

**LUCIANA MARQUES CARDOSO**

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA, NUTRICIONAL E POTENCIAL  
ANTIOXIDANTE DA POLPA DOS FRUTOS DE *Euterpe  
edulis* Martius E SUA AVALIAÇÃO NOS FATORES DE RISCO E  
NAS LESÕES ATEROSCLERÓTIAS EM CAMUNDONGOS  
APOE<sup>-/-</sup>**

Dissertação apresentada à  
Universidade Federal de Viçosa,  
como parte das exigências do  
Programa de Pós-Graduação em  
Bioquímica Agrícola, para obtenção  
do título de *Doctor Scientiae*.

**VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2012**

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e  
Classificação da Biblioteca Central da UFV

T

C268c  
2012

Cardoso, Luciana Marques, 1980-

Caracterização química, nutricional e potencial antioxidante da polpa dos frutos de *Euterpe edulis* Martius e sua avaliação nos fatores de risco e nas lesões ateroscleróticas em camundongos apoE<sup>-/-</sup> / Luciana Marques Cardoso. – Viçosa, MG, 2012.

xv, 117f. : il. ; (algumas col.) ; 29cm.

Inclui anexos.

Orientador: João Paulo Viana Leite

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. *Euterpe edulis*. 2. Aterosclerose. 3. Antioxidantes.  
4. Antocianinas. 5. Camundongo. I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

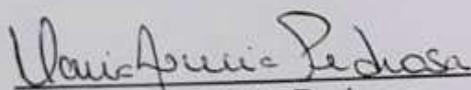
CDD 22. ed. 634.6

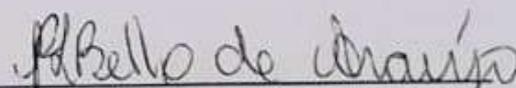
# LUCIANA MARQUES CARDOSO

CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA, NUTRICIONAL E POTENCIAL ANTIOXIDANTE DA POLPA DOS FRUTOS DE *Euterpe edulis* Martius E SUA AVALIAÇÃO NOS FATORES DE RISCO E NAS LESÕES ATEROSCLERÓTICAS EM CAMUNDONGOS APOE<sup>-/-</sup>

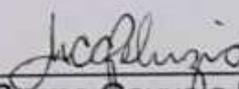
Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

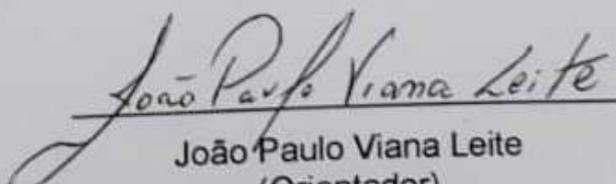
APROVADA: 30 de julho de 2012

  
\_\_\_\_\_  
Maria Lúcia Pedrosa

  
\_\_\_\_\_  
Raquel Linhares Bello de Araújo

  
\_\_\_\_\_  
Sérgio Luis Pinto da Matta

  
\_\_\_\_\_  
Maria do Carmo Gouveia Peluzio  
(Coorientadora)

  
\_\_\_\_\_  
João Paulo Viana Leite  
(Orientador)

"É do buscar e não do achar que nasce o que eu não conhecia."  
*Clarice Lispector*

## AGRADECIMENTOS

À Deus, pelo apoio espiritual, saúde e sabedoria.

Aos meus pais Cyriaco (*in memoriam*) e Flávia, pelo apoio e por investirem na minha educação.

Ao meu esposo Ângelo, pelo apoio, compreensão e dedicação.

À Universidade Federal de Viçosa, professores e técnicos que fizeram parte da minha formação.

Ao meu orientador Prof. João Paulo Viana Leite, pelos ensinamentos, orientação, acessibilidade, compreensão e estímulo a pesquisa e a extensão.

À minha co-orientadora Prof<sup>a</sup>. Maria do Carmo Gouveia Peluzio, pelos ensinamentos, orientação, compreensão e pelo carinho.

Ao Eduardo Monteiro, o Du, pelo apoio e conselhos.

Aos amigos Letícia e Renato, mentores da idéia deste trabalho.

Aos grandes parceiros e amigos Cynthia e Alexandre, pelos momentos de alegria, motivação e busca de novos conhecimentos e técnicas.

Aos colaboradores desta pesquisa: Rômulo, Esther e Leandro.

Ao grupo do Laboratório de Bioquímica Nutricional e do Laboratório de Biodiversidade.

Aos amigos: Natália, Ana Carla, Priscila, Bruna, Solange e Ana Paula pelo apoio e conselhos.

Aos membros da banca, pela disponibilidade e contribuição científica ao avaliarem este trabalho.

Às agências financiadoras, Finep, CNPq, Capes e Fapemig, e ao Núcleo de Análise de Biomoléculas (NuBioMol).

E a todos, que de alguma forma, contribuíram para a concretização deste trabalho.

OBRIGADA!!!

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS .....	vii
LISTA DE TABELAS .....	ix
LISTA DE QUADROS .....	xi
RESUMO.....	xii
ABSTRACT .....	xiv
INTRODUÇÃO GERAL.....	1
OBJETIVO GERAL.....	3
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	4

### **Capítulo 1. Revisão: Efeitos biológicos das antocianinas no processo aterosclerótico.....6**

1. INTRODUÇÃO.....	7
2. Propriedades antioxidantes das antocianinas.....	10
3. Propriedades antiinflamatórias das antocianinas.....	20
4. Processo de formação da aterosclerose.....	23
5. Antocianina no tratamento da lesão aterosclerótica.....	25
6. CONCLUSÃO.....	28
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	29

### **Capítulo 2 - Caracterização química, nutricional e capacidade antioxidante da polpa dos frutos de *Euterpe edulis* Mart.....34**

1. INTRODUÇÃO.....	35
2. OBJETIVOS.....	37
2.1. Objetivo Geral.....	37
2.2. Objetivos Específicos.....	37
3. METODOLOGIA.....	38
3.1. Coleta do Material Vegetal.....	38
3.2. Preparo da Polpa dos Frutos de <i>E. edulis</i> .....	38
3.3. Composição Química Centesimal.....	39
3.4. Análise de Ácidos Graxos.....	40

3.5.	Análise de Minerais.....	40
3.6.	Análise de Carotenóides por HPLC/DAD.....	41
3.7.	Análise de Ácido Ascórbico por HPLC/DAD.....	42
3.8.	Análise Fitoquímica.....	43
3.9.	Análise de Antocianinas Totais Monoméricas.....	45
3.9.1.	Preparo do tampão cloreto de potássio 0,025 mol/L pH=1,0.....	45
3.9.2.	Preparo do tampão acetato de sódio 0,4 mol/L pH=4,5.....	46
3.10.	Análise de Antocianinas por HPLC/MS.....	46
3.11.	Análise de Antocianinas por HPLC-ESI-MS.....	48
3.12.	Atividade Antioxidante <i>in vitro</i> .....	49
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	51
4.1.	Análises Bromatológicas.....	51
4.2.	Prospecção Fitoquímica.....	55
4.3.	Análise de Antocianinas Totais Monoméricas.....	56
4.4.	Análise de Antocianinas por HPLC/DAD e HPLC/MS.....	58
4.5.	Atividade Antioxidante (DPPH).....	60
5.	CONCLUSÃO.....	63
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	64

