



UFOP

UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
ESCOLA DE NUTRIÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E NUTRIÇÃO
LABORATÓRIO DE BIOQUÍMICA METABÓLICA



AVALIAÇÃO DOS DANOS HEPÁTICOS CAUSADOS PELO EXCESSO DE FRUTOSE E POSSÍVEIS BENEFÍCIOS DA SUPLEMENTAÇÃO COM AÇAÍ (*EUTERPE OLERACEA MARTIUS*) EM RATOS DA LINHAGEM *FISCHER*

MAYARA MEDEIROS DE FREITAS CARVALHO

OURO PRETO, MG

2016

MAYARA MEDEIROS DE FREITAS CARVALHO

AVALIAÇÃO DOS DANOS HEPÁTICOS CAUSADOS PELO EXCESSO DE FRUTOSE E POSSÍVEIS BENEFÍCIOS DA SUPLEMENTAÇÃO COM AÇAÍ (*EUTERPE OLERACEA MARTIUS*) EM RATOS DA LINHAGEM *FISCHER*

Dissertação de Mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Saúde e Nutrição da Universidade Federal de Ouro Preto, como requisito para obtenção do título de Mestre em Saúde e Nutrição, área de concentração: Bioquímica e Fisiopatologia da Nutrição.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Lucia Pedrosa

Coorientadores: Prof^a. Dr^a. Larissa de Freitas Bonomo e Prof. Dr. Marcelo Eustáquio Silva

OURO PRETO, MG

2016

C331a Carvalho, Mayara Medeiros de Freitas.
Avaliação dos danos hepáticos causados pelo excesso de frutose e possíveis benefícios da suplementação com açaí (*Euterpe oleracea* Martius) em ratos da linhagem Fischer [manuscrito] / Mayara Medeiros de Freitas Carvalho. - 2016.
82f.: il.: color; graf; tabs; Quadros.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Lucia Pedrosa.
Coorientadora: Profa. Dra. Larissa de Freitas Bonomo.
Coorientador: Marcelo Eustáquio Silva.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Ouro Preto. Escola de Nutrição. Programa de Pós Graduação em Saúde e Nutrição.
Área de Concentração: Bioquímica e Fisiopatologia da Nutrição.

1. Açaí. 2. Frutose. 3. Fígado. 4. Stress (Fisiologia). I. Pedrosa, Maria Lucia. II. Bonomo, Larissa de Freitas. III. Silva, Marcelo Eustáquio. IV. Universidade Federal de Ouro Preto. V. Título.

CDU: 612.35:613.26



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Universidade Federal de Ouro Preto – UFOP
Escola de Nutrição – ENUT
Programa de Pós-Graduação em Saúde e Nutrição

ATA DE DEFESA PÚBLICA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Aos três dias do mês de janeiro de dois mil e dezesseis, às nove horas, no Auditório da Escola de Nutrição da Universidade Federal de Ouro Preto, realizou-se a Defesa da Dissertação de Mestrado da aluna **Mayara Medeiros de Freitas Carvalho**. A Banca Examinadora, definida anteriormente, foi composta pelas Professoras Maria Lúcia Pedrosa (UFOP), Joana Ferreira do Amaral (UFOP) e Maisa Silva (UFJF). Dando início ao exame, a aluna apresentou sua Dissertação de Mestrado intitulada: **“Avaliação dos danos hepáticos causados pelo excesso de frutose e possíveis benefícios da suplementação com açaí (EUTERPE OLERACEA MARTIUS) em ratos da linhagem Fischer”**. Após a apresentação, a candidata foi arguida pela Banca que avaliou o domínio do conteúdo metodológico e teórico relacionado à dissertação. Após julgamento, os membros da Banca decidiram por:



APROVAR



REPROVAR

Maisa Silva

Profa. Maisa Silva (UFJF),
Examinadora Externa.

Joana Amaral

Profa. Joana Ferreira do Amaral (UFOP),
Examinadora Interna.

Maria Lúcia Pedrosa

Profa. Maria Lúcia Pedrosa (UFOP),
Orientadora.

Larissa de Freitas Bonomo

Profa. Larissa de Freitas Bonomo (UFJF),
Coorientadora.

Marcelo Eustáquio Silva

Prof. Marcelo Eustáquio Silva (UFOP),
Coorientador.

Mayara Medeiros de Freitas Carvalho

Mayara Medeiros de Freitas Carvalho (UFOP),
Mestranda.

Este trabalho foi realizado no **Laboratório de Bioquímica Metabólica (LBM)**, *no Laboratório de Nutrição Experimental (LABNEX)* e Laboratório de Multiusuários do Núcleo de Pesquisa em Ciências Biológicas (NUPEB), todos da Universidade Federal de Ouro Preto, com auxílio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP).

Ao meus pais, por serem meu alicerce e razão de tudo!

AGRADECIMENTO ESPECIAL

A Deus por sempre guiar meus passos.

Ao meus pais e toda minha família pela confiança e apoio.

Ao Ernane Júnior, por acreditar no meu potencial, incentivar meus sonhos e estar presente da melhor forma possível.

A todos meus amigos que mesmo longe se fizeram presentes, me apoiando e incentivando a nunca desistir da caminhada, em especial a Fernanda Magalhães, Luísa Carvalho, Mirna Murta, Rayana Murta e Rayssa Carvalho.

À Karina Pena e sua família, por me incentivarem a fazer a seleção do mestrado e auxiliar da melhor forma nesta mudança de vida.

A todos vocês que sempre torceram por mim e que de alguma forma contribuíram para esse trabalho.

Muito obrigada!

AGRADECIMENTOS

A **Maria Lucia Pedrosa, Renata Rebeca Pereira, Larissa de Freitas Bonomo e Marcelo Eustáquio Silva**, agradeço por me guiarem nesta caminhada, vocês são uma inspiração de profissionais a serem seguidos, obrigada pela paciência e carinho durante essa jornada. Cada momento vivido e palavra dita seguirão comigo para sempre.

Ao professor Wanderson Geraldo de Lima, por estar sempre presente auxiliando e acreditando neste trabalho sem medir esforços.

Aos funcionários do Laboratório de Nutrição Experimental, Jair Pastor Mota e Clodoaldo Pereira dos Santos, pelo apoio técnico e agradável convivência.

Ao Programa de Pós-graduação em Saúde e Nutrição e seus professores pelos ensinamentos.

Aos Laboratórios de Imunoparasitologia e de Genética Bioquímica, pela gentileza ao cederem espaço e equipamentos para realização de atividades.

Aos amigos dos Laboratórios de Nutrição Experimental e de Bioquímica Metabólica, Ana Maria Viana, Alice Paulino, Filipe Drumond, Heberth de Paula, Jaqueline Ferreira, Joyce Guerra, Juliana Lopes, Larissa Lélis, Nara Lage, Sabrina Peixoto e Victor Lavorato.

A professora Elizabethe Adriana Esteves e amigos do Laboratório de Estudos Metabólicos da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri – UFVJM, pela amizade e ensinamentos que transcenderam os anos de iniciação científica.

Obrigada a todos pela ajuda e inexplicável contribuição para realização deste trabalho.

RESUMO

A doença hepática gordurosa não alcoólica (NAFLD) é caracterizada pelo acúmulo de gordura no fígado de pacientes sem história de consumo excessivo de álcool. A NAFLD é classificada como esteatose simples, na qual ocorre a deposição de gordura nos hepatócitos ou como esteatohepatite (NASH) na qual, além de depósitos de gordura ocorre necroinflamação. Alterações no metabolismo de lipídios e nos mecanismos antioxidantes têm sido relacionadas como fatores promotores da doença. O consumo excessivo de frutose pode causar danos hepáticos característicos dessa doença. A frutose pode estimular a síntese *de novo* de lipídios e seu efeito lipogênico não é mediado exclusivamente pelo excesso de substrato. Tem sido demonstrado que o excesso de frutose altera vias de sinalização regulatórias impactando o metabolismo de macronutrientes e alterando o processo inflamatório. Estudos demonstram que o açaí, fruto da palmeira *EUTERPE OLERACEA* MART. afeta o metabolismo de lipídios e pode, portanto, ter efeito protetor sobre a esteatose hepática, além de apresentar efeito anti-inflamatório e antioxidante. Assim, o presente estudo avaliou os benefícios da suplementação com açaí sobre os danos hepáticos causados pelo excesso de frutose em ratos da linhagem *Fischer*. Foram utilizados 30 ratos (machos) divididos em 2 grupos: grupo C (grupo controle) recebeu dieta padrão AIN-93M (10 animais) e o grupo F (grupo frutose) recebeu dieta contendo 60% de frutose (20 animais). Após 8 semanas, 10 animais do grupo frutose passaram a receber a mesma dieta contendo 2% de açaí liofilizado, grupo FA (frutose+açaí). Os ratos foram alimentados *ad libitum* com estas dietas por mais 10 semanas. Os dados foram submetidos ao teste de normalidade de Kolmogorov Smirnov. Aqueles cuja distribuição foi paramétrica foram analisados pelo teste One-Way ANOVA, seguido do pós-teste de Tukey. Os dados com distribuição não paramétrica foram avaliados pelo teste de Kruskal-Wallis seguido pelo pós-teste de Dunn's. As diferenças foram consideradas significativas para $p < 0,05$. Os resultados obtidos mostram o efeito hiperglicêmico e hipertrigliceridêmico decorrente da dieta rica em frutose e alterações características de esteatose hepática foram confirmadas pela análise histológica do fígado. Essa dieta também alterou a atividade de enzimas hepáticas e enzimas antioxidantes. O tratamento com açaí (FA) reduziu a atividade da alanina aminotransferase e reduziu parcialmente fosfatase alcalina em relação ao grupo frutose (F), a atividade da paroxonase sobre o substrato paroxon, reduziu parcialmente em relação ao grupo frutose (F) e catalase reduziu a níveis iguais ao controle. A adição de açaí aumentou a relação da glutathione total por oxidada (GSH/GSSG) e reduziu o grau de esteatose macrovesicular e microvesicular. Dessa forma, a ingestão da dieta rica em frutose por esse período foi eficaz em promover a esteatose hepática, e a suplementação com açaí revelou melhorar algumas das variáveis estudadas, sugerindo um possível efeito protetor desse fruto.

Palavras-Chaves: *Euterpe oleracea* Mart.; Dieta alta em frutose; Fígado; NAFLD/DHGNA; Estresse oxidativo.

ABSTRACT

Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) is characterized by fat accumulation in the liver of patients without history of excessive alcohol consumption. The NAFLD is classified as simple fatty liver, which occurs in the deposition of fat in hepatocytes, and as steatohepatitis (NASH) in which, in addition to fatty deposits occur necroinflammation. Changes in lipid metabolism and antioxidant mechanisms have been implicated as promoting factors of the disease. Excessive consumption of fructose can cause liver damage characteristic of this disease. Fructose can stimulate *de novo* synthesis of lipids and its lipogenic effect is not mediated exclusively by excess substrate. It has been shown that the excess fructose modifies regulatory signaling pathways impacts the macronutrients metabolism and altering the inflammatory process. It has been shown that the acai fruit of *EUTERPE OLERACEA* MART. palm tree affects the lipid metabolism and may therefore have protective effects on hepatic steatosis, besides having anti-inflammatory and antioxidant effect. The present study evaluated the benefits of açaí supplementation on the liver damage caused by fructose rich-diet in rats Fischer lineage. 30 rats (males) divided into 2 groups: Group C (control group) received standard diet AIN-93M (10 animals) and F group (fructose group) received a diet containing 60% fructose (20 animals). After eight weeks, 10 animals of the fructose group started receiving the same, but now containing 2% freeze dried acai, FA group (fructose + acai). The rats were fed these diets ad libitum for 10 weeks. The data were submitted to the Kolmogorov-Smirnov normality test. Those whose distribution was parametric were analyzed by one-way ANOVA followed by Tukey's post-test. The data with non-parametric distribution were evaluated by the Kruskal-Wallis test followed by Dunn's post-test. Differences were considered significant for $p < 0.05$. The results show the hyperglycemic effect and hypertriglyceridemia due to diet high in fructose and changes characteristics of hepatic steatosis were confirmed by histological analysis in liver. This diet has also altered activity of liver enzymes and antioxidant enzymes. Treatment with acai (FA) reduces aspartate aminotransferase alanine activity and reduced partially alkaline phosphatase compared to fructose group (F), the paraoxonase activity about paroxon substrate decreased partially with respect to fructose group (F) and catalase reduced levels equal to control. Adding acai increased the ratio of the total glutathione to oxidized (GSH / GSSG) and reduced the degree of macrovesicular and microvesicular steatosis. Thus, the intake of diet rich in fructose for this period was effective in promoting hepatic steatosis, and supplementation with acai revealed improve some of the variables studied, suggesting a possible protective effect of this fruit.

Key Words: *Euterpe oleracea* Mart.; Fructose-rich diet; Liver; NAFLD / DHGNA; Oxidative stress.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Espectro da doença hepática gordurosa não alcoólica.	5
Figura 2. O conceito tradicional de estresse oxidativo em saúde e doença.	7
Figura 3. Conceito modificado de estresse oxidativo.	7
Figura 4. Integração dos sistemas de defesa enzimático.	9
Figura 5. Metabolismo Hepático da frutose.	13
Figura 6. Fotos dos frutos do açaizeiro.	17
Figura 7. Representação esquemática do delineamento experimental.	27
Figura 8. Esquema do Kit de Superóxido Dismutase.	33
Figura 9. Massa corporal inicial e massa corporal na 8ª semana.	41
Figura 10. Massa relativa do fígado (%p/p).	42
Figura 11. Níveis hepáticos de glutathione Total, Glutathione Oxidada, Glutathione reduzida e Relação glutathione reduzida por glutathione oxidada.	45
Figura 12. Micrografias histológicas de tecidos hepático, coradas com H&E.	47
Figura 13. Quantificação do volume das macrovesículas e volume de célula macrovesicular por campo (μ^2).	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Conteúdo de polifenóis e capacidade antioxidante açaí liofilizado.	40
Tabela 2. Consumo alimentar, ganho de massa, eficiência alimentar e excreção fecal nos grupos experimentais.	41
Tabela 3. Concentração de glicose e atividade de enzimas no soro dos grupos experimentais.	42
Tabela 4. Perfil lipídico sérico nos grupos experimentais.	43
Tabela 5. Perfil lipídico hepático e fecal nos grupos experimentais.	43
Tabela 6. Atividade sérica da enzima paroxonase para os substratos fenilacetato e paraxon e concentração sérica de sulfidrilas totais nos grupos experimentais.	44
Tabela 7. Atividade hepática de Catalase e Superóxido dismutase nos grupos experimentais.	44
Tabela 8. Concentração hepática de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e proteína carbonilada (PC) nos grupos experimentais.	46

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Características físico-químicas do açáí.	19
Quadro 2. Composição do açáí liofilizado.	24
Quadro 3. Composição das dietas experimentais (g/1000g de dieta).	29

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

- Acetil-CoA:** Acetil Coenzima-A
- Adipo R2:** Receptor tipo 2 de adiponectina
- AG:** Ácidos graxos
- ALT:** Alanina-aminotransferase.
- ANOVA:** Análise de variância
- ApoA-I:** Apolipoproteína A-I
- ApoB:** Apolipoproteína B
- AST:** Aspartato-aminotransferase
- BHT:** Butil-hidroxi-tolueno
- C:** Controle (grupo experimental)
- CAT:** Catalase
- CDNB:** 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno
- CEA:** Coeficiente de eficiência alimentar
- CEUA:** Comissão de Ética no Uso de Animais
- CO₂:** Dióxido de carbono
- CT:** Colesterol total.
- CYP7A1:** Colesterol 7 α -hidrolase
- DC:** Densidade calórica
- DCNT:** Doenças crônicas não transmissíveis
- DNA:** Ácido desoxirribonucleico
- DNPH:** 4-dinitrofenilhidrazina
- DNTB:** Ácido 5,5'-Ditio-bis-2-nitrobenzóico
- DP:** Desvio padrão
- DPPH:** 2,2-difenil-1-picril-hidrazil
- EDTA:** Ácido etilenodiaminotetracético
- F:** Frutose (grupo)
- FA:** Frutose açai (grupo)
- GAE:** Equivalente de ácido gálico
- GAPDH:** Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
- GLUT2:** Transportador de glicose 2
- GPX:** Glutationa peroxidase

-
- GR:** Glutationa redutase
- GRd:** Glutationa redutase
- GSH:** Glutationa reduzida
- GSSG:** Glutationa oxidada
- GST:** Glutationa-S-transferase
- H&E:** Hematoxilina & Eosina
- H₂O:** Água
- H₂O₂:** Peróxido de hidrogênio
- HCl:** Fator de necrose tumoral alfa
- HDL:** Lipoproteína de alta densidade, ou do inglês, *High Density Lipoprotein*
- HOMA-IR:** Modelo de avaliação da homeostase, ou do inglês, *homeostatic model assessment*
- HPLC:** Cromatografia líquida de alta eficiência
- IFN- γ :** Interferon-gama
- IL-6:** Interleucina 6
- LABNEX:** Laboratório de Nutrição Experimental
- LDH:** Lactato desidrogenase
- LDL:** Lipoproteína de baixa densidade, ou do inglês, *Low Density Lipoprotein*
- MDA:** Malondialdeído
- MPO:** Mieloperoxidase
- NADPH:** Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
- NAFLD:** *Non-alcoholic fatty liver disease* ou do português, **DHGNA:** Doença hepática gordurosa não alcoólica
- NASH:** *Nonalcoholic steatohepatitis* ou do português, **EHNA:** Esteatohepatite não alcoólica
- NF- κ B:** Fator de necrose tumoral alfa
- NO \cdot :** Óxido nítrico
- NUPEB:** Núcleo de Pesquisa em Ciências Biológicas
- O₂ \cdot^- :** Radical superóxido
- OH \cdot :** Radical hidroxila
- OONO $^-$:** Peróxido nitritos
- PC:** Proteína carbonilada
- PDH:** Piruvato desidrogenase

-
-
- PON:** Paraoxonase
- PPAR α :** Proliferador peroxissoma alfa
- PT:** Compreende a tríade portal, que consiste da artéria hepática, veia portal e ducto biliar
- CV:** Veia central
- RE:** Retículo endoplasmático
- RNS:** *Reactive nitrogen species*, ou do português, **ERN:** espécies reativas de nitrogênio
- ROS:** *Reactive oxygen species*, ou do português, **ERO:** espécies reativas de oxigênio
- S \cdot :** Tiol
- SERCA:** Reticulo sarco/endoplasmático
- SM:** Síndrome metabólica
- SMC:** S-metil-cisteína
- SOD:** Superóxido dismutase
- SREBP-1:** Proteína de ligação ao elemento de resposta a esterol
- SS:** Pontes dissulfeto
- SSA:** Ácido de sulfosalicílico
- ST:** Sulfidrilas totais.
- STZ:** Estreptozima
- TAG:** Triacilglicerol
- TBA:** Ácido tiobarbitúrico
- TBARS:** Níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
- TCA:** Ácido tricloroacético
- TEA:** Trietanolamina
- TEAC:** Capacidade antioxidante equivalente ao trolox, ou do inglês, *Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*
- TNF- α :** Fator de necrose tumoral alfa
- Trolox:** 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico
- UFOP:** Universidade Federal de Ouro Preto
- VE:** Valor energético
- VLDL:** Lipoproteína de muito baixa densidade, ou do inglês, *very low density lipoprotein*

LISTA DE ANEXOS

Anexo I. Certificado de aprovação do protocolo pela Comissão de Ética no Uso de Animais	70
Anexo II. Protocolos das Dosagens Bioquímicas	71
Anexo III. Trabalhos Publicados em Eventos Científicos	81

SUMÁRIO

RESUMO	VIII
ABSTRACT	IX
LISTA DE FIGURAS	X
LISTA DE TABELAS	XI
LISTA DE QUADROS	XII
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS	XIII
LISTA DE ANEXOS	XVI
1) INTRODUÇÃO	1
2) REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1) Esteatose hepática não alcoólica (NAFLD)	3
2.1.1) Estresse Oxidativo	6
2.1.2) Defesa antioxidante enzimáticas	8
2.1.3) Defesa antioxidante natural ou não enzimáticas	111
2.2) A RELAÇÃO ENTRE FRUTOSE E A NAFLD	12
2.3) AÇAÍ (<i>EUTERPE OLERACEAE</i> MARTIUS)	17
2.3.1) Composição química e compostos bioativos da polpa do açaí	18
2.3.2) Estudos utilizando o fruto do açaí	20
3) OBJETIVOS	23
3.1) Objetivo Geral	23
3.2) Objetivos Específicos	23
4) MÉTODOS	24
4.1) Açaí liofilizado	24
4.2) Caracterização da polpa de açaí liofilizada	25
4.2.1) Capacidade Antioxidante	25
4.2.2) Conteúdo de Polifenóis	25
4.3) Animais e delineamento experimental	26
4.4) Dietas	29
4.5) Dosagens de Metabólitos Séricos	30
4.6) Extração de gordura hepática	30
4.7) Extração de gordura fecal	30
4.8) Atividade Antioxidante e Marcadores do Estresse Oxidativo	31

4.8.1) Paraoxonase – Atividade Arilesterásica	31
4.8.2) Paraoxonase –Atividade Paraoxonásica	32
4.8.3) Grupos Sulfidrilas	32
4.8.4) Superóxido Dismutase	33
4.8.5) Catalase	34
4.8.6) Concentração de glutathiona total, glutathiona oxidada e glutathiona reduzida	35
4.8.7) Níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)	36
4.8.8) Proteína Carbonilada	37
4.8.9) Proteínas totais em tecidos	38
4.9) Processamento histológico e análise morfométrica	39
5) Análises Estatísticas	39
6) RESULTADOS	40
6.1) Conteúdo de polifenóis e capacidade antioxidante do açaí liofilizado	40
6.2) Resultados do experimento <i>in vivo</i>	41
6.3) Massa relativa do fígado, glicose e enzimas hepáticas	42
6.4) Perfil lipídico sérico, hepático e fecal	43
6.5) Defesas Antioxidantes e Marcadores do Estresse Oxidativo	44
6.6) Análise histológica e morfometria	46
6) DISCUSSÃO	49
7) CONCLUSÃO	56
REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS	57
ANEXOS	70
Anexo I. Certificado de aprovação do protocolo pela Comissão de Ética no Uso de Animais	70
Anexo II. Protocolos das Dosagens Bioquímicas	71
Anexo III. Trabalhos Publicados em Eventos Científicos	81

1) INTRODUÇÃO

A Doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA ou, do inglês, NAFLD) e esteatohepatite não alcoólica (EHNA ou, do inglês, NASH) tiveram sua prevalência dobrada nos últimos 20 anos e em alguns países é considerada a causa primária de doenças hepáticas (LABRECQUE *et al.*, 2014). Em 2014, NAFLD foi confirmada como a etiologia que mais evoluiu para hepatocarcinoma celular nos EUA (RINELLA&SANYAL, 2015). Esta doença compreende a esteatose simples e a esteatohepatite, caracterizada por aumento do estresse oxidativo, inflamação e em estágios mais avançados necrose (DAY&JAMES, 1998).

Múltiplas vias e mecanismos estão envolvidos na NAFLD e precisam ser melhor elucidados, mas sabe-se que os componentes dietéticos podem agravar ou atenuar o desenvolvimento da esteatose. A frutose consumida em excesso pode causar o acúmulo de lipídeos hepáticos, por estimular a síntese *de novo* de lipídios. O excesso de frutose altera vias de sinalização regulatórias, impactando no metabolismo de macronutrientes, alterando parâmetros relacionados à síndrome metabólica, como resistência à insulina e dislipidemia, e acarretando também um processo inflamatório (KELISHADI; MANSOURIAN; HEIDARI-BENI, 2014).

A terapia de maior relevância para a NAFLD compreende alterações no estilo de vida, sendo que a perda de peso seria a mais eficiente por atuar nos fatores desencadeadores da doença (SASS; CHANG; CHOPRA, 2005; LEWIS&MOHANTY, 2010; IBRAHIM; KELLENI; GEDDAWY, 2013). Compostos dietéticos foram estudados como opções terapêuticas nessa patologia, com especial ênfase nas antocianinas, pois relatos demonstram sua atuação na redução da esteatose e danos hepáticos (VALENTI *et al.*, 2013).

O *EUTERPE OLERACEA* MART., popularmente conhecido como açaí, é nativo da Amazônia Brasileira e do Estado do Pará. O fruto do açaizeiro conquistou novos mercados devido a presença de compostos antioxidantes benéficos à saúde, como vitamina E, antocianinas e compostos fenólicos (DE VASCONCELOS *et al.*, 2006; OLIVEIRA; FARIAS NETO; SILVA PENA, 2007). Entre os compostos fenólicos presentes nesse fruto, as antocianinas têm se destacado em estudos sobre seus possíveis benefícios a saúde, devido ao seu potencial antioxidante e abundância na composição deste fruto.

