

UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
NÚCLEO DE PESQUISAS EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
LABORATÓRIO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR

Suplementação da Dieta com Polpa do Fruto do Açaí (*Euterpe oleraceae* Martius) Melhora o Perfil Lipídico e a Capacidade Antioxidante – Uma Avaliação *in vivo*.

AUTORA: Melina Oliveira de Souza
ORIENTADORA: PROF^a. Dr^a. Maria Lúcia Pedrosa
CO-ORIENTADOR: PROF. Dr. Marcelo Eustáquio Silva

Ouro Preto

2009

UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
NÚCLEO DE PESQUISAS EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
LABORATÓRIO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR

Suplementação da Dieta com Polpa do Fruto do Açaí (*Euterpe oleraceae* Martius) Melhora o Perfil Lipídico e a Capacidade Antioxidante – Uma Avaliação *in vivo*.

AUTORA: Melina Oliveira de Souza
ORIENTADORA: PROF^a. Dr^a. Maria Lúcia Pedrosa
CO-ORIENTADOR: PROF. Dr. Marcelo Eustáquio Silva

Dissertação apresentada ao Programa de Pós – Graduação do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto, como parte integrante dos requisitos para a obtenção do título de Mestre, em Ciências Biológicas, área de concentração: Bioquímica Estrutural e Fisiológica.

Ouro Preto

2009

Este trabalho foi realizado no **Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular** e no **Laboratório de Nutrição Experimental** do Núcleo de Pesquisa em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto, com auxílio da *CAPES*, *FAPEMIG E UFOP*.

DEDICATÓRIA

Ao meu esposo
Amilton Rodrigues da Silva,
pelo amor e
permanente estímulo.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Aos meus professores e orientadores **Maria Lúcia Pedrosa** e **Marcelo Eustáquio da Silva**, pela dedicação, carinho e ensinamentos passados a mim. Sou muita grata a vocês por terem me dado esta oportunidade, e os tenho como exemplo a seguir durante a minha vida profissional.

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, por me conceder a graça de chegar até aqui.

À **minha mãe Maria das Graças O. Souza e meus irmãos Maíra O Souza e Rafael O. Souza**, meu especial agradecimento por estarem sempre presentes em todos os momentos da minha vida, me incentivando.

Ao meu querido pai **Ronaldo O. Souza**, que mesmo não estando entre nós, sei que está sempre iluminando meus passos.

Aos meus tios, **Renato Cruz e Maria de Lurdes Cruz**, pelo constante apoio e carinho a mim dispensado.

A todos **meus familiares** pela amizade e confiança.

À **Larissa Bonomo e Maísa Silva**, grandes amigas que pude ter o enorme prazer de conhecer e conviver durante este período.

Aos **colegas da pós-graduação** pela agradável convivência.

Ao **Jair Pastor Mota** e a **Maria Aparecida Reis Trópia**, pela dedicação e disponibilidade que sempre me atenderam.

À professora **Riva de Paula Oliveira**, pelas horas dispensadas na discussão dos resultados e pelo aperfeiçoamento dado ao manuscrito do trabalho submetido à publicação.

Ao professor **Elísio Alberto Evangelista**, que contribuiu de maneira fundamental para a minha formação em Bioquímica.

A todos os amigos do Laboratório de Nutrição Experimental, em especial ao **Bruno, Emerson, Fabiano, Fabrício, Fernanda, Flávia, Joamyr, Joyce, Heberth, Laura, Leandro, Lorena, Rogério, Sandra, Simone e Wanda** a minha gratidão e a certeza de que, sem vocês, este trabalho não teria sido possível.

RESUMO

O açaí (*Euterpe oleraceae* Martius) é um fruto tipicamente brasileiro e economicamente importante. Relatos populares indicam um efeito positivo do uso medicinal do seu suco e trabalhos que descrevem sua composição demonstraram a presença de compostos fenólicos, fibras, ácidos graxos insaturados e fitosteróis, componentes dietéticos relacionados com o controle da hipercolesterolemia e do balanço redox fisiológico. Assim, o objetivo desse trabalho foi avaliar *in vivo* algumas propriedades funcionais do açaí, especialmente os efeitos hipocolesteremiante e antioxidante, em ratos controles e hipercolesterolêmicos alimentados com a polpa do açaí.

Ratos *Fischer* (fêmeas) foram divididos em quatro grupos (8 animais por grupo): grupo C recebeu dieta padrão AIN-93M (4% óleo de soja); grupo H recebeu dieta hipercolesteremiante (25% de óleo de soja e 1% de colesterol); grupo CA recebeu dieta padrão suplementada com 2% de açaí e grupo HA recebeu dieta hipercolesteremiante suplementada com 2% de açaí. Os animais foram alimentados *ad libitum* por 8 semanas. Os dados foram analisados por ANOVA, análise bivariada. Diferenças de $P < 0,05$ foram consideradas significativas.

Como esperado a dieta hipercolesteremiante provocou um aumento do colesterol sérico total e da fração não-HDL e uma diminuição do colesterol HDL. Redução na atividade da paraoxonase e aumento na atividade da superóxido dismutase foram também observados. A adição de açaí, tanto na dieta hipercolesteremiante quanto na padrão, mostrou efeito positivo. Os animais do grupo HA apresentaram redução de 33% nos níveis séricos de colesterol total e da fração não-HDL, quando comparados aos animais do grupo H. Além disso, a atividade da Paraoxonase – Arolesterase foi aumentada significativamente quando ambas as dietas eram suplementadas com o açaí (C: 37.1 ± 7.6 U/mL / CA: 65.17 ± 7.45 U/mL / H: 16.7 ± 3.24 U/mL / HA: 27.39 ± 9.09 U/mL). A atividade da Superóxido Dismutase e a concentração de Glutathione Total também foram aumentadas no grupo H e a presença de açaí na dieta hipercolesteremiante reverteu este efeito. Além disso, foi observada uma redução de 48% na concentração de proteína carbonílica (produto de oxidação

protéica) nos animais onde as dietas foram suplementada com açaí (grupos CA e HA) comparado aos grupos C e H.

Nossos resultados mostram que o consumo da polpa de açaí melhora o *status* antioxidante e o perfil lipídico em um modelo animal de hipercolesterolemia induzida pela dieta, sugerindo ter o açaí um valor significativo como alimento funcional.

ABSTRACT

Açaí (*Euterpe oleraceae* Martius) is a typically Brazilian fruit and it is economically important. Popular reports indicate a positive effect of the medicinal use of its juice and the papers that describe the fruit composition demonstrate the presence of phenolics, fiber, unsaturated fatty acids and phytosterols and these are dietetic compounds related to the control of hypercholesterolemia and of the physiological redox balance. Thus the aim of the present work was to assess *in vivo* some functional properties of açaí, especially the antioxidant and the hypocholesterolemic effects in both control and hypercholesterolemic rats consuming of açaí fruit pulp.

Female Fisher rats were divided into 4 groups (8 animals per group): Group C received the standard AIN-93M diet (4% soybean oil); group H received a hypercholesterolemic diet (25% soybean oil and 1% cholesterol); Group CA received the standard diet supplemented with 2% of açaí and group HA received the hypercholesterolemic diet plus 2% açaí. Animals were fed *ad libitum* for 8 weeks. Data were analysed by two-way ANOVA and differences with $p < 0.05$ were considered significant.

As expected the hypercholesterolemic diet provoked an increase of total serum cholesterol and of the non HDL fraction as well as a decrease in HDL the fraction. Reduction of the paraoxonase and increase in the superoxid dismutase (SOD) activities were also observed. Açaí addition both in the control and the hypercholesterolemic diets showed a positive effect. HA animals had 33% lower levels of total and non-HDL cholesterol fractions as compared with the controls. Besides it paraoxonase - arylesterase activity was significantly increased when the diets were supplemented with the fruit. (C: 37.1 ± 7.6 U/mL / CA: 65.17 ± 7.45 U/mL / H: 16.7 ± 3.24 U/mL / HA: 27.39 ± 9.09 U/mL). SOD activity and total glutathione concentration were also found augmented in the H group and the presence of the fruit in the hypercholesterolemic diet reverted this effect. In addition a 48% reduction in the concentration of carbonilic protein (product of protein oxidation) was observed in the açaí supplemented animals as compared with non supplemented ones.

Our results show that açai intake improves the antioxidant status and lipid profile in an animal model of diet-induced hypercholesterolemia, suggesting that the fruit has a significant value as a functional food.

SUMARIO

RESUMO.....	VII
ABSTRACT.....	IX
1 – INTRODUÇÃO	1
2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 – Alimentos Funcionais	3
2.2 – O Fruto do Açaí e seu Potencial como Alimento Funcional	4
2.3 – Efeitos Funcionais dos Componentes Presentes no Fruto do Açaí.....	8
2.3.1 - Ácidos Graxos insaturados.....	8
2.3.2 - Fibras Alimentares.....	11
2.3.3 - Esteróides Vegetais.....	13
2.3.4 - Flavonóides.....	15
2.4 – Efeitos Funcionais da Polpa do Açaí - Trabalhos <i>in vitro</i>	200
2.5 – Efeitos Funcionais da Polpa do Açaí - Trabalhos <i>in vivo</i>	23
3 – OBJETIVOS	26
3.1 – Objetivo Geral.....	26
3.2 – Objetivos Específicos	26
4 – MATERIAL E MÉTODOS	27
4.1 – Animais	27
4.2 – Dietas	27
4.3 – Delineamento Experimental	29
4.4 – Dosagens dos Parâmetros Bioquímicos	299
4.4.1 - Paraoxonase - Atividade Arilesterásica.....	30
4.4.2 - Paraoxonase - Atividade Paraoxonase.....	31
4.4.3 - Superóxido Dismutase.....	31
4.4.4 - Concentração de Glutathione Total.....	33
4.4.5 - Catalase.....	35
4.4.6 - Proteína Carbonílica.....	36
4.4.7 - Grupos Sulfidrilas.....	38
4.5 - Análise Estatística.....	41
5 – RESULTADOS	42
5.1 Crescimento corporal, ingestão alimentar, excreção fecal e peso dos órgãos	442
5.2 Perfil lipídico.....	45
5.3 Defesas antioxidantes.....	46
5.4 Concentração de proteína carbonílica e grupos sulfidrilas.....	48
5.5 Indicadores bioquímicos da função hepática.....	50
6 - DISCUSSÃO.....	51

7 - CONCLUSÕES.....	60
8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	61
ANEXOS	77
Anexo I - Protocolo das Dosagens Bioquímicas.....	77
I.1 - Alanina Aminotransferase.....	77
I.2 - Aspartato Aminotransferase.....	78
I.3 - Colesterol HDL.....	79
I.4 - Colesterol Total.....	80
I.5 - Fosfatase Alcalina.....	81
I.6 - Triacilgliceróis.....	83
I.7 - Proteínas Totais.....	84
Anexo II – Trabalhos submetidos à publicação	86

LISTA DE TABELAS

Tabela I – Composição das dietas experimentais (g / Kg de dieta).

Tabela II – Crescimento corporal, ingestão alimentar, excreção fecal e peso dos órgãos de ratos tratados com dieta padrão (C), padrão acrescida de açaí (CA), hipercolesterolemiantes (H) e hipercolesterolemiantes acrescida de açaí (HA).

Tabela III – Colesterol total, colesterol não - HDL, colesterol HDL e triacilgliceróis séricos de ratos tratados com dieta padrão (C), padrão acrescida de açaí (CA), hipercolesterolemiantes (H) e hipercolesterolemiantes acrescida de açaí (HA).

Tabela IV – Atividade arilesterásica e paraoxonase da enzima paraoxonase no soro, atividade sérica da superóxido dismutase, concentração hepática de glutatona total e atividade da catalase no fígado de ratos tratados com dieta padrão (C), padrão acrescida de açaí (CA), hipercolesterolemiantes (H) e hipercolesterolemiantes acrescida de açaí (HA).

Tabela V – Concentração sérica de proteína carbonílica, radical sulfidrila total, radical sulfidrila livre e radical sulfidrila ligado a proteína de ratos tratados com dieta padrão (C), padrão acrescida de açaí (CA), hipercolesterolemiantes (H) e hipercolesterolemiantes acrescida de açaí (HA).

Tabela VI – Atividade sérica da aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT) e fosfatase alcalina (ALP) de ratos tratados com dieta padrão (C), padrão acrescida de açaí (CA), hipercolesterolemiantes (H) e hipercolesterolemiantes acrescida de açaí (HA).

LISTA DE FIGURAS

Figura I – Fotos do Açaí (*Euterpe oleraceae* Martius).

Figura II – Estrutura química das antocianinas presentes no açaí.

Figura III – Estrutura química do colesterol e alguns insaturados (campesterol, β -sitosterol e estigmasterol) e saturado (sitostanol) fitosteróis.

Figura IV – Exemplo da estrutura química geral de um composto fenólico.

Figura V – Estrutura geral dos flavonóides.

Figura VI – Estruturas das principais classes de flavonóides.

ABREVIATURAS

ALP - Fosfatase alcalina

ALT - Alanina aminotransferase

AST - Aspartato aminotransferase

C - Grupo que recebeu dieta padrão

CA – Grupo que, recebeu dieta padrão suplementada com açaí

DCV – Doenças cardiovasculares

GSH - Glutationa reduzida

GSSG - Glutationa oxidada

H - Grupo que recebeu dieta hipercolesterolemiantes

HA - Grupo que recebeu dieta hipercolesterolemiantes suplementada com açaí

MUFA – Ácidos graxos monoinsaturados

PON – Paraoxonase

PPAR – Receptor ativador da proliferação peroxissomal

PUFA – Ácidos graxos poliinsaturados

EROS – Espécies reativas de oxigênio

SAFA – Ácidos graxos saturados

SH Livre – Sulfidril livre

SH Prot. – Sulfidril ligada à proteína

SHTT – Sulfidril total

SOD – Superóxido dismutase

TAG – Triacilgliceróis

ANEXOS

Anexo I – Protocolos das Dosagens Bioquímicas.

- I.1 - Alanina Aminotransferase
- I.2 - Aspartato Aminotransferase
- I.3 - Colesterol HDL
- I.4 - Colesterol Total
- I.5 - Fosfatase Alcalina
- I.6 - Triacilgliceróis
- I.7 - Proteínas Totais

Anexo II – Trabalhos submetidos à publicação.

1 – INTRODUÇÃO

Elevações rápidas e substanciais da mortalidade por causas cardiovasculares têm sido observadas no Brasil, de forma semelhante ao que ocorre para outros países em desenvolvimento (Sociedade Brasileira de Cardiologia, 2007). Projeções indicam que em 2020 as doenças cardiovasculares (DCV) serão responsáveis pela maior parcela dos óbitos no mundo (World Health Organization, 2003).

A distribuição do colesterol entre as várias frações das lipoproteínas plasmáticas é utilizada como marcador biológico para avaliar o risco de desenvolvimento dessas doenças. Sendo a lipoproteína plasmática de baixa densidade (LDL) associada a propriedades aterogênicas, enquanto que a lipoproteína de alta densidade (HDL) está associada a fatores de proteção à lesão aterosclerótica.

Espécies reativas de oxigênio (EROS) podem atacar LDLs, transformando-as em LDL oxidada, a qual é reconhecida por macrófagos e dão origem as células espumosas, caracterizando a primeira manifestação da lesão aterosclerótica (Gant & Heinecke, 2001).

Portanto, a redução do colesterol total e do colesterol LDL são os primeiros passos para a prevenção de DCV. Outro importante passo é a prevenção da ocorrência do dano oxidativo. Existem evidências que altos níveis de antioxidantes estão associados com menores frequências de doenças coronárias (Hussein *et al.*, 2001), e que menores níveis de antioxidantes no plasma podem favorecer a formação de radicais livres e promover a oxidação da LDL (Stocker & Keaney, 2004).

Atualmente, pesquisas têm sido realizadas com o objetivo de identificar caminhos para prevenir o aparecimento de DCV e outras doenças através de mudanças nos hábitos alimentares. Dietas com elevado conteúdo de frutas e vegetais podem inibir o desenvolvimento dessas doenças (Riboli & Norat, 2003). Vários autores têm associado os efeitos benéficos desses alimentos à presença de compostos fenólicos e alguns nutrientes, como por exemplo, ácidos graxos insaturados, fibras e fitosteróis. Eles exercem dentre outras funções, ações antioxidantes e controle nos níveis de colesterol, principalmente à fração LDL (Poli *et al.*, 2008; Szmitko & Verma, 2005).

Euterpe oleraceae Martius é uma palmeira economicamente importante da Amazônia (Lorenzi *et al.*, 1996). Seu fruto é popularmente conhecido como açaí, sendo consumido pela população brasileira em uma variedade de bebidas e preparações alimentares. Gradativamente tem ocorrido a popularização do uso desse fruto por outros países (Menezes *et al.*, 2005), uma vez que seu consumo tem sido associado com vários efeitos benéficos para a saúde, destacando-se o seu potencial antioxidante (Del Pozo-Insfran *et al.*, 2004). Além disso, os efeitos *in vitro* já descritos têm comprovado que o açaí exibe alta capacidade antioxidante, especialmente para os radicais superóxido e peroxila (Del Pozo-Insfran *et al.*, 2004; Schauss *et al.*, 2006a).

Schauss *et al.* (2006b), estudaram a composição fitoquímica e de nutrientes da polpa do açaí, e os resultados mostraram que antocianinas, proantocianinas e outros flavonóides são os principais polifenóis deste fruto. Do total de ácidos graxos presentes na polpa de açaí, 74% são ácidos graxos insaturados, destacando-se principalmente os ácidos oléico e linoléico. Esses autores também observaram a presença de fitosteróis, e encontraram que o β -sitosterol é o que se apresenta em maior quantidade. Toiari *et al.* (2005) mostraram que em 100g de peso seco de açaí encontram-se 12,5g de fibra alimentar. Assim a composição química do fruto do açaí o indica com alto potencial como alimento funcional.

Entretanto, estudos *in vivo* que avaliam os efeitos decorrentes do uso desse fruto são escassos na literatura. Desta forma, este estudo procurou avaliar algumas propriedades funcionais derivadas do consumo regular da polpa do açaí, especialmente sobre ingestão alimentar, crescimento corporal, perfil lipídico, defesas antioxidantes, concentração de biomarcadores do estresse oxidativo e marcadores da função hepática.

2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 – Alimentos Funcionais

Com o aumento da expectativa de vida e ao mesmo tempo o crescente aparecimento de doenças crônicas como obesidade, aterosclerose, hipertensão, osteoporose, diabetes e câncer, está havendo uma maior preocupação, por parte da população e dos órgãos públicos de saúde, com a alimentação. Estes estão cada vez mais conscientes da ligação entre saúde e nutrição (Mollet & Rowland, 2002). Atualmente, alimentos não são utilizados somente como fonte de calorias e nutrientes, eles proporcionam um benefício fisiológico adicional, como a prevenção de uma variedade de doenças e a melhora do bem estar físico e mental dos consumidores (Menrad, 2003). Neste contexto, os alimentos funcionais desempenham um excelente papel.

O termo “alimento funcional” foi primeiramente introduzido no Japão em meados dos anos 80 e se refere aos alimentos processados, contendo ingredientes que auxiliam funções específicas do corpo além de serem nutritivos, sendo estes alimentos definidos como “Alimentos para uso específico da saúde” (Foods for Specified Health Use - FOSHU) em 1991 (Hardy, 2000). Nessa perspectiva, o alimento funcional deve apresentar primeiramente as funções nutricional e sensorial, sendo a funcionalidade a função terciária do alimento (Kwak & Jukes, 2001). As alegações de saúde dos alimentos funcionais são muitas, eles podem atuar, por exemplo, como alimentos designados para reduzir riscos relacionados com o desenvolvimento de doenças, tais como a hipercolesterolemia e o estresse oxidativo (Mäkinen-Aakula, 2006).

Esta classe de alimentos possui variados alcances em diferentes países e uma vasta nomenclatura: nutracêuticos, alimentos de desenho, alimentos para uso médico, alimentos para uso saudável, entre outras. Tanto na literatura científica, quanto na orientada pelo marketing, alimento funcional tem tantas definições quanto o número de autores referindo-se a ele, propondo citações simples até conceitos mais complexos. No Brasil, alimento funcional é definido pela Secretaria de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde, como sendo “aquele alimento ou ingrediente que além das funções nutritivas básicas, quando consumido como parte da dieta usual, produz efeitos

metabólicos e / ou fisiológicos e / ou efeitos benéficos à saúde, devendo ser seguro para consumo sem supervisão médica” (RDC 18/99).

Estudos demográficos mostram que a demanda por esses produtos teve influência de fatores como: os altos custos com o tratamento de doenças, o avanço no conhecimento mostrando a relação entre a alimentação e o binômio saúde / doença e os interesses econômicos da indústria de alimentos. (Mark-Herbert, 2004; Side, 2006). As evidências científicas sobre a eficiência dos alimentos funcionais estão cada vez mais crescentes, e isso faz com que estes produtos representem uma categoria sustentável no mercado de alimentos. Uma vez que o papel da alimentação equilibrada na manutenção da saúde tem despertado cada vez mais o interesse do consumidor (Bech-Larsen & Scholderer, 2007; Jones & Jew, 2007).

2.2 – O Fruto do Açaí e seu Potencial como Alimento Funcional

Euterpe oleraceae Martius é uma palmeira de belo porte, que alcança em torno de 15 a 20 m de altura e 12 a 18 cm de diâmetro, é uma planta que prefere os terrenos alagados e áreas úmidas, por isso sua ocorrência é mais frequente às margens dos rios. Encontrada principalmente na região norte do Brasil, nos estados do Pará, Amazonas, Maranhão e Amapá, e estendendo-se para as Guianas e Venezuela. Dela são extraídos o palmito e o fruto para o consumo alimentar, além disso, suas folhas são usadas para coberturas de casas, a madeira em construções rústicas, as fibras das folhas para tecer chapéus, esteiras e as próprias cestas utilizadas no transporte e comércio do fruto. Portanto é uma planta economicamente importante para a população nativa das regiões produtoras sendo utilizada para suprir várias necessidades (Lorenzi *et al.*, 1996; Souza *et al.*, 1996).

Seu fruto é popularmente conhecido como açaí, conta a lenda, que uma tribo indígena que vivia onde hoje está situada a cidade de Belém, estava passando por um período de escassez de alimentos, levando o cacique a decretar a proibição de nascimentos. Porém, a filha do cacique, a índia Iaçã, ficou grávida. O cacique não voltou atrás em sua decisão e mandou matar seu próprio neto. Iaçã chorava dia e noite a perda do filho, até que uma noite ouviu o choro do filho vindo da direção de uma árvore que tinha umas frutinhas cor de vinho. No dia seguinte a índia Iaçã foi encontrada

morta, abraçada ao tronco desta árvore. Então, o cacique pediu que os cachos da árvore fossem apanhados, tirando daí o fruto para alimentar os índios da tribo. As frutinhas ele chamou de Açaí e revogou o decreto que proibia o nascimento de crianças, pois o açaí bastava para alimentar a todos.

O açaí é um fruto arredondado e pesa cerca de dois gramas, somente 17% dele é comestível (polpa com casca), sendo necessários cerca de 2 kg de frutos para produzir um litro de suco de açaí, o restante representa o caroço, contendo a semente oleaginosa, a cor do fruto maduro é púrpura a quase preta (Oliveira *et al.*, 2000). Os frutos podem ser obtidos por todo o ano, com alta estação entre agosto a dezembro, onde os frutos apresentam melhor qualidade organoléptica (Rogez, 2000). Através do despulpamento manual ou mecânico, obtêm-se o suco que é conhecido como “vinho do açaí” consumido em uma variedade de bebidas e preparações alimentares como, cremes, licor, geléia, mingau, sorvetes e doces (Figura I).

Existem vários relatos populares, especialmente das regiões norte e nordeste do Brasil, indicando o efeito positivo do uso medicinal do açaí no tratamento de diversas desordens, tais como febre, dor, gripe e diarreia (Kong *et al.*, 2003; Menezes *et al.*, 2005). Nos últimos anos a demanda por açaí tem crescido gradativamente, tanto no mercado interno como no externo, sendo consumido pela população do sudeste do Brasil e alguns países da Europa, Estados Unidos, Japão e China (Silva, 2002). A popularização do uso desse fruto se deve ao fato do seu consumo estar associado a vários efeitos benéficos para a saúde, como por exemplo, propriedade antienvhecimento e atividade antioxidante (Menezes *et al.*, 2005; Mertens-Talcott *et al.*, 2008; Schauss *et al.*, 2006a).



Figura I – Fotos do Açaí (*Euterpe oleraceae* Martius).

Fonte: www.amazon-mania.com. A: Palmeira *Euterpe oleraceae* Martius; B: O fruto do açaí; C: Despolpamento mecânico e o suco de açaí na tigela.

A análise da composição fitoquímica da polpa do açaí mostra que este fruto é rico em compostos fenólicos. Segundo Schauss *et al.* (2006b) dentre os fenólicos presentes neste fruto destacam-se os flavonóides, principalmente a classe das antocianinas. Cinco antocianinas foram identificadas no açaí (Figura II), sendo a cianidina 3-glicosídeo e cianidina 3-rutinosídeo as mais predominantes. Doze outros flavonóides também foram identificados, tais como, epicatequina, catequina, homoorientina, orientina, isovitexina, taxifolina deoxihexose (Schauss *et al.*, 2006b).

Schauss *et al.* (2006b) também analisaram os nutrientes que compõem a polpa do açaí, os principais achados mostram que este fruto apresenta quantidades bastante expressivas de ácidos graxos insaturados e fitosteróis. Os autores mostraram que em 100g de peso seco de açaí, 32,5g são gorduras (saturadas e insaturadas). Dessas gorduras totais, 8,5g estão representadas por ácidos graxos saturados, destacando-se a presença do ácido palmítico (C16:0) e, 24g (74%) estão representadas por ácidos graxos insaturados, destacando o ácido oléico (18,3g) e o ácido linoléico (4,1g). Dentre os fitosteróis presentes na composição química do açaí, destacam-se o β -sitosterol, campesterol e estigmasterol.

