

UNIVERSIDADE COMUNITÁRIA DA REGIÃO DE CHAPECÓ
Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais

Fernanda Kuhn

POTENCIAL ANTIOXIDANTE DA *Plinia trunciflora* (O. Berg) Kausel
SOBRE PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO EM *Rhamdia*
quelen

Chapecó – SC, 2014

UNIVERSIDADE COMUNITÁRIA DA REGIÃO DE CHAPECÓ
Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais

POTENCIAL ANTIOXIDANTE DA *Plinia trunciflora* (O. Berg) Kausel
SOBRE PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO EM *Rhamdia*
quelen

Fernanda Kuhn

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Universidade Comunitária da Região de Chapecó, como parte dos pré-requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais.

Orientador: Prof. Dr. Jacir Dal Magro

Chapecó – SC, 2014

Catálogo elaborado por
Joseana Foresti
CRB 14/536

K45p Khun, Fernanda
Potencial antioxidante da *Plinia trunciflora* (O. Berg)
Kausel sobre parâmetros de estresse oxidativo em *Rhamdia*
quelen / Fernanda Khun.-- 2014.
69 p.

Dissertação (mestrado em ciências ambientais) - Universidade
Comunitária da Região de Chapecó, 2014

1. Jundiá (Peixe). 2. Produtos naturais - Agentes
oxidantes. 3. Jabuticabeira. I. Dal Magro, Jacir.
II. Título.

ODD 21 -- 639.3



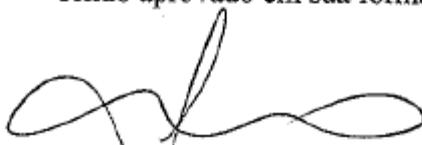
UNIVERSIDADE COMUNITÁRIA DA REGIÃO DE CHAPECÓ
Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais

POTENCIAL ANTIOXIDANTE DA *Plinia trunciflora* (O. Berg) Kausel
SOBRE PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO EM *Rhamdia*
quelen

Fernanda Kuhn

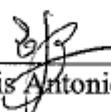
Esta dissertação foi julgada adequada para a obtenção do grau de

Mestre em Ciências Ambientais
sendo aprovado em sua forma final.

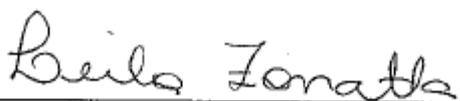


Prof. Jacir Dal Magro, Dr. em Química
Orientador

BANCA EXAMINADORA



Prof. Clovis Antonio Rodrigues, Dr. em Química



Prof. Leila Zanata, Dra. em Farmácia

Chapecó, 29 de agosto de 2014.

AGRADECIMENTOS

Dedico meus sinceros agradecimentos a todas as pessoas que, de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho.

Agradeço especialmente os professores Jacir Dal Magro, Angelo Piato e Greicy Conterato, por toda ajuda e pelos conhecimentos compartilhados durante a execução desse projeto.

À minha amiga, prima e irmã Aline Bohn, por ter estado sempre pronta para ajudar em todos os experimentos e bioensaios.

À amiga e colega Cássia Sachett pela ajuda nas análises e também pelas experiências de trabalho a mim repassadas.

À amiga Lucia Helena Medeiros, por todo o incentivo na conclusão dessa etapa.

Ao Professor Leonardo Barcellos e ao mestrando Murilo Sander de Abreu da Universidade de Passo Fundo; Aline Augusti Boligon e Margareth Linde Athayde da Universidade de Santa Maria pela disponibilidade e auxílio em algumas análises.

Agradeço também o oceanógrafo e pesquisador Osmar Tomazelli Jr, pela contribuição com as experiências vivenciadas na piscicultura, que foram de suma importância para o êxito na realização desse estudo.

E por fim, agradeço a Deus, por ter colocado essas pessoas no meu caminho.

Agradecimento em especial ao Fundo de Apoio à Manutenção e ao Desenvolvimento da Educação (FUMDES) pelo auxílio financeiro concedido.

É melhor tentar e falhar; que preocupar-se e ver a vida passar;
É melhor tentar ainda que em vão, que sentar-se fazendo nada até o final.
Eu prefiro na chuva caminhar, que em dias tristes em casa me esconder;
Prefiro ser feliz, embora louco, que em conformidade viver.

Martin Luther King

RESUMO

KUHN, Fernanda. **Potencial antioxidante da *Plinia trunciflora* (O. Berg) Kausel sobre parâmetros de estresse oxidativo em *Rhamdia quelen***. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós – Graduação em Ciências Ambientais. Universidade Comunitária da Região de Chapecó. 2014, 69 p.

O *Rhamdia quelen* é um peixe nativo que vem despontando como um dos mais promissores para ser cultivado em função da sua resistência ao manejo, crescimento acelerado, inclusive no inverno e boa eficiência alimentar. Porém, com a intensificação dos sistemas de cultivo, os peixes são expostos a condições de estresse, podendo ocasionar patologias e problemas relacionados à deterioração ambiental. O uso de produtos naturais pode permitir que os animais superem de maneira saudável e sem danos, as condições adversas que estão frequentemente sujeitos, resistindo às práticas de manejo. Dessa forma, os extratos vegetais podem contribuir para uma aquicultura sustentável, através do controle de doenças com produtos biodegradáveis. Nesse contexto, destaca-se a jabuticaba, fruta nativa do Brasil, pertencente à família Myrtaceae que tem sido alvo de inúmeros estudos científicos por apresentar elevada atividade antioxidante devido principalmente ao seu conteúdo significativo de antocianinas. No entanto, investigações do potencial antioxidante da espécie *Plinia trunciflora* ainda são escassos. Portanto, o presente trabalho teve por objetivo avaliar o potencial antioxidante do extrato de *Plinia trunciflora* na proteção contra o estresse oxidativo em jundiá (*Rhamdia quelen*) submetidos ao modelo de estresse de perseguição por rede. Inicialmente, foram quantificados os teores de polifenóis totais e antocianinas por espectrofotometria e por CLAE em diferentes extratos de jabuticaba (aquoso, etanólico 99% e hidroalcoólico 70%), bem como seu potencial antioxidante medido através da captura dos radicais sintéticos ABTS e DPPH. O extrato hidroalcoólico 70% apresentou o maior conteúdo de polifenóis totais e antocianinas e conseqüentemente a maior atividade antioxidante. Esse extrato foi posteriormente incorporado na ração e administrado aos jundiás por 15 dias. Após esse período, os animais foram submetidos a um protocolo de estresse agudo (perseguição por rede). Após a eutanásia dos animais avaliou-se as atividades das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutatona S- transferase (GST) hepáticas. Os níveis de cortisol, peroxidação lipídica (TBARS) e tióis não proteicos hepáticos também foram

avaliados. Constatou-se que o extrato hidroalcoólico 70% de *Plinia trunciflora* preveniu o dano oxidativo em jundiás expostos a um fator físico de estresse.

Palavras-chave: Produtos naturais. *Plinia trunciflora* (O. Berg) Kausel. Atividade antioxidante. Estresse oxidativo. *Rhamdia quelen*.

ABSTRACT

KUHN, Fernanda. **Antioxidant potential of *Plinia trunciflora* (O. Berg) Kausel on oxidative stress parameters in *Rhamdia quelen*.** Dissertation (Master). Post – Graduation in Environmental Sciences. Universidade Comunitária da Região de Chapecó. 2014, 69 p.

The *Rhamdia quelen* is a native fish that has been emerging as one of the most promising to be cultivated due to its resistance management, accelerated growth, even in the winter and good feed efficiency. However, with the intensification of farming systems, fish are exposed to stress conditions, which may cause diseases and problems related to environmental deterioration. The use of natural products can allow animals to overcome healthily and without damage, adverse conditions that are often subject, resisting management practices. Thus, the plant extracts may contribute to a sustainable aquaculture through control of diseases with biodegradable products. In this context, there is jabuticaba, fruit native to Brazil, belonging to the *Myrtaceae* family that has been the subject of numerous scientific studies by presenting antioxidant activity mainly due to its significant content of anthocyanins. However, investigations of the antioxidant potential of *Plinia trunciflora* are still scarce. Therefore, this study aimed to evaluate the antioxidant potential of the extract *Plinia trunciflora* in protecting against oxidative stress in *Rhamdia quelen* subjected to the stress of persecution by network model. Initially, the contents of total polyphenols and anthocyanins were quantified by spectrophotometry and by HPLC in different extracts Jabuticaba (aqueous, ethanolic 99% and hydroalcoholic 70%), as well as its antioxidant potential measured by capturing the synthetic DPPH and ABTS radicals. The hydroalcoholic extract 70% had the highest content of total polyphenols and anthocyanins and consequently the highest antioxidant activity. This extract was subsequently incorporated into the diet and administered for 15 days to the catfishes. After this period, the animals were submitted to a protocol of acute stress (persecution network). After animals euthanasia the activities of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione S-transferase (GST) from liver was assessed. Cortisol levels, lipid peroxidation (TBARS) and hepatic non-protein thiols were also evaluated. It was found that 70% alcoholic extract of *Plinia trunciflora* prevented oxidative damage in silver catfish exposed to a physical stressor.

Keywords: Natural products. *Plinia trunciflora* (O. Berg) Kausel. Antioxidant activity. Oxidative stress. *Rhamdia quelen*.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Figura 1 – Produção de ERO e níveis de estresse oxidativo	6
Figura 2 – Principais classes de flavonoides	10
Figura 3 – Estrutura química e ocorrência das principais antocianidinas.....	12

CAPÍTULO II

Figura 1 - Perfil cromatográfico dos padrões de antocianinas e dos extratos de <i>Plinia trunciflora</i> . Cianidina (pico 1), malvidina (pico 2), delphinidina 3- <i>O</i> -glicosídeo (pico 3), cianidina 3- <i>O</i> -glicosídeo (pico 4) e malvidina 3- <i>O</i> -glicosídeo (pico 5).....	28
Figura 2 - Percentual de atividade antioxidante dos diferentes extratos de <i>Plinia trunciflora</i> medido através do método de captura do radical DPPH. Médias seguidas da mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Os valores representam a média \pm o desvio padrão.....	32
Figura 3 - Percentual de atividade antioxidante dos diferentes extratos de <i>Plinia trunciflora</i> medido através do método de captura do radical ABTS. Médias seguidas da mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Os valores representam a média \pm o desvio padrão.....	32

CAPÍTULO III

Figura 1: Níveis de cortisol em juvenis de <i>Rhamdia quelen</i> tratados com extrato de <i>Plinia trunciflora</i> . Os valores são expressos como média \pm desvio padrão (n=8). Letras diferentes representam diferença estatística ($p < 0,05$).....	45
---	----

Figura 2: Níveis de TBARS (nmol MDA. mg⁻¹ de proteína) em juvenis de *Rhamdia quelen* tratados com extrato de *Plinia trunciflora*. Os valores são expressos como média ± desvio padrão (n=8). Letras diferentes representam diferença estatística (p <0,05).....47

Figura 3: Atividade da Superóxido dismutase (SOD, U SOD mg proteína⁻¹), Catalase (CAT, K g proteína⁻¹), Glutathione- S- transferase (GST, nmol CDNB min mg proteina⁻¹) e níveis de Tióis não proteicos (SHNP, nmol mg proteína⁻¹) em juvenis de *Rhamdia quelen* tratados com extrato de *Plinia trunciflora*. Os valores são expressos como média ± desvio padrão (n=8). Letras diferentes representam diferença estatística (p <0,05).....49

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II

Tabela 1 - Polifenóis totais e antocianinas nos diferentes extratos de jabuticaba (<i>Plinia trunciflora</i>).....	26
Tabela 2 - Quantificação por CLAE das antocianinas presentes nos diferentes extratos de <i>Plinia trunciflora</i>	30
Tabela 3: EC ₅₀ dos diferentes extratos de <i>Plinia trunciflora</i>	34

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABTS - 2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)

CAT - Catalase

CDNB - 1 cloro 2-4 dinitro benzeno

CLAE - Cromatografia líquida de alta eficiência

DPPH - 1,1-Diphenyl-2-2picrylhydrazil radical

DTNB - 5,5-ditiobis-(2-ácido nitrobenzóico)

EAG - Equivalentes de ácido gálico

EROs - Espécies reativas de oxigênio

GST - Glutathione – S- transferase

GPx - Glutathione peroxidase

GR - Glutathione reductase

GSH - Glutathione

H₂O₂ - Peróxido de hidrogênio

MDA - Malondialdeído

MPA - Ministério da Pesca e Aquicultura

O₂^{•-} - Ânion superóxido

•OH - Radical hidroxil

PBS - Tampão fosfato

pH - Potencial hidrogeniônico

ROO[•] - Hidroperoxila

SOD - Superóxido dismutase

SHNP - Tióis não proteicos

TBA - Ácido tiobarbitúrico

TBARS - Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

SUMÁRIO

CAPÍTULO I	1
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS	3
2.1. Objetivo geral	3
2.2. Objetivos específicos	3
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
3.1. Jundiá (<i>Rhamdia quelen</i>)	4
3.2. Estresse oxidativo e Espécies Reativas de Oxigênio (EROs)	5
3.3. Defesas antioxidantes enzimáticas	7
3.4. Agentes antioxidantes: Compostos fenólicos	9
3.5. Jabuticaba <i>Plinia trunciflora</i> (O. Berg) Kausel.....	13
4. REFERÊNCIAS	14
CAPÍTULO II - AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE <i>IN VITRO</i> DE DIFERENTES EXTRATOS DE <i>Plinia trunciflora</i> (O. Berg) Kausel	20
1. INTRODUÇÃO.....	20
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	21
2.1. Coleta dos frutos e elaboração dos extratos.....	21
2.2. Determinação dos polifenóis totais nos extratos de jabuticaba	22
2.3. Análise do teor de antocianinas monoméricas nos extratos de jabuticaba.....	23
2.4. Quantificação e identificação das antocianinas por cromatografia líquida de alta eficiência com arranjo de diodo (CLAE)	23
2.5. Avaliação do potencial antioxidante <i>in vitro</i> dos extratos de jabuticaba	24
2.5.1. Monitoramento da atividade sequestrante do radical DPPH.....	24
2.5.2. Monitoramento da atividade sequestrante do radical ABTS.....	25
2.6. Análises estatísticas	25
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
3.1. Polifenóis totais e antocianinas monoméricas quantificadas por espectrofotometria	26
3.2. Quantificação e identificação das antocianinas por CLAE	28
3.3. Atividade antioxidante <i>in vitro</i>	31
4. CONCLUSÃO.....	35

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	35
-------------------------------------	----

CAPÍTULO III – POTENCIAL ANTIOXIDANTE DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE <i>Plinia trunciflora</i> (O. Berg) Kausel NA PREVENÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO EM <i>Rhamdia quelen</i>.....	39
1. INTRODUÇÃO.....	39
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	40
2.1. Animais	40
2.2. Delineamento experimental.....	41
2.3. Bioensaio e tratamentos.....	41
2.4. Protocolo de estresse	42
2.5. Dosagem dos níveis de cortisol	42
2.6. Dosagem de proteínas	43
2.7. Avaliação da peroxidação lipídica tecidual (TBARS)	43
2.8. Avaliação do sistema de defesa antioxidante enzimático.....	43
2.8.1. Superóxido dismutase (SOD)	43
2.8.2. Glutationa S-transferase (GST)	44
2.8.3. Catalase (CAT).....	44
2.9. Avaliação do sistema de defesa não enzimático.....	44
2.9.1. Tióis não-proteicos (SHNP)	44
2.10. Análises estatísticas	45
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
3.1. Níveis de cortisol.....	45
3.2. Peroxidação lipídica tecidual (TBARS)	47
3.3. Sistema de defesa antioxidante	48
4. CONCLUSÃO	51
5. REFERÊNCIAS	51

CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO

De acordo com dados estatísticos do Ministério da Pesca e Aquicultura (MPA), em 2011 a Região Sul foi novamente a que assinalou a maior produção de pescado do país, com 153.674,5 t, respondendo por 28,2% da produção nacional nessa modalidade. A análise da produção nacional de pescado por Unidade da Federação demonstrou que o Estado do Paraná é o maior produtor de pescado continental do Brasil, com 73.831,1 t, seguido pelos estados, de Santa Catarina com 53.641,8 t e Mato Grosso com 48.748,3 t (BRASIL, 2012).

A piscicultura Catarinense tem crescido significativamente nos últimos anos e historicamente, a maior parte dos cultivos é feito em pequenas propriedades familiares, mas que no seu somatório resultaram em uma produção de 34.609 toneladas de peixes em 2012. Tal quantidade de peixes equivale ao montante aproximado de R\$ 11.247.925,00 (média de R\$ 3,25 por kg de peixe) direto aos produtores. Além da tilápia, outro peixe que vem se destacando e sua produção crescendo ano a ano é o peixe nativo jundiá (*Rhamdia quelen*). Possui condições de atender a um mercado exigente pelas excelentes qualidades apresentadas, como ótimo sabor, baixo nível de gordura, altos índices de ômega 3, carne branca e sem espinhas no filé já desponta como altamente promissor em termos de retorno para o produtor (EPAGRI/CEDAP, 2013).

O jundiá é um peixe de água doce e sua distribuição compreende desde o centro da Argentina até o sul do México. A espécie se caracteriza por apresentar um bom desempenho de crescimento e boa fecundidade em criações intensivas, além disso, adapta-se facilmente ao manejo reprodutivo (SANTOS, 2002).

Com a intensificação dos sistemas de cultivo, os peixes são expostos a condições de estresse, podendo ocasionar patologias e problemas relacionados à deterioração ambiental (BALCÁZAR *et al.*, 2006). O ambiente aquático é extremamente dinâmico e os animais que vivem nesse ambiente enfrentam alterações dificilmente enfrentadas pelos animais terrestres como mudanças rápidas ou extremas na concentração de O₂ dissolvido, pH e salinidade, o que pode ocasionar estresse e alterar a homeostase. Os agentes estressores podem ser de natureza química, como por exemplo, concentração elevada de amônia e nitrito, decorrente da degradação da matéria orgânica, redução da concentração de O₂ dissolvido, poluentes

orgânicos e inorgânicos. Podem também ser resultantes de atividades agroindustriais; ou podem ser de natureza física, como alta densidade populacional, confinamento, captura ou mudanças no ambiente físico, como a redução do nível de água nos corpos d' água. Os fatores estressantes tem sido a principal causa das perdas de lucros na piscicultura, pois afetam o metabolismo e, conseqüentemente, o crescimento dos peixes (MARIANO *et al.*, 2009 a).

O termo estresse tem sido utilizado para caracterizar um estado de ameaça a homeostase causada por um estímulo estressante, podendo causar distúrbios fisiológicos, bioquímicos ou morfológicos. O estresse é caracterizado também como uma resposta comportamental geral na qual há reações motoras e neurovegetativas mediadas pelo sistema neuro-endócrino (PICKERING, 1981; WENDELAAR BONGA, 1997). Já o estresse oxidativo é uma condição ocasionada pelo aumento da geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) e outros compostos oxidantes, através do acúmulo de intermediários reativos, em prejuízo do sistema de defesa antioxidante e incapacidade para reparar o dano oxidativo (OBA *et al.*, 2009).