Estudos *in vivo* demonstram a ação do açúcar na melhora do perfil lipídico e de biomarcadores do estresse oxidativo (DE SOUZA *et al.*, 2010) em ratos hipercolesterolemicos, atuando na modulação da expressão de genes envolvidos no metabolismo de colesterol (DE SOUZA *et al.*, 2012), melhora do balanço oxidante/antioxidante (DA COSTA GUERRA *et al.*, 2011) e na redução da esteatose hepática não alcoólica (DA COSTA GUERRA *et al.*, 2015), em camundongos alimentados com dieta rica em gordura.

Considerando que o excesso de frutose na alimentação pode afetar o metabolismo de lipídios, o estado oxidativo e processos inflamatórios, o objetivo desse trabalho foi avaliar os danos causados pelo excesso de frutose no fígado de ratos da linhagem *Fischer* e os possíveis benefícios da suplementação com açúcar. O esclarecimento dos efeitos protetores do açúcar poderá ampliar a diversidade de opções dietéticas na terapêutica e prevenção da doença.

2) REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1) Esteatose hepática não alcoólica (NAFLD)

Doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) ou do inglês *Non-alcoholic fatty liver disease* (NAFLD) é um termo amplo utilizado para abranger um espectro de doenças hepáticas não associadas ao consumo de álcool. A real prevalência e incidência da NAFLD é difícil de ser estimada, por ser uma doença assintomática e de difícil diagnóstico, mas estima-se que sua prevalência seja de 10 a 20% da população em geral e de 40 a 55% em pacientes registrados em centros de cuidado à saúde, dos Estados Unidos, Europa, Oriente Médio, Extremo Oriente, África, Caribe e América Latina (LABRECQUE *et al.*, 2014).

A NAFLD ocorre em todas as idades e grupos étnicos, incluindo crianças e adolescentes (WELSH; KARPEN; VOS, 2013). Sendo que a maioria dos casos está associada com a obesidade, dislipidemia e resistência à insulina (BOGDANOVA *et al.*, 2006) e na maioria dos casos ocorre em pacientes obesos e diabéticos tipo 2 (WILLIAMS, K. *et al.*, 2012). Sabendo que a obesidade têm aumentado em toda a região das Américas, Europa e Ásia durante as últimas três décadas proporcionalmente ao aumento da incidência da NAFLD (LOOMBA&SANYAL, 2013).

A NAFLD além de ser assintomática e evidente em todas as faixas etárias é caracterizada pelo excesso de triacilgliceróis (TAG) nos hepatócitos encontrando-se acima de 5% da massa do fígado (esteatose) (BRUNT&TINIAKOS, 2010), podendo evoluir para Esteatohepatite não alcoólica (EHNA), ou do inglês *Nonalcoholic steatohepatitis* (NASH), quando associada à esteatose encontram-se também inflamação, injúria hepatocelular e fibrose podendo resultar em cirrose e evoluir ao câncer (SASS; CHANG; CHOPRA, 2005; LABRECQUE *et al.*, 2014).

Os mecanismos moleculares que desencadeiam a progressão da NAFLD não são completamente conhecidos, mas têm sido interpretados pela hipótese dos dois *hits*. O insulto primário ou primeiro *hit* inclui o acúmulo de lipídios. O acúmulo de lipídios no fígado pode ocorrer devido ao aumento da captação de ácidos graxos (AG) pelos hepatócitos pelo excesso de ingestão ou pela liberação do tecido adiposo, aumento da síntese de novo de ácidos graxos, triacilgliceróis hepáticos, falha na síntese e exportação de triacilgliceróis como lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL, ou do inglês *very low density lipoprotein*) e da falha na degradação de AG devido a erros na β -oxidação

mitocondrial (ANSTEE&GOLDIN, 2006). O primeiro *hit* sensibiliza o fígado para o segundo *hit*, que consiste em estresse oxidativo elevado, inflamação e resistência à insulina, levando a evolução de esteatose para NASH (Figura 1). A teoria dos dois *hits* tem sofrido modificações devido a novos achados relacionados à resistência à insulina, estresse oxidativo, adipocinas, inflamação do tecido adiposo e outros fatores. Deste modo, têm-se sugerido o modelo dos *múltiplos hits*, o qual considera que a instalação da esteatose hepática ocorre por mecanismos patogênicos distintos (TAKAKI; KAWAI; YAMAMOTO, 2013).

A evolução da NAFLD envolve a mesma região, com lesões de células hepáticas e apoptose de hepatócitos e formação de corpos de Mallory que se associam ao infiltrado inflamatório, representado por linfócitos e neutrófilos. Nessa fase ocorre peroxidação lipídica, estresse oxidativo e produção de citocinas (SYN; CHOI; DIEHL, 2009), quando estas alterações excedem o estado anti-inflamatório acarretam uma inflamação crônica (LALOR *et al.*, 2007).

A maior peroxidação de lipídeos de membrana é um importante mecanismo da doença, pois pode causar necrose celular e megamitocôndria, devido aos aldeídos produzidos serem capazes de ativar células estreladas, maior produção de colágeno e quimiotaxia de neutrófilos. Estes aldeídos podem contribuir para inflamação por ativar NF- κ B, que regula as citocinas pró-inflamatórias e moléculas de adesão, incluindo fator de necrose tumoral (TNF) (DAY&JAMES, 1998).

A esteatose pode se apresentar como macrovesicular, que é caracterizada pela presença de grandes vacúolos/gotículas ocupando quase todo o citoplasma e empurrando o núcleo para a periferia (JAMES&DAY, 1998); ou, esteatose microvesicular, caracterizada por múltiplos pequenos vacúolos lipídicos no citossol dos hepatócitos e o núcleo está localizado no centro da célula (BRUNT&TINIAKOS, 2010; TAKAHASHI; SOEJIMA; FUKUSATO, 2012). A esteatose microvesicular torna o fígado mais sensível a mecanismos deletérios secundários, sendo considerada uma condição mais grave, pois ocorre como resultado de alterações na β -oxidação mitocondrial, conduzindo ao acúmulo de ácidos graxos (DA SILVA&ESCANHOELA, 2012).

Na esteatose, podem ser observados também focos de inflamação lobular, inflamação portal moderada, e lipogranulomas. No entanto, características da lesão e fibrose hepatocelular, indicando a progressão da doença não são observadas

(BRUNT&TINIAKOS, 2010). A Figura 1 apresenta o espectro da NAFLD e o esquema de progressão da esteatose hepática.

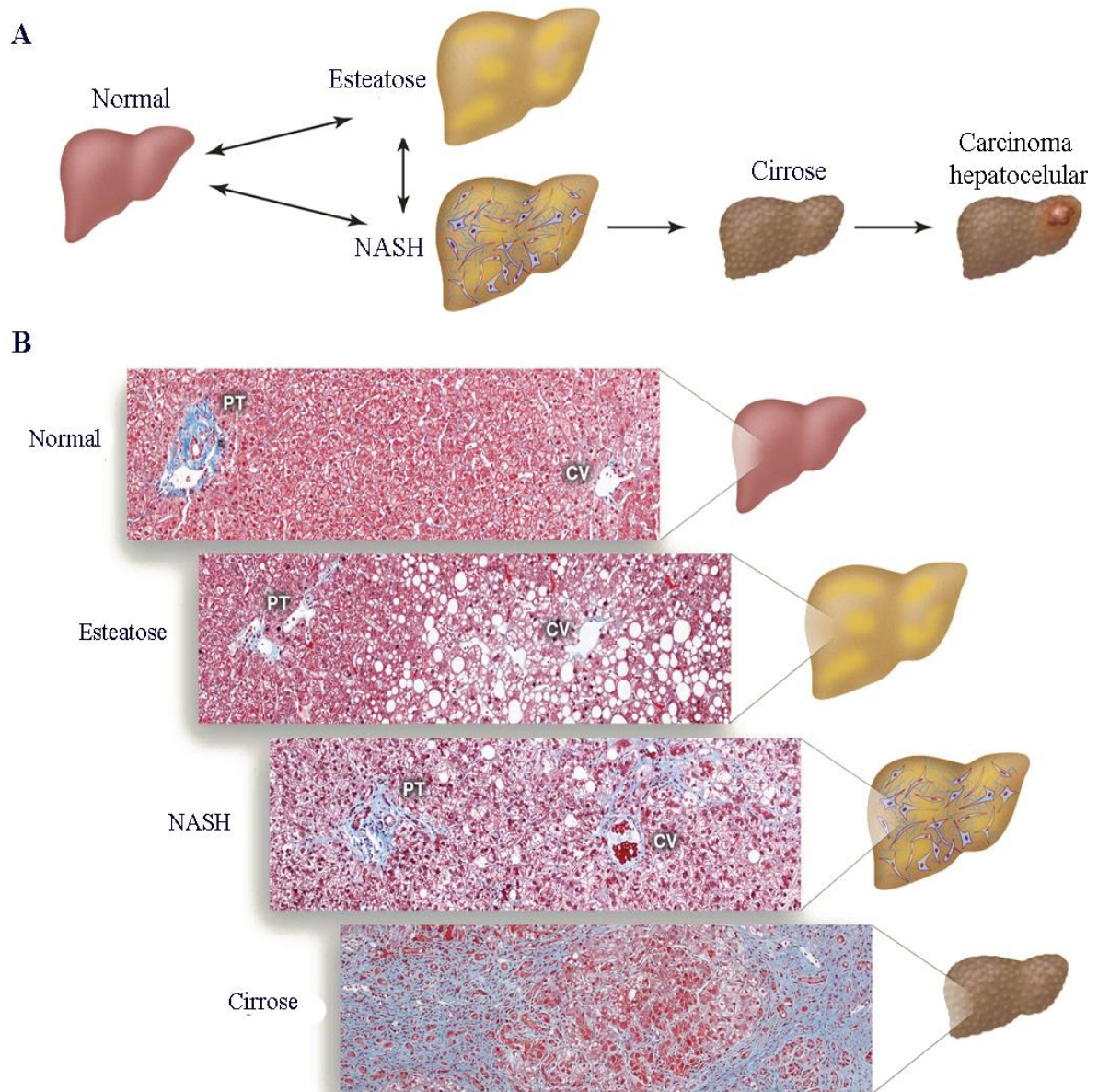


Figura 1. Espectro da doença hepática gordurosa não alcoólica. (A) Esquema da progressão da NAFLD. A acumulação de triacilgliceróis (TAG) no interior dos hepatócitos causa esteatose. A esteatose associada com inflamação, morte celular e fibrose é referida como NASH, que pode progredir para cirrose. Indivíduos com cirrose têm risco aumentado para desenvolverem carcinoma hepatocelular. (B) Secções histológicas ilustrando o fígado normal, a esteatose, NASH e cirrose. Fibras de colágeno são apresentadas na imagem coradas de azul com tricrômico de Masson. (PT) compreende a tríade portal que consiste da artéria hepática, veia portal e ducto biliar e (CV) veia central. Fonte: Adaptado de COHEN, J. C.; HORTON; HOBBS (2011).

2.1.1) Estresse Oxidativo

A importância do estresse oxidativo na evolução da esteatose para NASH é bem aceita na literatura. Assim, faz-se necessária a compreensão dos fatores envolvidos no estresse oxidativo, dos danos oxidativos e dos mecanismos de defesas envolvidos nesta doença.

Tradicionalmente define-se que o estresse oxidativo ocorre devido ao desequilíbrio entre a produção de espécies reativas do oxigênio (ERO, ou do inglês ROS) ou do nitrogênio (ERN, ou do inglês RNS) e as defesas antioxidantes, em favor dos primeiros gerando danos a biomoléculas com consequente perda de função biológica (Figura 2).

No entanto, o conhecimento sobre vias sinalização dependentes do estado redox e a descoberta de mecanismos moleculares envolvidos nas terapias antioxidantes, têm levado a questionamentos sobre a visão tradicional do estresse oxidativo e o definindo como uma interrupção do fluxo, onde o estresse oxidativo pode ocorrer de forma compartimentalizada, sem necessariamente haver um equilíbrio entre o espaço extracelular, o citoplasma e organelas, ou seja, pode ocorrer sem um desequilíbrio pró-oxidante/antioxidante global (Figura 3). Portanto o estresse oxidativo pode levar à toxicidade específica de um órgão ou a uma via sem danos macromoleculares (FITZPATRICK; JONES; BROWN, 2012).

As espécies reativas de oxigênio e nitrogênio no organismo humano são principalmente geradas pela cadeia transportadora de elétrons na mitocôndria, metabolismo de ácidos graxos no peroxissomo, via metabólica catalisada pelas enzimas citocromo P₄₅₀ nos microsomas (RIBEIRO *et al.*, 2008; STEINBRENNER&SIES, 2009). Ainda, alguns sistemas enzimáticos produzem RNS como ciclooxigenase, lipoxigenase, xantina oxidase, mieloperoxidase e óxido nítrico sintase (SIES, 1994; STEINBRENNER&SIES, 2009). A produção de superóxido pela NADPH oxidase de células fagocíticas também representa uma importante fonte de ROS (BABIOR, 1999) e encontra-se aumentada na esteatose hepática induzida por dieta hipercolesterolemia (ABREU *et al.*, 2014).

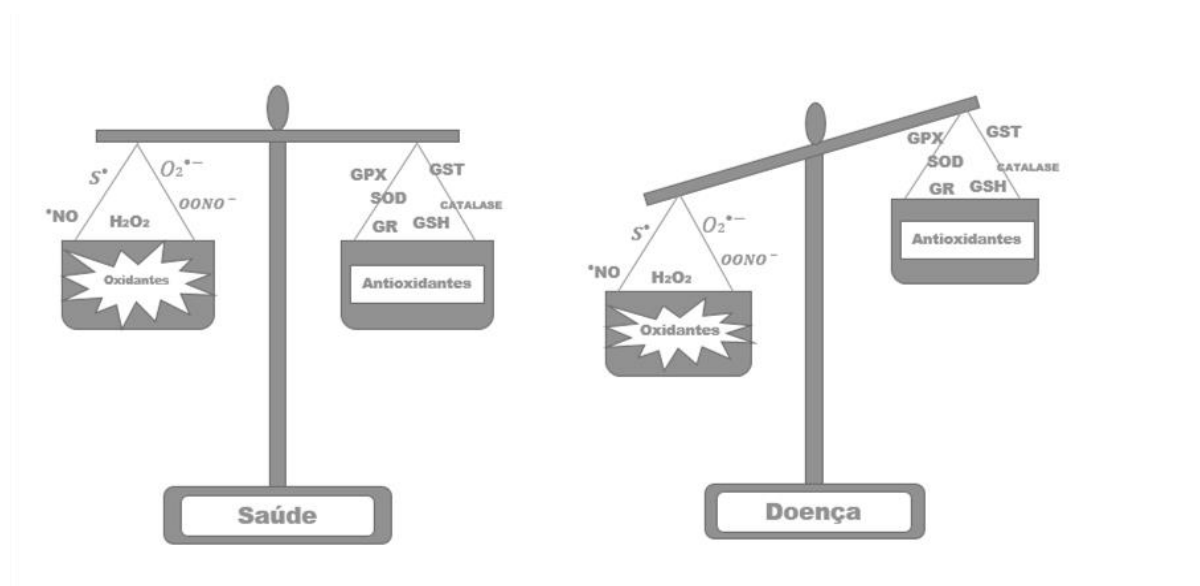


Figura 2. O conceito tradicional de estresse oxidativo em saúde e doença. Originalmente, o estresse oxidativo foi descrito como o resultado da ruptura global entre o equilíbrio pró-oxidante e antioxidante. Nessa visão, a doença foi atribuída a um aumento de radicais livres Tiol (S^{\bullet}), oxido nítrico (NO^{\bullet}), superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxido nitritico ($OOONO^-$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), glutathiona (GSH), catalase, glutathiona-S-transferase (GST), glutathiona redutase (GR), superóxido dismutase (SOD) e glutathiona peroxidase (GPX). Fonte: Adaptado de FITZPATRICK; JONES; BROWN (2012).

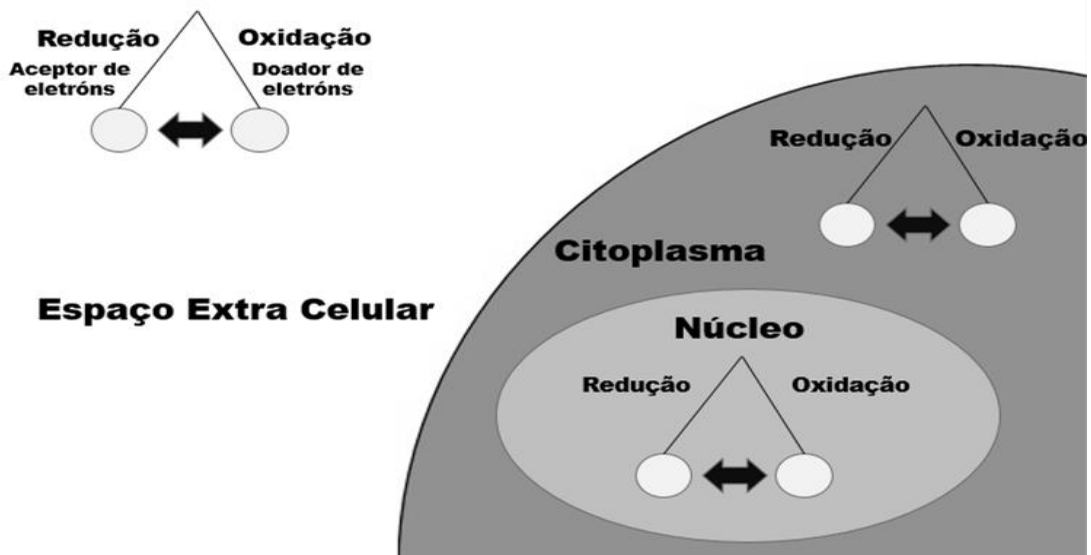


Figura 3. Conceito modificado de estresse oxidativo. Nessa visão, o estresse oxidativo é um processo dinâmico em constante fluxo, semelhante a um pêndulo. As mudanças oxidativas são compartimentalizadas e não há, necessariamente, equilíbrio entre o espaço extracelular, o citoplasma e organelas. Fonte: Adaptado de FITZPATRICK; JONES; BROWN (2012).

O maior influxo de ácidos graxos para os hepatócitos contribui para aumento estresse oxidativo e disfunção mitocondrial. Na NAFLD, ocorre uma sobrecarga da β -oxidação mitocondrial do ácidos graxos, originando as ROS (PETTA; MURATORE; CRAXI, 2009). Uma adicional fonte de ROS pode ocorrer devido a alterações estruturais e ativação da ω -oxidação, via alternativa que ocorre no retículo endoplasmático (BROWNING&HORTON, 2004).

Em condições fisiológicas existe a presença de ROS em pequenas quantidades no organismo, as quais atuam como mediadores em processos celulares e vias de sinalização vitais, como na defesa contra microrganismos e na regulação da expressão gênica baseada na óxido-redução (D'AUTRÉAUX&TOLEDANO, 2007). Entretanto, em condições patológicas com o aumento na produção de ROS pode ocasionar danos celulares, como a depleção de ATP, dano ao DNA (ácido desoxirribonucleico), alterações proteicas, peroxidação lipídica e a liberação de citocinas inflamatórias (BROWNING&HORTON, 2004).

2.1.2) Defesa antioxidante enzimáticas

O organismo possui formas de combater o excesso de ROS produzidas, para assim minimizar os possíveis danos oriundos do estresse oxidativo. As defesas antioxidantes inibem e/ou reduzem os danos gerados por oxidantes de várias formas, por meio da prevenção (impede a formação), varredura (impede a ação) ou reparo (reparando e reconstituindo estruturas). O sistema de defesa antioxidante pode ser dividido em enzimático (endógeno) e não enzimático (exógeno) (SIES, 1994).

O sistema de defesa enzimático constitui a primeira defesa endógena contra as ROS, impedindo sua formação ou sequestrando-as para que estas não possam interagir com alvos celulares (JÚNIOR *et al.*, 2001). Este sistema inclui as enzimas Superóxido Dismutase (SOD), Catalase (CAT) e Glutathione Peroxidase (GPx), juntas essas enzimas são capazes de prevenir, impedir e/ou controlar a formação de radicais livres e espécies não radicalares, envolvidos na ocorrência de danos oxidativos (HALLIWELL, 1995; CHANNON&GUZIK, 2002; BARBOSA, K. B. F. *et al.*, 2010). A superóxido dismutase (SOD) cataliza a dismutação do radical ânion superóxido a oxigênio e peróxido de hidrogênio, este e outros peróxidos são convertidos em produtos não tóxicos pela catalase e glutathione peroxidase (GPx).

As enzimas CAT e GPx agem impedindo o acúmulo de peróxido de hidrogênio. A ação dessas enzimas é importante pois, a reação de Fenton e Haber—Weiss com participação de ferro ou de cobre, gera radical hidroxila (OH^{\bullet}) que não sofre eliminação enzimática, sendo o mais propício à produção de danos oxidativos. O radical hidroxila (OH^{\bullet}) é o iniciador da peroxidação lipídica, que altera função biológica de membranas e proteínas, além do ataque ao DNA (ácido desoxirribonucleico), podendo ocasionar mutações. A SOD apresenta as isoformas: SOD-Cu/Zn (citoplasmática) e SOD-Mn (mitocôndrial) e a GPx pode ser dependente ou independente de selênio e apresentar-se no citoplasma ou na mitocôndria (CHANNON&GUZIK, 2002; BARBOSA, K. B. F. *et al.*, 2010).

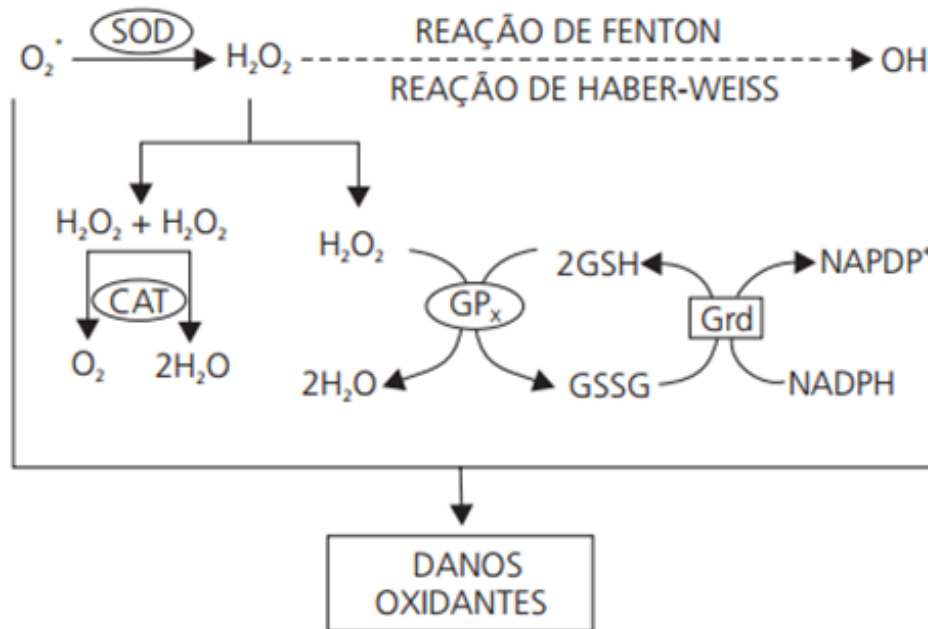


Figura 4. Integração dos sistemas de defesa enzimático. Superóxido dismutase (SOD); peróxido de hidrogênio (H_2O_2); superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$); catalase (CAT); glutatona peroxidase (GPx); hidroxila (OH^{\bullet}); glutatona reduzida (GSH); glutatona oxidada (GSSG); glutatona redutase (GRd). Fonte: Barbosa *et al.* (2010).

No ciclo catalítico da glutatona, a GPx catalisa a redução do H_2O_2 . O excesso de GSSG ocorre em ambiente oxidante, o que favorece a formação de pontes dissulfeto (-SS), esta pode ser revertida pela ação antioxidante da glutatona redutase (GRd). A GRd não age diretamente na remoção de radicais livres, mas é responsável pela recuperação da GSH, na presença NADPH , impedindo a paralisação do ciclo da glutatona

(HALLIWELL, 1995; JÚNIOR *et al.*, 2001; CHANNON&GUZIK, 2002; BARBOSA, K. B. F. *et al.*, 2008).

Em condições de estresse oxidativo, haverá mudanças no estado redox da glutationa, caracterizando um desequilíbrio entre a produção de GSSG e o consumo GSH, dessa forma a magnitude do estresse oxidativo pode ser monitorada pela razão GSH/GSSG ou pela avaliação, em eritrócitos, da atividade das enzimas do ciclo catalítico da glutationa, e outras enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase e catalase (JÚNIOR *et al.*, 2001; BARBOSA, K. B. F. *et al.*, 2008).

A paraoxonase (PON) é outra proteína com significativo papel antioxidante, é composta de três diferentes isoformas, PON1, PON2 e PON3, que compartilham considerável homologia estrutural (PRIMO-PARMO *et al.*, 1996). A PON1 e a PON3 são expressas basicamente no fígado e rins e são encontradas no plasma, onde estão associadas à HDL (lipoproteína de alta densidade, ou do inglês, *High Density Lipoprotein*) (MARSILLACH *et al.*, 2008).