**Capítulo 3 - Efeito da polpa dos frutos de *Euterpe edulis* Mart. nos fatores de risco e lesões ateroscleróticas e hepáticas em camundongos apoE<sup>-/-</sup>.69**

1.	INTRODUÇÃO.....	70
2.	OBJETIVOS.....	72
2.1	Objetivo Geral.....	72
2.2	Objetivos Específicos.....	72
3.	METODOLOGIA.....	73
3.1	Coleta do Material Vegetal e Preparo da PLFE.....	73
3.2	Cuidados Éticos.....	73
3.3	Animais e Dietas.....	73
3.4	Peso corporal e ingestão alimentar.....	75
3.5	Análises Sanguíneas.....	76
3.6	Avaliação das Lesões Ateroscleróticas.....	76
3.7	Determinação das Enzimas Antioxidantes.....	77

3.7.1	Superóxido Dismutase (SOD).....	77
3.7.2	Catalase.....	77
3.8	Análise Histopatológica.....	78
3.8.1	Processamento Histológico do Tecido Hepático.....	78
3.8.2	Densidade Volumétrica e Análise de Colágeno.....	78
3.8.3	Densidade Numérica e Cariometria.....	80
3.9	Análises Estatísticas.....	81
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	82
4.1	Peso Corporal e Ingestão Alimentar.....	82
4.2	Análises Sanguíneas.....	83
4.3	Lesões Ateroscleróticas.....	87
4.4	Enzimas Antioxidantes.....	90
4.5	Análises Histopatológicas.....	94
5.	CONCLUSÃO.....	96
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	97
	CONCLUSÃO GERAL.....	104
	ANEXOS	
	Anexo 1: Metodologia sobre o isolamento dos padrões de carotenóides.....	105
	Anexo 2: Cromatogramas obtidos da análise de antocianinas por HPLC ESI/MS.....	110
	Anexo 3: Certificado do Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFMG.....	117

## LISTA DE FIGURAS

### Capítulo 1. Revisão: Efeitos biológicos das antocianinas no processo aterosclerótico.

**Figura 1.** Estrutura do cátion flavílio.....7

**Figura 2.** Possíveis transformações estruturais sugeridas para antocianinas em meio aquoso em função do pH.....8

### Capítulo 2. Caracterização química, nutricional e capacidade antioxidante da polpa dos frutos de *Euterpe edulis* Mart.

**Figura 1.** Cromatograma do mix dos padrões de antocianinas.....47

**Figura 2.** Curva padrão da cianidina 3-glicosídeo (C3G).....47

**Figura 3.** Curva padrão da cianidina 3- rutinosídeo (C3R).....48

**Figura 4.** Cromatograma referente a PLFE. C3G: cianidina 3-glucosídeo e C3R: cianidina 3-rutinosídeo.....58

**Figura 5.** Gráfico com as concentrações seriadas da PLFE, em mg/L (eixo x) versus a % de captura de DPPH (eixo y).....61

**Figura 6.** Gráfico com as concentrações seriadas de DPPH, em mM (eixo x) versus absorvância (eixo y).....61

### Capítulo 3. Efeito da polpa dos frutos de *Euterpe edulis* Mart. nos fatores de risco e lesões ateroscleróticas em camundongos apoE<sup>-/-</sup>.

<b>Figura 1.</b> Método de análise de imagem para avaliar esteatose hepática (imagem digital de seção embebidas em parafina coradas com hematoxilina e eosina, barra).....	80
<b>Figura 2.</b> Percentagem de lesões ateroscleróticas dos grupos experimentais.....	88
<b>Figuras 3 e 4.</b> Atividade das enzimas catalase e superóxido dismutase (U/mg de proteína) no fígado.....	91

## LISTA DE TABELAS

### Capítulo 2. Caracterização química, nutricional e capacidade antioxidante da polpa dos frutos de *Euterpe edulis* Mart.

**Tabela 1.** Prospecção fitoquímica da polpa liofilizada dos frutos de *E. edulis*..44

**Tabela 2.** Composição centesimal, de minerais e vitaminas da polpa liofilizada dos frutos de *E. edulis* e *E. oleracea*.....52

**Tabela 3.** Prospecção fitoquímica da polpa liofilizada dos frutos de *E.edulis*...56

**Tabela 4.** Quantificação por HPLC/DAD das antocianinas em PLFE. ....59

**Tabela 5.** Antocianinas identificadas na polpa liofilizada de *E. edulis* por HPLC/MS.....59

**Tabela 6.** Concentrações da PLFE e suas correspondentes absorvâncias e % de captura de radical livre DPPH.....60

### Capítulo 3. Efeito da polpa dos frutos de *Euterpe edulis* Mart. nos fatores de risco e lesões ateroscleróticas em camundongos apoE<sup>-/-</sup>.

**Tabela 1.** Composição das dietas experimentais administradas aos animais.....75

**Tabela 2.** Peso corporal dos grupos experimentais antes e após o ensaio biológico.....82

**Tabela 3.** Consumo de antocianinas (mg) por dia e por Kg de peso corporal dos grupos de animais que receberam 2 (G3), 6 (G6) e 10% (G5) de PLFE.....83

**Tabela 4.** Valores sanguíneos de colesterol total, HDL colesterol, triglicerídeos e glicose dos grupos experimentais. ....84

**Tabela 5.** Efeito do tratamento com a PLFE na densidade volumétrica de componentes hepáticos de camundongos apoE -/-.....94

## LISTA DE QUADROS

**Capítulo 1. Revisão: Efeitos biológicos das antocianinas no processo aterosclerótico.**

**Quadro 1.** Estudos *in vivo* com humanos e animais que correlacionam às antocianinas (ACN) e suas atividades antioxidantes.....13

**Quadro 2.** Estudos *in vitro* com células humanas e de animais que correlacionam às antocianinas (ACN) e suas atividades antioxidantes.....15

**Quadro 3.** Estudos que avaliaram a atividade antioxidante de vegetais ou seus derivados, ricos em antocianinas.....18

## RESUMO

CARDOSO, Luciana Marques, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, Julho de 2012. **Caracterização química, nutricional e potencial antioxidante da polpa dos frutos de *Euterpe edulis* Martius e sua avaliação nos fatores de risco e nas lesões ateroscleróticas em camundongos apoE<sup>-/-</sup>**. Orientador: João Paulo Viana Leite. Co-orientadores: Maria do Carmo Gouveia Peluzio e José Humberto de Queiróz.