Neste contexto, a utilização de antioxidantes naturais pode permitir que os animais superem de maneira natural e sem danos as condições adversas a que estão sujeitos, resistindo às práticas de manejo (MONTEIRO *et al.*, 2007). Dessa forma, os extratos vegetais podem contribuir para uma aquicultura sustentável, através do controle de patologias com produtos biodegradáveis, diminuindo conseqüentemente o uso de produtos químicos prejudiciais ao homem e ao meio ambiente (GALINA *et al.*, 2009).

O poder antioxidante de uma planta, por exemplo, pode ser atribuído ao conteúdo de compostos fenólicos. Os compostos fenólicos são incluídos na categoria de interruptores de radicais livres, sendo muito eficientes na prevenção da autoxidação dos lipídios. Além da captura de radicais livres, esses compostos podem atuar como quelantes de metais, agindo tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo (SHAHIDI *et al.*, 1992).

A jabuticaba destaca-se como uma importante fonte natural de compostos fenólicos. Vários estudos já demonstraram que os frutos de diferentes espécies de jabuticaba (*Myrciaria cauliflora*, *Myrciaria jaboticaba*) apresentam atividade antioxidante significativa devido principalmente ao conteúdo de antocianinas, classe de compostos fenólicos majoritários presentes na casca do fruto (EINBOND *et al.*, 2004; REYNERTSON *et al.*, 2005; REYNERTSON *et al.*, 2008; TERCIO 2004). No entanto, ainda não existem estudos quantificando esses compostos, nem avaliando a atividade antioxidante da *Plinia trunciflora* em modelos de indução de estresse em animais.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial antioxidante do extrato de jabuticaba (*Plinia trunciflora*) em juvenis de jundiá (*Rhamdia quelen*) submetidos a um protocolo de estresse.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Produzir extratos de jabuticaba (*Plinia trunciflora*) utilizando diferentes métodos de extração;
- Determinar o teor de compostos fenólicos totais e antocianinas monoméricas dos extratos de jabuticaba;
- Quantificar e identificar as antocianinas presentes nos diferentes extratos de jabuticaba através da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE);
- Avaliar o potencial antioxidante *in vitro* dos extratos de jabuticaba através dos testes de captura dos radicais DPPH e ABTS;
- Avaliar o efeito do extrato de jabuticaba sobre os níveis de cortisol em juvenis de *Rhamdia quelen* submetidos a um protocolo de estresse por perseguição com rede;
- Avaliar o potencial antioxidante *in vivo* do extrato de jabuticaba através da medida dos níveis de peroxidação lipídica (TBARS), das defesas antioxidantes enzimáticas catalase (CAT), glutathione S-transferase (GST) e superóxido dismutase (SOD) e das defesas não enzimáticas (tióis não-proteicos) no fígado de juvenis de *Rhamdia quelen* submetidos a um protocolo de estresse por perseguição com rede.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Jundiá (*Rhamdia quelen*)

O jundiá é um peixe comumente encontrado na região do sul da América do Sul. Habita lagos e poços fundos dos rios, preferindo os ambientes de águas mais calmas com fundo de areia e lama, junto às margens e vegetação. Escondem-se entre pedras e troncos, de onde saem à noite à procura de alimento. Em experimentos com larvas e alevinos dessa espécie em cativeiro, observou-se uma acentuada aversão à luz e busca por locais escuros (PIAIA *et al.*, 1999).

Essa espécie pode atingir 50 cm de comprimento e 3 kg de peso. Os alevinos suportam água do mar a 10%, até 9,0 g/L de sal comum e pH na faixa de 4,0 a 8,5, com melhor crescimento das larvas na faixa de pH de 8,0 a 8,5. É uma espécie euritérmica, omnívora e com tendência piscívora. A maturidade sexual é atingida no primeiro ano de vida. Na natureza, os cardumes desovam em locais com água limpa, calma e de fundo pedregoso. Não apresenta cuidado parental. Possui dois picos reprodutivos por ano (um no verão e outro na primavera) e desova múltipla. O jundiá apresenta uma alta taxa prolífica e ganho de peso elevado, principalmente nos meses mais quentes. Devido a estas características, esse peixe vem sendo intensivamente cultivado (GOMES *et al.*, 2000).

A sequência mais viável para a cultura do jundiá é viveiro, incubadora (1-2 a 10 g), e terminação (600-800 g) (BARCELLOS *et al.*, 2004). O período de envio, que é o tempo decorrido entre a captura em tanques berçário e transferência para os tanques interiores até a venda e expedição para fazendas de peixes, geralmente dura 10 dias e durante esse tempo, além de mudanças na dieta (de plâncton para alimentação artificial) o jundiá é mantido em altas densidades (BARCELLOS *et al.*, 2009).

Tendo como modelo o *catfish* (*Ictalurus punctatus*), o jundiá está demonstrando ter uma habilidade de altas produções em monocultivo com alta densidade. Pesquisas tem demonstrado que densidades de até três unidades por metro quadrado tem rendido à espécie uma oportunidade de demonstrar sua rusticidade e crescimento em alta densidade (GRAEFF, 2013).

A produção de jundiá vem crescendo a cada ano não só pelas suas vantagens zootécnicas, mas também pelas pesquisas, experimentos e ações de extensão realizadas. É

importante ressaltar duas vantagens importantes para o cultivo do jundiá: a econômica e a ambiental. O rendimento dos filés, próximo a 50%, é bem acima do rendimento do filé de tilápia, a principal espécie de água doce produzida no Brasil. O potencial zootécnico do jundiá o habilita a se tornar a principal espécie nativa de água doce a ser produzida na região Sul. Vale ressaltar que até o ano de 2007, nos levantamentos anuais de peixes comercializados no estado de Santa Catarina, o jundiá não participava das estatísticas. Atualmente, no último levantamento realizado no ano de 2012, participou com cerca de 1,9% do total produzido pelo estado, sendo a espécie nativa mais cultivada (AMARAL JÚNIOR, 2013; EPAGRI/ CEDAP, 2013).

3.2. Estresse oxidativo e Espécies reativas de oxigênio (EROs)

Todos os organismos aeróbios enfrentam a necessidade de lidar com as espécies reativas de oxigênio (EROs), moléculas quimicamente reativas que contém oxigênio. Estas são formadas como um subproduto natural do metabolismo normal do oxigênio e tem um importante papel na sinalização celular e homeostase. No entanto, durante períodos de estresse ambiental os níveis de EROs podem aumentar drasticamente. Quando a produção e acumulação de EROs estão além da capacidade do organismo para eliminar essas espécies reativas ocorre o estresse oxidativo (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999).

Espécies reativas de oxigênio tais como radical hidroxila ($\bullet\text{OH}$), ânion radical superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) e hidroperoxila ($\text{ROO}\bullet$), além de causar danos ao DNA, podem oxidar lipídios e proteínas. As EROs atacam as cadeias de ácidos graxos poli-insaturados dos fosfolipídios e o colesterol, abstraindo um hidrogênio do grupo metileno bis-aliílico, iniciando assim o processo de peroxidação lipídica nas membranas celulares. Os radicais de carbono formados podem reagir com oxigênio originando radicais peroxila, que por sua vez podem atacar novas cadeias de ácidos graxos poli-insaturados, propagando a reação. O resultado deste processo é a oxidação de várias moléculas de ácidos graxos (VALKO *et al.*, 2004; HASLAM, 1996).

O desenvolvimento do estresse oxidativo, fontes celulares de EROs e os sistemas antioxidantes serão analisados a seguir. A apresentação esquemática do estresse oxidativo é mostrada na Figura 1. Sob condições normais, o nível de EROs é estabilizado pelo equilíbrio entre sua produção e eliminação. Quando, o nível de EROs é aumentado e se contrabalançado por antioxidantes, retorna rapidamente ao intervalo inicial. Estes eventos são chamados de

"estresse oxidativo agudo". No entanto, se a eficiência do sistema antioxidante não é suficientemente elevada para diminuir o nível de EROs para a concentração estacionária inicial, esse nível pode ser mantido por períodos mais longos (chamado "estresse oxidativo crônico") e apenas o aumento da eficiência do sistema antioxidante pode retornar o sistema ao estado inicial. Em algumas circunstâncias, o sistema perturbado não retorna ao nível de EROs inicial (estado estacionário) e é estabilizado a um nível de EROs maior chamado de "quase-estacionário" (LUSHCHAK, 2011).

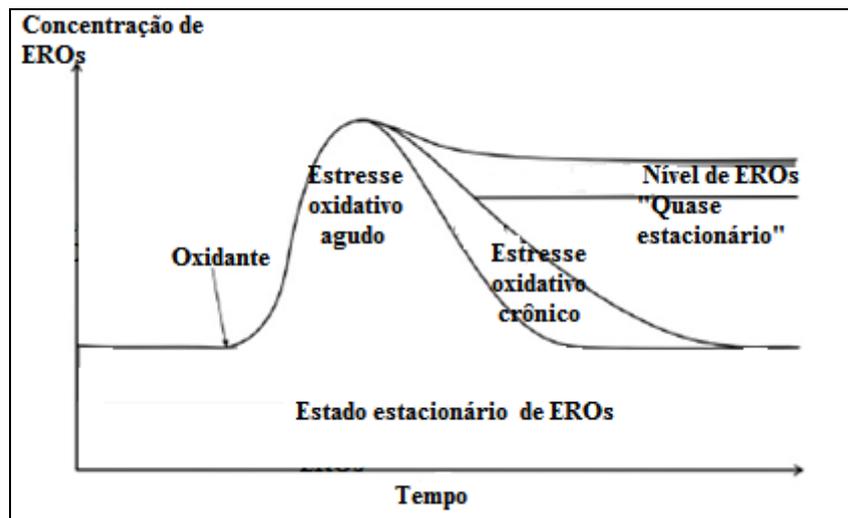


Figura 1: Produção de EROs e níveis de estresse oxidativo

Fonte: LUSHCHAK (2011)

Muitos fatores podem determinar a resposta do sistema neuro - endócrino a estímulos estressantes, gerando variabilidade na resposta ao estresse. As causas de tais variabilidades podem ser devido a processos adquiridos ao longo da vida do indivíduo, a ajustes às particularidades do ambiente e desenvolvimento do animal e evolutivas, ou seja, adaptações geneticamente estruturadas (VIGAS, 1980; PICKERING, 1981).

O ambiente aquático é extremamente dinâmico e os animais que vivem nesse ambiente enfrentam alterações ambientais dificilmente enfrentadas pelos animais terrestres como mudanças rápidas ou extremas na concentração de O_2 dissolvido, pH e salinidade, o que pode ocasionar estresse e alterar a homeostase (OBA *et al.*, 2009).

Uma grande variedade de organismos vivos, incluindo as bactérias tem a capacidade de responder aos níveis elevados de EROs, com um aumento nos níveis de glutathione intracelular ou com aumento da expressão de proteínas - enzimas com a capacidade de

eliminação de EROs. Este processo é conhecido como “resposta ao estresse oxidativo” (DROGE, 2002).

3.3. Defesas antioxidantes enzimáticas

Para combater o estresse oxidativo, os organismos aeróbios desenvolveram mecanismos de defesas antioxidantes, que podem ser produzidas endogenamente ou serem adquiridas através da dieta. As principais enzimas antioxidantes são a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GR) e glutathione S-transferase (GST), todas elas abundantes nos tecidos de peixes (STOREY, 1996; VAN DER OOST *et al.*, 2003).

A enzima catalase, um componente de defesa antioxidante primário, exerce duas funções importantes: a decomposição de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em água e oxigênio ($H_2O + O_2$) e a oxidação de compostos hidrogenados, como metanol, etanol, ácido fórmico, fenóis, com o consumo de um mol de peróxido (AEBI, 1984). Muitas reações de degradação dos aminoácidos e gorduras, ocasionadas pelo estresse oxidativo, produzem radicais livres e peróxidos de hidrogênio, espécies altamente reativas capazes de lesar a “maquinaria” celular. A maneira que a célula encontrou para se defender desses produtos foi a formação de peroxissomos, pequenas vesículas envoltas por membrana, onde ocorrem as reações devido a grande quantidade de catalase, como citado por Lehninger *et al.* (1995).

A atividade da catalase é importante para o monitoramento, por ser uma enzima que apresenta elevada atividade quando o organismo se encontra em estresse oxidativo. É encontrada no sangue, medula óssea, mucosas, rim e fígado. Em modelos de estresse oxidativo decorrente de agressão térmica, os eritrócitos exibem diminuição da atividade da catalase durante o processo hemolítico termo dependente (FERREIRA; MATSUBARA, 1997). Muitos estudos sugerem que a catalase é mais efetiva para controlar o estresse oxidativo quando as concentrações intracelulares de H_2O_2 são muito elevadas. Pequenos aumentos no H_2O_2 parecem ser mais bem controlados pela glutathione peroxidase (GPx) (HERMES-LIMA, 2004).

Como as catalases estão localizadas nos peroxissomos da maioria das células e estão envolvidas no metabolismo dos ácidos graxos, alterações na sua atividade, principalmente no fígado, podem ser de difícil interpretação. Por isso, a atividade catalásica nos eritrócitos pode

ser um marcador mais apropriado para a exposição oxidante em peixes (STEGEMAN *et al.*, 1992).

A atividade dessa enzima também se correlaciona com os hábitos alimentares dos peixes, e, diferentemente do que acontece com a SOD, a atividade da CAT tende a ser menor nos herbívoros do que nos onívoros (LACKNER, 1998).

A SOD corresponde a uma família de enzimas com diferentes grupos prostéticos em sua composição. A forma CuZn-SOD está presente, principalmente, no citosol e meio extracelular, enquanto que a Mn-SOD está localizada, principalmente, na mitocôndria. Esta enzima tem um papel antioxidante, pois catalisa a dismutação do O_2^- em H_2O_2 . Durante o processo hemolítico decorrente de agressão térmica, os glóbulos vermelhos exibem queda da atividade de SOD (BARTOSZ *et. al.*, 1978; HATHERILL, *et. al.*, 1991). A adição desta enzima também protege o DNA de lesões provocadas pela sobrecarga de Fe^{+++} . A SOD apresenta um grande potencial como biomarcador (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

A superóxido dismutase mostra grandes diferenças em atividade entre tecidos e espécies de peixes. Sua atividade é maior em peixes marinhos, em comparação com peixes de água doce (WILHELM FILHO, 1996); peixes herbívoros também apresentam maior atividade dessa enzima (LACKNER, 1998). Em relação à presença de contaminantes, vários trabalhos mostram que a atividade da SOD tende a ser maior em peixes de locais poluídos, sugerindo que sua atividade pode ser usada para medir a severidade do impacto ambiental. Ela é induzida muito rapidamente, dentro de poucas horas, especialmente se a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) não for muito alta (VAN DER OOST *et al.*, 2003).

Em meio ácido, o O_2^- rapidamente forma o H_2O_2 , já em meio neutro ou pH alto a dismutação do O_2^- é catalisada pela SOD (GREGORY; FRIDOVICH, 1973; FRIDOVICH, 1978, 1995). Mariano (2009 b) estudou as defesas antioxidantes e o possível estresse oxidativo em *H. unitaeniatus* após exposição ao ar atmosférico e subsequente retorno ao ambiente aquático e verificou que a diminuição da SOD tanto no fígado quanto no plasma apresentada em todos os grupos a partir de 6 horas de exposição ao ar e nos grupos de recuperação pode ter sido influenciada pela diminuição do pH, pois como a conversão O_2^- a H_2O_2 poderia ter acontecido pela acidez do meio, a SOD teve sua atividade reduzida neste processo.

A principal peroxidase de peixes é a glutathiona peroxidase (GPx), esta enzima é largamente utilizada como biomarcadora, o que demonstra a obtenção de resultados expressivos em diversas situações de estresse. A GPx pode estar localizada no citosol, bem como na matriz mitocondrial, e divide com a catalase a habilidade para detoxificar o peróxido

de hidrogênio (H_2O_2). Entretanto, como a catalase está geralmente restrita aos peroxissomos, os peróxidos da matriz citoplasmática e mitocôndrias são então detoxificados pela GPx, embora a atividade da GPx tecidual corresponda a um milésimo da atividade da catalase (LACKNER, 1998).

As glutatonas S-transferases (GSTs) representam uma importante família de enzimas, primariamente citosólicas, que catalisam a conjugação de vários compostos com o tripeptídeo glutatona. Essas proteínas também desempenham papéis adicionais no processo de detoxificação. As GSTs solúveis aumentam a disponibilidade de agentes tóxicos lipofílicos para as enzimas de fase I, servindo como proteínas carreadoras. Também, por meio de ligações covalentes com os compostos tóxicos, as GSTs reduzem a probabilidade desses compostos se ligarem a outras macromoléculas celulares, como o DNA. O fígado é a principal fonte de GST em peixes (STEGEMAN *et al.*, 1992).

3.4. Agentes antioxidantes não enzimáticos: Compostos fenólicos

Os organismos vivos estão constantemente sujeitos à ação oxidativa do oxigênio, sendo que diversos estudos têm demonstrado que o consumo de substâncias antioxidantes na dieta diária pode produzir uma ação protetora efetiva contra estes processos oxidativos que ocorrem no organismo (DEGÁSPARI *et al.*, 2004).

Os antioxidantes podem ser definidos como substâncias que em pequenas concentrações, em comparação ao substrato oxidável, retardam ou previnem significativamente o início ou a propagação da cadeia de reações de oxidação. Estes compostos inibem não só a peroxidação dos lipídios, mas também, a oxidação de outras moléculas, como proteínas, DNA, entre outras (HALLIWELL, 1995).

Compostos fenólicos pertencem a uma classe de compostos que inclui uma grande diversidade de estruturas simples e complexas, que possuem pelo menos um anel aromático no qual, ao menos, um hidrogênio é substituído por um grupamento hidroxila. Estão amplamente distribuídos no reino vegetal e nos microrganismos, fazendo parte também do metabolismo animal. Dentre os compostos fenólicos pertencentes ao metabolismo secundário das plantas são encontradas estruturas tão variadas quanto a dos ácidos fenólicos, dos derivados da cumarina, dos pigmentos hidrossolúveis das flores, dos frutos e das folhas. Além disso, essa classe de compostos abrange as ligninas e os taninos, polímeros com importantes

funções nos vegetais. Ainda, estruturas fenólicas são encontradas fazendo parte de proteínas, alcalóides e terpenóides (CARVALHO *et al.*, 2001).

Os flavonoides constituem o grupo mais representativo dos antioxidantes vegetais, encontrados com ampla diversidade de formas, sendo representado por mais de 4000 compostos fenólicos incluindo subgrupos: flavonóis, flavanonas, antocianinas, flavononas e flavanóis, como mostra a Figura 2 (BOVERIS *et al.*, 2001).