A PON1 é a mais estudada e foi descoberta inicialmente por meio de sua capacidade em hidrolisar organofosfatos xenobióticos do soro humano (MARSILLACH *et al.*, 2008). PON1 está presente no soro, fortemente associada com a apolipoproteína A-I (ApoA-I) integrante da HDL, a qual possui a função principal de proteger a oxidação da LDL (lipoproteína de baixa densidade, ou do inglês, *Low Density Lipoprotein*), demonstrando poder atuar na prevenção do acúmulo de lipoperóxidos na LDL, correlacionando com a doença cardiovascular (COSTA *et al.*, 2005).

A presença de alterações nas defesas antioxidantes de pacientes com NAFLD é comum. No estudo de (PERLEMUTER *et al.*, 2005) apenas as defesas citosólicas (Cu/Zn-SOD, GPx e catalase) foram aumentadas e durante a progressão da doença ocorreu a inibição dos genes de enzimas antioxidantes, como a SOD e catalase, culminando em um aumento dos produtos de peroxidação lipídica e progressão das lesões hepáticas

2.1.3) Defesa antioxidante natural ou não enzimáticas

Adicionalmente às enzimas antioxidantes existem os antioxidantes não-enzimáticos, compreendendo os compostos antioxidantes exógenos como vitaminas, minerais e compostos fenólicos, carotenoides (BARBOSA, K. B. F. *et al.*, 2010).

Os polifenóis são os antioxidantes encontrados em diversos alimentos e bebidas de origem vegetal, como frutas, legumes, cereais, leguminosas, vinho, chá e café. Estes estão relacionados com a atividade antioxidante, atuando na captura de radicais livres e na inibição da peroxidação de lipídios (COUTINHO *et al.*, 2008). Entre os polifenóis, os flavonoides têm uma estrutura favorável ao sequestro de radicais, consistindo em um antioxidantes mais efetivos que as vitaminas C e E. A atividade antioxidante depende da estrutura da molécula e da possibilidade de atuar como agente doador de H (doador de prótons é H⁺) e elétrons (WILLIAMS, R. J.; SPENCER; RICE-EVANS, 2004; BARREIROS; BOSSOLAN; TRINDADE, 2005).

A ingestão de alimentos ricos em polifenóis está associada em modelos experimentais humanos e animais com redução de dislipidemias, aterosclerose, disfunção endotelial, hipertensão e redução de processos inflamatórios associados com doenças cardiovasculares (BERTELLI&DAS, 2009).

Os flavonoides podem atuar na proteção de doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) por influenciar na redução da oxidação de LDL e aumentar os níveis de HDL, reduzindo a inflamação cardiovascular (MIDDLETON; KANDASWAMI; THEOHARIDES, 2000), assim demonstrando possuir efeitos benéfico a saúde humana.

Um estudo com a oferta do extrato de polifenóis do vinho foi utilizado para avaliar seu efeito protetor contra danos oriundos de uma dieta rica em gordura e açúcar. Este tratamento demonstrou impedir parcialmente o estresse oxidativo no fígado e coração e também evitar parcialmente o desenvolvimento da esteatose hepática (FEILLET-COUDRAY *et al.*, 2009). O estudo de LUO *et al.* (2012) observou um efeito hepatoprotetor do theaflavin, um polifenol isolado do chá preto por mecanismo antioxidantes, anti-inflamatório e anti-apoptótico.

O chá verde é rico em flavonoides e conhecido pelo seu alto poder antioxidante, o estudo de SAKATA *et al.* (2013) concluiu que a ingestão de 700 ml por dia de chá verde contendo > 1 g catequina por 12 semanas melhorou o conteúdo de gordura hepática e inflamação, reduzindo o estresse oxidativo em pacientes com NAFLD. Outro composto

rico em polifenóis, *Hibiscus sabdariffa*, foi estudado em humanos e reduziu a obesidade, gordura abdominal, ácidos graxos livres no soro e melhora na esteatose hepática (CHANG *et al.*, 2014). Dessa forma os polifenóis tem se destacado por estar em associados positivamente com a redução do risco de desordens metabólicas associadas com a esteatose hepática, como a redução lipogênese *de novo* e o aumento da β -oxidação de ácidos graxos (RODRIGUEZ-RAMIRO; VAUZOUR; MINIHANE, 2015).

Os flavonoides estão no centro das atenções para o tratamento da esteatose hepática pelo fato de seus efeitos positivos terem sido encontrados em metabolismo lipídico, resistência à insulina, inflamação e estresse oxidativo, as vias fisiopatológicas mais importantes na esteatose hepática (VAN DE WIER *et al.*, 2015).

2.2) A relação entre Frutose e a NAFLD

A frutose depois de absorvida é direcionada para a circulação portal e é captada pelo fígado, pelo transportador de glicose 2, GLUT2. No fígado, a maioria da frutose é metabolizada em frutose-1-fosfato pela frutocinase, que possui afinidade e velocidade máxima altas, características para o metabolismo eficiente da frutose nas células hepáticas (TAPPY&LÊ, 2010; NELSON&COX, 2011), permitindo continuar na via glicolítica ou direcionar a gliconeogênese (Figura 5).

A terceira enzima no metabolismo da frutose é a triose-cinase, atuando na fosforilação de gliceraldeído para gerar gliceraldeído-3-fosfato, também intermediário da via glicolítica e deste ponto em diante as vias de degradação da glicose e da frutose são qualitativamente semelhantes. A di-hidroxiacetona-fosfato fica em equilíbrio com glicerol-3-fosfato, que participa na esterificação de acil-CoA, na síntese de triacilgliceróis e fosfolipídios (MAYES, 1993; TAPPY&LÊ, 2010).

A di-hidroxiacetona fosfato produzida a partir de frutose pode ser convertida em piruvato e oxidar em CO₂ e H₂O, no ciclo do ácido cítrico ou é convertida em lactato que é liberado para a circulação sistêmica. Outra porção se direciona à síntese de ácidos graxos, fosfoglicerídeos e VLDL triacilgliceróis (MAYES, 1993; TAPPY&LÊ, 2010).

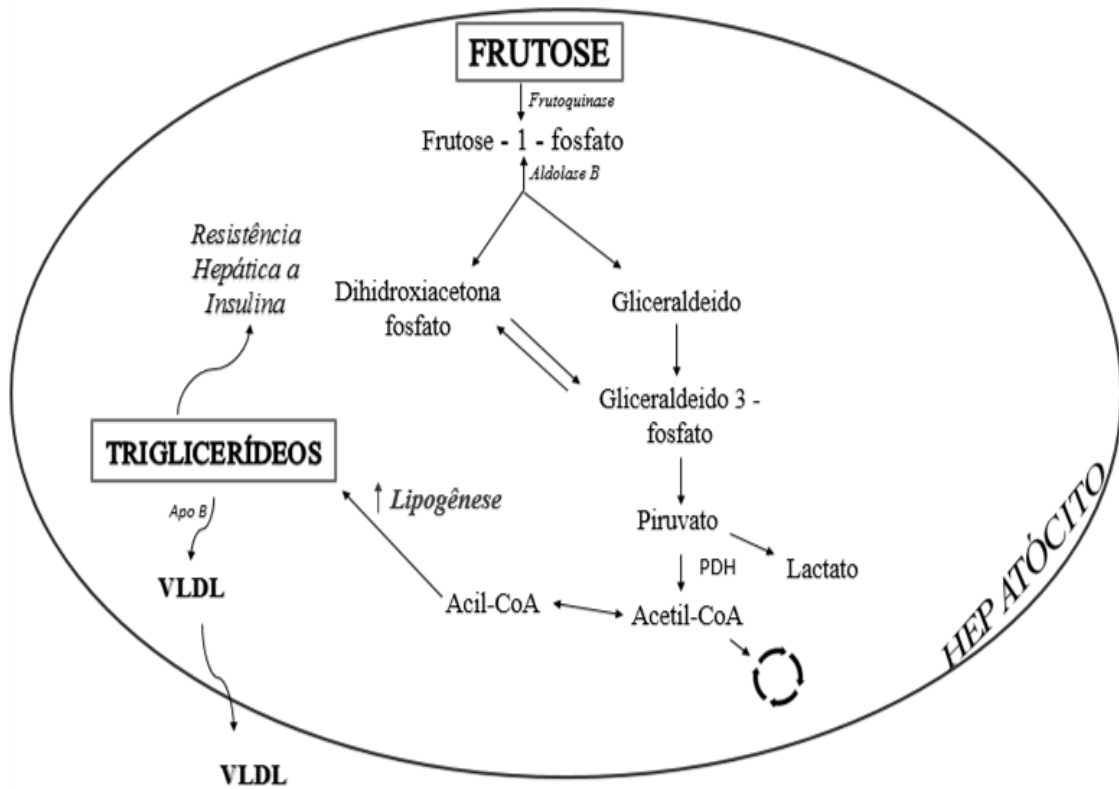


Figura 5. Metabolismo Hepático da frutose. A frutose é rapidamente metabolizada principalmente no fígado, fornecendo átomos de carbono induzindo a lipogênese, por ser uma fonte não regulada de acetil-CoA. Fornecendo um maior estímulo a síntese de triacilgliceróis, podendo conduzir ao seu acúmulo hepático e maior formação de partículas de VLDL, devido à maior disponibilidade de substrato e estabilidade da apolipoproteína B (Apo B). PDH: piruvato desidrogenase. Adaptado de Basciano et al. (2005).

Quando é ofertada uma dieta rica em frutose/sacarose, há uma redução da utilização e oxidação da glicose, acompanhada de um aumento na capacidade de metabolização de frutose, devido à inibição da glicocinase e estimulação da glicose-6-fosfatase. O fígado é importante na captação de frutose, por isso os efeitos da frutose no metabolismo lipídico são encontrados neste órgão que envolve as principais vias de oxidação de ácidos graxos, esterificação e lipogênese (MAYES, 1993). A maior produção de ácidos graxos a partir de frutose pode ocorrer devido a menor regulação da sua via metabólica quando comparada a via de metabolização da glicose, e o aumento da concentração de ácidos graxos contribui para a obesidade. A ingestão excessiva de frutose dietética acarreta o aumento de triacilgliceróis plasmático e da síntese *de novo* de lipídeos (TAPPY&LÊ, 2010; SUN&EMPIE, 2012).

A frutose tem sido utilizada como um importante adoçante nas últimas três décadas, período de aumento da prevalência da obesidade. Um crescente corpo de evidências científicas sugere que a ingestão dietética de frutose induz à NAFLD. Embora seja muito conhecido o metabolismo hepático da frutose, o mecanismo detalhado do *segundo hit* da NAFLD associado ao consumo de frutose não é bem elucidado (NOMURA&YAMANOUCHI, 2012). Mas sabe-se que a prevalência da NAFLD pode chegar a aproximadamente 70 a 80% nos obesos e diabéticos tipo 2 (WILLIAMS, K. *et al.*, 2012), os quais tem um maior risco de desenvolver fibrose e cirrose.

Um estudo duplo-cego, randomizado e controlado com adolescentes, comparou o consumo de bebidas ricas em glicose e em frutose, o qual demonstrou uma relação entre a redução do consumo de frutose por quatro semanas em adolescentes com esteatose hepática e a melhora na sensibilidade à insulina, inflamação, concentração de ácidos graxos livres no plasma, e oxidação de LDL colesterol, sugerindo que a redução do consumo de frutose reduz fatores importantes relacionados a doenças cardiovasculares (JIN *et al.*, 2014).

Modelos experimentais que estudam as consequências do consumo de frutose têm sido muito utilizados. Em 1989, um estudo avaliou ratos que se alimentaram com uma dieta contendo 35% frutose em substituição ao amido, por 4 semanas e resultou em menor sensibilidade à insulina, prejuízos hepáticos e renais, aumento de triacilgliceróis e glicose, mas não mostrou diferença de composição corporal ou peso (THORBURN *et al.*, 1989).

Um estudo que relaciona a NAFLD com a hipertrigliceridemia e com o consumo de carboidratos simples, realizou a análise do fígado de ratos *wistar* mantidos em jejum por 48h e realimentados por 24/48h com dieta contendo 63% de frutose e também um grupo que foi alimentado com essa dieta por 90 dias. Foi observado o comprometimento de 100% dos hepatócitos no grupo 24h. Nos animais realimentados por 48h observaram menor depósito de gordura hepática. Ficou demonstrado o aumento de gordura nos hepatócitos de acordo com o aumento da exposição à frutose (45, 60 e 90 dias) e que a esteatose comprometeu cerca de 20% dos hepatócitos, sendo considerada esteatose leve. Sugerindo que o excesso de frutose e sacarose leva a maior formação de acetil-CoA e formação de ácidos graxos armazenados como triacilgliceróis no fígado, facilitando o aparecimento de características da síndrome metabólica (SM). (CASTRO *et al.*, 2011).

Su *et al.*, (2014) investigaram a relação entre a disfunção mitocondrial e o estresse no retículo endoplasmático (RE) no início da esteatose hepática em camundongos machos

selvagens (WT) (C57BL/6J), PPAR α -*knockout* e em ratos com disfunção na sinalização de receptores ativados pelo proliferador peroxissoma (PPAR α) induzida (a disfunção é induzida por dieta) por dieta rica em frutose (60%). Os autores demonstraram que a dieta rica em frutose comprometeu a atividade funcional do metabolismo de enzimas envolvidas na oxidação mitocondrial de ácidos graxos e induziu estresse mitocondrial hepático. E, ainda evidenciou que a deficiência na sinalização PPAR α desempenha um papel importante no estresse em patologias decorrentes da ingestão de nutrientes lipogênicos, como a frutose. A supressão da sinalização de PPAR α por frutose está associada com a indução do estresse mitocondrial e no RE. A frutose é altamente lipogênica, não estimula a secreção de insulina, aumenta os níveis de lipídeos hepáticos e associa-se com o aumento da síntese e da secreção de VLDL. O acúmulo de apoB suprime o RE e a expressão do mRNA Ca²⁺ ATPase do retículo sarco/endoplasmático (SERCA), o que poderia ser um dos fatores que contribuem para a indução de estresse no RE. A restauração da sinalização do PPAR α , preveniu a indução de ambos os estresses e reduziu a biossíntese de apoB, melhorando a hiperlipidemia e a esteatose hepática associada ao consumo de frutose. Os resultados sugerem que as abordagens farmacêuticas destinadas a modular o PPAR podem ser benéficas no tratamento da síndrome metabólica associada à excessiva ingestão calórica advinda da frutose.

Outro estudo, utilizando dieta rica em frutose em ratos Sprague Dawley com o objetivo de investigar o efeito da carnosina sozinha e associada com α -tocoferol por 8 semanas também avaliou as defesas antioxidantes. A dieta induziu a esteatose macro e microvesicular, aumentou a atividade das enzimas hepáticas, promoveu resistência à insulina, inflamação e hipertrigliceridemia. Ainda nesse estudo, foram observados níveis elevados de lipoperóxidos e de glutathiona reduzida (GSH) no fígado, porém a atividade e expressão da superóxido dismutase (SOD) não apresentaram alterações. A carnosina sozinha diminuiu esteatose e a peroxidação lipídica, sem qualquer alteração no sistema antioxidante do fígado, mas quando associada ao α -tocoferol foi mais eficaz em diminuir a resistência à insulina, inflamação, esteatose hepática e o *status* pró-oxidante (GIRIŞ *et al.*, 2014).

Um estudo com ratos *Wistar* alimentados com 60% de frutose e tratados com S-metil-cisteína (SMC) mostrou que o tratamento de SMC reduziu o estresse oxidativo induzido pela dieta rica em frutose, indicado pela redução do malondialdeído, aumento da atividade da catalase e glutathiona peroxidase (GPx). Houve redução da concentração

de glutathione, diminuição da resistência à insulina, glicose, insulina e do índice HOMA-IR (do inglês homeostatic model assessment). Também foram reduzidos os níveis plasmáticos de TNF- α . Esses resultados indicam que a SMC possui potencial atividade antioxidante, permitindo prevenir ou reduzir o desenvolvimento do estresse oxidativo induzido pelo alto teor de frutose na dieta, pela inflamação e resistência à insulina (THOMAS *et al.*, 2015).

A NAFLD não tem terapia farmacológica comprovadamente eficaz, apesar de algumas já terem sido estudadas e necessitarem de maior atenção. A perda de peso seria o mais eficiente por atuar nos fatores desencadeadores da doença (SASS; CHANG; CHOPRA, 2005; LEWIS&MOHANTY, 2010; IBRAHIM; KELLEN; GEDDAWY, 2013). Terapias dietéticas têm sido estudadas nessa doença, com especial ênfase nas antocianinas, que vêm sendo consideradas promissoras na prevenção da doença, por atuar na redução da esteatose e de danos hepáticos, por meio da redução da lipogênese e estimulação da lipólise (VALENTI *et al.*, 2013). Pesquisas adicionais são necessárias para determinar os mecanismos subjacentes e possíveis abordagens terapêuticas para NAFLD induzida por frutose.

No ano de 2008 verificou-se que a administração de gravinol, uma proantocianidina encontrado em uvas melhorou as perturbações metabólicas induzidas por frutose, como a hipergliceridemia, hiperlipidemia, hipertensão, e o acúmulo de gordura no fígado, fato associado com a redução da concentração de TAG, justificado pela *down-regulation* de SREBP-1 e redução do estresse oxidativo pela regulação da sinalização de NF-kB (YOKOZAWA; KIM; CHO, 2008). A administração de um extrato rico em antocianinas advindo do arroz preto foi capaz de prevenir e melhorar a hiperlipidemia e resistência à insulina induzida por uma dieta rica em frutose (GUO *et al.*, 2007).

2.3) Açaí (*Euterpe oleraceae* Martius)

O açaí (*Euterpe oleraceae* Martius), é um fruto brasileiro e que por tempos foi exclusivo do Pará e alguns estados da Amazônia (Figura 6), são esféricos, na cor preto púrpura, com cerca de 1 a 2 cm de diâmetro, com um peso médio de 0,8 a 2,3g e contém uma única semente grande (DEL POZO-INSFRAN; BRENES; TALCOTT, 2004). O fruto é na maioria das vezes utilizado em consumo local e o palmito é exportado, sendo considerado como a principal fonte de palmito da agroindústria Brasileira, a polpa desse fruto pode resultar em produtos como sucos, geleias, licor e sorvetes (NOGUEIRA *et al.*, 1995). A preparação de bebidas do açaí do gênero *Euterpe*, que são exportadas para todo o mundo como bebida energética (DE LIMA YAMAGUCHI *et al.*, 2015).



Figura 6. Fotos dos frutos do açaizeiro. Retirada da palmeira para seleção inicial (A) e armazenamento (B). Fonte: EMBRAPA.

Após a extração da parte comestível do fruto (epicarpo e mesocarpo) e processamento do fruto, a polpa é comercializada e pode ser classificada de três formas: Tipo A (grosso ou especial), quando possui mais de 14% de sólidos totais e apresenta característica muito densa; Tipo B (médio ou regular), quando apresenta de 11 a 14% de sólidos totais e sua característica é densa; Tipo C (fino ou popular), quando apresenta de 8 a 11% de sólidos totais (caraterística pouco densa) (DE VASCONCELOS *et al.*, 2006).

No ano de 2011 a produção nacional de açaí foi de 215,4 mil toneladas, onde 50,8% vieram do estado do Pará, seguido do Amazonas com 41,5% e gerando um valor estimado de US\$ 700.000. (DE LIMA YAMAGUCHI *et al.*, 2015).

2.3.1) Composição química e compostos bioativos da polpa do açaí

O açaí tem tido grande destaque em estudos científicos pela sua alta capacidade antioxidante e tem sido considerado como uma “superfruta” por suas atribuições funcionais (DE LIMA YAMAGUCHI *et al.*, 2015). Em análise da composição do óleo do açaí adquirido por extração enzimática, foi confirmado que em sua composição predominam ácidos graxos insaturados (71%), ácidos graxos monoinsaturados (61%) e poli-insaturados (até 10%), destacando-se o oleico (Ômega 9), palmitoleico (monoinsaturados), palmítico (saturado), linoleico (poli-insaturado/ Ômega 6) (DO NASCIMENTO *et al.*, 2008; YUYAMA *et al.*, 2011). A proporção desses ácidos graxos presentes no fruto se mantém também na forma de suco, de diferentes procedências (YUYAMA *et al.*, 2011) e sua fração lipídica varia entre 42% a 52%, dependendo da origem vegetal (DO NASCIMENTO *et al.*, 2008). Além da composição lipídica, o fruto tem como característica nutricional fibras e minerais, como cálcio e potássio e uma fração proteica é superior ao leite e ovo e sua composição em aminoácidos é semelhante ao ovo (DE VASCONCELOS *et al.*, 2006).

A expansão do consumo do açaí ocorreu devido aos seus benefícios à saúde, associados à sua composição e grande capacidade antioxidante. Dessa forma, o fruto vem sendo considerado um alimento nutracêutico ou altamente funcional (Quadro 1), por sua composição em antocianinas, proantocianidina e outros flavonoides, que auxiliam no combate aos radicais livres no organismo (PORTINHO; ZIMMERMANN; BRUCK, 2012). Justificando a necessidade do consumo de alimentos com efeitos benéficos à saúde por auxiliarem na prevenção de doenças crônicas que possuem o estresse oxidativo como causa primária.

Quadro 1. Características físico-químicas do açaí.

Determinações	BRS Pará
Sólidos totais (g.100g ⁻¹)	10,44 ± 0,19
Cinzas (g.100g ⁻¹)	0,19 ± 0,01
Proteínas (g.100g ⁻¹ ms)	19,69 ± 0,23
Lipídeos (g.100g ⁻¹ ms)	40,92 ± 0,42
Sólidos solúveis totais (°Brix)	1,8 ± 0,06
pH	4,80 ± 0,02
Acidez total em ácido cítrico (g.100g ⁻¹)	0,09 ± 0,00
*Polifenóis totais (g.100g ⁻¹)	3964,60 ± 28,36
*Antocianinas totais (g.100g ⁻¹)	45,31 ± 0,82
*Atividade antioxidante (µM de trolox.g ⁻¹ amostra)	232,76 ± 0,00

*Polpa liofilizada ± desvio padrão. ms: matéria seca. Média de três determinações. (Adaptado de COHEN, K. D. O. *et al.* (2009).

As antocianinas são compostos hidrossolúveis responsáveis pela coloração vermelha escura dos frutos, têm sido estudadas por suas diversas propriedades farmacológicas e medicinais, com função antioxidante, anticarcinogênica, anti-inflamatória e antimicrobiana, prevenindo a oxidação de LDL, doenças cardiovasculares e doenças neurológicas (DA SILVA MENEZES; TORRES; SRUR, 2008).

As cianidinas são as principais antocianinas encontradas na polpa do açaí, a mais frequente é a cianidina-3-O-rutinosídeo e a cianidina-3-O-glucosídeo. Estão também presentes nesse fruto os ácidos fenólicos e outros flavonóis, potencializando suas propriedades. O processo de liofilização tem sido utilizado como uma excelente forma de conservação da polpa de açaí (DA SILVA MENEZES; TORRES; SRUR, 2008) e as antocianinas podem ser isoladas utilizando a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), como já realizado em polpa de açaí liofilizada, demonstrando a presença de cianidina-3-O-glucosídeo (35,29 ± 0,12 mg.100g⁻¹) e de cianidina-3-O-rutinosídeo (58,73 ± 0,22 mg.100g⁻¹) (GOUVÊA *et al.*, 2012).

2.3.2) Estudos utilizando o fruto do açaí

Sabendo do potencial antioxidante desse fruto e seus benefícios à saúde humana quando associados ao seu consumo diário, diferentes formas de estudo com esse fruto vêm sendo investigadas por todo o mundo.

O tratamento com açaí tem se destacado por melhorar a sensibilidade à insulina e os componentes relacionadas à síndrome metabólica e estudos demonstram a alta capacidade antioxidante da polpa de açaí e seu efeito hipocolesterolemiantes em modelo animal, supondo uma possível prevenção de doenças crônico-degenerativas (SOUZA, M. O. D. *et al.*, 2011).

Em um estudo piloto com humanos com sobrepeso, houve melhora na homeostase de glicose e marcadores séricos de risco metabólico, como insulina, colesterol total e colesterol LDL, com a ingestão de 200g de polpa de açaí por dia (UDANI *et al.*, 2011). Também em humanos saudáveis, demonstrou-se uma maior capacidade antioxidante do plasma quando houve o consumo de polpa e suco de açaí em uma única dose de 7mL/Kg de peso (MERTENS-TALCOTT *et al.*, 2008).

A suplementação de 2% de polpa de açaí na dieta em ratos hipercolesterolêmicos melhorou o perfil lipídico, por reduzir o colesterol total e não-HDL. O fruto também reduziu os níveis de proteína carbonilada e superóxido dismutase, indicando uma redução do estresse oxidativo (SOUZA, M. O. *et al.*, 2010). Os autores demonstraram aumento da expressão de genes que codificam para os transportadores ABCG5 e ABCG8, que estão envolvidos com a liberação do colesterol na bile, aumento na excreção fecal de colesterol e também aumento dos receptores de LDL colesterol, podendo ser esses os fatores responsáveis pela redução do colesterol sérico (DE SOUZA *et al.*, 2012).