A espécie *Euterpe edulis* Martius, da família Arecaceae, popularmente chamada de palmeira juçara e pertencente ao mesmo gênero botânico do açazeiro da Amazônia (*Euterpe oleracea* Martius) produz frutos de coloração roxa intensa, devido, principalmente, à presença de antocianinas. As antocianinas possuem propriedades antioxidantes e antiinflamatórias e há evidências que podem contribuir para a redução da progressão de lesões ateroscleróticas. Assim, o objetivo do presente trabalho foi caracterizar a composição química, nutricional e o potencial antioxidante da polpa liofilizada dos frutos de *E. edulis* (PLFE) e avaliar seu efeito nos fatores de risco e nas lesões ateroscleróticas em camundongos ApoE<sup>-/-</sup>. Foi encontrado por HPLC-DAD e HPLC-ESI-MS a presença de seis antocianinas, sendo a cianidina 3-rutinosideo (440 mg/100g) e a cianidina 3-glicosideo (147 mg/100g) as predominantes. Na PLFE também foi identificado outros compostos como polifenóis, flavonóides, saponinas,  $\beta$ -caroteno e minerais, como o Ca, P, Na, K, Mg, Zn, Fe, Cu e Mg. A composição centesimal da PLFE apresentou 6,98% de proteína, 41,4% de lipídios e 42,17% de carboidratos, sendo que destes 71,89% e 10,85% é representado por fibra insolúvel e fibra solúvel, respectivamente. Com relação ao perfil lipídico da PLFE, foi identificado um alto conteúdo de ácidos graxos insaturados (72,93%), sendo que destes 33,02% e 39,91% foram constituído de ácidos graxos monoinsaturados e poliinsaturados, respectivamente. A PLFE apresentou atividade antioxidante, mensurada por DPPH, sendo o valor de EC50 de 81,7 ppm. Os tratamentos com a PLFE foram também comparados com o acetato de  $\alpha$ -tocoferol e ambos reduziram fatores de risco associados a aterosclerose. Os resultados *in vivo* sugeriram atividade antioxidante da PLFE, acarretando na diminuição significativa da atividade da catalase em todos os tratamentos com a PLFE

(doses de 2, 6 e 10%) e no grupo que recebeu acetato de  $\alpha$ -tocoferol (G6), em relação ao controle positivo (G2). A atividade da superóxido dismutase e os níveis de triglicérides plasmáticos foram reduzidos no G4, que recebeu a dose de 6% de PLFE na dieta. Uma atividade antiinflamatória da PLFE na dose de 10% pode ser destacada, através da redução de infiltrados inflamatórios, das gotículas de lipídeos e de colágeno no fígado dos camundongos apoE<sup>-/-</sup>, componentes estes associados a processos inflamatórios como a esteatose e a fibrose hepática. Nossos resultados sugerem que compostos presentes na PLFE, como as antocianinas, fibras, ácidos graxos insaturados, vitaminas e minerais, podem contribuir para reduzir fatores de risco associados à aterosclerose.

## ABSTRACT

CARDOSO, Luciana Marques, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July 2012. **Chemical, nutritional and potential antioxidant characterization from pulp of *Euterpe edulis* Martius fruits and its avaluation on risk factors and atherosclerotic lesions in apoE<sup>-/-</sup> mice.** Advisor: João Paulo Viana Leite. Co-advisors: Maria do Carmo Gouveia Peluzio and José Humberto de Queiróz.

The fruits of the species *Euterpe edulis* Martius, family Arecaceae, popularly called palm juçara and belonging to the same botanical genus of Amazonian açai (*Euterpe oleracea* Martius) have purple colored, mainly due to the presence of anthocyanins. Anthocyanins have antioxidant and anti-inflammatory properties and there is evidence that may contribute to reducing the progression of atherosclerotic lesions. The objective of this study was to characterize the chemical composition, nutritional and antioxidant from freeze-dried pulp of *E. edulis* fruits (PLFE) and evaluate its effect on risk factors and atherosclerotic lesions in mice in the ApoE<sup>-/-</sup>. Was found by HPLC and HPLC-DAD-ESI-MS the presence of six anthocyanins, is the predominant cyanidin 3-rutinoside (440 mg/100 g) and cyanidin 3-glucoside (147 mg/100g). In PLFE other compounds was also identified as polyphenols, flavonoids, saponines, significant amounts of  $\beta$ -carotene and minerals such as Ca, P, Na, K, Mg, Zn, Fe, Cu and Mg. The chemical composition of PLFE consisted of 6.98% protein, 41.4% lipids and 42.17% carbohydrates, and of these 71.89% and 10.85% is represented by insoluble fiber and soluble fiber, respectively. Regarding the lipid profile of PLFE, we identified a high content of unsaturated fatty acids (72.93%), and of these 33.02% and 39.91% consisted of polyunsaturated and monounsaturated fatty acids, respectively. The PLFE proved to have antioxidant activity (measured by DPPH) being EC50 values of 81.7 ppm. Treatments with PLFE were also compared with the  $\alpha$ -tocopherol acetate and both were unable to act directly on atherosclerosis by reducing the atherosclerotic lesions, but reduced risk factors associated with this disease. The in vivo results suggested antioxidant activity PLFE, resulting in significant reduction of catalase activity in all treatments with PLFE doses (2, 6 and 10%) and in the group given  $\alpha$ -tocopherol acetate (G6), in compared to positive control (G2). The activity of

superoxide dismutase and plasma triglyceride levels were reduced in G4, which received a dose of 6% in the diet PLFE. Anti-inflammatory activity of PLFE at a dose of 10% can be enhanced through the reduction of inflammatory infiltrates, lipid droplets and collagen in the liver of mice apoE<sup>-/-</sup>, these components associated with inflammatory processes such as hepatic steatosis and fibrosis. Our results suggest that compounds present in PLFE such as anthocyanins, fiber, unsaturated fatty acids, vitamins and minerals, can help reduce risk factors associated with atherosclerosis.

## INTRODUÇÃO GERAL

O Brasil é um dos países com maior biodiversidade do planeta, sendo que quase um terço das florestas tropicais remanescentes do mundo estão em seu território, sendo estas reconhecidas como um dos mais importantes repositórios da diversidade biológica global. Entretanto, essas áreas vêm sendo rapidamente destruídas em decorrência da atividade humana acelerada (Brasil, 2006).

A Mata Atlântica é um dos biomas mais devastado e ameaçado do planeta. Uma longa história de exploração de recursos eliminou a grande parte desta floresta tropical, restando atualmente menos de 7% da sua extensão original (Pinto e Brito, 2005).

Visando o uso sustentável e agregação de valor aos recursos vegetais presentes na Mata Atlântica, o desenvolvimento de pesquisas de prospecção de novos fármacos, cosméticos e alimentos, torna-se estratégico para a construção de um modelo de exploração aliado a conservação do bioma. Como parte do portfólio de produtos possíveis de serem desenvolvidos a partir de recursos vegetais da Mata Atlântica, destacam-se os alimentos funcionais.

Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária Alimento (Anvisa, RDC 18/99) o alimento ou ingrediente que alegar propriedades funcionais ou de saúde pode, além das funções nutritivas básicas, quando se tratar de nutriente, produzir efeitos metabólicos e ou fisiológicos e ou efeitos benéficos à saúde, devendo ser seguro para consumo sem supervisão médica.

A espécie *Euterpe edulis* Mart. da família Arecaceae, conhecida popularmente como palmeira juçara, produz um palmito comestível muito apreciado por seus consumidores, mas que vem sendo explorado de uma forma ilegal, contribuindo para a extinção desta espécie e para a perda de áreas remanescentes de Mata Atlântica (Reis, 1996).