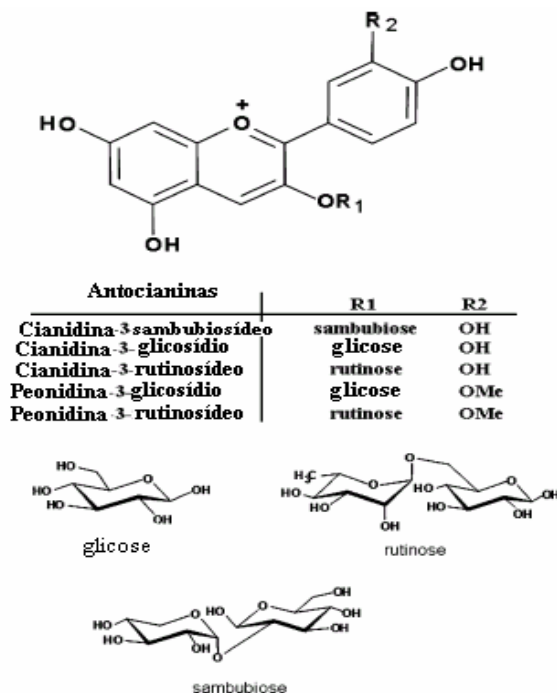


Figura II – Estrutura química das antocianinas presentes no açaí.
Adaptado de: Schauss et al., 2006b.

É importante ressaltar o estudo de Mantovani *et al.* (2003) que avaliaram a possibilidade de ocorrer diferença na composição química, em relação aos ácidos graxos, quando comparado os extratos obtidos de diferentes partes do açaí com o fruto íntegro. Após a realização das cromatografias os autores verificaram que não existia diferença significativa em relação à composição química de ácidos graxos para as diferentes partes do fruto do açaí.

O fruto do açaí apresenta um potencial relevante como fonte de fibra alimentar, possuindo valores superiores aos relatados para morango, figo e goiaba (Ramulu & Udayasekhara Rao, 2003). Sanabria & Sangronis (2007) ao estudar a composição química da polpa do açaí proveniente de duas colheitas do ano de 2005, mostraram que nas duas colheitas (fevereiro / julho) o conteúdo de fibra alimentar foi bastante alto. Para fibra solúvel tem-se 3,6 e 2,0g em 100g peso seco de açaí, na primeira e na segunda colheita, respectivamente. E para fibra insolúvel tem-se 27,3 e 18,0g em 100g peso seco de açaí.

Diante da sua composição de nutrientes (ácidos graxos insaturados, fibras alimentares e fitosteróis) e do seu alto conteúdo de compostos fenólicos, o açaí tem sido

considerado por alguns estudiosos como um alimento funcional, uma vez que, seu consumo está associado a vários benefícios fisiológicos (Bobbio *et al.*, 2000; Menezes *et al.*, 2005).

2.3 – Efeitos Funcionais dos Componentes Presentes no Fruto do Açaí

2.3.1 – Ácidos Graxos Insaturados

A distribuição do colesterol entre as várias frações das lipoproteínas plasmáticas é um marcador biológico utilizado para avaliar o risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares (DCV). A lipoproteína plasmática de baixa densidade (LDL) está associada a propriedades aterogênicas, enquanto que a lipoproteína de alta densidade (HDL) está relacionada a fatores de proteção à lesão aterosclerótica. Os ácidos graxos presentes na dieta podem alterar o perfil das lipoproteínas plasmáticas e conseqüentemente o risco de desenvolvimento de DCV (Lichtenstein, 2006).

A proteção cardiovascular exercida pelas castanhas e o óleo de oliva pode ser explicada pela composição bioquímica desses alimentos. Apesar de serem ricos em gorduras, eles apresentam um baixo conteúdo de ácidos graxos saturados (SAFA) e altas concentrações de ácidos graxos insaturados. Principalmente ácidos graxos poliinsaturados (PUFA) nas amêndoas e monoinsaturados (MUFA) no óleo de oliva (Casas-Agustench *et al.*, 2008).

Os ácidos graxos poliinsaturados constituem-se de duas famílias de ácidos graxos: ômega-6 e ômega-3, distintos pela localização da primeira dupla ligação contida na molécula a partir do grupo metil terminal do ácido graxo. O ácido linoléico pertence à família dos ácidos graxos ômega-6 e o ácido α -linolênico dos ácidos graxos ômega-3. Estes ácidos graxos poliinsaturados não podem ser sintetizados pelo organismo humano, eles são ácidos graxos essenciais e que devem ser obtidos pela dieta. Os ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa são formados pelo alongamento e dessaturação dos ácidos linoléico e α -linolênico. O mais predominante MUFA da dieta é o ácido oléico, também conhecido como ômega – 9, composto por 18 carbonos e uma dupla ligação.

A importância do consumo de ácidos graxos insaturados tem aumentado significativamente nos últimos anos, decorrente do número de publicações que mostram uma relação positiva entre o consumo destas gorduras e a saúde (Matthan *et al.*, 2009; Pagkalos *et al.*, 2009). Estudos tais como, “KIHD Study” e “The Nurses’ Health Study”, mostram que dietas que propõe a substituição de SAFA por ácidos graxos monoinsaturado ou poliinsaturado, estão associadas com a diminuição no desenvolvimento de DCV, principalmente por providenciarem uma redução nos níveis séricos de colesterol e triacilgliceróis (Laaksonen *et al.*, 2005).

O mecanismo proposto para explicar o efeito hipocolesterolêmico dos ácidos graxos insaturados refere-se à capacidade dessas gorduras em propiciar um aumento da expressão e atividade do receptor para a LDL no fígado. Diferentemente as gorduras saturadas agem de modo a suprimir a atividade deste receptor (Fernandez & West, 2005). Além disso, PUFAs são conhecidos por exercer ações que propiciam uma supressão na síntese de ácido graxo, bem como um aumento da oxidação destes (Madsen *et al.*, 2005).

A literatura mostra que ácidos graxos poliinsaturados podem modular a expressão gênica agindo, por exemplo, como potentes ativadores de uma família de receptores nucleares, os receptores ativadores da proliferação peroxissomal (PPARs) (Kliewer *et al.*, 1997). Existem três isotipos de PPARs (PPAR α , PPAR γ e PPAR δ) eles apresentam distintas funções fisiológicas, distribuição tecidual e especificidade de ligantes. A ativação de PPAR α conduz a uma redução nos níveis séricos de lipídeos, uma vez que aumentam a expressão de genes responsáveis pela oxidação de ácidos graxos, PPAR γ promove um aumento na sensibilidade à ação da insulina e PPAR δ regula níveis séricos de colesterol e glicose (Barish *et al.*, 2006).

Em relação à redução dos níveis plasmáticos de triacilgliceróis (TAG) pelas gorduras insaturadas, a literatura mostra que este efeito é decorrente da redução da produção ou da taxa de secreção da lipoproteína de densidade muito baixa (VLDL) pelo fígado. A VLDL é a principal lipoproteína secretada pelo fígado, ela transporta o colesterol e os triacilgliceróis que vieram da dieta e chegaram ao fígado pelos quilomícrons. Outro mecanismo sugerido para a redução dos TAG seria uma ação dos ácidos graxos insaturados na própria síntese dos triacilgliceróis, propiciando uma

redução na atividade da enzima diacil-glicerol acil transferase (DGAT). Esta enzima catalisa a conversão do diacilglicerol em triacilglicerol. Estudos mostram que o consumo de ácido eicosapentanóico (20:5 n-3) reduz os níveis plasmáticos de TAG por inibir a atividade da DGAT (Harris & Bulchandani, 2006).

Ácidos graxos insaturados (AGINS) também apresentam efeitos antiinflamatórios, promovendo a manutenção da função endotelial. Disfunções no endotélio vascular como, por exemplo, aumento na expressão de moléculas de adesão, leucócitos e plaquetas, e diminuição na produção de vasodilatadores são um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento da aterosclerose (Cooke, 2000). Estudos experimentais têm mostrado que AGINS inibem a transcrição de genes, como o fator NF- κ B, relacionado com o aumento da expressão de citocinas pro-inflamatórias e quimiocinas (Calder, 2005; Torrejon *et al.*, 2007). Além disso, mediadores antiinflamatórios derivados dos PUFAS tais como, lipoxinas e resolvinas, controlam a inflamação em modelos experimentais de desordens inflamatórias (Weylandt *et al.*, 2007).

A substituição na dieta de gorduras saturadas por insaturadas promove uma redução na gordura visceral. Esta redução e a ativação de PPAR γ podem explicar o efeito benéfico dessas gorduras insaturadas na sensibilidade periférica à ação da insulina em indivíduos com diabetes tipo 2 (Mostad *et al.*, 2006; Summers *et al.*, 2002). Outro benefício decorrente do consumo de PUFA está relacionado com a perda de peso, onde o consumo frequente de amêndoas promove uma redução no índice de massa corpórea (IMC). Estudos mostram que a ingestão de amêndoas e óleo de oliva propicia um aumento na saciedade, na termogênese e na oxidação de gorduras pelo organismo (Garcia-Lorda *et al.*, 2003; Soares *et al.*, 2004).

Portanto, na tentativa de melhorar o perfil sérico de lipídeos, é comumente aceito que a diminuição na ingestão de ácidos graxos saturados, bem como a sua substituição por gorduras insaturadas são uma das principais estratégias para reduzir a incidência de DCV.

2.3.2 – Fibras Alimentares

Estudos clínicos e epidemiológicos têm mostrado a relação entre o consumo de fibras alimentares e a proteção contra o desenvolvimento de várias doenças, especialmente desordens metabólicas como, obesidade, diabetes tipo 2 e doenças cardiovasculares (Artiss *et al.*, 2006; Kris-Etherton *et al.*, 2002). Esta relação pode ser devida aos efeitos favoráveis das fibras sobre os lipídeos do soro, metabolismo da glicose e insulina, pressão sanguínea e inflamação (Aller *et al.*, 2004; Juntunen *et al.*, 2003; King *et al.*, 2003).

Fibras alimentares são a parte comestível de plantas ou carboidratos análogos, que são resistentes a ação de enzimas do trato gastrointestinal e a absorção no intestino delgado de humanos, com fermentação completa ou parcial no intestino grosso. De acordo com sua solubilidade em água, as fibras alimentares podem ser classificadas em solúvel e insolúvel. As solúveis são representadas pela pectina (frutas), gomas (aveia, cevada) e leguminosas (feijão, grão-de-bico, lentilha e ervilha). Já a celulose (trigo), hemicelulose (grãos) e lignina (hortaliças) representam as fibras insolúveis (Cummings & Stephen, 2007).

O exato mecanismo hipocolesterolemizante das fibras alimentares ainda não está totalmente elucidado. Evidências sugerem que as fibras podem interferir com o metabolismo de lipídeos e/ou ácidos biliares, outras sugerem mecanismos que incluem a inibição da síntese hepática do colesterol por produtos originados da fermentação bacteriana (Theuwissen & Mensink, 2008).

Fibras alimentares, principalmente as solúveis, podem agir a nível intestinal de modo a se ligarem a ácidos biliares durante a formação das micelas, provocando assim um aumento na excreção destes ácidos. Além disso, essas fibras podem atuar como barreiras fisiológicas no lúmen intestinal, formando uma matriz viscosa que aumenta a espessura da barreira de difusão existente entre o lúmen e a borda em escova. Assim, a difusão e absorção de gorduras e ácidos biliares ficam dificultadas e, conseqüentemente ocorre uma maior excreção fecal desses componentes. As fibras também podem aumentar a excreção de gorduras nas fezes, por agirem limitando a ação da lipase pancreática, resultando numa redução da hidrólise dos TAG vindos da dieta. Como resultado, a atividade da enzima 7- α - hidroxilase aumenta, propiciando uma maior

conversão hepática de colesterol em ácidos biliares. No fígado também ocorre um aumento na expressão de receptores para LDL para restabelecer o pool hepático do colesterol, o que conduz a uma redução na concentração sérica desta lipoproteína aterogênica (Fukushima *et al.*, 2000; Gropper *et al.*, 2005; Ramos *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2003).

As fibras solúveis não são digeridas e absorvidas durante o trajeto pelo intestino delgado e, quando chegam ao intestino grosso podem sofrer o processo de fermentação pelas bactérias do cólon humano. Este processo bioquímico resulta na produção de ácidos graxos de cadeia curta, como acetato, propionato e butirato. O butirato geralmente é utilizado como fonte primária de energia pelas células do colón, enquanto que o acetato e o propionato são rapidamente absorvidos. A literatura tem mostrado que a produção desses ácidos graxos de cadeia curta e principalmente mudanças na relação propionato/acetato podem influenciar no metabolismo de lipídeos, inibindo, por exemplo, a lipogênese no fígado. Ou também podem exercer efeitos antiinflamatórios e pro-apoptóticos em células neoplásicas (Galisteo *et al.*, 2005; Theuwissen & Mensink, 2008).

Além do efeito hipocolesterolemizante, as fibras alimentares também estão associadas com ações positivas sob o índice de massa corporal (IMC) (Bazzano, *et al.*, 2005; Slavin, 2005). O consumo de fibras promove uma redução na ingestão de calorias, principalmente por exercer um efeito na absorção de nutrientes (carboidratos, gorduras e proteínas) pela mucosa intestinal e na saciedade. A absorção dos nutrientes é reduzida, isto porque as fibras agem de modo a aumentar o bolo alimentar e reduzir o tempo do trânsito intestinal dificultando a ação das enzimas digestivas (Slavin, 2001). Os ácidos graxos de cadeia curta gerados pela fermentação das fibras podem afetar a saciedade através de ações na produção e na secreção de hormônios. Ratos alimentados com uma dieta suplementada com fibras alimentares fermentáveis mostraram uma redução na concentração plasmática de grelina, um hormônio associado com a fome e o apetite, quando comparado ao grupo de animais que não recebeu esta suplementação (Cani *et al.*, 2004). Anini *et al.*(1999) demonstraram um aumento na liberação do peptídeo tirosina-tirosina (PYY) após a infusão de ácidos graxos de cadeia curta no intestino grosso de ratos. PYY pode atravessar a barreira hemato – encefálica e ativar

neurônios que estimulem a sensação de saciedade e inibir aqueles que estimulem o comportamento alimentar (Batterham *et al.*, 2002).

As fibras alimentares também apresentam efeito na regulação das funções intestinais, promovendo uma melhora em situações de constipação e episódios de diarreia, bem como em casos de colite ulcerativa e alguns tipos de câncer. Em paralelo, as fibras podem agir como prebióticos promovendo mudanças na flora bacteriana e no ambiente intestinal (Kris-Etherton *et al.*, 2002; Marlett *et al.*, 2002).

Diante de todas as ações benéficas decorrentes do consumo de fibras alimentares, a American Heart Association tem recomendado um aumento no consumo de fibras para 25 a 30 g/dia, indicando ser esta recomendação importante para prevenir o desenvolvimento de eventos cardiovasculares (Bazzano *et al.*, 2003).

2.3.3 – Esteróides Vegetais

Fitosteróis estão entre as opções dietéticas disponíveis para ajudar na regulação dos níveis plasmáticos do colesterol, uma vez que seu consumo está associado com uma redução de 30-40% na absorção intestinal deste lipídeo (Demonty *et al.*, 2009; Miettinen & Gylling, 2004; Perisee, 2005).

Os esteróides vegetais (fitosteróis) são componentes essenciais da membrana celular de plantas, sendo encontrados em óleos vegetais, sementes, vegetais e frutas. Eles incluem principalmente o sitosterol, campesterol e estigmasterol. Fitosteróis e fitostanóis (apresentam no carbono 5 uma saturação, no lugar da ligação dupla) são moléculas hidrofóbicas e apresentam estrutura química similar a do colesterol (Perisee, 2005) (Figura III). Em contraste com o colesterol, os fitosteróis não são sintetizados pelos mamíferos e apresentam diferenças na absorção intestinal. A absorção intestinal do colesterol dietético varia em torno de 55-60%, enquanto que esteróides vegetais não ultrapassam a margem de 14%. Esta diferença na absorção pode ser explicada pela estrutura química desses compostos, que apesar de serem semelhantes, os fitosteróis são moléculas mais hidrofóbicas (Ostlund Jr. *et al.*, 2002).

A habilidade dos fitosteróis em reduzir os níveis de colesterol está principalmente relacionada com a capacidade desses fitoquímicos em reduzir a absorção intestinal do colesterol, tanto o dietético quanto o biliar. Fitosteróis podem atuar por

diversos caminhos como, por exemplo, competir com o colesterol durante a absorção intestinal, diminuir a solubilidade do colesterol nas micelas mistas e aumentar a excreção de ácidos biliares (Christiansen, *et al.*, 2001; Ostlund Jr., 2004; Rozner *et al.*, 2009).

Estudos também têm sugerido que os fitosteróis podem reduzir a atividade da colesterol acil transferase (ACAT), enzima responsável pela esterificação do colesterol na mucosa intestinal. O colesterol deve ser esterificado para a formação do quilomícrom, lipoproteína formada nas células da mucosa intestinal que transportam pelo plasma sanguíneo os triacilgliceróis e o colesterol vindos da dieta (Buhman *et al.*, 2000; Repa *et al.*, 2004; Trautwein *et al.*, 2003).

Outro mecanismo que também tem sido proposto é a atuação dos fitosteróis nos transportadores de colesterol denominados ABC – “ATP-Binding Cassette Cholesterol Transporters” (Plat *et al.*, 2005). Plat & Mensink (2002b) demonstraram que *in vivo* fitosteróis podem atuar no fígado ativando o receptor LXR (um receptor nuclear que controla a expressão dos transportadores ABCG5/8), o que levaria a um aumento na expressão desses transportadores. Os transportadores ABCG5 e o ABCG8 agem de modo a limitar a absorção intestinal de esteróis e promover a secreção hepatobiliar do colesterol (Graf *et al.*, 2002). Entretanto, os estudos que propõe a ação de fitosteróis em transportadores ABC ainda são conflitantes. Outros autores concluíram que os efeitos de fitosteróis na absorção do colesterol não estão relacionados com a ativação do receptor LXR no fígado (Calpe-Berdiel *et al.*, 2005; Plosch *et al.*, 2006).

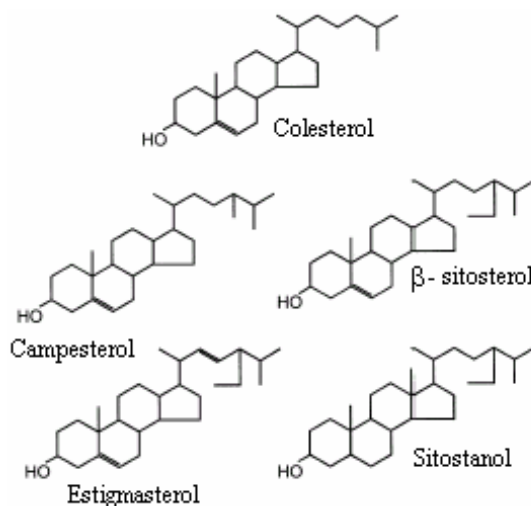


Figura III – Estrutura química do colesterol e alguns insaturados (campesterol, β -sitosterol e estigmasterol) e saturado (sitosterol) fitosteróis.

Adaptado de: Ostlund Jr., 2002.

Independente do mecanismo utilizado pelos fitosteróis para promover a inibição da absorção do colesterol, um estado de deficiência deste esteróide é gerado no fígado, e assim ocorre um aumento na expressão de receptores de LDL, resultando em menores concentrações desta lipoproteína no soro (Plat & Mensink, 2002b).

Os fitosteróis também estão relacionados com propriedades antiinflamatória, imunomoduladora e anti-neoplásica (Bradford & Awad, 2007; Calpe-Berdiel *et al.*, 2007; Ifere *et al.*, 2009; Nashed *et al.*, 2005) Entretanto, estudos que sugerem estes efeitos ainda são preliminares. A ingestão diária de 2 g de fitosteróis é considerada segura e eficaz para ser usada como ingrediente funcional no controle da hipercolesterolemia (IAS, 2003; NHF, 2001).

2.3.4 – Flavonóides

Atualmente já está bem estabelecido na literatura que o consumo regular de frutas e vegetais protege o organismo do desenvolvimento de doenças crônicas não transmissíveis (Riboli & Norat, 2003). Esta ação protetora tem sido atribuída, principalmente as ações antioxidantes de diversos nutrientes, como por exemplo, a vitamina C, carotenóides e os compostos fenólicos (Poli *et al.*, 2008; Szmítka & Verma, 2005). Os compostos fenólicos são substâncias encontradas principalmente em plantas e

que apresentam em sua estrutura química geral a hidroxila ligada diretamente ao grupo benzênico (Figura IV).

Devido a sua ampla distribuição em alimentos de origem vegetal e a presença de constituintes ativos com ação farmacológica, os fenólicos têm sido alvo de muitos estudos, os quais buscam elucidar sua absorção no trato intestinal, os seus mecanismos de ação e suas propriedades farmacológicas e toxicológicas (Engler & Engler, 2004). Os compostos fenólicos podem ser divididos em dois grupos: os flavonóides e os não flavonóides (Melo & Guerra, 2002).

Os flavonóides são substâncias fenólicas de baixo peso molecular, e que possuem em sua estrutura química anéis aromáticos, tendo como base o 2-fenil-benzopirano ($C_6.C_3.C_6$). A figura V mostra a estrutura genérica dos flavonóides e utiliza um sistema de números para distinguir as posições dos carbonos ao redor da molécula. Os três anéis fenólicos são referidos como A, B e C. O benzeno do primeiro anel é condensado com o sexto carbono do terceiro anel que na posição 2 carrega um anel de fenil-benzeno como substituinte. O terceiro anel pode ser um pirano heterocíclico, gerando as estruturas básicas das leucoantocianinas (ou proantocianinas, ou catequinas) e das antocianinas, denominado de núcleo flavan. No caso do terceiro anel apresentar-se como uma pirona, ocorre à formação das flavonas, flavonóis, flavanonas, isoflavonas, chalconas e auronas, recebendo a denominação de núcleo 4-oxo-flavonóide (Aherne & O'brien, 2002).

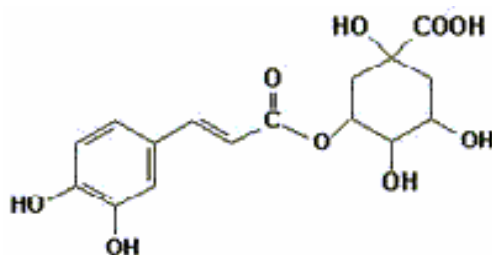


Figura IV – Exemplo da estrutura química geral de um composto fenólico.
Fonte: Degáspari, 2004.

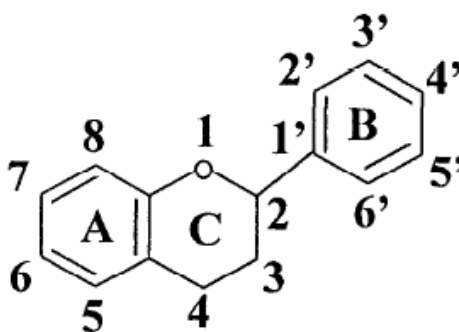


Figura V – Estrutura geral dos flavonóides.

Fonte: Cook & Samman, 1996.

Mais de 4.000 diferentes tipos de flavonóides extraídos de plantas já foram descritos na literatura. As atividades bioquímicas destes compostos fenólicos dependem principalmente da sua estrutura química, e é a partir dela que os flavonóides também são classificados. As principais classes de flavonóides incluem: flavonóis, flavonas, flavanonas, catequinas, antocianinas, isoflavonas, dihidroflavonois e chalconas (Figura VI). Muitos flavonóides ocorrem naturalmente nas plantas acompanhados por glicídios, como a D-glicose, galactose, lignina e arabinose, recebendo a denominação de glicoflavonóide. Quando se apresentam isentos de glicídios, a estrutura recebe o nome de aglicona (Calabro *et al.*, 2004).

É importante ressaltar que dentre as classes de flavonóide, as antocianinas têm sido o principal alvo de estudo, por serem descritas como potentes antioxidantes (Kahkonen & Heinonen, 2003; Rahman *et al.*, 2006; Zheng & Wang, 2003). As antocianinas constituem um grupo de pigmentos vegetais hidrossolúveis, encontrados predominantemente na forma glicosilada e amplamente distribuídos no reino vegetal, principalmente nos frutos como morango, amora e outros (Wu *et al.*, 2002), em inglês estes frutos são conhecidos como “berries”. O espectro de cor das antocianinas varia do vermelho ao azul, apresentando-se também como uma mistura de ambas as cores resultando em tons de púrpura.

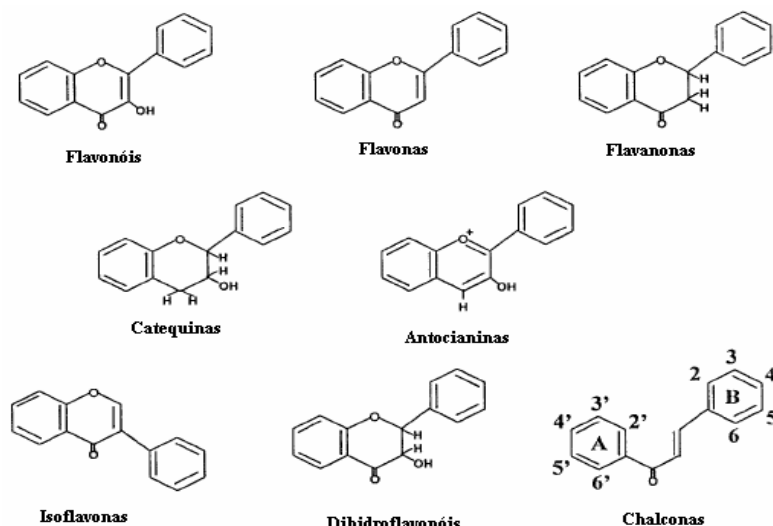


Figura VI – Estruturas das principais classes de flavonóides.
Adaptado de: Cook & Samman, 1996.