Esse mesmo tipo de suplementação em ratos com diabetes induzido por estreptozima (STZ), exerceu um efeito protetor, diminuindo os níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico e aumentando os níveis de glutatona reduzida no fígado, melhorando assim o balanço oxidante/antioxidante (GUERRA *et al.*, 2011).

A administração do extrato aquoso do açaí na dose de 3 g/kg em camundongos demonstrou atenuar a esteatose induzida por dieta rica em gordura, devido a redução do teor de triacilgliceróis hepático e aumento na expressão de genes envolvidos na sinalização de adiponectina, incluindo o receptor tipo 2 de adiponectina (Adipo R2),

PPAR- α , e seu gene alvo, carnitina palmitoiltransferase (DA COSTA GUERRA *et al.*, 2015).

O fruto apresentou efeito na redução da peroxidação lipídica através do aumento de enzimas antioxidantes e inibiu a produção de citocinas pró-inflamatórias, TNF- α e IL-6, em camundongos hiperlipidêmicos, deficientes na apolipoproteína E e alimentados com dieta hiperlipídica (XIE *et al.*, 2011). Também foi demonstrada uma possível melhora na função renal, devido à redução da ureia sérica, creatinina sérica e ureia no sangue; melhora significativa dos marcadores de estresse oxidativo renal, como catalase, glutatona reduzida; e nas alterações histopatológicas renais, em ratos com insuficiência renal aguda induzida por glicerol (UNIS, 2014). Corroborando com os dados citados, o extrato de açaí melhorou a lesão renal aguda e isquêmica, pela supressão de níveis de ureia, creatinina, inibição da atividade de lactato desidrogenase (LDH) no soro e de conteúdos renais de malondialdeído (MDA), mieloperoxidase (MPO) e interferon-gama (IFN- γ) (EL MORSY; AHMED; AHMED, 2014).

Em modelos experimentais como *zebrafish*, utilizando o açaí, , houve redução da inflamação hepática, redução do fígado gorduroso e de ROS (KIM *et al.*, 2012). Em coelhos o mesmo fruto foi eficaz em atenuar o processo aterosclerótico e proporcionou efeito hipolipidêmico devido a um maior equilíbrio na síntese e absorção de esteróis (FEIO *et al.*, 2011). Além de também possuir ação anti-tumorigênica quando avaliando adenocarcinoma mamário e de colorretal (SILVA *et al.*, 2014).

Um estudo realizado com mulheres saudáveis, com idade entre 18 e 35 anos, eutróficas ou com sobrepeso, mostrou que a ingestão de 200g de polpa de açaí, modulada a expressão do fator de crescimento epidérmico e do inibidor do ativador do plasminogênio-1. Possivelmente o açaí atuou em parâmetros de composição corporal, dietética, clínica, bioquímica e inflamatória, levando a uma redistribuição e redimensionamento da gordura corporal e talvez aumento da gordura visceral (DE SOUSA PEREIRA *et al.*, 2015). Neste mesmo modelo, outros autores mostraram resultados benéficos da adição desse antioxidante na dieta, pois promoveu o aumento da atividade da catalase, capacidade antioxidante total e reduziu a produção de espécies reativas de oxigênio no soro. Além de reduzir a concentração sérica de proteína carbonilada e aumento dos grupos sulfidrilas totais no soro (BARBOSA, P. O. *et al.*, 2015)

Sabendo da participação do estresse oxidativo na patogênese da NAFLD e as desordens metabólicas que podem ocorrer devido ao excesso de frutose na dieta, pela primeira vez foi investigado os possíveis benefícios da suplementação com açaí liofilizado em ratos *Fischer* alimentados com uma dieta rica em frutose.

3) Objetivos

3.1) Objetivo Geral

Avaliar os danos hepáticos causados pelo excesso de frutose e possíveis benefícios da suplementação com açai em ratos da linhagem *Fischer*.

3.2) Objetivos Específicos

1. Determinar o conteúdo de polifenóis e capacidade antioxidante do açai liofilizado.
2. **Em ratos alimentados com dieta rica em frutose e suplementados com açai:**
 - 2.1 Avaliar a concentração de metabólitos e a atividade de enzimas séricas.
 - 2.2 Determinar o teor de lipídeos hepáticos e fecais.
 - 2.3 Determinar alterações nas defesas antioxidantes e marcadores do estresse oxidativo.
 - 2.4 Quantificar alterações teciduais no fígado por meio de técnicas morfométricas.

4) Métodos

4.1) Açaí liofilizado

Utilizou-se o açaí liofilizado cedido gentilmente, sem fins lucrativos, pela empresa Liotécnica Tecnologia em Alimentos (São Paulo-SP/Brasil).

Quadro 2. Composição do açaí liofilizado.

Informações nutricionais açaí liofilizado/100g	
Valor calórico (kcal)	541
Carboidratos (g)	5
Proteínas (g)	9,8
Gorduras totais (g)	54
Gorduras Saturadas (g)	15
Gorduras Monoinsaturadas (g)	33
Ácido Palmitoléico (g)	2,7
Ácido Oleico (Ômega 9) (g)	30,3
Gorduras Polinsaturadas (g)	5,1
Ácido Linoleico (Ômega 6) (g)	5,1
Gordura Trans (g)	0,0
Fibra Alimentar (g)	27
Sódio (mg)	64
Cálcio (mg)	345
Ferro (mg)	3,8
Vitamina A (UI)	<100
Vitamina C (mg)	<1
Vitamina E (mg)	12,7
Potássio (mg)	715
Magnésio (mg)	174

Informações cedidas pela empresa.

4.2) Caracterização da polpa de açaí liofilizada

4.2.1) Capacidade Antioxidante

A capacidade antioxidante do Açaí liofilizado foi determinado através da técnica de inibição do radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil), de acordo a metodologia de (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSET, 1995), que ocorre pela transferência de elétrons de um composto antioxidante para o radical DPPH em solução de metanol.

As determinações foram realizadas adicionando em tubos de ensaio a solução DPPH, dissolvidos em metanol 80% e a solução com o açaí em diferentes concentrações ou água destilada (controle). O Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico) foi utilizado como antioxidante de referência. Da mesma forma, adicionou-se em tubos de ensaio a solução de DPPH à solução Trolox em diferentes concentrações. Os tubos foram homogeneizados e armazenados no escuro por 30 minutos à temperatura ambiente. O espectrofotômetro foi zerado com metanol 80% e determinou-se as absorbâncias à 515 nm.

A atividade antioxidante foi determinada através da redução da absorbância do radical DPPH a 515 nm e o percentual de inibição foi determinado de acordo com a equação a seguir:

$$\% \text{ inibição do radical DPPH} = (A_{\text{controle } 515} - A_{\text{amostra } 515} / A_{\text{controle } 515}) \times 100$$

Onde:

$A_{\text{controle } 515}$ - absorbância da solução de DPPH sem a presença de antioxidantes obtida a 515 nm (controle);

$A_{\text{amostra } 515}$ - absorbância da amostra obtida a 515nm.

4.2.2) Conteúdo de Polifenóis

O conteúdo de polifenóis totais foi determinado pelo método de Folin-Ciocalteu (GEORGÉ *et al.*, 2005). Neste método o reagente de Folin-Ciocalteu, que é uma mistura dos ácidos fosfotungstico ($\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$) e fosfomolibdico ($\text{H}_3\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}$), é reduzido ao oxidar os compostos fenólicos, produzindo óxidos túngstico (W_8O_{23}) e molibdênico (Mo_8O_{23}) de cor azul que absorvem no comprimento de onda de 760 nm.

Inicialmente 100 µL da polpa de açaí foi diluída em 9,9 ml de água destilada. Em tubos de ensaio, o reagente de Folin diluído em água destilada (1:10) é adicionado à amostra diluída ou solução padrão de ácido gálico em diferentes concentrações para obtenção da curva de calibração. Para o branco utilizou-se água destilada. Após 2 minutos em temperatura ambiente, adicionou-se a solução de carbonato de sódio (7,5%) e misturou-se. Após incubação por 15 minutos a 50°C, a mistura é colocada em banho de gelo. As absorvâncias relativas ao branco foram determinadas a 760 nm.

Todas as análises foram realizadas em triplicatas. Foi construído um gráfico utilizando os valores de absorvância versus a concentração de ácido gálico. Após análise de regressão linear a obtenção da equação da reta, os valores de absorvância da amostra foram utilizados para o cálculo da concentração de polifenóis. O conteúdo foi expresso em mg de equivalentes de ácido gálico (GAE) por 100 g de açaí liofilizado.

4.3) Animais e delineamento experimental

Foram utilizados 30 ratos, *Fischer*, albinos, machos, com aproximadamente 80 dias de idade e cerca de 200 gramas, provenientes do Laboratório de Nutrição Experimental (LABNEX), da Escola de Nutrição, UFOP. Durante 8 semanas, os animais foram divididos em 2 grupos que receberam as dietas padrão AIN-93M (REEVES; NIELSEN; FAHEY JR, 1993) e AIN-93M acrescentada com 60% de frutose (SUZUKI *et al.*, 1997; FARAH *et al.*, 2006). Após 8 semanas de duração do experimento os animais foram redistribuídos em 3 grupos de acordo com o tratamento recebido e foi fornecida a dieta correspondente ao grupo os quais foram alocados aleatoriamente da seguinte forma: grupo controle (C) recebeu dieta padrão (AIN-93M); o grupo frutose (F) que recebeu a dieta rica em frutose (substituição de 60% para frutose) e o grupo frutose açaí (FA) recebeu a dieta rica em frutose (60% de frutose) com substituição de 2% (p/p) para açaí liofilizado.

Os animais foram alojados individualmente em gaiolas metálicas mantidas em ambiente arejado, com temperatura, umidade e ventilação controladas. Os animais receberam água filtrada e dieta *ad libitum* diferenciando-se apenas quanto ao tipo de dieta e foram distribuídos nos diferentes grupos de acordo com a massa corporal, de modo que não houvesse diferença significativa entre as médias de massa dos grupos e a cada dois dias foi realizada a manutenção

da dieta e da água nos comedouros e bebedouros. Os animais foram pesados semanalmente em balança Mettler PC 4000® para acompanhamento da massa corporal e a massa relativa foi calculada, pela seguinte equação: $PR = (\text{Peso úmido do órgão (g)} \times 100) / \text{massa corporal final (g)}$.

A ingestão alimentar foi avaliada na décima e décima primeira semana (10 dias), assim como a excreção fecal. Para realização do controle de ingestão e excreção, foram colocadas bandejas de papel sob cada uma das gaiolas. Diariamente foi realizada a troca da bandeja usada por uma limpa, a bandeja usada era colocada em estufa por 1 hora, a 90°C. Após esse período as bandejas eram raspadas, separando-se as fezes da dieta e estas foram pesados separadamente, somente as fezes foram armazenadas para posteriores análises. Concomitantemente a essa etapa, foi controlada também a quantidade de dieta oferecida para cada animal.

O coeficiente de eficiência alimentar (CEA) foi calculado pela razão entre o ganho de massa corporal e o consumo alimentar multiplicado por 100.

Os procedimentos experimentais realizados foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFOP (Protocolo nº 2013/46, que consta no anexo I deste trabalho). O delineamento experimental e coleta de material biológico para análise foram realizadas conforme a figura 7, a seguir:

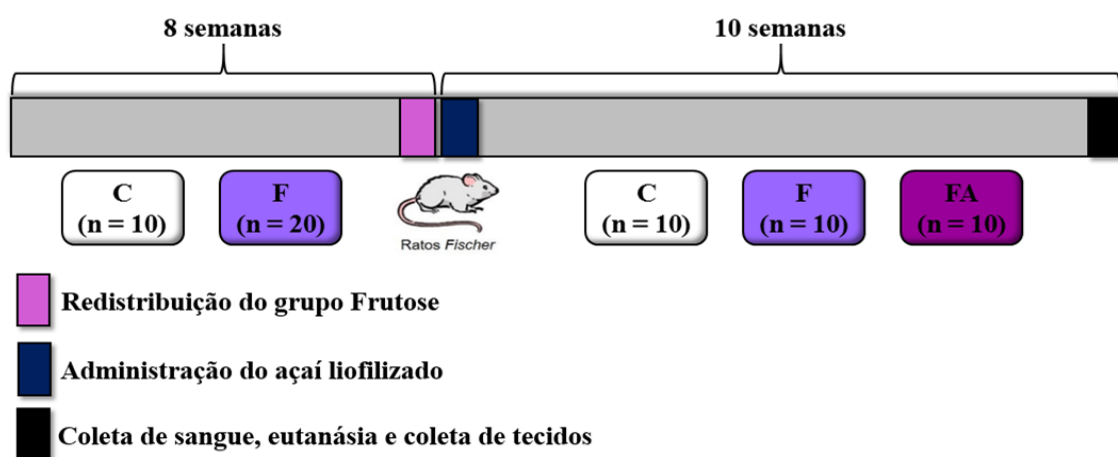


Figura 7. Representação esquemática do delineamento experimental.

Após as 18 semanas do período experimental os animais foram deixados em jejum por doze horas e estes foram anestesiados com isoflurano (Terrell™), o sangue desses animais foram coletados em tubos de polipropileno sem anticoagulante através da incisão dos vasos sanguíneos adjacentes ao plexo braquial até sangria total e posteriormente centrifugado a 10.000 rpm por 15 minutos para obtenção do soro. O mesmo foi guardado sob refrigeração (-80°C) para a realização das dosagens séricas. O órgão foi extraído, pesado e armazenado a -80°C para realização de análises. Uma parte foi fixada em solução de formol tamponado (10%) e o restante imediatamente armazenado em nitrogênio líquido para análises bioquímicas.

4.4) Dietas

Os grupos experimentais, Controle receberam dieta padrão AIN-93M, os grupos Frutose receberam dieta padrão AIN 93-M com 60% de frutose e o grupo Frutose + Açaí recebeu a dieta padrão com 60% de frutose e 2% de açaí (Tabela 03).

As dietas foram confeccionadas no Laboratório de Nutrição Experimental (LABNEX), acondicionadas em sacos plásticos e armazenadas em freezer a -20°C.

Quadro 3. Composição das dietas experimentais (g/1000g de dieta).

Composição	Dietas		
	C	F	FA
Colina	2,5	2,5	2,5
Metionina	2,5	2,5	2,5
Mistura de Vitaminas ¹	10	10	10
Mistura de Minerais ²	35	35	35
Celulose	50	50	50
Sacarose	100	100	100
Óleo de soja	40	40	40
Caseína	140	140	140
Amido de milho	620	20	0
Frutose*	0	600	600
Açaí liofilizado**	0	0	20
Total (g)	1000	1000	1000
V. E. (kcal/kg)	3800	3800	3828,2
DC	3,8	3,8	3,8282

V.E. (Valor energético); DC (Densidade calórica). C (Grupo controle/AIN93M); F (Grupo Frutose); FA (Grupo Frutose +Açaí). ¹ - *Mistura de Minerais* (expresso em g/kg da mistura): NaCl - 74/KI - 0,01/Citrato Tripotássico - 28/CaCO₃ - 357/MnCO₃ - 0,63/Citrato de Ferro - 6,06/ MgO - 24/ K₂SO₄ - 46,6/ KH₂PO₄ - 250 / ZnCO₃ - 1,65/CuCO₃ - 0,3/Na₂SeO₄ - 0,01/ (NH₄)₆MoO₂₄. 4 H₂O - 0,00795. Os sais foram adquiridos do Reagen, Rio de Janeiro, Brasil. ² - *Mistura de Vitaminas* (expresso em g/kg da mistura): Niacina - 3/ Pantotenato de Cálcio - 1,6/Piridoxina HCl - 0,7/Tiamina HCl - 0,6/Riboflavina - 0,6/Ácido Fólico - 0,2/Biotina - 0,02/Cianocobalamina - 2,5/Vitamina E (500 IU/g) - 15/Vitamina A (500.000 IU/g) - 0,8/Vitamina D (400.000 IU/g) - 0,25/Vitamina K - 0,075/Sacarose q.s.p. 1Kg. As vitaminas foram adquiridas da Merk, Darmstadt, Alemanha. *Frutose (Synth) **Açaí liofilizado (Liotécinca).

4.5) Dosagens de Metabólitos Séricos

Neste trabalho foram realizadas dosagens bioquímicas utilizando kits Labtest Diagnóstica S.A.: Glicose, Triacilgliceróis (TAG), Colesterol Total, Colesterol-HDL, Alanina Aminotransferase (ALT), Aspartato Aminotransferase (AST) e Fosfatase Alcalina. Os princípios dos métodos e seus respectivos protocolos estão descritos no Anexo II deste trabalho.

A determinação da concentração do colesterol não-HDL foi realizada da seguinte forma:

$$\text{Colesterol não-HDL (mg/dL)} = \text{Colesterol Total (mg/dL)} - \text{Colesterol HDL (mg/dL)}$$

4.6) Extração de gordura hepática

Os lipídeos totais foram extraídos de uma alíquota de 200mg de tecido hepático, estes foram homogeneizados em 3,800 µL de solução de clorofórmio/metanol (2:1, vol/vol). Em seguida foram adicionados 800 µL de metanol ao homogenato e então centrifugados a 3,000 x g por dez minutos. O sobrenadante foi transferido para outro tubo em seguida adicionado 1,6 µL de clorofórmio e 1,300 µL de NaCl a 0,73%, com posterior centrifugação a 3,000 x g por dez minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado por três vezes com solução de Folch (3% de clorofórmio, 48% de metanol, 47% de água e 2% de NaCl a 0,2%). Os extratos lipídicos foram secos em estufa semiaberta a 37 °C. Após a evaporação os tubos foram colocados em dessecador para esfriar e pesados novamente, para o cálculo da quantidade de gordura hepática, que foi obtida pela diferença entre o peso final (g) do tubo pelo peso inicial do tubo (g) multiplicado por 100 (FOLCH; LEES; SLOANE-STANLEY, 1957). Os extratos lipídicos foram ressuspensos com 1 mL de isopropanol e posteriormente utilizado para dosagem de colesterol total e triacilgliceróis através de Kit Labtest (Lagoa Santa, MG, Brasil).

4.7) Extração de gordura fecal

Os lipídeos totais foram extraídos de uma alíquota de 200mg de fezes maceradas, que foram homogeneizados em 1,900 µL de solução de clorofórmio/metanol (2:1, vol/vol). Em seguida foram adicionados 400 µL de metanol ao homogenato e então centrifugados a 3,000 x

g por dez minutos. O sobrenadante foi transferido para outro tubo em seguida adicionado 800 µL de clorofórmio e 640 µL de NaCl a 0,73%, com posterior centrifugação a 3,000 x g por dez minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado por três vezes com solução de Folch (3% de clorofórmio, 48% de metanol, 47% de água e 2% de NaCl a 0,2%). Os extratos lipídicos foram secos em estufa semiaberta a 37°C. Após a evaporação os tubos foram colocados em dessecador para esfriar e pesados novamente, para o cálculo da quantidade de gordura hepática, que foi obtida pela diferença entre o peso final (g) do tubo pelo peso inicial do tubo (g) multiplicado por 100 (FOLCH; LEES; SLOANE-STANLEY, 1957). Os extratos lipídicos foram ressuspensos com 300 µL de isopropanol e utilizados posteriormente para dosagem de colesterol total e triacilgliceróis através de Kit Labtest (Lagoa Santa, MG, Brasil).

4.8) Atividade Antioxidante e Marcadores do Estresse Oxidativo

4.8.1) Paraoxonase – Atividade Arilesterásica

A determinação da atividade arilesterásica da enzima paraoxonase, foi realizada usando fenilacetato como substrato, tendo como base a velocidade de hidrólise do fenilacetato (BEŁTOWSKI; WÓJCICKA; JAMROZ, 2001).

Em um tubo de ensaio adicionou-se tampão Tris-HCl, 9 mM e pH 8, contendo cloreto de cálcio e 5 µL de soro. O conteúdo do tubo foi misturado e então adicionou-se solução Tris-fenilacetato (1 µL de fenilacetato para cada 1500 µL de TrisHCL), 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.

Utilizamos a definição para atividade enzimática de acordo com (BEŁTOWSKI; WÓJCICKA; JAMROZ, 2001). 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 calculada pela equação:

$$U/mL = \frac{\text{Absorbância}}{\epsilon \times b} \times \frac{1000}{\text{Volume da amostra}}$$

Onde:

ϵ – Coeficiente de extinção molar;

b – caminho óptico, igual a 10 mm.

4.8.2) Paraoxonase –Atividade Paraoxonásica

A determinação da atividade paraoxonásica, foi realizada utilizando o paraoxon como substrato, tendo como base a velocidade de hidrólise deste, com a liberação do paranitrofenol por minuto (BEŁTOWSKI; WÓJCICKA; JAMROZ, 2001).

Inicialmente preparou-se uma solução contendo tampão glicina/NaOH, pH 10,5, que continha CaCl_2 e 2 μL de paraoxon. Em um tubo de polipropileno adicionou-se essa solução e 20 μL de soro. A solução foi homogeneizada e lida as absorbâncias 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.

Segundo descrito por (BEŁTOWSKI; WÓJCICKA; JAMROZ, 2001) 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 da enzima paraoxonase é expressa de acordo com a seguinte equação:

$$\text{U/mL} = \frac{\text{Absorbância}}{\epsilon \times l} \times \frac{1000.000}{\text{Volume da amostra}}$$

A absorbância utilizada é o delta obtido das três absorbâncias lidas (absorbância final - absorbância inicial / 2).

4.8.3) Grupos Sulfidrilas

Os radicais sulfidrilas representam todos os grupos tíois encontrados em proteínas, como a albumina e compostos de baixo peso molecular, como a glutatona. Estes grupos podem ser oxidados quando o estresse oxidativo está elevado. A determinação de grupos sulfidrilas totais foi realizada utilizando o reagente de Ellman (DNTB - Ácido 5,5'-Ditio-bis-2-

nitrobenzóico) (SEDLAK&LINDSAY, 1968), Os grupos tióis reagem com DNTB formando um complexo, que absorve luz à 412 nm.

Para cada amostra, adicionou-se metanol, Tris-HCl, 30mM e pH 8,2, DTNB e 40 μ L 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 foram feitos dois brancos, branco 1 que contém todos os reagentes exceto a amostra e o branco 2 que não contém amostra e DTNB, as absorbâncias obtidas de todas as amostras foram diminuídas da absorbância obtida para o branco 1. O branco 2 foi utilizado para zerar o aparelho.

Foi feito um gráfico expressando concentração do padrão de cisteína (Eixo Y) X Absorbância do padrão (Eixo X). Após análise de regressão linear da curva padrão obteve-se a equação da reta (Concentração = a*Absorbância + b) que foi utilizada para determinar a concentração de sulfidrilas totais e as concentrações foram expressas em μ mol/L.

4.8.4) Superóxido Dismutase

Para se obter a atividade da enzima superóxido dismutase foi utilizado *kit Superoxide Dismutase Assay Kit* adquirido da Cayman Chemical Company® (n° 706002; Lot 0450282). Este teste utiliza o sal de tetrazólio para detectar a geração de radicais superóxido pela xantina oxidase e hipoxantina. Uma unidade de SOD é definida como a quantidade de enzima necessária para exibir 50% de dismutação do radical superóxido. Somente a SOD-Cu/Zn será mensurada, como demonstrado no esquema do teste (figura 07).

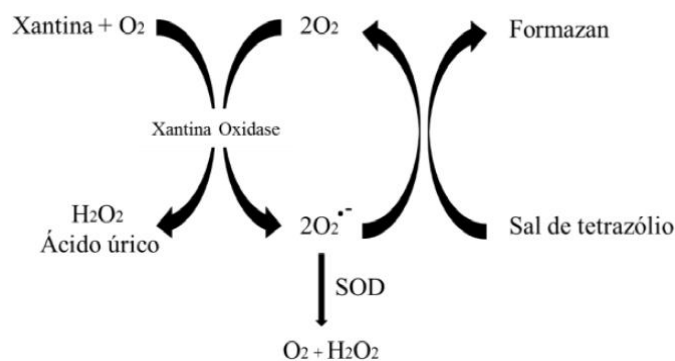


Figura 8. Esquema do Kit de Superóxido Dismutase.

Para a realização da dosagem foi utilizado 100mg de tecido hepático foram homogeneizados em 1 mL de tampão HEPES 20mM, pH 7,2, contendo 1mM de EGTA, 210 mM de manitol e 70mM de sacarose. O homogenato foi centrifugado a 1500g por 5 minutos a 4°C e o sobrenadante foi recolhido. Foi feita a determinação da atividade da SOD citosólica (Cu/Zn) e, para tanto, centrifugou-se o sobrenadante adquirido acima a 10000g por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante retirado desta centrifugação foi dado como amostra. A análise em si foi realizada de acordo com os procedimentos descritos pelo fabricante e a atividade da enzima foi expressa por U/mg de proteína.

4.8.5) Catalase

Determinação da atividade da enzima catalase, foi baseada na sua capacidade de hidrolisar o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em água e oxigênio molecular (AEBI, 1984), o método baseia-se na decomposição do H_2O_2 pela enzima observada durante 3 minutos por espectrofotometria a 240 nm, com luz U.V.