Uma das partes pouco utilizadas da *E. edulis* são os seus frutos. O despulpamento deles origina um produto semelhante à polpa do açaí, que é extraído de frutos de palmeiras do mesmo gênero botânico, a *Euterpe oleracea* Mart. conhecida como açaizeiro da Amazônia. A utilização dos frutos de *E. edulis* também pode contribuir para a preservação da espécie, uma vez que para o aproveitamento dos seus frutos não se faz necessária a derrubada da árvore e, após o

processamento da polpa, suas sementes podem ser aproveitadas para a obtenção de mudas e para a confecção de artesanatos.

A polpa dos frutos de *E. edulis* é rica em antocianinas (De Brito et al., 2007; Borges et al., 2011). Entre as várias substâncias presentes nos alimentos de origem vegetal, as antocinainas, que são metabólitos secundários biossintetizados por plantas e pertencentes ao grupo dos flavonóides (Leite, 2008), têm se destacado por suas propriedades antioxidantes e antiinflamatórias (Yi et al., 2010; Beltrán-Debón et al., 2010). E como na patogenia da aterosclerose processos inflamatórios e o estresse oxidativo estão envolvidos, há evidências que as antocianinas possam reduzir o desenvolvimento e a progressão de placas de ateroma (Feio et al., 2012; Xie et al., 2011; Xia et al., 2006).

O conhecimento da composição química, fitoquímica e nutricional dos frutos de *E. edulis* é ainda muito limitado, sendo estes pontos importantes para a determinação do potencial nutricional e farmacológico deste fruto e da sua possibilidade de ser considerado um alimento funcional. Assim, este trabalho objetiva caracterizar a composição química, fitoquímica, nutricional e o potencial antioxidante da polpa liofilizada dos frutos de *E. edulis* (PLFE) e avaliar seu efeito nos fatores de risco e nas lesões ateroscleróticas em camundongos ApoE<sup>-/-</sup>.

## **OBJETIVO GERAL**

Caracterizar a composição química, nutricional e o potencial antioxidante da polpa liofilizada dos frutos de *E. edulis* e avaliar seu efeito nos fatores de risco e nas lesões ateroscleróticas em camundongos ApoE<sup>-/-</sup>.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Anvisa. Resolução nº 18, de 30/04/1999. Disponível em: <http://www.e-legis.bvs.br/leisref/public/search.php>. Acesso em fevereiro de 2009.

Beltrán-Debón, R., Alonso-Villaverde, C., Aragonés, G., Rodríguez-Medina, I., Rull, A., Micol, V., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutiérrez, A., Camps, J., Jovem, J. (2010). The aqueous extract of *Hibiscus sabdariffa* calices modulates the production of monocyte chemoattractant protein-1 in humans. *Phytomedicine*, 17, 186-191.

Brasil. Ministério do Meio Ambiente. (2006). O corredor central da mata atlântica: uma escala de conservação da biodiversidade. (1ª ed.). Ministério do Meio Ambiente, Conservação Internacional e Fundação SOS Mata Atlântica. Brasília. *Ministério do Meio Ambiente; Conservação Internacional*, 46 p.

Borges, G.S.C., Vieira, F.G.K., Copetti, C., Gonzaga, L.V., Zambiasi, R.C., Filho, J.M., Fett, R. (2011). Chemical characterization, bioactive compounds, and antioxidant capacity of jussara (*Euterpe edulis*) fruit from the Atlantic Forest in southern Brazil. *Food Research International*, 44 (7), 2128-2133.

De Brito, E.S., Araújo, M.C.P., Alves, R.E., Carkeet, C., Clevidence, B.A., Novotny, J.A. (2007). Anthocyanins Present in Selected Tropical Fruits: Acerola, Jambolão, Jussara, and Guajiru. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 55, 9389-9394.

Feio, C.A., Izar, M.C., Ihara, S.S., Kasma, S.H., Martins, C.M., Feio, M.N., Maués, L., Borges, N.C., Moreno, R.A., Póvoa, R.M., Fonseca, F.A. (2012). *Euterpe oleracea* (açai) Modifies Sterol Metabolism and Attenuates Experimentally-Induced Atherosclerosis. *Journal of Atherosclerosis and Trombosis*, 19 (3), 237-245.

Leite, J.P.V. Fitoterapia: bases científicas e tecnológicas. São Paulo: *Atheneu*, 328p., 2008.

Reis, M. S. (1996). Distribuição e dinâmica da variabilidade genética em populações naturais de palmito (*Euterpe edulis* Martius). Tese de Doutorado em Agronomia/Genética e Melhoramento de Plantas, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/Universidade de São Paulo, Piracicaba, 210p.

Xia, X., Ling, W., Ma, J., Xia, M., Hou, M., Wang, Q., Zhu, H., Tang, Z. (2006). An Anthocyanin-Rich Extract from Black Rice Enhances Atherosclerotic Plaque Stabilization in Apolipoprotein E–Deficient Mice. *Journal Nutrition*, 136, 2220–2225.

Xie, C., Kanga, J., Burrisa, R., Ferguson, M.E., Schauss, A.G., Nagarajana, S., Wua, X. (2011). Açai juice attenuates atherosclerosis in ApoE deficient mice through antioxidant and anti-inflammatory activities. *Atherosclerosis*, 216, 327-333.

Yi, I., Chen, C., Jin, X., Mi, M., Chang, Hui., Ling, W., Zhang, T. (2010). Structural requirements of anthocyanins in relation to inhibition of endothelial injury induced by oxidized low-density lipoprotein and correlation with radical scavenging activity. *FEBS Letters*, 584, 583-590.

# CAPÍTULO 1

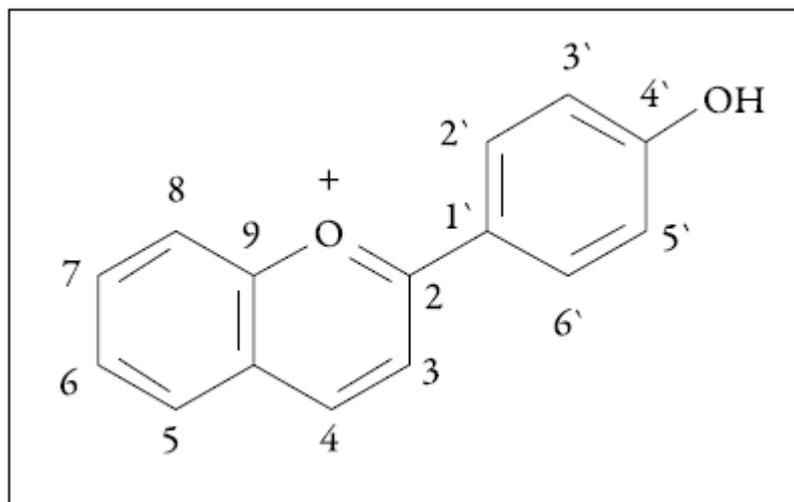
## REVISÃO: EFEITOS BIOLÓGICOS DAS ANTOCIANINAS NO PROCESSO ATEROSCLERÓTICO

**Observação:** Artigo publicado em 2011, com modificações (Cardoso, L.M., Leite, J.P.V., Peluzio, M.C.G. 2011. Efeitos biológicos das antocianinas no processo aterosclerótico. *Revista Colombiana Ciências Química Farmaceutica*, 40, 116-138).