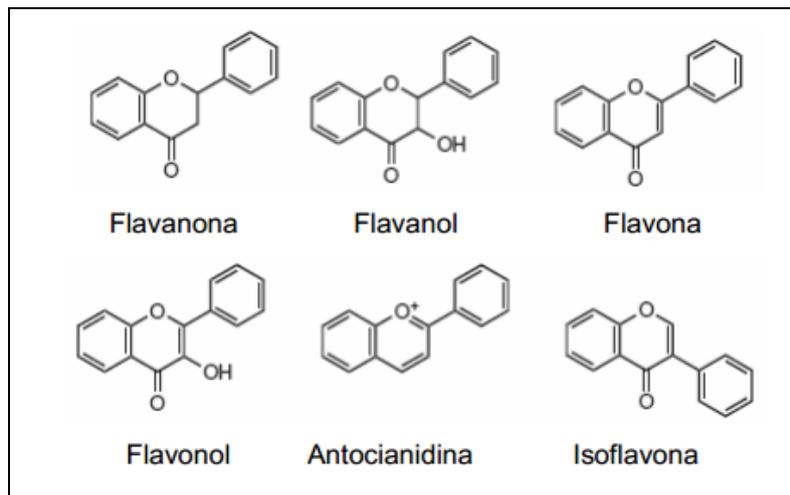


Figura 2: Principais classes de flavonoides

Fonte: SHAHIDI; NACZK (2004)

A distribuição dos flavonoides nos vegetais depende de diversos fatores de acordo com o filo/ordem/família do vegetal, bem como da variação das espécies. Os padrões de distribuição dependem do grau de acesso à luminosidade, especialmente raios ultravioletas B, pois a formação dos flavonóides é acelerada pela luz. Conseqüentemente, plantas cultivadas em estufas, nas quais os raios ultravioletas são bloqueados o conteúdo de flavonoides é reduzido (SELLAPPAN *et al.*, 2002).

Os efeitos bioquímicos e farmacológicos dos flavonoides são muito vastos, dentre estes se destacam as ações antioxidante, anti-inflamatória e antiplaquetária, além do efeito antialérgico. Eles podem inibir enzimas destacando-se a prostaglandina sintetase, a lipooxigenase e a ciclooxigenase, todas relacionadas diretamente com a tumorgênese. Também têm o poder de induzir enzimas do sistema desintoxicante como a glutathione S-transferase. Os flavonoides atuam como antioxidantes na inativação dos radicais livres, em ambos os compartimentos celulares, lipofílico e hidrofílico. Esses compostos têm a

capacidade de doar átomos de hidrogênio e, portanto, inibir as reações em cadeia provocadas pelos radicais livres (DEGÁSPARI *et al.*, 2004).

Os perfis fenólicos presentes em plantas superiores são, portanto, o resultado de processos longos e complexos de evolução e coevolução. É evidente que a regulação de sua síntese envolve mecanismos muito sofisticados de condução e controle preciso da produção de moléculas específicas no lugar certo e na hora certa ou em resposta a estímulos ambientais (BOUDET, 2007).

O mecanismo de ação dos antioxidantes, presentes em extratos de plantas, possui um papel importante na redução da oxidação lipídica em tecidos, vegetal e animal e quando incorporados na alimentação não conservam apenas a qualidade do alimento, mas também reduzem o risco de desenvolvimento de patologias (PIMENTEL *et al.*, 2005).

Compostos fenólicos como flavonoides, os quais estão presentes nas frutas e vegetais podem auxiliar na prevenção de danos oxidativos agindo como antioxidantes, capturando radicais livres, inibindo ou ativando enzimas, ou ainda, através da quelação de metais de transição (YI *et al.*, 2005).

Antocianinas constituem um grupo de pigmentos solúveis em água responsável pela maioria das cores vermelha, laranja e azul de flores, frutas e vegetais. Com a mesma origem biossintética dos outros flavonoides naturais, as antocianinas estão estruturalmente caracterizadas pela presença do esqueleto contendo 15 átomos de carbono na forma C₆-C₃-C₆, porém ao contrário dos outros flavonoides, as antocianinas absorvem fortemente na região visível do espectro, conferindo uma infinidade de cores, dependendo do meio de ocorrência. As antocianinas mais comumente encontradas em frutas são derivadas principalmente de seis antocianidinas: pelargonidina, cianidina, delphinidina, peonidina, petunidina e malvidina (BROUILLARD, 1983; TIMBERLAKE; BRIDLE, 1975).

A antocianidina, isto é, a antocianina sem a molécula de açúcar (Figura 3), é conhecida pelo nome de aglicona ou cation flavílio. A deficiência eletrônica do cation flavílio faz com que as antocianidinas sejam muito reativas e não existam naturalmente, estando sempre esterificadas com uma ou mais moléculas de açúcar que lhes conferem estabilidade, sendo este complexo o que recebe o nome de antocianina. Assim, uma antocianina é formada por uma aglicona (antocianidina) esterificada por uma ou mais moléculas de açúcar. Estas são as formas que existem na natureza (FURTADO *et al.*, 1993)

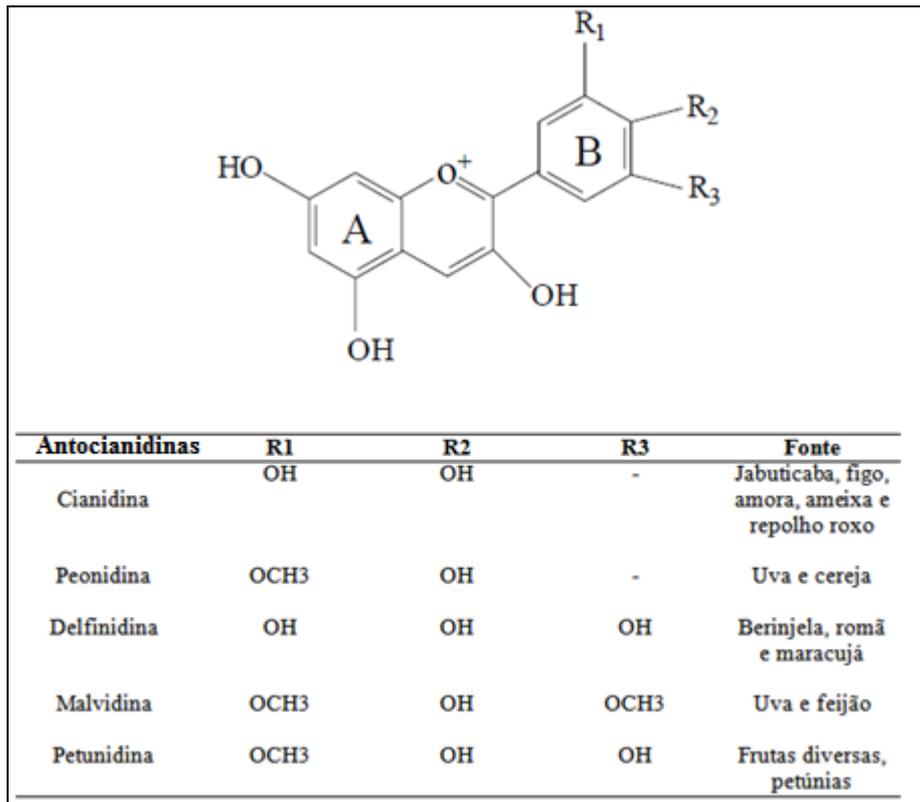


Figura 3: Estrutura química e ocorrência das principais antocianidinas

Fonte: JACKSON (1994); BOBBIO & BOBBIO (1995)

Seus efeitos benéficos em relação à nutrição e saúde estão relacionados às suas propriedades antioxidantes, pois são carreadores diretos de radicais livres e desta forma desempenham um papel importante na prevenção de doenças. Antocianinas de várias plantas, dentre elas a jabuticaba, têm sido testadas, uma vez que podem ser ativas na redução do estresse oxidativo e na prevenção de algumas doenças inflamatórias, cardiovasculares, na prevenção de câncer e da sua progressão (BRITO *et al.*, 2007; DAI *et al.*, 2009; LEITE-LEGATTI *et al.*, 2012; VOLP *et al.*, 2008).

3.5. Jabuticaba *Plinia trunciflora* (O Berg) Kausel

A jabuticabeira é uma árvore frutífera pertencente à família *Myrtaceae*, de ocorrência espontânea em grande parte do Brasil. Seus frutos são tipo baga globosa de até 3 cm de diâmetro, com casca avermelhada quase preta, polpa esbranquiçada mucilaginosa, agridoce, muito saborosa, apresenta comumente uma única semente, mas podendo apresentar até 4 sementes (GOMES, 1983).

Segundo Mattos (1978), existem nove espécies de jabuticabeiras sendo que dentre elas destacam-se a *Plinia trunciflora* (DC) Berg, ou jabuticabeira de cabinho, de ocorrência natural na região Sudoeste do Paraná, a *Plinia cauliflora* que é a jabuticaba paulista e a *Plinia jaboticaba* (Vell.) ou jabuticaba sabará, que produz frutos apropriados para a indústria e para o consumo *in natura* (DONADIO, 1983; MATTOS, 1983).

Plinia trunciflora (O. Berg) Kausel é sinônimo de outras espécies como a *Myrciaria trunciflora* (O. Berg), a *Eugenia cauliflora* (O. Berg) e a *Myrciaria Peruviana* (Poir.) (ANGELY, 1970; ZULOAGA, 2008).

A *Myrciaria cauliflora* Berg citada por Lorenzi (1992) com vários nomes comuns é ocorrente de Minas Gerais ao Rio Grande do Sul, nas matas pluviais atlânticas e nas submatas de altitude.

As vegetações da jabuticabeira podem ocorrer em várias épocas do ano, mas as de fim de inverno e início de primavera são as mais intensas, com produção de folhas novas na periferia da copa, o que lhe dá um tom de cor diferente, do verde claro ao arroxeado. Elas antecedem a principal época de floração, que ocorre nos troncos e ramos, após a ruptura da casca. O fruto amadurece em cerca de três semanas após o florescimento e até cinco colheitas podem ser feitas por ano, em condições ideais de clima e cultivo (DUARTE, 1995).

Diferentes espécies de jabuticaba têm sido utilizadas no tratamento de várias doenças, sua casca é caracterizada em tratamentos populares de asma, diarreia e inflamação crônica das amígdalas, Santos e Meireles (2009). Estudos demonstram que o fruto da jabuticabeira tem elevados teores de taninos, vitamina C e conteúdo de flavonóides, especialmente em sua casca, o que indica um grande potencial antioxidante e, assim, um possível papel na prevenção de muitas doenças relacionadas ao estresse oxidativo (GIACOMETTI; LLERAS, 1994).

De acordo com Terci (2004) a jabuticaba apresenta entre 310 e 315 mg de antocianinas por 100 g da fruta, valor considerado alto quando comparado com outras frutas, como a amora (de 261 a 292 mg/100g) e uva (227 a 235mg/100g).

Em estudos de compostos antioxidantes e anti - câncer presentes em frutas topicais, o extrato metanólico de jabuticaba (*Myrciaria cauliflora*) apresentou forte atividade antioxidante no ensaio DPPH ($IC_{50} = 35\mu\text{g/mL}$). Realizou-se também o isolamento de um novo depsídeo da jabuticaba, a jaboticabina. Depsídeos são compostos fenólicos que contém duas ou mais unidades aromáticas unidas por uma ligação éster, muito comuns em líquens, até então não encontrados em Myrtaceae. Em geral, depsídeos apresentam atividade antibiótica, antiproliferativa e anti-inflamatória (REYNTERSON *et al.*, 2006; REYNTERSON *et al.*, 2008).

Embora já descrita a atividade biológica de algumas espécies de jabuticaba, a *Plinia trunciflora* ainda é pouco estudada.

4. REFERÊNCIAS

AEBI, H. Catalase *in vitro*. **Methods Enzymol**, v.105, p.121-126, 1984.

AMARAL JÚNIOR, H. **Influência da Rede jundiá na piscicultura do estado de Santa Catarina**. In: BARCELLOS, L. J.G.; FAGUNDES, M.; FERREIRA, D. (Org.). Workshop sobre jundiá: Histórias e perspectivas. Ed. Universidade de Passo Fundo, p. 43-46, 2013.

ANGELY, J. A. Myrtaceae. In: **Fl. Anal. Fitogeográfica Estado São Paulo**, v. 3, p. 548-610, 1970.

BALCÁZAR, J.L.; DE BLAS,I.; RUIZ-ZARZUELA, I.; CUNNINGHAM, D.; VENDRELL, D.; MUZQUIZ, J.L. The role of probiotics in aquaculture: Review. **Veterinary Microbiology**, v. 114, p.173–186, 2006.

BARCELLOS, L.J.; KREUTZ, L.C. MEZZALIRA, R.; DA ROSA, J.G.S.; KOAKOSKI, G.; CENTENARO, L.; POTTKER, E. Influence of color background and shelter availability on jundiá (*Rhamdia quelen*) stress response. **Aquaculture**, v. 288, p. 51–56, 2009.

BARCELLOS, L.J.G.; KREUTZ, L.C.; QUEVEDO, R.M.; FIOREZE, I.; RODRIGUES, L.B.; SOSO, A.B.; RITTER, F.; CONRAD, J.; CERICATO, L.; FAGUNDES, M.; LACERDA, L.A.; TERRA, S. Hematological changes in jundiá (*Rhamdia quelen* Quoy and Gaimard *Pimelodidae*) provoked by usual aquaculture practices, with emphasis on immunosuppressive effects. **Aquaculture**, v. 237, p. 229–236, 2004.

BARTOSZ G.; TANNERT CH.; FRIED R.; LEYKO W. Superoxide dismutase activity decreases during erythrocyte aging. **Experientia**, v. 34: p. 1-464, 1978.

BIRD, R. P.; DRAPER, H. H. in Methods in Enzymology (Colowick, S. P., and Kaplan, O. P., Eds.). **Academic Press**, v. 105, p. 299-305, 1984.

BOBBIO, P.A.; BOBBIO, F.O. **Química do processamento de alimentos: pigmentos**. 2ª ed., Campinas: Varela, 1995, p. 105-120.

BOUDET, A. M. Evolution and current status of research in phenolic compounds. **Phytochemistry**, v. 68, p. 2722–2735, 2007.

BOVERIS, A.; SILVA, E.L.D.; WILHELM, D.F. **Flavonóides Antioxidantes de plantas medicinais e alimentos: importancia e perspectivas tereapêuticas**. In: YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B. Plantas medicinais sob a ótica da química moderna: métodos de estudo, fitoterápicos e fitofármacos, biotecnologia, patente. Argos, 2001. 523 p.

BRASIL. Ministério da Pesca e Aquicultura (MPA). **Boletim Estatístico da Pesca e Aquicultura 2011**. Brasília, 2012.

BRITO, E. S.; ARAÚJO, M. C. P.; ALVES, R. E., CARKEET, C.; CLEVIDENCE, B. A.; NOVOTNY, J. A. Anthocyanins present in selected tropical fruits: acerola, jambolão, jussara, and guajiru. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 9389–9394, 2007.

BROUILLARD, R. The in vivo expression of anthocyanin colour in plants. **Phytochemistry**, v. 22, p. 311-23, 1983.

CARVALHO, J.C.T.; GOSMANN, G.; SCHENKEL, E. P. **Compostos fenólicos simples e heterosídicos. Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Organizado por Claudia Maria Oliveira Simões, *et.al.* 3 ed.rev. Porto Alegre, Ed. Universidade UFRGS, 2001.

DAI, J.; GUPTA, A.; GATES, L.; MUMPER, R.J. A comprehensive study of anthocyanin-containing extracts from selected blackberry cultivars: Extraction methods, stability, anticancer properties and mechanisms. **Food and Chemical Toxicology**, v. 47, p.837–847, 2009.

DEGÁSPARI, C.H.; WASZCZYNSKYJ, N.; SANTOS, R.J. dos. Propriedades antioxidantes de compostos fenólicos. **Visão Acadêmica**, v.5, p. 33-40, 2004.

DONADIO, L.C. **Noções práticas de fruticultura**. Campinas, Fundação Cargil, 74p, 1993.

DROGE, W. Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. **Physiological Reviews**, v. 82, p. 47–95, 2002.

DUARTE, O. **Vermehrung, Blüten – und Fruchtentwicklung sowie Leagerung von jaboticaba (*Myrciaria cauliflora* (Mart) Berg)**. Berlin, 105 p, 1995.

EINBOND, L.S.; REYNERTSON, K.A.; LUO, X.; BASILE, M.J.; KENNELLY, E.J. Anthocyanin antioxidants from edible fruits. **Food Chemistry**, v. 84, p.23-28, 2004.

EPAGRI/CEDAP. **Síntese da produção da piscicultura catarinense em 2012**. Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina /Centro de Desenvolvimento em Aquicultura e Pesca. Florianópolis-SC, 2013.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista Associação Médica Brasileira**, v. 43, p. 61-68, 1997.

FRIDOVICH, I. The biology of oxygen radicals. **Science**, v. 201, p. 875- 780, 1978.

FURTADO P.; FIGUEIREDO P.; CHAVES DAS NEVES, H.; PINA F. Photochemical and thermal degradation of anthocyanidins. **Journal of Photochemistry and Photobiology**, v. 75, p. 113-118, 1993.

GALINA, J.; YIN, E.G.; ARDO, E.L.; JENEY, E.Z. The use of immunostimulating herbs in fish. An overview of research. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 35, p. 669–676, 2009.

GIACOMETTI, D., LLERAS. E. In: BERMEJO, J. E. H., LEON, J., editors. Neglected Crops: 1492 from a different perspective, Rome: **FAO**, p. 229-237, 1994.

GOMES, R.P. **Fruticultura Brasileira**. 9. Ed. São Paulo: Nobel, 1983. 446p.

GOMES, L. C.; GOLOMBIESKI, J.I.; CHIPARI, A.; BALDISSEROTTO, B. Biologia do jundiá *Rhamdia quelen* (Teleostei, *Pimelodidae*). **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 30, p. 179-185, 2000.

GRAEFF, A. **Impacto do jundiá na produção piscícola de Santa Catarina: panorâmica atual pensando no futuro**. In: BARCELLOS, L. J. G.; FAGUNDES, M.; FERREIRA, D. (Org.). Workshop sobre jundiá: Histórias e perspectivas. Ed. Universidade de Passo Fundo. p. 109-134, 2013.

GREGORY, E.M.; FRIDOVICH, I. Oxygen toxicity and the superoxide dismutase. **Journal of Bacteriology**, v. 114, p. 1193-1197, 1973.

HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J.M.C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. Oxford University Press, New York, 1999.

HALLIWELL, B. et al. The characterization of antioxidants. **Food and Chemical Toxicology**, v. 33, p. 601-617, 1995.

HASLAM, E. Natural Polyphenols (Vegetable Tannins) as Drugs: Possible Modes of Action. **Journal of Natural Products**, v. 59, p. 205-15, 1996.

HATHERILL J.R.; TILL G.O.; WARD P.A. Mechanisms of oxidant-induced changes in erythrocytes. **Agents-Actions**, v. 32, p.351-8, 1991.