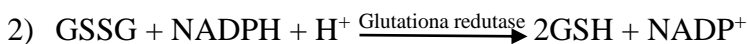
Foram utilizados 100 mg do fígado homogeneizado com 1mL de tampão fosfato 0,1 M, pH 7,2 e em seguida centrifugado por 10 minutos à 4°C. O sobrenadante foi retirado e usado como amostra biológica.

Em um tubo de polipropileno colocaram-se 50 μ L de tampão fosfato e 40 μ L de água destilada. Em seguida adicionou-se 10 μ L da amostra diluída e 900 μ L de H_2O_2 (10 mM), homogeneizou-se a solução, o espectrofotômetro foi zerado com H_2O_2 (10 mM) em 240 nm e determinaram-se as absorbâncias das amostras exatamente a cada minuto, durante três minutos. Água destilada foi utilizada como branco.

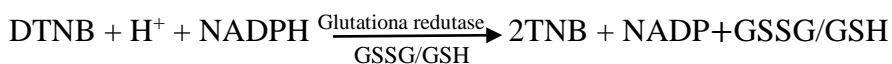
A atividade da catalase foi calculada utilizando o delta das absorbâncias durante os três minutos (absorbância final –absorbância inicial/2), o coeficiente de extinção molar do peróxido de hidrogênio ($\epsilon= 39,4 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$), 1U de catalase é equivalente a hidrólise de 1 μ mol de H_2O_2 . Os resultados foram expressos em nmoles/mg de proteína.

4.8.6) Concentração de glutathiona total, glutathiona oxidada e glutathiona reduzida

Os níveis de glutathiona total foram determinados em homogenato de fígado utilizando Kit Sigma CS0260 (St. Louis, MO., USA). Este tripeptídeo está presente nas células principalmente na sua forma reduzida (GSH) e é o principal tiol livre na maioria delas, estando envolvida em muitos processos biológicos, tais como a desintoxicação de xenobióticos, e remoção de hidroperóxidos. Sua oxidação leva a formação de glutathiona oxidada (GSSG). Este kit utiliza um método cinético para mensurar os níveis de glutathiona total (GSH+GSSG) em amostras biológicas, baseado na redução do DTNB (Ácido 5,5'-Ditio-bis-2-nitrobenzóico) a TNB e a GSSG formada é reciclada pela glutathiona redutase e NADPH, como nas reações que seguem abaixo:



A combinação das duas reações:



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

Em uma microplaca foram adicionados 10 µL da amostra, em seguida, 150 µL da mistura de trabalho composta por 95 mM de tampão fosfato, pH 7,0, 0,95 mM de EDTA, 48 µM de NADPH, 0,031 mg/mL de DTNB, 0,115 unidades/mL de glutathiona redutase e 0,24% de ácido sulfosalicílico. As amostras são então incubadas por 5 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, 50 µL de NADPH 0,16 mg/mL devem ser adicionados às mesmas e o cronômetro disparado. As absorbâncias das amostras serão lidas durante 5 minutos a cada minuto, no leitor de ELISA a 412 nm.

As absorbâncias de diluições seriadas de uma solução padrão de glutathiona reduzida são determinadas, para obtenção da curva de calibração, foi confeccionado um gráfico utilizando os pontos obtidos na curva padrão (correspondentes ao delta das absorbâncias). Após análise de regressão linear, foi determinado a equação da reta (Concentração = a*(delta das

absorbâncias) + b). Esta equação foi utilizada para determinar a concentração em nmols de glutathiona total em 10 μ L de amostra, e este valor convertido em nmols/mL.

Para realização da quantificação da glutathiona oxidada foram pipetados 100 μ L do referido sobrenadante, adicionados 2 μ L de vinilpiridina e posteriormente misturados no vórtex. O pH foi ajustado com trietanolamina (TEA) (2,5 μ L) para entre 6 e 7. As amostras foram incubadas à temperatura ambiente durante 60 minutos e o ensaio se deu da mesma maneira que para glutathiona total.

Para o cálculo da glutathiona reduzida foi realizada a subtração da glutathiona total da glutathiona oxidada e com a finalidade de avaliar o estado redox foi feita a divisão da glutathiona reduzida pela glutathiona oxidada.

4.8.7) Níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

A peroxidação lipídica foi determinada através do ensaio de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (BUEGE, 1978). A determinação da concentração de TBARS se baseia na capacidade do ácido tiobarbitúrico (TBA) em se ligar a lipídeos oxidados. Foram utilizados 100 mg do tecido hepático homogeneizados com 1mL de tampão Tris HCL 20 mM (pH 7,4) e em seguida o homogenato foi centrifugado por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi utilizado como amostra biológica. Misturou-se 300 μ L da amostra com ácido tricloroacético (TCA) (28% p/v em HCl 0,25N), TBA (1% em ácido acético 0,25M) e BHT (125mM em etanol), aquecido por 15 minutos a 95°C e em seguida colocado em um banho de gelo. O precipitado foi removido por centrifugação a 10000g por 15 minutos a 4°C, e a absorbância do sobrenadante foi determinada a 535 nm.

Foi utilizado um branco de amostra contendo todos os reagentes, exceto a amostra. Os níveis de TBARS foram calculados utilizando a equação da reta de malondialdeído (MDA) a partir de uma solução de malondialdeído (MDA) à 500 μ M. O resultado foi expresso em nmoles/mg de proteínas.

4.8.8) Proteína Carbonilada

A oxidação de proteína por espécies reativas de oxigênio leva à formação de derivados carbonílicos. Estes podem ser mensurados por métodos sensíveis, particularmente aqueles que utilizam o 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH). O DNPH 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).

Neste procedimento foram homogeneizados 400 mg de tecido hepático em 2 mL de tampão fosfato 50 mM, pH 6.7, contendo EDTA 1 mM. Seguiu-se a centrifugação a 10000g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante retirado foi empregado como amostra. Para cada amostra utilizou-se dois tubos de polipropileno, um foi denominado de Amostra (A) e outro de Branco (B). Transferiu-se a amostra para os tubos A e B, em seguida adicionou-se ácido tricloroacético (TCA) 10%, posteriormente foi realizada uma centrifugação à 10.000g por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante foi descartado. Após essa etapa adicionou-se no tubo A DNPH (2,4-dinitrofenilhidrazina) e ao tubo B, HCl 2 mM. Ambos foram mantidos no escuro à temperatura ambiente por um período de 30 minutos foram misturados no vórtex. No passo seguinte foi adicionado 1 mL de TCA 10% em cada tubo e centrifugados à 5.000g por 10 minutos a 4°C. Depois de centrifugados, os sobrenadantes foram descartados e o precipitado foi lavado duas vezes com 1 mL da mistura etanol/acetato de etila, misturados no vórtex e novamente centrifugados. Ao final das lavagens o precipitado foi dissolvido em 500 µL de SDS 6%, misturados no vórtex e centrifugados à 10.000g por 10 minutos à 4°C. O sobrenadante foi utilizado para leitura em espectrofotômetro à 370 nm.

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

$$\text{Proteína Carbonílica (nmol/mL)} = \frac{CA}{22000} \times \frac{1000.000}{0,5}$$

Onde CA é a subtração da absorbância do tubo A (amostra) pela absorbância do tubo C (controle). Os resultados foram expressos nmoles/mg de proteína.

4.8.9) Proteínas totais em tecidos

A concentração de proteínas totais no fígado foi determinada pelo método de (LOWRY *et al.*, 1951). O princípio do método baseia-se na redução do reagente de Folin Ciocalteu, ao reagir com aminoácidos aromáticos, catalisada por íons cobre, em meio alcalino, formando uma coloração azul. Inicialmente foram preparadas as soluções de trabalho conforme descrito abaixo:

Reagente A: Foram dissolvidos 0,25 g de sulfato de cobre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) e 0,5 g de citrato de sódio em 100 mL de água destilada.

Reagente B: Foram dissolvidos 5 g de carbonato de sódio e 1 g de hidróxido de sódio em 250 mL de água destilada.

Reagente C: Em 50 mL de reagente B foram adicionados 1 mL de reagente A.

Reagente D: Em 1 mL de reagente de Folin foram adicionados 1 mL água destilada.

Para a realização do ensaio, 10 μL do sobrenadante do homogenato de tecido hepático foram diluídos em 90 μL de água destilada.

Em tubos de polipropileno foram adicionados 100 μL da amostra diluída ou soluções padrão de albumina e água destilada (branco). Em seguida foi adicionado o reagente C. Os tubos foram agitados no vórtex e incubados a temperatura ambiente por 15 minutos. Posteriormente foi adicionado o reagente D em todos os tubos, misturou-se vigorosamente e após 30 minutos de incubação no escuro as absorbâncias das amostras foram determinadas a 660 nm. Diluições seriadas de uma solução de concentração conhecida de albumina bovina sérica foram utilizadas para a construção da curva de calibração. Após análise de regressão linear, foi determinada a equação da reta, esta foi utilizada para determinar a concentração de proteínas totais no homogenato hepático.

4.9) Processamento histológico e análise morfométrica

O fígado foi cortado transversalmente fixado em formol tamponado (10%). Em seguida, o material foi processado em série decrescente de alcoóis e embocado em parafina. Os cortes histológicos de 4µm foram obtidos em micrótomo semiautomático, fixados em lâminas de vidro previamente limpas e desengorduradas. A técnica de coloração utilizada para esse experimento foi Hematoxilina & Eosina (H&E), que separa estruturas ácidas e básicas.

As quantificações morfométricas foram realizadas no Laboratório Multiusuários do Núcleo de Pesquisa em Ciências Biológicas (NUPEB) da UFOP. Para capturar as fotomicrografias foi utilizado microscópio Leica DM5000 acoplado à câmera Digital. Para avaliar os estágios da esteatose foi utilizado um sistema de pontuação semiquantitativo em 10 campos (ALBANO *et al.*, 2005). A esteatose foi classificada como grau 1: < 33%, grau 2: de 33% à 66% e grau 3: mais de 66%, de acordo com a porcentagem de campos analisados ocupados com vesículas lipídicas (BRUNT *et al.*, 1999).

As análises de volume celular das macrovesículas observadas pelas fotomicrografias foram realizadas com auxílio do *Software Image J*. A quantificação de núcleos foi realizada nas mesmas fotomicrografias com o auxílio do software Leica QWin Plus Versão 3.0, que identifica os núcleos dos hepatócitos de acordo com a coloração selecionada.

5) Análises Estatísticas

Inicialmente os dados foram submetidos ao teste de normalidade de Kolmogorov Smirnov. Aqueles cuja distribuição foi paramétrica tiveram seus resultados apresentados como média ± desvio-padrão e tratados pelo teste One-Way ANOVA e pelo pós-teste de Tukey, afim de averiguar a diferença entre os grupos. Os dados com distribuição não paramétrica foram expressos como mediana, intervalo interquartil e avaliados pelo teste de Kruskal-Wallis seguido pelo pós-teste de Dunn's. Para análise do massa corporal inicial e massa corporal na oitava semana foi utilizado teste t student. As diferenças foram consideradas significativas para $p < 0,05$. Para realização das análises foi utilizado o software GraphPad Prisma versão 6.00 compatível com o sistema operacional Windows.

6) Resultados

6.1) Conteúdo de polifenóis e capacidade antioxidante do açaí liofilizado

Para demonstrar a presença de compostos bioativos no açaí liofilizado quantificou-se o conteúdo de polifenóis e sua capacidade antioxidante demonstrando um alto conteúdo desses compostos (Tabela 1).

Tabela 1. Conteúdo de polifenóis e capacidade antioxidante açaí liofilizado.

Compostos	Concentração
Polifenóis totais (mg GAE/g)	1619,08 ± 43,72
TEAC (µM/g)	104,80 ± 0,44

GAE: Equivalentes de Ácido Gálico

TEAC: Capacidade antioxidante equivalente do trolox (µM de equivalentes de Trolox/g).

6.2) Resultados do experimento *in vivo*

Ao final da primeira etapa do experimento, quando havia dois grupos C e F, não foram observadas diferenças entre as massas corporais nos mesmos grupos (Figura 9).

Ao final das 18 semanas experimentais não houve diferença entre os grupos com relação ao consumo alimentar, ganho de peso, coeficiente de eficiência alimentar e excreção fecal (Tabela 2).

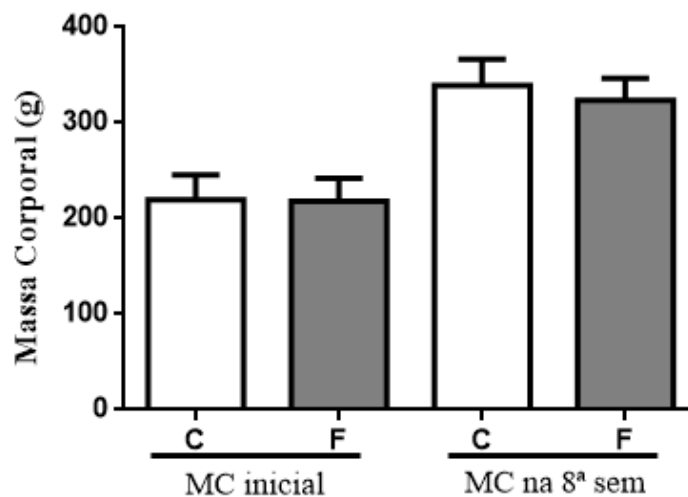


Figura 9. Massa corporal inicial e massa corporal na 8ª semana, de ratos alimentados com dieta controle e frutose. Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão (n=20). Teste t.

Tabela 2. Consumo alimentar, ganho de massa, eficiência alimentar e excreção fecal nos grupos experimentais.

Variáveis	Grupos experimentais		
	C	F	FA
Consumo alimentar (g/dia)	19,8 \pm 1,2	19,5 \pm 0,8	19,3 \pm 0,9
Ganho de massa (g)	171,3 \pm 30,1	153,5 \pm 19,5	157,4 \pm 31,4
Coefficiente de eficiência alimentar (%)	7,7 \pm 3,5	7,7 \pm 2,4	5,8 \pm 2,9
Excreção fecal (g/sem) ¹	5,1/4,2-6,3	5,0/4,1-6,6	5,7/4,5-5,8

Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão ou ¹mediana e intervalos interquartil (n=10). Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística. Teste One-Way ANOVA, com pós teste de Tukey.

6.3) Massa relativa do fígado, glicose e enzimas hepáticas

Foi demonstrado que a dieta rica em frutose aumentou o peso desse órgão (F e FA) (Figura 10).

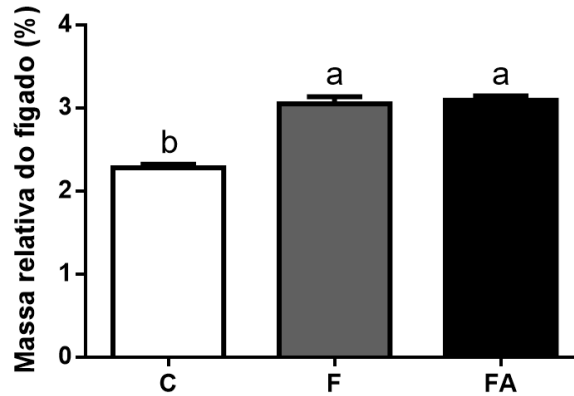


Figura 10. Massa relativa do fígado (%p/p) de ratos alimentados com dieta controle, frutose, e frutose tratado com açaí. Letras diferentes indicam diferença estatística. Dados expressos em média \pm DP, teste One-Way ANOVA, com pós teste de Tukey.

Os níveis de glicose nos grupos alimentados com frutose (F e FA) foram maiores, comparado com o grupo C. As atividades de ALT e fosfatase alcalina no grupo F também apresentaram aumentadas comparadas aos demais grupos. O grupo FA apresentou uma na atividade de ALT e uma redução parcial na atividade de fosfatase alcalina. Não houve diferença quanto a atividade de AST entre os grupos experimentais. (Tabela 03).

Tabela 3. Concentração de glicose e atividade de enzimas no soro dos grupos experimentais.

Variáveis	Grupos experimentais		
	C	F	FA
Glicose (mg/dL)	96,9 \pm 15,6 ^b	137,1 \pm 29,2 ^a	138,8 \pm 13,9 ^a
AST (U/mL)	52,9 \pm 9,9	54,4 \pm 12,1	54,3 \pm 12,7
ALT (U/mL)	16,9 \pm 2,7 ^{a,b}	20,1 \pm 5,4 ^a	15,7 \pm 1,9 ^b
Fosfatase alcalina (U/L)	79,3 \pm 19,0 ^b	107,2 \pm 18,9 ^a	98,9 \pm 22,9 ^{a,b}

AST: Aspartato-aminotransferase; ALT: Alanina-aminotranferase. Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão (n=10). Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística. Teste One-Way ANOVA, com pós teste de Tukey.

6.4) Perfil lipídico sérico, hepático e fecal

A dieta rica em frutose promoveu alteração no perfil lipídico dos animais, aumentando os níveis de TAG sérico, hepático e fecal. O grupo FA teve os níveis de CT hepático superior aos demais grupos. Em relação às frações séricas de colesterol total, colesterol HDL e não-HDL, não foram apresentadas diferenças significativas entre os grupos (Tabela 4 e 5).

Tabela 4. Perfil lipídico sérico nos grupos experimentais.

Variáveis	Grupos experimentais		
	C	F	FA
TAG (mg/dL)	116,6 ± 34,5 ^b	180,4 ± 36,1 ^a	185,8 ± 50,0 ^a
CT (mg/dL)	115,0 ± 17,6	103,4 ± 14,9	104,4 ± 16,7
HDL (mg/dL)	79,9 ± 13,9	70,3 ± 10,6	69,7 ± 12,6
Não-HDL (mg/dL)*	35,0 ± 7,2	33,0 ± 6,6	34,8 ± 6,5

TAG: Triacilgliceróis; CT: Colesterol Total. *Não-HDL: VLDL + LDL. Os dados são apresentados como média ± desvio padrão (n=10). Letras diferentes na mesma linha indicam diferenças estatísticas. Teste One-Way ANOVA, com pós teste de Tukey.

Tabela 5. Perfil lipídico hepático e fecal nos grupos experimentais.

Variáveis	Grupos experimentais		
	C	F	FA
Colesterol (mg/g de fígado)	0,9 ± 0,3 ^b	1,2 ± 0,4 ^b	1,7 ± 0,5 ^a
TAG (mg/g de fígado)¹	8,5/7,4-10,7 ^b	16,0/11,9-29,4 ^a	14,8/8,9-31,4 ^a
Colesterol (mg/g de fezes)	5,2 ± 1,6	5,5 ± 0,6	6,7 ± 1,5
TAG (mg/g de fezes)	2,7 ± 0,9 ^b	5,0 ± 2,5 ^a	5,6 ± 1,8 ^a

CT: Colesterol Total; TAG: Triacilgliceróis. Os dados são apresentados como média ± desvio padrão ou ¹mediana e intervalos interquartil (n=10). Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística. Teste One-Way ANOVA, com pós teste de Tukey.

6.5) Defesas Antioxidantes e Marcadores do Estresse Oxidativo

A enzima antioxidante paraoxonase possui dois substratos: fenilacetato e paraoxon. O grupo que recebeu a dieta rica em frutose aumentou a atividade da enzima para ambos substratos. O grupo FA apresentou atividade da enzima parcialmente reduzida, para o substrato paraoxon. Em relação a concentração de sulfidrilas totais não foram apresentadas diferenças estatísticas entre os grupos (Tabela 6).

Tabela 6. Atividade sérica da enzima paraoxonase para os substratos fenilacetato e paraoxon e concentração sérica de sulfidrilas totais nos grupos experimentais.

Variáveis	Grupos experimentais		
	C	F	FA
PON – fenilacetato ($\mu\text{mol} / \text{mL}$)	16,4 \pm 3,4 ^b	20,4 \pm 1,5 ^a	21,9 \pm 3,4 ^a
PON – paraoxon (nmol/mL)	147,6 \pm 17,9 ^b	167,3 \pm 14,9 ^a	152,8 \pm 16,2 ^{a,b}
ST (nmoles/L)	223,5 \pm 66,3	219,0 \pm 30,9	228,2 \pm 30,2

ST: Sulfidrilas totais. Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão (n=10). Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística. Teste One-Way ANOVA, com pós teste de Tukey.

A enzima superóxido dismutase (SOD) apresentou atividade reduzida nos grupos F e FA. Em contrapartida o nível da enzima catalase (CAT) foi superior no grupo F e no grupo FA houve uma redução parcial dessa enzima comparado ao grupo C (Tabela 7).

Tabela 7. Atividade hepática de Catalase e Superóxido dismutase nos grupos experimentais.

Variáveis	Grupos experimentais		
	C	F	FA
SOD (U/mg de proteína)	0,11 \pm 0,03 ^a	0,06 \pm 0,03 ^b	0,08 \pm 0,03 ^b
CAT (U/mg de proteína)	83,2 \pm 11,0 ^b	99,6 \pm 16,5 ^a	85,1 \pm 13,6 ^{a,b}

SOD: Superóxido dismutase; CAT: Catalase; Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão (n=10). Letras diferentes sobrescritas na mesma linha indicam diferença estatística. Teste One-Way ANOVA, com pós teste de Tukey.

A concentração de glutathiona oxidada (GSSG) para o grupo F não foi alterado e o tratamento com açai reduziu este parâmetro comparado ao controle. A relação entre os níveis de glutathiona reduzida e oxidada (GSH/GSSG) foi superior no grupo FA. As concentrações de glutathiona total e glutathiona reduzida não apresentaram diferença estatística entre os grupos experimentais. (Figura 11).

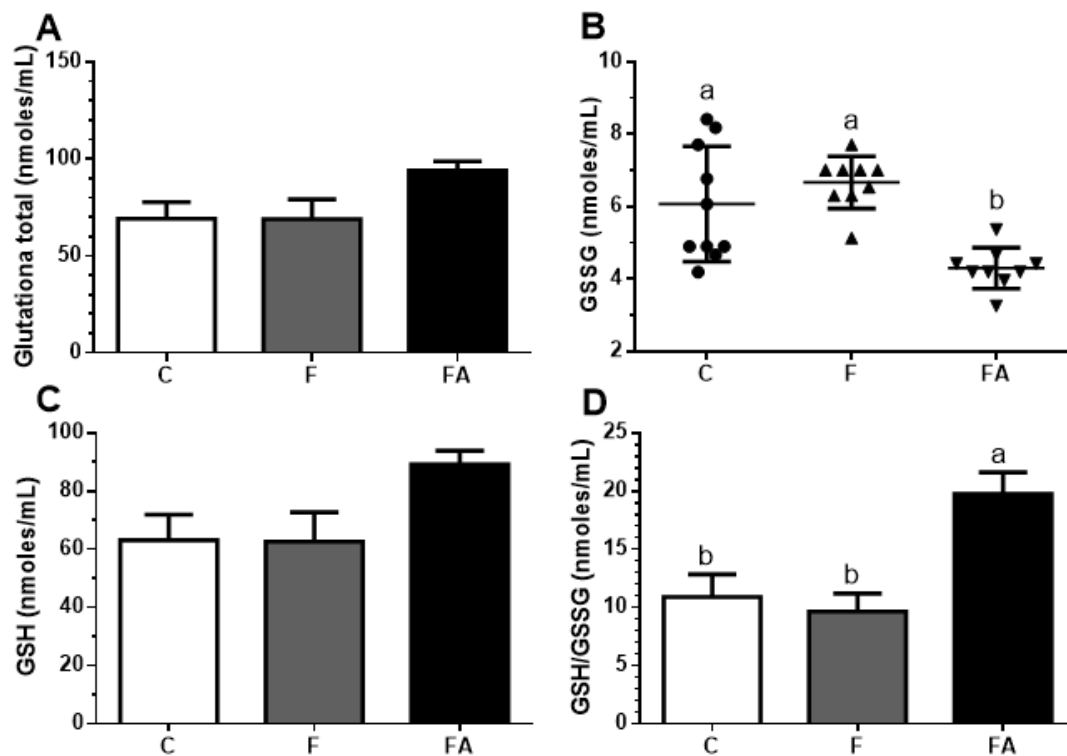


Figura 11. Concentração de glutathiona, A: Glutathiona Total, B: Glutathiona Oxidada, C: Glutathiona reduzida e D: Relação glutathiona reduzida por glutathiona oxidada, de ratos alimentados com dieta controle, frutose e frutose tratados com açai. Letras diferentes indicam diferença estatística. Análise one-way ANOVA com pós-teste de Tukey para os dados paramétricos, expressos por média \pm DP, e kruskal-wallis com pós teste de Dunns para os dados não paramétricos expressos em mediana e intervalo interquartis.

A dieta rica em frutose reduziu os níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Não foram encontradas diferenças estatísticas quanto ao nível de PC (Tabela 8).

Tabela 8. Concentração hepática de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e proteína carbonilada (PC) nos grupos experimentais.

