN.

Além disso, diversas evidências demonstram que ERO/ERN atuam na sinalização celular em vários processos fisiológicos normais, tais como regulação da proliferação e de sobrevivência celular (Ma, 2010).

Uma disfunção nos mecanismos que mantêm o equilíbrio entre a produção e a eliminação de ERO/ERN pode levar a alterações do estado redox da célula. Um aumento na formação de ERO/ERN ou uma diminuição da capacidade da célula de eliminar essas moléculas devido a estímulos exógenos ou alterações metabólicas endógenas pode levar a um distúrbio da homeostase redox, conduzindo a um estado de estresse oxidativo/nitrosativo (Figura 2). Quando as células se encontram em um estado de estresse oxidativo/nitrosativo, o excesso de ERO/ERN pode reagir com biomoléculas, como lipídeos, proteínas e o DNA, resultando em danos oxidativos severos (Trachootham *et al.*, 2008).

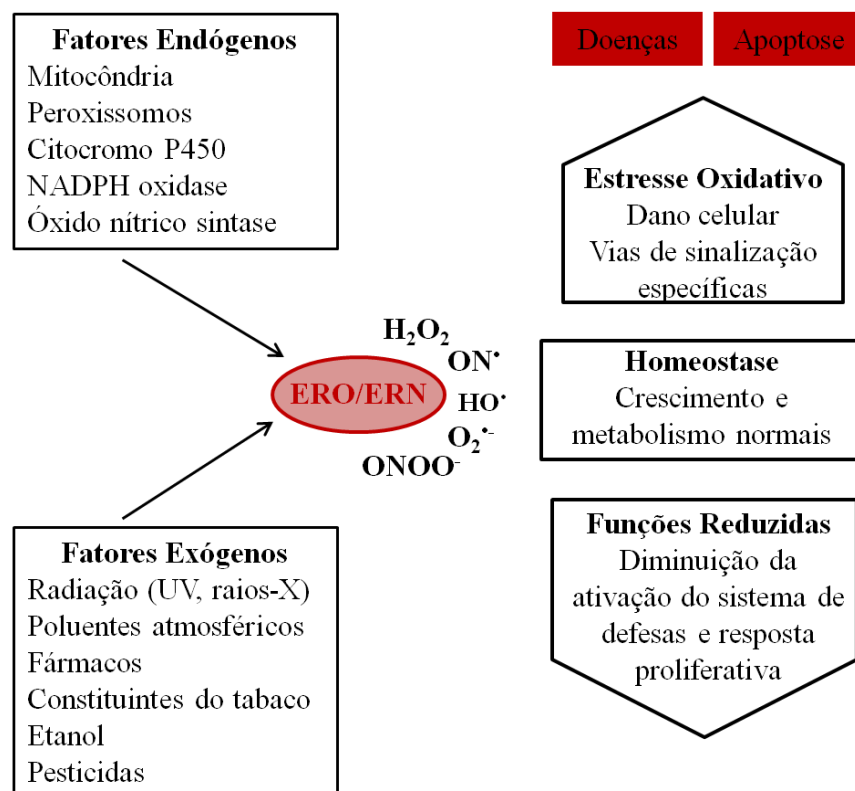


Figura 2. Efeitos biológicos das ERO/ERN. A produção de ERO/ERN deriva do metabolismo normal e de processos endógenos ou é estimulada por agentes exógenos. As ERO/ERN, quando em concentrações fisiológicas, são necessárias para a função normal das células, enquanto que o excesso de produção de ERO/ERN conduz ao estresse oxidativo, que contribui para o envelhecimento e desenvolvimento de doenças. Fonte: adaptado de Ma, 2010.

Os lipídios são as moléculas mais suscetíveis à modificação oxidativa. A peroxidação lipídica é iniciada através da reação de um radical livre 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, conseqüentemente, 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 reação em cadeia que, como resultado, produz aldeídos, incluindo o malondialdeído e o 4-hidroxi-2-nonenal (Ogino & Wang, 2007; Mangialasche *et al.*, 2009).

A oxidação de proteínas pode ocorrer de três diferentes formas: 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. Os danos oxidativos a proteínas podem afetar a função de receptores, enzimas, anticorpos e proteínas de transporte (Dalle-Donne *et al.*, 2003; Mangialasche *et al.* 2009).

O dano induzido pelos radicais livres 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 cromossomais. 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/nitrosativo e os danos a 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, diabetes *mellitus*, obesidade, desordens neurológicas e as doenças de Alzheimer e Parkinson (Valko et al., 2007).

2.2 Antioxidantes

Um antioxidante é definido com uma molécula que, quando presente em baixas concentrações quando comparado com aquelas do substrato oxidável, retarda ou inibe significativamente a oxidação do substrato ou pode ser definida ainda como uma molécula que retarda, impede ou elimina os danos oxidativos a uma molécula-alvo (Halliwell, 2007; Khlebnikov *et al.*, 2007).

Os organismos aeróbios 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 glutathione peroxidase (GPx), a catalase (CAT) e a superóxido dismutase (SOD). A enzima GPx atua doando elétrons para reduzir peróxidos, a Cat converte o H_2O_2 em água e O_2 e, por fim, a SOD converte o $\text{O}_2^{\cdot-}$ em H_2O_2 , o qual se torna substrato para a enzima CAT ou da GPx. Essas três enzimas, GPx, CAT e SOD, atuam como uma linha primária de defesa antioxidante. A linha de defesa antioxidante secundária é composta por outras enzimas como a glutathione reductase (GSR), a qual converte a glutathione de sua forma oxidada (GSSG) para a forma reduzida (GSH) e a glicose-6-fosfato desidrogenase, que regenera o NADPH (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato) para manter um ambiente redutor (Tabela 1) (Rahman, 2007; Carrocho & Ferreira, 2013).

Apesar de serem eficientes, as defesas antioxidantes endógenas muitas vezes não são suficientes, fazendo com que a participação de antioxidantes obtidos através da dieta seja importante para a manutenção do equilíbrio redox. Dentre os antioxidantes não enzimáticos destacam-se principalmente as vitaminas C e E, os carotenoides, como o β -caroteno e os compostos fenólicos (Tabela 1) (Bouayed & Bohn, 2010; Carrocho & Ferreira, 2013).

Tabela 1. Principais componentes do sistema de defesa antioxidante.

ANTIOXIDANTES ENZIMÁTICOS	
Classes	Exemplos
Defesas enzimáticas primárias	Glutathione peroxidase (GPx) Superóxido dismutase (SOD) Catalase (CAT)
Defesas enzimáticas secundárias	Glutathione reductase (GSR) Glicose-6-fosfato desidrogenase
ANTIOXIDANTES NÃO ENZIMÁTICOS	
Classes	Exemplos
Vitaminas	Vitamina C (ácido ascórbico) Vitamina E (α -tocoferol)
Carotenoides	β -caroteno Licopeno
Compostos fenólicos	Flavonóis Antocianinas
Outros: Glutathione (GSH) e NADPH	

Fonte: adaptado de Bouayed & Bohn, 2010.

2.2.1 Compostos Fenólicos

Os compostos fenólicos são metabólitos secundários produzidos principalmente por plantas e constituem-se num dos mais numerosos grupos de produtos naturais amplamente distribuídos no reino vegetal (Tsao, 2010). Esses compostos são sintetizados, em parte, como uma resposta ao estresse ambiental e fisiológico, 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 (Treutter, 2006).

A maior parte dos compostos fenólicos é sintetizada a partir de duas vias metabólicas principais. Uma delas é a via do ácido chiquímico, onde são formados principalmente fenilpropanoides, e a outra, a via do ácido acético, na qual 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, (Balasundram *et al.*, 2006).

Os ácidos fenólicos são constituídos de dois subgrupos, os ácidos hidroxibenzoicos e hidroxicinâmicos. O grupo dos ácidos hidroxibenzóicos inclui os ácidos gálico, *p*-hidroxibenzóico, protocatecuico, vanílico e siríngico, 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 (Balasundram *et al.*, 2006; Russell & Duthie, 2011).

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 (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 (Balasundram *et al.*, 2006; Giada, 2013).

Os estilbenos, classificados como não flavonoides, apresentam uma estrutura C6-C2-C6 e representam um componente alimentar extremamente menor. O principal estilbeno conhecido é o resveratrol, que ocorre como isômeros *cis* e *trans*, bem como conjugados, incluindo o *trans*-resveratrol-3-*O*-glicosídeo. Os 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). 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 3). Os flavonoides 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 2) (Balasundram *et al.*, 2006; Tsao, 2010; González-Paramás *et al.*, 2011).

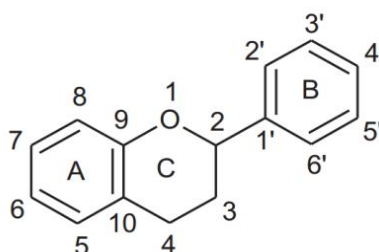
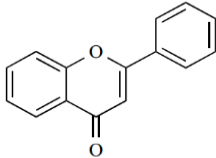
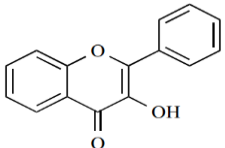
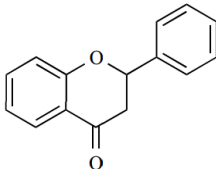
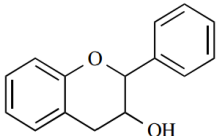
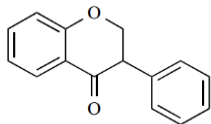
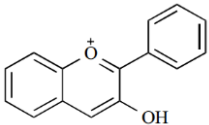
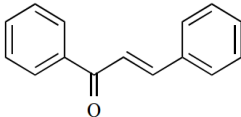


Figura 3. Estrutura básica de um flavonoide. Fonte: adaptado de Del Rio *et al.*, 2013.

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, como 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 vários fatores tais como o clima, a espécie, a variedade, o grau de maturação e o armazenamento pós-colheita (Tomás-Barberán & Espín, 2001).

Tabela 2. 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)galocatequina
Isoflavonas		Genisteína e daidzeína
Antocianinas		Cianidina, delfinidina, malvidina, pelargonidina, petunidina e peonidina
Chalcona		Ploretina, arbutina e buteina

Fonte: adaptado de González-Paramás *et al.*, 2011

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 (Mazza, 2007). Estruturalmente, as antocianinas compreendem uma aglicona, denominada antocianidina, ligada a uma ou mais unidades de açúcar. As antocianinas geralmente encontradas em frutos são glicosiladas na posição 3-OH (3-O-monoglicosídeos) e, em menor extensão, em ambas as posições 3 e 5-OH (3,5-O-diglicosídeos) (Figura 4) (Jaakola, 2013; Fernandes *et al.*, 2014).

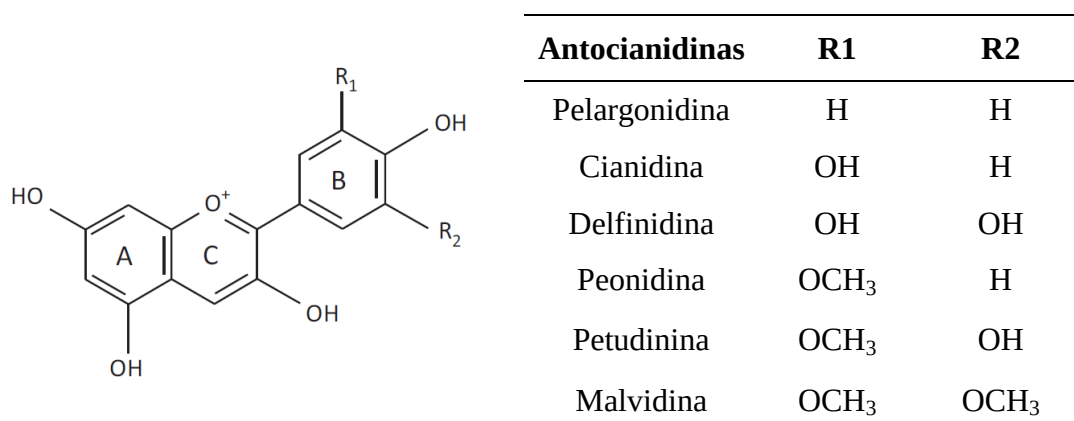


Figura 4. Estruturas químicas das principais agliconas (antocianidinas) de antocianinas. Fonte: adaptado de Jaakola, 2013

Apesar das antocianinas 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). Dentre as antocianinas conhecidas, a cianidina é a mais comumente encontrada em frutas (Jaakola, 2013).

Os flavonóis, outra classe de flavonoides, são flavonas substituídas na posição C-3 por uma hidroxila. Esses compostos são os flavonoides 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 5) (Simões *et al.*, 2010). Estes compostos acumulam-se principalmente nos tecidos externos (pele e folhas), em virtude de sua biossíntese ser estimulado pela luz (Manach *et al.*, 2004).

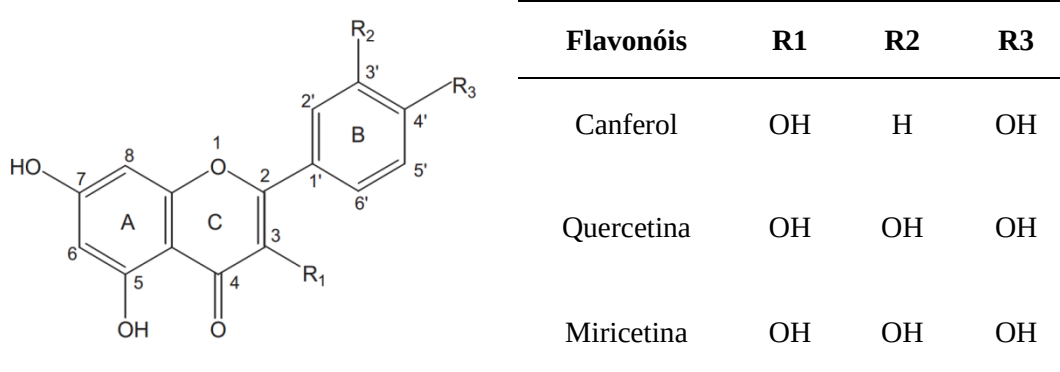


Figura 5. Estruturas químicas dos flavonóis e alguns representantes mais comuns.
Fonte: adaptado Simões *et al.*, 2010.

O estudo dos compostos fenólicos tem indicado uma variedade de propriedades biológicas, tais como atividades antioxidante, anti-inflamatória, antimicrobiana e cardioprotetora. Além disso, a alta ingestão de frutas e verduras ricas em compostos fenólicos tem sido associada a riscos reduzidos de doenças crônicas, incluindo câncer e doenças cardiovasculares (Bouayed & Bohn, 2010; Boeing *et al.*, 2012). Por outro lado, os compostos fenólicos são conhecidos também por agirem fatores antinutricionais, ou seja, esses compostos apresentam capacidade de se ligarem a nutrientes como ferro e zinco tornando esses minerais menos biodisponíveis para a absorção (Raes *et al.*, 2014).

A atividade antioxidante dos compostos fenólicos é a mais estudada delas, sendo que 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 radicais livres (Figura 6) (Balasundram *et al.*, 2006).

Portanto, os compostos fenólicos podem complementar e contribuir para as funções de vitaminas e enzimas antioxidantes, como defesas contra o estresse oxidativo/nitrosativo.

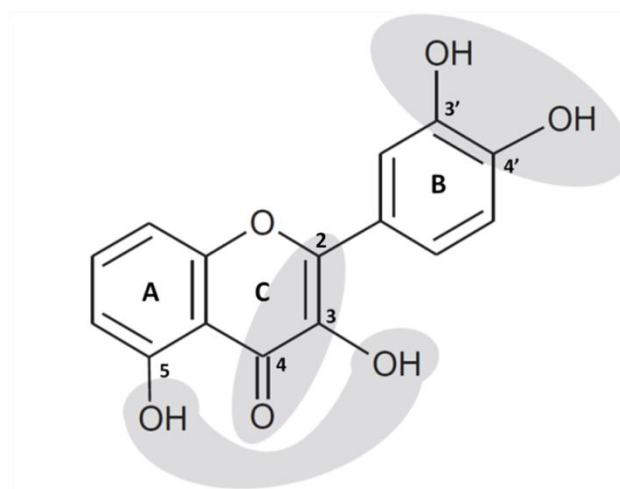


Figura 6. Características estruturais que definem a ação antioxidante de flavonoides. As áreas destacadas mostram os três critérios necessários para a atividade antioxidante máxima de flavonoides: um grupo catecol no anel B (3'- e 4'- OH), a ligação dupla entre os carbonos 2 e 3 conjugado com 4-ceto do anel C e as hidroxilas em 3 e 5 dos anéis C e A, respectivamente. Fonte: adaptado de Fraga *et al.*, 2010.

2.2.2 Metodologias para Avaliação de Compostos Fenólicos e Atividade Antioxidante

Embora a determinação quantitativa de compostos fenólicos seja dificultada pela sua complexidade e diversidade estrutural, vários métodos têm sido utilizados para determinação do conteúdo destes compostos em extratos de plantas. Um dos ensaios mais conhecidos para a determinação do conteúdo de compostos fenólicos de extratos utiliza o reagente de Folin-Ciocalteu. A reação forma um cromóforo azul constituído por um complexo fosfomolibdênio-fosfotúngstico, onde a absorção máxima dos cromóforos depende da solução alcalina e da concentração de compostos fenólicos e pode ser

quantificado espectrofotometricamente a 765nm. Essa reação geralmente fornece dados relativamente exatos e específicos para vários grupos de compostos fenólicos (Singleton & Rossi, 1965; Blainski, Lopes, & Mello, 2013).

Considerando a alta complexidade envolvida na ação antioxidante *in vivo*, diversas metodologias *in vitro* têm sido empregadas para estimar, de forma experimental simples, a capacidade antioxidante de compostos naturais e suas misturas. Dentre as metodologias de determinação da atividade antioxidante *in vitro*, podem-se destacar os ensaios de determinação da capacidade de redução dos radicais DPPH[•] (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) e ABTS^{•+} (2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico), os quais são radicais livres estáveis que apresentam coloração e têm sido amplamente empregados para a avaliação da atividade antioxidante de produtos naturais. O ensaio DPPH[•] baseia-se no princípio de que o antioxidante é o doador de hidrogênio. O DPPH[•] é um ensaio colorimétrico, no qual existe a mudança da cor púrpura para amarelo na presença de antioxidantes, a qual pode ser lida espectrofotometricamente a 517nm (Niki, 2010). Já o ensaio de ABTS^{•+} envolve a oxidação inicial do 2,2-azinobis [3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato] para um radical cátion intensamente colorido, o ABTS^{•+}, que na presença de antioxidantes, perde essa coloração. O ensaio de ABTS^{•+} é muito utilizado para testar extratos de alimentos, já que o ABTS^{•+} tem uma absorção máxima em 734 nm e a maioria dos extratos de alimentos são altamente coloridos, mas não absorvem luz a 734 nm. É útil ainda para sistemas aquosos ou lipofílicos (Re *et al.*, 1999; Carochi & Ferreira, 2013).