Os flavonóides são encontrados em diversos alimentos de origem vegetal, como maçã, uva, cebola, repolho, brócolis, chicória, aipo, açaí, cacau, chá e vinho tinto sendo, portanto, importantes constituintes da dieta humana. Estes compostos fenólicos têm um papel significativo como componentes da dieta, uma vez que seu consumo está associado a várias ações citoprotetoras (Youdim & Joseph, 2001). Muitos dos benefícios fisiológicos dos flavonóides têm sido atribuídos principalmente à sua capacidade antioxidante, podendo exercer um efeito direto (eliminando as espécies reativas) ou indireto (aumentando a atividade ou expressão de enzimas antioxidantes).

O efeito de eliminar as espécies reativas exercido pelos flavonóides se deve à capacidade destes compostos em neutralizar os radicais livres (ânion superóxido, radicais hidroxilas e peroxilas) ou quelar íons metálicos (cobre e ferro). Os flavonóides apresentam grupos hidroxilas em sua estrutura, portanto eles podem inibir as reações de oxidação das espécies reativas de oxigênio, por doarem átomos de hidrogênio às espécies, estabilizando-as e transformando-se em quinonas (substâncias pardas). Ao quelar íons metálicos ocorre a inibição da Reação de Fenton, uma forma endógena de produzir espécies reativas (Enio, 2003; Harborne & Willians, 2000; Tian & McLaughlin, 2000). Em adição a estes efeitos sob as espécies reativas, evidências mostram que flavonóides regulam a atividade de enzimas antioxidantes, modulam

receptores nucleares, atuam sobre a expressão gênica e caminhos de sinalização celular (Seeram & Heber, 2006).

O consumo de flavonóides pode reduzir o risco de desenvolvimento de DCV através de vários mecanismos. Um deles é atuar no metabolismo de lipídeos e prevenir a hipercolesterolemia, um dos primeiros passos para o aparecimento da placa aterosclerótica. Estes compostos promovem a redução da absorção do colesterol, ou por interagir com moléculas transportadoras na borda em escova, ou por promover um aumento na excreção de ácidos biliares. Esta redução na absorção conduz ao aumento na expressão de receptores de LDL no fígado, o que resulta em uma redução sérica dessa lipoproteína (Hardin-Fanning, 2008; Loest *et al.*, 2002; Raederstorff *et al.*, 2003; Yoon & Baek, 2005).

Outro mecanismo seria através de sua ação antioxidante, uma vez que espécies reativas de oxigênio (EROS) podem atacar LDL, transformando-a em LDL oxidada, a qual é reconhecida por macrófagos e origina as células espumosas da lesão aterosclerótica (Gant & Heinecke, 2001). Estudos mostram que flavonóides podem inibir a modificação oxidativa da LDL tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Devido à sua natureza anfipática, os flavonóides conseguem proteger a peroxidação lipídica dentro e fora da molécula de LDL. (Dani *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2000; Rein *et al.*, 2000). Safari & Sheikh (2003) mostraram que o cobre é capaz de catalisar o processo de modificação oxidativa da LDL e que a incubação de LDL com flavonóides, significativamente diminuiu a susceptibilidade às modificações oxidativas nessas lipoproteínas, com conseqüente redução da lipoperoxidação lipídica.

Estes efeitos, hipocolesterolemiantes e antioxidantes, são os principais passos para reduzir o risco de desenvolvimento de aterosclerose. Além disso, efeitos antiinflamatórios também são cardioprotetores, uma vez que promovem a manutenção da função endotelial. Flavonóides exercem efeito inibitório sobre enzimas da biossíntese dos eicosanóides como, por exemplo, as cicloxigenases e as lipoxigenases, promovendo uma redução na produção de moléculas de adesão na parede arterial e uma menor agregação plaquetária (Zern & Fernandez, 2005).

A literatura mostra que os flavonóides exibem uma ampla faixa de atividades incluindo efeitos vasodilatadores, anticarcinogênico, antibacteriano, antialérgico

(atuando sobre moduladores da função imune) e neuroprotetores (Azam *et al.*, 2004; Heo & Lee, 2004; Higa *et al.*, 2003; Maher, 2006; Mercer *et al.*, 2005).

2.4 – Efeitos Funcionais da Polpa do Açaí - Trabalhos *in vitro*

Del Pozo-Insfran *et al.* (2004) determinaram a composição fenólica e a ação antioxidante total da polpa de açaí. Este estudo também estabeleceu a respectiva contribuição dos polifenóis para a capacidade antioxidante deste fruto. Os autores encontraram que o polifenol predominante na polpa de açaí é cianidina 3-glicosídeo (1040 mg/L). Em relação à capacidade antioxidante total, o açaí apresentou um valor de 48,6 μmol equivalentes Trolox/mL. Este valor encontrado foi superior aos valores obtidos para outros frutos ricos em antocianinas como, morango (18,3-22,9), framboesa (19,2-22,6), amoras pretas (13,7-25,10) e suco de uva (18,2-26,7). Portanto, este estudo mostra que a polpa de açaí apresenta alta capacidade antioxidante total e que as antocianinas contribuem predominantemente para esta ação, mas deve ficar bem claro que a atividade dos outros compostos fenólicos não deve ser menosprezada.

Matheus *et al.* (2006) avaliaram os efeitos das flores, fruto e espigas da palmeira *Euterpe oleraceae* Martius, sob a produção de óxido nítrico (NO), a capacidade de eliminar o radical NO, bem com a atividade e a expressão da enzima óxido nítrico sintase (iNOS). Foi obtido o extrato etanólico de todas as frações da planta, e os efeitos sob o NO e a iNOS foram testados em culturas de células RAW 264.7 de macrófagos de camundongos, estimuladas com lipopolissacarídeos e IFN- γ . A óxido nítrico sintetase é a enzima responsável pela produção de NO em macrófagos e outros tipos de células após a ativação com lipopolissacarídeos ou citocinas. Os resultados mostraram que a fração obtida do fruto (açaí) foi mais potente em inibir a produção de óxido nítrico em culturas de células, esta redução não foi devida à capacidade de eliminar o radical NO e sim pela inibição da atividade da enzima óxido nítrico sintase. As frações obtidas das flores e espigas também apresentaram efeito inibitório na produção do NO *in vitro*, o mecanismo de inibição parece ser devido a redução na expressão (fração das flores) ou na atividade da iNOS (fração espigas). Os autores relacionaram estes efeitos com a concentração de polifenóis na diferentes frações da planta. Eles constataram que o efeito

mais pronunciado exercido pelo fruto se deve ao seu maior conteúdo em antocianinas em relação às flores e espigas. Este estudo sugere uma ação antiinflamatória do açaí, uma vez que o uso de agentes que inibem a atividade e/ou a indução da iNOS são focos terapêuticos em alergias e desordens auto-imune.

Schauss *et al.* (2006a) demonstraram a capacidade antioxidante da polpa de açaí, utilizando diferentes métodos de avaliação e várias fontes de espécies reativas. A capacidade antioxidante total (TAC) foi determinada por uma série de ensaios da capacidade de absorbância do radical oxigênio por meios fluorescentes (ORACFL), incluindo hidrofílico ORACFL (H-ORACFL), lipofílico (L-ORACFL), capacidade de eliminar o radical peroxinitrito (NORAC) e capacidade de eliminar o radical hidroxila (HORAC). Além desses métodos, a avaliação da capacidade de eliminar o ânion superóxido (SOD), a avaliação antioxidante total (TAO) e a inibição na formação de espécies reativas de oxigênio em neutrófilos de doadores humanos saudáveis foram realizadas. Os resultados encontrados mostraram uma excepcional atividade contra o ânion superóxido e alta capacidade contra o radical peroxila, sendo esta capacidade mais alta do que qualquer outro fruto já relatado na literatura. A atividade em eliminar os radicais peroxinitrito e hidroxila foi considerada moderada. Na avaliação antioxidante total (TAO), os componentes antioxidantes do açaí foram diferenciados em “ação demorada” e “ação rápida”. Os componentes de “ação demorada” incluem antioxidantes orgânicos complexos (como os polifenóis) e foram mensurados em 30 minutos, os de “ação rápida” são antioxidantes “semelhantes à vitamina C” mensurados em 30 segundos. A combinação desses valores resulta na TAO. Os resultados obtidos para TAO na polpa de açaí mostraram claramente que a capacidade dos antioxidantes de “ação demorada” é muito mais forte do que os componentes de “ação rápida”. O tratamento de neutrófilos humanos incubados anteriormente com o peróxido de hidrogênio com a polpa de açaí resultou em significativa redução na formação de EROS.

Outras possíveis bioatividades *in vitro* do açaí foram testadas neste estudo, como por exemplo, ação antiinflamatória e efeitos sobre marcadores da função imune. Os resultados mostraram que o açaí exerceu forte ação inibitória na atividade das ciclooxigenases (COX 1 e COX 2), um fraco efeito na produção de óxido nítrico induzida por lipopolissacarídeos e nenhum efeito sobre a proliferação de linfócitos e

capacidade fagocitária. Os resultados obtidos providenciam informações adicionais sobre a capacidade antioxidante e a ação antiinflamatória exercidas pelo açaí *in vitro*.

Del Pozo-Insfran *et al.* (2006) estudaram os efeitos dos polifenóis presentes na polpa de açaí sob células leucêmicas humanas (HL-60), investigando efeitos antiproliferativos e pro-apoptóticos. Este estudo demonstrou que polifenóis presentes no açaí induzem a mortalidade de células HL-60 através de mecanismos pro-apoptóticos, como por exemplo, a ativação de caspase-3.

Rocha *et al.* (2007) determinaram se extratos obtidos do fruto do açaí demonstravam efeito vasodilatador em leito vascular mesentérico (MVB) de ratos. Três extratos foram obtidos do açaí, sendo um aquoso obtido do fruto íntegro e dois hidroalcoólicos (um da casca e outro da semente). Este estudo demonstrou que os três extratos de açaí exerceram um substancial efeito vasodilatador em MVB em um mecanismo dose-dependente. A magnitude do efeito vasodilatador induzido pelos três extratos do fruto do açaí demonstrou similar efeito ao exercido pela acetilcolina e nitroglicerina. Mas diferente desses peptídeos vasoativos os extratos apresentaram um efeito vasodilatador reversível. O efeito exercido pelo açaí em MVB de ratos foi parecido entre os três extratos, entretanto o extrato obtido da semente (ASE) teve uma ação vasodilatadora significativamente mais pronunciada. Estes achados providenciam um suporte experimental para a possibilidade do uso do açaí, como planta medicinal, no tratamento de DCV.

Santos *et al.* (2008) em seu trabalho caracterizaram polpas comerciais de açaí, além de correlacionar a contribuição da vitamina C, carotenóides totais e compostos fenólicos com a atividade antioxidante destes produtos. Os estudiosos realizaram análises de pH, acidez total titulável, sólidos solúveis totais, açúcares, cor, atividade de água, vitamina C, carotenóides totais, atividade antioxidante e compostos fenólicos. Dentre os resultados obtidos, foi encontrado que polpas de açaí são consideradas importantes fontes de antioxidantes, tendo as antocianinas totais e os compostos fenólicos totais correlação positiva e significativa com a atividade antioxidante das polpas de açaí.

2.5 – Efeitos Funcionais da Polpa do Açaí - Trabalhos *in vivo*

Mertens-Talcott *et al.* (2008) estudaram a concentração sérica de antocianinas e ácido úrico, a geração de espécies reativas e a capacidade antioxidante no plasma e na urina de indivíduos saudáveis após o consumo da polpa e do suco clarificado de açaí. Doze indivíduos saudáveis e voluntários com idade entre 21-31 anos foram submetidos a uma dose aguda de quatro tipos de bebidas (uma bebida a cada dia diferente). A polpa de açaí e o suco clarificado de açaí foram às bebidas experimentais e como controles foram utilizadas a polpa de maçã (“applesauce” - polpa de fruta muito consumida nos Estados Unidos, utilizada no estudo como um controle negativo para antocianinas) e uma bebida sem antioxidantes (livre de compostos fenólicos). Os indivíduos recebiam uma dose de 7mL de cada tratamento do estudo por Kg de peso, após jejum noturno. Amostras de sangue eram recolhidas 0,5, 1, 2, 4, 6 e 12 horas após o consumo e amostra de urina nos períodos de 0-3, 3-6, 6-9, 9-12 e 12-24 horas. Estas amostras eram submetidas a análises tais como, determinação da concentração sérica de antocianinas, avaliação da capacidade antioxidante (ORAC) no plasma e na urina, extensão intracelular de EROS em células mononucleares do sangue e concentração sérica de ácido úrico.

Os resultados obtidos mostraram que a cianidina glicosídeo e a rutinosídeo foram as mais predominantes antocianinas presentes tanto na polpa (303.8 mg/Kg de polpa) quanto no suco clarificado de açaí (165.9 mg/L de suco). Depois da quantificação deste flavonóide nas bebidas experimentais, a concentração sérica de antocianinas foi avaliada no soro dos indivíduos após cada tratamento. Como esperado antocianinas não foram detectadas no soro dos participantes após o consumo das bebidas controles (polpa de maçã e sem-antioxidantes). Entretanto a concentração sérica de antocianinas foi significativamente elevada após o consumo da polpa e do suco clarificado de açaí. O soro dos participantes após o consumo da polpa de açaí apresentou uma concentração máxima de 2321ng/L no tempo de 2.2 horas. Já para o suco clarificado a concentração mensurada foi de 1138 ng/L no tempo de 2.0 horas. Um aumento na capacidade antioxidante do soro também foi encontrado após o consumo da polpa de açaí, do suco clarificado e da polpa de maçã quando comparado com a bebida controle sem antioxidantes. Entretanto, a polpa de açaí e a polpa de maçã apresentaram

valores significativamente maiores que o suco clarificado. Os resultados obtidos das análises da capacidade antioxidante na urina, da geração de EROS em células mononucleares do sangue e da concentração sérica de ácido úrico não foram alterados por nenhum tipo de tratamento quando comparado com a bebida livre de polifenóis. Os resultados obtidos neste estudo mostram que antocianinas do açaí são absorvidas e apresentam efeito antioxidante no plasma de humanos após um consumo agudo da polpa e/ou do suco clarificado.

Jensen *et al.* (2008) investigaram propriedades antioxidantes e antiinflamatória *in vivo* e *in vitro* do *MonaVie Active* (JB), um suco feito com a mistura de várias frutas, mas que tem o açaí como ingrediente predominante. Este estudo foi realizado em três etapas. A fase inicial avaliou o conteúdo de compostos fenólicos do *MonaVie Active*, bem como a capacidade antioxidante e antiinflamatória *in vitro*. A segunda fase foi um estudo piloto realizado com cinco indivíduos adultos saudáveis, objetivando avaliar a absorção e as bioatividades do suco JB, onde amostras de sangue foram coletadas imediatamente e 30, 60 e 120 minutos após o consumo deste suco. A última etapa foi um estudo com 12 indivíduos adultos saudáveis, na faixa etária de 19-52 anos, sendo os mesmos 12 participantes testados com uma bebida controle e o *MonaVie Active* em dias diferentes. Capacidade antioxidante do soro e níveis da peroxidação lipídica (concentração de TBARS) foram avaliadas na terceira etapa deste estudo.

Os resultados demonstraram que comparado com a polpa de açaí o perfil de polifenóis do *MonaVie Active* é bem diferente. Entretanto assim como o açaí o suco JB apresenta a cianidina 3-glicosídeo e cianidina 3-rutinosídeo como as antocianinas mais predominantes. O suco JB mostrou uma significativa proteção antioxidante *in vitro*, quando utilizado o método de proteção antioxidante de eritrócitos, baseado na viabilidade da célula (CAP-e). Este resultado permite concluir que antioxidantes presentes no suco JB conseguem atravessar a membrana plasmática e proteger a célula do dano oxidativo. O tratamento de células mononucleares (PMN) com o suco JB resultou em significativa inibição na formação de EROS induzida pelo peróxido de hidrogênio. Além desses efeitos do suco JB, os autores demonstraram uma marcante ação antiinflamatória *in vitro*. A capacidade antioxidante do soro dos participantes da segunda fase deste estudo foi avaliada usando os métodos ORAC e CAP-e. Quando utilizado o método CAP-e um aumento significativo na capacidade antioxidante dos

cinco participantes foi observado, entretanto este mesmo resultado não foi encontrado quando a capacidade antioxidante do soro foi avaliada pelo método ORAC. Com base neste resultado, os autores resolveram avaliar a capacidade antioxidante do soro na terceira fase deste estudo utilizando o método CAP-e. Duas horas após o consumo do suco JB, um aumento da capacidade antioxidante do soro em 11 dos 12 participantes e uma redução na concentração sérica de TBARS em 10 dos 12 participantes foram observadas. O estudo também demonstrou uma correlação existente entre aumento da capacidade antioxidante e redução na peroxidação lipídica 2 horas após o consumo do suco JB. O presente estudo mostra que um suco rico em várias frutas, mas que possui o açaí como ingrediente predominante possui antioxidantes que são capazes de proteger células contra o dano oxidativo *in vivo*.

Todos estes estudos *in vitro e in vivo* que avaliam a capacidade antioxidante e outros efeitos do açaí, podem ter valor significativo em denominá-lo com “alimento funcional”, associando a sua ingestão com a melhora de doenças relacionadas ao estresse oxidativo, como as doenças cardiovasculares e processos de envelhecimento. Entretanto, observamos que os estudos que descrevem os potenciais efeitos do açaí são na maioria avaliações *in vitro*, poucos mostram as ações *in vivo* decorrentes do consumo deste fruto. Além disso, nenhum trabalho que correlacione o açaí e perfil lipídico foi encontrado na literatura. Assim, resolvemos avaliar o efeito obtido do consumo da polpa de açaí, associado ou não, a dieta hipercolesterolemiantes sobre o perfil lipídico, defesas antioxidantes e marcadores do estresse oxidativo em ratos. Uma vez que, bioatividades baseadas em outros mecanismos além das atividades antioxidantes podem também contribuir para demonstrar os benefícios fisiológicos do açaí. Por outro lado, sendo o fígado um órgão muito importante na regulação do metabolismo, avaliamos a função hepática através de marcadores séricos bioquímicos, para assegurar a segurança da utilização da polpa do açaí como alimento funcional.

3 - OBJETIVOS

3.1 – Objetivo Geral

Avaliar propriedades funcionais da polpa de açaí relacionadas à redução da hipercolesterolemia e ações antioxidantes em um modelo animal de hipercolesterolemia induzida pela dieta.

3.2 – Objetivos Específicos

Tratar ratos com dietas padrão e hipercolesterolemiantes, acrescidas ou não com a polpa de açaí e assim:

- I. Avaliar o ganho de peso, a ingestão alimentar e a excreção fecal dos animais;
- II. Avaliar alteração do perfil lipídico;
- III. Avaliar o *status* antioxidante e biomarcadores do estresse oxidativo;
- IV. Avaliar a função hepática, determinada através das atividades séricas das aminotransferases e da fosfatase alcalina.

4 – MATERIAL E MÉTODOS

4.1 – Animais

Foram utilizadas no experimento 32 ratas *Fischer*, albinas com aproximadamente 60 dias de idade e peso médio de 145g, provenientes do Laboratório de Nutrição Experimental do Departamento de Alimentos, Escola de Nutrição, Universidade Federal de Ouro Preto. Os animais foram mantidos em gaiolas individuais, dispostas em ambiente arejado com controle de temperatura, umidade e luminosidade. Durante o experimento o manejo dos mesmos foi de acordo com os princípios e diretrizes descritas no Canadian Council on Animal Care (1984) e os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Ouro Preto.

4.2 – Dietas

Os animais foram alimentados com dieta padrão AIN-93M, 4% óleo de soja (Reeves *et al.*, 1993), ou dieta hipercolesterolemiantes com 25% de óleo de soja e 1% de colesterol, suplementadas ou não com polpa de açaí. A composição das dietas experimentais está descrita na Tabela I. Os teores de óleo e colesterol da dieta hipercolesterolemiantes foram definidos a partir de Turbino-Ribeiro *et al.* (2003) e adaptados à dieta AIN-93M.

Foi utilizada polpa de açaí congelada, obtida da empresa Icefruit Comércio de Alimentos LTDA, São Paulo, Brasil. A polpa utilizada não contém corantes e conservantes, é pasteurizada, embalada a vácuo e mantida à -18°C. De acordo com o fornecedor a polpa utilizada contém em 100ml, calorias (122 Kcal), proteínas (1,4g), gorduras totais (15g), carboidrato (valor não determinado) e fibra alimentar (73mg). Foi determinada a porcentagem de umidade, de acordo com o Manual do Instituto Adolfo Lutz (1985), da polpa de açaí utilizada, e encontrado um valor de 90%.

A polpa era descongelada e adicionada à dieta, que em seguida era colocada em estufa ventilada 60°C por um período de 3h, para redução da umidade. Para cada quilo

de dieta preparada foi utilizado 200mL da polpa de açaí, portanto 20g de açaí foram adicionados a cada quilo de dieta preparada.

Todas as dietas foram confeccionadas no Laboratório de Nutrição Experimental, Escola de Nutrição, Universidade Federal de Ouro Preto. Acondicionadas em sacos plásticos e armazenadas em freezer. Durante o experimento, as dietas e água foram oferecidas aos animais *ad libitum*.

Tabela I - Composição das dietas experimentais (g / Kg de dieta).

Nutrientes	Padrão	Padrão + Açaí	Hipercolesterole- miente	Hipercolesterole miente + Açaí
Caseína	140,0	140,0	140,0	140,0
Amido Milho	722,5	702,5	502,5	482,5
Óleo de Soja	40,0	40,0	250,0	250,0
Colesterol	0,0	0,0	10,0	10,0
Colina	2,5	2,5	2,5	2,5
Mist. Minerais ¹	35,0	35,0	35,0	35,0
Mist. Vitaminas ²	10,0	10,0	10,0	10,0
Celulose	50,0	50,0	50,0	50,0
Açaí	0,0	20,0	0,0	20,0
Valor Calórico (Kcal)	3810	3974	4910	5074

¹Mistura de minerais (expresso por g/kg da mistura): NaCl – 139,3 / KI- 0,79 / MgSO₄·7H₂O- 57,3 / CaCO₃- 381,4 / MnSO₄·H₂O – 4,01 / FeSO₄·7H₂O – 0,548 / CuSO₄· 5H₂O – 0,477 / CoCl₂·6H₂O – 0,023 / KH₂PO₄ – 389,0. Os sais foram adquiridos do Reagen, Rio de Janeiro, Brasil.

²Mistura de vitaminas (expresso por em mg/kg da mistura): Acetato de retinol – 690; colecalciferol – 5; ácido *p*-amino benzóico – 10 000; inositol – 10 000; niacina – 4000; riboflavina – 800; tiamina HCL – 500; ácido fólico – 200; botina – 40; cianocobalamina – 3; *dl*-α - tocoferol – 6 700; sacarose – q.s.p. 1000. As vitaminas foram adquiridas da Merk, Darmstadt, Alemanha.

4.3 – Delineamento Experimental

Os animais foram divididos em quatro grupos de 8 animais de acordo com a dieta recebida: grupo C recebeu dieta padrão, grupo H recebeu dieta hipercolesterolemiantes, grupo CA recebeu dieta padrão suplementada com açaí e grupo HA recebeu dieta hipercolesterolemiantes suplementada com açaí. Nos primeiros 14 dias de experimento os grupos passaram por um período de adaptação às dietas, no qual os grupos C e CA receberam dieta padrão e os grupos H e HA receberam a dieta hipercolesterolemiantes. Após essas duas semanas cada grupo passou a receber sua respectiva dieta por mais seis semanas. Os animais foram pesados semanalmente durante todo o experimento. Medidas de ingestão, desperdício e quantidade de fezes foram realizadas semanalmente.

Ao final das oito semanas de experimento os animais foram deixados 8 horas em jejum e o sangue coletado através do plexo braquial até sangria total. O sangue foi recolhido em tubos de polipropileno (com 2,0mL de capacidade) com ou sem 15µL de anticoagulante Glistab® (Labtest cat. 29) para obtenção do plasma ou soro, respectivamente. Em seguida, o sangue era centrifugado a 13000 rpm (Centrífuga FANEM – Modelo 243) por 15 minutos e o plasma ou soro guardados sob refrigeração (-4°C). As diversas dosagens bioquímicas foram realizadas imediatamente ou em até três dias. Os órgãos fígado, baço, coração e rins, bem como a gordura abdominal foram extraídos e posteriormente pesados. 100mg do fígado foi imediatamente homogeneizado em tampão fosfato 0,1M; pH 7,2 e outros 100mg foram homogeneizados com 1mL de ácido sulfosalicílico 5%, ambos foram centrifugados à 10000g por 10 minutos à 4°C, removidos os sobrenadantes e mantidos à -80°C até análise de catalase e glutathiona total, respectivamente.

4.4 – Dosagens dos Parâmetros Bioquímicos

Neste trabalho realizamos dosagens bioquímicas utilizando kits Labtest Diagnóstica S.A.: Alanina Aminotransferase (ALT), Aspartato Aminotransferase (AST), Colesterol-HDL, Colesterol Total, Fosfatase Alcalina (ALP), Triacilgliceróis (TAG) e Proteínas Totais. Os princípios dos métodos e seus respectivos protocolos

estão descritos no Anexo I deste trabalho. Para determinação da concentração do colesterol não-HDL foi feita a subtração da concentração do colesterol total pela concentração do colesterol HDL.

$$\text{Colesterol não-HDL (mmol/L)} = \text{Colesterol Total (mmol/L)} - \text{Colesterol HDL (mmol/L)}$$

4.4.1. Paraoxonase – Atividade Arilesterásica

Objetivo

Determinação da atividade arilesterásica da enzima paraoxonase, usando fenilacetato como substrato, tendo como base a velocidade de hidrólise do fenilacetato, conforme descrito por Beltowski *et al.* (2002).