Variáveis	Grupos experimentais		
	C	F	FA
TBARS (nmoles/ mg de proteína)	1,1 ± 0,2 ^a	0,8 ± 0,2 ^b	0,7 ± 0,2 ^b
PC (nmoles/ mg de proteína)	1,8 ± 0,5	1,9 ± 0,4	1,9 ± 0,3

PC: Proteína Carbonilada. Os dados são apresentados como média ± desvio padrão (n=10). Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística. Teste One-Way ANOVA, com pós teste de Tukey.

6.6) Análise histológica e morfometria

De acordo com a análise histológica realizada após o processamento e coloração com H&E, observamos que o grupo F apresentou um elevado grau de macrovesículas e microvesículas lipídicas, um maior volume de macrovesículas esteatóticas e uma menor quantificação de núcleos hepáticos, para o grupo FA houve redução parcial de microvesículas. Tais características encontram-se representadas na figura 12.

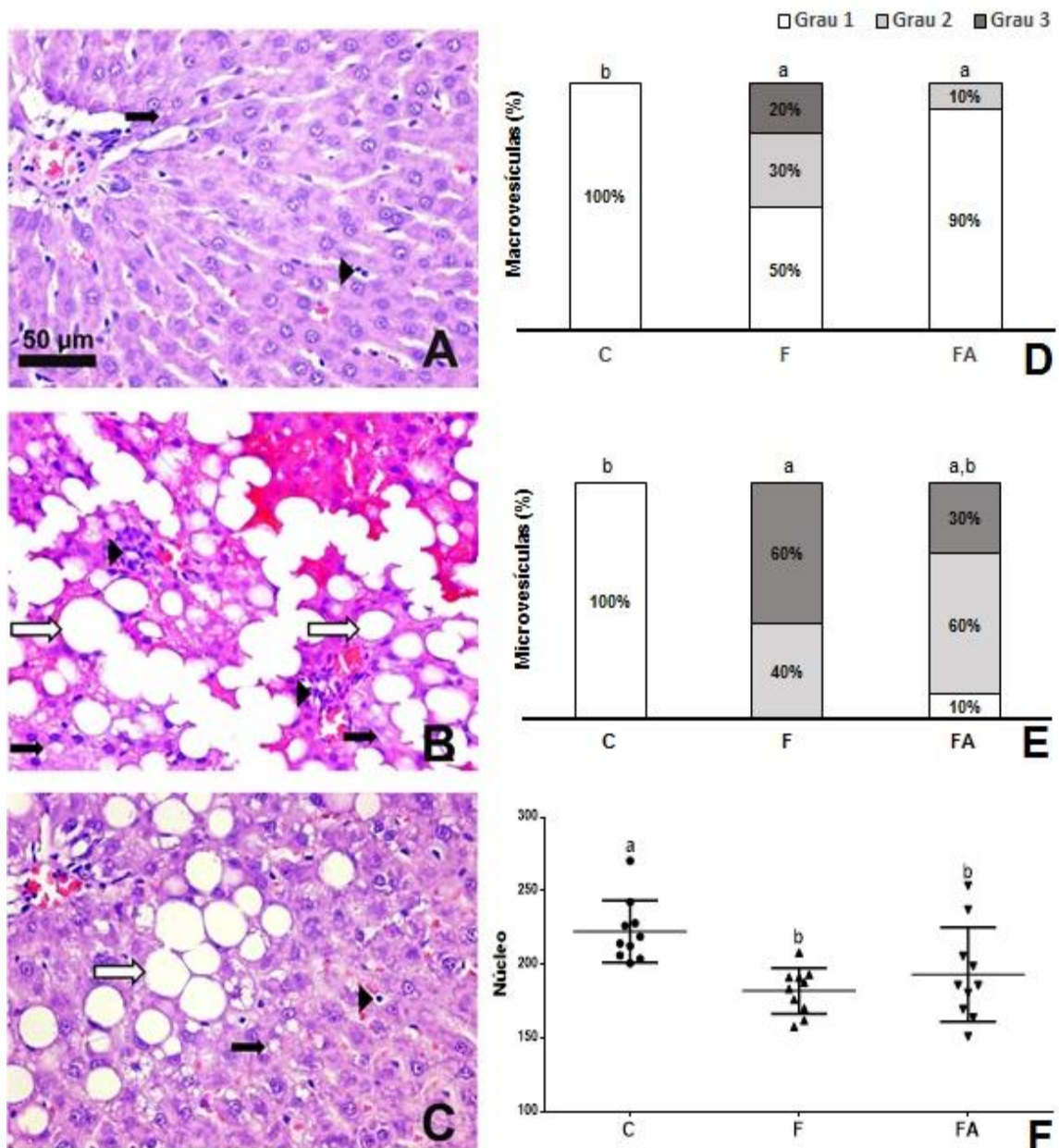


Figura 12. Micrografias histológicas de tecidos hepático, coradas com H&E. Paineis A, B e C apresentam normalidade, esteatose macrovesicular e esteatose microvesicular, respectivamente. Paineis D, E e F, classificação do grau de esteatose macrovesicular, esteatose microvesicular e quantificação de núcleos do hepatócito entre os grupos experimentais. Seta branca indica esteatose macrovesicular; Seta preta indica esteatose microvesicular; Cabeça de seta indica núcleo de hepatócitos. Classificação da esteatose: grau 1: < 33%, grau 2: de 33% à 66% e grau 3: mais de 66%. Letras diferentes representam diferenças estatísticas pelo teste de Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn's. Barra = 50 μ m, as imagens foram fotografadas com aumento de 400x.

Em análise do volume das macrovesículas e na relação de células macrovesiculares por campo analisado, os grupos F e FA aumentaram esses parâmetros comparado ao grupo C (Figura 13).

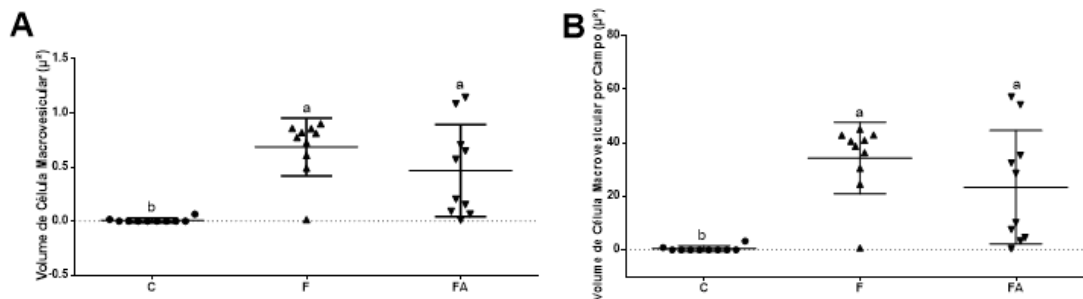


Figura 13. A: Quantificação do volume das macrovesículas e B: volume de célula macrovesicular por campo (μ^2), de ratos alimentados com dieta controle, frutose e frutose tratados com açúcar. Dados apresentados em mediana, mínimos e máximos. Letras diferentes representam diferenças estatísticas pelo teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn's.

6) Discussão

Estudos têm evidenciado uma associação entre o conteúdo dietético e o desenvolvimento da esteatose hepática, demonstrando a ligação entre os hábitos alimentares e a doença hepática gordurosa não alcoólica (NAFLD). Alguns estudos utilizando componentes presentes nos alimentos relatam que estes amenizam a progressão dessa patologia, quando introduzidos na dieta. As antocianinas estão presentes em muitos alimentos, o motivo de se destacarem como opção terapêutica e o açaí (*Euterpe Oleracea* Matius) é um fruto que apresenta alto teor desses composto e por isso demonstra ação protetora na esteatose (DE SOUZA *et al.*, 2012; DA COSTA GUERRA *et al.*, 2015).

Polpas de açaí comerciais e não comerciais têm sido avaliadas e demonstram ter diferentes concentrações de antocianinas (LICHTENTHÄLER *et al.*, 2005). Os fatores climáticos, a forma de extração e as diferentes classificações das polpas de acordo com o teor de sólidos totais pode interferir na concentração desses compostos (DE VASCONCELOS *et al.*, 2006), fato que pode justificar a variação entre diferentes polpas quanto aos valores da capacidade antioxidante equivalente ao trolox (TEAC) e polifenóis apresentados na literatura (SANTOS, G. M. D. *et al.*, 2008).

O processamento de frutas para reduzir o seu teor de umidade tem sido muito utilizado como forma de prolongar a durabilidade, ofertar diferentes formas de aquisição e facilitar o acesso ao consumo. Uma técnica muito utilizada para a conservação das propriedades químicas e organolépticas é a liofilização (SANTOS, J. *et al.*, 2012).

Neste estudo utilizamos açaí liofilizado que apresentou conteúdo de fenólicos totais de 1619,03 mg GAE/g. Este valor é superior ao apresentado por polpas de açaí, que variam entre 182,95 e 598,55 (SANTOS, G. M. D. *et al.*, 2008) e ao extrato do fruto fresco, que apresentou 31,20mg GAE/g de polifenóis (KANG *et al.*, 2012).

Uma correlação positiva entre o conteúdo de polifenóis e a capacidade antioxidantes de frutas e vegetais é descrito por LI *et al.* (2009). A capacidade antioxidante equivalente ao trolox (TEAC) total do açaí liofilizado foi de 104,80 μ M/g, o que corresponde a valores superiores de polpas de açaí comerciais já estudadas que apresentaram entre 10,21 e 52,47 μ M/g (SANTOS, G. M. D. *et al.*, 2008) e inferior a valor encontrado no extrato do fruto fresco, 133,4 μ M (KANG *et al.*, 2012).

Após a avaliação da capacidade antioxidante do açaí liofilizado *in vitro*, e diante da obtenção de resultados que demonstram alto potencial antioxidante do mesmo,

avaliamos pela primeira vez o efeito do açaí sobre a esteatose hepática induzida por dieta isocalórica rica em frutose em ratos *Fischer*.

Em nosso estudo, adicionamos 2% do liofilizado à dieta consumida pelos ratos, estudos prévios utilizando 2% de peso seco da polpa congelada de açaí, demonstrou ter efeito hipocolesterolemizante e de proteção contra desordens metabólicas, como a esteatose hepática (DE SOUZA *et al.*, 2012; DA COSTA GUERRA *et al.*, 2015).

O açaí liofilizado utilizado apresentou 541 kcal/100g e em sua fração lipídica com predomínio de ácidos graxo monoinsaturados, dados que corroboram o descrito por DA SILVA MENEZES; TORRES; SRUR (2008). De acordo com o seu valor calórico, a adição de 2% de açaí liofilizado na dieta dos animais alimentados com frutose correspondeu a uma adição de 28,3 kcal/kg, o que não altera de forma significativa o conteúdo calórico ofertado nessas condições descritas.

Alterações na composição dietética têm sido utilizada para estudo de desordens metabólicas em modelo animal, uma delas é a substituição de 60% do amido, carboidrato predominante em dietas experimentais por outro carboidrato, a frutose, demonstrando a ocorrência de alterações metabólicas em grupos experimentais com oferta dessa dieta isocalórica (DE CASTRO *et al.*, 2013; DOĞRU-ABBASOĞLU *et al.*, 2014). Este modelo experimental tem sido considerado o melhor para a indução da esteatohepatite não alcoólica (NASH) (KAWASAKI *et al.*, 2009).

Em nosso trabalho a oferta de uma dieta com 60% de frutose não resultou em maior consumo alimentar, ganho de massa corporal e excreção fecal, o que corrobora o relatado de outros estudos onde não há aumento da massa corporal. Entretanto, o grupo de animais que recebeu essa dieta apresentou maior massa relativa do fígado, explicado pelo fato de que esse monossacarídeo é primariamente metabolizado no fígado, resultando em um aumento da lipogênese *de novo*, de enzimas lipogênicas e da gliconeogênese (KAWASAKI *et al.*, 2009; DE CASTRO *et al.*, 2013; DOĞRU-ABBASOĞLU *et al.*, 2014).

Outra característica desse modelo experimental é o aumento nos níveis de glicose, triacilgliceróis (TAG) e enzimas hepáticas (CHAN *et al.*, 2013; DE CASTRO *et al.*, 2013; DOĞRU-ABBASOĞLU *et al.*, 2014). Em nosso estudo a aspartato transaminase (AST) não se apresentou alterada no grupo F, o que pode ser justificado por essa enzima ser predominantemente encontrada na mitocôndria dos hepatócitos, indicando maior dano hepático quando comparada a alanina transaminase (ALT), uma enzima encontrada na

região citoplasmática relacionada com leve dano hepático. A alteração da enzima fosfatase alcalina também é característica de alteração da função hepática, por estar ligada ao transporte de lipídeos no intestino (MOTTA, 2000). A redução dos níveis séricos de ALT com a oferta de açaí tem sido relatada como um indicador do efeito hepatoprotetor desse fruto na atenuação da esteatose hepática (DE SOUZA *et al.*, 2010; KIM *et al.*, 2012). O efeito hepatoprotetor têm sido pela ativação de genes relacionados à adiponectina, envolvendo o receptor de adiponectina 2, PPAR- α e carnitina palmitoil transferase, o que levaria à melhora da sensibilidade à insulina e aumento da oxidação de ácidos graxos (DA COSTA GUERRA *et al.*, 2015).

O aumento nos níveis de TAG, mas não de CT foi recorrente no grupo F quando analisado no soro e fígado, corroborando os dados da literatura (DOĞRU-ABBASOĞLU *et al.*, 2014) e ainda houve aumento de TAG fecal, também encontrado por HEYMAN *et al.* (2014). Supreendentemente observamos um aumento nos níveis de CT no grupo FA. Fato que nos levou a criar a hipótese de que a oferta do açaí na forma liofilizada, onde todos os componentes encontram-se concentrados, compreendendo os antioxidantes e também a fração lipídica, pode ter favorecido este aumento no grupo FA. O estudo de HEYMAN *et al.* (2014) adicionou uma dose 10 vezes superior ao nosso estudo, ou seja 20% de açaí liofilizado em uma dieta hiperlipídica e observou o aumento de TAG hepático e fecal e CT fecal, sugerindo que uma grande dose não potencializa os efeitos benéficos, ainda pode causar complicações adicionais.

O estudo de RENAUD *et al.* (2014), mostrou que ratos alimentados com um dieta rica em frutose possuem o RNAm e a proteína da enzima CYP7A1 reduzidos no fígado, fato que limita a velocidade de conversão do colesterol em ácidos biliares. Sugerindo que a oferta crônica de frutose conduz a um maior acúmulo de colesterol hepático, levando ao desenvolvimento da esteatose e sugere também que a supressão da CYP7A1 seja o mecanismo pelo qual a dieta rica em frutose resulte no acúmulo de colesterol hepático.

As alterações hepáticas encontradas em nosso estudo e descritas até o momento foram confirmadas pela análise histológica onde houve uma prevalência de macrovesículas e microvesículas gordurosas no grupo F, características de NAFLD, como estabelecido pela literatura (YOKOZAWA; KIM; CHO, 2008; KAWASAKI *et al.*, 2009; DE CASTRO *et al.*, 2013; DOĞRU-ABBASOĞLU *et al.*, 2014). A adição de açaí no grupo FA reduziu parcialmente a presença de microvesículas, sendo que 60% corresponderam ao estágio 2, segundo a classificação de ALBANO *et al.* (2005), uma

importante alteração decorrente da adição do açaí, pois esse tipo vesícula gordurosa é considerada uma manifestação mais grave da esteatose. Quanto aos níveis de esteatose macrovesicular o açaí (FA) culminou na presença de 90% de esteatose grau 1, contra 50% na ausência de açaí (F). Essa melhora na classificação dos estágios de esteatose macrovesicular também foi observada no estudo de DA COSTA GUERRA *et al.* (2015), onde foi induzida esteatose hepática com dieta hiperlipídica associada a 2% de extrato aquoso de açaí. O excesso de lipídeos no fígado pode desencadear um processo inflamatório, mas a presença de macrovesículas lipídicas pode sobrepor aos núcleos hepáticos acarretando uma redução na quantificação de núcleos hepáticos, o que foi verificado nos grupos F e FA.

A NAFLD em sua patogênese pode envolver múltiplos *hits*, onde o estresse oxidativo desempenha um papel central e se correlaciona com estados patológicos e severidade, como morte celular e dano tecidual (PETTA; MURATORE; CRAXI, 2009; ROLO; TEODORO; PALMEIRA, 2012). Para averiguar se esse modelo experimental desencadeou alguma alteração no balanço pró e antioxidante fizemos análises relacionadas com as defesas antioxidantes e danos oxidativos em macromoléculas.

A enzima paraxonase 1 (PON1) é sintetizada pelo fígado e secretada no plasma e tem sido estudada por atuar prevenindo o estresse oxidativo e o processo inflamatório. Esta isoforma exibe atividade paraoxonásica e arilesterásica; A PON1 está presente no soro, fortemente associada com a apolipoproteína A-I (ApoA-I) integrante da HDL, a qual possui a função de proteger a LDL contra modificações oxidativas e também de reduzir o acúmulo de produtos da peroxidação lipídica (COSTA *et al.*, 2005). A atividade paraoxonásica e arilesterásica da PON foi aumentada no grupo F e a adição de açaí reduziu parcialmente a atividade paraoxonásica no grupo FA. DE SOUZA *et al.* (2010), obteve redução de ambas as atividades da PON quando ofertada uma dieta hipercolesterolêmica e aumento das mesmas quando administrado 2% de polpa de açaí na dieta. Permanece a ser esclarecido o porquê na situação de estresse causado por dieta hiperlipídica a atividade da enzima reduz, mas em outra situação de estresse (dieta rica em frutose) a atividade da enzima aumenta.

Um dos marcadores para avaliação do dano oxidativo é a concentração de sulfidrilas totais, o estresse oxidativo aumenta a concentração dos grupos tióis oxidados, que podem ser encontrados na glutatona e proteínas (WISDOM *et al.*, 1991) e no plasma podem funcionar como sequestradores fisiológicos de radicais livres (QUINLAN;

EVANS; GUTTERIDGE, 1994). A determinação da concentração de proteínas carboniladas também é utilizada como medida na avaliação de danos oxidativos, pois as proteínas são os maiores alvos de ROS, muitas vezes o dano oxidativo é irreversível e possui um grande impacto fisiológico, podendo gerar perda de função (DAVIES *et al.*, 1999). Não foram encontradas diferenças entre os grupos experimentais quanto a essas análises em nosso estudo, possivelmente pelo maior período experimental comparado aos demais estudo encontrados na literatura.

A peroxidação lipídica também é um marcador utilizado para monitorar o *status* oxidativo celular e ao analisar os produtos gerados durante os processos oxidativos. Nesse estudo os grupos F e FA apresentaram menores concentrações quando comparados com o controle, este resultado inesperado pode ter ocorrido devido a inespecificidade da técnica ou pelo fato do período experimental ter sido maior a outros estudos prévios, como o de DOĞRU-ABBASOĞLU *et al.* (2014).

Para avaliar o estado redox dos grupos experimentais foi avaliado a concentração de glutathione total, oxidada e reduzida, onde não houve alteração nos níveis de glutathione total, como descrito por DOĞRU-ABBASOĞLU *et al.* (2014) e também de glutathione reduzida (GSH). A adição de açaí promoveu uma redução nos níveis de GSSG e um aumento na relação GSH/GSSG, mostrando sua atuação benéfica na principal enzima de detoxificação endógena. Insultos crônicos têm demonstrado aumentar os níveis de GSSG e a aplicação da razão: GSH/GSSG é usada para mensurar o estado oxidativo, informando casos de doenças (FITZPATRICK; JONES; BROWN, 2012). O estudo de FAURE *et al.* (1997), utilizando ratos wistar ofertou uma dieta com 56% de frutose durante 6 semana e observou um aumento nos níveis de GSSG e na razão GSH/GSSG. A diferença dos nossos resultados com o da literatura pode ser devido ao maior período experimental, modelo e idade dos animais utilizados em nosso estudo.

Enzimas antioxidantes auxiliam no sequestro de espécies reativas de oxigênio. A SOD age no ânion superóxido convertendo-o em peróxido de hidrogênio e água, estes últimos são neutralizados pela ação da catalase e glutathione peroxidase à água e oxigênio (GILL&TUTEJA, 2010). A atividade da SOD reduzida no grupo F e a de CAT aumentada demonstra um sinergismo entre as enzimas para combater a produção de radicais livres. Isto é descrito na literatura como uma forma primária de combater os radicais livres (SHYAMALA; VENUKUMAR; LATHA, 2003). A atividade da CAT reduziu parcialmente no grupo FA, justificado pelo fato dos flavonoides reduzirem a atividade de

enzimas antioxidantes, principalmente da catalase, devido à uma melhora no estado redox (BREINHOLT; LAURIDSEN; DRAGSTED, 1999).

A administração de 60% de frutose por 8 semanas, reduziu os níveis de glutathione total, glutathione peroxidase, catalase e SOD e a administração de extrato de semente de uva aumentou os níveis de SOD, glutathione total e catalase, demonstrando a ação dos compostos fenólicos presentes no extrato em proteger as enzimas antioxidantes, além das já descritas propriedades atuantes na redução da glicemia, insulina e adiponectina, que sensibiliza seus receptores para ativação da AMPK e PPAR, afetando a ativação da absorção de glicose e redução da resistência à insulina (SUWANNAPHET *et al.*, 2010), estimulando a mesma via descrita por DA COSTA GUERRA *et al.* (2015) utilizando polpa de açaí. Uma provável justificativa para a diferença dos resultados encontrados em nosso estudo é que o maior tempo de experimento tenha permitido uma adaptação do organismo ao stress oxidativo, acarretando o aumentando das defesas antioxidantes.

O estudo de FEILLET-COUDRAY *et al.* (2009) utilizando extrato de polifenol do vinho da região de Languedoc-Roussillon (França) e uma dieta rica em sacarose e lipídeos, destacando que a dieta levou a disfunção do sistema mitocondrial, por alterar as subunidades da cadeia respiratória, mas sem modificar o sistema da NADPH oxidase, e que esta disfunção provavelmente desempenhou um papel importante no desenvolvimento do estresse oxidativo e desenvolvimento da NAFLD. O extrato apresentou alguns efeitos protetores contra a esteatose hepática e contra o estresse oxidativo, por prevenir a formação de produtos finais de glicosilação avançados (AGEs) plasmáticos, os quais são resultantes da ligação não enzimática entre carboidratos e proteínas, carboidratos e lipídeos, de forma irreversível, intimamente relacionada com a hiperglicemia e que se depositam no plasma e nos tecidos. O extrato também impediu parcialmente a oxidação de lipídeos e proteínas no fígado, prevenindo assim a esteatose, sugerindo agir diretamente sobre ROS, pela aceitação de um elétron dos grupos fenólicos, ou estimulando os sistemas de defesa endógenos e que tal efeito pode ser atribuído a ativação da AMPK, que regula a oxidação e a síntese de lipídeos, e inativação da ACC (acetil-CoA carboxilase). Sugestão relacionada a descrição de HOU *et al.* (2008) que polifenóis estimulam a AMPK e evitam o acúmulo de lipídios pela ativação da SIRT1, evitando o comprometimento da fosforilação da AMPK e os seus alvos, ACC, em elevação expressão de FAS (ácido graxo sintase) e acúmulo de lipídios em células de hepatócitos humanos (HepG2) expostas a alto teor de glucose.

A administração do morin, um flavonoide isolado de erva chinesa, associado a oferta de 10% de frutose na água, mostrou regular o metabolismo lipídico e aliviar o acúmulo de lipídeos hepáticos induzido por frutose, inibiu a ativação de NF-κB, reduzindo as lesões do fígado, melhorando a inflamação e inibiu o comprometimento da sinalização de insulina e leptina, por inibir a via de sinalização da esfingosina kinase 1 (WANG *et al.*, 2013).

Um estudo duplo-cego com diabéticos tipo II investigou o efeito protetivo dos polifenóis da uva na resistência à insulina induzida por frutose. Para isso suplementou pacientes com 2g/dia de polifenol da uva por 9 semanas e nos últimos 6 dias receberam dose 3g/kg/dia de frutose, a suplementação preveniu os efeitos deletérios da frutose, prevenindo o estresse oxidativo, disfunção mitocondrial e IR hepática, limitando a produção de ROS (HOKAYEM *et al.*, 2013).

A adição de açaí liofilizado provocou algumas alterações que podem contribuir para investigações na prevenção da NAFLD e suas complicações. São necessárias outras análises para explicar com precisão a sua atuação nesse modelo experimental proposto, sugerindo assim investigar genes relacionados com a biossíntese do colesterol, oxidação e síntese de lipídeos e também o sistema da NADPH oxidase.

7) Conclusão

A dieta com substituição de amido por frutose foi eficaz em desencadear a NAFLD, apesar de ambas as dietas apresentarem o mesmo valor calórico houve o acúmulo de lipídeos no fígado, alteração das enzimas marcadoras de dano hepático e antioxidantes. Neste modelo não foram encontradas diferenças nos marcadores de dano oxidativo.

O açaí atenuou o desenvolvimento da esteatose hepática, demonstrado pela análise histológica, da enzima alanina aminotransferase, aumentou a atividade da catalase, reduziu GSSG e aumentou a concentração GSH/GSSG. Nossos dados não permitem afirmar que isso se deva ao seu papel antioxidante e permanece a ser esclarecido se este efeito protetor é consequência da ação do açaí sobre o metabolismo de lipídeos como já demonstrado em modelos de dieta hiperlipídica.