## 1. INTRODUÇÃO

As antocianinas são pigmentos naturais que pertencem ao grupo de metabólitos secundários vegetais conhecidos como flavonóides. Uma das principais funções das antocianinas nos vegetais são a atração de agentes polinizadores e dispersores de sementes e a proteção a diversos tecidos da planta durante as etapas de seu ciclo de vida (Eibond et al., 2004).

As antocianinas ocorrem na natureza como glicosídeos de antocianidinas e podem ser aciladas com ácidos orgânicos aromáticos ou alifáticos como, cumárico, caféico, ferúlico, p-hidroxibenzóico, acético, malônico, succínico, oxálico e ácidos málicos (Gris et al., 2007). Sua estrutura geral é derivada do cátion flavílio (Figura 1).

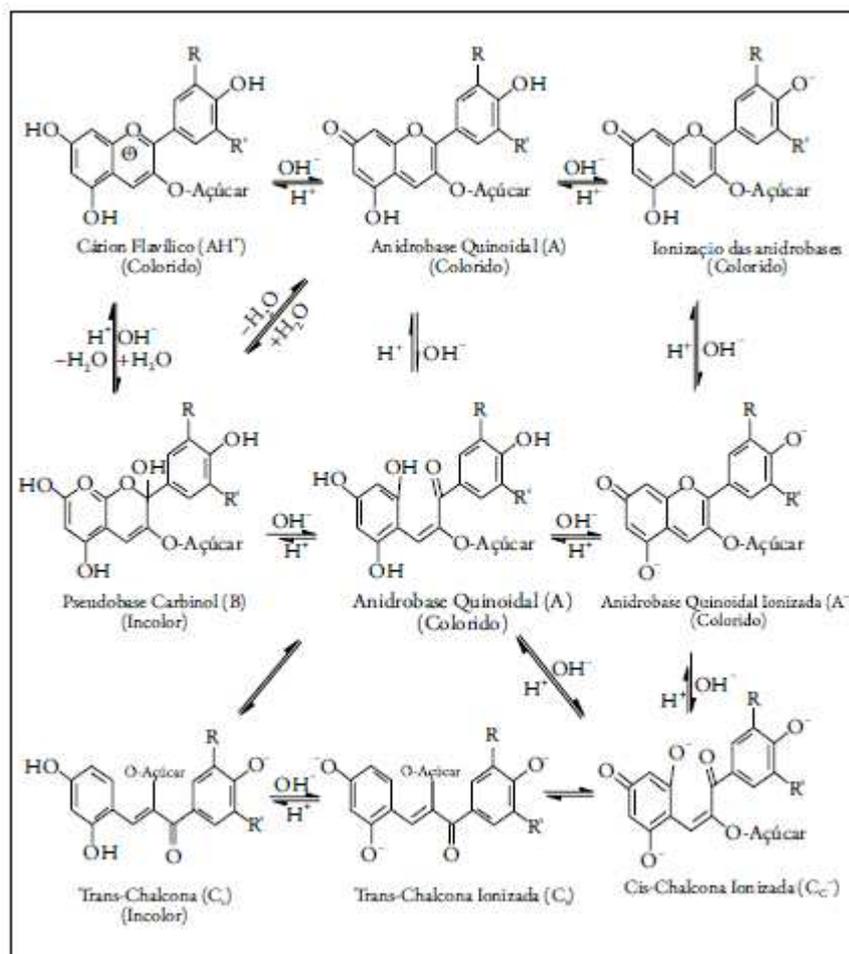


**Figura 1.** Estrutura do cátion flavílio.

As antocianinas podem apresentar diferentes formas estruturais, tais como o cátion flavílio, a base quinoidal, o carbinol e a chalcona. Essas estruturas podem sofrer interferência de diversos fatores, as quais podem assumir diferentes colorações, destacando-se entre estes a temperatura, o valor do pH e possíveis ligações com outras substâncias químicas. O pH é o fator que mais influencia na coloração das antocianinas, visto que, em função de sua acidez ou alcalinidade, estas podem apresentar diferentes estruturas (Bordignon et al., 2009).

Com o aumento do pH ocorre nas antocianinas uma diminuição da coloração e do número de ligas duplas conjugadas, que são responsáveis pelo aumento nos máximos de absorção das substâncias, pela protonação do cátion flavílio. Em meio

ácido (pH=1), as antocianidinas apresentam sua máxima coloração (cátion flavílio) e em pH ainda ácido, porém maior (pH=4,5), as antocianidinas apresentam uma coloração vermelha bem menos intensa, próximo ao incolor, como mostra a Figura 2 (Turker et al., 2006).



**Figura 2.** Possíveis transformações estruturais sugeridas para antocianinas em meio aquoso em função do pH.

As antocianinas são solúveis em água e podem ser facilmente extraídas com solventes polares. Solventes alcoólicos, como metanol e etanol, são os mais utilizados. Muitos trabalhos têm empregado solventes extratores alcoólicos acidificados para favorecer a extração, pois auxilia a penetração do solvente nos tecidos das frutas e vegetais, além de aumentar a estabilidade dos extratos por dificultar o aparecimento de fungos (Macz-Pop et al., 2006). Porém, o uso de solventes ácidos para a extração de antocianinas deve ser cauteloso, pois o excesso de ácido pode promover sua hidrólise, levando a formação de antocianidinas e

outros flavonóides. O aquecimento durante a extração também deve ser observado, pois estudos indicam que as antocianinas são termicamente estáveis até 60°C (Terci, 2004; Turker et al., 2006).

Com relação à estabilidade das antocianinas, esta é influenciada por diversos fatores, como temperaturas de extração e de armazenamento exposição à luz, variações de pH e ação de agentes oxidantes (Turker et al., 2006).

A quantidade e o tipo das antocianinas nos vegetais também sofrem influência de alguns determinantes, como as condições de cultivo, tempo de plantio, exposição à luz UV e método de colheita. Por esse motivo, a comparação de teores de antocianinas entre diferentes culturas de um mesmo vegetal, como frutas, ou entre culturas de vegetais diferentes pode gerar resultados bastante distintos (Siriwoham et al., 2004).

Há diversos métodos descritos na literatura para quantificar as antocianinas (totais ou individuais), dentre os quais se destacam aqueles que envolvem: polarografia, colorimetria, espectrofotometria UV-VIS, cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e espectrometria de massas (Castañeda-Ovando et al., 2009; Tian et al., 2005; Harbone, 1994).

Observa-se um crescente interesse no uso de antocianinas em diversos segmentos, dentre os quais se destacam as indústrias alimentícia, farmacêutica e cosmética, onde podem ser aplicadas, por exemplo, como corantes, principalmente corantes vermelhos, os quais são os corantes naturais mais difíceis de encontrar na natureza em forma estável. Entretanto, o uso industrial de antocianinas como corantes ainda é restrito devido a algumas limitações, dentre as quais podemos citar a baixa estabilidade e a capacidade corante reduzida, quando comparadas a corantes sintéticos, além de dificuldades na etapa de purificação e do alto custo desse processo (Macz-Pop et al., 2006).

Como importantes fontes de antocianina na dieta podem ser citadas as frutas como o açaí, ameixa, amora, cereja, figo, framboesa, uva, maçã, morango e acerola e os vegetais, como o repolho roxo, batata roxa, berinjela, entre outros (Eibond et al., 2004).