A cultura de células tem sido frequentemente utilizada como modelo para elucidar os mecanismos subjacentes ao estresse oxidativo e também para avaliar os efeitos protetores dos antioxidantes contra vários indutores de estresse oxidativo. A vantagem da utilização de células em cultura é a possibilidade de utilizar vários indutores de estresse e diferentes tipos celulares para a avaliação do efeito antioxidante (Piga *et al.*, 2010; Niki, 2010). Além disso, permite a elucidação de mecanismos de ação de moléculas com

possível uso terapêutico, facilitando a análise das propriedades biológicas e processos que não seriam elucidados em ensaios químicos (Zucco *et al.*, 2004).

Linhagens celulares, como por exemplo, os fibroblastos isolados de pulmão humano (MRC-5) (Figura 7), vêm sendo largamente utilizadas no estudo de compostos naturais. A linhagem MRC-5 cresce em cultura aderente e apresenta tempo de duplicação de população de cerca de 24 horas e pode duplicar o tamanho da população entre 42 a 46 vezes antes do início da senescência (Jacobs *et al.*, 1970).

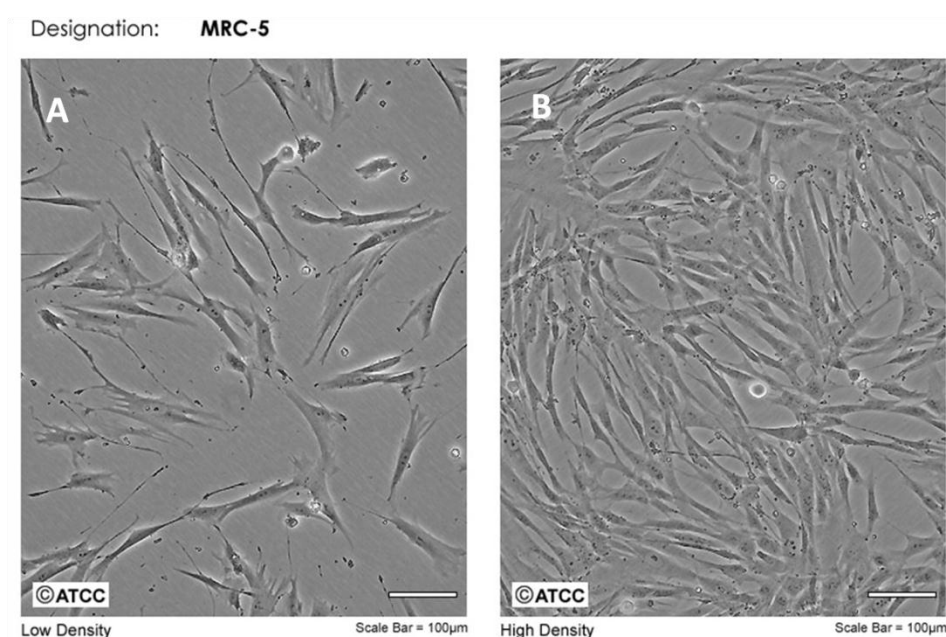


Figura 7. Microscopia da linhagem de fibroblastos de pulmão humano (MRC-5) com baixa densidade **(A)** e alta densidade **(B)** de crescimento. Fonte: adaptado de American Type Culture Collection (ATCC).

Os efeitos dos antioxidantes podem ser observados em cultura de células através da avaliação da supressão da formação de ERO/ERN, dos níveis de oxidação de lipídios e proteínas, danos ao DNA, e também através da determinação da viabilidade celular.

A viabilidade celular tem sido amplamente avaliada através do ensaio de MTT ((3 - [4,5-dimetiltiazol-2-il] -2,5-difeniltetrazólio). O MTT é um sal de tetrazólio solúvel em água, que é convertido através da clivagem do anel tetrazólio para cristais de formazan de cor púrpura. O MTT pode ser reduzido por desidrogenases e agentes redutores presentes, principalmente, nas mitocôndrias de células metabolicamente ativas.

Portanto, o acúmulo de cristais de formazan intracelular é diretamente proporcional a viabilidade celular e pode ser considerado um marcador indireto da função mitocondrial (Fotakis & Timbrell, 2006).

Outro ensaio que tem sido empregado para a determinação da viabilidade celular é a coloração de *trypan blue*. O *trypan blue* é um corante diazótico que tem sido largamente utilizado para corar seletivamente tecidos ou células mortas. O mecanismo de coloração com *trypan blue* é baseado na característica deste composto em não interagir com as células a menos que a membrana plasmática esteja danificada. Portanto, todas as células com membrana plasmática íntegra são capazes de evitar a entrada do corante e são, desta forma, consideradas viáveis. Por outro lado, nas células danificadas, a permeabilidade da membrana plasmática é alterada levando a um distúrbio da homeostase e, conseqüentemente, a morte celular. O dano à membrana plasmática leva a formação de poros que permitem a entrada do corante. Desta forma, as células são coradas com uma cor azul característica, a qual é facilmente observada sob um microscópio óptico (Tran *et al.*, 2011).

Os níveis de $\text{ON}^\bullet$ podem ser quantificados em células de mamíferos de forma indireta pela determinação de seu produto de decomposição, o NO_2^- , através da reação de Griess. Essa reação é composta por duas etapas nas quais o agente nitrosante trióxido de dinitrogênio (N_2O_3), gerado a partir da acidificação do NO_2^- ou pela autooxidação do $\text{ON}^\bullet$, reage com a sulfanilamida formando um íon diazônio que, por sua vez, interage com o *N*-(1-naftil) etilenodiamina para formar um cromóforo diazo colorido que apresenta absorção em 550 nm (Bryan & Grisham, 2007).

A quantificação dos produtos finais da peroxidação lipídica, como hidrocarbonetos (etano e pentano) e aldeídos (malondialdeído), pelo método de TBARS (Substâncias Reativas do Ácido Tiobarbiturico), que mensura os produtos capazes de reagir com o ácido tiobarbitúrico, é um importante indicador de níveis de danos

oxidativos aos lipídeos e pode ser utilizado como marcador de estresse oxidativo em cultura de células de mamíferos (Halliwell & Gutteridge, 2007).

2.3 *Plinia* sp.

2.3.1 Descrição Botânica

A *Plinia* sp., conhecida popularmente como jabuticabeira, 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 goiaba (*Psidium guajava*), a pitanga (*Eugenia uniflora*) e também a jabuticaba (*Plinia* sp.). São conhecidas, dentro do gênero *Plinia* sp., cerca de nove espécies de jabuticaba, das quais apenas três tem distribuição natural e são cultivadas no Brasil, sendo elas a *Plinia trunciflora* (O. Berg) Kausel (sinônimo de *Myrciaria trunciflora* Mart. (O. Berg), conhecida como jabuticaba de cabinho; a *Plinia cauliflora* (DC.) Berg, conhecida como jabuticaba paulista, ponhema ou assú; e a *Plinia jaboticaba* (Vell.) Berg, conhecida como sabará. As duas últimas 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 (Mattos, 1983).

Estas três espécies de jabuticaba cultivadas no Brasil compartilham entre si características muito semelhantes, o que leva a certa dificuldade em relação à identificação botânica. Em geral, *Plinia* sp. apresenta-se como uma árvore de tamanho médio, que comumente atinge entre 4 a 7 metros de altura, podendo chegar até 12 metros. Forma copa com grande número de ramificações 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 e pontudas no ápice (Figura 9A). O tronco é liso, com cerca de 30 a 40 cm de diâmetro, e a casca descama anualmente (Morton, 1987).

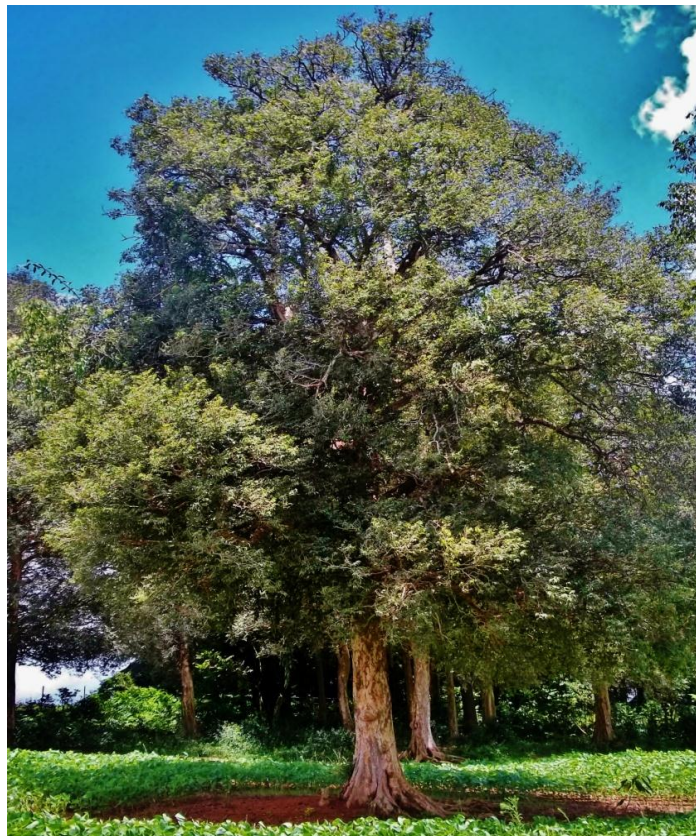


Figura 8. Imagem de uma jabuticabeira (*Plinia* sp.).
Fonte: arquivo pessoal do autor.

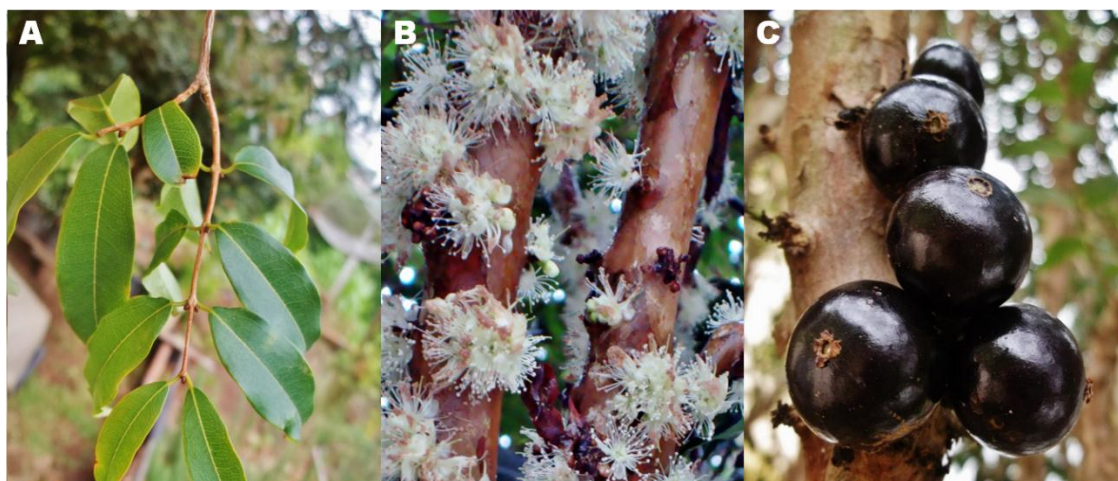


Figura 9. Folhas (A), flores (B) e frutos (jabuticabas) (C) de *Plinia* sp. Fonte: arquivo pessoal do autor.

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, quase negra, que cobre uma polpa branca, de sabor agridoce e textura gelatinosa, a qual pode conter entre 1 e 4 sementes (Meletti, 2000). As flores e frutos (Figura 9B e C) nascem diretamente no tronco e nos galhos principais da árvore, o que confere uma aparência distinta à planta. As jabuticabeiras frutificam em abundância 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).

2.3.2 Produção Comercial

A produção comercial de jabuticabas no Brasil, embora em crescimento, ainda é pequena e limitada a algumas regiões, principalmente São Paulo, Rio de Janeiro e Minas Gerais, e por isso, há poucas informações sobre sua produção e comercialização (Sato & Cunha, 2007; Citadin *et al.*, 2010). A informação mais recente reporta que em 2008 foram comercializadas aproximadamente 2.000 toneladas de jabuticabas na Companhia de Entrepósitos e Armazéns Gerais de São Paulo (CEAGESP) e nos CEASAS de Curitiba e Belo Horizonte (Citadin *et al.*, 2010).

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 (Brunini *et al.*, 2004; Balerdi *et al.*, 2006). Em consequência disso, a fruta é geralmente utilizada na fabricação de geleias, sucos, vinhos, licores e vinagres (Wilbank *et al.*, 1983).

2.3.3 Composição Nutricional, Fitoquímica e Atividade Biológica

Os frutos frescos de *Plinia* sp. apresentam uma grande variedade de nutrientes como carboidratos, sais minerais, aminoácidos e vitaminas. As frutas são ricas em cálcio, ferro, potássio e especialmente fósforo. Além disso, o ácido ascórbico (vitamina C), um antioxidante hidrofílico, está presente em quantidades importantes na polpa da fruta, como mostra a Tabela 3 (Lorenzi *et al.*, 2000; Oliveira *et al.*, 2003; Rufino *et al.* 2011).

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).

Tabela 3. Composição centesimal de jabuticaba crua (*P. cauliflora*) por 100 gramas de parte comestível.

Nutrientes	Quantidade/100g
Calorias (Kcal)	58
Proteína (g)	0,6
Lipídeos (g)	0,1
Carboidratos (g)	15,3
Fibra alimentar (g)	2,3
Umidade (%)	83,6
Cinzas (g)	0,4
Cálcio (mg)	8
Ferro (mg)	0,1
Fósforo (mg)	15
Potássio (mg)	130
Vitamina C (mg)	16,2

Fonte: adaptado da tabela brasileira de composição de alimentos (TACO). NEPA – UNICAMP. 4ª Ed. rev. e ampl. 2011.

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). Entretanto, estes estudos 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*.

Os estudos realizados com *P. cauliflora* e *P. jaboticaba* demonstram que estas espécies de jabuticaba, de forma semelhante a outras frutas de cor escura, como o mirtilo e a uva, por exemplo, 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).

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 (metil 2-[(3,4-diidroxibenzoiloxi)-4,6-diidroxifenil]acetato,1), além de antocianinas, como delphinidina-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 delphinidina-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*, o qual 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 antocianinas 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).

O 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 (Figura 10) (Reynertson *et al.*, 2006). Os depsídeos são compostos fenólicos formados por grupos aromáticos monocíclicos unidos por ligações ésteres. Originalmente encontrados nos líquens, esses compostos foram recentemente identificados em plantas superiores, incluindo *Inga laurina* (inga-mirim) e *Origanum dictamnus* (orégano) (Lokvam *et al.*, 2007; Chatzopoulou *et al.*, 2010). Os dois depsídeos encontrados na jaboticaba 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 (DPOC). Além disso, as antocianinas cianidina-3-O-glicosídeo e delfinidina-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 cardíacas e pulmonares (Reynertson *et al.*, 2006). A jaboticabina, o ácido 2-O-(3,4-dihidroxibenzoil)-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, um fármaco utilizado no tratamento de câncer, sendo que esses compostos apresentaram valores de IC₅₀ de 65, 30 e 20µM, respectivamente (Reynertson *et al.*, 2006).

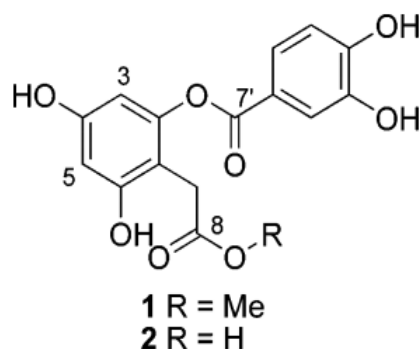


Figura 10. Estrutura química dos depsídeos jabuticabina (metil 2-[(3,4-diidroxibenzoiloxi)-4,6-diidroxifenil] acetato) **(1)** e ácido 2-O-(3,4-dihidroxibenzoil)-2,4,6-trihidroxifenil acético) **(2)**. Fonte: adaptado de Reynertson *et al.*, 2006.

Outro estudo com a espécie *P. jabuticaba* 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 o crescimento apenas da linhagem de células de leucemia (K-562), com uma concentração de 1,9µg/mL, enquanto que o extrato apolar foi eficiente em inibir o crescimento tanto das células de leucemia quanto de células tumorais de próstata (PC-3), com concentrações de 15,8 e 13,8µg/mL, respectivamente. Estes mesmos extratos não demonstraram citotoxicidade em uma linhagem não tumoral de macaco (VERO). Além disso, a mutagenicidade e antimutagenicidade do extrato polar de casca de *P. jabuticaba* foram avaliadas. Para isso, foi determinada a frequência de micronúcleos em células da medula óssea de camundongos que receberam 30, 100 e 300mg/kg de peso corporal de 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).

Apesar de alguns poucos estudos mostrarem atividades biológicas, como as atividades antiproliferativa e anti-inflamatória, para as espécies *P. cauliflora* e *P. jabuticaba*, a principal atividade biológica já estudada para estas duas espécies é a atividade antioxidante. A atividade antioxidante *in vitro* da jabuticaba foi demonstrada em diversos estudos, avaliada através de ensaios como DPPH[•], ABTS^{•+}, FRAP e branqueamento do β -caroteno (Rufino *et al.*, 2010; Santos *et al.*, 2010; Leite *et al.*, 2011; Abe *et al.*, 2011; Leite-Legatti *et al.*;2012; Wu *et al.*, 2012). 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. jabuticaba*), 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 melhorou a sua capacidade antioxidante sérica, avaliada através dos ensaios TEAC (trolox equivalence assay) e ORAC (oxygen radical absorbance capacity). No entanto, observou-se uma queda nesta mesma capacidade antioxidante com o aumento da concentração (3 e 4%) de casca liofilizada oferecida aos ratos, o que pode ter ocorrido devido a uma sobrecarga de antioxidantes, a qual impede que um estado oxidativo mínimo necessário para a célula seja mantido, sendo sugerido, portanto, que existe um limite inferior e superior para a dose de compostos antioxidantes (Leite *et al.*, 2011).