Procedimento de dosagem

Em tubo de ensaio adicionaram-se 2 mL de tampão Tris-HCl, 9 mM; pH 8,0 contendo 0,9 mmol/L de cloreto de cálcio e 5 µL de soro. O conteúdo do tubo foi misturado e adicionaram-se 0,5 mL da solução Tris- fenilacetato (1 µL de fenilacetato para cada 1500 µL de TrisHCL 9 mM; pH=8,0;). Após exatamente 3 minutos, a absorbância foi lida em 270 nm. O espectrofotômetro foi zerado com o branco que continha todos os reagentes acima, exceto o soro.

Cálculo

Utilizamos a definição para atividade enzimática de acordo com Beltowski *et al.* (2002). Segundo a qual 1U da enzima paraoxonase é equivalente a hidrólise de 1mmol de fenilacetato ($\epsilon = 1310 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) por minuto (usualmente a atividade desta enzima é representada por 1mL de soro). Assim a atividade arilesterásica da enzima é:

$$U / mL = \frac{\text{Absorbância}}{\epsilon \times b} \times \frac{1000}{\text{Tempo} \times \text{Volume de Soro}}$$

Onde:

ϵ – Coeficiente de extinção molar;

b – caminho óptico, igual a 10 mm.

4.4.2. Paraoxonase – Atividade Paraoxonase

Objetivo

Determinação da atividade da paraoxonase, utilizando o paraoxon como substrato, tendo como base a velocidade de hidrólise deste, com a liberação do para-nitrofenol por minuto, conforme descrito por Beltowski *et al.* (2002).

Procedimento de dosagem

Inicialmente preparou-se uma solução contendo 9 mL de tampão glicina/NaOH 50 mM; pH 10,5 contendo CaCl₂ 0,9 mM e 2 µL de paraoxon. Em um tubo de polipropileno adicionaram-se 780 µL dessa solução e 20 µL de soro. A solução foi homogeneizada e lida as absorvâncias das amostras no espectrofotômetro à 412 nm, exatamente a cada minuto, por 3 minutos. O branco (tubo com 780 µL da solução preparada inicialmente e 20 µL de água) foi utilizado para acertar o aparelho

Cálculo

Segundo Beltowski *et al.* (2002) 1U da enzima paraoxonase é equivalente a hidrólise de 1mmol de paraoxon ($\epsilon = 18290 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) por minuto (usualmente a atividade desta enzima é representada por 1mL de soro). A atividade paraoxonase da enzima paraoxonase é:

$$U / mL = \frac{\text{Absorvância}}{\epsilon \times b} \times \frac{1000}{\text{Tempo} \times \text{Volume de Soro}}$$

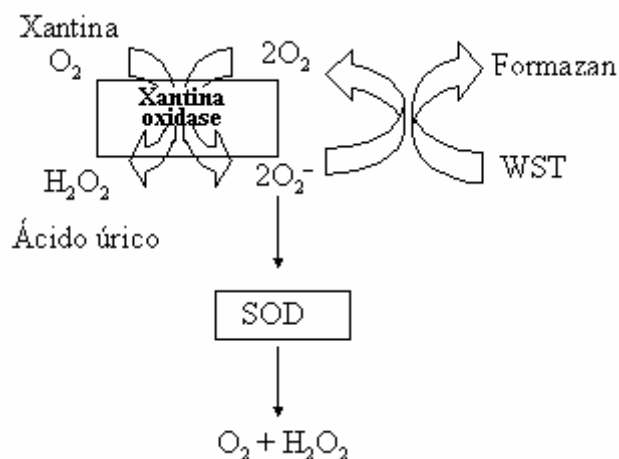
A absorvância utilizada nessa expressão é o delta obtido das três absorvâncias lidas (absorvância final – absorvância inicial / 2).

4.4.3. Superóxido Dismutase

Princípio da técnica

Para se obter a atividade da enzima superóxido dismutase foi utilizado o kit Fluka # 19160 (USA). Este kit utiliza um sistema de geração de ânions superóxido,

xantina e xantina oxidase, e avalia a capacidade da solução teste, sob condições padrões, em inibir a reação do ânion superóxido com o WST (2-(4 iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio). Esta reação quando ocorrida forma um composto denominado formazan, o qual absorve luz a 450 nm (conforme mostra o esquema abaixo). Utilizou-se soro como amostra biológica.



Preparo dos reagentes

WST – solução de trabalho: Foi diluído 1mL de WST em 19 mL de solução tampão.

Solução de enzima de trabalho: Foram diluídos 15 μ L da solução de enzima com 2,5 mL do tampão diluído.

Procedimento de dosagem

Em uma placa de ELISA, procedeu-se a dosagem conforme o quadro abaixo:

	Amostra	Branco 1	Branco 2	Branco 3
1- Amostra	20 μ L	-	20 μ L	
2- dd H ₂ O	-	20 μ L	-	20 μ L
3- WST de trabalho	200 μ L	200 μ L	200 μ L	200 μ L
4- Enzima de trabalho	20 μ L	20 μ L	20 μ L	-
5- Tampão diluído	-	-	-	20 μ L

Esta placa de ELISA foi incubada por 20 minutos à 37°C e em seguida as absorbâncias das amostras foram lidas a 450 nm no leitor de ELISA.

Cálculo

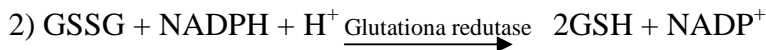
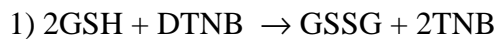
Atividade de SOD (Taxa de inibição %) =

$$[\frac{(A \text{ branco } 1 - A \text{ branco } 3) - (A \text{ amostra} - A \text{ branco } 2)}{(A \text{ branco } 1 - A \text{ branco } 3)} * 100].$$

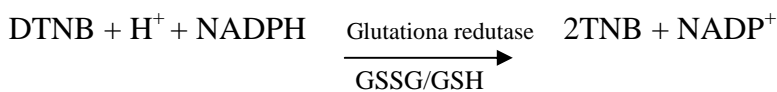
Portanto a atividade da enzima superóxido dismutase foi determinada através da habilidade das amostras do soro em inibir a reação do ânion superóxido com o WST.

4.4.4. Concentração de Glutathiona Total*Princípio da técnica*

A concentração de glutathiona total foi determinada utilizando o kit Sigma # CS0260. A glutathiona está presente nas células principalmente na sua forma reduzida (GSH) representando em torno de 90%, o restante aparece na forma de glutathiona oxidada (GSSG). Este kit utiliza um método cinético para mensurar os níveis de glutathiona total (GSH+GSSG) em amostras biológicas, através da redução do DTNB (Ácido 5,5'-Ditio-bis-(2-nitrobenzóico) à TNB.



A combinação das duas reações:

*Preparação da amostra biológica*

100mg do fígado foi homogeneizado com 1mL de ácido de sulfosalicílico 5% (SSA), e em seguida centrifugado por 10 minutos à 4°C. O sobrenadante foi retirado e usado como amostra biológica.

Preparo dos reagentes de estoque

Solução de ácido sulfosalicílico (SSA) 5%.

Tampão fosfato 5X (500 mM), contendo 5 mM EDTA.

Solução padrão estoque de glutatona: 0,3 mg de glutatona reduzida em 0,1 mL de água destilada.

Solução de estoque de DTNB: 8 mg de DTNB foram diluídos em 5,33 mL de dimetil sulfosalicílico (DMSO), resultando em uma solução com 1,5 mg/mL de concentração.

Estoque de NADPH (solução de 40 mg/mL).

Preparo dos reagentes de trabalho

Solução de enzimas diluída: Diluir 15,2 μ L de glutatona redutase (100 unidades/mL) em 250 μ L de tampão fosfato 1x.

Solução de NADPH de trabalho: Da solução de estoque de NADPH preparada são retirados 30 μ L para 7,5 mL de tampão fosfato 1x.

Mistura de trabalho: 8 mL de tampão 1x, 228 μ L da solução de enzimas diluída e 228 μ L de DNPH solução de estoque.

Solução padrão de glutatona – preparar para a curva padrão: Diluir 10 μ L de solução estoque de glutatona padrão com 2 mL de ácido SSA 5%.

Procedimento para dosagem

A confecção da curva padrão e as dosagens nas amostras foram feitas em placas de Elisa. Os reagentes e a sequência de adições estão descritas nas tabelas abaixo.

Procedimento para curva padrão

Poço	1	2	3	4	5
[GSH] μ M	50	25	12,5	6,25	3,125
Solução de GSH (μ L)	50	25(tubo 1)	25(tubo 2)	25(tubo 3)	25(tubo 4)
SSA 5% (μ L)	-	25	25	25	25
nmoles de GSH em 10 μ L de amostra	0,5	0,25	0,125	0,062	0,0312

Procedimento para o teste

	Amostra	SSA 5%	Mistura de trabalho
Branco	-	10 (µL)	150 (µL)
Padrão (tubos preparados para a curva)	10 (µL)	-	150 (µL)
Amostra	10 (µL)	-	150 (µL)

As amostras foram incubadas por 5 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, 50 µL de NADPH foram adicionados às mesmas e o cronômetro disparado. As absorvâncias das amostras foram lidas durante 5 minutos, no leitor de ELISA à 412 nm.

Cálculo

Foi feito um gráfico utilizando os pontos obtidos na curva padrão (estes pontos obtidos foram o delta das absorvâncias). Após análise de regressão linear, foi determinado a equação da reta (Concentração = a*(delta das absorvâncias) + b). Esta equação foi utilizada para determinar a concentração em nmoles de glutathiona total em 10µL de amostra, e este valor convertido para 1mL de amostra.

4.4.5. Catalase*Objetivo*

Determinação da atividade da enzima catalase, baseado na sua capacidade de hidrolisar o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em água e oxigênio molecular, conforme descrito por Aebi (1984). A amostra biológica utilizada para este ensaio foi homogenato do fígado.

Preparação da amostra biológica

100 mg do fígado foi homogeneizado com 1mL de tampão fosfato 0,1 M, pH 7,2 e em seguida centrifugado por 10 minutos à 4°C. O sobrenadante foi retirado e usado como amostra biológica.

Procedimento de dosagem

Em um tubo de polipropileno colocaram-se 50 µL de tampão fosfato pH 7,2; (0,1 mM) e 40 µL de água destilada, o qual foi mantido em banho maria 30°C por 1 minuto. Em seguida adicionaram-se 10 µL da amostra e 900 µL de H₂O₂ (10 mM). Homogeneizou-se a solução, o espectrofotômetro foi zerado com H₂O₂ (10 mM) em 240 nm e determinaram-se as absorvâncias das amostras exatamente a cada minuto, durante cinco minutos.

Cálculo

1U de catalase é equivalente a hidrólise de 1µmol de H₂O₂ ($\epsilon = 39,4 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) por minuto (Aebi, 1984). Usualmente a atividade dessa enzima é representada em Unidade por mL de amostra. Então podemos calcular a atividade da catalase da seguinte maneira:

$$U / mL = \frac{\text{Absorbância}}{\epsilon \times b} \times \frac{1000}{\text{Tempo} \times \text{Volume de Soro}}$$

A absorvância utilizada nessa expressão é o delta obtido das cinco absorvâncias lidas (absorvância final – absorvância inicial / 4).

4.4.6. Proteína Carbonílica

Objetivo

A oxidação de proteína por EROS leva à formação de derivados carbonílicos. Estes podem ser mensurados por métodos sensíveis, particularmente aqueles que utilizam o 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNP). O DNP reage com grupos carbonílicos gerando a hidrazona correspondente, a qual pode ser analisada espectrofotometricamente. A determinação da concentração sérica de proteína carbonílica foi realizada conforme descrito por Levine *et al.* (1994).

*Reagentes utilizados e forma de preparo*Ácido Clorídrico 2,5M.

DNPH (2,4-dinitrofenilhidrazina): 0,01 g de DNPH foram diluídos em 10 mL de HCL 2,5 M. Obtendo-se uma solução com 0,1% DNPH. Esta solução foi estocada no escuro a 4°C.

Solução de TCA (ácido tricloroacético): Inicialmente uma solução de TCA 2g/ml foi preparada. Dessa solução foram retirados 12 mL e diluídos em 108 mL de água. Obtendo-se uma solução final de TCA 20%. Em seguida, 40 mL da solução de TCA 20% foram retirados e diluídos em 40 mL de água, tendo uma solução final de TCA 10%.

SDS 6% - Sulfato Dodecil de Sódio.

Mistura de etanol e acetato de etila: Em um frasco foram misturados 30 mL de etanol e 30 mL de acetato de etila.

Procedimento de dosagem

Para cada amostra utilizaram-se dois tubos de polipropileno, um foi denominado de Amostra (A) e outro de Controle (C). Transferiram-se 200 µL de soro para os tubo A e C. Em seguida foram adicionados ao tubo A 800 µL de DNPH (2,4-dinitrofenilhidrazina) e ao tubo C 800 µL de HCL a 2,5 M. Ambos foram mantidos no escuro à temperatura ambiente por um período de 1 hora e a cada 15 minutos eram misturados no vórtex. No passo seguinte foi adicionado 1 mL de ácido tricloroacético (TCA) 20% em cada tubo. Os tubos foram misturados no vórtex e mantidos no gelo por 5 minutos. Logo após, foram centrifugados (tubo A e C) à 10.000g por 10 minutos a 4°C. Depois de centrifugados, os sobrenadantes eram descartados, e 1 mL de TCA 10% era adicionado a cada precipitado, estes misturados no vórtex e mantidos por 5 minutos no gelo. Uma nova centrifugação foi realizada. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e aos tubos A e C foram adicionados 1 mL da mistura etanol / acetato de etila, misturados no vórtex e novamente centrifugados. Este último passo foi repetido mais duas vezes. Ao final das repetições, o sobrenadante dos tubos A e C foram novamente descartados e adicionaram-se em ambos 500 µL de SDS 6%, misturados no

vórtex e centrifugados à 10.000 g por 10 minutos à 4°C. Finalmente o sobrenadante dos tubos foram retirados e lidos no espectrofotômetro à 370 nm.

Cálculos

A concentração de proteína carbonílica foi determinada utilizando a seguinte equação:

$$\text{Proteína Carbonílica (nmol / mL)} = \frac{CA}{0,022\mu\text{M}^{-1}} \times \frac{500\mu\text{L}}{200\mu\text{L}}$$

Onde CA é a subtração da absorbância do tubo A (amostra) pela absorbância do tubo C (controle).

Para se obter a concentração de proteína carbonílica em relação à concentração de proteínas totais no soro, este parâmetro foi determinado utilizando o kit comercial Labtest Diagnóstica S.A. O princípio da técnica de proteínas totais está descrita no Anexo I, item I.7 deste trabalho. Assim foi possível expressar a concentração de proteína carbonílica em nmoles/mg de proteína.

4.4.7. Grupos Sulfidrilas

Objetivo

Os radicais sulfidrilas representam todos os grupos tióis encontrados em proteínas, como a albumina e compostos de baixo peso molecular, como a glutathiona. Estes grupos podem ser oxidados quando o estresse oxidativo está elevado. A determinação de grupos sulfidrilas totais, grupos sulfidrilas ligados às proteínas e grupos sulfidrilas em compostos de baixo peso molecular (sulfidrilas livres) foi realizada conforme proposto por Sedlak & Lindsay (1968), utilizando o reagente de Ellman (DNTB). Os grupos tióis reagem com DNTB formando um complexo, que absorve luz à 412 nm.

Reagentes utilizados e forma de preparo

Tampão Tris-HCl, pH = 8,2: Foram dissolvidos 24,22 g de Trizma Base (PM 121,1) e 8,32 g de Ácido Etilenodiaminotetracético (EDTA; PM 416,21; 99% m/m) em 800 mL

de água destilada. O pH foi ajustado em 8,2 usando HCl 3 mol/L. Água destilada foi utilizada para completar o volume final para 1.000mL. A solução final continha 30 mmol/L de Trizma Base e 3 mmol/L de EDTA.

Tampão Tris-HCl, pH = 8,9: Foram dissolvidos 48,44 g de Trizma Base (PM 121,1) e 8,32 g de EDTA (PM 416,21; 99 %m/m) em 800 mL de água destilada. Ajustou-se o pH em 8,9 usando HCl 3 mol/L. Água destilada foi utilizada para completar o volume para 1.000 mL. A solução final continha 30 mmol/L de Trizma Base e 3 mmol/L de EDTA.

Cloreto de Trietanolamina (TEA): 1,33 mL de cloreto de trietanolamina (TEA; PM 185,7) e adicionou-se água destilada para completar o volume para 500 mL.

Ácido Tricloroacético (TCA): Foram dissolvidos 10 g de ácido tricloroacético (TCA PM 163,4) em 70 mL de água destilada. Agitou-se cuidadosamente e água destilada foi adicionada para completar o volume para 100mL.

Ácido 5,5'-Ditio-bis-(2-nitrobenzóico) (DTNB): Foram dissolvidos 10mg de ácido 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzóico) (DTNB; Reagente de Ellman; PM. 396,3) em 14,71 mL de metanol (PM 32,04; 0,79g/mL). Este reagente era preparado pouco antes da dosagem e mantido no gelo enquanto usado.

Solução padrão estoque: Foram dissolvidos 12 mg de cisteína (PM 121,16) em volume de TEA suficiente para 5 mL. A solução final continha 20 mmol/L de cisteína. Este reagente foi preparado no dia da dosagem e mantido no gelo enquanto usado.

Curva padrão para sulfidrilas totais e livres

O padrão de cisteína foi feito dissolvendo 50 µL de solução padrão estoque em 950 µL de TEA. E procedeu-se como segue:

TUBOS	1	2	3	4	5	6
CONC (µMOL/L)	0	50	100	250	500	1000
Padrão cisteína (µL)	0	25	50	125	250	500
TEA (µL)	500	475	450	375	250	0

Procedimento de dosagem de sulfidrilas totais no soro:

Para cada amostra, adicionaram-se 800 μL de metanol, 150 μL de Tris-HCl pH 8,2, 50 μL de DTNB e 40 μL de amostra (ou da série de padrões). Foi centrifugado a 13000 rpm durante 15 minutos à temperatura ambiente. As absorbâncias das amostras foram determinadas em 412 nm, a 25°C. Nesta dosagem são feitos dois brancos, o branco 1 que contém todos os reagentes menos a amostra e o branco 2 que não contém amostra e DTNB. O branco 2 é utilizado para acertar o aparelho. E as absorbâncias obtidas de todas as amostras são diminuídas da absorbância obtida para o branco 1.

Procedimento de dosagem de sulfidrilas livres no soro:

Para cada amostra, adicionaram-se 200 μL de TCA e 200 μL de amostra. Esta mistura foi agitada e centrifugada por 15 minutos a 13000 rpm em temperatura ambiente, para que as proteínas precipitassem. Adicionaram-se a um outro tubo de polipropileno, 150 μL do sobrenadante, 600 μL de Tris-HCl pH 8,9 e 60 μL de DTNB. As absorbâncias das amostras foram determinadas em 412 nm. Nesta dosagem são feitos dois brancos, o branco 1 que contém todos os reagentes menos a amostra e o branco 2 que não contém amostra e DTNB. O branco 2 é utilizado para acertar o aparelho. E as absorbâncias obtidas de todas as amostras são diminuídas da absorbância obtida para o branco 1.

Cálculos

Foi feito um gráfico expressando Concentração do padrão (Eixo Y) X Absorbância do padrão (Eixo X). Após análise de regressão linear da curva padrão obteve-se a equação da reta ($\text{Concentração} = a \cdot \text{Absorbância} + b$) que foi utilizada para determinar a concentração de sulfidrilas totais e de sulfidrilas livres. A concentração dos radicais sulfidrilas ligados às proteínas foi calculada pela diferença entre sulfidrilas totais e sulfidrilas livres. Todas as concentrações foram expressas em $\mu\text{mol/L}$.

4.5 – Análise Estatística

Para análise dos dados empregou-se o método de Análise de Variância Bivariada (Two – Way), usando o MINITAB 13 Software (State College, PA). As diferenças foram consideradas significantes quando o valor de P foi menor que 0,05. Quando ocorreram interações entre os fatores (dieta x açai) foi realizado o Teste de Tukey. Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão.

5 - RESULTADOS

5.1 Crescimento corporal, ingestão alimentar, excreção fecal e peso dos órgãos

Primeiramente examinamos como que a adição da polpa de açaí às dietas (padrão e hipercolesterolemiantes) afetava o ganho de peso final, ingestão alimentar, excreção fecal e peso dos órgãos dos animais. A tabela II mostra que no início do experimento os animais de todos os grupos experimentais apresentavam em média um peso inicial de 145g. Entretanto, o ganho de peso final foi 37% maior nos animais alimentados com a dieta hipercolesterolemiantes (H + HA) comparados aos que receberam a dieta padrão (C + CA). Concomitantemente, a adição da polpa de açaí às dietas também proporcionou um aumento no ganho de peso final, tendo os animais dos grupos CA e HA um peso final 7% maior que os grupos C e H. A ingestão alimentar foi reduzida pela dieta hipercolesterolemiantes. Além disso, uma interação entre dieta e açaí foi encontrada para este parâmetro, fazendo com que a média da ingestão alimentar do grupo CA ($754,32 \pm 56,54$ g) fosse similar a do grupo C ($710,53 \pm 46,56$ g) e a ingestão alimentar do grupo HA ($596,27 \pm 73,06$ g) menor que do grupo H ($676,86 \pm 42,77$ g) (Tabela II). Os animais que receberam a suplementação de açaí na dieta tiveram um aumento de 36% na excreção fecal comparados aos grupos C e H.

Animais que receberam a dieta hipercolesterolemiantes (H + HA) apresentaram um aumento de aproximadamente 19% no peso da gordura abdominal em relação aos grupos C e CA. A tabela II também mostra que a adição de açaí às dietas aumentou em aproximadamente 50% tanto o peso da gordura abdominal quanto o peso relativo (peso da gordura abdominal / peso do animal) nos grupos CA e HA comparados aos grupos C e H. Uma interação entre dieta e açaí também foi observada para estes pesos da gordura abdominal, fazendo com que as médias dos pesos da gordura abdominal para o grupo CA fosse maior que os valores encontrados para o grupo C e que os pesos da gordura abdominal fossem similares entre os grupos H e HA (Tabela II).

Os pesos do baço, do coração e dos rins, bem como os pesos relativos do coração e dos rins não apresentaram diferenças estatísticas entre os quatro grupos experimentais. Entretanto, o resultado obtido para o peso relativo do baço mostrou que a suplementação das dietas com a polpa de açaí provocou uma redução de 11,4% no peso

relativo deste órgão nos animais dos grupos CA e HA comparados aos grupos C e H (Tabela II). A dieta hipercolesterolemiantes (H + HA) determinou um aumento de 72% no peso do fígado, bem como um aumento de 56% no peso relativo deste órgão. Entretanto, a adição da polpa de açaí às dietas (grupos CA e HA) promoveu uma redução de 10% no peso relativo deste órgão comparado aos grupos C e H (Tabela II).

Estes dados sugerem que o açaí promove um aumento no ganho de peso dos animais, não interferindo na ingestão alimentar quando adicionado à dieta padrão ou a reduzindo em animais hipercolesterolemiantes. Este aumento no peso corporal pode estar em parte, associado com a maior quantidade de gordura abdominal também apresentada pelos grupos CA e HA. A adição de açaí às dietas também proporcionou uma redução no peso relativo do fígado, que como esperado tinha sido aumentado pela dieta hipercolesterolemiantes.

Tabela II – Crescimento corporal, ingestão alimentar, excreção fecal e peso dos órgãos de ratos tratados com dieta padrão (C), padrão acrescida de açaí (CA), hipercolesterolemiantes (H) e hipercolesterolemiantes acrescida de açaí (HA).

	Grupos Experimentais				Anova: Valor P		
	C	CA	H	HA	Dieta	Açaí	Dieta x Açaí
	Peso inicial (g)	145,00 ± 5,61	144,63 ± 5,73	145,75 ± 9,13	145,13 ± 6,51	>0,05	>0,05
Peso final (g)	177,88 ± 11,53	199,75 ± 9,44	202,63 ± 17,73	209,00 ± 12,96	<0,05	<0,05	>0,05
Ganho de peso final (g)	32,88 ± 11,63	55,13 ± 10,15	56,88 ± 11,90	63,88 ± 16,42	<0,05	<0,05	>0,05
Ingestão alimentar (g/42dias)	710,53 ± 46,56 ^{a,b}	754,32 ± 56,54 ^a	676,86 ± 42,77 ^b	596,27 ± 73,06 ^c	<0,05	>0,05	<0,05
Excreção fecal (g/42dias)	15,19 ± 3,02	22,87 ± 2,17	17,75 ± 1,00	22,09 ± 3,69	>0,05	<0,05	>0,05
Gordura abdominal (g)	4,11 ± 0,65 ^b	9,79 ± 1,78 ^a	7,86 ± 2,29 ^a	8,75 ± 2,15 ^a	<0,05	<0,05	<0,05
Peso relativo gordura abdominal (%p/p)	2,31 ± 0,33 ^b	4,90 ± 0,91 ^a	3,87 ± 1,10 ^a	4,17 ± 0,89 ^a	>0,05	<0,05	<0,05
Baço (g)	0,39 ± 0,06	0,41 ± 0,04	0,45 ± 0,09	0,39 ± 0,08	>0,05	>0,05	>0,05
Peso relativo baço (%p/p)	0,22 ± 0,04	0,21 ± 0,01	0,22 ± 0,03	0,18 ± 0,03	>0,05	<0,05	>0,05
Coração (g)	0,59 ± 0,04	0,63 ± 0,05	0,65 ± 0,08	0,64 ± 0,05	>0,05	>0,05	>0,05
Peso relativo coração (g)	0,33 ± 0,03	0,31 ± 0,03	0,32 ± 0,02	0,31 ± 0,02	>0,05	>0,05	>0,05
Rins (g)	1,15 ± 0,08	1,19 ± 0,08	1,24 ± 0,09	1,25 ± 0,22	>0,05	>0,05	>0,05
Peso relativo rins (%p/p)	0,65 ± 0,04	0,59 ± 0,04	0,61 ± 0,06	0,60 ± 0,10	>0,05	>0,05	>0,05
Fígado (g)	5,63 ± 0,72	5,30 ± 0,47	9,55 ± 1,26	9,20 ± 1,26	<0,05	>0,05	>0,05
Peso relativo fígado (%p/p)	3,16 ± 0,27	2,65 ± 0,16	4,70 ± 0,31	4,39 ± 0,44	<0,05	<0,05	>0,05

Os dados estão apresentados como média ± desvio padrão; n=8. Letras superescritas diferentes indicam diferença estatisticamente significativa na mesma linha (p<0,05). Peso relativo = (peso total do órgão) / (peso do animal).