HERMES-LIMA, M. Oxygen in biology and biochemistry: role of free radicals. In: STOREY, K.B. (ed.) Functional metabolism: regulation and adaptation. New York, **John Wiley & Sons, Inc.**, p. 319-368, 2004.

JACKSON, R. Chemical Constituents of grapes. In: WINE science: principles and applications. London: **Academic Press**. p. 178-219, 1994.

LACKNER, R. "Oxidative stress" in fish by environmental pollutants. In: BRAUNBECK, T.; HINTON, D.E.; STREIT, B. (eds.) **Fish ecotoxicology**. Basel, Switzerland, Birkhäuser Verlag, p. 203-224, 1998.

LEHNINGER, A.L, NELSON, D.L & COX, M.M. **Princípios de Bioquímica**. 2.ed. São Paulo: Savier, 1995.

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.; DE CARVALHO-SILVA, L.B.; RUIZ, A.L.T.G.; DE CARVALHO, J.E.; PASTORE, G.M.; JUNIOR, M.R.M. Jaboticaba peel: Antioxidant compounds, antiproliferative and antimutagenic activities, **Food Research International**, v. 49, p. 596–603, 2012.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras**. Manual de Identificação e Cultivo de Plantas Arbóreas Nativas do Brasil. Nova Odessa. Ed. Plantarum. 352 p, 1992.

LUSHCHAK, V. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. **Aquatic Toxicology**, v. 101, p.13–30, 2010.

MARIANO, W.S.; OBA, E. T.; ASSIS, H.C.S. Biomarcadores de estresse oxidativo em peixes. Tópicos especiais em saúde e produção animal. **EMBRAPA**, AMAPÁ, 2009. a

MARIANO, W.S.; OBA, E.T.; SANTOS, L.R.B.; FERNANDES, M.N. Respostas fisiológicas de jeju, *Hoplerythrinus unitaeniatus* (Characiformes, Erythrinidae) expostos ao ar atmosférico. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 10, p. 210-223, 2009. b

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

MATTOS, J.L.R. **Frutos indígenas comestíveis do Rio Grande do Sul**. Porto Alegre: Secretaria da Agricultura, 1978.

MISRA, H.P; FRIDOVICH,I. The role of superoxide anion in the auto-oxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 247, p. 3170–3175. 1972.

MONTEIRO, D. A.; RANTIN, F. T.; KALININ, A. L. Uso do selênio na dieta de matrinxã, *Brycon cephalus*. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.8, p. 32-47, 2007.

OBA, E.T; MARIANO, W.S; SANTOS, L. R. B. Estresse em peixes cultivados: agravantes e atenuantes para o manejo rentável. Manejo e sanidade de peixes em cultivo. **EMBRAPA AMAPÁ-MACAPÁ**, 2009.

PIAIA, R., TOWNSEND, C.R., BALDISSEROTTO, B., Growth and survival of fingerlings of *Rhamdia quelen* exposed to different light regimes. **Aquaculture International**, v. 7, p. 201-205, 1999.

PIMENTEL, C.V.M.B.; FRANCKI, V.M.; GOLLUCKE, A.P.B. **Alimentos funcionais: introdução às principais substâncias alimentos**. São Paulo: Varela, 2005.

PICKERING, A.D. Stress and fish. London: **Academic Press**, 1981.

REYNERTSON, K.A.; BASILE, M.J.; KENNELLY, E.J. antioxidant potential of seven myrtaceous fruits. **Ethnobotany Research & Applications**, v. 3, p. 25-35, 2005.

REYNERTSON, K.A.; WALLACE, A.M.; ADACHI, S.; GIL, R.R.; YANG, H.; BASILE M.J.; D'ARMIENTO, J.; WEINSTEIN, I.B.; KENNELLY, E.J. Bioactive depsides and anthocyanins from Jaboticaba (*Myrciaria cauliflora*). **Journal of Natural Products**, v. 69, p.1228-30, 2006.

REYNERTSON, K.A.; YANG, H.; JIANG, B.; BASILE, M.J.; KENNELLY, M.E.J. Quantitative analysis of antiradical phenolic constituents from fourteen edible Myrtaceae fruits. **Food Chemistry**, v.109, p. 883-890, 2008.

SANTOS, D.T.; MEIRELES, M.A.A. Jaboticaba as a source of functional pigments. **Pharmacognosy Reviews**, v.3, p. 127-132, 2009.

SANTOS, G.O. Fecundidade do Jundiá, *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard, 1824) parasitados por *Argulus* sp. em tanques de terra (Teleostei: Pimelodidae). **Comum. Museu de Ciências e Tecnologias, PUC-RS, Sér. Zool**, Porto Alegre, v.15, n. 1, p.55-60, 2002.

SELLAPPAN, S.; AKOH, C.C.; KREWER, G. Phenolic compounds and antioxidant capacity of Georgia-grown blueberries and blackberries. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.50, p. 2432-2438, 2002.

SHAHIDI, F.; WANASUNDARA, P.D. Phenolic antioxidants. **Critical Reviews in Food Science & Nutrition**, v. 32, p. 67-103, 1992.

SHAHIDI, F.; NACZK, M. Phenolics in Food and Nutraceuticals. Boca Raton: **CRC Press**, 576 p, 2004.

STEGEMAN, J.J; BROUWER, M.; DI GIULIO, R.T.; FÖRLIN, L.; FOWLER, B.A.; SANDERS, B.M.; VAN VELD, P.A. Molecular responses to environmental contamination: enzyme and protein systems as indicators of chemical exposure and effect. In: HUGGET, R.J.; KIMERLE, R.A.; MEHRLE JR, P.M.; BERGMAN, H.L. (eds.) Biomarkers. Biochemical, physiological, and histological markers of anthropogenic stress. Boca Raton, **Lewis Publishers**, p. 235-335, 1992.

STOREY, K.B. Oxidative stress: animal adaptations in nature. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 29, p. 1715-1733, 1996.

TERCI, D.B.L. **Aplicações analíticas e didáticas de antocianinas extraídas de frutas**. Campinas: Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas. (Tese, Doutorado em Química Analítica), 231p, 2004.

TIMBERLAKE, C. F.; BRIDLE, P. The flavonoides. HARBORNE, J. B., ed.; **Academic Press**: New York, 1975.

VALKO, M.; IZAKOVIC, M.; MAZUR, M.; RHODES, C. J.; TELSER. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. **Journal of Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 266, p. 37-56, 2004.

VAN DER OST, R.; BEYER, B.; VERMEULEN, N.P.E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 13, p. 57-149, 2003.

VIGAS, M. Contribution to the understanding of the stress concept. In: USDIN, KVETRIANSKY, KOPIN (eds). Catecholamines and stress: recent advances. **Elsevier**, North Holland, p. 573-577, 1980.

VOLP, A.C.P.; RENHE, I.R.T.; BARRA, K.; STRINGUETTA, P.C. Flavonóides antocianinas: características e propriedades na nutrição e saúde. **Revista Brasileira de Nutrição Clínica**, v. 23, p. 141-9, 2008.

WENDELAAR BONGA, S.E. The Stress Response in Fish. **Journal of Physiology**, v. 77, p. 591-625, 1997.

WILHELM, D. Fish antioxidant defenses. A comparative approach. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 29, p.1735–1742, 1996.

YI, W., FISCHER, J., KREWER, G., AKOH, C.C. Phenolic Compounds from Blueberries Can Inhibit Colon Cancer Cell Proliferation and Induce Apoptosis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 18, 2005.

ZULOAGA, F. O. *et al.* Catálogo de las plantas vasculares del Cono Sur. **Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden**, v.3, p. 1-3348, 2008.

CAPÍTULO II - POTENCIAL ANTIOXIDANTE *IN VITRO* DE DIFERENTES EXTRATOS DE *Plinia trunciflora* (O. Berg) Kausel

1. INTRODUÇÃO

Antioxidantes naturais, particularmente em frutas tem ganhado um interesse crescente por parte dos consumidores e da comunidade científica, pois muitos estudos revelam que o consumo frequente de antioxidantes naturais está associado a um menor risco de doenças cardiovasculares e câncer (RENAUD *et al.*, 1998; TEMPLE, 2000). Os efeitos de defesa de antioxidantes naturais em frutas e vegetais estão relacionadas a três grandes grupos: vitaminas, compostos fenólicos e carotenóides. O ácido ascórbico e compostos fenólicos são conhecidos como antioxidantes hidrofílicos, enquanto que os carotenóides são conhecidos como antioxidantes lipofílicos (HALLIWELL, 1996).

Entre os inúmeros compostos fenólicos conhecidos, as antocianinas destacam-se por apresentar uma potente atividade antioxidante. Antocianinas de vários extratos de plantas, dentre elas a jaboticaba, têm sido testadas, uma vez que podem ser ativas na redução do estresse oxidativo e na prevenção de algumas doenças (BRITO *et al.*, 2007; DAI *et al.*, 2009; LEITE-LEGATTI *et al.*, 2012; EINBOND *et al.*, 2004; REYNERTSON *et al.*, 2005; REYNERTSON *et al.*, 2008; TERCI, 2004).

A jaboticabeira é uma árvore frutífera pertencente à família *Myrtaceae*, de ocorrência espontânea em grande parte do Brasil. Seus frutos são tipo baga globosa de até 3 cm de diâmetro, com casca avermelhada quase preta, polpa esbranquiçada, agridoce, muito saborosa (GOMES, 1983).

Destacam-se várias espécies, sendo as mais importantes a *Myrciaria cauliflora* (Mart.) O. Berg, *Myrtus cauliflora* Mart., *Eugenia cauliflora* DC., *Myrciaria jaboticaba* (Vell.) O. Berg, *Myrciaria tenella* (DC.) O. Berg, *Myrciaria trunciflora* O. Berg, *Plinia cauliflora* (Mart.) Kausel e *Plinia trunciflora* (O. Berg) Kausel (Lorenzi, 1992). A espécie *Plinia trunciflora* (O. Berg) Kausel é sinônimo de outras espécies como a *Myrciaria trunciflora* (O. Berg), a *Eugenia cauliflora* (O. Berg) e a *Myrciaria Peruviana* (Poir.) (ANGELY, 1970; ZULOAGA *et al.*, 2008).

É conhecida como uma das mais ricas fontes brasileiras de antocianinas. Comumente encontradas nos mercados brasileiros, sua popularidade tem sido comparada ao de uvas nos Estados Unidos (REYNERTSON *et al.*, 2008).

Leitte-Legatti *et al.* (2012) em um estudo da atividade antioxidante da jabuticaba (*Myrciaria jaboticaba*), demonstraram que a casca liofilizada, rica em fibras e antocianinas (delfinidina e cianidina 3-glicosídeo) apresentou alta atividade antioxidante. O extrato polar de jabuticaba mostrou efeitos anti-proliferativos contra linhagem de células leucêmicas (K-562) e o extrato não polar foi ativo contra linhagem de células de câncer de próstata (PC-3). O teste de micronúcleos em camundongos mostrou que o extrato polar não induziu danos ao DNA e não causou efeitos mutagênicos.

Embora já descrita a atividade biológica de algumas espécies de jabuticaba, a *Plinia trunciflora* ainda é pouco estudada. Portanto, o presente trabalho teve por objetivo determinar o conteúdo de polifenóis totais, quantificar e identificar as antocianinas e avaliar o potencial antioxidante *in vitro* de diferentes extratos de *Plinia trunciflora*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Coleta dos frutos e elaboração dos extratos

Os frutos de *Plinia trunciflora* foram coletados em setembro de 2012 na Linha Barra Grande, no município de Alpestre, Rio Grande do Sul (27°10'56.82"S e 53° 7'19.55"O, altitude de 224 m), às margens do Rio Uruguai. A exsicata da planta encontra-se no herbário da Universidade Comunitária da Região de Chapecó e tem como número de registro de depósito 3302. A identificação da espécie foi realizada pelo botânico Marcos Sobral.

Os extratos etanólico 99% e hidroalcoólico 70% foram elaborados com as cascas dos frutos da jabuticaba, de acordo com a metodologia descrita por Veggi *et al.* (2011), com modificações. As cascas da jabuticaba foram previamente submetidas ao processo de secagem em estufa a 40°C. Logo após, foram transferidas para recipientes de vidro, onde foi adicionado álcool etílico absoluto P.A (Dinâmica) e água destilada na proporção de 70% de álcool e 30% de água. Já para o extrato etanólico 99% utilizou-se somente álcool etílico absoluto P.A (Dinâmica). A mistura permaneceu ao abrigo da luz por 72 horas. O solvente foi evaporado e o extrato liofilizado para a realização dos ensaios *in vitro*.

O extrato aquoso foi obtido de acordo com Kuskoski *et al.* (2005) com modificações, onde 100 gramas do fruto inteiro foi triturado em liquidificador com 200 mL de solução aquosa acidificada com ácido clorídrico (pH 1,5). A mistura permaneceu refrigerada a 4°C

durante 12 horas ao abrigo da luz. Em seguida, foi centrifugada e o sobrenadante submetido à liofilização.

2.2. Determinação dos polifenóis totais nos extratos de jabuticaba

O conteúdo fenólico total dos extratos foi determinado pelo método de Folin-Ciocalteu, conforme metodologia proposta por Shahidi e Naczk (1995), com modificações. A 1 mL do extrato, adicionou-se 7,5 mL de água destilada e 0,5 mL do reagente Folin-Ciocalteu, nesta ordem. A solução foi agitada durante 20 segundos, permanecendo 3 minutos em repouso. Em seguida, adicionou-se 1,5 mL de solução saturada de carbonato de sódio. A solução foi deixada 1 hora em repouso no escuro. A solução branco foi preparada nas mesmas condições do extrato, substituindo-se o volume de extrato de jabuticaba pelo volume dos solventes contidos no extrato. As leituras espectrofotométricas da amostra e do branco foram realizadas a 765 nm em espectrofotômetro Scinco SUV- 2120. A quantificação de polifenóis totais realizou-se com base na curva-padrão de ácido gálico P. A., preparada com soluções do padrão variando entre 25 e 500 mg/L. O conteúdo fenólico total foi expresso em mg de equivalente de ácido gálico (EAG) por 100 g de extrato.

2.3. Análise do teor de antocianinas monoméricas nos extratos de jabuticaba

A determinação total de antocianinas foi realizada pelo método do pH diferencial, no qual utilizou-se dois sistemas tampão: ácido clorídrico/cloreto de potássio de pH 1,0 (0,025 M) e ácido acético/acetato de sódio de pH 4,5 (0,4 M). Com 0,2 mL de uma amostra diluída (para conseguir uma absorvância na faixa de 0,100-1,200 a 520 nm) adicionou-se 1,8 mL da correspondente dissolução tampão e mediu-se a absorvância frente a um branco a 520 nm e 700 nm (GIUSTI; WROLSTAD, 2001).

Calculou-se a absorvância final a partir de:

$$A = (A_{\text{max.vis}} - A_{520\text{nm}}) \text{ pH } 1,0 - (A_{\text{max.vis}} - A_{700\text{nm}}) \text{ pH } 4,5,$$

onde:

A - Absorvância final da amostra diluída.

O cálculo da concentração das antocianinas monoméricas totais foi obtido através da seguinte equação:

Pigmento de antocianina monomérica (mg/100g): $(A \times MM \times FD \times 100) / (\epsilon \times l)$,

onde:

- **A** - Absorbância final da amostra diluída;
- **MM** - Massa molecular da antocianina majoritária (cianidina 3-glucosídeo) no solvente específico;
- **FD** - fator de diluição (30);
- **ϵ** - absorvitividade molar para o pigmento majoritário da amostra no solvente específico (ϵ cianidina 3-glucosídeo = 26900 mol.L⁻¹).

2.4. Quantificação e identificação das antocianinas por cromatografia líquida de alta eficiência com arranjo de diodo (CLAE)

Todos os reagentes utilizados eram de grau analítico. Acetonitrila e o ácido fórmico (Merck Darmstadt, Alemanha). Cianidina, cianidina 3-*O*-glicosídeo, malvidina, malvidina 3-*O*-glicosídeo, delphinidina 3-*O*-glicosídeo foram adquiridos da ChromaDex. A Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foi realizada com um cromatógrafo Shimadzu (SIL-20A) do sistema de CLAE (Shimadzu, Kyoto, Japão), equipado com bombas de êmbolo LC-20AT Shimadzu, ligado a um DGU 20A desgaseificador com um CBM 20A software 1,22 SP1 integrador, SPD-M20A detector por arranjo de diodos e solução LC.

As análises cromatográficas de fase reversa foram realizadas sob as condições de gradiente, utilizando coluna C18 (4,6 mm x 150 mm) carregada com partículas de diâmetro de 5 μ m. A fase móvel foi água contendo 1% de ácido fórmico (A) e acetonitrila (B), e o gradiente de composição foi: 13% de B por 10 min, alterados para se obter 20%, 30%, 50%, 60%, 70%, 20% e 10% de B a 20, 30, 40, 50, 60, 70 e 80 minutos, respectivamente, de acordo com metodologia descrita por Kamdem *et al.* (2013), com ligeiras modificações.

Os extratos de jabuticaba (extrato etanólico 99%, hidroalcoólico 70%, e o extrato aquoso) foram filtrados através de filtro de membrana de 0,45 (Millipore) e, em seguida, foram desgaseificados por banho ultra-sônico antes do uso. Os extratos foram analisados a uma concentração de 20 mg/mL.

A taxa de fluxo foi de 0,5 mL/min, volume de injeção de 20 μ l e o comprimento de onda foi de 520 nm. As soluções dos padrões de antocianinas foram preparadas em fase

móvel de CLAE numa gama de concentrações de 0,030-0,250 mg/mL. Os picos cromatográficos foram confirmados por comparação do seu tempo de retenção com os picos dos padrões e pelos espectros de arranjo de diodo (300 a 700 nm). Todas as operações de cromatografia foram realizadas a temperatura ambiente e em triplicata.

O limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ) foi calculado com base no desvio-padrão das respostas e da inclinação por meio de três curvas analíticas independentes. LOD e LOQ foram calculados como $3,3$ e $10 \sigma / S$, respectivamente, onde σ é o desvio padrão da resposta e S é o declive da curva de calibração (BOLIGON *et al.*, 2013).

2.5. Avaliação do potencial antioxidante *in vitro* dos extratos de jabuticaba

A estratégia experimental para se verificar a atividade antioxidante *in vitro* dos extratos de jabuticaba foi realizada através de ensaios que avaliam o percentual de captura do radical DPPH (1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl) e ABTS (ácido 2,2'-azinobis-(3-etil-benzotiazolino-6-sulfônico)) conforme metodologias apresentadas a seguir:

2.5.1. Monitoramento da atividade sequestrante do radical DPPH

O radical DPPH é considerado um radical estável e tem sua absorção máxima em 517 nm. Quando este composto recebe um elétron ou um radical hidrogênio para se tornar um composto mais estável, sua absorção diminui. A técnica foi realizada de acordo com Brand - Williams *et al.* (1995), com algumas modificações e constitui-se da incubação dos extratos de jabuticaba (concentrações de 10, 20, 40, 80, 160 e 320 $\mu\text{g/mL}$) por 24 horas a 25°C , em uma solução metanólica de DPPH na concentração de 0,06 mM com posterior leitura da absorbância em 517 nm. O percentual de inibição do radical DPPH foi calculado, convertendo em porcentagem de atividade antioxidante (AA) usando a seguinte fórmula:

$$\text{AA \%} = 100 - \{[(\text{Abs. amostra} - \text{Abs. branco}) \times 100] / \text{Abs. controle}\}$$

Após, o valor do EC50, definido como a quantidade do antioxidante necessária para reduzir em 50% a concentração inicial do radical livre DPPH, em um determinado intervalo de tempo, foi determinada por regressão linear através da curva da concentração dos extratos

vs. atividade antioxidante (%). A atividade antioxidante de cada extrato foi expressa pelo **EC50**.