Em outro estudo foram avaliados parâmetros de estresse oxidativo e o perfil lipídico de ratos diabéticos (modelo com estreptozotocina) que receberam, durante 40 dias, pó de jabuticaba (*P. jabuticaba*) na dose de 1 ou 2g/kg de peso. Após essa suplementação, foi observada uma diminuição na peroxidação lipídica no plasma (22%) e no cérebro (10-17%) destes ratos. Adicionalmente, a capacidade antioxidante plasmática destes ratos, avaliada através do ensaio FRAP (Ferric Reducing Ability of Plasma), aumentou cerca de 2 vezes e os níveis de colesterol e de triglicerídeos plasmáticos dos ratos diabéticos diminuíram em 32% e 50%, respectivamente, após os 40 dias de

suplementação (Alezandro *et al.*, 2013b). Além das atividades antioxidante, antiproliferativa e anti-inflamatória, outros estudos demonstram ainda a atividade antimicrobiana e antifúngica da jabuticaba. O extrato hidroalcoólico das folhas de *P. cauliflora* apresentou efeito inibitório sobre o crescimento de *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus sanguis*, microrganismos formadores do biofilme dental (Carvalho *et al.*, 2009; Macedo-Costa *et al.*, 2009). O óleo essencial de folhas de *P. trunciflora* foi ativo contra as bactérias Gram-positivas *Streptococcus equi* e *Staphylococcus epidermis* e contra as leveduras *Candida* sp. e *Cryptococcus* sp. (Lago *et al.*, 2011).

Na Tabela 4 estão apresentadas, de forma resumida, as principais atividades biológicas da jabuticaba já estudadas. Pode-se observar que a *P. jabuticaba* 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 variadas efeitos biológicos, principalmente em relação à atividade antioxidante, anti-hiperlipidêmica, anti-diabética, hepatoprotetora, antifúngica e antibacteriana.

Considerando que não existem na literatura estudos que avaliem os compostos fenólicos presentes nos frutos de *P. trunciflora* e sua atividade biológica, torna-se interessante a investigação desta espécie, principalmente da casca da fruta, onde estão concentrados os principais compostos fenólicos, tanto no sentido de uma melhor caracterização das frutas, quanto para a melhor compreensão das atividades biológicas, principalmente atividade antioxidante.

Tabela 4. Principais atividades biológicas relatadas na literatura para a jabuticaba.

Atividades biológicas	Espécie	Parte da planta ou compostos	Modelo de estudo	Efeito observado	Referências
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
Antidiabética	<i>P. jaboticaba</i>	Extrato da fruta	Ratos obesos	Inibição de α -amilase e α -glicosidase	Alezandro <i>et al.</i> , 2013
Antifúngica	<i>P. trunciflora</i> e <i>P. cauliflora</i>	Extrato e óleo essencial de folhas	Linhagens de fungos	Inibição do crescimento de fungos (<i>Candida sp</i> , <i>Cryptococcus sp</i> e <i>Saccharomyces sp.</i>)	Lago <i>et al.</i> , 2011 Oliveira <i>et al.</i> , 2011.
Anti-hiperlipidêmica	<i>P. jaboticaba</i>	Extrato da fruta	Ratos diabéticos	Diminuição dos níveis de colesterol total e triglicerídeos	Alezandro <i>et al.</i> , 2013
Anti-hiperlipidêmica	<i>P. jaboticaba</i>	Farinha da casca	Ratos	Diminuição dos níveis de colesterol total e aumento do colesterol HDL.	Fonseca <i>et al.</i> , 2014
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
Antioxidante	<i>P. jaboticaba</i>	Casca liofilizada	Ratos	Aumento da capacidade antioxidante plasmática	Leite <i>et al.</i> , 2010
Antiproliferativa	<i>P. jaboticaba</i>	Extrato polar da casca (etanol 80%) Extrato apolar da casca (diclorometano)	Cultura de células tumorais	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
Citotóxica	<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 testadas.	Reynertson <i>et al.</i> , 2006
Hepatoprotetora	<i>P. jaboticaba</i>	Farinha da casca	Ratos	Diminuição da atividade de enzimas hepáticas. Diminuição da esteatose hepática e da peroxidação lipídica no fígado.	Fonseca <i>et al.</i> , 2014
Melhora da resistência à insulina	<i>P. jaboticaba</i>	Extrato da casca	Ratos obesos	Redução da resistência à insulina, evitando a hiperinsulinemia. Aumento da concentração de colesterol HDL.	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

Fonte: adaptado de Wu *et al.*, 2013.

3. OBJETIVO

3.1 Objetivo Geral

O objetivo deste trabalho foi avaliar a composição de macronutrientes, o conteúdo de compostos fenólicos totais e antocianinas da casca e da polpa de jabuticaba (*P. trunciflora*). Paralelamente, determinou-se a composição química, a atividade antioxidante *in vitro* e a capacidade do extrato aquoso de casca de jabuticaba (ECJ) em reduzir o estresse oxidativo/nitrosativo e modular a função mitocondrial na linhagem celular de fibroblastos de pulmão humano (MRC-5) tratadas com H₂O₂.

3.2 Objetivos Específicos

- Determinar a composição de macronutrientes da casca e polpa de jabuticaba (*P. trunciflora*)
- Determinar o conteúdo de compostos fenólicos totais e antocianinas da casca e da polpa de *P. trunciflora*.
- Determinar a composição química do ECJ através da análise de espectrometria de massa com ionização por electrospray (ESI-MS) e ESI acoplada à espectrometria de massa em tandem (ESI-MS/MS).
- Avaliar a atividade antioxidante *in vitro* do ECJ, através da capacidade de redução dos radicais DPPH[•] e ABTS^{•+}.
- Avaliar a viabilidade das células MRC-5 tratadas com o ECJ e peróxido de hidrogênio (H₂O₂), através dos ensaios de MTT e coloração com *trypan blue*.

- Avaliar os níveis de estresse oxidativo nas células MRC-5 tratadas o ECJ e com H_2O_2 , através da determinação dos produtos da peroxidação lipídica utilizando a metodologia de TBARS.
- Avaliar os níveis de estresse nitrosativo nas células MRC-5 tratadas com o ECJ e com H_2O_2 , através da determinação do conteúdo de óxido nítrico.
- Avaliar a função mitocondrial das células MRC-5 tratadas o ECJ e com H_2O_2 através da determinação da atividade do complexo I da cadeia de transporte de elétrons mitocondrial e do conteúdo de ATP.

4. RESULTADOS

Os resultados desta dissertação estão apresentados na forma de artigo científico intitulado **Jaboticaba (*Plinia trunciflora* (O. Berg) Kausel) fruit reduces oxidative and nitrosative stress through the modulation of mitochondrial function in human fibroblasts cells (MRC-5)**, o qual será submetido a uma revista internacional.

Jaboticaba (*Plinia trunciflora* (O. Berg) Kausel) fruit reduces oxidative and nitrosative stress through the modulation of mitochondrial function in human fibroblasts cells (MRC-5)

Caroline Calloni^a, Rafaela Dall Agnol^a, Luana Soares Martínez^a, Fábio de Siqueira Marcon^a, Sidnei Moura^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 Produtos Naturais e Sintéticos, Instituto de Biotecnologia, 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

Jaboticaba species (*Plinia sp*) have attracted attention because of their significant levels of phenolic compounds, primarily anthocyanins and flavonols. Jaboticaba, termed the Brazilian berry, has emerged as a new functional food with potential health benefits. *Plinia trunciflora* (O. Berg) Kausel is one of the main species of jaboticaba that is naturally occurring and cultivated in Brazil. Thus, this study aimed to determine the macronutrient and phenolic compositions of *P. trunciflora* pulp and peel. Additionally, jaboticaba peel extract (JPE) was evaluated for its *in vitro* antioxidant activity and its capacity to modulate oxidative and nitrosative stress (O&NS) as well as mitochondrial function in human lung fibroblast cells (MRC-5). The macronutrient found to have the highest level in both the peel and pulp was carbohydrates, followed by the high fiber content of the peel. The total phenolic compounds and anthocyanin levels were higher in the peel than in the pulp. High resolution mass spectrometry (HRMS) showed the presence of cyanidin-3-O-glucoside and kaempferol. Moreover, JPE was able to reduce the decreases in complex I activity and the ATP levels induced by H₂O₂ and thereby decreased the O&NS in MRC-5 cells. These findings show a new role for jaboticaba as a mitochondrial protectant in pathological conditions where mitochondrial dysfunction is involved.

Keywords: Jaboticaba, *Plinia trunciflora*, antioxidants, phenolic compounds, mitochondria.

1. Introduction

Plinia trunciflora (O. Berg) Kausel) is a native Brazilian tree that belongs to the Myrtaceae family and is widely distributed in the southern and southeastern areas of Brazil (Sobral, Proença, Souza, Mazine & Lucas, 2012). Within this family, many *Plinia sp* species are known; however, only three of them, including *P. trunciflora*

(O. Berg) Kausel (synonym *Myrciaria trunciflora* Mart (O. Berg)), *Plinia cauliflora* (DC.) Berg (synonym *Myrciaria cauliflora*) and *Plinia jaboticaba* (Vell.) Berg (synonym *Myrciaria jaboticaba*), have a natural distribution and are crops in Brazil. All of these species produce a similar grape-like edible fruit, known as jaboticaba, which grows directly from the branches of the tree and presents a sweet jelly-like white pulp covered by a purple peel (Lorenzi, Bacher, Lacerda & Sartori, 2000). Jaboticaba is largely consumed fresh or used to make jellies, juices, wines, spirits and vinegar (Wu, Dastmalchi, Long, & Kennelly, 2012). In traditional medicine, the peel tea of *P. cauliflora* has been used in the treatment of asthma, angina, dysentery and erysipelas (Morton, 1987).

Studies have demonstrated that jaboticaba species are a rich source of phenolic compounds such as anthocyanins and flavonols, which are primarily found in the peel (Reynertson et al., 2006; Leite-Legatti et al., 2012). Phenolic compounds are an important group of natural metabolites widely distributed in fruits and vegetables that are part of the human diet (Del Rio et al., 2013). Over the past few years, research has associated the high intake of foods rich in phenolic compounds with health benefits, such as the prevention of cardiovascular and neurodegenerative diseases, diabetes and cancer (Visioli & Davalos, 2011; Ebrahimi & Schluesener, 2012; Mursu, Virtanen, Tuomainen, Nurmi, & Voutilainen, 2014). These benefits have been largely attributed to the capacity of phenolic compounds to prevent or reduce oxidative and nitrosative stress (O&NS) (Lorenz, Roychowdhury, Engelmann, Wolf, & Horn, 2003; Wahle, Rotondo, Brown, & Heys, 2009; Quincozes-Santos et al., 2013). Reactive oxygen species (ROS), such as the superoxide anion ($O_2^{\bullet-}$) and hydrogen peroxide (H_2O_2), and reactive nitrogen species (RNS), including nitric oxide ($^{\bullet}NO$) and peroxynitrite ($ONOO^-$), are produced during normal physiologic processes and perform numerous roles in the

regulation of cellular function (Thannickal, 2009). However, an increase in the formation of ROS and RNS and/or a decrease in the antioxidant capacity due to exogenous stimuli or endogenous metabolic alterations can cause a disturbance in redox homeostasis, leading to severe oxidative/nitrosative damage to lipids, proteins, and DNA (Trachootham, Lu, Ogasawara, Nilsa, & Huang, 2008).

Recent reports have shown that mitochondrial dysfunction could play an important role in the development and progression of O&NS (Sharma et al., 2011; Cui, Kong, & Zhang, 2012). The inhibition of complex I in the electron transport chain (ETC) increases the generation of ROS, which can then inhibit the ETC in a vicious cycle (Fato et al. 2010; Choi 2011). This mitochondrial dysfunction is associated with the physiopathology of Parkinson's disease, bipolar disorder, tumorigenesis and cancer progression and invasion, making the mitochondria an important therapeutic target (Sharma et al., 2011; Taddei et al., 2012; Smith, Hartley, Cochemé, & Murphy, 2012; Subramaniam & Chesselet, 2013; Scola, Kim, Young, & Andreazza, 2013). Some phenolic compounds, such as quercetin, cyanidin-3-O-glucoside and delphinidin-3-O-glucoside, can restore mitochondrial dysfunction, suggesting a possible new therapeutic role for dietary phenolic compounds (Carrasco-Pozo et al. 2011; Carrasco-Pozo, Mizgier, Speisky, & Gotteland, 2012; Xie, Zhao, & Shen, 2012a; Xie, Zhao, & Shen, 2012b).

The phenolic compounds found in jaboticaba have attracted great interest, primarily because of their antioxidant effects. In fact, the antioxidant activities of *P. cauliflora* peel (Leite-Legatti et al., 2012) and *P. jaboticaba* peel (Leite et al., 2011) have already been demonstrated. However, until now, there has been no study about the phenolic composition and biological activities of *P. trunciflora*, a very popular fruit in southern Brazil.

Thus, the aim of this study was to determine the macronutrient and phenolic compositions of *P. trunciflora* pulp and peel. In addition, *P. trunciflora* peel extract was evaluated regarding its chemical composition, *in vitro* antioxidant activity and capacity to modulate O&NS as well as mitochondrial function in human lung fibroblast cells (MRC-5).

2. Materials and Methods

2.1. Chemicals

Dulbecco's modified eagle medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS), trypsin-EDTA, penicillin-streptomycin and trypan blue were purchased from Gibco BRL (Grand Island, NY, USA). Gallic acid was obtained from Vetec Química Fina (São Paulo, Brazil). Thiobarbituric acid (TBA), trichloroacetic acid (TCA), 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), hydrolyzed 1,1,3,3-tetramethoxypropane (TMP), 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), ABTS^{•+} (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) and hydrogen peroxide (H₂O₂) were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). All other reagents and solvents were obtained from Sigma (St. Louis, MO, USA). All of the chemicals were of analytical grade.

2.2. Plant material and sample preparation

Jaboticaba (*P. trunciflora*) fruits were collected in Passo Fundo, Rio Grande do Sul (28° 18' 45,75" S; 52° 24' 57,64" W), Brazil, in 2013. Voucher specimens were identified by the herbarium of the University of Caxias do Sul, RS (HUCS40706). Fruits were peeled and deseeded. Milled fresh pulp and peel were used to determine the macronutrient profile. For the other assays, fresh pulp or peel were mixed with distilled

water (5% w v⁻¹) and extracted under reflux (100 °C) for 15 min. Jaboticaba pulp and peel extracts were used to evaluate the total phenolic and anthocyanin contents. Jaboticaba peel extract (JPE) was lyophilized (LIOBRAS model L-101) and stored in the dark. The JPE was used for the mass spectrometry assay and to determine the *in vitro* antioxidant activity and the capacity to modulate O&NS and mitochondrial function in MRC-5 cells. Except for the mass spectrometry assay, JPE was dissolved in water immediately before each assay.

2.3. Determination of the macronutrients

The carbohydrate, lipid, protein, total fiber and ash contents of fresh peel and pulp of *P. trunciflora* were determined using the methods described by the Association of Official Analytical Chemists (AOAC, 2011). The moisture content was determined using the methodology described by the Instituto Adolfo Lutz (2005).

2.4. Total phenolic and anthocyanin contents

The total phenolic content was determined by using the Folin–Ciocalteu colorimetric method with modifications (Singleton & Rossi, 1965). Briefly, 200 µL of the peel or pulp extract (5%, w v⁻¹) was mixed with 800 µL of sodium carbonate (7.5%) and 1000 µL of Folin–Ciocalteu reagent. After 30 min in the dark, the absorbance was measured at 765 nm by a spectrophotometer (UV-1700 spectrophotometer, Shimadzu, Kyoto, Japan). The phenolic contents of the pulp and peel were expressed as mg of gallic acid equivalents per 100 g of fresh peel or pulp (mg GAE 100 g⁻¹).

Anthocyanin contents of the peel and pulp extracts (5%, w v⁻¹) were determined by the differential pH method described by Wrolstad, 1993. Peel and pulp

extracts were diluted 10 times using 0.025 M potassium chloride buffer with a pH of 1.0; then, the absorbance was read at 510 and 700 nm (UV-1700 spectrophotometer, Shimadzu, Kyoto, Japan). Another part of the extract was diluted in the same proportions in 0.4 M sodium acetate buffer with a pH of 4.5, and then, the absorbencies were read at the same wavelengths. The anthocyanin content (AC) was calculated using the following formula: $AC = \text{abs} \times MW \times DF / \epsilon$, where MW is the molecular weight (449.2), DF is the dilution factor and ϵ is the molar absorptivity (29,600). The results were expressed as mg of cyanidin-3-glucoside equivalents per 100 g of fresh peel or pulp (mg cyn-3-glu 100 g⁻¹).

2.5. Mass spectrometry assay

For the mass spectrometry assay, the JPE was dissolved in a solution of 50% (v v⁻¹) chromatographic grade acetonitrile (Tedia, Fairfield, OH, USA), 50% (v v⁻¹) deionized water and 0.1% formic acid or 0.1% ammonia hydroxide (for ESI (+) or ESI (-), respectively). The solutions were individually infused directly or with HPLC (Shymadzu) assistance into the ESI source by means of a syringe pump (Harvard Apparatus) at a flow rate of 10 $\mu\text{L min}^{-1}$. ESI (+)-MS, tandem ESI (+)-MS/MS and ESI (-)-MS were acquired using a hybrid high resolution (5 $\mu\text{L L}^{-1}$) microTof (Q-TOF) mass spectrometer (Bruker Scientific) under the following conditions: the capillary and cone voltages were set to +3500 V and +40 V, respectively, and the desolvation temperature was 100 °C. For ESI (+)-MS/MS, the energy for the collision induced dissociations (CID) was optimized for each component. Diagnostic ions in different fractions were identified by the comparison of their ESI (+)-MS/MS dissociation patterns with compounds identified in previous studies. For data acquisition and processing, the Hystar software (Bruker Scientific) was used. The data were collected in the m/z range

of 70–800 at the speed of two scans per second, providing a resolution of 50,000 (FWHM) at a m/z of 200. No important ions were observed below a m/z of 180 or above a m/z of 500; therefore, the data are shown in the m/z range of 180–500.