Estima-se que a ingestão de antocianinas nos Estados Unidos, principalmente na forma de cianidina e malvidina, esteja entre 12 a 215 mg/dia por indivíduo (Wu et al., 2006), a qual é maior que outros flavonóides incluindo quercetina, kaempferol, miricetina, apigenina e luteolina (Hertog et al., 1993).

Além de suas funções como corantes naturais, as antocianinas têm apresentado grandes benefícios à saúde devido suas atividades biológicas, que incluem propriedades antioxidantes (Garcia-Alonso et al., 2008), antiinflamatórias (Xia et al., 2009), inibição da oxidação do LDL (Chang et al., 2006), diminuição dos riscos de doenças cardiovasculares (Toufektsian et al., 2008) e de câncer (Chen et al., 2006).

## **2. PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES DAS ANTOCIANINAS**

O estresse oxidativo é caracterizado por um desequilíbrio entre moléculas oxidantes, como os radicais livres, e antioxidantes, favorecendo o aumento de agentes oxidantes no sistema biológico. Nessa situação, os oxidantes podem provocar danos em estruturas celulares, como os ácidos nucleicos, proteínas e lipídios (Ribeiro et al., 2008).

Radical livre é uma espécie química que tem elétrons desemparelhados, sendo por isso instável e com grande capacidade de reatividade. Outras espécies químicas podem-se formar a partir dos radicais livres, que embora, não tenham elétrons desemparelhados, possuem similar instabilidade estrutural dos radicais livres. Assim, para designar as espécies reativas na forma de radical livre e não radical são utilizados os termos espécies reativas de oxigênio (EROs) e espécies reativas de nitrogênio (ENOs) (Ribeiro et al., 2008).

As espécies reativas são formadas a partir de inúmeras reações no organismo, como parte de seu metabolismo normal. Como exemplos há a formação de íons superóxidos por células de defesa imunológica e a partir do oxigênio molecular ( $O_2$ ) por meio da respiração mitocondrial, assim como a formação de óxido nítrico como mecanismo de vasodilatação vascular. Porém condições patológicas como a inflamação e fontes endógenas, como o cigarro, poluentes do ar, radiação, medicamentos e dieta podem aumentar a produção das espécies reativas (Madamanchi et al., 2001).

A ocorrência de um estresse oxidativo moderado, frequentemente é acompanhada pelo aumento das defesas antioxidantes enzimáticas, mas a produção de uma grande quantidade de radicais livres pode causar danos e morte celular (Anderson, 1996). Os danos oxidativos induzidos nas células e tecidos têm sido relacionados com a etiologia de várias doenças, incluindo, a aterosclerose.

As EROs, parecem ser uma das principais causas da disfunção endotelial que precede e promove a aterogênese. As EROs podem lesar membranas celulares e o núcleo, interagir com mediadores vasomotores, inativando seus efeitos vasodilatadores, e, principalmente, oxidar os lipídios da LDL, elemento chave na aterosclerose (Aviram et al., 2000).

O organismo humano possui mecanismos de defesa antioxidante, os quais atuam intracelular e extracelularmente e mantém o equilíbrio redox da célula, assegurando que o aumento das EROs seja transitório. Existem dois mecanismos antioxidantes: o enzimático e o não enzimático, os quais agem cooperativamente para manter o equilíbrio dos radicais livres no organismo (Ribeiro et al., 2008).

O mecanismo de defesa enzimático é a primeira linha de defesa do organismo contra os danos oxidativos. O sistema é constituído por um conjunto de enzimas, tais como a superóxido dismutase, glutathione peroxidase, glutathione reductase, catalase, tioredoxinas, peroxiredoxinas e inúmeras outras redutases (Ribeiro et al., 2008). Já o mecanismo não-enzimático é constituído por um grande número de compostos de baixo peso molecular, ingeridos pela dieta (nutrientes e não-nutrientes) ou sintetizados no organismo, como as vitaminas A, C e E, o peptídeo glutathione e os flavonóides (Ribeiro et al., 2008; Singh, 2006).

Estudos *in vitro* e *in vivo* mostram que as antocianinas podem atenuar o estresse oxidativo envolvido no processo aterosclerótico. Sendo que vários mecanismos podem estar envolvidos nesse processo, como a capacidade das antocianinas em inibir a oxidação do LDL (Chang et al., 2006) e reduzir a injúria oxidativa das células endoteliais vasculares (Yi et al., 2010).

Os efeitos biológicos antioxidantes das antocianinas dependem da sua estrutura química, tais como grau de glicosilação e números de grupos hidroxilas (Kong et al., 2003). O número de hidroxilas (-OH) total, a presença de hidroxilas nas posições C3' e C4' no anel B e no C3 do anel C parecem ser os principais requisitos estruturais para as antocianinas inibirem a injúria oxidativa das células endoteliais e a atividade intracelular de radicais livres. E a presença de metilações nas posições (C3', C4' e C3) reduzem esses efeitos. Comparando as substituições por diferentes açúcares, as antocianinas que possuem os monossacarídeos glicose e galactose apresentam benefícios antioxidantes superiores com relação as que contêm dissacarídeos (Yi et al., 2010).

Nos Quadros 1 e 2 encontram-se resumos de trabalhos realizados *in vivo* e *in vitro*, respectivamente, que correlacionam a atividade antioxidante das antocianinas ou de frutos que são fontes características desse flavonóide.

A capacidade antioxidante das antocianinas também tem sido extensivamente avaliada nos derivados dos vegetais ricos nesse flavonóide, como nas polpas e sucos, como representado no Quadro 3.

**Quadro 1:** Estudos *in vivo* com humanos e animais que correlacionam às antocianinas (ACN) e suas atividades antioxidantes.

Participantes	Material Avaliado	Dose/Duração	Análises	Resultados	Referências
<b>HUMANOS</b>					
120 indivíduos com dislipidemia (42 homens e 78 mulheres), com idade entre 40-65 anos.	Cápsula com 17 tipos de ACN (58% delfinidina e 33% cianidina) extraídas de <i>Vaccinium myrtillus</i> (mirtillo) e <i>Ribes Nigrum</i> (groselha preta).	320mg/dia (4 cápsulas de 80mg) por 12 semanas.	<u>Plasma:</u> colesterol total, HDL, LDL, triglicerídeos, glicose, apoproteína A e B, atividade da LCAT* e CETP** e marcadores hematológicos.	↑ HDL (13,7%) ↓ LDL (13,6%) ↓ atividade CETP (10,4% e 6,3%, respectivamente).	Quin et al., 2009
7 indivíduos saudáveis (2 homens e 5 mulheres), idade média de 31 anos.	Extrato com 183mg de vários tipos de antocianinas extraídas do vinho tinto (71,2% de ACN monoglicosiladas).	Dose única de 12g do extrato de ACN.	<u>Plasma:</u> MCP-1, FRAP (capacidade de redução de ferro do plasma) e TEAC (capacidade antioxidante equivalente ao Trolox).	↓ MCP-1 após 3hs de ingestão do extrato. Não houve diferença significativa de FRAP e TEAC.	Garcia-Alonso et al., 2008
12 voluntários saudáveis, com idade entre 21-31 anos.	Polpa e suco clarificado*** de açaí ( <i>E.oleracea</i> ). ACN polpa: 303.8mg/kg e suco:165.9mg/kg. ACN predominante: cianidina-3-glicosídeo.	Dose única de 7mL/kg de peso corporal.	<u>Plasma:</u> ORAC (Capacidade de Absorção do Radical de Oxigênio) e ácido úrico. <u>Urina:</u> ORAC Amostras de sangue e urina coletadas 4hs e 24hs após o consumo da polpa ou suco de açaí.	↑ Capacidade antioxidante no plasma (polpa = ↑ 3vezes; suco ↑ 2,3 vezes). Sem alterações na concentração de ácido úrico no plasma e da capacidade antioxidante na urina.	Mertens-Talcott et al., 2008
<b>ANIMAIS</b>					
32 ratos Ficher fêmeas com 9 semanas de idade e peso	Polpa de açaí pasteurizada ( <i>Euterpe oleracea</i> ).	Dieta purificada com 2% de açaí por 6 semanas.	<u>Soro:</u> perfil lipídico, atividade da paraoxanase arilesterase (PON1)****, proteína carbonilada e	↓ Colesterol total e LDL, sem modificação no HDL e triglicerídeos. ↓ Proteínas carboniladas	Souza et al., 2009