5.2 Perfil lipídico

Como o açaí possui diversos componentes com a capacidade de regular os níveis séricos de colesterol, avaliamos se a suplementação com a polpa deste fruto modificaria o perfil sérico de lipídeos em animais controles e hipercolesterolêmicos. Para isto mensuramos o colesterol total, colesterol não – HDL, colesterol HDL e triacilgliceróis. Como esperado animais alimentados com a dieta hipercolesterolemiantes (H + HA) mostraram um aumento nos níveis de colesterol total e colesterol não –HDL e uma redução de aproximadamente 83% na concentração do colesterol HDL comparados aos grupos C + CA (Tabela III). Os elevados níveis no soro do colesterol total e não – HDL foram reduzidos pela adição da polpa de açaí às dietas experimentais. Além disso, uma interação entre dieta e açaí foi encontrada para os resultados de colesterol total e não – HDL. Não observamos diferença estatística para a média da concentração de colesterol total entre os grupos C ($2,16 \pm 0,21$ mmol/L) e CA ($2,06 \pm 0,23$ mmol/L), mas as diferenças foram significativas quando comparamos H e HA, o grupo HA ($5,42 \pm 0,98$ mmol/L) apresentou o nível de colesterol total menor do que o grupo H ($8,12 \pm 2,32$ mmol/L). Este mesmo perfil pode ser observado para a fração não – HDL do colesterol, ou seja, as médias dos grupos C ($0,52 \pm 0,25$ mmol/L) e CA ($0,29 \pm 0,15$ mmol/L) foram similares e a concentração de colesterol não – HDL no grupo H ($7,84 \pm 2,30$ mmol/L) foi maior que no grupo HA ($5,12 \pm 0,97$ mmol/L) (Tabela III).

Em relação à concentração sérica de triacilgliceróis os resultados encontrados mostraram que animais submetidos à dieta hipercolesterolemiantes (H + HA) apresentaram uma redução de 52% comparados aos grupos C e CA. Também foi encontrada uma interação entre dieta e açaí para este metabólico sérico, fazendo com que a média de TG do grupo CA ($0,64 \pm 0,03$ mmol/L) fosse menor que a do C ($0,76 \pm 0,09$ mmol/L) e que a concentração de TG fosse similar entre os grupos H ($0,31 \pm 0,04$ mmol/L) e HA ($0,36 \pm 0,06$ mmol/L) (Tabela III).

Sugerimos que a polpa de açaí apresenta efeito em reduzir os níveis séricos de colesterol em animais hipercolesterolêmicos.

Tabela III – Colesterol total, colesterol não - HDL, colesterol HDL e triacilgliceróis séricos de ratos tratados com dieta padrão (C), padrão acrescida de açaí (CA), hipercolesterolemiantes (H) e hipercolesterolemiantes acrescidos de açaí (HA).

	Grupos Experimentais				Anova: Valor P		
	C	CA	H	HA	Dieta	Açaí	Dieta x Açaí
Colesterol total (mmol/L)	2,16 ± 0,21 ^c	2,06 ± 0,23 ^c	8,12 ± 2,32 ^a	5,42 ± 0,98 ^b	<0,05	<0,05	<0,05
Colesterol não-HDL (mmol/L)	0,52 ± 0,25 ^c	0,29 ± 0,15 ^c	7,84 ± 2,30 ^a	5,12 ± 0,97 ^b	<0,05	<0,05	<0,05
Colesterol HDL (mmol/L)	1,64 ± 0,33	1,78 ± 0,09	0,28 ± 0,04	0,30 ± 0,07	<0,05	>0,05	>0,05
Triacilgliceróis (mmol/L)	0,76 ± 0,09 ^a	0,64 ± 0,03 ^b	0,31 ± 0,04 ^c	0,36 ± 0,06 ^c	<0,05	>0,05	<0,05

Os dados estão apresentados como média ± desvio padrão; n=8. Letras superescritas diferentes indicam diferença estatisticamente significativa na mesma linha (p<0,05).

5.3 Defesas antioxidantes

Investigamos o *status* antioxidante dos animais ao mensurar a atividade sérica da PON utilizando o fenilacetato e o paraoxon como substratos, a atividade da superóxido dismutase, a atividade da catalase e a concentração de glutathione total no fígado dos animais.

A dieta hipercolesterolemiantes reduziu em 57% a atividade arilesterásica da PON nos grupos H e HA em relação aos animais C e CA. Entretanto, a adição de açaí aumentou em 72% a atividade desta enzima. Concomitantemente, uma interação entre dieta e açaí também foi observada neste parâmetro, fazendo com que a média da atividade de PON-arilesterase fosse maior no grupo CA (65,17 ± 7,45 U/mL) comparada ao grupo C (37,10 ± 7,60 U/mL) e também foi maior no grupo HA (27,39 ± 9,09 U/mL) em relação ao H (16,7 ± 3,24 U/mL) (Tabela IV).

Como encontrado na PON – arilesterase a atividade paraoxonase também foi diminuída pela dieta hipercolesterolemiantes, os grupos H e HA apresentaram uma redução de 69% na atividade da PON – paraoxonase comparado aos grupos C e CA. E aumentada pela adição da polpa de açaí nas dietas experimentais, onde os grupos CA e HA apresentaram um aumento de 67% na atividade paraoxonase desta enzima. Além disso, uma interação entre dieta e açaí também foi observada, porém de maneira diferente da ocorrida para a atividade arilesterásica. Na atividade paraoxonase observou-se que o grupo CA ($0,35 \pm 0,06$ U/mL) apresentou o maior valor em relação ao grupo C ($0,20 \pm 0,05$ U/mL) e que os grupos HA ($0,10 \pm 0,03$ U/mL) e H ($0,07 \pm 0,01$ U/mL) não apresentaram diferença estatística entre si (Tabela IV).

Os resultados obtidos mostraram que a dieta hipercolesterolemiantes proporcionou um aumento de 54% na atividade sérica de SOD nos grupos H e HA comparados aos grupos C e CA. Diferentemente, a polpa de açaí reduziu significativamente a atividade da superóxido dismutase. Uma interação entre dieta e açaí também foi observada, fazendo com que os grupos C ($37,38 \pm 2,09$) e CA ($36,6 \pm 1,27$) fossem similares e que a média da atividade de SOD fosse menor no grupo HA ($47,22 \pm 7,19$) em relação ao H ($66,95 \pm 19,17$) (Tabela IV).

Assim como para a atividade de SOD, a adição da polpa de açaí às dietas experimentais (grupos CA e HA) proporcionou uma redução de 42% na concentração hepática de glutathiona total comparada aos grupos C e H. Os resultados obtidos para glutathiona total também mostraram uma interação entre dieta e açaí, proporcionando valores similares para os grupos C ($117,50 \pm 17,57$ nmoles/mL) e CA ($89,72 \pm 20,55$ nmoles/mL) e diferenças entre H e HA, tendo o grupo HA ($67,73 \pm 23,88$ nmoles/mL) apresentado menores níveis de glutathiona em relação ao grupo H ($155,08 \pm 17,24$ nmoles/mL). A atividade da catalase no fígado dos animais não apresentou diferença estatística entre os quatro grupos experimentais (Tabela IV).

Em resumo, a suplementação das dietas com a polpa de açaí promoveu nas defesas antioxidantes um efeito contrário aos resultados obtidos para o efeito da dieta hipercolesterolemiantes. O açaí proporcionou um aumento em ambas as atividades da PON e uma redução na atividade de SOD e na concentração de glutathiona total.

Tabela IV – Atividade arilesterásica e paraoxonase da enzima paraoxonase no soro, atividade sérica da superóxido dismutase, concentração hepática de glutathiona total e atividade da catalase no fígado de ratos tratados com dieta padrão (C), padrão acrescida de açaí (CA), hipercolesterolemiantes (H) e hipercolesterolemiantes acrescida de açaí (HA).

	Grupos Experimentais				Anova: Valor P		
	C	CA	H	HA	Dieta	Açaí	Dieta x Açaí
	PON - arilesterase (U/mL)	37,10 ± 7,60 ^b	65,17 ± 7,45 ^a	16,70 ± 3,24 ^c	27,39 ± 9,09 ^b	<0,05	<0,05
PON - paraoxonase (U/mL)	0,20 ± 0,05 ^b	0,35 ± 0,06 ^a	0,07 ± 0,01 ^c	0,10 ± 0,03 ^c	<0,05	<0,05	<0,05
SOD (Taxa de inibição %)	37,38 ± 2,09 ^b	36,60 ± 1,27 ^b	66,95 ± 19,17 ^a	47,22 ± 7,19 ^b	<0,05	<0,05	<0,05
Glutathiona total (nmoles/mL)	117,50 ± 17,57 ^b	89,72 ± 20,55 ^{b,c}	155,08 ± 17,24 ^a	67,73 ± 23,88 ^c	>0,05	<0,05	<0,05
Catalase (U/mL)	26,56 ± 6,92	21,89 ± 11,48	20,07 ± 8,67	19,67 ± 7,64	>0,05	>0,05	>0,05

Os dados estão apresentados como média ± desvio padrão; n=8. Letras superescritas diferentes indicam diferença estatisticamente significativa na mesma linha (p<0,05). Pon: Enzima Paraaxonase; SOD: Superóxido dismutase. A atividade de SOD foi determinada através da habilidade de amostras do soro em inibir a reação do ânion superóxido com o WST.

5.4 Concentração de proteína carbonílica e grupos sulfidrila

Como biomarcadores do estresse oxidativo os níveis séricos de proteína carbonílica e grupos sulfidrila foram determinados. A adição da polpa de açaí às dietas padrão e hipercolesterolemiantes reduziu em 47% os níveis de proteínas carbonílicas no soro (Tabela V). Animais de ambos grupos, controle e hipercolesterolêmicos,

suplementados com a polpa de açaí aumentaram significativamente a concentração de grupos SH total, livre e ligado a proteína (Tabela V).

Em adição, uma interação entre dieta e açaí foi encontrada para o radical sulfidrila total e sulfidrila ligado à proteína. O resultado obtido para SHTT mostrou que a concentração deste radical no grupo CA ($407,64 \pm 42,17 \mu\text{mol/L}$) foi superior comparado ao grupo C ($309,55 \pm 35,95 \mu\text{mol/L}$) e que o grupo HA ($478,41 \pm 43,60 \mu\text{mol/L}$) também apresentou uma concentração de SHTT maior em relação ao H ($295,96 \pm 28,59 \mu\text{mol/L}$). Para o radical SH Prot. observou-se que o grupo CA ($294,17 \pm 40,57 \mu\text{mol/L}$) e C ($244,66 \pm 36,51 \mu\text{mol/L}$) foram semelhantes e que os níveis deste radical foi maior no grupo HA ($352,51 \pm 44,62 \mu\text{mol/L}$) em relação ao grupo H ($223,00 \pm 30,54 \mu\text{mol/L}$) (Tabela V).

Tabela V – Concentração sérica de proteína carbonílica, radical sulfidrila total, radical sulfidrila livre e radical sulfidrila ligado a proteína de ratos tratados com dieta padrão (C), padrão acrescida de açaí (CA), hipercolesterolemiantes (H) e hipercolesterolemiantes acrescida de açaí (HA).

	Grupos Experimentais				Anova: Valor P		
	C	CA	H	HA	Dieta	Açaí	Dieta x Açaí
Proteína carbonílica (nmol/mg proteína)	$0,56 \pm 0,38$	$0,21 \pm 0,17$	$0,47 \pm 0,32$	$0,33 \pm 0,13$	>0,05	<0,05	>0,05
SHTT ($\mu\text{mol/L}$)	$309,55 \pm 35,95^c$	$407,64 \pm 42,17^b$	$295,96 \pm 28,59^c$	$478,41 \pm 43,60^a$	<0,05	<0,05	<0,05
SH Livre ($\mu\text{mol/L}$)	$64,89 \pm 5,91$	$113,47 \pm 2,83$	$72,95 \pm 7,57$	$125,90 \pm 5,26$	<0,05	<0,05	>0,05
SH Prot. ($\mu\text{mol/L}$)	$244,66 \pm 36,51^{b,c}$	$294,17 \pm 40,57^b$	$223,00 \pm 30,54^c$	$352,51 \pm 44,62^a$	>0,05	<0,05	<0,05

Os dados estão apresentados como média \pm desvio padrão; n=8. Letras superescritas diferentes indicam diferença estatisticamente significativa na mesma linha ($p < 0,05$). SHTT: Sulfidrila total; SH Livre: Sulfidrila Livre; SH Prot.: Sulfidrila ligada à proteína.

5.5 Indicadores bioquímicos da função hepática

A dieta hipercolesterolemiantes promoveu um aumento nas atividades das enzimas, alanina aminotransferase, aspartato aminotransferase e fosfatase alcalina. Entretanto, a adição da polpa de açaí não alterou as atividades das aminotransferases e proporcionou uma redução de 18% na atividade de ALP nos grupos CA e HA comparados aos grupos C e H (Tabela VI). O resultado obtido para a atividade da alanina aminotransferase também mostrou uma interação entre dieta e açaí, fazendo com que a média da atividade de ALT no grupo CA ($23,95 \pm 0,77$ UI) fosse menor em relação ao grupo C ($29,07 \pm 3,54$ UI) e que os grupos H ($31,36 \pm 3,39$ UI) e HA ($33,26 \pm 4,80$ UI) apresentassem valores similares (Tabela VI).

Tabela VI – Atividade sérica da aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT) e fosfatase alcalina (ALP) de ratos tratados com dieta padrão (C), padrão acrescida de açaí (CA), hipercolesterolemiantes (H) e hipercolesterolemiantes acrescida de açaí (HA).

	Grupos Experimentais				Anova: Valor P		
	C	CA	H	HA	Dieta	Açaí	Dieta x Açaí
AST (UI)	$39,98 \pm 4,37$	$39,8 \pm 4,15$	$59,66 \pm 3,98$	$54,63 \pm 4,55$	<0,05	>0,05	>0,05
ALT (UI)	$29,07 \pm 3,54^a$	$23,95 \pm 0,77^b$	$31,36 \pm 3,39^a$	$33,26 \pm 4,8^a$	<0,05	>0,05	<0,05
ALP (U/L)	$35,93 \pm 3,39$	$26,34 \pm 6,67$	$58,0 \pm 6,41$	$50,54 \pm 4,9$	<0,05	<0,05	>0,05

Os dados estão apresentados como média \pm desvio padrão; n=8. Letras superescritas diferentes indicam diferença estatisticamente significativa na mesma coluna ($p < 0,05$). AST: Aspartato aminotransferase; ALT: Alanina aminotransferase; ALP: Fosfatase alcalina.

6 – DISCUSSÃO

A LDL é a principal lipoproteína transportadora de colesterol do fígado para os tecidos periféricos. Esta lipoproteína fornece colesterol para os tecidos periféricos através da interação com receptores de superfície celular chamados receptores de LDL (LDLR), que reconhecem sua apolipoproteína B-100. Após a ligação, o complexo LDL-LDLR sofre endocitose mediada por clatrina (Champe & Harvey, 2002). Quando a célula está repleta de colesterol ocorre redução do LDLR na membrana plasmática, contribuindo para aumentar a concentração de colesterol na circulação.

Quando a concentração de LDL na corrente sanguínea é alta, esta lipoproteína pode se acumular no espaço sub-endotelial arterial e sofrer modificações químicas, como por exemplo, oxidação por espécies reativas de oxigênio, tornando-se LDL modificada (Gant & Heinecke, 2001). Macrófagos reconhecem as partículas de LDL modificadas, por meio de receptores *scavengers* (Kunjathoor *et al.*, 2002). Os macrófagos por não apresentarem a regulação do colesterol por feedback o acumulam, originando as células em espuma responsáveis pela primeira manifestação da placa aterosclerótica (Osterud & Bjorklid, 2003).

Em contraste a HDL, uma lipoproteína sintetizada no fígado e liberada na corrente sanguínea, reduz o risco de desenvolvimento de DCV. Esta lipoproteína é responsável pelo transporte reverso do colesterol. Portanto, a redução na concentração do colesterol LDL e o aumento nos níveis de HDL são os primeiros passos na prevenção das DCV. Além disso, a prevenção da oxidação da LDL também é muito importante para prevenir o desenvolvimento da aterosclerose.

Assim, a procura por novos compostos com capacidade de reduzir e/ou regular a concentração do colesterol plasmático, bem como exercer ações antioxidantes tem aumentado através dos anos, resultando em um aumento no número de publicações que descrevem os efeitos fisiológicos exercidos por uma variedade de produtos naturais. Dentre estes produtos, podemos destacar o açaí, um fruto tipicamente brasileiro que tem despertado muito interesse no mercado mundial de alimentos.

No presente estudo, alimentamos ratos com dieta hipercolesterolemiantes e estes apresentaram uma piora do perfil sérico de lipídeos, caracterizado por um aumento nos

níveis séricos de colesterol total e colesterol não – HDL e uma redução na concentração do colesterol HDL. Estes animais também apresentaram um desequilíbrio do *status* antioxidante, como sugerido pela alteração das defesas antioxidantes. Assim, este modelo animal foi utilizado para estudar o efeito do consumo de açaí sob perfil lipídico, defesas antioxidantes e biomarcadores do estresse oxidativo.

Nossos resultados mostraram uma ação benéfica da polpa de açaí sob o perfil sérico de lipídeos. A suplementação da dieta hipercolesterolemiantes com polpa de açaí fez com que os animais do grupo HA apresentassem valores inferiores de colesterol total e colesterol não – HDL (representado por frações aterogênicas do colesterol) comparados aos animais do grupo H. Quando adicionado à dieta padrão a polpa de açaí exerceu um efeito hipotriglicéidêmico.

Este efeito hipocolesterolemiantes do açaí também tem sido descrito para outros alimentos ricos em compostos fenólicos, tais como, uva vermelha (Naissides *et al.*, 2004), maçã (Aprikian *et al.*, 2002) e chá verde (Bose *et al.*, 2008). Os autores sugerem que compostos fenólicos podem inibir a absorção intestinal de lipídeos da dieta por formarem complexos com essas biomoléculas e assim interferirem com o processo de emulsificação, solubilização e hidrólise das micelas. De acordo com Ikeda *et al.* (2005) a redução nos níveis séricos de triacilgliceróis devido ao consumo de compostos fenólicos pode estar associada à inibição da atividade da lipase pancreática por estes compostos.

Recentemente Akila & Devaraj (2008) avaliaram o efeito sinérgico de dois extratos alcoólicos ricos em compostos fenólicos sob parâmetros bioquímicos em ratos com hipercolesterolemia induzida pela dieta. A administração simultânea desses dois extratos reduziu significativamente os níveis de colesterol total e de LDL e VLDL (colesterol não – HDL) no soro e no tecido cardíaco dos animais, além de promover um aumento na concentração fecal de ácidos biliares e esteróides neutros.

Os estudos listados acima nos levam a pensar que a fração de polifenóis seria responsável pelo efeito hipolipidêmico do açaí. Entretanto, como foi mostrado no capítulo 2 deste trabalho, os outros nutrientes da polpa do açaí (ácidos graxos insaturados, fibras alimentares e fitosteróis) também desempenham importantes efeitos na melhora do perfil lipídico. A ingestão de ácidos graxos insaturados leva à redução dos níveis de colesterol total e LDL na circulação (Hu *et al.*, 1997), por aumentar a

expressão ou a atividade de receptores de LDL no fígado (Fernandez & West, 2005). As fibras dietéticas sequestram e promovem a excreção de sais biliares, em resposta o fígado produz mais ácidos biliares, e em consequência mais colesterol é captado da circulação (Brown *et al.*, 1999) e os fitosteróis por apresentarem a estrutura química similar à do colesterol, competem pela absorção intestinal (Ostlund, 2004).

A adição de açaí às dietas testadas não apresentou qualquer efeito sobre os níveis séricos do colesterol HDL o que corrobora com os dados da literatura. Segundo Fernandez & West (2005) ácidos graxos monoinsaturados não possuem efeitos significativos sobre os níveis de colesterol HDL e o ácido linoléico possui mínimos efeitos. Calpe-Berdiel *et al.* (2009) mostraram que o consumo diário de produtos enriquecidos com esteróides de plantas apresenta um efeito positivo no perfil lipídico de pacientes hipercolesterolêmicos. Promovendo uma redução do colesterol total e LDL, sem interferir nos níveis de triacilgliceróis e colesterol HDL.

Surpreendentemente, animais alimentados com a dieta hipercolesterolemiantes apresentaram uma redução na concentração de triacilgliceróis no soro quando comparados aos alimentados com uma dieta padrão. A dieta hipercolesterolemiantes possui uma maior porcentagem de ácidos graxos insaturados (óleo de soja) do que a dieta padrão, esta diferença pode ser responsável pelo resultado obtido. Uma vez que ácido graxo insaturado possui efeito sobre o metabolismo da VLDL, sua ingestão promove uma redução na síntese e excreção hepática desta lipoproteína provocando assim, uma diminuição nos níveis séricos de triacilgliceróis (Connor *et al.*, 1993). Esta redução nos níveis séricos de TG em ratos alimentados com uma dieta hipercolesterolemiantes rica em óleo de soja também foi encontrado por Turbino-Ribeiro *et al.* (2003).

Além das concentrações das lipoproteínas plasmáticas, mais recentemente, interesse tem sido dado à atividade da enzima paraoxonsase (PON). A redução na atividade da PON está inversamente relacionada com o desenvolvimento da aterosclerose. Não somente a LDL está susceptível à modificação oxidativa, mas também outros lipídeos no soro, como por exemplo, aqueles presentes na HDL. A modificação oxidativa da HDL tem sido associada com o prejuízo da habilidade desta lipoproteína em promover o transporte reverso do colesterol (Morel, 1994). A PON

possui a função de prevenir a oxidação da LDL, da HDL, bem como hidrolisar fosfolipídios oxidados e hidroperóxidos presentes na LDL modificada (Aviram *et al.*, 1998b). Além de efeitos antioxidantes, a PON exerce propriedades antiinflamatórias, uma vez que reduz a adesão de monócitos nas células endoteliais e reduz a quimiotaxia de macrófagos exercida por fosfolipídios oxidados (Ahmed *et al.*, 2003).

A paraoxonase é uma esterase dependente de cálcio, sua família consiste de 3 genes: PON1, PON2 e PON3 (Chait *et al.*, 2005). O RNAm da PON1 é expresso principalmente no fígado, o da PON3 é expresso no fígado e rim, enquanto que PON2 é amplamente expresso em muitos tecidos, incluindo células da parede arterial, como macrófagos. A PON1 e PON3 são secretadas pelo fígado associadas a HDL, contribuindo assim para o efeito ateroprotetor desta lipoproteína (Ng *et al.*, 2004). Todas as três proteínas possuem atividade hidrolítica tendo atividade arilesterásica ou paraoxonase, dependendo dos substratos a serem hidrolisados, ácidos carboxílicos aromáticos ou compostos organofosfatos, respectivamente (Getz & Reardon, 2004).

A PON1 possui três resíduos de cisteína, dois formam pontes dissulfeto intramolecular e um resíduo é livre, o qual é essencial para a ação da PON1 em proteger as lipoproteínas plasmáticas da oxidação por espécies reativas. Entretanto, a oxidação deste resíduo de cisteína livre pelo peróxido de hidrogênio ou pela própria LDL modificada, leva a inativação desta enzima (Aviram *et al.*, 1998a). Ratos alimentados com uma dieta rica em colesterol apresentam uma redução significativa na síntese hepática da PON 1 (Durak *et al.*, 2004). Entretanto, antioxidantes da dieta podem aumentar a atividade e os níveis da PON1, uma vez que podem agir diretamente na expressão do gene desta enzima ou indiretamente por reduzir o estresse oxidativo (o qual inativa PON1) (Durrington *et al.*, 2002). Dentre os antioxidantes dietéticos, os compostos fenólicos estão relacionados com o aumento da atividade da PON1 no soro de humanos e camundongos (Fuhrman & Aviram, 2002).

No presente estudo, encontramos que ratos alimentados com a dieta hipercolesterolemia apresentaram uma redução de ambas às atividades da PON e que a suplementação das dietas experimentais (padrão e hipercolesterolemia) com a polpa de açaí proporcionava um aumento nas atividades desta enzima. Nossos resultados sugerem que provavelmente a polpa de açaí exerceu efeito antioxidante, uma

vez que a presença de açaí resultou em um aumento na atividade de uma enzima que é inibida por espécies reativas ou produtos da sua oxidação.