2.6. *In vitro* antioxidant activity

The *in vitro* antioxidant activity of the JPE was determined by DPPH[•] (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) and ABTS^{•+} (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) radical reduction assays. The DPPH[•] assay was performed using a modified method of Yamaguchi, Takamura, Matoba, & Terao (1998). Briefly, JPE was diluted to different concentrations (ranging from 1.0 to 0.05 mg mL⁻¹) and added to Tris-HCl buffer (100 mM, pH = 7.0) containing 250 µmol of DPPH[•] dissolved in ethanol. The tubes were stored in the dark for 20 min, and the absorbance was measured at 517 nm. The results were expressed as IC₅₀ (mg mL⁻¹ of JPE needed to scavenge 50% of the radical DPPH[•]) values. The capacity of the extract to reduce the ABTS^{•+} radical cation was determined following a previously published method with some modifications (Re et al., 1999). First, the ABTS^{•+} radical cation was generated by reacting an aqueous solution of ABTS (7 mM) with a potassium persulfate solution (140 mM). This solution was kept in the dark at room temperature for 12–16 h before use. Then, the ABTS^{•+} solution was diluted with ethanol (99.5%) to an absorbance of 0.70 ± 0.02 at 734 nm. Afterward, 3.0 mL of diluted ABTS^{•+} solution was added to 30 µL of the different concentrations of JPE (ranging from 1.0 to 0.05 mg mL⁻¹), and the absorbance was read exactly 6 min after the initial mixing. The results were expressed as IC₅₀ (mg mL⁻¹ of JPE needed to scavenge 50% of the radical ABTS^{•+}) values.

2.7. Assays with human lung fibroblasts cells

To study the effects of JPE in mammalian cells, the human lung fibroblast cell line (MRC-5) was chosen. Cells were cultured in Dulbecco's modification of Eagle's medium (DMEM), which was supplemented with heat inactivated 10% fetal bovine serum, penicillin (100UI mL^{-1}) and streptomycin ($100\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$). Cells were maintained at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ under an atmosphere of 5% CO_2 with 90% relative humidity. Cells were detached with 0.15% trypsin solution.

2.7.1. Cell viability assessment

MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) and trypan blue assays were used to evaluate the cell viability (Denizot & Lang, 1986; Strober, 2001). For the MTT assay, cells at a density of $1 \times 10^5\text{ cells mL}^{-1}$ grown for 24 h in DMEM medium. After that, cells were treated for 1 h with different predetermined concentrations of the JPE (50, 100, and $250\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$). The JPE was removed, and the cells were challenged with $700\text{ }\mu\text{M}$ of H_2O_2 for 26 h. After the removal of H_2O_2 , cells were exposed to 1 mg mL^{-1} per well of MTT solution and cultured for 3 h. The supernatant was discarded, and precipitates were dissolved in $150\text{ }\mu\text{L}$ of DMSO per well. After 20 min of agitation, the optical density of the resultant solution was measured with a microplate reader (Victor-X3, Perkin Elmer, Finland) at 517 nm. The viability of the cells in each well was expressed as a percentage of the control.

To perform the trypan blue viability assay, cells at a density of 2.5×10^5 were treated as reported for the MTT assay. After removal of the H_2O_2 , cells were detached and exposed to the trypan blue reagent (0.4%) for 10 min. Stained and non-stained cells

were counted under an optical microscope. The results were expressed as a percentage of the control.

2.7.2. Oxidative and nitrosative stress assessment

Oxidative stress was evaluated through the measurement of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), as described by Wills, 1966. Nitrosative stress was evaluated through the index of $\cdot\text{NO}$ production, which was determined as nitrite (NO_2^-), using the Griess reaction-based method (Green et al., 1981). Cells at a density of 1×10^7 were seeded in 75 cm^2 flasks and treated with different concentrations of the JPE (50, 100 and $250 \mu\text{g mL}^{-1}$) for 1 h. The JPE was removed, and the cells were challenged with $700 \mu\text{M}$ of H_2O_2 for 26 h. Cells were washed with cold phosphate-buffered saline (PBS), scraped and homogenized in ice-cold PBS buffer. The protein concentration was determined via the Lowry method, using bovine serum albumin as the standard (Lowry, Rosebrough, Farr, & Randall, 1951). To evaluate the oxidative stress, samples containing $400 \mu\text{L}$ of cell lysates were combined with $600 \mu\text{L}$ of 15% trichloroacetic acid and 0.67% thiobarbituric acid (TBA). The mixture was heated at 100°C for 20 min. After being cooled to room temperature, the samples were centrifuged at 5000 rpm for 10 min. The supernatant fraction was isolated, and its absorbance was measured at 532 nm. 1,1,3,3-Tetrametoxipropano (TMP) was used as the standard, and the results were expressed as nmol of TMP per mg of protein. For the evaluation of the nitrosative stress, $50 \mu\text{L}$ of cell lysate was reacted with an equal volume of Griess reagent (0.1% naphthylethylenediamine and 1% sulfanilamide in 5% H_3PO_4) for 10 min at room temperature, and the absorbance was read at 550 nm. Sodium nitroprusside was used as the standard. The results were expressed as nmol of nitrite per mg of protein.

2.7.3. Mitochondrial function assessment

To evaluate the ability of JPE to modulate the complex I activity of the mitochondrial ETC, 1×10^7 cells were treated for 1 h with the lowest and the highest concentrations of JPE (50 and 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectively) used in the cell viability assays (MTT and trypan blue). After the removal of JPE, the cells were challenged with 700 μM of H_2O_2 for 26 h. The cells were washed with cold PBS, scraped and homogenized in ice-cold PBS buffer. The protein concentration was determined via the Lowry method using bovine serum albumin as the standard (Lowry et al., 1951). The cells were assayed for complex I activity using the Complex I Enzyme Activity Microplate Assay Kit (Mitoscience, Abcam, Cambridge, MA, USA) according to manufacturer's instructions. The results were presented as a percentage of the control.

To verify a possible alteration in the ATP production, 5×10^4 cells mL^{-1} were treated with 50 and 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of JPE for 1 h. After removal of the JPE, cells were challenged with 700 μM of H_2O_2 for 26 h. After removal of the H_2O_2 , cells were assayed for their ATP concentrations using the Cell-Titer-Glo® assay (Promega, Madison, WI) according to the manufacturer's instructions. The results were presented as a percentage of the control.

2.8. Statistical analysis

The results were expressed as the mean $\pm$ standard deviation (SD) from at least three independent experiments. The results were determined to be parametrical by using the Kolmogorov-Smirnoff test. Data were subjected to Student's t-test. The relationships between the variables were assessed using Pearson's correlation coefficient. Statistical significance was determined at $p < 0.05$. The software SPSS 21.0 (SPSS Inc., Chicago, IL) was used for all of the statistical analysis.

3. Results and Discussion

Currently, much attention has been given to the antioxidant capacities of natural products, especially those that are present in the human diet, such as fruits. Jaboticaba species have been emerging as new functional foods (Wu, Long, & Kennelly, 2013). In fact, jaboticaba has been termed the Brazilian berry because of its similarity, particularly in relation to its phenolic composition, to other berries. Thus, in our study, we evaluated the macronutrient and phenolic contents of jaboticaba peel and pulp. In addition, the *in vitro* antioxidant activity and the capacity of the JPE to modulate O&NS as well as mitochondrial function in MRC-5 cells were studied.

Jaboticaba presented carbohydrates as the main macronutrient found both in the peel and pulp. In addition, it was shown that jaboticaba peel is an important source of total fiber (Table 1), as previously described (Leite et al., 2011). Carbohydrates are important substrates for cell energy generation (ATP), whereas fiber has been linked to numerous health benefits, such as control of glucose and lipid absorption, improvement of intestinal function and weight maintenance (Anderson et al., 2009). In addition, *P. trunciflora* peel and pulp present significant phenolic compounds content (Table 1). Although no data about the phenolic content of *P. trunciflora* have been published, studies have already shown high content of phenolic compounds in other jaboticaba species, such as *P. jaboticaba* and *P. cauliflora* (Leite-Legatti et al., 2012; Reynertson et al., 2006; Rufino et al., 2010). The phenolic content of jaboticaba whole fruit found in our study is higher than that reported for other berries known as great sources of phenolic compounds, such as blueberries (308.4 ± 7.7 mg GAE 100 g^{-1}), strawberries (269.5 ± 17.6 mg GAE 100 g^{-1}), red grapes (134.3 ± 26.3 mg GAE 100 g^{-1}) and cranberries (92.4 ± 7.9 mg GAE 100 g^{-1}) (Floegel et al., 2010). Jaboticaba is also an important source of anthocyanins, which are mainly found in the peel (Table 1).

Anthocyanins are a water-soluble group of phenolic compounds that are responsible for the red, violet and blue colors in fruits and vegetables, and they are the main metabolites found in berries, such as blueberries, blackberries and raspberries (Szajdek & Borowska, 2008; Sariburun, Sahin, Demir, Türkben, & Uylaşer, 2010). The anthocyanin content in jaboticaba found in our study was similar to that reported for açai frozen pulp (282.5 ± 1.6 mg cyn-3-glu 100 g^{-1}) and higher than that found for other berries, such as blueberry species (122.7 ± 11.0 mg cyn-3-glu 100 g^{-1}), black raspberries (179 ± 89 mg cyn-3-glu 100 g^{-1}) and black currants (207 ± 61 mg cyn-3-glu 100 g^{-1}) (Rosso et al., 2008; Prior et al., 1998; Moyer, Hummer, Finn, Frei, & Wrolstad, 2002). These data confirm that jaboticaba should be considered an important functional food.

Table 1. Macronutrients and phenolic content of fresh jaboticaba (*P. trunciflora*) peel and pulp.

Components	Peel	Pulp
Carbohydrates ($\text{g } 100\text{g}^{-1}$)	11.54 ± 0.01	13.11 ± 0.01
Lipids ($\text{g } 100\text{g}^{-1}$)	0.25 ± 0.01	0.17 ± 0.05
Protein ($\text{g } 100\text{g}^{-1}$)	1.00 ± 0.03	0.21 ± 0.02
Moisture (%)	75.18 ± 0.85	86.46 ± 0.43
Total fiber ($\text{g } 100\text{g}^{-1}$)	8.45 ± 0.01	0.15 ± 0.01
Ash ($\text{g } 100\text{g}^{-1}$)	0.58 ± 0.01	0.23 ± 0.02
Total phenolic content (mg GAE 100g^{-1})	313.7 ± 4.26	162.2 ± 7.67
Anthocyanins content (mg cyn-3-glu 100g^{-1})	242.75 ± 14.25	1.1 ± 0.21

Considering the complex constituents of the fruit, the techniques of electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS) and ESI coupled with tandem mass spectrometry (ESI-MS/MS) were used to characterize and identify the chemical composition of JPE (Vessecchi et al., 2011). The measurements were performed using high-resolution mass spectrometry (HRMS) Q-TOF-II (Bruker Scientific). Formic acid or ammonia hydroxide at 0.1% was introduced into the sample solution to obtain a response in the positive or negative mode, respectively. Accurate mass measurements by the instrument give the elemental composition of parent and fragment ions. Analysis of the full mass spectrum of the JPE allowed the identification of four compounds (Figure 1). Two phenolic compounds were found, the flavonol kaempferol (m/z 287.0558), and the anthocyanin cyaniding-3-*O*-glucoside (m/z 449.1080). Other studies have already demonstrated the presence of cyaniding-3-*O*-glucoside in jaboticaba species (Reynertson et al., 2006; Wu et al., 2012). However, this is the first study that describes the presence of kaempferol in jaboticaba fruit. In addition, two other compounds, hexadecanoic acid (m/z 257.2473) and octadecanoic acid (m/z 285.2786 [$M + H$], m/z 283.2651 [$M - H$]) were also identified. The structural elucidation of some compounds by their mass spectrum (MS) is not trivial, and the deduction needs more studies for confirmation, such as m/z 203.0481, which is a very intensive peak and is most likely important in our context. The majority of compounds could be well detected in the positive ion mode through direct comparison with predetermined compounds found in the Myrtaceae family (Table 2). Because the widely accepted accuracy threshold for the confirmation of elemental compositions was established as 5 ppm, this technique usually provides a highly reliable identification of the target compounds (Lacorte & Fernandez-Alba, 2006). In addition, mass measurement accuracy is also easily obtained for all of the characteristic fragment ions, thus providing two sets of

important information for the unequivocal identification of compounds, as isobaric interferences can also be differentiated. As shown in Figure 2, in the MS-MS mode, the isolation and ion fragmentation of m/z 449.1080 by the loss of a glucosyl group confirm the chemical structure of cyanidin-3-*O*-glucoside. The presence of flavonoids associated with glycoside, which may be the active molecules, is common in fruits of this species.

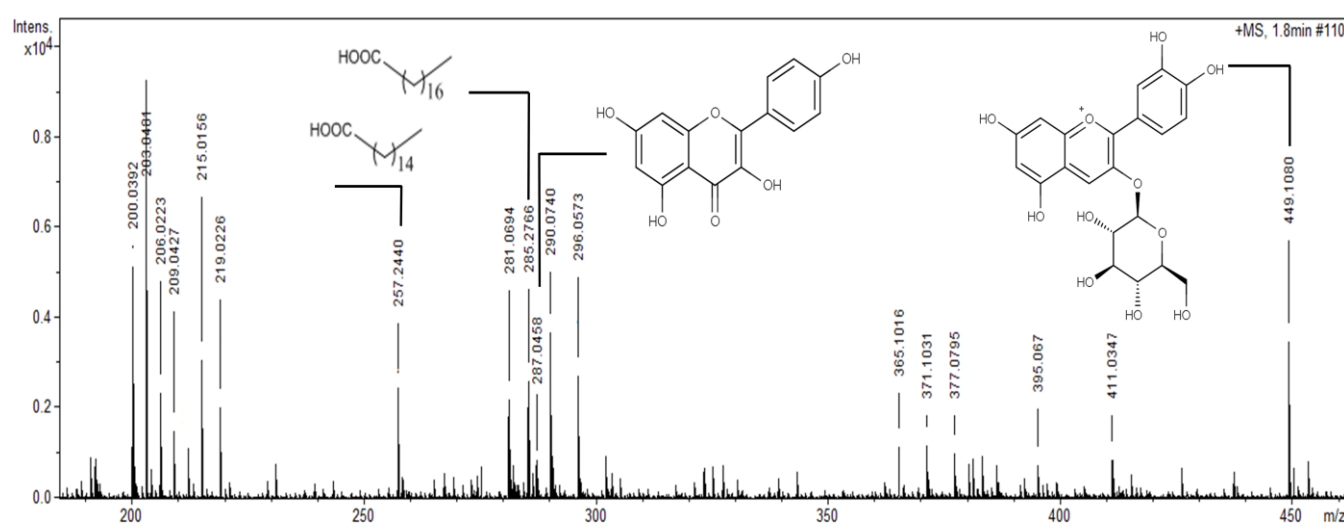


Figure 1. Full mass spectrum of jaboticaba (*P. trunciflora*) peel.

Table 2. Chemical composition of jaboticaba (*P. trunciflora*) peel by ESI-MS (+) and (-).

Entry	Precursor ion m/z (%)	Identification	Elem. comp.	Diff. ppm	Ref.
1	257.2473 [M + H]	Hexadecanoic acid	$C_{16}H_{33}O_2$	2.94	(Duarte et al., 2010)
2	285.2786 [M + H]	Octadecanoic acid	$C_{18}H_{37}O_2$	2.65	(Quijano & Pino, 2007)
	283.2651 [M - H]		$C_{18}H_{35}O_2$	4.92	
3	287.0558 [M + H]	Kaempferol	$C_{15}H_{11}O_6$	0.82	(Gonçalves, Lajolo, & Genovese, 2010)
4	449.1080 [M + H]	Cyanidin-3- <i>O</i> -glucoside	$C_{21}H_{20}O_{11}$	0.86	(Wu et al., 2012)

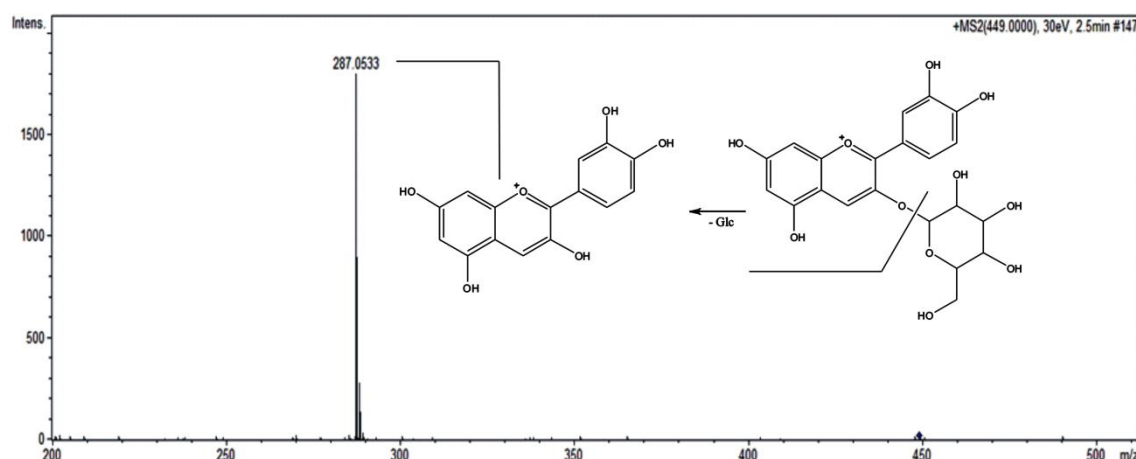


Figure 2. The MS-MS of cyanidin-3-O-glucoside (m/z 449.1080) from jaboticaba peel (*P. trunciflora*).

Phenolic compounds act as strong scavengers of ROS and RNS (Halliwell, 2007). As described for other jaboticaba species, *P. trunciflora* exhibited a significant scavenger capacity, presenting IC_{50} values of $0.35 \pm 0.01 \text{ mg mL}^{-1}$ and $0.69 \pm 0.02 \text{ mg mL}^{-1}$ for $DPPH^{\bullet}$ and $ABTS^{\bullet+}$ assays, respectively. The *in vitro* antioxidant activity of JPE was higher than that found for jaboticaba juice ($0.45 \pm 0.01 \text{ mg mL}^{-1}$) by the $DPPH^{\bullet}$ assay (Wu et al., 2012). The $DPPH^{\bullet}$ assay can detect the ability of the sample to participate in a hydrogen atom transfer reaction while the ABTS assay is based on the transfer of an electron to the radical cation $ABTS^{\bullet+}$ (Huang, Ou, & Prior, 2005). A positive correlation was found between the antioxidant activity evaluated through $DPPH^{\bullet}$ ($r=0.919$, $p<0.001$) and $ABTS^{\bullet+}$ ($r=0.993$, $p<0.001$) assays and the phenolic content of JPE. Positive correlations were also found between the anthocyanin content and the antioxidant activity evaluated through $DPPH^{\bullet}$ ($r=0.805$, $p<0.001$) and $ABTS^{\bullet+}$ ($r=0.948$, $p<0.001$) assays. These correlations suggest that phenolic compounds play an important role in the *in vitro* antioxidant activity of JPE.