2.5.2. Monitoramento da atividade sequestrante do radical ABTS^{•+}

O radical ABTS foi obtido pela reação de ABTS (7 mM, concentração final) com persulfato de potássio (2,45 mM) incubados a temperatura ambiente durante 16 horas (mantido no escuro). A técnica constitui-se da incubação dos extratos de jabuticaba (concentrações de 10, 20, 40, 80, 160 e 320 µg/mL) por 7 minutos a 25° C, em uma solução etanólica de 80% de ABTS na concentração de 7 mM com posterior leitura da absorbância em 754 nm (RE *et al.*, 1999).

O percentual de inibição do radical pelos extratos foi calculado da seguinte maneira:

$$AA \% = 100 - \{[(Abs. amostra - Abs. branco) \times 100] / Abs. controle\}$$

A atividade antioxidante dos extratos de jabuticaba nos métodos DPPH e ABTS foi comparada com o padrão ácido ascórbico nas mesmas concentrações (10, 20, 40, 80, 160 e 320 µg/mL) dos extratos estudados.

2.6. Análises estatísticas

Para as análises estatísticas foi utilizado o software Statistica 6.0. Diferenças significativas entre as variáveis analisadas foram calculadas através da análise de variância (ANOVA), com aplicação do teste de Tukey, admitindo um nível de significância de $p < 0,05$.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Polifenóis totais e antocianinas monoméricas quantificadas por espectrofotometria

Os extratos de *Plinia trunciflora* apresentaram diferentes teores de polifenóis totais, expressos em mg de equivalente de ácido gálico (EAG) por 100 g de extrato seco e antocianinas monoméricas, conforme os métodos de extração empregados, como mostra a Tabela 1.

Tabela 1: Polifenóis totais e antocianinas nos diferentes extratos de jabuticaba (*Plinia trunciflora*)

	Polifenóis totais (mg EAG/100g)	Antocianinas monoméricas (mg/100g)
Extrato aquoso	1201,67±33,29 ^a	175,34±11,81 [*]
Extrato etanólico 99%	2095,83±18,09 ^b	449,87±12,75 ^{&}
Extrato hidroalcoólico 70%	2680,83±14,22 ^c	570,05±1,35 [#]

Médias com letras diferentes apresentam diferença pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Médias com símbolos diferentes apresentam diferença pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Verifica-se na Tabela 1 que, a maior eficiência na extração de polifenóis e antocianinas monoméricas foi obtida utilizando como solvente extrator uma mistura de 70% de etanol e 30% de água. Foi possível observar diferenças significativas ($p < 0,05$) nas quantidades de polifenóis totais e antocianinas, para os três extratos avaliados.

O extrato hidroalcoólico 70% apresentou a maior quantidade de polifenóis totais e antocianinas monoméricas, seguido pelo extrato etanólico 99% e pelo extrato aquoso.

Uma provável explicação para o fato de o extrato aquoso acidificado ter extraído uma quantidade significativamente menor de polifenóis totais e conseqüentemente antocianinas seria que para esse extrato foi utilizado o fruto inteiro, enquanto que para os demais utilizou-se somente a casca da jaboticaba.

Resultados semelhantes ao presente trabalho são mostrados por Silva (2011) em seu estudo de otimização de extração de antocianinas e polifenóis totais de *Myrciaria jaboticaba* com soluções orgânicas usando a metodologia de superfície de respostas, onde obteve-se maior eficiência na extração utilizando metanol 70%, seguido pelo etanol 70%.

O elevado conteúdo de compostos fenólicos obtidos nos diferentes extratos de jaboticaba (*Plinia trunciflora*), principalmente no extrato hidroalcoólico 70% ($2680,83 \pm 14,22$ mg EAG/100g) tem sido observados na casca e no fruto inteiro em outras espécies de jaboticaba, tais como a *Myrciaria cauliflora* e a *Myrciaria jaboticaba* (GUEDES, 2013; ABE *et al.*, 2012; REYNERTSON *et al.*, 2008; SANTOS; MEIRELES, 2011; SANTOS *et al.*, 2010; LEITE-LEGATTI *et al.*, 2012). No entanto, ainda são escassos estudos dessa planta nativa do Brasil, principalmente com relação à espécie *Plinia trunciflora*.

A maceração com etanol acidificado também tem sido relatada como um método eficaz na extração de pigmentos antociânicos da jaboticaba (LIMA *et al.*, 2011). As antocianinas são moléculas polares, portanto, os solventes mais comuns utilizados nas extrações são misturas aquosas de etanol, metanol ou acetona (KAHKONEM *et al.*, 2001; DAI *et al.*, 2009).

Para as antocianinas monoméricas presentes na casca da jaboticaba quantificadas por espectrofotometria, foram obtidos teores na faixa de $175,34 \pm 11,81$ mg/100g para o extrato aquoso até $570,05 \pm 1,35$ mg/100g para o extrato hidroalcoólico 70%.

Valores próximos, porém inferiores ao extrato hidroalcoólico 70% de *Plinia trunciflora*, foram obtidos por Teixeira *et al.* (2008) que determinou um teor de 492,74 mg/100g para a casca da jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba*) e Kuskoski (2006) obtiveram valores médios que variaram de 111,2 mg/100g a 420,09 mg/100 g. Já, Santos *et al.* (2010) demonstraram valores de antocianinas na jaboticaba variando de 367 a 616 mg/100g de peso fresco. Esta variação pode ser explicada devido a diferenças nas variedades, clima, grau de maturação e método de extração.

Os teores de antocianinas obtidas na jaboticaba são comparáveis com outras fontes antociânicas, tais como o mirtilo (25-497 mg/100g), uva (30-375 mg/100g), amora 670

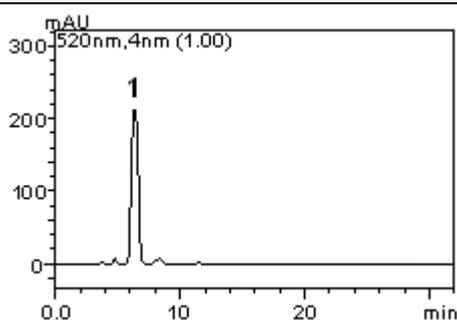
mg/100g e o açaí, fruta típica brasileira (263 mg/100g) (LAURO; FRANCIS, 2000; HENDRY; HOUGHTON, 1996; DELGADO-VARGAS; PAREDEZ-LÓPEZ, 2003). Sendo que na casca, principalmente para a jabuticaba encontram-se os maiores teores de antocianinas (ABE *et al.*, 2012; LEITE-LEGATTI *et al.*, 2012).

3.2. Quantificação e identificação das antocianinas por cromatografia líquida de alta eficiência com arranjo de diodo (CLAE)

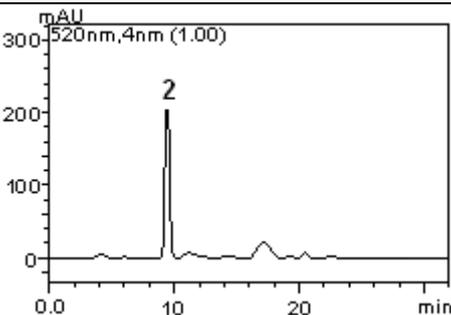
Os extratos de jabuticaba (*Plinia trunciflora*) foram submetidos à análise cromatográfica (CLAE) com arranjo de diodo para a identificação e quantificação das antocianinas. Os cromatogramas obtidos são mostrados na Figura 1 e revelam a presença da cianidina (tempo de retenção - t_R = 6,41 min; pico 1), malvidina (t_R = 9,73 min; pico 2), delphinidina 3-*O*-glicosídeo (t_R = 11,94 min; pico 3), cianidina 3-*O*-glicosídeo (t_R = 15,08; pico 4) e malvidina 3-*O*-glicosídeo (t_R = 20,57 min; pico 5).

As curvas de calibração foram as seguintes: para a cianidina: $Y = 13054x + 1245,8$ ($r = 0,9997$); cianidina 3-*O*-glicosídeo: $Y = 12695x + 1184,3$ ($r = 0,9999$), malvidina: $Y = 12749x + 1267,9$ ($r = 0,9996$); malvidina 3-*O*-glicosídeo: $Y = 13158x + 1305,2$ ($r = 0,9995$) e delphinidina 3-*O*-glicosídeo: $Y = 12539x + 1183,1$ ($r = 0,9997$).

Cianidina (Padrão)



Malvidina (Padrão)



Delphinidina3-*O*-glicosídeo (Padrão)

Cianidina3-*O*-glicosídeo (Padrão)

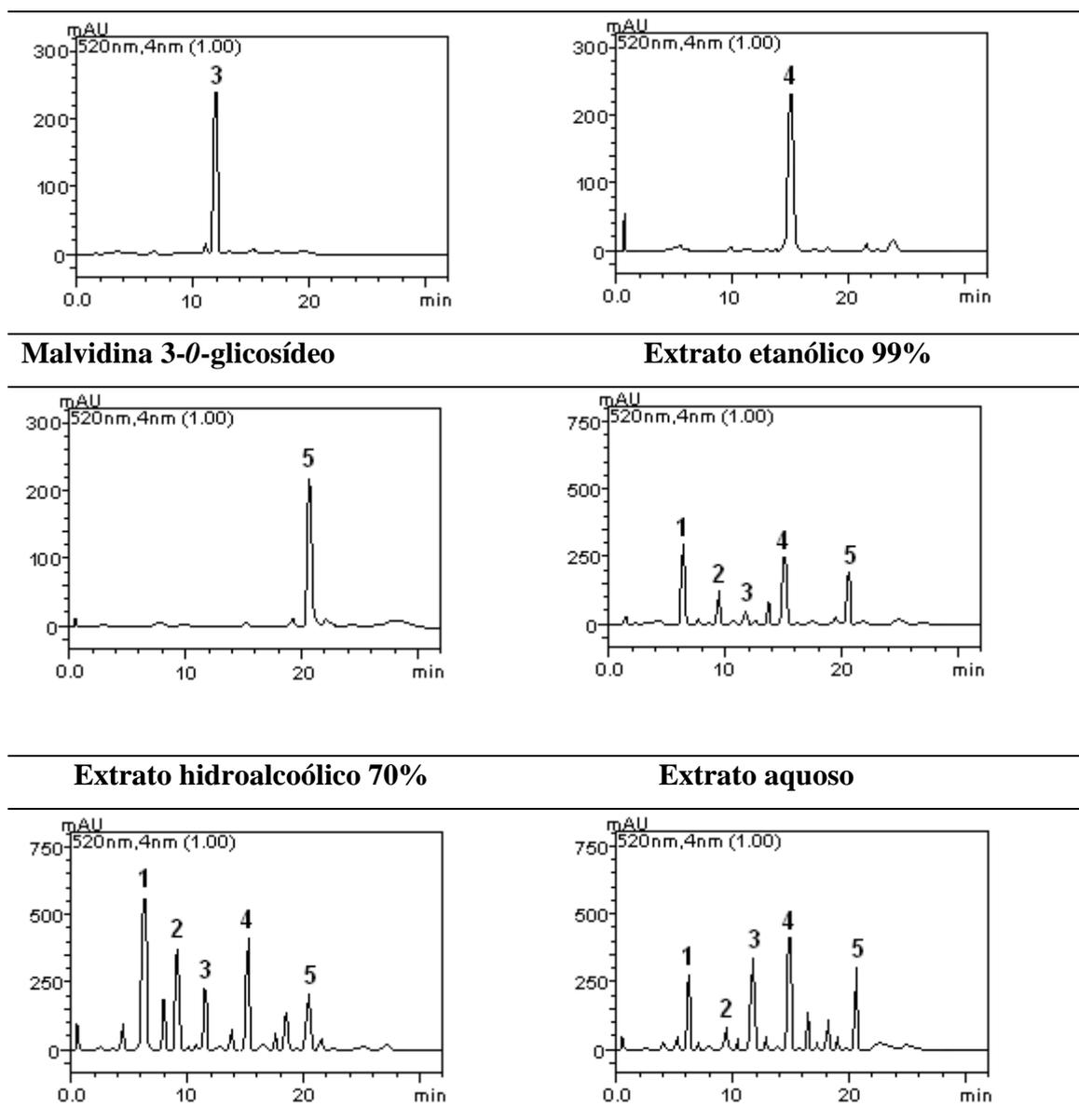


Figura 1: Perfil cromatográfico dos padrões de antocianinas e dos extratos de *Plinia trunciflora*. Cianidina (pico 1), malvidina (pico 2), delphinidina 3-*O*-glicosídeo (pico 3), cianidina 3-*O*-glicosídeo (pico 4) e malvidina 3-*O*-glicosídeo (pico 5).

A Tabela 2 apresenta a quantificação de cada antocianina identificada nos diferentes extratos analisados.

Tabela 2: Quantificação por CLAE das antocianinas presentes nos diferentes extratos de *Plinia trunciflora*

Antocianinas mg/g	Extrato aquoso	Extrato hidroalcoólico 70%	Extrato etanólico 99%	LOD µg/mL	LOQ µg/mL
Cianidina	16,19 ± 0,01 ^a	42,08 ± 0,01 ^b	17,49 ± 0,03 ^c	0,015	0,049
Malvidina	3,45 ± 0,02 ^a	25,76 ± 0,02 ^b	6,84 ± 0,01 ^c	0,028	0,093
Delfinidina 3- 0-glicosídeo	24,07 ± 0,03 ^a	13,47 ± 0,01 ^b	2,11 ± 0,02 ^c	0,009	0,031
Cianidina 3-0- glicosídeo	27,56 ± 0,03 ^a	26,91 ± 0,01 ^b	15,93 ± 0,02 ^c	0,021	0,069
Malvidina 3- 0-glicosídeo	17,05 ± 0,02 ^a	14,26 ± 0,03 ^b	11,74 ± 0,01 ^c	0,017	0,058

Os resultados são expressos como média ± desvio padrão. Médias seguidas de letras diferentes diferem pelo teste de Tukey a $p < 0,01$. LOD: limite de detecção e LOQ: limite de quantificação.

Este estudo demonstrou pela primeira vez, a identificação e quantificação de antocianinas presentes na espécie de jaboticaba *Plinia trunciflora*.

Pela Tabela 2 observa-se que, o extrato hidroalcoólico 70% de *P. trunciflora* apresentou a maior quantidade das antocianinas cianidina ($42,08 \pm 0,01 \text{ mg.g}^{-1}$) com 34,35 % e cianidina 3- glicosídeo ($26,91 \pm 0,01 \text{ mg.g}^{-1}$) com 21,97 % do total das antocianinas quantificadas. Para o extrato aquoso, a cianidina 3-0-glicosídeo e a delfinidina 3-0-glicosídeo foram os componentes majoritários, apresentando $27,56 \pm 0,03 \text{ mg.g}^{-1}$ e $24,07 \pm 0,03 \text{ mg.g}^{-1}$, respectivamente. O extrato aquoso extraiu as antocianinas glicosiladas, ou seja, as antocianinas mais polares. No extrato etanólico 99%, as antocianinas presentes em maior quantidade também foram a cianidina ($17,49 \pm 0,03 \text{ mg.g}^{-1}$) e a cianidina 3-0-glicosídeo ($15,93 \pm 0,02 \text{ mg.g}^{-1}$), como no extrato hidroalcoólico 70%, porém em menor quantidade.

A análise cromatográfica por CLAE das antocianinas do extrato etanólico acidificado (95% de etanol: 1,5 N de HCl, 85: 15) da casca da *Myrciaria jaboticaba* revelou a presença

das antocianinas: cianidina 3-*O*-glicosídeo ($19,63 \pm 0,527 \text{ mg.g}^{-1}$) e delphinidina 3-*O*-glicosídeo ($6,34 \pm 0,018 \text{ mg.g}^{-1}$) como componentes principais LEITE-LEGATTI *et al.* (2012), sendo no entanto, esses valores inferiores ao conteúdo de antocianinas encontrado no extrato hidroalcoólico 70% de *Plinia trunciflora*.

Reynertson *et al.* (2006) identificaram a cianidina 3-*O*-glicosídeo e a peonidina 3-*O*-glicosídeo nos frutos da *Myrciaria jaboticaba*.

Em extratos de jabuticaba (*Myrciaria cauliflora*) e na falsa jabuticaba (*Myrciaria vexator*) a cianidina 3-*O*-glicosídeo foi identificada como a antocianina majoritária. No entanto, a delphinidina 3-*O*-glicosídeo foi detectada apenas no extrato da jabuticaba, enquanto que a cianidina-3-*O*-galactosídeo e cianidina-3-*O*-arabinose pôde ser detectada apenas no extrato da falsa jabuticaba. A quantidade de delphinidina 3-*O*-glicosídeo no extrato metanólico (70%) de jabuticaba (*Myrciaria cauliflora*) foi de $0,736 \pm 0,064 \text{ mg.g}^{-1}$ e $2,98 \pm 0,173 \text{ mg.g}^{-1}$ de cianidina 3-*O*-glicosídeo. Não foi detectada a presença da delphinidina 3-*O*-galactosídeo e da malvidina 3-*O*-glicosídeo (WU *et al.*, 2012; WU *et al.*, 2013).

Antocianinas como a cianidina e a delphinidina 3-*O*-glicosídeo também já foram descritas no fruto e na casca da *Myrciaria cauliflora* e *Myrciaria jaboticaba* (ABE *et al.*, 2012; LIMA *et al.*, 2011; SANTOS *et al.*, 2010), podendo ser estas, juntamente com a cianidina 3-*O*-glicosídeo as principais antocianinas presentes nas diferentes espécies de jabuticaba, dentre elas, a *Plinia trunciflora*, como demonstrado no presente estudo.

3.3. Atividade antioxidante *in vitro*

A atividade antioxidante dos diferentes extratos de jabuticaba (*Plinia trunciflora*) foi avaliada através da captura dos radicais sintéticos DPPH e ABTS.

As Figuras 2 e 3 apresentam o percentual de atividade antioxidante medida através da captura dos radicais sintéticos DPPH e ABTS, respectivamente. Como padrão de antioxidante foi utilizado o ácido ascórbico.