Nossos resultados corroboram com a literatura, Shiner *et al.* (2007) mostraram que o suco de romã, o qual é rico em compostos fenólicos, promove um aumento na expressão de PON2 em macrófagos, em um mecanismo relacionado com a ativação de receptores nucleares (PPAR γ). Noll *et al.* (2008) trataram camundongos que apresentavam um quadro de hiperhomocisteinemia com extrato de polifenóis de uva vermelha. Os autores encontraram que a suplementação com o extrato fenólico aumentou significativamente a atividade sérica e hepática da PON1, que tinha sido reduzida pelo quadro de hiperhomocisteinemia apresentado pelos animais.

Sabe-se que os radicais livres são importantes agentes na modificação química da LDL promovendo a sua oxidação e tornando-a mais aterogênica. Além disso, são capazes de danificar toda biomolécula celular, até mesmo quando esta dispõe de algum mecanismo de proteção, como no caso da molécula de DNA das células de mamíferos (Ames, 1989). Além do DNA, proteínas, carboidratos, ácidos graxos, membranas biológicas e muitas outras estruturas estão sujeitos a esta oxidante ação deletéria (Bagchi & Puri, 1998).

Baixos e constantes níveis de EROS são indispensáveis em muitos processos bioquímicos, incluindo apoptose celular (Ghosh & Myers, 1998) e defesa contra microorganismos (Bae *et al.*, 1997). Em contraste, altas concentrações ou inadequada remoção de EROS resultam em um quadro de estresse oxidativo, o qual pode gerar danos a macromoléculas biológicas e severos distúrbios metabólicos. Por definição, estresse oxidativo é o desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio e a capacidade de ação do sistema de defesa antioxidante para neutralizá-las e prevenir seus efeitos deletérios (Mayne, 2003).

Então, para que prevaleça o equilíbrio homeostático e as funções biológicas sejam preservadas, é necessário que o organismo controle a presença de ambos, oxidante e antioxidante, continuamente. Para isto, sistemas biológicos desenvolveram a capacidade de promover respostas adaptativas que podem compensar o estresse oxidativo, como por exemplo, um sistema de proteção antioxidante altamente complexo, que envolve uma variedade de componentes endógenos e exógenos, funcionando interativamente para neutralizar espécies reativas (Sies, 1993).

A enzima superóxido dismutase (SOD) tem ação antioxidante, pois catalisa a dismutação do radical superóxido em H_2O_2 e O_2 . Uma vez produzido, o peróxido de hidrogênio precisa ser destruído, já que participa da reação que produz o radical hidroxila (considerado a EROS mais reativa em sistemas biológicos). O H_2O_2 então é eliminado pelas enzimas antioxidantes, catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GSH-Px). Para exercer sua função antioxidante a GSH-PX utiliza a glutathione reduzida (GSH) como cofator e em consequência desta utilização produz a glutathione oxidada (GSSG).

A produção dessas defesas citoprotetivas é induzida pela exposição às espécies reativas de oxigênio, via um mecanismo regulado a nível transcricional (Kensler *et al.*, 2007). Sob condições fisiológicas normais, a transcrição do fator Nrf2 é inibida pela proteína repressora Keap1 localizada no citoplasma das células (Itoh *et al.*, 2003). A proteína Keap1 contém resíduos conservados de cisteína, os quais desempenham um papel crítico na manutenção do Nrf2 no citoplasma. Entretanto, um aumento na produção de EROS no organismo promove no citoplasma a dissociação desse complexo, fazendo com que o Nrf2 fique ativado sendo transportado para o núcleo (Dahl & Mulcahy, 2001; Vries *et al.*, 2008). No núcleo das células este fator de transcrição se liga a elementos de resposta a antioxidantes (ARE) na região promotora dos genes que transcrevem enzimas antioxidantes endógenas (Nguyen *et al.*, 2003). A ativação Nrf2-ARE induz a produção da superóxido dismutase, catalase, glutathione peroxidase, glutathione reduzida, peroxiredoxinas, nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH): quinona oxidoreduases (NQOs) e hemoxigenases (Dringen *et al.*, 2005; McCord & Edeas, 2005). Juntas estas enzimas e peptídeos representam um potente mecanismo antioxidante de defesa. Uma vez restabelecido o balanço redox da célula, o Nrf2 é dissociado do núcleo pelo Keap1 e subsequentemente transportado para o citoplasma onde é ubiquitinado e degradado (Sun *et al.*, 2007).

A dieta hipercolesterolemiantes promove uma piora do balanço redox do organismo, impondo uma maior produção de espécies reativas (Kurosawa *et al.*, 2005). Neste estudo vimos um aumento na atividade da SOD e na concentração da glutathione total em ratos alimentados com a dieta hipercolesterolemiantes. Isto possivelmente ocorreu devido ao aumento na produção de EROS induzida pela dieta e, consequente

ativação da via Nrf2-ARE para que o organismo contornasse o quadro de estresse. Quando esta dieta foi suplementada com açaí, ocorreu uma redução na atividade da SOD e na concentração de glutathione, retornando a valores semelhantes aos grupos alimentados com a dieta padrão (C e CA). Nossos resultados sugerem que componentes presentes na polpa de açaí agiram de modo a reduzir a formação de espécies reativas mantendo o balanço redox do organismo, não tendo a necessidade fisiológica de ativar a via Nrf2 -ARE. Dentre os componentes presentes na polpa de açaí, tem-se descrito que flavonóides atuam de modo a diminuir a produção de espécies reativas (quelando íons metálicos) e também atuam de modo a neutralizá-las (Enio, 2003; Harborne & Willians, 2000).

Yao *et al.* (2008) trataram células do cristalino humano com radiação ultravioleta, a fim de induzir a formação de EROS. Em seguida, essas células foram tratadas com fisetina, com o objetivo de avaliar os efeitos deste flavonóide. Os autores observaram que a radiação U.V. provocava um aumento na formação de espécies reativas e ativação do fator de transcrição NRF2 e seu transporte para o núcleo celular. Entretanto, a ativação e a translocação não foram estimuladas pelo tratamento com a fisetina. Os autores concluíram que este flavonóide age diminuindo a formação de EROS *in vitro* e por isso inibem esta via de sinalização.

Por outro lado, outros estudos mostraram que o consumo de compostos fenólicos pode propiciar um aumento na atividade das defesas antioxidantes ou até mesmo não apresentar nenhum tipo de efeito (Alia *et al.*, 2003; Breinholt *et al.*, 1999; Dragsted *et al.*, 2004). Estes resultados contraditórios indicam que a resposta à atividade dessas defesas depende da origem do estresse oxidativo, do modelo animal utilizado, da defesa antioxidante estudada e do tipo e fonte do antioxidante dietético.

Todavia, a literatura é bastante consistente ao demonstrar a existência de uma inversa relação entre a ingestão de alimentos ricos em compostos fenólicos e a formação das EROS e dos produtos por elas gerados (Lecumberri *et al.*, 2007; Panza *et al.*, 2008). Vários biomarcadores têm sido descritos para demonstrar a ocorrência de injúria oxidativa (Perry *et al.*, 2000). Proteína carbonílica é um marcador bioquímico, usado para detectar a modificação oxidativa de resíduos de aminoácidos em proteínas (Beal, 2002). Cátions tais como, Fe^{2+} ou Cu^{2+} , podem se ligar a locais de ligação de cátions nas proteínas, e assim permitir o ataque dessas proteínas por espécies reativas, como H_2O_2

ou O_2^- . Essas espécies transformam a cadeia de aminoácidos em carbonilas (Levine *et al.*, 1994). Mudanças oxidativas em proteínas essenciais podem resultar em perda da função.

O açaí promoveu, no presente estudo, uma redução nos níveis séricos de proteína carbonílica, mostrando uma ação na proteção de estruturas protéicas no organismo, confirmando o seu potencial antioxidante. Corroborando com nossos resultados, Ansari *et al.* (2009) observaram uma redução nos níveis de oxidação protéica em cultura de células neuronais tratadas com o flavonóide quercetina.

Tem-se demonstrado que os níveis de grupos tióis também podem ser considerados um biomarcador do estresse oxidativo (Kadota *et al.*, 1991; Quinlan *et al.*, 1994), uma vez que estes grupos contribuem significativamente para a capacidade antioxidante do plasma. No presente estudo, avaliamos os níveis séricos de radicais sulfidrilas totais, sulfidrilas ligados à proteína, sulfidrilas livres (que representa os grupos tióis encontrados em compostos de baixo peso molecular).

A albumina é a principal fonte de grupos tióis ligados à proteína no plasma. Esta pode funcionar como antioxidante extracelular, uma vez que consegue neutralizar espécies reativas, pois possui em sua estrutura resíduos livres de cisteína. Os grupos tióis de baixo peso molecular estão representados principalmente pela glutathiona reduzida (GSH) e pela cisteína (CSH) que quando oxidados formam a glutathiona oxidada (GSSG) e a cistina (CSSC), respectivamente (Koehler, 2003).

O efeito do açaí em reduzir o estresse oxidativo no organismo dos animais também foi confirmado pelos grupos sulfidrilas. Os níveis destes grupos foram aumentados no plasma dos animais que tiveram sua dieta suplementada com este fruto e já está bem estabelecido na literatura que os níveis de tióis no plasma diminuem à medida que o estresse se eleva, uma vez que estes grupos podem ser oxidados (Wisdom *et al.*, 1991). Estudos mostraram que a alta relação de DCV em pacientes urêmicos em terapia de hemodiálise é devida principalmente, aos baixos níveis de grupos tióis encontrados nestes pacientes comparados aos níveis encontrados em indivíduos saudáveis (Lim *et al.*, 2007).

A AST e a ALT são enzimas intracelulares presentes em grandes quantidades no citoplasma dos hepatócitos. Lesões ou destruição das células hepáticas liberam essas aminotransferases para a circulação. A fosfatase alcalina pertence a um grupo de

enzimas que catalisa a hidrólise de vários fosfomonoésteres em pH alcalino, ela está localizada nas membranas de revestimento dos canalículos biliares, portanto um aumento nos níveis séricos de ALP está relacionado com a ocorrência de desordens do trato biliar (Motta, 2003).

A dieta hipercolesterolemiaante provavelmente conduziu a um dano hepático, promovendo uma hepatomegalia e um aumento na atividade das aminotransferases e da fosfatase alcalina. Este aumento de peso pode ser devido a um acúmulo de gordura, representando um quadro de esteatose hepática, estes dados corroboram com outros trabalhos (Rosamet al., 1998; Story & Baldino, 1981). Nossa hipótese era que pelo seu potencial antioxidante o açaí poderia abrandar tais efeitos. De fato, nossos resultados mostraram que a polpa de açaí agiu de modo a reduzir o peso relativo do fígado e a atividade da fosfatase alcalina, independente da dieta. E um efeito adicional foi observado quando a polpa de açaí foi suplementada à dieta padrão, tendo os animais do grupo CA uma menor atividade da alanina aminotransferase. Estes resultados mostram que *in vivo* a polpa de açaí utilizada não promoveu efeito hepatoprotetor significativo, principalmente quando adicionado à dieta hipercolesterolemiaante. Outros ensaios utilizando doses maiores devem ser realizados para confirmar ou rejeitar nossa hipótese.

7 – CONCLUSÕES

- ✓ Nossos resultados mostraram que a polpa do açaí promove uma evidente melhora nos níveis de colesterol na hipercolesterolemia induzida pela dieta em ratas. Quando o açaí é adicionado à dieta hipercolesterolemiantes ocorreu uma redução nos níveis séricos de colesterol total e da fração não-HDL. Entretanto, estes efeitos não foram observados nos animais normocolesterolêmicos.

- ✓ A dieta hipercolesterolemiantes reduziu a atividade da paraoxonase e a adição da polpa de açaí reverteu este efeito. Foi demonstrado que a polpa do açaí foi capaz de aumentar a atividade desta enzima mesmo quando associada à dieta padrão. A dieta hipercolesterolemiantes também promoveu aumento na atividade da enzima antioxidante Superóxido dismutase e da concentração da Glutathione total, sugerindo ter esta dieta um efeito de aumentar a formação de EROS. A polpa do açaí, provavelmente pelos seus efeitos antioxidantes, fez com que estes parâmetros apresentassem valores similares aos apresentados pelos grupos controles. A adição da polpa de açaí às dietas padrão e hipercolesterolemiantes significativamente diminuiu a concentração sérica de proteína carbonílica e aumentou os níveis de grupos sulfidrilas presentes em proteínas ou compostos de baixo peso molecular. Todos estes resultados indicam que a polpa de açaí apresenta notável ação antioxidante.

- ✓ Nossos resultados possuem um grande impacto na avaliação das bioatividades *in vivo* da polpa de açaí e revelam uma importante função deste fruto na promoção da saúde, possibilitando o seu reconhecimento como alimento funcional.

8 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aebi, H. (1984). Catalase *in vitro*. *Methods Enzymol.* 105: 121-6.

Aherne, S. A.; O'Brien, N. M. (2002). Dietary flavonols: chemistry, food content, and metabolism. *Nutrition.* 18(1): 75-81.

Ahmed, Z.; Babaei, S.; Maguire, G. F.; et al. (2003). Paraoxonase-1 reduces monocyte chemotaxis and adhesion to endothelial cells due to oxidation of palmitoyl, linoleoyl glycerophosphorylcholine. *Cardiovasc Res.* 57: 225–231.

Akila, M.; Devaraj, H. (2008). Synergistic effect of tincture of *Crataegus* and *Mangifera indica* L. extract on hyperlipidemic and antioxidant status in atherogenic rats. *Vascul Pharmacol.* 49: 173–177.

Alia, M.; Horcajo, C.; Bravo, L.; Goya, L. (2003). Effect of grape antioxidant dietary fiber on total antioxidant capacity and the activity of liver antioxidant enzymes in rats. *Nutr Res.* 23: 1251– 1267.

Aller, R.; Antonio de Luis, D.; Izaola, O.; La Calle, F.; Olmo, L.; Fernandez, L.; Arranz, T.; Hernandez, J. M.G. (2004). Effect of soluble fiber intake in lipid and glucose levels in healthy subjects: a randomized clinical trial. *Diabetes Res Clin Pract.* 65: 7–11.

Ames, B. N. (1989). Endogenous DNA damage as related to cancer and aging. *Mutation Res.* 214: 41-46.

Anini, Y.; Fu-Cheng, X.; Cuber, J. C.; et al. (1999). Comparison of the postprandial release of peptide YY and proglucagon-derived peptides in the rat. *Pflügers Arch.* 438: 299–306.

Ansari, M. A.; Abdul, H. M.; Joshi, G.; Opii, W. O.; Butterfield, D. A. (2009). Protective effect of quercetin in primary neurons against Aβ₁₋₄₂: relevance to Alzheimer's disease. *J Nutr Biochem.* 20: 269-275.

Aprikian, O.; Busserolles, J.; Manach, C.; Mazur, A.; Morand, C.; Davicco, M. J.; et al. (2002). Lyophilized apple counteracts the development of hypercholesterolemia, oxidative stress, and renal dysfunction in obese Zucker rats. *J Nutr.* 132: 1969-1976.

Artiss, J. D.; Brogan, K.; Brucal, M.; Moghaddam, M.; Jen, K-L.C. (2006). The effects of a new soluble dietary fiber on weight gain and selected blood parameters in rats. *Metab. Clin. Experim.* 55: 195–292.

Aviram, M.; Billecke, S.; Sorenson, R.; Bisgaier, C. L.; Newton, R S.; Rosenblat, M.; Erogul, J.; Dunlop, C.; La Du, B. (1998a). Paraoxonase active site required for protection against LDL oxidation involves its free sulfhydryl group and is different than

that required for its arylesterase/paraoxonase activities: Selective action of human paraoxonase allozymes Q and R. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 18: 1617–1624.

Aviram, M.; Rosenblat, M.; Bisgaier, C.; et al. (1998b). Paraoxonase inhibits high density lipoprotein oxidation and preserves its functions. A possible peroxidative role for paraoxonase. *J Clin Invest.* 101: 1581–1590.

Azam, S.; Hadi, N.; Khan, N. U.; Hadi, S. M. (2004). Prooxidant property of green tea polyphenols epicatechin and epigallocatechin-3-gallate: implications for anticancer properties. *Toxicol In Vitro.* 18: 555–561.

Bae, Y. S.; Kang, S. W.; Seo, M. S.; et al. (1997). Epidermal growth factor (EGF)-induced generation of hydrogen peroxide. *J Biol Chem.* 272: 217–221.

Bagchi, K.; Puri, S. (1998). Free radicals and antioxidants in health and disease. *East Mediterr Health J.* 4(2): 350-360.

Barish, G. D.; Narkar, V. A.; Evans, R. M. (2006). PPAR delta: a dagger in the heart of the metabolic syndrome. *J Clin Invest.* 116(3): 590-597.

Batterham, R. L.; Cowley, M. A.; Small, C. J. et al. (2002). Gut hormone PYY(3–36) physiologically inhibits food intake. *Nature.* 418: 650–654.

Bazzano, L. A.; He, J.; Orden, L. J.; Loria, C. M.; Whelton, P. K. (2003). Dietary fiber intake and reduced risk of coronary heart disease in US men and women: the National Health and Nutrition Examination Survey I Epidemiologic Follow-up Study. *Arch Intern Med.* 163: 1897–904.

Bazzano, L. A.; Song, Y.; Bubes, V.; Good, C. K.; Manson, J. E.; Liu, S. (2005). Dietary intake of whole and refined breakfast cereals and weight gain in men. *Obes. Res.* 13, 1952–1960.

Beal, M. F. (2002). Oxidatively modified proteins in aging and disease. *Free Radic Biol Med.* 32: 797–803.

Bech-Larsen, T.; Scholderer, J. (2007). Functional foods in Europe: Consumer research, market experiences and regulatory aspects. *Trends in Food Science & Technology.* 18: 231–234.

Beltowski, J.; Wojcicka, G.; Jamroz, A. (2002). Differential effect of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors on plasma paraoxonase 1 activity in the rat. *Pol J Pharmacol.* 54: 661-671.

Bobbio, F. O.; Druzian, J. I.; Abrão, P. A.; Bobbio, P. A.; Fadelli, S. (2000). Identificação e quantificação das antocianinas do fruto do açaizeiro (*Euterpe oleracea*) Mart. *Ciência e Tecnologia de Alimento.* 20(3): 388-390.

Bose, M.; Lambert, J. D.; Ju, J.; Reuhl, K. R.; Shapses, S. A.; Yang, C. S. (2008). The Major Green Tea Polyphenol, (-)-Epigallocatechin-3-Gallate, Inhibits Obesity, Metabolic Syndrome, and Fatty Liver Disease in High-Fat-Fed Mice. *J. Nutr.* 138: 1677–1683.

Bradford, P. G.; Awad, A. B. (2007). Phytosterols as anticancer compounds. *Mol Nutr Food Res.* 51: 161–70.

Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Resolução n. 18*, de 30 de abril de 1999. Aprova o Regulamento Técnico que Estabelece as Diretrizes Básicas para Análise e Comprovação de Propriedades Funcionais e ou de Saúde Alegadas em Rotulagem de Alimentos. Brasília, 1999.

Breinholt, V.; Lauridsen, S. T.; Dragsted, L. O. (1999). Differential effects of dietary flavonoids on drug metabolizing and antioxidant enzymes in female rat. *Xenobiotica.* 29: 1227– 1240.

Brown, L.; Rosner, B.; Willet, W.; Sacks, S. M. (1999). Cholesterol – lowering effects of dietary fiber: a meta-analysis. *Am J Clin Nutr.* 69: 30-42.

Buhman, K. K.; Accad, M.; Novak, S.; et al. (2000). Resistance to diet-induced hypercholesterolemia and gallstone formation in ACAT2-deficient mice. *Nat Med.* 6: 1341–1347.

Calabro, M. L.; Galtieri, V.; Cutroneo, P.; Tommasini, S.; Ficarra, P.; Ficarra, R. (2004). Study of the extraction procedure by experimental design and validation of a LC method for determination of flavonoids in Citrus bergamia juice. *J Pharm Biomed Anal.* 35: 349–363.

Calder, P. C. (2005). Polyunsaturated fatty acids and inflammation. *Biochem Soc Trans.* 33: 423-427.

Calpe-Berdiel, L.; Escola-Gil, J. C.; Benitez, S.; et al. (2007). Dietary phytosterols modulate T-helper immune response but do not induce apparent antiinflammatory effects in a mouse model of acute, aseptic inflammation. *Life Sci.* 80: 1951–1956.

Calpe-Berdiel, L.; Escolà-Gil, J C.; Blanco-Vaca, F. (2009). New insights into the molecular actions of plant sterols and stanols in cholesterol metabolism. *Atherosclerosis.* 203(1): 18-31.

Calpe-Berdiel, L.; Escola-Gil, J. C.; Ribas, V.; Navarro-Sastre, A.; Garces-Garces, J.; Blanco-Vaca, F. (2005). Changes in intestinal and liver global gene expression in response to a phytosterol-enriched diet. *Atherosclerosis.* 181: 75-85.

Canadian Council on Animal Care. (1984). Guide to the Care and Use of Experimental Animals 1984; CCAC. Ottawa, Canada.

- Cani, P. D.; Dewever, C.; Delzenne, N. M. (2004). Inulin-type fructans modulate gastrointestinal peptides involved in appetite regulation (glucagon-like peptide-1 and ghrelin) in rats. *Br J Nutr.* 92: 521–526.
- Casas-Agustench, P.; Lopez-Uriarte, P.; Bullo, M.; Ros, E.; Gomez-Flores, A.; Salas-Salvado, J. (2008). Acute effects of three high-fat meals with different fat saturations on energy expenditure, substrate oxidation and satiety. *Clin Nutr.* 28: 1-7.
- Chait, A.; Han, C.; Oram, J.; Heinecke, J. (2005). The immune system and atherogenesis. Lipoprotein-associated inflammatory proteins: markers or mediators of cardiovascular disease? *J Lipid Res.* 46: 389–403.
- Champe, P. C.; Harvey, R. A. (2002). Metabolismo de Colesterol e Lipídios e Metabolismo dos Lipídios da Dieta. *Bioquímica Ilustrada* 20, 211-234. Porto Alegre, Brazil, Artmed.
- Christiansen, L.; Karjalainen, N.; Serimaa, A.; Lonroth, N.; Paakkari, T.; Yliruusi, J. (2001). Phase behaviour of b-sitosterol-cholesterol and bsitostanol-cholesterol coprecipitates. *Stp Pharma Sci.* 11: 167-173.
- Connor, W. E.; De Francesco, C. A.; Connor, S. L. (1993). n-3 fatty acids from fish oil. Effects on plasma lipoproteins and hypertriglyceridemic patients. *Ann NY Acad Sci.* 683: 16-34.
- Cook, N. C.; Samman, S. (1996). Flavonoids: chemistry, metabolism, cardioprotective effects and dietary sources. *J Nutr.* 7: 66–71.
- Cooke, J. P. (2000). The endothelium: a new target for therapy. *Vasc Med.* 5: 49–53.
- Cummings, J. H.; Stephen, A. M. (2007). Carbohydrate classification and terminology. *Eur J Clin Nutr.* 61 (1): 5–18S.
- Dahl, E. L.; Mulcahy, R. T. (2001). Cell-type specific differences in glutamate cysteine ligase transcriptional regulation monstrate independent subunit control. *Toxicol. Sci.* 61: 265–272.
- Dani, C.; Oliboni, L. S.; Pasquali, M. A. B.; Oliveira, M. R.; Umezu, F. M.; Salvador, M.; Moreira, J. C. F.; Henriques, J. A. P. (2008). Intake of Purple Grape Juice as a Hepatoprotective Agent in Wistar Rats. *J Med Food.* 11(1): 127–132.
- Degáspari, C. H. (2004). Propriedades antioxidantes de compostos fenólicos. *Visão Acadêmica, Curitiba.* 5(1): 33-40.
- Del Pozo-Insfran, D.; Brenes, C. H.; Talcott, S. T. (2004). Phytochemical Composition and Pigment Stability of Açai (Euterpe oleracea Mart.). *J Agric Food Chem.* 52: 1539-1545.

- Del Pozo-Insfran, D.; Percival, S. S.; Talcott, S. T. (2006). Acai (*Euterpe oleracea* Mart.) polyphenolics in their glycoside and aglycone forms induce apoptosis of HL-60 leukemia cells. *J Agric Food Chem.* 54: 1222–1229.
- Demonty, I.; Ras, R. T.; Van der Knaap, H. C. M.; Duchateau, G. M. S. J. E.; Meijer, L.; Zock, P. L.; Geleijnse, J. M.; Trautwein, E. A. (2009). Continuous Dose-Response Relationship of the LDL-Cholesterol-Lowering Effect of Phytosterol Intake. *J Nutr.* 139: 271–284.
- Dragsted, L. O.; Pedersen, A.; Hermetter, A.; Basu, S.; Hansen, M.; Haren, G. R.; et al. (2004). The 6-a-day study: effects of fruit and vegetables on markers of oxidative stress and antioxidative defense in healthy nonsmokers. *Am J Clin Nutr.* 79: 1060–1072.
- Dringen, R.; Pawlowski, P. G.; Hirrlinger, J. (2005). Peroxide detoxification by brain cells. *J Neurosci Res.* 79: 157–165.
- Durak, I.; Ozbek, H.; Devrim, E.; et al. (2004). Effects of cholesterol supplementation on antioxidant enzyme activities in rat hepatic tissues: possible implications of hepatic paraoxonase in atherogenesis. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 14: 211–214.
- Durrington, P. N.; Mackness, B.; Mackness, M. I. (2002). The hunt for nutritional and pharmacological modulators of paraoxonase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 22: 1248–1250.
- Engler, M. B.; Engler, M. M. (2004). The vasculoprotective effects of flavonoid-rich cocoa and chocolate. *Nutr Res.* 24: 695-706.
- Enio, C. V. (2003). Alimentos funcionais. *Rev Med Minas Gerais.* 13(4): 260-262
- Fernandez, M. L.; West, K. L. (2005). Mechanisms by which dietary fatty acids modulate plasma lipids. *J Nutr.* 135: 2075-2078.
- Fuhrman, B.; Aviram, M. (2002). Preservation of paraoxonase activity by wine flavonoids: possible role in protection of LDL from lipid peroxidation. *Ann N Y Acad Sci.* 957: 321–324.
- Fukushima, M.; Nakano, M.; Morii, Y.; Ohashi, T.; Fujiwara, Y.; Sonoyama, K. (2000). Hepatic LDL receptor mRNA in rats is increased by dietary mushroom (*Agaricus bisporus*) fiber and sugar beet fiber. *J Nutr.* 130: 2151– 2156.
- Galisteo, M.; Sanchez, M.; Vera, R.; Gonzalez, M.; Anguera, A.; Duarte, J.; et al. (2005). A diet supplemented with husks of *Plantago ovata* reduces the development of endothelial dysfunction, hypertension and obesity by affecting adiponectin and TNF- α in obese Zucker rats. *J Nutr.* 135: 2399–2404.