Mammalian cell culture is a model widely used as it allows the observation of biological responses and mechanisms that are not observed in chemical assays

(Zucco, De Angelis, Testai, & Stamatii, 2004). In this study, MRC-5 cells were pretreated with different non-cytotoxic concentrations of JPE and then challenged with H_2O_2 . The results showed that JPE was able to reduce the mortality induced by H_2O_2 in MRC-5 cells both in the MTT and trypan blue assays (Figure 3A & B). The MTT assay gives an idea of the overall cell metabolism because the MTT reduction is dependent on dehydrogenases and reducing agents, such as nicotinamide adenine dinucleotide (NADH), present in metabolically active cells (Stockert, Blázquez-Castro, Cañete, Horobin, & Villanueva, 2012). Conversely, the trypan blue viability assay evaluates the integrity of the plasma cell membrane, and it is based on the principle that damage and the consequent permeabilization of the plasma membrane can lead to a disturbance in cell homeostasis and result in cell death (Strober, 2001).

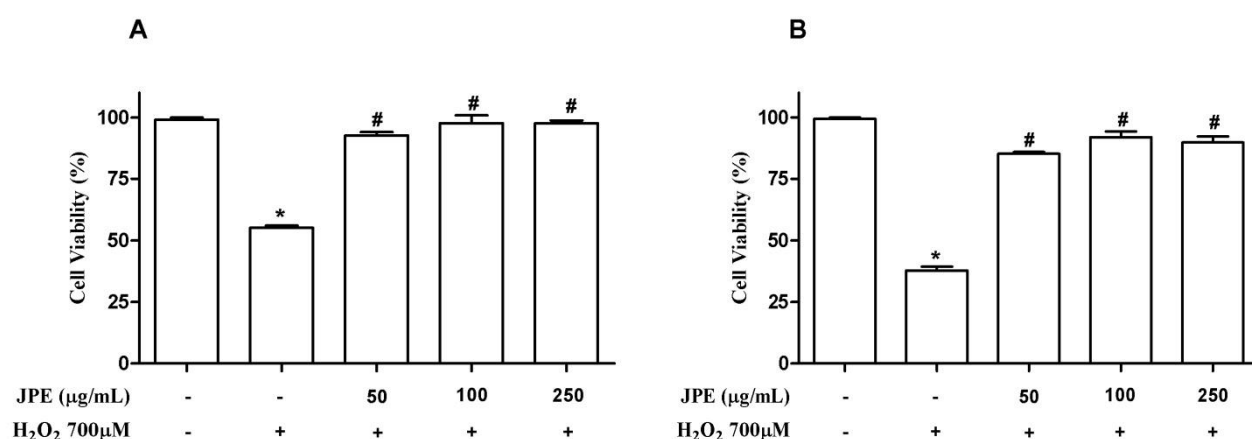


Figure 3. Effect of JPE on the viability of MRC-5 cells challenged with H_2O_2 . MRC-5 cells were pretreated with different concentrations of JPE (50, 100, 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$) and/or H_2O_2 (700 μM), and the cell viability was accessed by MTT **(A)** and trypan blue **(B)** assays. The results are expressed as the mean $\pm$ SD. *indicate significantly different values from the cell control. #indicate significantly different values from the cells treated with only H_2O_2 . Statistical significance was determined at $p < 0.05$.

Membrane oxidative lipid damage can be evaluated through the TBARS assay.

For this purpose, MRC-5 cells were pretreated with JPE and challenged with H_2O_2 . It was observed that JPE was able to avoid H_2O_2 -induced lipid damage in all of the

concentrations assayed (Table 3). Hydrogen peroxide is a stable ROS and can freely diffuse through cell membranes damaging cellular components. Furthermore, H_2O_2 is a precursor of other ROS, such as the hydroxyl radical (through Fenton's reaction), and induces RNS, such as $\cdot NO$ and $ONOO^-$ (Quincozes-Santos et al., 2013; Cai et al., 2003). High levels of $\cdot NO$ and $ONOO^-$ can lead to nitrosative stress along with a cytotoxic effect (Calcerrada, Peluffo, & Radi, 2011). In our study, we observed that JPE pretreatment was able to prevent the increase of $\cdot NO$ induced by H_2O_2 (Table 3). These data are in line with other studies that showed the ability of other berries, such as strawberries, black currants and boysenberries, to minimize the oxidative damage induced by H_2O_2 in mammalian cells (Ho & Chang, 2005; Jeong et al., 2014).

Table 3. Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) and nitric oxide ($\cdot NO$) levels in MRC-5 cells.

Treatments	TBARS (nmol TMP/mg of protein)	$\cdot NO$ (nmol nitrite/mg of protein)
Cell Control	3.43 ± 0.12	3.38 ± 0.04
H_2O_2 700 μM	$6.92 \pm 0.79^*$	$7.21 \pm 0.02^*$
JPE 50 $\mu g mL^{-1}$	3.55 ± 0.99	4.83 ± 0.30
JPE 100 $\mu g mL^{-1}$	2.89 ± 0.09	4.71 ± 0.03
JPE 250 $\mu g mL^{-1}$	3.81 ± 0.41	4.13 ± 0.05
JPE 50 $\mu g mL^{-1}$ + H_2O_2 700 μM	$3.57 \pm 0.04^{\#}$	$3.43 \pm 0.21^{\#}$
JPE 100 $\mu g mL^{-1}$ + H_2O_2 700 μM	$3.63 \pm 0.34^{\#}$	$4.68 \pm 0.03^{\#}$
JPE 250 $\mu g mL^{-1}$ + H_2O_2 700 μM	$2.20 \pm 0.28^{\#}$	$4.70 \pm 0.04^{\#}$

Content of TBARS and $\cdot NO$ levels in MRC-5 cells pretreated with different concentrations of JPE and challenged with H_2O_2 . Results are expressed as mean $\pm$ SD. *indicate significantly different values from the cell control. $^{\#}$ indicate significantly different values from the cells treated with only H_2O_2 . Statistical significance was determined at $p < 0.05$.

The ETC couples electron transport with the concomitant transfer of protons across the inner mitochondrial membrane, generating the electrochemical gradient needed for ATP synthesis. Dysfunction in the ETC induces an increase in the formation of ROS, which are mainly produced in complex I (NADH-ubiquinone oxidoreductase). Complex I is a multisubunit membrane complex of the mitochondrial ETC, which catalyzes the transfer of two electrons from NADH to ubiquinone. The reaction of only one electron of the ETC with an oxygen molecule generates $O_2^{\bullet -}$ (Murphy, 2009). To evaluate the possible effect of JPE in mitochondrial dysfunction, we used H_2O_2 , an oxidant able to induce complex I dysfunction (Tatsumi & Kako, 1993; Wu, Xing, & Lou, 2010). Hydrogen peroxide treatment induced a decrease in complex I activity of approximately 30% along with a decrease in ATP synthesis of approximately 36%. Therefore, the treatment showed a significant effect on ATP production. The treatment of cells with JPE was able to avoid the decrease in complex I activity and attenuated the decrease in ATP levels induced by H_2O_2 (Figure 4A & B). Superoxide radical anion produced through the dysfunction of complex I can be a substrate for superoxide dismutase originating H_2O_2 and/or react with $^{\bullet}NO$ leading to the formation of $ONOO^-$. In addition to $O_2^{\bullet -}$ and H_2O_2 , $ONOO^-$ can also decrease complex I activity, which can feed a vicious cycle of complex I inhibition and leading to O&NS which can results in cell apoptosis (Riobó et al., 2001; Brown & Borutaite, 2004).

Some anthocyanins, including the cyanidin-3-*O*-glucoside found in JPE, showed an ability to minimize mitochondrial complex I dysfunction in culture of vascular endothelial cells (Xie, Zhao, & Shen, 2012a; Xie, Zhao, & Shen, 2012b). Moreover, kaempferol, also found in JPE, was able to avoid antimycin A-complex IV inhibition in osteoblastic cell culture (Choi, 2011). Therefore, in addition to its direct antioxidant effect, it is possible that the phenolic compounds found in JPE can exert

ROS-scavenging independent actions, which include the ability to restore mitochondrial function (Smith et al., 2012). These mitochondria-targeted antioxidants could have a broad spectrum for the treatment of diseases associated with O&NS, such as cardiovascular and neurodegenerative diseases, diabetes and cancer (Visioli & Davalos, 2011; Ebrahimi & Schluesener, 2012; Mursu, Virtanen, Tuomainen, Nurmi, & Voutilainen, 2014).

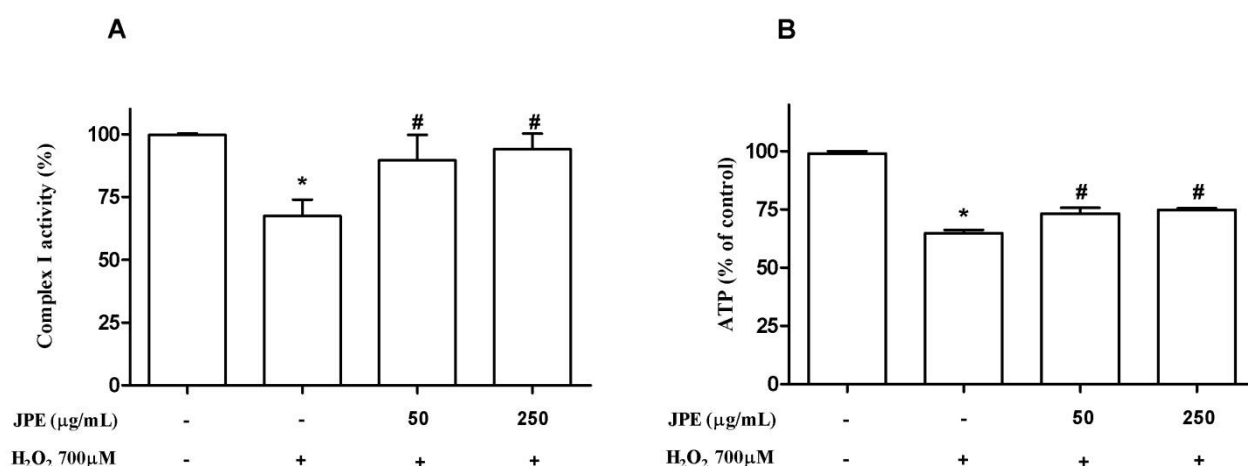


Figure 4. Complex I activity **(A)** and ATP levels **(B)** of MRC-5 cells pretreated with JPE (50 and 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$) and challenged with 700 μM H_2O_2 . The results are expressed as the mean $\pm$ SD. *indicate significantly different values from the cell control. #indicate significantly different values from the cells treated with only H_2O_2 . Statistical significance was determined at $p < 0.05$.

4. Conclusions

The results found in our study demonstrated that *P. trunciflora* peel is an important source of phenolic compounds, such as cyanidin-3-*O*-glucoside and kaempferol. Furthermore, JPE demonstrated the ability to prevent mitochondrial dysfunction minimizing the O&NS damage in MRC-5 cells. These findings showed that dietary phenolic compounds can possibly exert a new protective role towards mitochondria, contributing to the emerging field of mitochondrial pharmacology.

Conflict of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Financial Support

This study was funded by grants from CNPq and University of Caxias do Sul. Mirian Salvador is the recipient of a CNPq Research Fellowship and Caroline Calloni is the recipient of a CAPES Research Fellowship. Rafaela Dall Agnol, Luana Soares Martínez and Fábio de Siqueira Marcon are recipients of FAPERGS Research Fellowship.

5. References

- Anderson, J. W., Baird, P., Davis, R. H., Ferreri, S., Knudtson, M., Koraym, A., Williams, C. L. (2009). Health benefits of dietary fiber. *Nutrition Reviews*, 67(4), 188–205.
- AOAC (2011). Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists (18th ed.). Washington: AOAC.
- Brown, G. C., & Borutaite, V. (2004). Inhibition of mitochondrial respiratory complex I by nitric oxide, peroxynitrite and S-nitrosothiols. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1658(1-2), 44–9.
- Cai, H., Li, Z., Davis, M. E., Kanner, W., Harrison, D. G., & Dudley, S. C. (2003). Akt-dependent phosphorylation of serine 1179 and mitogen-activated protein kinase kinase/extracellular signal-regulated kinase 1/2 cooperatively mediate activation of the endothelial nitric-oxide synthase by hydrogen peroxide. *Molecular Pharmacology*, 63(2), 325–31.
- Calcerrada, P., Peluffo, G., & Radi, R. (2011). Nitric oxide-derived oxidants with a focus on peroxynitrite: molecular targets, cellular responses and therapeutic implications. *Current Pharmaceutical Design*, 17(35), 3905–32.
- 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. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(21), 11501–11508.
- Carrasco-Pozo, C., Mizgier, M. L., Speisky, H., & Gotteland, M. (2012). Differential protective effects of quercetin, resveratrol, rutin and epigallocatechin gallate against

mitochondrial dysfunction induced by indomethacin in Caco-2 cells. *Chemico-Biological Interactions*, 195(3), 199–205.

Choi, E. M. (2011). Luteolin protects osteoblastic MC3T3-E1 cells from antimycin A-induced cytotoxicity through the improved mitochondrial function and activation of PI3K/Akt/CREB. *Toxicology in Vitro: An International Journal Published in Association with BIBRA*, 25(8), 1671–9.

Cui, H., Kong, Y., & Zhang, H. (2012). Oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and aging. *Journal of Signal Transduction*, 2012, 646354.

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. *Antioxidants & Redox Signaling*, 18(14), 1818–92.

Denizot, F., & Lang, R. (1986). Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *Journal of Immunological Methods*, 89(2), 271–7.

Duarte, W. F.; Dias, D. R.; Oliveira, J. M.; Teixeira, J. A.; de Almeida e Silva, J. B.; Schwan, R. F. (2010). Characterization of different fruit wines made from cacao, cupuassu, gabirola, jaboticaba and umbu *Food Science and Technology*, 43(10),1564-72.

Ebrahimi, A., & Schluesener, H. (2012). Natural polyphenols against neurodegenerative disorders: Potentials and pitfalls. *Ageing Research Reviews*, 11(2), 329–345.

Fato, F., Bergamini, C., Bortolus, M., Maneiro, A. L., Leoni, S., Ohnishi, T., & Lenaz, G. (2010). Differential effects of mitochondrial Complex I inhibitors on production of reactive oxygen species. *Biochim Biophys Acta.*, 1787(5), 384–392.

Floegel, A., Kim, D.-O., Chung, S.-J., Song, W. O., Fernandez, M. L., Bruno, R. S., Chun, O. K. (2010). Development and validation of an algorithm to establish a total antioxidant capacity database of the US diet. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 61(6), 600–23.

Gonçalves, A. E. S. S.; Lajolo, F. M.; Genovese, M. I. (2010). Chemical composition and antioxidant/antidiabetic potential of Brazilian native fruits and commercial frozen pulps. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(8), 4666-74.

Green L.C., Tannenbaum S.R. and Goldman P. (1981). Nitrate synthesis in the germfree and conventional rat. *Science* 212, 56-58

Halliwell, B. (2007). Biochemistry of oxidative stress. *Biochemical Society Transactions*, 35(Pt 5), 1147–50.

Ho, J. H., & Chang, Y. L. (2005). Strawberry and its anthocyanins reduce oxidative stress-induced apoptosis in PC12 cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(6), 1984–1989.

- Huang, D., Ou, B., & Prior, R. L. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(6), 1841–56.
- Lacorte, S., & Fernandez-Alba, A. R. (2006). Time of flight mass spectrometry applied to the liquid chromatographic analysis of pesticides in water and food. *Mass Spectrometry Reviews*, 25, 866–880.
- Leite, A. V., Malta, L. G., Riccio, M. F., Eberlin, M. N., Pastore, G. M., & Maróstica Júnior, M. R. (2011). Antioxidant potential of rat plasma by administration of freeze-dried jaboticaba peel (*Myrciaria jaboticaba* Vell Berg). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(6), 2277–83.
- 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 Research International*, 49(1), 596–603.
- Lorenz, P., Roychowdhury, S., Engelmann, M., Wolf, G., & Horn, T. F. W. (2003). Oxyresveratrol and resveratrol are potent antioxidants and free radical scavengers: Effect on nitrosative and oxidative stress derived from microglial cells. *Nitric Oxide - Biology and Chemistry*, 9(2), 64–76.
- Lorenzi, H., Bacher, L., Lacerda, M., & Sartori, S. (2000). *Brazilian fruits & cultivated exotics (for consumin in natura)*. Avenida Brasil: Instituto Plantarumde Estudos da Flora Ltda.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, L. A., & Randall, R. J. (1951). Protein mensurement with the folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*, 265–275.
- Lutz, Instituto Adolfo (2005). Normas analíticas do instituto Adolfo Lutz (3rd ed.). São Paulo: Instituto Adolfo Lutz
- Morton, J. F. (1987). *Jaboticabas*. In: *Fruits of warm climates* (pp. 371–374). Miami, FL.
- Moyer, R. a, Hummer, K. E., Finn, C. E., Frei, B., & Wrolstad, R. E. (2002). Anthocyanins, phenolics, and antioxidant capacity in diverse small fruits: vaccinium, rubus, and ribes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(3), 519–25.
- Murphy, M. P. (2009). How mitochondria produce reactive oxygen species. *The Biochemical Journal*, 417(1), 1–13.
- Mursu, J., Virtanen, J. K., Tuomainen, T.-P., Nurmi, T., & Voutilainen, S. (2014). Intake of fruit, berries, and vegetables and risk of type 2 diabetes in Finnish men: the Kuopio Ischaemic Heart Disease Risk Factor Study. *Am J Clin Nutr*, 99(2), 328–33.
- Prior, R. L., Cao, G., Martin, A., Sofic, E., Mcewen, J., Brien, C. O., Mainland, C. M. (1998). Antioxidant Capacity As Influenced by Total Phenolic and Anthocyani Content

, Maturity , and Variety of Vaccinium Species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(7), 2686–2693.

Quijano, C. E. & Pino, J. A. (2007). Analysis of volatile compounds of camu-camu (*Myrciaria dubia* (HBK) Mcvaugh) fruit isolated by different methods. *Journal of Essential Oil Research*, 19(6), 527–33.

Quincozes-Santos, A., Bobermin, L. D., Latini, A., Wajner, M., Souza, D. O., Gonçalves, C.-A., & Gottfried, C. (2013). Resveratrol protects C6 astrocyte cell line against hydrogen peroxide-induced oxidative stress through heme oxygenase 1. *PloS One*, 8(5), e64372.

Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine*, 26(98), 1231–1237.

Reynertson, K. a, Wallace, A. M., Adachi, S., Gil, R. R., Yang, H., Basile, M. J., Kennelly, E. J. (2006). Bioactive depsides and anthocyanins from jaboticaba (*Myrciaria cauliflora*). *Journal of Natural Products*, 69(8), 1228–30.