médio de 145g. Grupos (n=8): 1- controle (C), 2-C + açai (A), 3- hipercolesterolê -micos (H), 4-H +açai (HA).			grupos de proteínas sulfidrilas, atividade da superóxido dismutase (SOD), da fosfatase alcalina (ALP), da alanina aminotransferase (ALT) e da aspartato aminotranferase (AST).	totais e livres e ↓ grupos de proteínas sulfidrilas (marcadores de oxidação protéica). ↓ SOD apenas no grupo HA. ↑Atividade PON1. ↓ Ingestão alimentar no grupo HA.	
--	--	--	---	---	--

\*LCAT (lecitina colesterol acil transferase).

\*\*CETP (proteína de transferência de colesterol esterificado).

\*\*\*A clarificação objetiva remover a turbidez do suco. Esta turbidez é devida principalmente a fibras, taninos e pectina em suspensão.

\*\*\*\*A PON1 (paraoxanase) é uma enzima sintetizada no fígado que apresenta atividade antioxidante

**Quadro 2:** Estudos *in vitro* com células humanas e de animais que correlacionam às antocianinas (ACN) e suas atividades antioxidantes.

Tipo de células	Material Avaliado	Dose e duração da incubação	Análises	Resultados	Referências
<b>CÉLULAS HUMANAS</b>					
Células vasculares endoteliais tratadas com 100µg/mL de LDL-ox por 24hs.	21 tipos de padrões de ACN.	Células incubadas por 2hs com 100µM de ACN.	Malondialdeído (MDA), óxido nítrico, atividade antioxidante intracelular por DCFH-DA (diacetato 2'7' diclorofluoresceína).	Com exceção da ACN quercetagenidina, todas as ACN: ↓ MDA (produto da peroxidação lipídica). ↓ óxido nítrico ↑ atividade antioxidante	Yi et al., 2010
Células sanguíneas incubadas com 50µM de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .	Extrato aquoso de <i>Hibiscus sabdariffa</i> , rico nas ACN delfinidina e cianidina.	Células incubadas com 10, 50 e 100µg/mL do extrato por 24hs.	Apoptose celular, MCP-1 e citotoxicidade de células sadias.	↓ apoptose das células induzidas com H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , e ↓MCP-1, de maneira dose dependente Doses de até 2000µg/mL do extrato não promoveram citotoxicidade em células sadias.	Beltrán-Debón et al., 2010
Cultura de células hepáticas HepG2.	Cianidina-3-glicosídeo.	0, 5, 10, 25, 50 e 100 µg/L por 24 horas.	Atividade relativa de CETP (proteína de transferência de colesterol esterificado).	↓ atividade de CETP dose dependente.	Quin et al., 2009
<b>CÉLULAS ANIMAIS</b>					
Células de gliomas cerebrais de ratos	Extrato liofilizado de açaí ( <i>Euterpe oleracea</i> ), rico em antocianinas (100mg/g).	As células foram tratadas por 24, 48 e 72hs com as doses do extrato: 50,100 e 200µg/mL.	Viabilidade celular (IC <sub>50</sub> ) Atividade antioxidante do extrato (ORAC, DPPH).	Inibição, dose dependente, do crescimento das células cancerígenas. Alta capacidade antioxidante do extrato de açaí (ORAC e DPPH: 2589µmoles e 1208 µmoles equivalentes de Trolox, respectivamente.	Hogan et al., 2010

Macrófagos de camundongos (RAW264,7) incubados com LDLox	Extrato metanólico liofilizado das folhas de <i>Hibiscus sabdariffa</i> , rico em antocianinas (85-90%).	<u>Morfometria:</u> 0,05 - 0,2µg/mL do extrato. <u>Expressão de CD36:</u> 0,01-0,2µg/mL do extrato.	Formação de células espumosas (análise morfológica usando o corante Oil-Red). Expressão gênica do receptor scavenger ou removedor CD36 (por RT-PCR).	↓ Formação das células espumosas. ↓ Expressão de CD36.	Kao et al., 2009
Células de monócitos e macrófagos de camundongos estimuladas com lipopolissacarídeo e citocinas.	Extratos etanólico, de acetato de etila e butanólico liofilizados de flores, frutos e casca do caule de <i>E. oleracea</i> (açai). ACN: cianidina-3-glicosídeo e cianidina-3-raminosídeo.	Para avaliar a produção do óxido nítrico e a expressão de iNOS, as células foram incubadas com doses entre 1-300µg/mL dos extratos por 24hs e 6hs, respectivamente	Óxido nítrico e expressão de iNOS (óxido nítrico sintase reduzida)	Os melhores resultados (↓óxido nítrico e ↓da expressão de iNOS) foram encontrados com 100µg/mL nas frações do fruto do açai (continha mais ACN).	Matheus et al., 2006
Macrófagos de camundongos (RAW264,7) incubados com	Extrato metanólico liofilizado das folhas de	Concentrações e tempo de incubação foram	<u>Inibição da oxidação de LDLox</u> induzida por CuSO4- (Mobilidade	Inibição da oxidação do LDL (-50% com 2mg/mL do extrato). ↓ Apoptose celular induzida	Chang et al., 2006

LDLox	<i>Hibiscus sabdariffa</i> , rico em antocianinas (85-90%).	diferentes para cada análise.	eletroforética relativa). <u>Viabilidade celular</u> (Western blotting). <u>Peroxidação lipídica:</u> <u>TBARS*</u> <u>DPPH</u> (2,2-difenil-1-picrilidrazila).	por LDLox. ↓ Quantidade de TBRAS. A adição de >0,1mg/mL do extrato foi capaz de “sequestrar” 95% dos radicais livres DPPH, de maneira dose dependente.	
Fibroblastos de camundongos (NIH-3T3).	Cianidina-3-glicosídeo extraída de frutos do figo ( <i>Ficus carica</i> )	Concentrações e tempo de incubação foram diferentes para cada análise.	Atividade antioxidante (TEAC) da ACN. Formação de EROs. Glutaciona	Inibição da formação de EROs e elevação dos níveis de glutaciona nos fibroblastos, de maneira dose dependente. Alta capacidade antioxidante da ACN em comparação ao Trolox.	Solomon et al., 2010

\*TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico).