- Gant, J. P.; Heinecke, J. W. (2001). Mechanisms for oxidizing low-density lipoprotein: insights from patterns of oxidation products in the artery wall and from mouse models of atherosclerosis. *Trends Cardiovasc Med.* 11: 103–112.
- Garcia-Lorda, P.; Megias Rangil, I.; Salas-Salvado, J. (2003). Nut consumption, body weight and insulin resistance. *Eur J Clin Nutr.* 57(1): 8–11S.
- Getz, G. S.; Reardon, C. A. (2004). Paraoxonase, a cardioprotective enzyme: continuing issues. *Curr Opin Lipidol.* 15: 261–267.
- Ghosh, J.; Myers, C. E. (1998). Inhibition of arachidonate 5-lipoxygenase triggers massive apoptosis in human prostate cancer cells. *Proc Natl Acad Sci.* 95(22): 13182–13187.
- Graf, G. A; Li, W. P; Gerard, R. D; Gelissen, I; White, A; Cohen, J. C; Hobbs, H. H. (2002). Coexpression of ATP-binding cassette proteins ABCG5 and ABCG8 permits their transport to the apical surface. *J Clin Invest.* 110: 659–669.
- Gropper, S. S.; Smith, J. L.; Gro, J. L. (2005). Fiber. In: Advanced nutrition and human metabolism. 4th edition. Belmont (CA): Thomson Wadsworth. p. 115–9.
- Harborne, J. B.; Willians, C. A. (2000). Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry.* 55: 481-504.
- Hardin-Fanning, F. (2008). The Effects of a Mediterranean-Style Dietary Pattern on Cardiovascular Disease Risk. *Nurs Clin N Am.* 43: 105–115.
- Hardy, G. (2000). Nutraceuticals and functional foods: Introduction and meaning. *Nutrition.* 16: 688–697.
- Harris, W. S.; Bulchandani, D. (2006). Why do omega-3 fatty acids lower serum triglycerides? *Curr. Opin. Lipidol.* 17: 387–393.
- Heo, H. J.; Lee, C. Y. (2004). Protective effects of quercetin and vitamin C against oxidative stress-induced neurodegeneration. *J Agric Food Chem.* 52(25): 7514–7517.
- Higa, S.; Hirano, T.; Kotani, M.; Matsumoto, M.; Fujita, A.; Suemura, M.; Kawase, I.; Tanake, T. (2003). Fisetin, a flavonol, inhibits TH2-type cytokine production by activated human basophils. *J Allergy Clin Immunol.* 111: 1299-1306.
- Hu, F. B.; Stampfer, M. F.; Manson, J. E.; Rimm, E.; Colditz, G. A.; Rosner, B. A.; *et al.* (1997). Dietary fat intake and the risk of coronary heart disease in women. *New Eng J Med.* 337: 1491-1499.
- Hussein, O.; Frydman, G.; Frim, H.; Aviram, M. (2001). Reduced susceptibility of low density lipoprotein to lipid peroxidation after cholestyramine treatment in heterozygous familial hypercholesterolemic children. *Pathophysiology.* 8(1): 21-28.

[IAS] International Atherosclerosis Society. (2003). Harmonized clinical guidelines on the prevention of atherosclerotic vascular disease. International Atherosclerosis Society, Hamburg, Germany, p 1-28.

Ifere, G. O.; Barr, E.; Equan, A.; Gordon, K.; Singh, U. P.; Chaudhary, J.; Igietseme, J. U.; Ananaba, G. A. (2009). Differential effects of cholesterol and phytosterols on cell proliferation, apoptosis and expression of a prostate specific gene in prostate cancer cell lines. *Cancer Detect Prev.* 32(4): 319-328.

Ikeda I.; Tsuda, K.; Suzuki, Y.; Kobayashi, M.; Unno, T.; Tomoyori, H.; *et al.* (2005). Tea cachins with a galloyl moiety suppress post prandial hypertriaclycerolemia by delaying lymphatic transport of dietary fat in rats. *J Nutr.* 135: 155-159.

Instituto Adolfo Lutz (IAL). (1985). Normas analíticas, métodos químicos e físicos para análises de alimentos. 3 ed. V. 1, São Paulo; 1985.

Itoh, K.; Wakabayashi, N.; Katoh, Y.; Ishii, T.; O'Connor, T.; Yamamoto, M. (2003). Keap1 regulates both cytoplasmic–nuclear shuttling and degradation of Nrf2 in response to electrophiles. *Genes Cells.* 8: 379–391.

Jensen, G. S.; Wu, X.; Patterson, K. M.; Barnes, J.; Carter, S. G.; Scherwitz, L.; Beaman, R.; Endres, J. R.; Schauss, A. G. (2008). In Vitro and in Vivo Antioxidant and Anti-inflammatory Capacities of an Antioxidant-Rich Fruit and Berry Juice Blend. Results of a Pilot and Randomized, Double-Blinded, Placebo-Controlled, Crossover Study. *J Agric Food Chem.* 56: 8326–8333.

Jones, P. J.; Jew, S. (2007). Functional food development: Concept to reality. *Trends in Food Science & Technology.* 18: 387–390.

Juntunen, K. S.; Laaksonen, D. E.; Poutanen, K. S.; Niskanen, L. K.; Mykkanen, H. M. (2003). High-fiber rye bread and insulin secretion and sensitivity in healthy postmenopausal women. *Am J Clin Nutr.* 77: 385–391.

Kadota, K.; Yui, Y.; Hattori, R.; Murohara, Y.; Kawai, C. (1991). Decreased sulfhydryl groups of serum albumin in coronary artery disease. *Jpn Circ J.* 55: 937–941.

Kahkonen, M. P.; Heinonen, M. (2003). Antioxidant activity of anthocyanins and their aglycons. *J Agric Food Chem.* 51: 628–633.

Kensler, T. W.; Wakabayashi, N.; Biswal, S. (2007). Cell survival responses to environmental stresses via the Keap1–Nrf2–ARE pathway. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 47: 89–116.

King, D. E.; Egan, B. M.; Geesey, M. E. (2003). Relation of dietary fat and fiber to elevation of C-reactive protein. *Am J Cardiol.* 92: 1335–1339.

- Kliwer, S. A.; Sundseth, S. S.; Jones, S. A.; Brown, P. J.; Wisely, G. B.; Koble, C. S.; Devchand, P.; Wahli, W.; Willson, T. M.; Lenhard, J. M.; Lehmann, J. M. (1997). Fatty acids and eicosanoids regulate gene expression through direct interactions with peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma. *Proc Natl Acad Sci.* 94(9): 4318-4323.
- Koehler, P. (2003). Concentrations of Low and High Molecular Weight Thiols in Wheat Dough As Affected by Different Concentrations of Ascorbic Acid. *J Agric Food Chem.* 51 (17): 4948-4953.
- Kong, J.; Chia, L.; Goh, N.; Chia, T.; Brouillard, R. (2003). Analysis and biological activities of Anthocyanins. *Phytochemistry.* 64: 923-933.
- Kris-Etherton, P. M.; Hecker, K. D.; Bonanome, A.; Coval, S. M.; Binkoski, A. E.; Hilpert, K. F.; Griel, A. E.; Etherton, T. D. (2002). Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. *Am J Med.* 113: 71-88S.
- Kunjathoor, V. V.; Febbraio, M.; Podrez, E. A.; et al. (2002). Scavenger receptors class A-I/II and CD36 are the principal receptors responsible for the uptake of modified low density lipoprotein leading to lipid loading in macrophages. *J Biol Chem.* 277(4): 9982-9988.
- Kurosawa, T.; Itoh, F.; Nozaki, A.; Nakano, Y.; Katsuda, S.; Osakabe, N.; et al. (2005). Suppressive effects of cacao liquor polyphenols (CLP) on LDL oxidation and the development of atherosclerosis in Kurosawa and Kusanagihypercholesterolemic rabbits. *Atherosclerosis* 179: 237-246.
- Kwak, N. S.; Jukes, D. J. (2001). Functional foods. Part 1. The development of a regulatory concept. *Food Control.* 12: 99-107.
- Laaksonen, D. E.; Nyssonen, K.; Niskanen, L.; Rissanen, T. H.; Salonen, J. T. (2005). Dietary and serum linoleic and polyunsaturated fatty acids predict cardiovascular mortality in middle-aged men. *Arch Intern Med.* 165: 193-199.
- Lecumberri, E.; Luis G.; Mateos, R.; Alía, M.; Ramos, S.; Izquierdo-Pulido, M.; Bravo, L. (2007). A diet rich in dietary fiber from cocoa improves lipid profile and reduces malondialdehyde in hypercholesterolemic rats. *Nutrition* 23: 332-341
- Levine, R. L.; Williams, J. A.; Stadtman, E. R.; Shacter, E. (1994). Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol.* 233: 346-357.
- Lichtenstein, A. H. (2006). Thematic review series: patient-oriented research. Dietary fat, carbohydrate, and protein: effects on plasma lipoprotein patterns. *J Lipid Res.* 47: 1661-1667.
- Lim, P. S.; Cheng, Y. M.; Yang, S. M. (2007). Impairments of the biological properties of serum albumin in patients on hemodialysis. *Nephrology (Carlton)* 12: 18-24.

- Loest, H. B.; Noh, S. K.; Koo, S. I. (2002). Green tea extract inhibits the lymphatic absorption of cholesterol and alpha-tocopherol in ovariectomized rats. *J Nutr.* 132: 1282–1288.
- Lorenzi, H.; Souza, H. M.; Medeiros Costa, J. T.; Cerqueira, L. S. C.; Van Behr, N. (1996). *Palmeiras no Brasil: nativas e exóticas*. s.l.: Ed. Plantarum Ltda. 303p.
- Madsen, L.; Petersen, R. K.; Kristiansen, K.; (2005). Regulation of adipocyte differentiation and function by polyunsaturated fatty acids. *Biochim Biophys Acta.* 1740: 266–286.
- Maher, P. (2006). Comparison of the neurotrophic activities of the flavonoid fisetin and some of its derivatives. *Free Radic Res.* 40: 1105-1111.
- Mäkinen-Aakula, M. (2006). Trends in functional foods dairy market. In *Proceedings of the third functional food net meeting*. Liverpool, UK, September 18–19, 2006.
- Mantovani, I. S. B.; Fernandes, S. B. O.; Menezes, F. S. (2003). Constituintes apolares do fruto do açaí (*Euterpe oleracea* M. - Arecaceae). *Revista Brasileira de Farmacognosia.* 13: 41-42.
- Mark-Herbert, C. (2004). Innovation of a new product category—Functional foods. *Technovation.* 24: 713–719.
- Marlett, J. A.; McBurney, M. I.; Slavin, J. L. (2002). Position of the American Dietetic Association: health implications of dietary fiber. *J Am Diet Assoc.* 102: 993–1000.
- Matheus, M. E.; de Olivera Fernandes, S. B.; Silveira, C. S.; Rodrigues, V. P.; de Sousa Menezes, F.; Fernandes, P. D. (2006). Inhibitory effects of *Euterpe oleracea* Mart. on nitric oxide production and iNOS expression. *J Ethnopharmacol.* 107: 291–296.
- Matthan, N. R.; Dillard, A.; Lecker, J. L.; Ip, B.; Lichtenstein, A. H. (2009). Effects of Dietary Palmitoleic Acid on Plasma Lipoprotein Profile and Aortic Cholesterol Accumulation Are Similar to Those of Other Unsaturated Fatty Acids in the F1B Golden Syrian Hamster. *J Nutr.* 139: 215–221.
- Mayne, S. T. (2003). Antioxidant nutrients and chronic disease: use of biomarkers of exposure and oxidative stress status in epidemiologic research. *J Nutr.* 133: 933-940.
- McCord, J. M.; Edeas, M. A. (2005). SOD, oxidative stress and human pathologies: a brief history and a future vision. *Biomed Pharmacother.* 59: 139–142.
- Melo, E. A.; Guerra, N. B. (2002). Ação antioxidante de compostos fenólicos naturalmente presentes em alimentos. *Bol SBCTA. Campinas.* 36(1): 1-11.

- Menezes, F. S.; Falcão, D. Q.; Mendonça Filho, R. F. W.; Silveira, C. S.; Rennó, M. N.; *et al.* (2005). Chemical and pharmacological survey on Brazilian medicinal plants using ethnopharmacological information as a tool. *Acta Horticulturae*. 675: 89–95.
- Menrad, K. (2003). Market and marketing of functional food in Europe. *J Food Eng*. 56: 181–188.
- Mercer, L. D.; *et al.* (2005). Dietary polyphenols protect dopamine neurons from oxidative insults and apoptosis: investigations in primary rat mesencephalic cultures. *Biochem Pharmacol*. 69(2): 339–45.
- Mertens-Talcott, S. U.; Rios, J.; Jilma-Stohlawetz, P.; Pacheco- Palencia, L. A.; Meibohm, B.; Talcott, S. T.; Derendorf, H. (2008). Pharmacokinetics of Anthocyanins and Antioxidant Effects after the Consumption of Anthocyanin-Rich Açai Juice and Pulp (*Euterpe oleracea* Mart.) in Human Healthy Volunteers. *J Agric Food Chem*. 56(10): 7796–7802.
- Miettinen, T. A.; Gylling, H. (2004). Plant stanol and sterol esters in prevention of cardiovascular diseases. *Ann Med* 36: 126–134.
- Mollet, B.; Rowland, I. (2002). Functional foods: At the frontier between food and pharma. *Curr Opin Biotechnol*. 13: 483–485.
- Morel, D. W. (1994). Reduced cholesterol efflux to mildly oxidized high density lipoprotein. *Biochem Biophys Res Commun*. 200: 408–416.
- Mostad, I. L.; Bjerve, K. S.; Bjorgaas, M. R.; Lydersen, S.; Grill, V. (2006). Effects of n-3 fatty acids in subjects with type 2 diabetes: reduction of insulin sensitivity and time-dependent alteration from carbohydrate to fat oxidation. *Am J Clin Nutr*. 84: 540–550.
- Motta, V. T. (2003). Bioquímica clínica para o laboratório: Princípios e interpretações. p. -419. Editora Médica Missau, Caxias do Sul, 2003.
- [NHF] National Heart Foundation. (2001). Lipid management guidelines – 2001. *Med J Aust*, 175: 1-36S.
- Naissides, M.; Mamo, J. C. L.; James, A. P.; Pal, S. (2004). The effect of acute red wine polyphenol consumption on post prandial lipaemia in postmenopausal women. *Atherosclerosis*. 1770: 401-408.
- Nashed, B.; Yeganeh, B.; HayGlass, K. T.; Moghadasian, M. H. (2005). Antiatherogenic effects of dietary plant sterols are associated with inhibition of proinflammatory cytokine production in Apo E-KO mice. *J Nutr*. 135: 2438–2444.
- Ng, C. J.; Shih, D. M.; Hama, S.; *et al.* (2004). The paraoxonase gene family and atherosclerosis. *Free Radic Biol Med*. 38: 153–163.

- Nguyen, T.; Sherratt, P. J.; Pickett, C. B. (2003). Regulatory mechanisms controlling gene expression mediated by the antioxidant response element. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 43: 233–260.
- Noll, C.; Hamelet, J.; Matulewicz, E.; Paul, J. L.; Delabar, J. M.; Janel, N. (2008). Effects of red wine polyphenolic compounds on paraoxonase-1 and lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 in hyperhomocysteinemic mice. *J Nutr Biochem.* Article in press.
- Oliveira, M. S. P.; Carvalho, J. E. U.; Nascimento, W. M. O. (2000). Açai (*Euterpe oleraceae* Mart.). Jaboticabal: FUNEP. 52p.
- Osterud, B.; Bjorklid, E. (2003). Role of monocytes in atherogenesis. *Physiol Rev.* 83: 1069–1112.
- Ostlund Jr., R. E. (2002). Phytosterols in human nutrition. *Annu. Rev. Nutr.* 22: 533–549.
- Ostlund Jr., R. E. (2004). Phytosterols and cholesterol metabolism. *Curr Opin Lipidol.* 15: 37-41.
- Ostlund Jr., R. E.; McGill, J. B.; Zeng, C. M.; Covey, D. F.; Stearns, J.; Stenson, W. F.; et al. (2002). Gastrointestinal absorption and plasma kinetics of soy Δ^5 -phytosterols and phytostanols in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 282: 911-916.
- Pagalos, V. A.; Moschandreas, J.; Kiriakakis, M.; Roussomoustakaki, M.; Kafatos, A.; Kouroumalis, E. (2009). Fatty acid composition of subcutaneous adipose tissue and gastric mucosa: is there a relation with gastric ulceration? *BMC Gastroenterol.* 9:9.
- Panza, V. S.; Wazlawik, E.; Ricardo Schütz, G.; Comin, L.; Hecht, K. C.; da Silva, E. L.; (2008). Consumption of green tea favorably affects oxidative stress markers in weight-trained men. *Nutrition.* 24(5): 433-42.
- Perisee, D. M. (2005). Food fortification with plant sterol/stanol for hyperlipidemia: management in free-living populations. *J Am Diet Assoc.* 105: 52–53.
- Perry, G.; Raina, A. K.; Nunomura, A.; Wataya, T.; Sayre, L. M.; Smith, M. A. (2000). How important is oxidative damage? Lessons from Alzheimer's disease. *Free Radic Biol Med.* 28: 831–834.
- Plat, J.; Mensink, R. P. (2002a). Effects of plant stanol esters on LDL receptor protein expression and on LDL receptor and HMG-CoA reductase mRNA expression in mononuclear blood cells of healthy men and women. *FASEB J.* 16: 258–260.
- Plat, J.; Mensink, R. P. (2002b). Increased intestinal ABCA1 expression contributes to the decrease in cholesterol absorption after plant stanol consumption. *FASEB J.* 16: 1248-1253.

- Plat, J.; Nichols, J. A.; Mensink, R. P. (2005). Plant sterols and stanols: effects on mixed micellar composition and LXR (target gene) activation. *J Lipid Res.* 46: 2468–2476.
- Plosch, T.; Kruit, J. K.; Huijkman, N. C.; Havinga, R.; Duchateau, G. S.; Lin, Y.; et al. (2006). Reduction of cholesterol absorption by dietary plant sterols and stanols in mice is independent of the absg5/8 transporter. *J Nutr.* 136: 2135-2140.
- Poli, A.; Marangoni, F.; Paoletti, R.; Mannarino, E.; Lupattelli, G.; Notarbartolo, A.; et al. (2008). Non-pharmacological control of plasma cholesterol levels. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 18: 1-16S.
- Quinlan, G. J.; Evans, T. W.; Gutteridge, J. M. (1994). Oxidative damage to plasma proteins in adult respiratory distress syndrome. *Free Radic Res.* 20: 289-298.
- Raederstorff, D. G.; Schlachter, M. F.; Elste, V.; Weber, P. (2003). Effect of EGCG on lipid absorption and plasma lipid levels in rats. *J Nutr Biochem.* 14: 326–332.
- Rahman, M. M.; Ichiyanagi, T.; Komiyama, T.; Hatano, Y.; Konishi, T. (2006). Superoxide radical and peroxynitrite-scavenging activity of anthocyanins; structure-activity relationship and their synergism. *Free Radic Res.* 40(9): 993–1002.
- Ramos, S.; Moulay, L.; Granado–Serrano, A. B.; Vilanova, O.; Muguerza, B.; Goya, L.; Bravo, L. (2008). Hypolipidemic Effect in Cholesterol-Fed Rats of a Soluble Fiber-Rich Product Obtained from Cocoa Husks. *J Agric Food Chem.* 56: 6985–6993.
- Ramulu, P.; Udayasekhara Rao, P. (2003). Total, insoluble and soluble dietary fiber contents of Indian fruits. *J Food Comp Anal.* 16: 677–685.
- Reeves, P. G.; Nielsen, F. H.; Fahey, G. C. (1993). AIN-93 purified diets for laboratory rodents: Final report of the American Institute of Nutrition *ad hoc* Writing Committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr.* 123(11): 467-472.
- Rein, D.; Lotito, S.; Holt, R. R.; Keen, C. L.; Schmitz, H. H.; Fraga, C. G. (2000). Epicatechin in human serum: in vivo determination and effect of chocolate consumption on serum oxidation status. *J Nutr.* 130: 2109–2114S.
- Repa, J. J.; Buhman, K. K.; Farese Jr., R. V.; Dietschy, J. M.; Turley, S. D. (2004). ACAT2 deficiency limits cholesterol absorption in the cholesterolfed mouse: impact on hepatic cholesterol homeostasis. *Hepatology.* 40: 1088–1097.
- Riboli, E.; Norat, T. (2003). Epidemiologic evidence of the protective effect of fruit and vegetables on cancer risk. *Am J Clin Nutr.* 559–569S.
- Rocha, A. P.; Carvalho, L. C.; Sousa, M. A.; Madeira, S. V.; Sousa, P. J.; Tano, T.; Schini-Kerth, V. B.; Resende, A. C.; Soares de Moura, R. (2007). Endothelium-

dependent vasodilator effect of *Euterpe oleracea* Mart. (Acai) extracts in mesenteric vascular bed of the rat. *Vascul Pharmacol.* 46: 97–104.

Rogez, H. (2000). Açai: Preparo, Composição e Melhoramento da Conservação; EDUFPA: Belém, Brazil. 313 pp.

Rosa, O. B. C.; Costa, N. M. B.; Nunes, R. M.; Leal, P. F. G. (1998). Efeito dos feijões (*Phaseolus Vulgaris*, L.) preto, carioquinha e vermelho na redução do colesterol de ratos hipercolesterolêmicos. *Arch Latinoam Nutr.* 48(4): 306-310.

Rozner, S.; Kogan, A.; Mehta, S.; Somasundaran, P.; Aserin, A.; Garti, N.; Ottaviani, M. F. (2009). Characterization of Nonionic Microemulsions by EPR. Part II. The Effect of Competitive Solubilization of Cholesterol and Phytosterols on the Nanostructure. *J Phys Chem B.* 113(3): 700-707.

Safari, M. R.; Sheikh, N. (2003). Effects of flavonoids on the susceptibility of low-density lipoprotein to oxidative modification. *Prostaglandins, Leukot Essent Fatty Acids.* 69: 73–77.

Sanabria N.; Sangronis, E. (2007). Caracterización del acai o manaca (*Euterpe oleracea* Mart.): Un fruto del Amazonas. *Arch Latinoam Nutr.* 57(1): 94-98.

Santos, G. M.; Maia, G. A.; Sousa, P. H.; Costa, J. M.; Figueiredo, R. W.; Prado, G. M. (2008). Correlation between antioxidant activity and bioactive compounds of açai (*Euterpe oleracea* Mart) comercial pulps. *Arch Latinoam Nutr.* 58(2): 187-192.

Schauss, A. G.; Wu, X.; Prior, R. L.; Ou, B.; Huang, D.; Owens, J.; Agarwal, A.; Jensen, G. S.; Hart, A. N.; Shanbrom, E. (2006a). Antioxidant capacity and other bioactivities of the freeze-dried Amazonian Palm Berry, *Euterpe oleraceae* Mart. (Acai). *J Agric Food Chem.* 54: 8604-8610.

Schauss, A. G.; Wu, X.; Prior, R. L.; Ou, B.; Pastel, D.; Huang, D.; Kababick, J. P. (2006b). Phytochemical and nutrient composition of the freeze-dried Amazonian Palm Berry, *Euterpe oleraceae* Mart. (Acai). *J Agric Food Chem.* 54: 8598-8603.

Sedlak J.; Lindsay, R. H. (1968). Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal Biochem.* 25: 192-205.

Seeram, N. P.; Heber, D. (2006). Impact of berry phytochemicals on human health: Effects beyond antioxidation. In *Lipid Oxidation and Antioxidants: chemistry, Methodologies and Health Effects*; ACS Symposium Series 956; Ho, C T.; Shahidi, F S. Eds.; Oxford University Press: New York, 2006; Chapter 21.

Shiner, M.; Fuhrman, B.; Aviram, M. (2007). Macrophage paraoxonase 2 (PON2) expression is up-regulated by pomegranate juice phenolic anti-oxidants via PPAR gamma and AP-1 pathway activation. *Atherosclerosis.* 195(2): 313-321.