Riobó, N. A., Clementi, E., Melani, M., Boveris, A., Cadenas, E., Moncada, S., & Poderoso, J. J. (2001). Nitric Oxide Inhibits mitochondrial NADH: ubiquinone reductase activity through peroxynitrite formation. *Biochemical Journal*, 359, 139–145.

Rufino, M. D. 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 Chemistry*, 121(4), 996–1002.

Sariburun, E., Sahin, S., Demir, C., Türkben, C., & Uylaşer, V. (2010). Phenolic content and antioxidant activity of raspberry and blackberry cultivars. *Journal of Food Science*, 75(4), C328–35.

Scola, G., Kim, H. K., Young, T. L., & Andreazza, A. C. (2013). A Fresh Look at Complex I in Microarray Data : Clues to Understanding Disease-Specific Mitochondrial Alterations in Bipolar Disorder. *Society of Biological Psychiatry*, 73, 4–5.

Sharma, L. K., Fang, H., Liu, J., Vartak, R., Deng, J., & Bai, Y. (2011). Mitochondrial respiratory complex I dysfunction promotes tumorigenesis through ROS alteration and AKT activation. *Human Molecular Genetics*, 20(23), 4605–4616.

Singleton, V.L.; Rossi, J.A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic- phosphotungstic acid reagents. *Am. J. of Enology and Viticulture*. 16: 144–158.

Smith, R. a J., Hartley, R. C., Cochemé, H. M., & Murphy, M. P. (2012). Mitochondrial pharmacology. *Trends in Pharmacological Sciences*, 33(6), 341–52.

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.

- Stockert, J. C., Blázquez-Castro, A., Cañete, M., Horobin, R. W., & Villanueva, Â. (2012). MTT assay for cell viability: Intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets. *Acta Histochemica*, 114(8), 785–796.
- Strober, W. (2001). Trypan blue exclusion test of cell viability. *Current Protocols in Immunology*.
- Subramaniam, S. R., & Chesselet, M. (2013). Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in Parkinson's disease, 107, 17–32.
- Szajdek, A., & Borowska, E. J. (2008). Bioactive compounds and health-promoting properties of berry fruits: a review. *Plant Foods for Human Nutrition*, 63(4), 147–56.
- Taddei, M. L., Giannoni, E., Raugei, G., Scacco, S., Sardanelli, A. M., Papa, S., & Chiarugi, P. (2012). Mitochondrial Oxidative Stress due to Complex I Dysfunction Promotes Fibroblast Activation and Melanoma Cell Invasiveness. *Journal of Signal Transduction*, 2012, 684592.
- Tatsumi, T., & Kako, K. J. (1993). Effects of hydrogen peroxide on mitochondrial enzyme function studied in situ in rat heart myocytes. *Basic Research in Cardiology*, 88(3), 199–211.
- Thannickal, V. J. (2009). Oxygen in the evolution of complex life and the price we pay. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 40(5), 507–10.
- Trachootham, D., Lu, W., Ogasawara, M. a, Nilsa, R.-D. V., & Huang, P. (2008). Redox regulation of cell survival. *Antioxidants & Redox Signaling*, 10(8), 1343–74.
- Veggi, P. C., Santos, D. T., & Meireles, M. A. a. (2011). Anthocyanin extraction from Jabuticaba (*Myrciaria cauliflora*) skins by different techniques: economic evaluation. *Procedia Food Science*, 1(Icef 11), 1725–1731.
- Rosso, V., Hillebrand, S., Cuevas Montilla, E., Bobbio, F. O., Winterhalter, P., & Mercadante, A. Z. (2008). Determination of anthocyanins from acerola (*Malpighia emarginata* DC.) and açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) by HPLC–PDA–MS/MS. *Journal of Food Composition and Analysis*, 21(4), 291–299.
- Vessecchi, R., Zocolo, G. J., Gouvea, D. R., Hübner, F., Cramer, B., de Marchi, M. R. R., ... Lopes, N. P. (2011). Re-examination of the anion derivatives of isoflavones by radical fragmentation in negative electrospray ionization tandem mass spectrometry: experimental and computational studies. *Rapid Communications in Mass Spectrometry : RCM*, 25(14), 2020–6.
- Visioli, F., & Davalos, a. (2011). Polyphenols and Cardiovascular disease: A critical summary of the evidence. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 11(14), 1186–1190.
- Wahle, K. W. J., Rotondo, D., Brown, I., & Heys, S. D. (2009). Plant Phenolics in the Prevention and Treatment of Cancer. *Bio-Farms for Nutraceuticals: Functional Food and Safety Control by Biosensors*.

- Wills, E. D. (1966). Mechanisms of lipid peroxide formation in animal tissues. *The Biochemical Journal*, 99(3), 667–76.
- Wrolstad, R. E. (1993). Color and Pigment Analyses in Fruit Products. *Agricultural Experiment Station, Oregon State University, Station Bu*(May).
- Wu, H., Xing, K., & Lou, M. F. (2010). Glutaredoxin 2 prevents H₂O₂-induced cell apoptosis by protecting complex I activity in the mitochondria. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1797(10), 1705–15.
- 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, 7513–7525.
- Wu, S., Long, C., & Kennelly, E. J. (2013). Phytochemistry and health benefits of jaboticaba, an emerging fruit crop from Brazil. *Food Research International*, 54, 148–159.
- Xie, X., Zhao, R., & Shen, G. X. (2012a). Impact of Cyanidin-3-Glucoside on Glycated LDL-Induced NADPH Oxidase Activation, Mitochondrial Dysfunction and Cell Viability in Cultured Vascular Endothelial Cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(12), 15867–80.
- Xie, X., Zhao, R., & Shen, G. X. (2012b). Influence of delphinidin-3-glucoside on oxidized low-density lipoprotein-induced oxidative stress and apoptosis in cultured endothelial cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(7), 1850–6.
- Yamaguchi, T., Takamura, H., Matoba, T., & Terao, J. (1998). HPLC Method for Evaluation of the free radical scavenging activity of foods by using 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl.pdf. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 62(6), 1201–1204.
- Zucco, F., De Angelis, I., Testai, E., & Stamatii, a. (2004). Toxicology investigations with cell culture systems: 20 years after. *Toxicology in Vitro*, 18(2), 153–163.

5. DISCUSSÃO GERAL

As frutas são parte integrante da dieta e constituem uma importante fonte de nutrientes essenciais, incluindo carboidratos, vitaminas, sais minerais, fibras e fitonutrientes. Além disso, o consumo de frutas vem sendo associado a uma diminuição do risco de desenvolvimento de diversas doenças, incluindo as doenças cardiovasculares, o câncer e a obesidade (Boeing *et al.*, 2012).

Dentre a grande diversidade de frutas existentes, as frutas tropicais, principalmente as frutas vermelhas, como a pitanga, o açaí e a jabuticaba, têm despertado grande interesse devido ao seu valor nutricional e por serem ricas em compostos fenólicos, aos quais se tem atribuído efeitos benéficos a saúde (Costa *et al.*, 2013). Esses compostos têm sido largamente associados à capacidade de reduzir os danos oxidativos/nitrosativos a biomoléculas, os quais vêm sendo associados à fisiopatologia de diversas doenças, tais como as cardiovasculares, o diabetes e o câncer (Visioli & Davalos, 2011; Ebrahimi & Schluesener, 2012; Mursu *et al.*, 2014).

Neste contexto, a jabuticaba (*Plinia* sp.) surge como uma fruta promissora que tem despertado um grande interesse científico, principalmente acerca de sua composição química e atividades biológicas. Entre 2011 e 2014, o número de novas publicações a respeito da jabuticaba (*Plinia* sp.) foi maior que a soma das publicações dos últimos 10 anos. A jabuticaba tem sido considerada uma fruta funcional por conter além de macronutrientes, fitonutrientes em quantidades significativas, sobretudo compostos fenólicos. Assim, neste estudo foi avaliada a composição nutricional e fenólica da casca e da polpa fresca de *P. trunciflora*. Além disso, foi determinada a composição química e a capacidade do ECJ em minimizar o estresse oxidativo/nitrosativo e modular a função mitocondrial em fibroblastos de pulmão humano (MRC-5) tratados com H₂O₂.

A análise nutricional da casca e da polpa de *P. trunciflora* demonstrou que ambas as partes apresentam um conteúdo relativamente alto de umidade ($86,46 \pm 0,43\%$ e $75,18 \pm 0,85\%$, respectivamente). De forma similar a *P. cauliflora*, os principais macronutrientes presentes, tanto na polpa quanto na casca, são os carboidratos, com valores de $13,11 \pm 0,01\text{g}/100\text{g}$ e $11,54 \pm 0,01\text{g}/100\text{g}$, respectivamente. A casca da jabuticaba apresentou ainda um conteúdo considerável de fibra total ($8,45 \pm 0,01\text{g}/100\text{g}$ de casca), o qual é cerca de 60 vezes maior que o conteúdo presente na polpa. Além disso, o conteúdo de fibra total da casca da jabuticaba é significativamente maior do que o conteúdo presente na casca de outras frutas, como manga ($4,16\text{g}/100\text{g}$), melão ($4,58\text{g}/100\text{g}$) e laranja ($3,55\text{g}/100\text{g}$), as quais vêm sendo utilizadas em preparações para enriquecer o conteúdo de fibra alimentar (Storck *et al.*, 2013). As fibras constituem uma ampla categoria de ingredientes alimentares que incluem polissacarídeos não amiláceos, oligossacarídeos, ligninas e polissacarídeos análogos, os quais tem sido relacionados a diversos benefícios à saúde, como diminuição do risco de diabetes mellitus tipo 2, doenças cardiovasculares e câncer de cólon (Eshak *et al.*, 2010; Lattimer & Haub, 2010; Papathanasopoulos & Camilleri, 2010).

Devido ao seu alto teor de umidade e de açúcares, a jabuticaba é muito perecível, apresentando uma vida útil relativamente curta, de 2 a 3 dias. Assim, para evitar perdas, geralmente as frutas são utilizadas no preparo de produtos como geleias, sucos, vinhos, licores e vinagres. No processamento para a fabricação destes produtos, as cascas normalmente são desprezadas. Além disso, a casca, na maioria das vezes, não é ingerida quando a fruta é consumida *in natura*. (Brunini *et al.*, 2004; Balerdi *et al.*, 2006; Lima *et al.*, 2008).

Alguns estudos têm demonstrado que a casca da jabuticaba é especialmente rica em flavonóis e antocianinas (Reynertson *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2012; Leite-Legatti

et al., 2012). Portanto, com o objetivo de determinar a melhor condição de extração destes compostos analisou-se o conteúdo de compostos fenólicos totais de extratos, tanto da casca quanto da polpa, obtidos a partir de diferentes métodos de extração (ultrassom e condensador), com diferentes solventes (metanol, etanol e água) e em diferentes tempos. Os extratos a 5% p/v, obtidos através de decocção com condensador durante 15 minutos, apresentaram maior conteúdo de compostos fenólicos, definindo-se assim, esta concentração e metodologia de extração (Anexo I e II). Os extratos da casca e da polpa foram utilizados para a determinação do conteúdo de compostos fenólicos totais e antocianinas. O extrato da casca (ECJ) foi liofilizado e utilizado para a determinação da composição química, atividade antioxidante *in vitro* e para a avaliação da capacidade de modulação do estresse oxidativo/nitrosativo e função mitocondrial nas células MRC-5.

Observou-se que a espécie de jabuticaba *P. trunciflora*, de forma semelhante às outras espécies, como *P. cauliflora* e *P. jaboticaba*, apresenta um importante conteúdo de compostos fenólicos e este conteúdo é maior na casca ($313,7 \pm 4,26$ mg EAG/100g de casca fresca) do que na polpa ($162,2 \pm 7,67$ mg EAG/100g de polpa fresca). Além disso, foi observado que a maior parte dos compostos fenólicos totais que compõem a casca da jabuticaba pertence à classe das antocianinas, sendo que o conteúdo de antocianinas da casca ($242,75 \pm 14,25$ mg de equivalentes de cianidina-3-glicosídeo/100g de casca) foi superior ao encontrado na polpa ($1,1 \pm 0,21$ mg equivalentes de cianidina-3-glicosídeo/100g de polpa). As antocianinas são responsáveis pela pigmentação roxa, quase negra, observada na casca da jabuticaba. Devido ao alto conteúdo de antocianinas, diversos estudos vêm tentando aprimorar a extração destes compostos da casca da jabuticaba com o objetivo de utilizá-los como

pigmentos naturais na indústria de alimentos (Montes *et al.*, 2005; Veggi *et al.*, 2011; Santos & Meireles, 2011).

Para a determinação da composição química do ECJ foi empregada a análise de espectrometria de massas com ionização por electrospray (ESI-MS), a qual representa uma importante ferramenta para a caracterização e identificação de compostos presentes em produtos naturais, como, por exemplo, os flavonoides (Vessecchi *et al.*, 2011). A espectrometria de massas permitiu a identificação de quatro compostos no ECJ, sendo que dentre eles, dois são compostos fenólicos, um da classe dos flavonóis, o canferol (m/z 287,0558), e outro da classe das antocianinas, a cianidina-3-*O*-glicosídeo (m/z 449,1080). Outros estudos já demonstraram a presença da antocianina cianidina-3-*O*-glicosídeo em outras espécies de jabuticaba (Reynertson *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2012). Entretanto, este é o primeiro estudo a mostrar a presença de canferol na casca de jabuticaba. Os outros dois compostos identificados, o ácido hexadecanóico ou ácido palmítico (m/z 257,2473) e o ácido octadecanóico ou ácido esteárico (m/z 285,2786 [$M + H$]; 283,2651 [$M - H$]), são ácidos graxos saturados encontrados tanto em gorduras de origem vegetal quanto animal.

Uma das principais atividades biológicas atribuídas aos compostos fenólicos é sua capacidade de reduzir radicais livres (Halliwell, 2007). Levando em conta o alto conteúdo de compostos fenólicos apresentado pelo ECJ, foram realizados os ensaios de redução dos radicais DPPH[•] e ABTS^{•+}. O ECJ apresentou uma capacidade significativa de reduzir tanto o radical DPPH[•] (IC_{50} : $0,35 \pm 0,01$ mg/mL) quanto o radical ABTS^{•+} (IC_{50} : $0,69 \pm 0,02$ mg/mL). Essa atividade antioxidante apresentada pelo ECJ foi superior àquela apresentada pelo suco de jabuticaba (IC_{50} : $0,453 \pm 0,001$ mg/mL), avaliado através do ensaio de DPPH[•] (Wu *et al.*, 2012). A avaliação da atividade antioxidante através do ensaio DPPH[•] é baseada no princípio de que o antioxidante

presente na amostra é capaz de transferir um átomo de hidrogênio ao radical, embora alguns autores sugiram que se trate de uma reação de transferência de elétrons. Por outro lado o ensaio ABTS^{•+} trata-se de uma reação de transferência de um elétron para o radical (Huang *et al.*, 2005).

O conteúdo de compostos fenólicos totais do ECJ apresentou uma correlação positiva com a atividade antioxidante avaliada através dos ensaios de DPPH[•] ($r = 0,919$, $p < 0,001$) e ABTS^{•+} ($r = 0,993$, $p < 0,001$). Foi observada também uma correlação positiva em relação ao conteúdo de antocianinas e a atividade antioxidante avaliada pelos ensaios de DPPH[•] ($r = 0,805$, $p < 0,001$) e ABTS^{•+} ($r = 0,948$, $p < 0,001$). Essa correlação sugere que a atividade antioxidante apresentada é, em grande parte, devida a presença de compostos fenólicos no ECJ.

Com o objetivo de avaliar os efeitos biológicos do ECJ frente ao estresse oxidativo induzido pelo agente H₂O₂, a linhagem MRC-5 foi utilizada como modelo de estudo. As células MRC-5 foram tratadas com três diferentes concentrações do ECJ (50, 100 e 250 µg/mL) durante uma hora e, após a remoção deste, foram expostas ao H₂O₂ por 26 horas. O ciclo celular da linhagem MRC-5 é de 24 horas, portanto, este tempo de tratamento de 26 horas foi determinado a fim de evitar possíveis erros em função do tempo de divisão celular da linhagem. A viabilidade celular foi avaliada imediatamente após a retirada do tratamento com o H₂O₂, através dos ensaios de MTT e de *trypan blue*. Foi observado que o ECJ, nas três concentrações testadas, foi capaz de diminuir, quase que totalmente, a mortalidade apresentada pelas células expostas ao H₂O₂. Esse resultado foi observado tanto no ensaio de MTT, que avalia o metabolismo global das células, já que o composto MTT é reduzido por desidrogenases e outros agentes redutores presentes nas células viáveis, quanto no ensaio de coloração com *trypan blue*, o qual é baseado no princípio de que os danos e a consequente permeabilização da

membrana pode levar a um distúrbio da homeostase e à morte celular (Strober, 2001; Stockert *et al.*, 2012).

O H_2O_2 é uma ERO com habilidade de atravessar membranas biológicas com facilidade, essa característica faz com que essa molécula seja capaz de difundir-se para dentro da célula e causar danos em múltiplos compartimentos celulares (Sies, 2014). Além disso, o H_2O_2 é precursor de outras ERO, como o $HO^\bullet$, através da reação com metais de transição (Cai *et al.*, 2003; Quincozes-Santos *et al.*, 2013). Dentre as biomoléculas que podem ser lesadas pelas ERO, os lipídeos são especialmente susceptíveis à oxidação, principalmente aqueles encontrados na membrana plasmática e na membrana de organelas intracelulares. A oxidação destas moléculas leva à formação e ao acúmulo de produtos da peroxidação lipídica, os quais podem ser quantificados através do ensaio de TBARS, que quantifica principalmente o malondialdeído, e vem sendo largamente utilizado como marcador para avaliação do estresse oxidativo (Ogino & Wang, 2007; Mangialasche *et al.*, 2009). Portanto, neste estudo, os níveis de estresse oxidativo foram determinados através da quantificação da peroxidação lipídica pelo método de TBARS. O pré-tratamento com diferentes concentrações do ECJ diminuiu os níveis de peroxidação lipídica nas células MRC-5 tratadas com H_2O_2 , demonstrando a capacidade do extrato em evitar os danos oxidativos aos lipídeos. Em estudo com ratos diabéticos observou-se que os animais que receberam 2g/kg de peso por dia de casca de jabuticaba (*P. jaboticaba*) liofilizada apresentaram uma diminuição nos níveis de danos oxidativos a lipídeos do plasma e do cérebro (Alezandro, Granato, & Genovese, 2013). Além disso, outros estudos também demonstraram uma diminuição na peroxidação lipídica no fígado de ratos que receberam casca de jabuticaba (*P. jaboticaba*) na dieta (Lage *et al.*, 2014; Batista *et al.*, 2014).