Referências Bibliográficas

ABREU, I. C. M. E. D.; GUERRA, J. F. D. C.; PEREIRA, R. R.; SILVA, M.; LIMA, W. G. D.; SILVA, M. E.; PEDROSA, M. L. Hypercholesterolemic diet induces hepatic steatosis and alterations in mRNA expression of NADPH oxidase in rat livers. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 58, n. 3, p. 251-259, 2014.

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

ALBANO, E.; MOTTARAN, E.; VIDALI, M.; REALE, E.; SAKSENA, S.; OCCHINO, G.; BURT, A.; DAY, C. Immune response towards lipid peroxidation products as a predictor of progression of non-alcoholic fatty liver disease to advanced fibrosis. **Gut**, v. 54, n. 7, p. 987-993, 2005.

ANSTEE, Q. M.; GOLDIN, R. D. Mouse models in non-alcoholic fatty liver disease and steatohepatitis research. **International journal of experimental pathology**, v. 87, n. 1, p. 1-16, 2006.

BABIOR, B. M. NADPH oxidase: an update. **Blood**, v. 93, n. 5, p. 1464-1476, 1999.

BARBOSA, K. B. F.; COSTA, N. M. B.; ALFENAS, R. D. C. G.; PAULA, S. O. D.; MININ, V. P. R.; BRESSAN, J. Estresse oxidativo: avaliação de marcadores. **Nutrire Rev. Soc. Bras. Aliment. Nutr**, v. 33, n. 2, p. 111-128, 2008.

BARBOSA, K. B. F.; COSTA, N. M. B.; ALFENAS, R. D. C. G.; DE PAULA, S. O.; MININ, V. P. R.; BRESSAN, J. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios; Oxidative stress: concept, implications and modulating factors. **Rev. nutr**, v. 23, n. 4, p. 629-643, 2010.

BARBOSA, P. O.; PALA, D.; SILVA, C. T.; DE SOUZA, M. O.; DO AMARAL, J. F.; VIEIRA, R. A. L.; DE FREITAS FOLLY, G. A.; VOLP, A. C. P.; DE FREITAS, R. N. Açai (*Euterpe oleracea* Mart.) pulp dietary intake improves cellular antioxidant enzymes and biomarkers of serum in healthy women. **Nutrition**, v., n., p., 2015.

BARREIROS, R. C.; BOSSOLAN, G.; TRINDADE, C. E. P. Fructose in humans: metabolic effects, clinical utilization, and associated inherent errors. **Revista de Nutrição**, v. 18, n. 3, p. 377-389, 2005.

BELTOWSKI, J.; WÓJCICKA, G.; JAMROZ, A. Differential effect of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors on plasma paraoxonase 1 activity in the rat. **Polish journal of pharmacology**, v. 54, n. 6, p. 661-671, 2001.

BERTELLI, A. A.; DAS, D. K. Grapes, wines, resveratrol, and heart health. **Journal of cardiovascular pharmacology**, v. 54, n. 6, p. 468-476, 2009.

BOGDANOVA, K.; PO CZATKOVA, H.; UHERKOVA, L.; RIEGROVA, D.; RYPKA, M.; FEHER, J.; MARCHESINI, G.; VESELY, J. Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD)-a novel common aspect of the metabolic syndrome. **BIOMEDICAL PAPERS-PALACKY UNIVERSITY IN OLOMOUC**, v. 150, n. 1, p. 101, 2006.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT-Food Science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25-30, 1995.

BREINHOLT, V.; LAURIDSEN, S.; DRAGSTED, L. Differential effects of dietary flavonoids on drug metabolizing and antioxidant enzymes in female rat. **Xenobiotica**, v. 29, n. 12, p. 1227-1240, 1999.

BROWNING, J. D.; HORTON, J. D. Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury. **Journal of Clinical Investigation**, v. 114, n. 2, p. 147, 2004.

BRUNT, E. M.; JANNEY, C. G.; DI BISCEGLIE, A. M.; NEUSCHWANDER-TETRI, B. A.; BACON, B. R. Nonalcoholic steatohepatitis: a proposal for grading and staging the histological lesions. **The American journal of gastroenterology**, v. 94, n. 9, p. 2467-2474, 1999.

BRUNT, E. M.; TINIAKOS, D. G. Histopathology of nonalcoholic fatty liver disease. **World journal of gastroenterology: WJG**, v. 16, n. 42, p. 5286, 2010.

BUEGE, J. A. Microsomal lipid peroxidation. **Method Enzymol.**, v. 52, n., p. 302-310, 1978.

CASTRO, G. S.; CARDOSO, J. F.; VANNUCCHI, H.; ZUCOLOTO, S.; JORDÃO, A. A. Fructose and NAFLD: metabolic implications and models of induction in rats. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 26, n., p. 45-50, 2011.

CHAN, S. M.; SUN, R.-Q.; ZENG, X.-Y.; CHOONG, Z.-H.; WANG, H.; WATT, M. J.; YE, J.-M. Activation of PPAR α ameliorates hepatic insulin resistance and steatosis in high fructose-fed mice despite increased endoplasmic reticulum stress. **Diabetes**, v. 62, n. 6, p. 2095-2105, 2013.

CHANG, H.-C.; PENG, C.-H.; YEH, D.-M.; KAO, E.-S.; WANG, C.-J. Hibiscus sabdariffa extract inhibits obesity and fat accumulation, and improves liver steatosis in humans. **Food & function**, v. 5, n. 4, p. 734-739, 2014.

CHANNON, K.; GUZIK, T. MECHANISMS OF SUPEROXIDE PRODUCTION IN HUMAN BLOOD. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 53, n. 4, p. 515-524, 2002.

COHEN, J. C.; HORTON, J. D.; HOBBS, H. H. Human fatty liver disease: old questions and new insights. **Science**, v. 332, n. 6037, p. 1519-1523, 2011.

COHEN, K. D. O.; MATTIETTO, R. D. A.; CHISTÉ, R. C.; OLIVEIRA, M. D. S. P. D. Caracterização físico-química e funcional da polpa extraída de frutos da cultivar de açaizeiro BRS Pará. v., n., p., 2009.

COSTA, L. G.; VITALONE, A.; COLE, T. B.; FURLONG, C. E. Modulation of paraoxonase (PON1) activity. **Biochemical pharmacology**, v. 69, n. 4, p. 541-550, 2005.

COUTINHO, I.; COELHO, R.; KATAOKA, V.; HONDA, N.; SILVA, J.; VILEGAS, W.; CARDOSO, C. Determination of phenolic compounds and evaluation of antioxidant capacity of Campomanesia adamantium leaves. **Eclética Química**, v. 33, n. 4, p. 53-60, 2008.

D'AUTRÉAUX, B.; TOLEDANO, M. B. ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 8, n. 10, p. 813-824, 2007.

DA COSTA GUERRA, J. F.; DE BRITO MAGALHÃES, C. L.; COSTA, D. C.; SILVA, M. E.; PEDROSA, M. L. Dietary açai modulates ROS production by neutrophils and gene expression of liver antioxidant enzymes in rats. **Journal of clinical biochemistry and nutrition**, v. 49, n. 3, p. 188, 2011.

DA COSTA GUERRA, J. F.; MACIEL, P. S.; DE ABREU, I. C. M. E.; PEREIRA, R. R.; SILVA, M.; DE MORAIS CARDOSO, L.; PINHEIRO-SANT'ANA, H. M.; DE LIMA, W. G.; SILVA, M. E.; PEDROSA, M. L. Dietary açai attenuates hepatic steatosis via adiponectin-mediated effects on lipid metabolism in high-fat diet mice. **Journal of Functional Foods**, v. 14, n., p. 192-202, 2015.

DA SILVA, G. H.; ESCANHOELA, C. A. F. Doença hepática gordurosa não alcoólica: patogênese e achados histológicos com ênfase nas alterações mitocondriais. **Revista de Ciências Médicas**, v. 18, n. 5/6, p., 2012.

DA SILVA MENEZES, E. M.; TORRES, A. T.; SRUR, A. U. S. Valor nutricional da polpa de açai (Euterpe oleracea Mart) liofilizada. **Acta Amazonica**, v. 38, n. 2, p., 2008.

DAVIES, M. J.; FU, S.; WANG, H.; DEAN, R. T. Stable markers of oxidant damage to proteins and their application in the study of human disease. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 27, n. 11, p. 1151-1163, 1999.

DAY, C. P.; JAMES, O. F. Steatohepatitis: a tale of two “hits”? **Gastroenterology**, v. 114, n. 4, p. 842-845, 1998.

DE CASTRO, U.; DOS SANTOS, R.; SILVA, M. E.; DE LIMA, W. G.; CAMPAGNOLE-SANTOS, M. J.; ALZAMORA, A. C. Age-dependent effect of high-fructose and high-fat diets on lipid metabolism and lipid accumulation in liver and kidney of rats. **Lipids Health Dis**, v. 12, n. 136, p. 10.1186, 2013.

DE LIMA YAMAGUCHI, K. K.; PEREIRA, L. F. R.; LAMARÃO, C. V.; LIMA, E. S.; DA VEIGA-JUNIOR, V. F. Amazon acai: Chemistry and biological activities: A review. **Food chemistry**, v. 179, n., p. 137-151, 2015.

DE SOUSA PEREIRA, I.; PONTES, T. C. M. C. M.; VIEIRA, R. A. L.; FOLLY, G. A. D. F.; SILVA, F. C. D. S.; DE OLIVEIRA, F. L. P.; DO AMARAL, J. F.; FREITAS, R.; VOLP, A. C. P. The consumption of acai pulp changes the concentrations of plasminogen activator inhibitor-1 and epidermal growth factor (EGF) in apparently healthy women. **Nutrición hospitalaria: Organo oficial de la Sociedad española de nutrición parenteral y enteral**, v. 32, n. 2, p. 931-945, 2015.

DE SOUZA, M. O.; SILVA, M.; SILVA, M. E.; DE PAULA OLIVEIRA, R.; PEDROSA, M. L. Diet supplementation with acai (*Euterpe oleracea* Mart.) pulp improves biomarkers of oxidative stress and the serum lipid profile in rats. **Nutrition**, v. 26, n. 7, p. 804-810, 2010.

DE SOUZA, M. O.; E SILVA, L. S.; DE BRITO MAGALHÃES, C. L.; DE FIGUEIREDO, B. B.; COSTA, D. C.; SILVA, M. E.; PEDROSA, M. L. The hypocholesterolemic activity of acai (*Euterpe oleracea* Mart.) is mediated by the enhanced expression of the ATP-binding cassette, subfamily G transporters 5 and 8 and low-density lipoprotein receptor genes in the rat. **Nutrition Research**, v. 32, n. 12, p. 976-984, 2012.

DE VASCONCELOS, M. A. M.; GALEÃO, R. R.; CARVALHO, A. V.; NASCIMENTO, V. Práticas de colheita e manuseio do Açaí. **Embrapa Amazônia Oriental. Documentos**, v., n., p., 2006.

DEL POZO-INSFRAN, D.; BRENES, C. H.; TALCOTT, S. T. Phytochemical composition and pigment stability of Acai (*Euterpe oleracea* Mart.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 6, p. 1539-1545, 2004.

DO NASCIMENTO, R. J. S.; COURI, S.; ANTONIASSI, R.; FREITAS, S. P. COMPOSIÇÃO EM ÁCIDOS GRAXOS DO ÓLEO DA POLPA DE AÇAÍ EXTRAÍDO COM ENZIMAS E COM HEXANO1. **Rev. Bras. Frutic.**, v. 30, n. 2, p., 2008.

DOĞRU-ABBASOĞLU, S.; KUMRAL, A.; OLGAC, V.; KOÇAK-TOKER, N.; UYSAL, M. Effect of carnosine alone or combined with α -tocopherol on hepatic steatosis and oxidative stress in fructose-induced insulin-resistant rats. **Journal of physiology and biochemistry**, v. 70, n. 2, p. 385-395, 2014.

EL MORSY, E. M.; AHMED, M. A.; AHMED, A. A. Attenuation of renal ischemia/reperfusion injury by açai extract preconditioning in a rat model. **Life sciences**, v., n., p., 2014.

FARAH, V.; ELASED, K. M.; CHEN, Y.; KEY, M. P.; CUNHA, T. S.; IRIGOYEN, M. C.; MORRIS, M. Nocturnal hypertension in mice consuming a high fructose diet. **Autonomic Neuroscience**, v. 130, n. 1, p. 41-50, 2006.

FAURE, P.; ROSSINI, E.; LAFOND, J. L.; RICHARD, M. J.; FAVIER, A.; HALIMI, S. Vitamin E improves the free radical defense system potential and insulin sensitivity of rats fed high fructose diets. **The Journal of Nutrition**, v. 127, n. 1, p. 103-107, 1997.

FEILLET-COUDRAY, C.; SUTRA, T.; FOURET, G.; RAMOS, J.; WRUTNIAK-CABELLO, C.; CABELLO, G.; CRISTOL, J.; COUDRAY, C. Oxidative stress in rats fed a high-fat high-sucrose diet and preventive effect of polyphenols: Involvement of mitochondrial and NAD (P) H oxidase systems. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 46, n. 5, p. 624-632, 2009.

FEIO, C. A.; IZAR, M. C.; IHARA, S. S.; KASMAS, S. H.; MARTINS, C. M.; FEIO, M. N.; MAUÉS, L. A.; BORGES, N. C.; MORENO, R. A.; PÓVOA, R. M. Euterpe oleracea (acai) modifies sterol metabolism and attenuates experimentally-induced atherosclerosis. **Journal of atherosclerosis and thrombosis**, v. 19, n. 3, p. 237-245, 2011.

FITZPATRICK, A. M.; JONES, D. P.; BROWN, L. A. S. Glutathione redox control of asthma: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities. **Antioxidants & redox signaling**, v. 17, n. 2, p. 375-408, 2012.

FOLCH, J.; LEES, M.; SLOANE-STANLEY, G. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. **J biol chem**, v. 226, n. 1, p. 497-509, 1957.

GEORGÉ, S.; BRAT, P.; ALTER, P.; AMIOT, M. J. Rapid determination of polyphenols and vitamin C in plant-derived products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 5, p. 1370-1373, 2005.

GILL, S. S.; TUTEJA, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 48, n. 12, p. 909-930, 2010.

GIRIŞ, M.; DOĞRU-ABBASOĞLU, S.; KUMRAL, A.; OLGAC, V.; KOÇAK-TOKER, N.; UYSAL, M. Effect of carnosine alone or combined with α -tocopherol on hepatic steatosis and oxidative stress in fructose-induced insulin-resistant rats. **Journal of physiology and biochemistry**, v. 70, n. 2, p. 385-395, 2014.

GOUVÊA, A. C. M. S.; ARAUJO, M. C. P. D.; SCHULZ, D. F.; PACHECO, S.; GODOY, R. L. D. O.; CABRAL, L. M. C. Anthocyanins standards (cyanidin-3-O-glucoside and cyanidin-3-O-rutinoside) isolation from freeze-dried açai (Euterpe oleraceae Mart.) by HPLC. **Food Science and Technology (Campinas)**, v. 32, n. 1, p. 43-46, 2012.

GUERRA, J. F. C.; BRITO MAGALHÃES, C. L.; COSTA, D. C.; SILVA, M. E.; PEDROSA, M. L. Dietary açai modulates ROS production by neutrophils and gene expression of liver antioxidant enzymes in rats. **Journal of clinical biochemistry and nutrition**, v. 49, n. 3, p. 188, 2011.

GUO, H.; LING, W.; WANG, Q.; LIU, C.; HU, Y.; XIA, M.; FENG, X.; XIA, X. Effect of anthocyanin-rich extract from black rice (*Oryza sativa* L. indica) on hyperlipidemia and insulin resistance in fructose-fed rats. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 62, n. 1, p. 1-6, 2007.

HALLIWELL, B. How to characterize an antioxidant: an update. In: Biochemical Society Symposia, 1995Portland Press Limited, p. 73-101.

HEYMAN, L.; AXLING, U.; BLANCO, N.; STERNER, O.; HOLM, C.; BERGER, K. Evaluation of beneficial metabolic effects of berries in high-fat fed C57BL/6J mice. **Journal of nutrition and metabolism**, v. 2014, n., p., 2014.

HOKAYEM, M.; BLOND, E.; VIDAL, H.; LAMBERT, K.; MEUGNIER, E.; FEILLET-COUDRAY, C.; COUDRAY, C.; PESENTI, S.; LUYTON, C.; LAMBERT-PORCHERON, S. Grape polyphenols prevent fructose-induced oxidative stress and insulin resistance in first-degree relatives of type 2 diabetic patients. **Diabetes care**, v. 36, n. 6, p. 1454-1461, 2013.

HOU, X.; XU, S.; MAITLAND-TOOLAN, K. A.; SATO, K.; JIANG, B.; IDO, Y.; LAN, F.; WALSH, K.; WIERZBICKI, M.; VERBEUREN, T. J. SIRT1 regulates hepatocyte lipid metabolism through activating AMP-activated protein kinase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 29, p. 20015-20026, 2008.

IBRAHIM, M. A.; KELLEN, M.; GEDDAWY, A. Nonalcoholic fatty liver disease: current and potential therapies. **Life sciences**, v. 92, n. 2, p. 114-118, 2013.

JAMES, O. F.; DAY, C. P. Non-alcoholic steatohepatitis (NASH): a disease of emerging identity and importance. **Journal of hepatology**, v. 29, n. 3, p. 495-501, 1998.

JIN, R.; WELSH, J. A.; LE, N.-A.; HOLZBERG, J.; SHARMA, P.; MARTIN, D. R.; VOS, M. B. Dietary fructose reduction improves markers of cardiovascular disease risk in Hispanic-American adolescents with NAFLD. **Nutrients**, v. 6, n. 8, p. 3187-3201, 2014.

JÚNIOR, L. R.; HÖEHR, N. F.; VELLASCO, A. P.; KUBOTA, L. T. Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutationa associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. **Quim. Nova**, v. 24, n. 1, p. 112-119, 2001.

KANG, J.; THAKALI, K. M.; XIE, C.; KONDO, M.; TONG, Y.; OU, B.; JENSEN, G.; MEDINA, M. B.; SCHAUSS, A. G.; WU, X. Bioactivities of açai (Euterpe precatoria Mart.) fruit pulp, superior antioxidant and anti-inflammatory properties to Euterpe oleracea Mart. **Food Chemistry**, v. 133, n. 3, p. 671-677, 2012.

KAWASAKI, T.; IGARASHI, K.; KOEDA, T.; SUGIMOTO, K.; NAKAGAWA, K.; HAYASHI, S.; YAMAJI, R.; INUI, H.; FUKUSATO, T.; YAMANOUCHI, T. Rats fed fructose-enriched diets have characteristics of nonalcoholic hepatic steatosis. **The Journal of Nutrition**, v. 139, n. 11, p. 2067-2071, 2009.

KELISHADI, R.; MANSOURIAN, M.; HEIDARI-BENI, M. Association of fructose consumption and components of metabolic syndrome in human studies: A systematic review and meta-analysis. **Nutrition**, v. 30, n. 5, p. 503-510, 2014.

KIM, J.-Y.; HONG, J.-H.; JUNG, H. K.; JEONG, Y. S.; CHO, K.-H. Grape skin and loquat leaf extracts and acai puree have potent anti-atherosclerotic and anti-diabetic activity in vitro and in vivo in hypercholesterolemic zebrafish. **International journal of molecular medicine**, v. 30, n. 3, p. 606-614, 2012.

LABRECQUE, D. R.; ABBAS, Z.; ANANIA, F.; FERENCI, P.; KHAN, A. G.; GOH, K.-L.; HAMID, S. S.; ISAKOV, V.; LIZARZABAL, M.; PEÑARANDA, M. M. World Gastroenterology Organisation global guidelines: Nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis. **Journal of clinical gastroenterology**, v. 48, n. 6, p. 467-473, 2014.

LALOR, P. F.; FAINT, J.; AARBODEM, Y.; HUBSCHER, S. G.; ADAMS, D. H. The role of cytokines and chemokines in the development of steatohepatitis. In: *Seminars in liver disease*, 2007, p. 173-193.

LEVINE, R. L.; WILLIAMS, J. A.; STADTMAN, E. R.; SHACTER, E. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. **Methods in enzymology**, v., n. 233, p. 346-357, 1994.

LEWIS, J. R.; MOHANTY, S. R. Nonalcoholic fatty liver disease: a review and update. **Digestive diseases and sciences**, v. 55, n. 3, p. 560-578, 2010.

LI, H.; WANG, X.; LI, Y.; LI, P.; WANG, H. Polyphenolic compounds and antioxidant properties of selected China wines. **Food Chemistry**, v. 112, n. 2, p. 454-460, 2009.

LICHTENTHÄLER, R.; RODRIGUES, R. B.; MAIA, J. G. S.; PAPAGIANNPOULOS, M.; FABRICIUS, H.; MARX, F. Total oxidant scavenging capacities of Euterpe oleracea Mart.(Acai) fruits. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 56, n. 1, p. 53-64, 2005.

LOOMBA, R.; SANYAL, A. J. The global NAFLD epidemic. **Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology**, v. 10, n. 11, p. 686-690, 2013.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J biol chem**, v. 193, n. 1, p. 265-275, 1951.

LUO, X.-Y.; TAKAHARA, T.; HOU, J.; KAWAI, K.; SUGIYAMA, T.; TSUKADA, K.; TAKEMOTO, M.; TAKEUCHI, M.; ZHONG, L.; LI, X.-K. Theaflavin attenuates ischemia-reperfusion injury in a mouse fatty liver model. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 417, n. 1, p. 287-293, 2012.

MARSILLACH, J.; MACKNESS, B.; MACKNESS, M.; RIU, F.; BELTRÁN, R.; JOVEN, J.; CAMPS, J. Immunohistochemical analysis of paraoxonases-1, 2, and 3 expression in normal mouse tissues. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 45, n. 2, p. 146-157, 2008.

MAYES, P. A. Intermediary metabolism of fructose. **The American journal of clinical nutrition**, v. 58, n. 5, p. 754S-765S, 1993.

MERTENS-TALCOTT, S. U.; RIOS, J.; JILMA-STOHLAWETZ, P.; PACHECO-PALENCIA, L. A.; MEIBOHM, B.; TALCOTT, S. T.; DERENDORF, H. Pharmacokinetics of anthocyanins and antioxidant effects after the consumption of anthocyanin-rich acai juice and pulp (Euterpe oleracea Mart.) in human healthy volunteers. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 17, p. 7796-7802, 2008.

MIDDLETON, E.; KANDASWAMI, C.; THEOHARIDES, T. C. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. **Pharmacological reviews**, v. 52, n. 4, p. 673-751, 2000.

MOTTA, V. T. Bioquímica clínica: princípios e interpretações. **Editora: Médica Massau**, v., n., p., 2000.

NELSON, D. L.; COX, M. M. Princípios de bioquímica de Lehninger. In: (Ed.). **Princípios de Bioquímica de Lehninger**: Artmed, 2011,

NOGUEIRA, O. L.; CARVALHO, C. D.; MULLER, C.; GALVÃO, E.; SILVA, H.; RODRIGUES, J.; OLIVEIRA, M. D.; CARVALHO, J. D.; ROCHA NETO, O. D.; NASCIMENTO, W. D. **A cultura do açaí**: EMBRAPA, Serviço de Produção de Informação, 1995, v.26

NOMURA, K.; YAMANOUCHI, T. The role of fructose-enriched diets in mechanisms of nonalcoholic fatty liver disease. **The Journal of nutritional biochemistry**, v. 23, n. 3, p. 203-208, 2012.

OLIVEIRA, M. D. S. P. D.; FARIAS NETO, J. T. D.; SILVA PENA, R. D. Açaí: técnicas de cultivo e processamento. **CEP**, v. 60, n., p. 002, 2007.

PERLEMUTER, G.; DAVIT-SPRAUL, A.; COSSON, C.; CONTI, M.; BIGORGNE, A.; PARADIS, V.; CORRE, M. P.; PRAT, L.; KUOCH, V.; BASDEVANT, A. Increase in liver antioxidant enzyme activities in non-alcoholic fatty liver disease. **Liver international**, v. 25, n. 5, p. 946-953, 2005.

PETTA, S.; MURATORE, C.; CRAXI, A. Non-alcoholic fatty liver disease pathogenesis: the present and the future. **Digestive and Liver Disease**, v. 41, n. 9, p. 615-625, 2009.

PORTINHO, J. A.; ZIMMERMANN, L. M.; BRUCK, M. R. Efeitos Benéficos do Açaí. **IJNutrology**, v. 5, n. 1, p. 15-20, 2012.

PRIMO-PARMO, S. L.; SORENSON, R. C.; TEIBER, J.; LA DU, B. N. The human serum paraoxonase/arylesterase gene (PON1) is one member of a multigene family. **Genomics**, v. 33, n. 3, p. 498-507, 1996.

QUINLAN, G. J.; EVANS, T. W.; GUTTERIDGE, J. M. Oxidative damage to plasma proteins in adult respiratory distress syndrome. **Free radical research**, v. 20, n. 5, p. 289-298, 1994.