- Side, C. (2006). Overview on marketing functional foods in Europe. In Functional food network general meeting. Turku, Finland, March 8-10, 2006.
- Sies, H. (1993) Strategies of antioxidant defense. Review. *Eur J Biochem.* 215(2): 213-219.
- Silva, P.R. (2002). Novidades na Fruticultura Paraense. *Fruticultura em Revista*. Belém, Pará. Novembro. 27-31.
- Slavin, J. L.(2001). Dietary Fiber and Colon Cancer. In Handbook of Dietary Fiber; Chen, S. S., Dreher M. L.; Marcel Dekker: New York. pp. 31-45.
- Slavin, J. L. (2005). Dietary fiber and body weight. *Nutrition.* 21: 411-418.
- Soares, M. J.; Cummings, S. J.; Mamo, J. C.; Kenrick, M.; Piers, L. S. (2004). The acute effects of olive oil v. cream on postprandial thermogenesis and substrate oxidation in postmenopausal women. *Br J Nutr.* 91: 245–252.
- Sociedade Brasileira de Cardiologia – SBC. (2007). IV Diretriz Brasileira Sobre Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia.* 88(I): 2-19.
- Souza, A.; Souza, N. R.; Silva, S. E. L.; Nunes, C. D. M.; Canto, A. C.; Cruz, L A. A. (1996). Fruteiras da Amazônia. Brasília: Embrapa–SPI. 204p.
- Stocker, R. E.; Keaney, J. F. Jr. (2004). Role of oxidative modification in atherosclerosis. *Physiological Reviews.* 84(4): 1381-1478.
- Story, A. J.; Baldino, A. (1981). Modification of cholesterol accumulation by dietary fiber in rats. *Nutr Rep Internat.* 24: 1213-1217.
- Summers, L. K.; Fielding, B. A.; Bradshaw, H. A.; Ilic, V.; Beysen, C.; Clark, M. L.; et al. (2002) Substituting dietary saturated fat with polyunsaturated fat changes abdominal fat distribution and improves insulin sensitivity. *Diabetologia.* 45: 369–377.
- Sun, Z.; Zhang, S.; Chan, J. Y.; Zhang, D. D. (2007). Keap1 controls postinduction repression of the Nrf2-mediated antioxidant response by escorting nuclear export of Nrf2. *Mol Cell Biol.* 27: 6334–6349.
- Szmitko, P. E.; Verma, S. (2005). Antiatherogenic potential of red wine: clinician update. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 288: 2023-2030.
- Theuwissen, E.; Mensink, R. P. (2008). Water-soluble dietary fibers and cardiovascular disease. *Physiol Behav.* 94: 285–292.
- Tian, F.; McLaughlin, J. L. (2000). Bioactive flavonoids from the black locust tree, *Robinia pseudoacacia*. *Pharm Biol.* 38: 229–234.

- Toiari, S. D. A.; Yuyama, L. K. O.; Aguiar, J. P. L.; Souza, R. F. S. (2005). Biodisponibilidade de ferro do açaí (*Euterpe oleraceae* Mart.) e da farinha de mandioca fortificada com ferro em ratos. *Rev Nutr.* 18(3): 291-99.
- Torrejon, C.; Jung, U. J.; Deckelbaum, R. J. (2007). n-3 Fatty acids and cardiovascular disease: actions and molecular mechanisms. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 77: 319-326.
- Trautwein, E. A.; Duchateau, G. S. M. J. E.; Lin, Y.; Mel'nikov, S. M.; Molhuizen, H. O. F.; Ntanios, F. Y. (2003). Proposed mechanisms of cholesterol-lowering action of plant sterols. *Eur J Lipid Sci Technol.* 105: 171-185.
- Turbino-Ribeiro, S. M.; Silva, M. E.; Chianca, D. A. Jr.; De Paula, H.; Cardoso, L. M.; Colombari, E.; Pedrosa, M. L. (2003). Iron overload in hypercholesterolemic rats affects iron homeostasis and serum lipids but not blood pressure. *J Nutr.* 133(1): 15-20.
- Vries, H. E.; Witte, M.; Hondius, D.; Rozemuller, A. J. M.; Drukarch, B.; Hoozemans, J.; Horssen, J. V. (2008). Nrf2-induced antioxidant protection: A promising target to counteract ROS-mediated damage in neurodegenerative disease? *Free Radic Biol Med.* 45: 1375-1383.
- Wang, J. F.; Schramm, D. D.; Holt, R. R.; Ensunsa, J. L.; Fraga, C. G.; Schmitz, H. H.; Keen, C. L. (2000). A dose-response effect from chocolate consumption on serum epicatechin and oxidative damage. *J Nutr.* 130: 2115-2119S.
- Weylandt, K. H.; Kang, J. X.; Wiedenmann, B.; Baumgart, D. C. (2007). Lipoxins and resolvins in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis.* 13: 797-799.
- Wisdom, S. J.; Wilson, R.; Mickillop, J. H.; Walker, J. J. (1991). Antioxidant systems in normal pregnancy and in pregnancy-induced hypertension. *Am J Obstet Gynecol.* 165: 170-174.
- World Health Organization. (2003). A race against the time: The challenge of cardiovascular disease in developing economies. 94p.
- Wu, X.; Cao, G.; Prior, R. L. (2002). Absorption and metabolism of anthocyanins in elderly women after consumption of elderberry or blueberry. *J Nutr.* 132: 1865-1871.
- www.amazon-mania.com. – Acessado no dia 20/11/2008, na Escola de Nutrição – Universidade federal de Ouro Preto.
- Yang, J. L.; Kim, Y. H.; Lee, H. S.; Lee, M. S.; Moon, Y. K. (2003). Barley beta-glucan lowers serum cholesterol based on the upregulation of cholesterol 7 α -hydroxylase activity and mRNA by Natraceutical Group. *J Nutr Sci Vitaminol.* 49: 381-387.

- Yao, K.; Zhang, L.; Zhang, Y.; Ye, P.; Zhu, N. (2008). The flavonoid, fisetin, inhibits UV radiation-induced oxidative stress and the activation of NF- κ B and MAPK signaling in human lens epithelial cells. *Molecular Vision*. 14: 1865-1871.
- Yoon, J.; Baek, S. J. (2005). Molecular targets of dietary polyphenols with anti-inflammatory properties. *Yonsei Med J*. 46(5): 585–596.
- Youdim, K. A.; Joseph, J. A. (2001). A possible emerging role of phytochemicals in improving age-related neurological dysfunctions: a multiplicity of effects. *Free Radic Biol Med*. 30(6): 583–594.
- Zern, T. L.; Fernandez, M. L. (2005). Cardioprotective effects of dietary polyphenols. *J Nutr*. 135: 2291–2294.
- Zheng, W.; Wang, S. Y. (2003). Oxygen radical absorbing capacity of phenolics in blueberries, cranberries, chokeberries, and lingonberries. *J Agric Food Chem*. 51: 502–509.

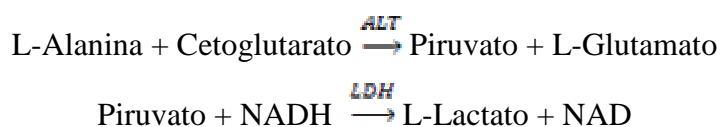
ANEXOS

Anexo I – Protocolos das Dosagens Bioquímicas

I.1 - Alanina Aminotransferase

Princípio

A ALT catalisa a transferência de grupos amina da alanina para o cetoglutarato, com formação de glutamato e piruvato. Este é reduzido a lactato por ação da lactato desidrogenase (LDH), enquanto que a coenzima NADH é oxidada a NAD. A consequente redução da absorvância em 340 ou 365 nm, monitorizada espectrofotometricamente, é diretamente proporcional à atividade da enzima na amostra.



Amostra

Recomenda-se jejum mínimo de 8 horas. Usar soro ou plasma (EDTA, heparina). A atividade enzimática é estável por 4 dias entre 2 – 8 °C e por 2 semanas a 10 °C negativos.

Produto Utilizado

ALT/GPT Liquiform, Catálogo 74-4/30 - ANVISA - 10009010029

Labtest Diagnóstica: Av. Paulo Ferreira da Costa, 600. Lagoa Santa, MG, 33400-000

Reagente 1: Armazenar entre 2 – 8°C.

Reagente 2: Armazenar entre 2 – 8°C.

Reagente de Trabalho: O conjunto de um frasco de Reagente 1 e de um frasco de Reagente 2 permite preparar o Reagente de Trabalho. Estável por 5 dias entre 15 - 25 °C e 14 dias entre 2 – 8°C. Contém tampão 80 mmol/L, pH 7,8, L-Alanina 500 mmol/L, 2-cetoglutarato 15 mmol/L, NADH 180

Equipamentos

1. Fotômetro com cubeta termostatizada a 37 °C capaz de medir a absorvância em 340 ou 365 nm com exatidão.
2. Pipetas para medir amostras e reagentes.
3. Cronômetro.

Procedimento

Condições de Reação: comprimento de onda de 340 ou 365 nm; cubeta termostatizada a 37°C com 10 mm de espessura de solução; banda de passagem de 8 nm ou menos e luz espúria menor que 0,1%.

1. Adicionar 0,1 mL de amostra a 1,0 mL do Reagente de Trabalho.
2. Homogeneizar.
3. Transferir para a cubeta termostatizada a 37 °C.

4. Esperar 1 minuto.
5. Fazer a leitura inicial, disparando simultaneamente o cronômetro.
6. Repetir as leituras após 1, 2 e 3 minutos.

Cálculos

Calcular a média das diferenças de absorbância por minuto ($\Delta A/\text{minuto}$) e utilizar para calcular o resultado.

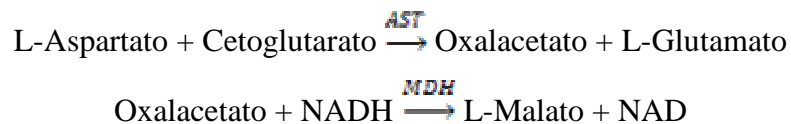
ALT/GPT (U/L) 340 nm = $\Delta A/\text{minuto} \times 1746$

Conversão: Unidades Convencionais (U/L) $\times 16,7$ = Unidades SI (nkat/L).

I.2 - Aspartato Aminotransferase

Princípio

A AST catalisa a transferência de grupos amina do aspartato para o cetoglutarato, com formação de glutamato e oxalacetato. Este é reduzido a malato por ação da malato desidrogenase (MDH), enquanto que a coenzima NADH é oxidada a NAD. A conseqüente redução da absorbância em 340 ou 365 nm, monitorizada espectrofotometricamente, é diretamente proporcional à atividade da enzima na amostra.



Amostra

Recomenda-se jejum mínimo de 8 horas. Usar soro ou plasma (EDTA, heparina). A atividade enzimática é estável por 4 dias entre 2 – 8°C e por 2 semanas a 10°C negativos.

Produto Utilizado

AST/GOT Liquiform, Catálogo 75-4/30 - ANVISA - 10009010018

Labtest Diagnóstica: Av. Paulo Ferreira da Costa, 600. Lagoa Santa, MG, 33400-000

Reagente 1: Armazenar entre 2 – 8°C.

Reagente 2: Armazenar entre 2 – 8°C.

Reagente de Trabalho: o conjunto de um frasco de Reagente 1 e de um frasco de Reagente 2 permite preparar o Reagente de Trabalho. Estável por 5 dias entre 15 – 25°C e por 14 dias entre 2 – 8°C; Contém tampão 80 mmol/L, pH 7,8, L-Aspartato 240 mmol/L, 2-cetoglutarato 12 mmol/L, NADH 180 $\mu\text{mol/L}$, LDH ≥ 900 U/L, MDH ≥ 600 U/L e azida sódica 14,6 mmol/L.

Equipamentos

1. Fotômetro com cubeta termostatizada a 37 °C capaz de medir a absorbância em 340 ou 365 nm com exatidão.
2. Pipetas para medir amostras e reagentes.
3. Cronômetro.

Procedimento

Condições de Reação: comprimento de onda de 340 ou 365 nm; cubeta termostaticada a 37°C com 10 mm de espessura de solução; banda de passagem de 8 nm ou menos e luz espúria menor que 0,1%.

1. Adicionar 0,1 mL de amostra a 1,0 mL do reagente de trabalho.
2. Homogeneizar.
3. Transferir para a cubeta termostaticada a 37 °C.
4. Esperar 1 minuto.
5. Fazer a leitura inicial, disparando simultaneamente o cronômetro.
6. Repetir as leituras após 1, 2 e 3 minutos.

Cálculos

Calcular a média das diferenças de absorbância por minuto ($\Delta A/\text{minuto}$) e utilizar para calcular o resultado.

AST/GOT (U/L) 340 nm = $\Delta A/\text{minuto} \times 1746$

Conversão: Unidades Convencionais (U/L) $\times 16,7$ = Unidades SI (nkat/L).

I.3 - Colesterol HDL

Princípio

As lipoproteínas de muita baixa densidade (VLDL) e as lipoproteínas de baixa densidade (LDL) são quantitativamente precipitadas e, após centrifugação, o colesterol ligado às lipoproteínas de alta densidade (Colesterol HDL) é determinado no sobrenadante.

Amostra

O jejum não é imprescindível para a dosagem de colesterol HDL. Usar soro. O analito é estável por 3 dias entre 2 – 8°C.

Produto Utilizado

Colesterol HDL, Catálogo 13 - ANVISA - 10009010026

Labtest Diagnóstica: Av. Paulo Ferreira da Costa, 600. Lagoa Santa, MG, 33400-000

Precipitante: Armazenar entre 2 – 8°C. Contém ácido fosfotúngstico 1,5 mmol/L e cloreto de magnésio 54 mmol/L.

Padrão - 20 mg/dL: Armazenar entre 2 – 8°C. Armazenar bem vedado para evitar evaporação.

Equipamentos

1. Centrífuga para tubos.
2. Fotômetro capaz de medir com exatidão a absorbância em 500 nm ou filtro verde (490 a 510 nm).
3. Banho-maria mantido à temperatura constante (37 °C).
4. Pipetas para medir amostras e reagentes.
5. Cronômetro.

Procedimento

Precipitação das VLDL e LDL: Em um tubo 12 x 75 colocar 0,25mL de soro e 0,25mL de precipitante. Agitar vigorosamente durante 30 segundos. A agitação sugerida é fundamental para obtenção de resultados consistentes. Centrifugar a 3.500 rpm por pelo menos 15 minutos para obter um sobrenadante límpido. Pipetar o sobrenadante límpido imediatamente após a centrifugação, tomando o cuidado para não ressuspender o precipitado, a fim de evitar resultados falsamente elevados.

Utilizar com o Reagente 1 - Colesterol Liquiform Labtest Cat. 76. Tomar 3 tubos de ensaio e proceder como a seguir:

	Branco	Teste	Padrão
Sobrenadante	-----	0,1 mL	-----
Padrão (n° 2)	-----	-----	0,1 mL
Reagente 1	1,0 mL	1,0 mL	1,0 mL

Misturar e colocar no banho-maria a 37 °C durante 10 minutos. O nível da água no banho deve ser superior ao nível do reagente nos tubos de ensaio. Determinar as absorbâncias do teste e padrão em 500 nm ou filtro verde (490 a 540 nm) acertando o zero com o branco. A cor é estável por 60 minutos.

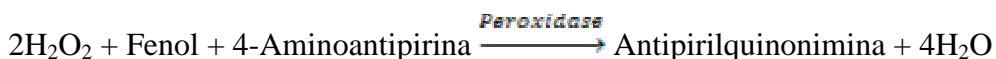
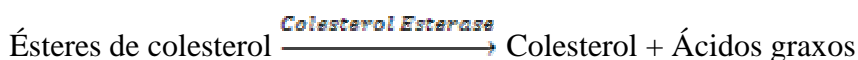
Cálculos

$$\text{HDL mg/dL} = \frac{\text{Absorbância do Teste}}{\text{Absorbância do padrão}} \times 40$$

Conversão de mg/dL para Unidade SI: mmol/L = mg/dL x 0,026

I.4 - Colesterol Total*Princípio*

O colesterol total é determinado de acordo com as seguintes reações:



A intensidade da cor vermelha formada é diretamente proporcional à concentração de colesterol na amostra.

Amostra

O jejum não é imprescindível para a dosagem de colesterol total. Usar soro. Anticoagulantes como citrato, oxalato ou EDTA produzem resultados falsamente diminuídos. O analito é estável por 7 dias entre 2 – 8 °C e vários meses a 10 °C negativos.

Produto Utilizado

Colesterol Liquiform, Catálogo 76-2/100 - ANVISA - 10009010068

Labtest Diagnóstica: Av. Paulo Ferreira da Costa, 600. Lagoa Santa, MG, 33400-000

Reagente 1: Armazenar entre 2 – 8°C. Contém tampão 50 mmol, pH 7,0, fenol 24,0 mmol/L, colato de sódio 500 µmol/L, azida sódica 15 mmol/L, 4 aminoantipirina 500 µmol/L, colesterol esterase ≥250 U/L, colesterol oxidase ≥250 U/L e peroxidase ≥1000 U/L.

Padrão 200 mg/dL: Armazenar entre 2 – 8°C. Após o manuseio armazenar bem vedado para evitar evaporação. Contém azida sódica 15 mmol/L.

Equipamentos

1. Fotômetro capaz de medir com exatidão a absorvância em 500 nm ou filtro verde (490 a 510 nm).
2. Banho-maria mantido à temperatura constante (37 °C).
3. Pipetas para medir amostras e reagentes.
4. Cronômetro.

Procedimento

Tomar 3 tubos de ensaio e proceder como a seguir:

	Branco	Teste	Padrão
Amostra	-----	0,01 mL	-----
Padrão (nº 2)	-----	-----	0,01 mL
Reagente 1	1,0 mL	1,0 mL	1,0 mL

Misturar e colocar em banho-maria 37 °C 10 minutos. O nível de água no banho deve ser superior ao nível de reagentes nos tubos de ensaio. Determinar as absorvâncias do teste e padrão em 500 nm ou filtro verde (490 a 510 nm), acertando o zero com o branco. A cor é estável por 60 minutos.

Cálculos

$$\text{Colesterol mg/dL} = \frac{\text{Absorvância do Teste}}{\text{Absorvância do padrão}} \times 200$$

Conversão de mg/dL para Unidade SI: mmol/L = mg/dL x 0,026.

I.5 - Fosfatase Alcalina*Princípio*

A fosfatase alcalina (ALP) do soro hidrolisa a timolftaleína-monofosfato liberando a timolftaleína, que tem cor azul em meio alcalino. A cor formada é diretamente proporcional à atividade enzimática, é medida em 590 nm. O produto final da reação se constitui de uma mistura de cor azul e a cor própria do substrato.

Amostra

Usar soro ou plasma (heparina). A atividade enzimática é estável por 7 dias entre 2 – 8°C e vários meses a 20°C negativos.

Produto Utilizado

Fosfatase Alcalina Liquiform, Catálogo 40 - ANVISA - 10009010081

Labtest Diagnóstica: Av. Paulo Ferreira da Costa, 600. Lagoa Santa, MG, 33400-000

Substrato: Armazenar entre 15 - 25 °C. contém timolftaleína monofosfato 22 mmol/L.

Tampão pH10,1; 300 mmol/L: Armazenar entre 15 - 25 °C.

Reagente de cor: Armazenar entre 15 - 25 °C. Contém carbonato de sódio 94 mmol/L e hidróxido de sódio 250 mmol/L.

Padrão 45 U/L: Armazenar entre 15 - 25 °C.

Equipamentos

1. Fotômetro capaz de medir com exatidão a absorvância entre 580 e 590 nm.
2. Banho-maria mantido à temperatura constante (37 °C).
3. Pipetas para medir amostras e reagente.
4. Cronômetro.

Procedimento

Tomar 3 tubos de ensaio e proceder como a seguir:

	Branco	Teste	Padrão
Substrato (n° 1)	0,05 mL	0,05 mL	0,05 mL
Tampão (n° 2)	0,5 mL	0,5 mL	0,5 mL
Padrão (n° 3)	-----	-----	0,05 mL

Incubar em banho-maria a 37°C durante 2 minutos. O nível da água no banho deve ser superior ao nível dos reagentes nos tubos de ensaio. Não remover os tubos do banho-maria para adicionar a amostra.

Amostra	-----	0,05 mL	-----

Misturar e incubar em banho-maria a 37°C durante 10 minutos (cronometrados).

Reagente de cor (n°3)	2,0 mL	2,0 mL	2,0 mL

Misturar e determinar as absorvâncias do teste e padrão em 590 nm ou filtro laranja (580 a 590), acertando o zero com o branco. A cor é estável por 120 minutos.

Cálculos

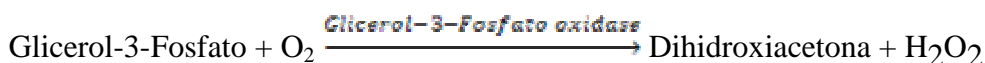
$$\text{Fosfatase Alcalina (U/L)} = \frac{\text{Absorvância do teste}}{\text{Absorvância do padrão}} \times 45$$

Definição da unidade: uma unidade é igual a quantidade de enzima que libera por hidrólise, 1 micromol de timolftaleína por minuto, por litro de soro nas condições do teste.

I.6 - Triacilgliceróis

Princípio

Os Triacilgliceróis são determinados de acordo com as seguintes reações:



A intensidade da cor vermelha formada é diretamente proporcional à concentração de triacilgliceróis na amostra.

Amostra

Jejum de 12 a 14 horas. Usar soro ou plasma com EDTA. O analito é estável por dois dias entre 2 – 8°C. Armazenamento prolongado da amostra não é recomendado, porque várias substâncias podem ser hidrolisadas liberando glicerol, levando à obtenção de resultados falsamente elevados. A heparina promove a ativação in vivo ou in vitro da lipase da lipoproteína, fazendo com que a concentração dos triglicérides se reduza gradativamente em amostras contendo heparina.

Produto Utilizado

Triacilgliceróis Liquiform, Catálogo 87 - ANVISA - 10009010070

Labtest Diagnóstica: Av. Paulo Ferreira da Costa, 600. Lagoa Santa, MG, 33400-000

Reagente 1 - Armazenar entre 2 - 8 °C. Contem tampão 50 mmol/L, pH 6,9; acetato de magnésio 4 mmol/L; 4-clorofenol 5 mmol/L; 4-aminoantipirina 300 µmol/L ATP 1,0 mmol/L; lipase da lipoproteína ≥ 1400 U/L; glicerolquinase ≥ 1000 U/L e azida sódica 7 mmol/L.

Padrão - 200 mg/dL - Armazenar entre 2 - 30 °C. Contém triglicérides 200 mg/dL e azida sódica 7 mmol/L. Após o manuseio sugere-se armazenar bem vedado, para evitar evaporação.

Equipamentos

1. Fotômetro capaz de medir com exatidão a absorvância em 505 nm ou filtro verde (490 a 520nm).
2. Banho-maria mantido à temperatura constante (37°C).
3. Pipetas para medir amostras e reagentes.
4. Cronômetro.

Procedimento

Tomar 3 tubos de ensaio e proceder como a seguir:

	Branco	Teste	Padrão
Amostra	-----	0,01 mL	-----
Padrão (nº 2)	-----	-----	0,01 mL
Reagente 1 (nº 1)	1,0 mL	1,0 mL	1,0 mL

Misturar e colocar no banho-maria 37 °C por 10 minutos. O nível da água no banho deve ser superior ao nível do reagente nos tubos de ensaio. Determinar as absorbâncias do teste e padrão em 505 nm ou filtro verde (490 a 520 nm) acertando o zero com o branco. A cor é estável por 60 minutos.

Cálculos

$$\text{Triacilgliceróis (mg/dL)} = \frac{\text{Absorbância do Teste}}{\text{Absorbância do padrão}} \times 200$$

Conversão de mg/dL para Unidade SI: mmol/L = mg/dL x 0,0113

I.7 - Proteínas Totais

Princípio

Os íons cobre (Cu⁺²) em meio alcalino (Reagente de Biureto) reagem com as ligações peptídicas das proteínas séricas formando cor púrpura, que tem absorbância máxima em 545 nm, proporcional à concentração das proteínas na amostra.

Amostra

Recomenda-se jejum mínimo de 8 horas. Usar soro. O analito é estável por 3 dias entre 2 – 8°C e 7 dias a 10°C negativos.

Produto Utilizado

Proteínas Totais, Catálogo 99 - ANVISA - 10009010080

Labtest Diagnóstica: Av. Paulo Ferreira da Costa, 600. Lagoa Santa, MG, 33400-000

Reagente Biureto: Armazenar entre 15 – 30°C. Contém hidróxido de sódio 600 mmol/L, sulfato de cobre 12 mmol/L, estabilizador e antioxidante.

Padrão - 4,0 g/dL; Armazenar entre 15 – 30°C. Após o manuseio, sugere-se armazenar bem vedado para evitar evaporação. Contém albumina bovina 4 g/dL e azida sódica 15,4 mmol/L.

Equipamentos

1. Fotômetro capaz de medir com exatidão a absorbância em 545 nm (530 a 550 nm).
2. Pipetas para medir amostras e reagentes.
3. Cronômetro.

Procedimento

Tomar 3 tubos de ensaio e proceder como a seguir:

	Branco	Teste	Padrão
Amostra	-----	0,02 mL	-----
Padrão (n° 2)	-----	-----	0,02 mL
Água destilada ou deionizada	0,02 mL	-----	-----
Biureto de Uso	1,0 mL	1,0 mL	1,0 mL

Misturar e incubar a 37 °C durante 10 minutos. Determinar as absorvâncias do teste e do padrão em 545 nm (530 a 550 nm), acertando o zero com o branco. A cor é estável durante 1 hora.

Cálculos

$$\text{Proteínas Totais (g/dL)} = \frac{\text{Absorbância do Teste}}{\text{Absorbância do padrão}} \times 4$$

Anexo II – Trabalhos submetidos à publicação

Parte dos resultados do presente estudo foram submetidos para publicação em artigo intitulado:

“Diet supplementation with açai (*Euterpe oleraceae*) pulp fruit improves biomarkers of oxidative stress and serum lipid profile in rats.”

Nutrition.

Resultados parciais foram também apresentados:

Souza, M. O., Guerra, J. F., Silva, M., Noujeimi, F., SILVA, M. E., Pedrosa, M. L. Effect of “Açai” supplementation on serum lipid profile and antioxidant defenses in rats. In: XXXVII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2008, Águas de Lindóia. Anais da XXXVII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2008.