O $\text{ON}^\bullet$ é um radical livre endógeno, produzido por uma variedade de isoformas da enzima ONS, através da oxidação da L-arginina a L-citrulina (Quincozes-Santos et al., 2013). Em concentrações elevadas, o $\text{ON}^\bullet$ pode ser convertido a outros derivados mais reativos, que são coletivamente denominados ERN como, por exemplo, o NO_2 , o ONOO^- e $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$, produzidos através das reações do $\text{ON}^\bullet$ com o O_2 , $\text{O}_2^{\bullet-}$ e com o H_2O_2 , respectivamente. Essas ERN podem oxidar/nitrar outras moléculas ou serem decompostas e produzir outras espécies prejudiciais (Calcerrada *et al.*, 2011). Para a determinação do conteúdo de $\text{ON}^\bullet$ nas células MRC-5 foi utilizado o método de Griess, que envolve a medida espectrofotométrica indireta de nitrito, produto da decomposição do $\text{ON}^\bullet$. Estudos já demonstraram a capacidade do H_2O_2 em induzir aumento dos níveis de $\text{ON}^\bullet$. Além disso, estudo de Nagase et al. (1997) demonstrou que existe a formação de $\text{ON}^\bullet$ a partir da reação do H_2O_2 com L-arginina, independente de ONS. Quando as células MRC-5 foram pré-tratadas com o ECJ, observou-se uma diminuição significativa nos níveis de $\text{ON}^\bullet$, em todas as concentrações do ECJ testadas. Outros estudos também demonstraram a capacidade de extratos de frutas ricas em antocianinas, como açaí e mirtilo, em modular os níveis de $\text{ON}^\bullet$ em cultura de células, principalmente através da modulação da expressão das isoformas da ONS (Wang & Mazza, 2002; Poulouse *et al.* 2012).

A CTE, localizada na membrana interna mitocondrial, é composta por quatro complexos proteicos através dos quais elétrons são transferidos. Concomitantemente à transferência de elétrons, prótons são bombeados para o espaço intermembrana através dos complexos I, III e IV, formando um gradiente de prótons essencial para a função da ATP sintase na geração de energia (ATP). Durante a transferência de elétrons na CTE, são geradas, continuamente, ERO, como resultado da interação entre O_2 e elétrons provenientes, principalmente, do complexo I da ETC (Smith, 2012). Estudos têm

demonstrado que a inibição do complexo I pode levar a um incremento na geração dessas ERO com concomitante aumento nos danos oxidativos e consequente disfunção mitocondrial. A disfunção mitocondrial e a atividade do complexo I diminuída têm sido associadas a doenças, principalmente a doença de Parkinson, a desordem bipolar e a tumorigênese e a progressão e invasão do câncer (Sharma *et al.*, 2011; Taddei *et al.*, 2012; Subramaniam & Chesselet, 2013).

Neste trabalho a função mitocondrial foi avaliada através da determinação da atividade do complexo I da ETC e dos níveis de ATP nas células MRC-5. Observou-se que as células tratadas apenas com H_2O_2 apresentaram uma diminuição na atividade do complexo I. Estudos já demonstraram esse efeito do H_2O_2 na diminuição da atividade do complexo I (Tatsumi & Kako, 1993; Wu *et al.*, 2010). Concomitante a diminuição da atividade do complexo I, observou-se uma redução também na produção de ATP, demonstrando que a diminuição da atividade do complexo I induzida pelo H_2O_2 , foi acompanhada pelo comprometimento da geração de ATP. A inibição da atividade do complexo I pode levar a um incremento na geração de $O_2^{\cdot-}$, que se reagir com o $ON^{\cdot}$, gerando $ONOO^-$. Estudos têm demonstrado que o $ONOO^-$ também causa diminuição da atividade do complexo I, alimentando um ciclo vicioso de inibição (Riobó *et al.*, 2001; Brown & Borutaite, 2004). Além disso, os danos oxidativos aos lipídios da membrana mitocondrial interna, onde estão localizados os complexos da CTE, podem também comprometer a atividade destes complexos. Um exemplo disso é a cardiolipina, um fosfolipídio encontrado quase exclusivamente em nível da membrana mitocondrial interna, sendo requerida para uma atividade ótima dos complexos da CTE. A cardiolipina é particularmente suscetível aos danos causados por ERO, sendo que sua oxidação pode levar a uma disfunção mitocondrial (Petrosillo *et al.*, 2009).

Portanto, a disfunção mitocondrial induzida por H₂O₂ leva a um incremento na geração de ERO/ERN, os quais podem ser responsáveis pela perda da viabilidade observada nas células MRC-5. O pré-tratamento das células com o ECJ foi capaz de evitar a diminuição da atividade do complexo I e, conseqüentemente, atenuou a diminuição da produção de ATP. Estudos demonstraram que algumas antocianinas, incluindo a cianidina-3-*O*-glicosídeo, apresentam capacidade de minimizar a disfunção do complexo I mitocondrial em cultura de células endoteliais (Xie *et al.*, 2012a; Xie *et al.*, 2012b). Além disso, canferol, também encontrado no ECJ, foi capaz de restaurar a atividade do complexo IV inibido por antimicina A em cultura de células (Choi, 2011).

Estes achados recentes sobre a capacidade de alguns compostos fenólicos em restaurar a função mitocondrial podem contribuir com os avanços na farmacologia mitocondrial (Smith *et al.*, 2012). De fato, a mitocôndria como alvo de compostos fenólicos pode representar um avanço no tratamento de doenças associadas com o estresse oxidativo/nitrosativo, incluindo as doenças cardiovasculares e neurodegenerativas, diabetes e câncer (Visioli & Davalos, 2011; Ebrahimi & Schluesener, 2012; Mursu *et al.*, 2014). Nesse sentido, a jabuticaba (*P. trunciflora*) ganha ainda mais atenção como fonte de compostos fenólicos com capacidade de modulação da função mitocondrial e, conseqüentemente, do estresse oxidativo/nitrosativo.

6. CONCLUSÕES

Os dados obtidos neste estudo permitem concluir que:

- 1.1. Os principais macronutrientes presentes na casca e na polpa frescas de *P. trunciflora* são carboidratos. Além disso, a casca de *P. trunciflora* apresentou importante conteúdo de fibras totais.
- 1.2. A casca da jabuticaba (*P. trunciflora*) apresentou importante conteúdo de compostos fenólicos totais, principalmente antocianinas, sendo que este conteúdo foi significativamente superior ao conteúdo encontrado na polpa.
- 1.3. A análise de espectrometria de massas do ECJ demonstrou a presença dos compostos cianidina-3-*O*-glicosídeo, canferol, ácido octadecanóico e ácido hexadecanóico.
- 1.4. O ECJ apresentou atividade antioxidante *in vitro*, sendo capaz de reduzir os radicais DPPH[•] e ABTS^{•+}.
- 1.5. O conteúdo de compostos fenólicos totais e de antocianinas apresentou correlação positiva com a atividade antioxidante *in vitro* do ECJ.
- 1.6. O ECJ foi capaz de diminuir a perda da viabilidade, os danos oxidativos a lipídeos e o aumento dos níveis de ON[•] induzidos pelo H₂O₂ nas células MRC-5
- 1.7. O ECJ foi capaz de evitar a diminuição da atividade do complexo I da CTE e atenuou a diminuição da biossíntese de ATP induzidos pelo H₂O₂ nas células MRC-5.

7. PERSPECTIVAS

Como continuidade deste trabalho, seria importante:

- 1.1. Determinar o conteúdo de vitaminas e minerais da casca e da polpa de *P. trunciflora*.
- 1.2. Identificar os compostos presentes no ECJ através análise de espectrometria de massas.
- 1.3. Determinar a capacidade do ECJ em evitar os danos oxidativos a proteínas, através do ensaio de proteínas carboniladas, e ao DNA, através do ensaio cometa, em cultura de células de mamíferos.
- 1.4. Avaliar a atividade dos complexos II, III e IV da cadeia de transporte de elétrons em cultura de células de mamíferos.
- 1.5. Avaliar a atividade do complexo I, em cultura de células de mamífero, frente a sua inibição com um inibidor conhecido como, por exemplo, a rotenona.
- 1.6. Avaliar a expressão de subunidades dos complexos da cadeia de transporte de elétrons, em cultura de células de mamíferos.
- 1.7. Avaliar outras atividades biológicas da jabuticaba (*P. trunciflora*), identificando os compostos responsáveis pelo efeito observado.

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
- 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.
- Andersen, O. M.; & Jordheim, M. (2005). The anthocyanins. In O. M. Andersen & K. R. Markham (Eds.), *Flavonoids: Chemistry, biochemistry and applications* (pp. 471–552). CRC Press.
- Balasundram, N.; Sundram, K.; Samman, S. (2006). Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity occurrence, and potential uses. **Food Chem.**, 99: 191–203.
- 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.
- Batista, A. G.; Lenquistea, S. A.; Cazarina, C. B. B.; Silva, J. K.; Ferreira, A. L.; Bogusz Jr., S.; Hantaod, L. W.; Souza, R. N.; Augustod, F.; Prado, M. A.; Maróstica Jr., M. R. (2014). Intake of jaboticaba peel attenuates oxidative stress in tissues and

- reduces circulating saturated lipids of rats with high-fat diet-induced obesity. **J. Funct. Foods**, 6(1): 450–461.
- Blainski, A.; Lopes, G. C.; Mello, J. C. P. (2013). Application and Analysis of the Folin Ciocalteu Method for the Determination of the Total Phenolic Content from *Limonium Brasiliense* L. **Molecules**, 18: 6852-6865.
- Boeing, H.; Bechthold, A.; Bub, A.; Ellinger, S.; Haller, D.; Kroke, A.; Leschik-Bonnet, E.; Müller, M. J.; Oberritter, H.; Schulze, M.; Stehle, P.; Watzl, B. (2012). Critical review: vegetables and fruit in the prevention of chronic diseases. **Eur. J. Nutr.**, 51: 637–663.
- Bouayed, J.; & Bohn, T. (2010). Exogenous antioxidants—Double-edged swords in cellular redox state. Health beneficial effects at physiologic doses versus deleterious effects at high doses. **Oxid. Med. Cell Longev.**, 3 (4): 228-37.
- Brown, G. C., & Borutaite, V. (2004). Inhibition of mitochondrial respiratory complex I by nitric oxide, peroxynitrite and S-nitrosothiols. **Biochim. Biophys. Acta**, 1658(1-2), 44–9.
- Brunini, M. A.; Oliveira, A. L.; Salandini, C. A. R. (2004). Influência de Embalagens e Temperatura no Armazenamento de Jabuticaba (Vell Berg) cv Sabará. **Cienc. Tecnol. Aliment.** 24: 378-383.
- Buonocore, G.; Perrone, S.; Tataranno, M. L. (2010). Oxygen toxicity: chemistry and biology of reactive oxygen species. **Semin. Fetal Neonatal Med.**, 15: 186-190
- Cai, H., Li, Z., Davis, M. E., Kanner, W., Harrison, D. G., & Dudley, S. C. (2003). Akt-dependent phosphorylation of serine 1179 and mitogen-activated protein kinase kinase/extracellular signal-regulated kinase 1/2 cooperatively mediate activation of

- the endothelial nitric-oxide synthase by hydrogen peroxide. **Mol. Pharmacol.**, 63(2): 325–31.
- Calcerrada, P., Peluffo, G., & Radi, R. (2011). Nitric oxide-derived oxidants with a focus on peroxynitrite: molecular targets, cellular responses and therapeutic implications. **Curr. Pharm. Des.**, 17(35): 3905–32.
- 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: 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.; Mizgier, M. L.; Speisky, H.; & Gotteland, M. (2012). Differential protective effects of quercetin, resveratrol, rutin and epigallocatechin gallate against mitochondrial dysfunction induced by indomethacin in Caco-2 cells. **Chem.-Biol. Interact.**, 195(3), 199–205.
- Carvalho, C. M.; Macedo-Costa, M. R.; Pereira, M. S. V.; Higino, J. S.; Carvalho, L. F. P. C.; Costa, L. J. (2009). Efeito antimicrobiano *in vitro* do extrato de jabuticaba [*Myrciaria cauliflora* (Mart.) O. Berg.] sobre *Streptococcus* da cavidade oral. **Rev. Bras. Pl. Med.** 11(1):79-83.
- Chatzopoulou, A.; Karioti, A.; Gousiadou, C.; Vivancos, V. L.; Kyriazopoulos, P.; Golegou, S.; et al. (2010). Depsides and other polar constituents from *Origanum dictamnus* L. and their in vitro antimicrobial activity in clinical strains. **J. Agr. Food Chem.**, 58: 6064–6068.

- Choi, E. M. (2011). Kaempferol protects MC3T3-E1 cells through antioxidant effect and regulation of mitochondrial function. **Food Chemical Toxicol.**, 49: 1800–1805.
- Choi, E. M. (2011). Luteolin protects osteoblastic MC3T3-E1 cells from antimycin A-induced cytotoxicity through the improved mitochondrial function and activation of PI3K/Akt/CREB. **Toxicol. In Vitro**, 25(8): 1671–9.
- Citadin, I; Danner, M. A; Sasso, S. A. Z. (2010). Jabuticabeiras. **Rev. Bras. de Frut.** 32(2): 343-656.
- Costa, A. G. V.; Garcia-Dia, D. F.; Jimenez, P.; Silva, P. I. (2013). Bioactive compounds and health benefits of exotic tropical red-blackberries. **J. Func. Foods**, 5: 539 –49.
- Dalle-Donne, I; Scaloni, A.; Giustarini, D.; Cavarra E.; Tell, G., Lungarella, G.; Colombo, R.; Rossi, R.; Milzani, A. (2005). Proteins As Biomarkers Of Oxidative/Nitrosative Stress In Diseases: The Contribution Of Redox Proteomics. **Mass Spectrom. Rev.**, 24: 55-99.
- 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.
- Ebrahimi, A.; & Schluesener, H. (2012). Natural polyphenols against neurodegenerative disorders: Potentials and pitfalls. **Ageing Res. Rev.**, 11(2), 329–345.
- Eshak, E. S.; Iso, H.; Date, C.; Kikuchi, S.; Watanabe, Y.; Wada, Y.; Wakai, K.; Tamakoshi, A.; et al. (2010). Dietary Fiber Intake Is Associated with Reduced Risk of Mortality from Cardiovascular Disease among Japanese Men and Women. **J. Nutr.**, 140: 1-9.

- Fernandes, I.; Faria, 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.; Franc, E. L.; Honorio-Franc, A. C. (2011). Oxidative and Nitrosative Stress on Phagocytes' Function: from Effective Defense to Immunity Evasion Mechanisms. **Arch. Immunol. Ther. Exp.**, 59:441–448.
- Fotakis, G.; Timbrell, J. A. (2006). In vitro cytotoxicity assays: Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. **Toxicol. Lett.**, 160: 171–177.
- 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: 435–45.
- Giada, M. L. R. (2013). Food Phenolic Compounds: Main Classes, Sources and Their Antioxidant Power, Oxidative Stress and Chronic Degenerative Diseases - A Role for Antioxidants, Dr. Jose Antonio Morales-Gonzalez (Ed.), 87-111.
- Gomes, R.P. (1980). **Fruticultura brasileira**. São Paulo: Nobel S.A. 266p.
- González-Paramás, A.M.; Santos-Buelga, C.; Dueñas, M.; González-Manzano, S. (2011). Analysis of Flavonoids in Foods and Biological Samples. **Mini. Rev. Med. Chem.**, 11, 1239-55.
- Halliwell, B. (2007). Biochemistry of oxidative stress. **Biochem. Soc. Trans.**, 35: 1147–1150.
- Halliwell, B.; Gutteridge, J. M. (2007). **Free radicals in biology and medicine**. 4 ed. New York: Oxford Univ.Press. 851p.

- Hekimi, S.; Lapointe, J.; Wen, Y. (2011). Taking a “good” look at free radicals. **Trends in Cell Bio.**, 21(10): 569-76.
- Hichri, I.; Barrieu, F.; Bogs, J.; Kappel, C.; Delrot, S.; Lauvergeat, V. Recent advances in the transcriptional regulation of the flavonoid biosynthetic pathway. **J. Exp. Bot.**, 1-19.
- Huang, D., Ou, B., & Prior, R. L. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. **J. Agri. Food Chem.**, 53(6): 1841–56.
- Jaakola, L. (2013). New insights into the regulation of anthocyanin biosynthesis in fruits. **Trends Plant Sci.**, 18(9): 477-83.
- Jacobs, J. P.; Jones, C.M.; Baille, J.P. (1970). Characteristics of a Human Diploid Cell Designated MRC-5. **Nature**. 227: 168-170.
- Khlebnikov, A. I.; Schepetkin, I. A.; Domina, N. G.; Kirpotina, L. N.; Quinn, M. T.; (2007). Improved quantitative structure–activity relationship models to predict antioxidant activity of flavonoids in chemical, enzymatic, and cellular systems. **Bioorg. Med. Chem.**, 15: 1749–1770.
- Kussmaul, L. & Hirst, J. (2006). The mechanism of superoxide production by NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) from bovine heart mitochondria. **PNAS**, 103 (20): 7607–12.
- Lage, F. F.; Simão, A. A.; Guedes, M. N. S.; Ramos, V. O.; Sousa, R. V.; Corrêa, 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.
- Lattimer, J. M. & Haub, M. D. (2010). Effects of dietary fiber and its components on metabolic health. **Nutrients**, 2(12): 1266–89.
- 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, A.G.; Dragano, N.R.V.; Marques, A.C.; Malta, L.G.; Riccio, M.F.; Eberlin, M.N.; Machado, A.R.T.; Carvalho-Silva, L.B.; Ruiz, A.L.T.G.; Carvalho, J.E.; Patore, G.M.; Júnior, M.R.M. (2012). Jaboticaba peel: antioxidant compounds, antiproliferative and antimutagenic activities. **Food Res. Int.** 49: 596-603.
- Lenquiste, S. A.; Batista, Â. G.; Marineli, R. S., Dragano, N. R. V., & Moróstica, M. R., Jr. (2012). Freeze-dried jaboticaba peel added to high-fat diet increases HDL-cholesterol and improves insulin resistance in obese rats. **Food Res. Int.**, 49: 153–160.
- Lima, A. J. B; Duarte, A. C; Alves, A. P. C.; Alves, C. (2008). Caracterização química do fruto jaboticaba (*Myrciaria cauliflora* Berg) e de suas frações. **Arch. Latinoamericanos de Nutrición**. 58(4): 416-421.
- Lobo, V.; Phatak, A.; Chandra, N. (2010). Free radicals and functional foods: impact on

- Lokvam, J.; Clausen, T. P.; Grapov, D.; Coley, P. D.; Kursar, T. A. (2007). Galloyl depsides of tyrosine from young leaves of *Inga laurina*. **J. Nat. Prod.**, 70: 134–136.
- Lorenzi, H.; Bacher, I.; Lacerda, M.; Sartori, S. (2000). Brazilian fruits and cultivated exotics (for consumin in natura). Avenida Brasil: Instituto Plantarum de Estudos da Flora Ltda.
- 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.
- Ma, Q. (2010). Transcriptional responses to oxidative stress: Pathological and toxicological implications. **Pharmacol. Ther.**, 125: 376–393.
- Mabberly, D.J. The Plant Book. A Portable Dictionary of the Vascular Plants, 2nd ed.; Cambridge University Press: Cambridge, UK, 1997.
- Macedo-Costa, M.R.; Diniz, D.N.; Carvalho, C.M.; Pereira, M.S.V.; Pereira, J.V.; Higino, J.S. (2009). Eficácia do extrato de *Myrciaria cauliflora* (Mart.) O. Berg. (Jaboticabeira) sobre bactérias orais. **Rev. Bras. Farmacogn.** 19(2B): 565-571.
- Manach, C.; Scalbert, A.; Morand, C.; Rémésy, C.; Jiménez, L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. **Am. J. Clin. Nutr.**, 79: 727–47.
- Mangialasche, F.; Polidori, M. C.; Monastero, R.; Ercolani, S.; Camardad, C.; Cecchetti, R.; Mecocci, P. (2009). Biomarkers of oxidative and nitrosative damage in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. **Ageing Res. Rev.**, 8: 285–305.
- Mattos, J. R. (1983). Fruteiras nativas do Brasil: jaboticabeiras. Porto Alegre: Nobel, 92p.