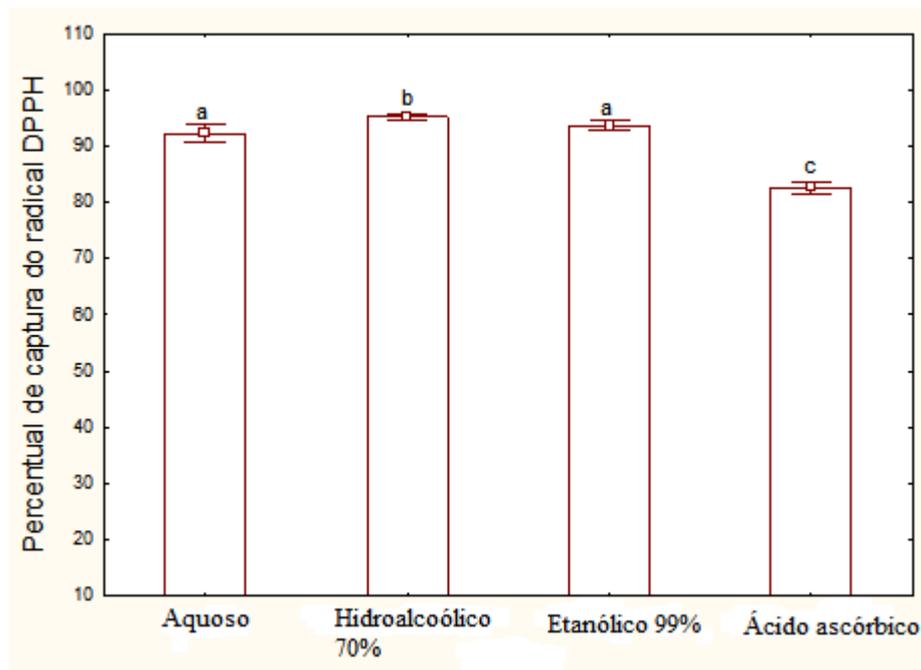


Figura 2: Percentual de atividade antioxidante dos diferentes extratos de *Plinia trunciflora* (concentração 320 $\mu\text{g/mL}$) medido através do método de captura do radical DPPH. Médias seguidas da mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$). Os valores representam a média \pm o desvio padrão.

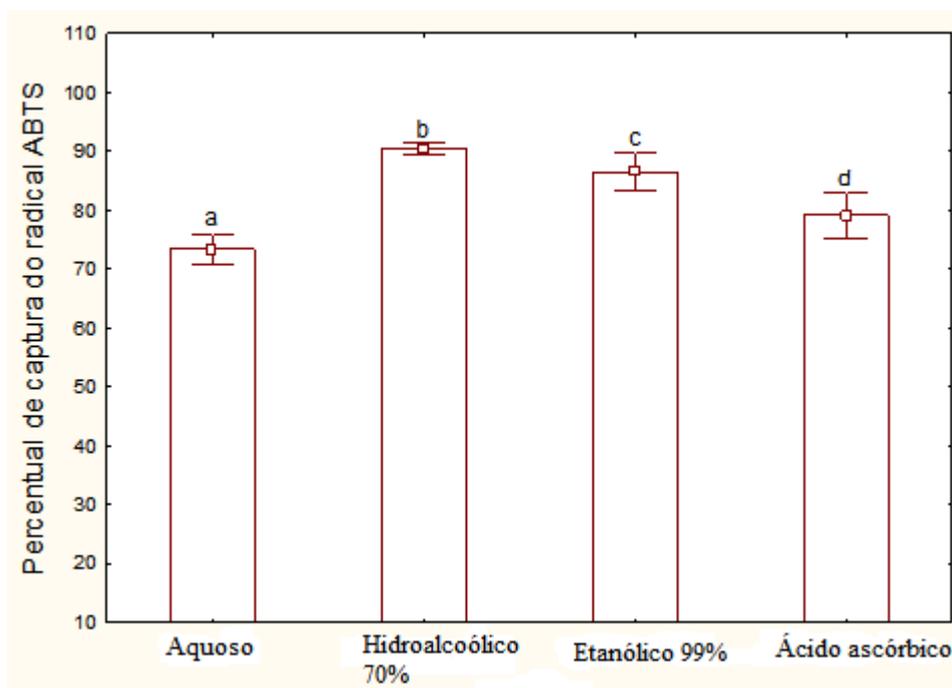


Figura 3: Percentual de atividade antioxidante dos diferentes extratos de *Plinia trunciflora* (concentração 320 $\mu\text{g/mL}$) medido através do método de captura do radical ABTS. Médias seguidas da mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Os valores representam a média \pm o desvio padrão.

Na Figura 2, observa-se que os maiores percentuais de atividade antioxidante medidos através do radical DPPH foram apresentados pelo extrato hidroalcoólico 70% ($95,20 \pm 0,21$ %), seguido pelo extrato etanólico 99% ($93,10 \pm 0,43$ %) e pelo extrato aquoso ($92,30 \pm 0,78$ %), embora não houve diferença significativa entre os dois últimos pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Todos os extratos apresentaram maior atividade antioxidante quando comparado com o ácido ascórbico ($82,56 \pm 0,48$ %).

Os resultados de atividade antioxidante avaliada através da captura do radical DPPH são comparáveis com o perfil dos valores obtidos através do radical ABTS (Figura 3), com o extrato hidroalcoólico 70% apresentando a maior atividade antioxidante, tendo um decréscimo ($90,37 \pm 0,42$ %) em relação ao DPPH, seguido pelos extratos etanólico 99% ($86,53 \pm 1,64$ %) e aquoso ($73,35 \pm 1,31$ %), havendo nesse caso, diferença significativa entre todos os extratos avaliados. A atividade sequestrante do radical ABTS apresentada pelos extratos de *P. trunciflora* também foi maior do que a do ácido ascórbico ($76,82 \pm 0,21$ %).

Semelhante aos nossos resultados, o extrato alcoólico da semente da jabuticaba (*Myrciaria cauliflora*) apresentou um percentual de atividade antioxidante através da captura do radical DPPH de $93,98 \pm 0,01$ % e $94,83 \pm 0,01$ % para o extrato aquoso, os quais foram superiores ao antioxidante sintético BHT (CARVALHO e ASQUIERI, 2012).

Uma forma usual de expressar os valores de atividade antioxidante do ensaio DPPH é calcular a quantidade de antioxidante capaz de sequestrar metade do radical livre presente na solução. Esse índice denomina-se EC_{50} . Quanto menor o valor de EC_{50} apresentado pelo extrato, maior será sua atividade antioxidante.

A Tabela 3 apresenta o EC_{50} dos extratos de *Plinia trunciflora* para capturar os radicais DPPH e ABTS.

Tabela 3: EC₅₀ dos diferentes extratos de *Plinia trunciflora*

	Extrato hidroalcoólico 70% (µg.mL ⁻¹)	Extrato etanólico 99% (µg.mL ⁻¹)	Ácido ascórbico (µg.mL ⁻¹)
EC₅₀ DPPH	24,79 ± 0,01 (R ² = 0,914)	93,03 ± 0,01 (R ² = 0,731)	180,25 ± 0,097 (R ² = 0,670)
EC₅₀ ABTS	53,67 ± 0,02 (R ² = 0,871)	157,60 ± 1,080 (R ² = 0,689)	185,44 ± 0,007 (R ² = 0,572)

Como esperado, o extrato hidroalcoólico 70% apresentou a menor EC₅₀, ou seja, a maior atividade antioxidante, tanto pela remoção do radical DPPH quanto do radical ABTS, confirmado anteriormente pela Figura 2. Em seguida está o extrato etanólico 99% e o extrato aquoso. O ácido ascórbico apresentou os maiores valores de EC₅₀ para ambos os radicais.

Para a casca liofilizada da *Myrciaria jaboticaba*, foi obtido um EC₅₀ de 45,38 mg.mL⁻¹, através do teste DPPH, já para o extrato metanólico de *Myrciaria cauliflora* o EC₅₀ foi de 35 mg.mL⁻¹ (REYNERTSON, 2007; LEITE-LEGATTI *et al.*, 2012), resultados que corroboram com os obtidos no presente trabalho, ganhando destaque o potencial antioxidante do extrato hidroalcoólico 70% da *Plinia trunciflora*.

Verificou-se que quanto maior o conteúdo de polifenóis totais dos extratos de *Plinia trunciflora*, maior foi a capacidade antioxidante dos extratos, tanto pela medida da captura do radical DPPH quanto do radical ABTS.

4. CONCLUSÃO

Através das análises realizadas nos diferentes extratos da jaboticaba (*Plinia trunciflora*) foi possível constatar elevada atividade antioxidante, com destaque para o extrato hidroalcoólico 70%. Pode-se dizer ainda que, essa atividade antioxidante pode estar relacionada com o teor de compostos fenólicos, assim como a presença das antocianinas que foram quantificadas nos extratos, dentre elas a cianidina e a cianidina 3-*O*-glicosídeo, presentes em grande quantidade.

5. REFERÊNCIAS

ABE, L. T.; LAJOLO, F. M.; GENOVESE, M. I. Potential dietary sources of ellagic acid and other antioxidants among fruits consumed in Brazil: jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba* (Vell.) Berg). **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 92, p.1679–1687, 2012.

ANGELY, J. A. Myrtaceae. In: **Fl. Anal. Fitogeográfica Estado São Paulo**, v. 3, p. 548-610, 1970.

BOLIGON, A.A.; KUBIÇA, T.F.; MARIO, D.N.; BRUM, T.F.; PIANA, M.; WEIBLEN, R.; LOVATO, L.; ALVES, S.H.; SANTOS, R.C.V.; ALVES, C.F.S.; ATHAYDE, M.L. Antimicrobial and antiviral activity-guided fractionation from *Scutia buxifolia* Reissek extracts. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 35, p. 2229-2239, 2013.

BRITO, E. S., ARAÚJO, M. C. P., ALVES, R. E., CARKEET, C., CLEVIDENCE, B. A. & NOVOTNY, J. A. Anthocyanins present in selected tropical fruits: acerola, jambolão, jussara, and guajiru. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 9389–9394, 2007.

BRAND-WILIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Food Science and Technology**, v.28, p.25-30, 1995.

CARVALHO, A.A; ASQUIERI, E.R. **Teor de compostos fenólicos e atividade antioxidante da semente de jaboticaba (*Myrciaria cauliflora*)**. Universidade Federal de Goiás, 2012.

DAI, J; GUPTE, A; GATES, L; MUMPER, R.J. A comprehensive study of anthocyanin-containing extracts from selected blackberry cultivars: Extraction methods, stability, anticancer properties and mechanisms. **Food and Chemical Toxicology**, v.47, p. 837–847, 2009.

DELGADO-VARGAS, F.; PAREDEZ-LÓPEZ, O. Natural colors for foods and nutraceutical uses. Boca Ratón: **CRC Press**, 327 p, 2003.

EINBOND, L. S.; REYNERTSON, K. A.; LUO, X.; BASILE, M. J.; KENNELLY, E. J. Anthocyanin antioxidants from edible fruits. **Food Chemistry**, v. 84, p. 23–28, 2004.

FULEKI, T.; FRANCIS, F.J. Quantitative methods for anthocyanins. **Journal of Food Science**, v. 33, p. 78-83, 1968.

GUEDES, A.R. **Levantamento do potencial antioxidante e antimicrobiano de frutas nativas da mata atlântica no estado do Paraná**. Universidade tecnológica Federal do Paraná. Cmapo Mourão, 2013.

GIUSTI, M.M.; WROLSTAD, R.E. Unit. F1.2.1-13. Anthocyanins. Characterization and measurement with UV-Visible spectroscopy. In: **Current Protocols in Food Anal. Chem.** John Wiley & Sons: New York, 2001.

GOMES, R.P. **Fruticultura Brasileira**. 9. Ed. São Paulo: Nobel, 446p, 1983.

HALLIWELL, B. Antioxidants in human health and disease. **Annual Review of Nutrition**, v. 16, p. 33-50, 1996.

HENDRY, G. A. F.; HOUGHTON, J. D. Natural food colorants, 2 ed, **Blackie Academic Press.**, 1996.

KAHKONEN, M.P.; HOPIA, A.I.; VUORELA, H.J. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, p. 3954–3962, 2001.

KAMDEM, J.P.; OLALEKAN, E.O.; HASSAN, W.; KADE, J.; YETUNDE, O.; BOLIGON, A.A.; ATHAYDE, M.L.; SOUZA, D.O.; ROCHA, J.B.T. *Trichilia catigua* (Catuaba) bark extract exerts neuroprotection against oxidative stress induced by different neurotoxic agents in rat hippocampal slices. **Industrial Crops and Products**, v.50, p. 625- 632, 2013.

KUSKOSKI, E. M. Frutos tropicais silvestres e polpas de frutas congeladas: atividade antioxidante, polifenóis e antocianinas. **Ciência Rural**, v. 36, n. 4, p. 1283 – 1287, 2006.

KUSKOSKI, M.; ASUERO, A. G.; TRONCOSO, A. M.; MANCINI-FILHO, J.; FETT, R. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante em 108 pulpa de frutos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n. 4, p. 726-732, 2005.

LAURO, G. J., FRANCIS, F.J. Natural Food Colours. **Science and technology**, 2000.

LEITE-LEGATTI, A.V; BATISTA, A. G; ROMANELLI, N; DRAGANO, V; MARQUES, A.C; MALTA, L.G; RICCIO, M.F; EBERLIN, M.N; MACHADO, A.R.T; CARVALHO-SILVA, L.B, *et al.* Jaboticaba peel: Antioxidant compounds, antiproliferative and antimutagenic activities. **Food Research International**, v. 49, p.596–603, 2012.

LIMA, A.J.B; CORRÊA, A; SACZK, A.A; MARTINS, M.P; CASTILHO, R. O. Anthocyanins, pigment stability and antioxidant activity in jaboticaba [*Myrciaria cauliflora* (Mart.) O. Berg]. **Rev. Bras. Frutic.**, Jaboticabal - SP, v. 33, n. 3, p. 877-887, 2011.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras**. Manual de Identificação e Cultivo de Plantas Arbóreas Nativas do Brasil. Nova Odessa. Ed. Plantarum. 352 p, 1992.

TEIXEIRA, L. N.; STRINGHETA, P. C.; OLIVEIRA, F. A. Comparação de métodos para quantificação de antocianinas. **Revista Ceres**. v. 55, p. 297-304, 2008.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICEEVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, p. 1231-1237, 1999.

RENAUD, S.C., GUEGUEN, R., SCHENKER, J., D'HOUTAUD, A. Alcohol and mortality in middle-aged men from eastern France. **Epidemiology**, v. 9, p. 184–188, 1998.

REYNERTSON, K. A.; WALLACE, A. M.; ADACHI, S.; GIL, R. R.; YANG, H.; BASILE, *et al.* Bioactive depsides and anthocyanins from jaboticaba (*Myrciaria cauliflora*). **Journal of Natural Products**, v. 69, p. 1228–1230, 2006.

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

REYNERTSON, K.A.; BASILE, M.J.; KENNELLY, E.J. antioxidant potential of seven myrtaceous fruits. **Ethnobotany Research & Applications**, v. 3, p. 25-35, 2005.

REYNERTSON, K.A.; YANG, H.; JIANG, B.; BASILE, M.J.; KENNELLY, M.E.J. Quantitative analysis of antiradical phenolic constituents from fourteen edible Myrtaceae fruits. **Food Chemistry**, v.109, p. 883-890, 2008.

SHAHIDI, F.; NACZK, M. Phenolics in Food and Nutraceuticals. Boca Raton: **CRC Press**, 576 p, 1995.

SILVA, P.I. **Otimização da extração e microencapsulamento de polifenóis e antocianinas de jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba*)**. Universidade Federal de Viçosa, 2011.

SANTOS, D. T., MEIRELES, A. A. Optimization of bioactive compounds extraction from jaboticaba (*Myrciaria cauliflora*) skins assisted by high pressure CO₂. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 112, p. 398–406, 2011.

SANTOS, D. T.; VEGGI, P. C.; MEIRELES, M. A. A. Extraction of antioxidant compounds from Jaboticaba (*Myrciaria cauliflora*) skins: Yield, composition and economical evaluation. **Journal of Food Engineering**, v. 101, p. 23-31, 2010.

TEIXEIRA, L.N.; STRINGHETA, P.C.; OLIVEIRA, F.A. Comparação de métodos para quantificação de antocianinas. **Revista Ceres**, v.55, p. 297-304, 2008.

TEMPLE, N.J. Antioxidants and disease: more questions than answers. **Nutrition Research** v. 20, p. 449–459, 2000.

TERCI, D.B.L. **Aplicações analíticas e didáticas de antocianinas extraídas de frutas**. Campinas: Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas. (Tese, Doutorado em Química Analítica). 2004. 231p.

VEGGI, P.C; SANTOS, D.T; ANGELA, M; MEIRELES, A. Anthocyanin extraction from Jaboticaba (*Myrciaria cauliflora*) skins by different techniques: economic evaluation. **Procedia Food Science**, v.1, p. 1725-1731, 2011.

WU, S.B.; WU, J.; YIN, Z.; ZHANG, J.; LONG, C.; KENNELLY, E.J.; ZHENG, S. Bioactive and Marker Compounds from Two Edible Dark-Colored Myrciaria Fruits and the Synthesis of Jaboticabin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, p. 4035 - 4043, 2013.

WU, S.B.; DASTMALCHI, K.; LONG, C.; KENNELLY, E.J. Metabolite Profiling of Jaboticaba (*Myrciaria cauliflora*) and Other Dark-Colored Fruit Juices. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, p. 7513-7525, 2012.

ZULOAGA, F. O. *et al.* Catálogo de las plantas vasculares del Cono Sur. **Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden**, v.3, p. 1-3348, 2008.

CAPÍTULO III - POTENCIAL ANTIOXIDANTE DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE *Plinia trunciflora* (O. Berg) Kausel NA PREVENÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO EM *Rhamdia quelen*

1. INTRODUÇÃO

Os fatores estressantes, tais como a forma de confinamento, baixos níveis de oxigênio dissolvido na água, captura ou mudanças no ambiente físico tem sido a principal causa das perdas de lucros na piscicultura, pois afetam o metabolismo e, conseqüentemente, o crescimento dos peixes (OBA *et al.*, 2009).

A instalação do processo de estresse oxidativo decorre da existência de um desequilíbrio entre compostos oxidantes e antioxidantes, em favor da geração excessiva de radicais livres ou em detrimento da velocidade de remoção desses (HALLIWELL; WHITEMAN, 2004).

O termo estresse tem sido utilizado para caracterizar um estado de ameaça a homeostase causada por um estímulo estressante, podendo causar distúrbios fisiológicos, bioquímicos ou morfológicos. O estresse é caracterizado também como uma resposta comportamental geral na qual há reações motoras e neurovegetativas mediadas pelo sistema neuro-endócrino (PICKERING, 1981; WENDELAAR BONGA, 1997).

Um peixe que vem se destacando e sua produção crescendo é o nativo jundiá (*Rhamdia quelen*), com condições de atender a um mercado exigente pelas excelentes qualidades apresentadas (ótimo sabor, baixo nível de gordura, altos índices de ômega 3, carne branca e sem espinhas no filé) já desponta como altamente promissor em termos de retorno para o produtor (EPAGRI/CEDAP, 2013).