REEVES, P. G.; NIELSEN, F. H.; FAHEY JR, G. C. 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**, v. 123, n. 11, p. 1939-1951, 1993.

RENAUD, H. J.; CUI, J. Y.; LU, H.; KLAASSEN, C. D. Effect of Diet on Expression of Genes Involved in Lipid Metabolism, Oxidative Stress, and Inflammation in Mouse Liver—Insights into Mechanisms of Hepatic Steatosis. v., n., p., 2014.

RIBEIRO, S.; QUEIROZ, M.; PELUZIO, M.; COSTA, N.; MATTA, S.; QUEIROZ, J. Antioxidantes na dieta. **Nutrição Básica e Metabolismo. Viçosa: UFV**, v., n., p. 235-260, 2008.

RINELLA, M. E.; SANYAL, A. J. NAFLD in 2014: Genetics, diagnostics and therapeutic advances in NAFLD. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v., n., p., 2015.

RODRIGUEZ-RAMIRO, I.; VAUZOUR, D.; MINIHANE, A. Polyphenols and non-alcoholic fatty liver disease: impact and mechanisms. **Proceedings of the Nutrition Society**, v., n., p. 1-14, 2015.

ROLO, A. P.; TEODORO, J. S.; PALMEIRA, C. M. Role of oxidative stress in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 52, n. 1, p. 59-69, 2012.

SAKATA, R.; NAKAMURA, T.; TORIMURA, T.; UENO, T.; SATA, M. Green tea with high-density catechins improves liver function and fat infiltration in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) patients: A double-blind placebo-controlled study. **International journal of molecular medicine**, v. 32, n. 5, p. 989-994, 2013.

SANTOS, G. M. D.; MAIA, G. A.; SOUSA, P.; COSTA, J.; FIGUEIREDO, R. W. D.; PRADO, G. M. D. [Correlation between antioxidant activity and bioactive compounds of acai (*Euterpe oleracea* Mart) comercial pulps]. **Archivos latinoamericanos de nutricion**, v. 58, n. 2, p. 187-192, 2008.

SANTOS, J.; COSTA, F.; SOARES, D.; CAMPOS, A.; CARNELOSSI, M.; NUNES, T.; JÚNIOR, A. Avaliação de mangaba liofilizada através de parâmetros físico-químicos. **Scientia Plena**, v. 8, n. 3 (a), p., 2012.

SASS, D. A.; CHANG, P.; CHOPRA, K. B. Nonalcoholic fatty liver disease: a clinical review. **Digestive diseases and sciences**, v. 50, n. 1, p. 171-180, 2005.

SEDLAK, J.; LINDSAY, R. H. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. **Analytical biochemistry**, v. 25, n., p. 192-205, 1968.

SHYAMALA, M.; VENUKUMAR, M.; LATHA, M. Antioxidant potential of the *Syzygium aromaticum* (Gaertn.) Linn.(Cloves) in rats fed with high fat diet. **Indian Journal of pharmacology**, v. 35, n. 2, p. 99-103, 2003.

SIES, H. Strategies of antioxidant defense. In: (Ed.). **EJB Reviews 1993**: Springer, 1994, p.101-107.

SILVA, D. F.; VIDAL, F. C.; SANTOS, D.; COSTA, M. C.; MORGADO-DÍAZ, J. A.; NASCIMENTO, M. D. D. S. B.; DE MOURA, R. S. Cytotoxic effects of *Euterpe oleracea* Mart. in malignant cell lines. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 14, n. 1, p. 175, 2014.

SOUZA, M. O.; SILVA, M.; SILVA, M. E.; PAULA OLIVEIRA, R.; PEDROSA, M. L. Diet supplementation with acai (*Euterpe oleracea* Mart.) pulp improves biomarkers of oxidative stress and the serum lipid profile in rats. **Nutrition**, v. 26, n. 7, p. 804-810, 2010.

SOUZA, M. O. D.; SANTOS, R. C. D.; SILVA, M. E. D.; PEDROSA, M. L. Açai (*Euterpe oleracea* Martius): composição química e bioatividades. **Nutrire**, v. 36, n. 2, p. 161-169, 2011.

STEINBRENNER, H.; SIES, H. Protection against reactive oxygen species by selenoproteins. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1790, n. 11, p. 1478-1485, 2009.

SUN, S. Z.; EMPIE, M. W. Fructose metabolism in humans-what isotopic tracer studies tell us. **Nutr Metab (Lond)**, v. 9, n. 1, p. 89, 2012.

SUWANNAPHET, W.; MEEPROM, A.; YIBCHOK-ANUN, S.; ADISAKWATTANA, S. Preventive effect of grape seed extract against high-fructose diet-induced insulin resistance and oxidative stress in rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, n. 7, p. 1853-1857, 2010.

SUZUKI, M.; NOMURA, C.; ODAKA, H.; IKEDA, H. Effect of an insulin sensitizer, pioglitazone, on hypertension in fructose-drinking rats. **The Japanese Journal of Pharmacology**, v. 74, n. 4, p. 297-302, 1997.

SYN, W.-K.; CHOI, S. S.; DIEHL, A. M. Apoptosis and cytokines in non-alcoholic steatohepatitis. **Clinics in liver disease**, v. 13, n. 4, p. 565-580, 2009.

TAKAHASHI, Y.; SOEJIMA, Y.; FUKUSATO, T. Animal models of nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis. **World journal of gastroenterology: WJG**, v. 18, n. 19, p. 2300, 2012.

TAKAKI, A.; KAWAI, D.; YAMAMOTO, K. Multiple hits, including oxidative stress, as pathogenesis and treatment target in non-alcoholic steatohepatitis (NASH). **International journal of molecular sciences**, v. 14, n. 10, p. 20704-20728, 2013.

TAPPY, L.; LÊ, K.-A. Metabolic effects of fructose and the worldwide increase in obesity. **Physiological reviews**, v. 90, n. 1, p. 23-46, 2010.

THOMAS, S.; SENTHILKUMAR, G. P.; SIVARAMAN, K.; BOBBY, Z.; PANEERSELVAM, S.; HARICHANDRAKUMAR, K. T. Effect of S-Methyl-L-Cysteine on Oxidative Stress, Inflammation and Insulin Resistance in Male Wistar Rats Fed with High Fructose Diet. **Iranian Journal of Medical Sciences**, v. 1, n. 1, p. 45-50, 2015.

THORBURN, A. W.; STORLIEN, L. H.; JENKINS, A. B.; KHOURI, S.; KRAEGEN, E. Fructose-induced in vivo insulin resistance and elevated plasma triglyceride levels in rats. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 49, n. 6, p. 1155-1163, 1989.

UDANI, J. K.; SINGH, B. B.; SINGH, V. J.; BARRETT, M. L. Effects of Acai(Euterpe oleracea Mart.) berry preparation on metabolic parameters in a healthy overweight population: A pilot study. **Nutrition journal**, v. 10, n. 1, p. 45, 2011.

UNIS, A. Açai berry extract attenuates glycerol-induced acute renal failure in rats. **Renal failure**, v., n. 0, p. 1-8, 2014.

VALENTI, L.; RISO, P.; MAZZOCCHI, A.; PORRINI, M.; FARGION, S.; AGOSTONI, C. Dietary anthocyanins as nutritional therapy for nonalcoholic fatty liver disease. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2013, n., p., 2013.

VAN DE WIER, B.; KOEK, G. H.; BAST, A.; HAENEN, G. R. The potential of flavonoids in the treatment of non-alcoholic fatty liver disease. **Critical reviews in food science and nutrition**, v., n. just-accepted, p. 00-00, 2015.

WANG, X.; ZHANG, D.-M.; GU, T.-T.; DING, X.-Q.; FAN, C.-Y.; ZHU, Q.; SHI, Y.-W.; HONG, Y.; KONG, L.-D. Morin reduces hepatic inflammation-associated lipid accumulation in high fructose-fed rats via inhibiting sphingosine kinase 1/sphingosine 1-phosphate signaling pathway. **Biochemical pharmacology**, v. 86, n. 12, p. 1791-1804, 2013.

WELSH, J. A.; KARPEN, S.; VOS, M. B. Increasing prevalence of nonalcoholic fatty liver disease among United States adolescents, 1988-1994 to 2007-2010. **The Journal of pediatrics**, v. 162, n. 3, p. 496-500. e491, 2013.

WILLIAMS, K.; SHACKEL, N.; GORRELL, M.; MCLENNAN, S.; TWIGG, S. Diabetes and nonalcoholic fatty liver disease: a pathogenic duo. **Endocrine reviews**, v. 34, n. 1, p. 84-129, 2012.

WILLIAMS, R. J.; SPENCER, J. P.; RICE-EVANS, C. Flavonoids: antioxidants or signalling molecules? **Free Radical Biology and Medicine**, v. 36, n. 7, p. 838-849, 2004.

WISDOM, S. J.; WILSON, R.; MCKILLOP, J. H.; WALKER, J. J. Antioxidant systems in normal pregnancy and in pregnancy-induced hypertension. **American journal of obstetrics and gynecology**, v. 165, n. 6, p. 1701-1704, 1991.

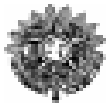
XIE, C.; KANG, J.; BURRIS, R.; FERGUSON, M. E.; SCHAUSS, A. G.; NAGARAJAN, S.; WU, X. Açai juice attenuates atherosclerosis in ApoE deficient mice through antioxidant and anti-inflammatory activities. **Atherosclerosis**, v. 216, n. 2, p. 327-333, 2011.

YOKOZAWA, T.; KIM, H. J.; CHO, E. J. Gravinol ameliorates high-fructose-induced metabolic syndrome through regulation of lipid metabolism and proinflammatory state in rats. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 13, p. 5026-5032, 2008.

YUYAMA, L. K. O.; AGUIAR, J. P. L.; SILVA FILHO, D. F.; YUYAMA, K.; VAREJÃO, J.; FÁVARO, D. I. T.; VASCONCELLOS, M. B. A.; PIMENTEL, S. A.; CARUSO, M. S. F. Physicochemical characterization of acai juice of *Euterpe precatoria* Mart. from different amazonian ecosystems. **Acta Amazonica**, v. 41, n. 4, p. 545-552, 2011.

Anexos

Anexo I. Certificado de aprovação do protocolo pela Comissão de Ética no Uso de Animais.



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**

Campus Universitário - Maro de Cruzeiro - 35224-9, Sala 29
35-400-000 - Ouro Preto - MG - Brasil
Fone (31) 3599-1398 Fax (31) 3599-1370
E-mail: ceua@propp.ufop.br



CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo nº. 2013/46 do projeto, relativo ao uso de animais, do projeto intitulado "Estudo dos efeitos do açai (*Euterpe oleracea* Mart.) sobre fatores envolvidos no metabolismo de lipídeos e sobre a esteato-hepatite não alcoólica, induzida por dieta rica em frutose em ratos Fischer", que tem como responsável a Profa. Dra. Maria Lúcia Pedrosa, foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFOP (CEUA-UFOP).

Este certificado expira em 14/11/2017.

Ouro Preto, 23 de outubro de 2013.

Wanderson Geraldo de Lima

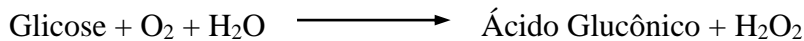
Prof. Dr. Wanderson Geraldo de Lima
Coordenador da CEUA-UFOP

Anexo II. Protocolos das Dosagens Bioquímicas

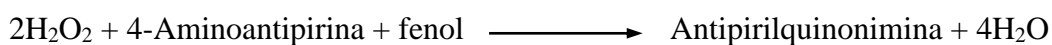
II.I) Glicose

Princípio

A glicose oxidase catalisa a oxidação da Glicose de acordo com a seguinte reação:



O peróxido de hidrogênio formado reage com 4-aminoantipirina e fenol, sob ação catalisadora da peroxidase, através de uma reação oxidativa de acoplamento, formando uma antipirilquinonimina vermelha cuja intensidade de cor é proporcional à concentração da glicose na amostra.



Amostra

Preparo do paciente: Glicemia de jejum: recomenda-se jejum mínimo de 8 horas.

Tipos de amostra: Usar plasma ou soro. Realizar a colheita do sangue utilizando um anticoagulante contendo um inibidor da glicólise. O uso do anticoagulante Glistab (Labtest cat. 29) permite a colheita de uma só amostra para as dosagens de creatinina, glicose e uréia. As amostras de sangue não contendo antiglicolítico devem ser centrifugadas imediatamente após a colheita e o plasma ou soro separados das células ou coágulo. No líquido e líquidos (ascítico, pleural e sinovial) adicionar anticoagulante contendo antiglicolítico na mesma proporção usada para a amostra de sangue e devem ser centrifugados antes de iniciar a medição.

Armazenamento e estabilidade da amostra: O analito é estável por 8 horas em amostras colhidas com antiglicolítico. No plasma, soro e outros líquidos separados das células, a glicose permanece estável por 3 dias entre 2 – 8 °C, quando não ocorre contaminação bacteriana.

Produto utilizado: Glicose Liquiform, Referência 133-1/500, 133-2/500 ANVISA - 10009010236

Reagente 1: Armazenar entre 2 – 8 °C. Contém tampão fosfato 30 mmol/L; pH 7,5; glicose oxidase ≥ 12.500 U/L; peroxidase ≥ 800 U/L; 4-aminoantipirina ≥ 290 $\mu\text{mol/L}$; fenol ≥ 1 mmol/L; azida sódica 7,5 mmol/L e surfactantes.

Padrão - 100 mg/dL: Armazenar entre 2 – 30 °C. Após o manuseio, sugere-se armazenar bem vedado para evitar evaporação. Contém glicose 100 mg/dL e biocida não tóxico. O

estabilizador do padrão pode precipitar-se em baixas temperaturas, fato que não interfere na sua qualidade.

Equipamentos

Procedimento manual

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

Método Direto

1. Tomar 3 tubos de ensaio e proceder como a seguir:

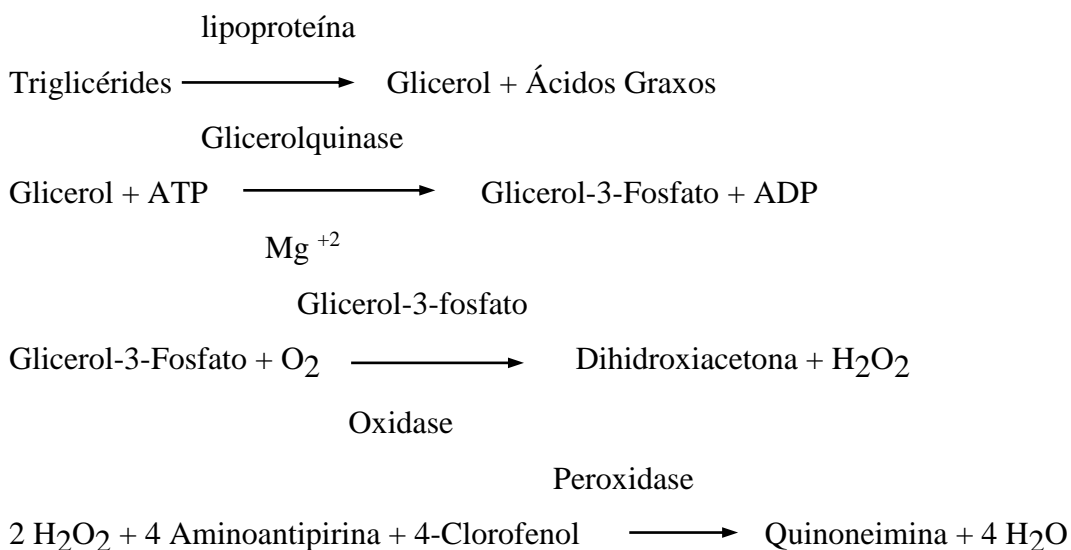
	Branco	Teste	Padrão
Amostra	-----	0,01 mL	-----
Padrão (n° 2)	-----	-----	0,01 mL
Reagente 1	1,0 mL	1,0 mL	1,0 mL

2. Misturar vigorosamente e colocar em banho-maria a 37 °C durante 10 minutos. O nível da água no banho deve ser superior ao nível dos reagentes nos tubos de ensaio. Determinar as absorvâncias 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.

II.II) Triacilgliceróis

Princípio

Os Triacilgliceróis são determinados de acordo com as seguintes reações:



A intensidade da cor vermelha formada é diretamente proporcional à concentração dos Triglicérides 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 triacilgliceróis 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 7mmol/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 absorvâncias 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

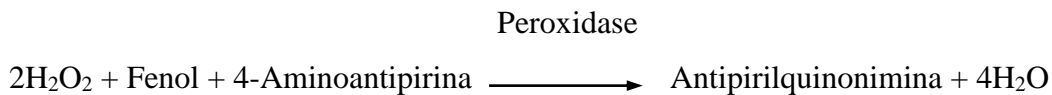
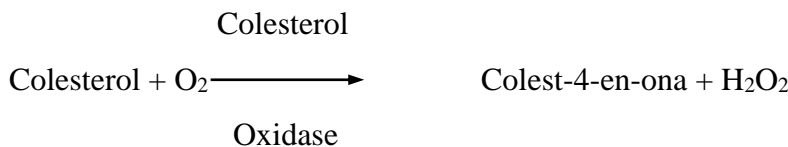
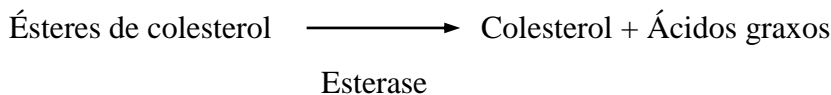
$$\text{Triglicérides (mg/dL)} \equiv \frac{\text{Absorbância do teste}}{\text{Absorbância do padrão}} \times 200$$

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

II.III) 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 resultado falsamente diminuídos. O analito é estável por 7 dias entre 2 – 8°C e vários meses a 10 °C

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

$$\text{Colesterol mg/dL} = \frac{\text{Absorbância do teste}}{\text{Absorbância do padrão}} \times 200$$

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

II.IV) 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 absorvância 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 e ensaio e proceder como a seguir:

	Branco	Teste	Padrão
Sobrenadante	-----	0,1 mL	-----
Padrão (nº 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 1 minutos. O nível da água o banho deve ser superior ao nível do reagente nos tubos de ensaio. Determinar as absorvâncias 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

Absorvância do teste

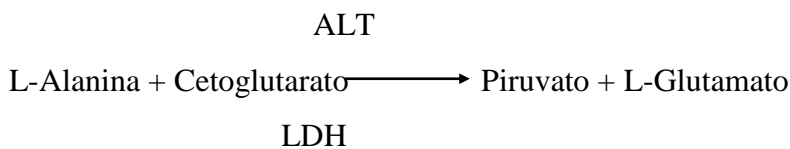
$$\text{HDL mg/dL} = \frac{\text{Absorbância do padrão}}{\text{Absorbância do padrão}} \times 40$$

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

II.V) Alanina Amino Transferase

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 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

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 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.

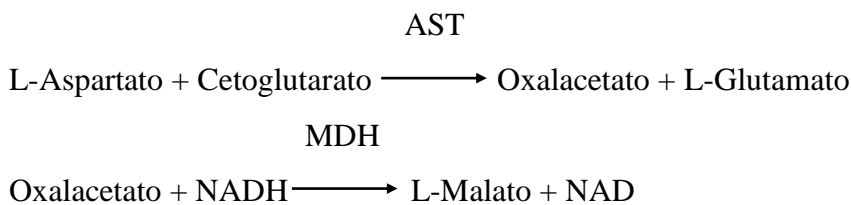
$$\text{ALT/GPT (U/L) } 340 \text{ nm} = \Delta A/\text{minuto} \times 1746$$

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

II.VI) Aspartato Aminotransferase*Princípio*

A AST catalisa a transferência de grupos amina da alanina 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 consequente 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

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 termostaticada 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 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 absorvância 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).

II.VII) Fosfatase Alcalina

Princípio

A fosfatase alcalina do soro hidrolisa a timolftaleína monofosfato liberando timolftaleína, que tem cor azul em meio alcalino. A cor formada, diretamente proporcional a 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

Preparo do paciente: Recomenda-se jejum mínimo de 8 horas.

Tipos de amostra: Soro ou plasma (heparina).

Armazenamento e estabilidade da amostra: A amostra é estável por 7 dias entre 2 – 8 °C.

Quando a amostra é armazenada à temperatura ambiente obtêm-se resultados falsamente elevados.

Produto utilizado

Fosfatase Alcalina, Catálogo 40 ANVISA - 10009010038

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

Substrato: Armazenar entre 15 – 25 °C. Não refrigerar. O reagente pode apresentar precipitado ou turvação, fato que não interfere na qualidade do mesmo; agitar antes de usar; manter o frasco bem vedado para evitar evaporação.

Contém timolftaleína monofosfato 22 mmol/L.

Tampão: Armazenar entre 15 – 25 °C.

Contém tampão 300 mmol/L pH 10,1.

Reagente de Cor: Armazenar entre 15 – 25 °C.

Contém carbonato de sódio 94 mmol/L, hidróxido de sódio 250 mmol/L.

Padrão - 45 U/L: Armazenar entre 15 – 25 °C. Após o manuseio sugere-se armazenar bem vedado para evitar evaporação.

Equipamentos

Procedimento manual:

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

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°4)	-----	-----	0,05 mL

Colocar em banho-maria a 37 °C 2 minutos. O nível da água no banho deve ser superior ao nível dos reagentes nos tubos de ensaio.

Amostra	-----	0,05 mL	----
Misturar e incubar em banho-maria a 37 °C por EXATAMENTE 10 minutos.			
Reagente de Cor (n° 3)	2,0 mL	2,0 mL	2,0 mL

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

Anexo III. Trabalhos Publicados em Eventos Científicos

- 1) **CARVALHO, M. M. F.**; PEREIRA, R. R.; REIS, L. L. T.; LOPES, J. M. M.; LAGE, N. N.; GUERRA, J. F. C.; BONOMO, L. F.; LIMA, W. G.; SILVA, M. E.; PEDROSA, M. L. FRUCTOSE-RICH DIET INDUCES LIVER DAMAGE IN MURINE MODEL. In: 23rd Congress of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB) and 44th Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology SBBq, 2015, Foz do Iguaçu Brazil. Anais do 23rd Congress of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB) and 44th Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology SBBq, 2015.
- 2) REIS, L. L. T.; **CARVALHO, M. M. F.**; BONOMO, L. F.; SILVA, M. E.; PEDROSA, M. L. THE EFFECT OF BARU NUT (DIPTERIX ALATA VOG.) FLOUR ON HEPATIC AND FECAL LIPID PROFILE AND SUPEROXIDE DISMUTASE ACTIVITY IN HYPERCHOLESTEROLEMIC RATS. In: 23rd Congress of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB) and 44th Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology SBBq, 2015, Foz do Iguaçu Brazil. Anais do 23rd Congress of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB) and 44th Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology SBBq, 2015.
- 3) ZAGO, H. P.; PEREIRA, R. R.; GUERRA, J. F. C.; LIMA, W. G.; LAGE, N. N.; LOPES, J. M. M.; **CARVALHO, M. M. F.**; SILVA, M. E.; PEDROSA, M. L.

- Efeito da suplementação do açaí na esteatose hepática induzida por dieta rica em frutose em ratos. In: XXIX Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental (FeSBE), 2014, Caxambu/MG. Anais da XXIX Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental (FeSBE), 2014.
- 4) **CARVALHO, M. M. F.**; ZAGO, H. P.; REIS, L. L. T.; LOPES, J. M. M.; LAGE, N. N.; GUERRA, J. F. C.; PEREIRA, R. R.; BONOMO, L. F.; LIMA, W. G.; SILVA, M. E.; PEDROSA, M. L. Fructose-rich diet and açaí supplementation effects on hepatic function biomarkers and antioxidant activity. In: XII Reunião Regional da SBBq e 5th International Symposium in Biochemistry of Macromolecules and Biotechnology, 2014, Natal/RN. Anais do XII Reunião Regional da SBBq e 5th International Symposium in Biochemistry of Macromolecules and Biotechnology. São Paulo/SP: SBBq, 2014.
- 5) REIS, L. L. T.; **CARVALHO, M. M. F.**; BONOMO, L. F.; PEDROSA, M. L.; SILVA, M. E. Effect of baru nut flour on lipid profile and oxidative stress in rats fed with hypercholesterolemic diet. In: XII Reunião Regional da SBBq e 5th International Symposium in Biochemistry of Macromolecules and Biotechnology, 2014, Natal/RN. Anais do XII Reunião Regional da SBBq e 5th International Symposium in Biochemistry of Macromolecules and Biotechnology. São Paulo/SP: SBBq, 2014.
- 6) **CARVALHO, M. M. F.**; DRUMMOND, F. R.; VIEIRA, A. M.; SOUZA, D. M. S.; OLIVEIRA, J. S.; PENA, K. B.; CASTRO, T. F.; SILVA, M. E. Avaliação da Dieta (AIN93) com diferentes porcentagens de proteína na indução de desnutrição em ratos adultos. In: Encontro de Saberes, 2014, Ouro Preto. Anais do Encontro de Saberes. Ouro Preto: UFOP, 2014.