- Mazza, G. J. (2007). Anthocyanins and heart health. **Ann. Ist. Super. Sanità**, 43(4): 369-74
- Meletti, L. M. M. (2000). **Propagação de frutíferas tropicais**. Guaíba: Agropecuária.
- Montes, C.; Vicario, I. M.; Raymundo, M.; Fett, R.; Heredia, F. J. (2005). Application of tristimulus colorimetry to optimize the extraction of anthocyanins from Jaboticaba (*Myrcia Jaboticaba* Berg.). **Food Res. Int.**, 38(8-9): 983–988.
- Morton, J. (1987). Jaboticabas. In: **Fruits of warm climates**. Miami, FL. 371–374p.
- Murphy, M. P. (2009). How mitochondria produce reactive oxygen species. **Biochem. J.**, 417, 1–13.
- Mursu, J., Virtanen, J. K., Tuomainen, T.-P., Nurmi, T., & Voutilainen, S. (2014). Intake of fruit, berries, and vegetables and risk of type 2 diabetes in Finnish men: the Kuopio Ischaemic Heart Disease Risk Factor Study. **Am. J. Clin. Nutr.**, 99(2), 328–33.
- Nagase, S.; Takemura, K.; Ueda, A.; Hirayama, A.; Aoyagi, K.; Kondoh, M.; Koyama, A. (1997). A novel nonenzymatic pathway for the generation of nitric oxide by the reaction of hydrogen peroxide and D- or L-arginine. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 233(1): 150–3.
- Niki, E. (2010). Assessment of Antioxidant Capacity in vitro and in vivo. **Free Radical Bio. Med.**, 49: 503–515.
- Ogino, K.; & Wang, D-H. (2007). Biomarkers of Oxidative/Nitrosative Stress: An Approach to Disease Prevention. **Acta Med.**, 61(4): 181–89.

- 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.
- Oliveira, L. A., de Souza-Moreira, T. M., Cefali, L. C., Chiari, B. G., Corrêa, M. A., Isaac, L. B., et al. (2011). Design of antiseptic formulations containing extract of *Plinia cauliflora*. **Braz. J. Pharm. Sci.**, 47: 525–533.
- Pamplona, R.; & Costantini, D. (2011). Molecular and structural antioxidant defenses against oxidative stress in animals. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, 301: 843–63.
- Papathanasopoulos, A. & Camilleri, M. (2010). Dietary fiber supplements: effects in obesity and metabolic syndrome and relationship to gastrointestinal functions. **Gastroenterology**, 138(1): 65–72.
- Petrosillo, G.; Matera, M.; Moro, N.; Ruggiero, F. M.; Paradies, G. (2009). Mitochondrial complex I dysfunction in rat heart with aging: critical role of reactive oxygen species and cardiolipin. **Free Radic. Biol. Med.**, 46: 88–94.
- Piga, R.; Saito, Y.; Yoshida, Y.; Niki, E. (2007). Cytotoxic effects of various stressors on PC12 cells: Involvement of oxidative stress and effect of antioxidants. **NeuroToxicology** 28:67–75.
- Poulose, S. M.; Fisher, D. R.; Larson, J.; Bielinski, D. F.; Rimando, A. M.; Carey, A. N.; Schauss, A. G. Shukitt-Hale, B. (2012). Anthocyanin-rich açai (*Euterpe oleracea* Mart.) fruit pulp fractions attenuate inflammatory stress signaling in mouse brain BV-2 microglial cells. **J. Agri. Food Chem.**, 60(4): 1084–93.
- Quincozes-Santos, A., Bobermin, L. D., Latini, A., Wajner, M., Souza, D. O., Gonçalves, C.-A., & Gottfried, C. (2013). Resveratrol protects C6 astrocyte cell line

- against hydrogen peroxide-induced oxidative stress through heme oxygenase 1. **PloS One**, 8(5): 1-10.
- Raes, K.; Knockaert, D.; Struijs, K.; Camp, J. V. (2014). Role of processing on bioaccessibility of minerals: Influence of localization of minerals and antinutritional factors in the plant. **Trends Food Sci. Tech.**, 37, 32-41.
- Rahman, K. (2007). Studies on free radicals, antioxidants and co-factors. **Clin. Interv. Aging**, 2: 219–236.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Bio. Med.**, 26 (98), 1231–1237.
- 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.
- Rigoulet, M.; Yoboue, E. D.; Devin, A. (2010). Mitochondrial ROS Generation and Its Regulation: Mechanisms Involved in H₂O₂ Signaling. **Antioxid. Redox Signaling.**, 14 (3): 459-68.
- Riobó, N. A.; Clementi, E.; Melani, M.; Boveris, A.; Cadenas, E.; Moncada, S.; Poderoso, J. J. (2001). Nitric oxide inhibits mitochondrial NADH:ubiquinone reductase activity through peroxynitrite formation. **Biochem. J.**, 359:139–145.
- 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.

- Rufino, M. S. M., Alves, R. E., Fernandes, F. A. N., & Brito, E. S. (2011). Free radical scavenging behavior of ten exotic tropical fruits extracts. **Food Res. Int.**, 44, 2072–2075.
- Russell, W.; & Duthie, G. (2011). Plant secondary metabolites and gut health: the case for phenolic acids. **Proc. Nutr. Soc.**, 70: 389-96.
- Sandoval-Acuña, C.; Ferreira, J.; Speisky, H. (2014). Polyphenols and mitochondria: An update on their increasingly emerging ROS-scavenging independent actions. **Arch. Biochem. Biophys.**, 559: 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. & Meireles, M. A. A. (2011). Optimization of bioactive compounds extraction from jabuticaba (*Myrciaria cauliflora*) skins assisted by high pressure CO₂. **Innov. Food Sci. Emerg. Technol.**, 12(3): 398–406.
- 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. of Food Engineering**. 101: 23-31.
- Sato, A. C. K; Cunha, R. L. (2007). Influência da temperatura no comportamento reológico da polpa de jabuticaba. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. 27 (4): 890-896.
- Scola, G., Kim, H. K., Young, T. L., & Andreazza, A. C. (2013). A Fresh Look at Complex I in Microarray Data: Clues to Understanding Disease-Specific Mitochondrial Alterations in Bipolar Disorder. **Society Biol. Psych.**, 73, 4–5.

- Sharma, L. K., Fang, H., Liu, J., Vartak, R., Deng, J., & Bai, Y. (2011). Mitochondrial respiratory complex I dysfunction promotes tumorigenesis through ROS alteration and AKT activation. **Hum. Mol. Gen.**, 20(23), 4605–4616.
- Sies, H. (2014). Role of Metabolic H₂O₂ Generation: Redox Signalling and Oxidative Stress. **J. Biol. Chem.**, 10: 1-18.
- Simões, C. M. O. (2010). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6º ed. rev. e ampl. Florianópolis: UFSC,. 1102 p.
- Smith, R. J., Hartley, R. C., Cochemé, H. M., & Murphy, M. P. (2012). Mitochondrial pharmacology. **Trends Pharmacol. Sci.**, 33(6): 341–52.
- 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-Moreira, T. M., Severi, J. A., Santos, E., Silva, V. Y. A., Vilegas, W., Salgado, H. R. N., et al. (2011). Chemical and antidiarrheal studies of *Plinia cauliflora*. **J. Med. Food**, 14: 1590–1596.
- Stockert, J. C., Blázquez-Castro, A., Cañete, M., Horobin, R. W., & Villanueva, A. (2012). MTT assay for cell viability: Intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets. **Acta Histochem.**, 114(8): 785–796.
- Storck, C. R., Nunes, G. L., Oliveira, B. B.; Basso, C. (2013). Folhas , talos , cascas e sementes de vegetais : composição nutricional, aproveitamento na alimentação e análise sensorial de preparações. **Ciência Rural**, 43(3): 537–43.
- Strober, W. (2001). Trypan blue exclusion test of cell viability. **Curr. Protoc. Immunol.**, 21:3B:A.3B.1–A.3B.2.

- Subramaniam, S. R.; & Chesselet, M. (2013). Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in Parkinson's disease. **Prog. Neurobiol.**, 107, 17–32.
- Tabela brasileira de composição de alimentos /NEPA – UNICAMP.- 4. ed. rev. e ampl. - Campinas: NEPAUNICAMP, 2011. 161 p.
- Taddei, M. L.; Giannoni, E.; Raugei, G.; Scacco, S.; Sardanelli, A. M.; Papa, S.; Chiarugi, P. (2011). Mitochondrial Oxidative Stress due to Complex I Dysfunction Promotes Fibroblast Activation and Melanoma Cell Invasiveness. **J Signal Transd.** 2012, 1-10.
- Tatsumi, T. & Kako, K. J. (1993). Effects of hydrogen peroxide on mitochondrial enzyme function studied in situ in rat heart myocytes. **Basic Res. Cardio.**, 88(3),: 199–211.
- Theoduloz, C., Franco, L., Ferro, E., & Hirschmann, G. S. (1988). Xantine Oxidase inhibitory activity of Paraguayan Mirtaceae. **J. Ethnopharmacol.**, 24, 179–183.
- Tomás-Barbera, F. A.; & Espín, J. C. (2001). Phenolic compounds and related enzymes as determinants of quality in fruits and vegetables. **J. Sci. Food Agric.**, 81: 853-76.
- Trachootham, D., Lu, W., Ogasawara, M. a, Nilsa, R.-D. V., & Huang, P. (2008). Redox regulation of cell survival. **Antioxid. Redox Signaling.**, 10(8), 1343–74.
- Tran, S.-L.; Puhar, A.; Ngo-Camus, M.; Ramarao, N. (2011). Trypan Blue Dye Enters Viable Cells Incubated with the Pore-Forming Toxin HlyII of *Bacillus cereus*. **PLoS one**, 6(9): 1-5.
- Treutter, D. (2006). Significance of flavonoids in plant resistance: a review. **Environ. Chem. Lett.**, 4:147–157.

- Trevisan, L. M.; Bobbio, F. O.; Bobbio, P. A. (1972). Carbohydrates, organic acids and anthocyanins of *Myrciaria jaboticaba*, Berg. **J. Food Sci.**, 37: 818-819.
- Tsao, R. (2010). Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols. **Nutrients**, 2: 1231-46.
- Valko, M.; Leibfritz, D.; Moncola, J.; Croninc, M. T. D.; Mazura, M.; Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, 39: 44-84.
- Veggi, P. C.; Santos, D. T.; Meireles, M. A. A. (2011). Anthocyanin extraction from Jaboticaba (*Myrciaria cauliflora*) skins by different techniques: economic evaluation. **Procedia Food Sci.**, 1: 1725-31.
- Vessecchi, R.; Zocolo, G. J.; Gouvea, D. R.; Hübner, F.; Cramer, B.; de Marchi, M. R. R.; Lopes, N. P. (2011). Re-examination of the anion derivatives of isoflavones by radical fragmentation in negative electrospray ionization tandem mass spectrometry: experimental and computational studies. **Rapid. Commun. Mass Sp.**, 25(14): 2020-6.
- Visioli, F.; & Davalos, A. (2011). Polyphenols and Cardiovascular disease: A critical summary of the evidence. **Mini Rev. Med. Chem.**, 11(14), 1186-1190.
- Wang, J. & Mazza, G. (2002). Effects of anthocyanins and other phenolic compounds on the production of tumor necrosis factor alpha in LPS/IFN-gamma-activated RAW 264.7 macrophages. **J. Agri. Food Chem.**, 50(15): 4183-9.
- Wilbank, M. V.; Chalfun, N. N. J.; Andersen, O. O. (1983). The jaboticaba in Brazil. **Proceedings of the Americans Society for Horticultural Science**, Alexandria. 27: 57-69.

- Wu, H., Xing, K. & Lou, M.F. (2010). Glutaredoxin 2 prevents H₂O₂-induced cell apoptosis by protecting complex I activity in the mitochondria. **Bioch. Bioph. Acta**, 1797(10): 1705–15.
- Wu, S., Long, C., & Kennelly, E. J. (2013). Phytochemistry and health benefits of jaboticaba, an emerging fruit crop from Brazil. *Food Research International*, 54, 148–159.
- Wu, S.B.; Dastmalchi, K.; Long, C.; Kennelly, E.J. (2012). Metabolite profiling of Jabuticaba (*Myrciaria cauliflora*) and other dark-colored fruit juices. **J. Agric. Food Chem.** 60: 7513–7525.
- Xie, X., Zhao, R., & Shen, G. X. (2012). Impact of Cyanidin-3-Glucoside on Glycated LDL-Induced NADPH Oxidase Activation, Mitochondrial Dysfunction and Cell Viability in Cultured Vascular Endothelial Cells. **Int. J. Mol. Sci.**, 13(12), 15867–80.
- Xie, X., Zhao, R., & Shen, G. X. (2012a). Impact of Cyanidin-3-Glucoside on Glycated LDL-Induced NADPH Oxidase Activation, Mitochondrial Dysfunction and Cell Viability in Cultured Vascular Endothelial Cells. **Int. J. Mol. Sci.**, 13(12): 15867–80.
- Xie, X., Zhao, R., & Shen, G. X. (2012b). Influence of delphinidin-3-glucoside on oxidized low-density lipoprotein-induced oxidative stress and apoptosis in cultured endothelial cells. **J. Agri. Food Chem.**, 60(7): 1850–6.
- Zucco, F.; De Angelis, I.; Testai, E.; Stamatii, A. (2004). Toxicology investigations with cell culture systems: 20 year after. **Toxicol. in Vitro**. 18: 153-163.

9. ANEXOS

9.1. Anexo I

Tabela 1. Conteúdo de compostos fenólicos totais dos diferentes extratos de casca de jabuticaba (*P. trunciflora*).

Concentração (p/v)	Processo de extração	Tempo de extração	Solvente	Polifenóis totais (mg EAG/g) *
5%	Ultrassom	2 horas	MeOH	14,05 ± 1,25 ^e
5%	Ultrassom	2 horas	EtOH	5,81 ± 0,27 ^a
5%	Ultrassom	2 horas	H ₂ O	11,18 ± 0,38 ^d
5%	Ultrassom	2 horas	MeOH:H ₂ O	8,10 ± 0,52 ^b
5%	Ultrassom	2 horas	EtOH:H ₂ O	7,02 ± 0,54 ^b
5%	Ultrassom	4 horas	MeOH	15,75 ± 1,36 ^e
5%	Ultrassom	4 horas	EtOH	7,45 ± 0,41 ^b
5%	Ultrassom	4 horas	H ₂ O	12,98 ± 0,33 ^d
5%	Ultrassom	4 horas	MeOH:H ₂ O	15,46 ± 1,99 ^e
5%	Ultrassom	4 horas	EtOH:H ₂ O	9,94 ± 0,68 ^c
5%	Extração por refluxo	15min	H ₂ O	19,56 ± 0,70 ^f
5%	Extração por refluxo	30min	H ₂ O	17,55 ± 0,30 ^e
10%	Extração por refluxo	15min	H ₂ O	10,32 ± 0,06 ^c
10%	Extração por refluxo	30min	H ₂ O	9,27 ± 0,08 ^c

* mg de equivalentes de ácido gálico (EAG)/g de casca. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa através da análise de variância (ANOVA) com pós-teste de Tukey. Significância estatística p<0,05.

9.2. Anexo II

Tabela 2. Conteúdo de compostos fenólicos totais dos diferentes extratos de polpa de jabuticaba (*P. trunciflora*).

Concentração (p/v)	Processo de extração	Tempo de extração	Solvente	Polifenóis totais (mg EAG/g)*
5%	Ultrassom	2 horas	MeOH	1,08 ± 0,06 ^c
5%	Ultrassom	2 horas	EtOH	0,89 ± 0,09 ^b
5%	Ultrassom	2 horas	H ₂ O	0,93 ± 0,01 ^b
5%	Ultrassom	2 horas	MeOH:H ₂ O (1:1)	1,24 ± 0,72 ^d
5%	Ultrassom	2 horas	EtOH:H ₂ O (1:1)	0,77 ± 0,02 ^a
5%	Ultrassom	4 horas	MeOH	1,26 ± 0,04 ^d
5%	Ultrassom	4 horas	EtOH	0,97 ± 0,02 ^b
5%	Ultrassom	4 horas	H ₂ O	0,98 ± 0,04 ^b
5%	Ultrassom	4 horas	MeOH:H ₂ O (1:1)	1,06 ± 0,03 ^c
5%	Ultrassom	4 horas	EtOH:H ₂ O (1:1)	0,71 ± 0,01 ^a
5%	Extração por refluxo	15min	H ₂ O	2,03 ± 0,05 ^g
5%	Extração por refluxo	30min	H ₂ O	1,76 ± 0,04 ^f
10%	Extração por refluxo	15min	H ₂ O	1,68 ± 0,05 ^f
10%	Extração por refluxo	30min	H ₂ O	1,77 ± 0,10 ^f

*mg de equivalentes de ácido gálico (EAG)/g de polpa. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa através da análise de variância (ANOVA) com pós-teste de Tukey. Significância estatística p<0,05.