O jundiá é um peixe nativo de água doce e sua distribuição compreende desde o centro da Argentina até o sul do México. A espécie se caracteriza por apresentar um bom desempenho de crescimento e boa fecundidade em criações intensivas, além disso, adapta-se facilmente ao manejo reprodutivo (SANTOS, 2002).

Com a intensificação dos sistemas de cultivo, os peixes são expostos a condições de estresse, podendo ocasionar doenças e problemas relacionados à deterioração ambiental. O ambiente aquático é extremamente dinâmico e os animais que vivem nesse ambiente enfrentam alterações ambientais dificilmente enfrentadas pelos animais terrestres como

mudanças rápidas ou extremas na concentração de O₂ dissolvido, pH e salinidade, o que pode ocasionar estresse e reduzir a habilidade em manter a homeostase (BALCÁZAR *et al.*, 2006).

A utilização de agentes antioxidantes naturais pode permitir que os animais superem de maneira saudável e sem danos, as condições adversas à que estão frequentemente sujeitos, resistindo às práticas de manejo. Evidencia-se ainda o potencial dos extratos vegetais, pois podem contribuir para uma aquicultura sustentável, através do controle de doenças com produtos biodegradáveis, diminuindo conseqüentemente o uso de produtos químicos prejudiciais ao homem e ao meio ambiente (GALINA *et al.*, 2009; MONTEIRO *et al.*, 2007).

Nesse contexto, destaca-se a jabuticaba, uma planta nativa, objeto de vários estudos, que tem demonstrado elevada atividade antioxidante de espécies como a *Myrciaria cauliflora* e *Myrciaria jaboticaba*. Esse efeito biológico deve-se principalmente à presença de quantidades significativas de antocianinas. Antocianinas da jabuticaba vêm sendo testadas, uma vez que podem ser ativas na redução do estresse oxidativo e na prevenção de algumas doenças inflamatórias, cardiovasculares, na prevenção de câncer e da sua progressão (BRITO *et al.*, 2007; DAI *et al.*, 2009; LEITE-LEGATTI *et al.*, 2012; VOLP *et al.*, 2008).

Embora descritas atividades biológicas de algumas espécies de jabuticaba, a espécie *Plinia trunciflora* têm sido pouco estudada. Portanto, o presente trabalho teve por objetivo avaliar o efeito do extrato hidroalcoólico da casca dos frutos de *Plinia trunciflora* sobre parâmetros de estresse oxidativo em juvenis de jundiá (*Rhamdia quelen*) submetidos a um modelo de estresse por perseguição com rede.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Animais

Foram utilizados juvenis de *Rhamdia quelen* com idade aproximada de 90 dias, peso médio de $6,12 \pm 0,86$ g e $7,15 \pm 1,22$ cm de comprimento, oriundos de uma estação de piscicultura do município de Ajuricaba (RS). O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA da Unochapecó (#002/2012).

2.2. Delineamento experimental

Foram utilizados 8 peixes em cada grupo (n=8). Os animais foram aclimatados em aquários de 15 L, contendo 4 g/L de NaCl. O NaCl foi adicionado aos aquários com o propósito de evitar o surgimento do íctio (*Ichthyophthirius multifiliis*), um parasita que comumente infecta o jundiá, ocasionando lesões e consequentemente a mortalidade dos peixes.

A densidade final nos aquários foi de aproximadamente 3,26 g/L. Essa densidade não é considerada estressante para *Rhamdia quelen* (BARCELLOS *et al.*, 2001). Os parâmetros físico químicos da água foram controlados e monitorados diariamente: temperatura $22 \pm 2^\circ\text{C}$, pH: $7,57 \pm 0,15$, oxigênio dissolvido $6,92 \pm 0,56$ mg/L e amônia $0,83 \pm 0,15$ mg/L. Os animais foram submetidos a um ciclo claro/escuro de 10/14 (claro/escuro) e alimentados duas vezes ao dia (09:00 e 16:00 hs), durante 15 dias, com ração comercial (Supra) (3% de ração calculada em função do peso) contendo 42 % de proteína bruta. Nessa ração foram adsorvidas diferentes concentrações de extrato hidroalcolico 70% de jabuticaba (*Plinia trunciflora*). Optou-se por utilizar o extrato hidroalcolico de *Plinia trunciflora*, pois este apresentou maior conteúdo de polifenóis totais, antocianinas e consequentemente maior atividade antioxidante *in vitro*, como mostrado anteriormente no capítulo II.

2.3. Bioensaio e tratamentos

Os animais foram divididos em dois grandes grupos experimentais: animais controle e animais submetidos ao protocolo de estresse. Esses dois grandes grupos foram subdivididos em grupos de acordo com o tratamento a seguir:

Grupo controle (sem estresse):

- TC: Animais alimentados somente com ração comercial sem adição de extrato;
- T1%: Animais alimentados com ração comercial contendo 1% de extrato de jabuticaba;
- T 3%: Animais alimentados com ração comercial contendo 3% de extrato de jabuticaba;
- T 10%: Animais alimentados com ração comercial contendo 10% de extrato de jabuticaba;

Grupo estressado (com estresse):

- TC: Animais alimentados somente com ração comercial sem adição de extrato;
- T 1%: Animais alimentados com ração comercial contendo 1% de extrato de jabuticaba;
- T 3%: Animais alimentados com ração comercial contendo 3% de extrato de jabuticaba;

- T 10%: Animais alimentados com ração comercial contendo 10% de extrato de jabuticaba;

2.4. Protocolo de estresse

Logo após esse período, o grupo estressado foi submetido ao protocolo de estresse por perseguição com rede durante 8 minutos. O modelo estudado é uma adaptação do modelo utilizado por BARCELLOS *et al.* (2011). Em seguida, os animais foram eutanasiados com anestésico MS 222 (tricaína, Sigma–Aldrich) na concentração de 0,1 g.L⁻¹. As amostras de fígado foram maceradas em tampão PBS pH 7,2, centrifugadas a 3600 por 15 minutos e os sobrenadantes submetidos às análises *in vivo*.

2.5. Dosagem dos níveis de cortisol

Os níveis de cortisol dos animais foram avaliados de acordo com a metodologia descrita por Sink *et al.* (2007) e Barcellos *et al.* (2009). Logo após serem submetidos ao protocolo de estresse, os peixes foram capturados e imediatamente congelados a -20°C até o momento da extração do cortisol. Cada jundiá foi pesado e triturado. Em seguida 0,5 g de amostra foi macerada com 3 mL de tampão fosfato salino (PBS-pH 7,4) até a completa homogeneização. Em tubos de ensaio foi adicionada uma alíquota de 1 mL do homogeneizado e 3mL de éter etílico. Os tubos de ensaio foram colocados em um vasilhame com nitrogênio líquido, onde o éter etílico contendo cortisol foi decantado. O éter etílico foi transferido para um novo tubo e completamente evaporado, obtendo-se um extrato de lipídios contendo o cortisol. O extrato foi armazenado a -20 ° C até a leitura das amostras através do kit ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay- EIAgen™ Cortisol Test; BioChem ImmunoSystems).

2.6. Dosagem de proteínas

As proteínas foram determinadas pelo método de Lowry, utilizando albumina como padrão (LOWRY *et al.*, 1951).

2.7. Avaliação da peroxidação lipídica tecidual (TBARS)

A lipoperoxidação foi estimada pelo doseamento das espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), realizada por uma reação com MDA e ácido 2-tiobarbitúrico (TBA), a qual foi medida opticamente. Foram utilizados 250 μ L do sobrenadante do homogenato dos fígado e homogeneizado em TCA 10%, TBA 0,67% e água ultra pura para um volume final de 2,0 mL. A mistura foi colocada em tubos de microcentrífuga e incubada durante 60 min a 95 ° C. Em seguida, foi adicionado nos tubos 1,5 mL de n-butanol, agitado por 40 s em vórtex e centrifugados a 3600 rpm por 20 minutos. A densidade óptica do sobrenadante foi medida por espectrofotometria a 535 nm. Os níveis de TBARS foram expressos como nmol MDA / mg proteína de acordo com Buege e Aust (1978).

2.8. Avaliação do sistema de defesa antioxidante enzimático

2.8.1. Superóxido dismutase (SOD)

A SOD medida no fígado foi baseada na inibição da reação de radical superóxido com a adrenalina como descrito por Mishra e Fridovich (1972). Neste método, a SOD presente na amostra compete com o sistema de detecção para radical superóxido. Uma unidade da enzima SOD é definida como a quantidade de enzima que inibe a velocidade de oxidação da adrenalina em 50%. SOD é determinada pela medição da velocidade de formação de adrenocromo, observada a 480 nm, num meio de reação que contém a glicina-NaOH (50 mM, pH 10,2) e adrenalina (60 mM, pH 1,7).

2.8.2. Glutathione S – transferase (GST)

A atividade da GST foi medida no fígado usando um procedimento descrito por Habig *et al.* (1974), que envolveu 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) como substrato. A mistura do ensaio continha CDNB 30 mM (em etanol), 75 mM de GSH, tampão de fosfato de potássio 20 mM (pH 6,5), e 34 µL do tecido homogeneizado. A atividade da enzima foi calculada a partir das alterações na absorvância a 340 nm usando um coeficiente de extinção molar de 9,6 mmol⁻¹. cm⁻¹. Uma unidade de atividade de GST foi definida como a quantidade de enzima necessária para catalisar a conjugação de um 1 mol de CDNB com GSH / minuto a 25 ° C.

2.8.3. Catalase (CAT)

A atividade da catalase foi determinada pela velocidade de consumo do H₂O₂ no primeiro minuto da reação, a 240 nm de acordo com Aebi (1984). Foi descontado ainda o desaparecimento do peróxido de hidrogênio sem a presença da amostra. O ensaio enzimático foi realizado em tampão fosfato de potássio (50 mM, pH 7,0) contendo 30 µL de homogenato do fígado dos animais. Como substrato iniciador utilizou-se 70 µL de H₂O₂ 0,3M. A absorvância basal é descontada a partir da leitura da reação do ensaio na ausência da amostra. A catalase foi calculada em k/g de proteína.

2.9. Avaliação do sistema de defesa antioxidante não enzimático

2.9.1. Tióis não - proteicos (SHNP)

A determinação dos tióis – não proteicos foi realizada de acordo com Ellman (1959), com algumas modificações. Inicialmente, uma alíquota de 150 µL do sobrenadante foi homogeneizada com 150 µL de ácido tricloroacético 10%. Em seguida, 100 µL do homogeneizado era misturado com DTNB 10 mM, tampão fosfato 0,5 M pH 7- 7,5, água ultrapura e Tris 1 M. Após 10 minutos, a leitura das amostras foi realizada por espectrofotometria a 412 nm. Os níveis de tióis não - protéicos foram expressos em nmol/ mg de proteína.

2.10. Análises estatísticas

O tratamento estatístico dos dados obtidos foi realizado através de uma análise multivariada de variância complementada pelo teste de Tukey, admitindo-se um nível de significância de no mínimo $p < 0,05$. O software utilizado foi o GraphPad InStat 3.00 (GraphPad Software, San Diego, Califórnia, EUA).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Níveis de cortisol

Após quinze dias de tratamento com diferentes concentrações do extrato de *Plinia trunciflora* e após serem submetidos a um fator de estresse, foram determinados os níveis de cortisol no organismo dos animais. Os resultados apresentam-se na Figura 1.

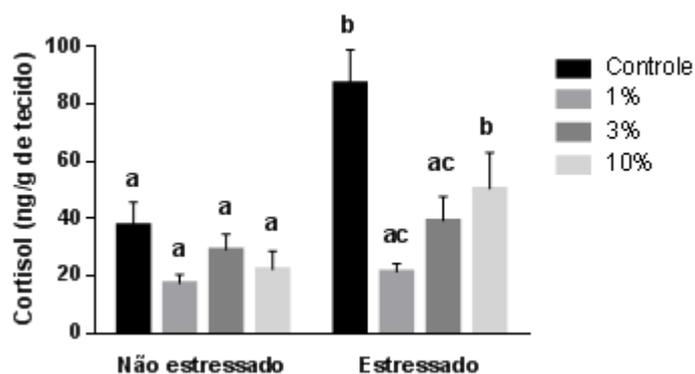


Figura 1: Níveis de cortisol em juvenis de *Rhamdia quelen* tratados com extrato de *Plinia trunciflora*. Os valores são expressos como média \pm desvio padrão (n=8). Letras diferentes representam diferença estatística ($p < 0,05$).

Verifica-se que o protocolo de estresse agudo, o qual os peixes foram submetidos, mostrou-se eficiente, uma vez que, apresentou níveis de cortisol significativamente maiores no grupo submetido ao estresse, quando comparado com o grupo controle.

Avaliando os tratamentos com as diferentes concentrações de extrato de *Plinia trunciflora*, observa-se que não houve diferença ($p > 0,05$) no grupo controle, no entanto, no grupo estressado, os tratamentos com 1 e 3% de extrato diferiram do tratamento controle estressado e do tratamento com 10% de extrato, apresentando um decréscimo nos níveis de cortisol, sendo comparáveis com os tratamentos que não foram submetidos ao protocolo de estresse. Deste modo, pode-se dizer que, o extrato de *Plinia trunciflora* pareceu exercer efeito sobre os níveis de cortisol em jundiá (*Rhamdia quelen*).

Em juvenis de *Rhamdia quelen* com aproximadamente 120 dias submetidos a um protocolo de estresse por perseguição com uma caneta, foram observados níveis significativamente elevados de cortisol, quando comparados com o controle (CERICATO *et al.*, 2008). Aumentos nos níveis desse hormônio ocasionados por um fator de estresse físico agudo, como o do presente estudo, também foram observados em zebrafish (*Danio rerio*). O protocolo avaliado para a espécie foi o protocolo de estresse agudo de contenção onde os animais permaneceram em microtubos de 2 mL com aberturas nas extremidades durante 90 minutos em tanque de 20 L (DAL SANTO *et al.*, 2014).

O potencial dos extratos vegetais tem sido evidenciado na aquicultura, pois são alternativas sustentáveis que podem contribuir para o controle de muitas enfermidades. Possuem várias atividades tais como, promotoras de crescimento, imunoestimulantes, antimicrobianas entre outras (CITARASU, 2003; DIREKBUSARAKOM, *et al.*, 1996; GALINA *et al.*, 2009), como também mostrado por Parodi *et al.* (2014) que utilizou o óleo essencial de *Aloysia triphylla* como anestésico em linhagens cinza e albina de jundiá (*Rhamdia quelen*). A concentração de 50 $\mu\text{L.L}^{-1}$ do óleo essencial provocou uma diminuição nos níveis de cortisol na linhagem cinza de juvenis de jundiá, após o transporte dos animais.

Os fatores estressantes de natureza química, os quais os peixes estão frequentemente expostos, como os agroquímicos, por exemplo, têm sido amplamente estudados (CERICATO *et al.*, 2008; HONTELA, 1998; PACHECO; SANTOS, 1996, 2001) demonstrando efeitos deletérios sobre a resposta do cortisol e um comprometimento da capacidade do animal para montar uma resposta adequada ao fator de estresse. No presente estudo, a resposta do cortisol a um fator de estresse físico foi um aumento significativo nos seus níveis, podendo apresentar respostas diferentes, dependendo do agente estressor e da intensidade do estresse a que o peixe for submetido.

3.2. Peroxidação lipídica tecidual (TBARS)

A Figura 2 apresenta os níveis de peroxidação lipídica avaliados no fígado de juvenis de *Rhamdia quelen* tratados com extrato de *Plinia trunciflora*.

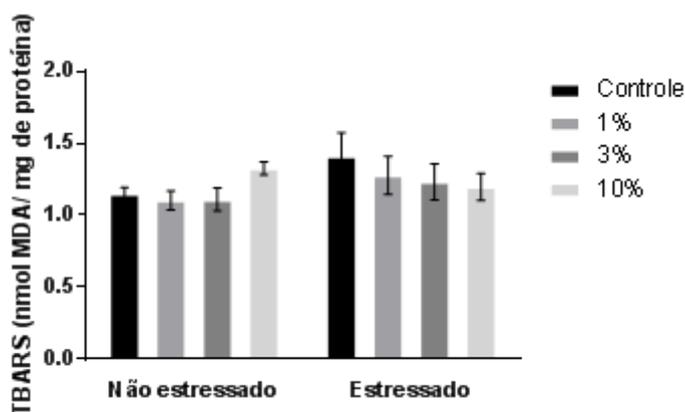


Figura 2: Níveis de TBARS (nmol MDA. mg⁻¹ de proteína) em juvenis de *Rhamdia quelen* tratados com extrato de *Plinia trunciflora*. Os valores são expressos como média \pm desvio padrão (n=8). Letras diferentes representam diferença estatística (p < 0,05).

A geração de níveis elevados de TBARS principalmente no fígado é uma clara indicação de LPO, uma vez que a intensidade da peroxidação lipídica é determinada pela quantificação de um dos seus principais produtos finais, o dialdeído malônico (MDA) (LUSHCHAK *et al.*, 2009).

Observa-se na Figura 2 que, os níveis de peroxidação lipídica não foram significativamente alterados nos dois grupos avaliados, não possibilitando, portanto, observar algum efeito do extrato sobre esse parâmetro. Esses resultados indicam que o modelo de estresse utilizado não foi suficiente para provocar uma alteração nos níveis de peroxidação lipídica.

Níveis elevados de TBARS e superiores aos encontrados no presente trabalho foram observados em jundiás expostos (96 horas) a outros agentes estressores, os agentes estressores químicos como os agrotóxicos *Roundup* e *Tebuconazole* (FERREIRA *et al.*, 2013; MENEZES *et al.*, 2011). De acordo com Ahmad *et al.* (2004), a peroxidação lipídica (LPO) é um dos principais processos induzidos pelo estresse oxidativo por xenobióticos tais como pesticidas, herbicidas e fungicidas, como tem sido observado em várias espécies de peixes.

A ausência de alteração no TBARS no grupo estressado pode ser atribuída ao aumento das defesas antioxidantes não enzimáticas (SHNP), que foi suficiente para prevenir que os radicais livres gerados causassem danos oxidativos aos lipídios, como mostra a Figura 3.

3.3. Sistema de defesa antioxidante

O modelo de estresse de perseguição por rede causou um aumento na atividade da SOD, o qual foi prevenido pelo tratamento com extrato de *Plinia trunciflora* na concentração de 1% e parcialmente prevenido pelo extrato na concentração de 10% (Figura 3). O decréscimo na atividade da CAT observado no grupo estressado foi prevenido pelas três concentrações de extrato, sendo que na concentração de 3%, a atividade dessa enzima foi ainda maior do que no grupo controle não estressado que recebeu ou não o extrato nas três concentrações.

A SOD catalisa a dismutação do ânion superóxido em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio, enquanto que a CAT remove o peróxido de hidrogênio, que é metabolizado em oxigênio e água. Assim, o aumento na atividade da SOD com uma diminuição paralela da CAT verificado no grupo estressado, pode indicar uma catálise aumentada na dismutação do íon superóxido (O_2^-), ou seja, um aumento na formação do H_2O_2 , com menor remoção dessa espécie reativa. Por outro lado, a prevenção concomitante do aumento da SOD e da diminuição da CAT pelo extrato de *Plinia trunciflora* (1 e 10%) sugere que o extrato aumenta a proteção antioxidante contra o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) gerado pelo modelo de estresse utilizado no presente estudo. Mesmo que a concentração 3% do extrato não tenha prevenido o aumento da SOD, a prevenção da diminuição da CAT também pode contribuir para a proteção contra a produção aumentada de H_2O_2 .

Verificou-se que a SOD e a CAT agiram conjuntas na prevenção do dano oxidativo, podendo suas ações serem aumentadas pelo extrato de *Plinia trunciflora*. Segundo Gaetani *et al.* (1989), a ação combinada de ambas as enzimas é um componente importante do sistema de defesa antioxidante primário.

De forma semelhante ao seu efeito sobre a atividade da SOD, o extrato de *Plinia trunciflora* também protegeu o decréscimo na atividade da GST causado pelo modelo de indução de estresse, porém nas concentrações de 1 e 3%, enquanto que parece ter sido potencializado pelo extrato na concentração de 10%.

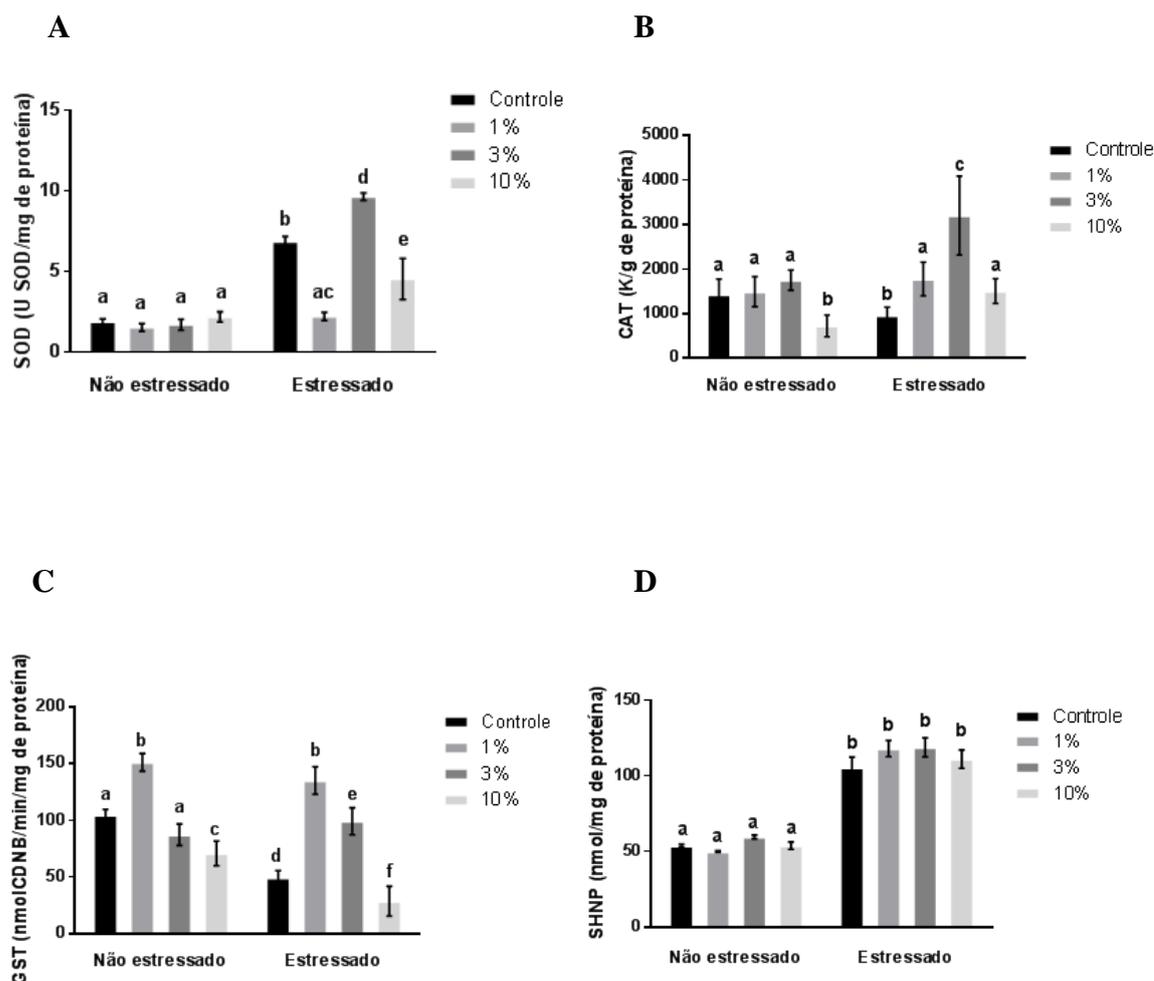


Figura 3: Atividade da Superóxido dismutase (SOD, U SOD mg proteína⁻¹) **A**, Catalase (CAT, K g proteína⁻¹) **B**, Glutationa- S- transferase (GST, nmol CDNB min mg proteína⁻¹) **C** e Tióis não proteicos (SHNP, nmol mg proteína⁻¹) **D** em juvenis de *Rhamdia quelen* tratados com extrato de *Plinia trunciflora*. Os valores são expressos como média \pm desvio padrão (n=8). Letras diferentes representam diferença estatística (p < 0,05).

O sistema de defesa antioxidante não enzimático, avaliado através dos níveis de tióis não proteicos também foi aumentado no grupo estressado, e esse efeito não foi prevenido pelo extrato, pois não apresentou diferenças significativas em relação ao grupo estressado em nenhuma das concentrações do extrato de *Plinia trunciflora* (p > 0,05).

Uma estratégia interessante que pode ser utilizada para avaliar o perfil redox de amostras biológicas é a medição dos níveis de tiol. Os aumentos nos níveis de tióis nos grupos expostos a um fator de estresse oxidativo, podem indicar a existência de uma resposta adaptativa à produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) durante condições de estresse.

Tióis não proteicos são maioritariamente compostos de GSH, um importante antioxidante não enzimático que mantém a homeostase redox intracelular (DAL SANTO *et al.*, 2014).

Em um estudo para avaliar produtos apícolas sob o estresse oxidativo em jundiás expostos ao fungicida *Tebuconazole* (Teb), Ferreira *et al.* (2013) demonstraram que em pelo menos um dos tratamentos com produtos apícolas houve um aumento das atividades antioxidantes enzimáticas e que, deste modo, o mecanismo predominante para a reversão de danos oxidativos pareceu ser o aumento da atividade das enzimas SOD, CAT e GST. Estes efeitos foram provavelmente causados pelos elevados teores de polifenóis destes compostos apícolas. Comportamento semelhante das atividades enzimáticas foi observado no presente trabalho, podendo esse efeito ser atribuído principalmente às antocianinas presentes no extrato de *Plinia trunciflora*.

Utilizamos a jabuticaba neste estudo por se tratar de uma fonte rica em compostos antioxidantes, que tem suas propriedades comprovadas por diversos estudos e também por ser uma planta nativa, comumente encontrada na região Sul do Brasil.

Embora a atividade antioxidante da jabuticaba tenha sido comprovada em mamíferos, sendo ativa na redução do estresse oxidativo e na prevenção de algumas doenças (BRITO *et al.*, 2007; DAI *et al.*, 2009; LEITE-LEGATTI *et al.*, 2012; EINBOND *et al.*, 2004; REYNERTSON *et al.*, 2005; REYNERTSON *et al.*, 2008; TERCI, 2004), não existem estudos desse efeito em peixes.

4. CONCLUSÃO

A proteção fornecida pelo extrato da *Plinia trunciflora* contra as alterações provocadas pelo estresse induzido pela perseguição por rede nas atividades enzimáticas (SOD, CAT e GST) pode estar envolvido nos mecanismos dos efeitos antioxidantes *in vivo* da jabuticaba. Mesmo que não tenha sido observado dano oxidativo aos lipídios, nem diminuição nos níveis dos grupos SHNP nos animais estressados, essa proteção sobre as atividades das enzimas antioxidantes, contribuiu para melhorar o status antioxidante dos peixes sob situação de estresse. Esse efeito protetor do extrato pode possivelmente ser atribuído aos teores significativos de compostos bioativos, tais como as antocianinas.

Destaca-se o potencial da *Plinia trunciflora* para ser utilizado na piscicultura como uma alternativa sustentável aos produtos químicos, para que os animais superem de maneira saudável alguns fatores de estresse, aos quais estão frequentemente submetidos, tais como a forma de confinamento, captura ou mudanças no ambiente físico, impactando deste modo, em menores riscos para o meio ambiente.

5. REFERÊNCIAS

- AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods Enzymol**, v.105, p.121-126. 1984.
- AHMAD, I.; PACHECO, M.; SANTOS, M.A. Enzymatic and enzymatic antioxidants as an adaptation to phagocytes induced damage in *Anguilla anguilla* L. following in situ harbor water exposure. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 57, p. 290–295, 2004.
- BALCÁZAR, J.L.; DE BLAS, I.; RUIZ-ZARZUELA, I.; CUNNINGHAM, D.; VENDRELL, D.; MUZQUIZ, J.L. The role of probiotics in aquaculture: Review. **Veterinary Microbiology** v. 114, p.173–186, 2006.
- BARCELLOS, L. J. G.; VOLPATO, G. L.; BARRETO R. E.; COLDEBELLA, I.; FERREIRA, D. Chemical communication of handling stress in fish. **Physiology & Behavior** v. 103, p.372–375, 2011.
- BARCELLOS, L.J.; KREUTZ, L.C. MEZZALIRA, R.; DA ROSA, J.G.S.; KOAKOSKI, G.; CENTENARO, L.; POTTKER, E. Influence of color background and shelter availability on jundiá (*Rhamdia quelen*) stress response. **Aquaculture**, v. 288, p.51–56, 2009.
- BARCELLOS, L.J.G.; WOEHL, V.M.; WASSERMANN, G.F.; KRIEGER, M.H.; QUEVEDO, R.M.; LULHIER, F. Plasma levels of cortisol and glucose in response to capture and tank transference in *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard), a South American catfishes. **Aquaculture Research**, v. 32, p.123–125, 2001.

BRITO, E. S.; ARAÚJO, M. C. P.; ALVES, R. E., CARKEET, C.; CLEVIDENCE, B. A.; NOVOTNY, J. A. Anthocyanins present in selected tropical fruits: acerola, jambolão, jussara, and guajiru. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 9389–9394, 2007.

BUEGE, J.A; AUST, S.D. Microsomal lipid peroxidation. **Methods Enzymol**, v. 52, p. 302–309, 1978.

CERICATO, L.; MACHADO NETO, J.G.; FAGUNDES, M.; KREUTZ, L.C.; QUEVEDOC, R.M.; FINCO, J.; DA ROSA, J.G.S.; KOAKOSKI, G.; CENTENARO, L.; POTTKER, E.; ANZILIERO, D.; BARCELLOS, L.J.G. Cortisol response to acute stress in jundiá *Rhamdia quelen* acutely exposed to sub-lethal concentrations of agrichemicals. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 148, p. 281–286, 2008.

CITARASU, T.; RAMALINGAM, K.; RAJA.; BABU, M.; MARIAN, M P. Influence of the antibacterial herbs, *Solanum trilobatum*, *Andrographis paniculata* and *Psoralea corylifolia* on the survival, growth and bacterial load of *Penaeus monodon* post larvae. **Aquaculture International**, v. 11, p. 583 – 595, 2003.

DAI, J.; GUPTA, A.; GATES, L.; MUMPER, R.J. A comprehensive study of anthocyanin-containing extracts from selected blackberry cultivars: Extraction methods, stability, anticancer properties and mechanisms. **Food and Chemical Toxicology**, v. 47, p. 837–847, 2009.

DAL SANTO, G.; CONTERATO, G. M.M.; BARCELLOS, L.J.G.; ROSEMBERG, D.B.; PIATO, A.L. Acute restraint stress induces an imbalance in the oxidative status of the zebrafish brain. **Neuroscience Letters**, p. 558, p.103–108, 2014.

DIREKBUSARAKOM, S.; HERUNSALEE, A.; YOSHIMIZU, M.; EZURA Y. Antiviral activity of several Thai traditional herb extracts against fish pathogenic viruses. **Fish Pathology**, v. 31, p. 209-213, 1996.

ELLMAN, G.L. Tissue sulfhydryl groups. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 82, p. 70–77, 1959.

EPAGRI/CEDAP. **Síntese da produção da piscicultura catarinense em 2012**. Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina /Centro de Desenvolvimento em Aquicultura e Pesca. Florianópolis-SC, 2013.

FERREIRA, D.; ROCHA, H.C.; KREUTZ, L.C.; LORO, V.L.; MARQUEZE, A.; KOAKOSKI, G.; DA ROSA, J.G.S.; GUSSO,D.; OLIVEIRA, T.A.; DE ABREU, M.S.; BARCELLOS, L.J.G. Bee Products Prevent Agrichemical-Induced Oxidative Damage in Fish. **Plos one**, v. 8, p.74499, 2013.

FERREIRA, D.; MOTTA, A.C.; KREUTZ, L.C.; TONI, C.; LORO, V.L., *et al.* Assessment of oxidative stress in *Rhamdia quelen* exposed to agrichemicals. **Chemosphere**, v. 79, p. 914–921, 2010.

GAETANI, G.F.; GALIANO, S.; CANEPA, L.; FERRARIS, A.M.; KIRKMAN, H.N. Catalase and glutathione peroxidase are equally active in detoxification of hydrogen peroxide in human erythrocytes. **Blood**, v. 73, p. 334–339, 1989.

GALINA, J.; YIN, E.G.; ARDO, E.L.; JENEY, E.Z. The use of immunostimulating herbs in fish. An overview of research. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 35, p. 669–676, 2009.

GRAF, J. R.; MAHONEY, R.G.; BRYANT, J.W. Eaton, Iron-catalyzed hydroxyl radical formation. Stringent requirement for free iron coordination site, **Journal of Biological Chemistry**, v. 259, p. 3620–3624, 1984.

HABIG, W.H; PABST, M.J; JACOBY, W.B. Glutathione S-transferase, the first enzymatic step in mercapturic acid formation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 249, p. 7130–7139, 1974.

HALLIWELL, B. Biochemistry of oxidative stress. **Biochemical Society Transactions**, v. 35. p. 1147 -1150, 2007.

HALLIWELL, B.; WHITEMAN, M. Measuring reactive species and oxidative damage *in vivo* and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? **British Journal of Pharmacology**, v. 142, p. 231-55, 2004.

HONTELA, A. Interrenal dysfunction in fish from contaminated sites: *in vivo* and *in vitro* assessment. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v.17, p. 44–48, 1998.

LEITE-LEGATTI, A.V.; BATISTA, A. G.; ROMANELLI, N.; DRAGANO, V.; MARQUES, A.C.; MALTA, L.G.; RICCIO, M.F.; EBERLIN, M.N.; MACHADO, A.R.T.; CARVALHO-SILVA, L.B, *et al.* Jaboticaba peel: Antioxidant compounds, antiproliferative and antimutagenic activities. **Food Research International**, v. 49, p. 596–603, 2012.

LOWRY, O.H.; ROSENBOUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurements with the Folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265-275, 1951.

LUSHCHAK, O.V; KUBRAK, O.I; STOREY, J.M; STOREY, K.B; LUSHCHAK, V.I. Low toxic herbicide roundup induces mild oxidative stress in goldfish tissues. **Chemosphere**, v.76, p.932–937, 2009.

MENEZES, C.C DE.; FONSECA, M.B.DA.; LORO, V.L.; SANTI, A.; CATTANEO, R.; CLASSEN, B.; PRETTO, A.; MORSCH, V.M. Roundup Effects on Oxidative Stress Parameters and Recovery Pattern of *Rhamdia quelen*. **Environmental Toxicology**, v. 60, p. 665–671, 2011.

MISRA, H.P; FRIDOVICH, I. The role of superoxide anion in the auto-oxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 247, p. 3170–3175, 1972.

MONTEIRO, D. A.; RANTIN, F. T.; KALININ, A. L. Uso do selênio na dieta de matrinxã, *Brycon cephalus*. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.8, p. 32-47, 2007.

OBA, E.T.; MARIANO, W.S.; SANTOS, L. R. B. **Estresse em peixes cultivados: agravantes e atenuantes para o manejo rentável**. Manejo e sanidade de peixes em cultivo. EMBRAPA AMAPÁ-MACAPÁ, 2009.

PACHECO, M., SANTOS, M.A. Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in the erythrocytes of *Anguilla anguilla* L. exposed either to cyclophosphamide or to bleached kraft pulp mill effluent. **Fresenius Environ. Bull.** 5, 746–751. 1996.

PACHECO, M.; SANTOS, M.A. Biotransformation, endocrine, and genetic responses of *Anguilla anguilla* L. to petroleum distillate products and environmentally contaminated waters. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 49, p. 64–75, 2001.

PARODI, T.V; CUNHA, M.A; BECKER, A.G; ZEPPEFELD, C.C; MARTINS, D.I; KOAKOSKI, G; BARCELLOS, L.G; HEINZMANN, B.M; BALDISSEROTTO, B. Anesthetic activity of the essential oil of *Aloysia triphylla* and effectiveness in reducing stress during transport of albino and gray strains of silver catfish, *Rhamdia quelen*. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 40, p.323–334, 2014.

PICKERING, A.D. Stress and fish. London: **Academic Press**, 1981.

REYNERTSON, K.A.; BASILE, M.J.; KENNELLY, E.J. antioxidant potential of seven myrtaceous fruits. **Ethnobotany Research & Applications**, v. 3, p. 25-35, 2005.

REYNERTSON, K.A.; YANG, H.; JIANG, B.; BASILE, M.J.; KENNELLY, M.E.J. Quantitative analysis of antiradical phenolic constituents from fourteen edible Myrtaceae fruits. **Food Chemistry**, v.109, p. 883-890, 2008.

SANTOS, G.O. Fecundidade do Jundiá, *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard, 1824) parasitados por *Argulus* sp. em tanques de terra (*Teleostei: Pimelodidae*). **Comum. Mus. Ciênc. Tecnol. PUCRS, Sér. Zool.**, Porto Alegre, v.15, n. 1, p.55-60, julho, 2002.

SINK, T.D; KUMARAN, S; LOCHMANN, R.T. Development of a whole-body cortisol extraction procedure for determination of stress in golden shiners, *Notemigonus crysoleucas*. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 33, p. 183–193, 2007.

VOLP, A.C.P.; RENHE, I.R.T.; BARRA, K.; STRINGUETTA, P.C. Flavonóides antocianinas: características e propriedades na nutrição e saúde. **Revista Brasileira de Nutrição Clínica**, v. 23, p.141-9, 2008.

WENDELAAR BONGA, S.E. The Stress Response in Fish. **Physiology**, v. 77, p. 591-625, 1997.