**Quadro 3:** Estudos que avaliaram a atividade antioxidante de vegetais ou seus derivados, ricos em antocianinas.

Material Avaliado	Análises	Resultados	Referência
Suco em pó de açaí ( <i>E. oleracea</i> ) produzido por Spray Dryer com 4 agentes carreadores diferentes: maltodextrina 10DE, maltodextrina 20DE, goma arábica e amido de tapioca. Amostras foram estocadas em diferentes temperaturas e atividades de água durante 120 dias.	Atividade antioxidante (DPPH). Teor de antocianinas e sua degradação (método espectrofotométrico).	Alto conteúdo de ACN (3946,14 ± 59,90 mg/100g de matéria seca) e alta atividade antioxidante (1230,43 ± 59,20 µmol Trolox/g de matéria seca). O aumento da temperatura e da atividade de água afetaram negativamente a degradação das ACNs. Até 45-60 dias de armazenamento, as ACNs apresentaram uma maior taxa de degradação. A maltodextrina 10DE mostrou ser o melhor carreador, visto que protegeu mais a degradação das ACNs e apresentou uma atividade antioxidante maior que as outras amostras.	Tonon et al., 2010
18 frutos frescos tradicionais do Brasil	Quantificação compostos bioativos. Atividade antioxidante por vários métodos (ABST, DPPH, FRAP e branqueamento do β-caroteno).	O maior conteúdo de antocianinas e flavonóides foi encontrado na juçara ( <i>Euterpe edulis</i> ). Os teores de vitamina C foram maiores no camu-camu ( <i>Myrciaria dúbia</i> ), seguido pela acerola ( <i>Malpighia emarginata</i> ). O gurguri ( <i>Mouriri guianensis</i> ) e o puçá-preto ( <i>Mouriri pusa</i> ) apresentaram maiores teores de carotenóides e clorofilas, respectivamente. Em geral, todos os frutos apresentaram boa atividade antioxidante, porém essa foi superior, em ordem decrescente no puçá-preto, camu-camu e acerola.	Rufino et al., 2010
11 polpas comerciais integrais (sem conservantes e sacarose) de açaí comercializadas na cidade de Fortaleza.	Atividade antioxidante (TEAC). Vitamina C (método titulométrico) Antocianinas (método espectrofotométrico e extração com etanol 95% + 1,5Mol/L HCl). Carotenóides e compostos	↑ Atividade antioxidante: 10,21 – 52,47 µM de Trolox/g da amostra. ACN: 13,93 – 54,18mg/100g. Carotenóides: 0,21 – 3,84mg/100g. Compostos fenólicos: 182,95 – 592,55 mg de equivalentes de ácido tânico/100g. Correlação positiva apenas das ACNs e compostos fenólicos com a atividade antioxidante das polpas. Todos os parâmetros apresentaram diferença significativa entre as	Santos et al., 2008

	fenólicos totais (método espectrofotométrico).	marcas.	
Extrato metanólico e etanólico de sementes de açaí ( <i>Euterpe edulis</i> ). O extrato metanólico foi preparado por digestão a frio e o etanólico usando o extrator Soxhlet.	Capacidade antioxidante total contra radicais peroxil, peroxinitrito e radicais hidroxil pelo método TOSC (em duplicata).	Os extratos exibiram boa atividade antioxidante, similares a da polpa do açaí, sendo que a digestão a frio com metanol foi mais eficaz. A capacidade antioxidante contra os radicais peroxinitrito e hidroxil foram mais eficazes. ACN predominante: cianidina. Outros polifenóis também foram encontrados, porém em pequenas quantidades: catequina e epicateuina. Conteúdo de polifenóis totais foi maior no extrato metanólico.	Rodrigues et al., 2006

### 3. PROPRIEDADES ANTIINFLAMATÓRIAS DAS ANTOCIANINAS

Existem evidências que comprovam que as antocianinas também apresentam propriedades antiinflamatórias. Alguns autores sugeriram que os efeitos antiinflamatórios das antocianinas podem ser explicados por diferentes mecanismos, tais como:

a) Inibição da ativação do fator nuclear Kappa B (NF-κB) em humanos.

Dentre os mecanismos regulatórios da resposta inflamatória, a via do fator nuclear kappa B (NF-κB) representa uma via crucial no controle da transcrição de vários genes pró-inflamatórios, como citocinas, quimiocinas, moléculas de adesão, proteínas de fase aguda, reguladores da apoptose e da proliferação celular (Winther et al., 2005). Portanto, a inibição desta via pode contribuir para a redução do processo aterosclerótico.

b) Redução da concentração plasmática da proteínas quimiotática de monócitos 1 (MCP-1) em humanos, *in vitro* e *in vivo*.

A MCP-1 é um biomarcador envolvido na evolução de doenças inflamatórias e é expressa, principalmente nas fases iniciais da aterosclerose. (Beltrán-Debón et al., 2010). Essa proteína está envolvida na aterogênese através de diferentes mecanismos. Ela promove o recrutamento de monócitos e linfócitos T circulantes do sangue para o espaço subendotelial e contribui para a diferenciação dos macrófagos em células espumosas (Karlsen et al., 2007). A MCP-1 é uma quimiocina membro da subfamília de quimiocinas secretadas por vários tipos de células presentes na parede arterial, como as células endoteliais, as células musculares lisas, fibroblastos e macrófagos e sua expressão pode ser mediada por fatores de transcrição NF-κB (Gu et al., 1998).

*In vitro*, o extrato aquoso de *Hibiscus sabdariffa* (10, 50 e 100µg/mL), rico nas antocianidinas delphinidina e cianidina, promoveu uma efetiva proteção da morte de células sanguíneas humanas induzidas por adição de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Houve redução na concentração de MCP-1 de uma maneira

dose dependente. O mesmo extrato de *Hibiscus sabdariffa*, porém liofilizado, na dose de 10g foi administrado oralmente a 5 homens e 5 mulheres, ambos saudáveis, com idade entre 23 e 50 anos. As concentrações plasmáticas de MCP-1 reduziram significativamente com a administração aguda de 10g do extrato liofilizado de *Hibiscus sabdariffa* (Beltrán-Debón et al., 2010).

Garcia-Alonso et al. (2008) avaliaram o consumo do extrato de vinho tinto, com alto teor de antocianinas, nos níveis plasmáticos de MCP-1 de indivíduos saudáveis. A caracterização do extrato por HPLC evidenciou a presença de 71,2% de antocianidinas monoglicosiladas do total de antocianidinas, representadas em ordem decrescente, pela malvidina-3-glicosídeo, delphinidina-3-glicosídeo, petunidina-3-glicosídeo, peonidina-3-glicosídeo e cianidina-3-glicosídeo. Sete indivíduos (dois homens e cinco mulheres), com idade média de 31 anos e índice de massa corporal médio de 23,2, receberam oralmente, após jejum de 12 horas, uma dose única de 12g do extrato rico em antocianinas. A dosagem de MCP-1 foi realizada no tempo 0, 3, 6, 10 e 24hs após a ingestão do extrato. Porém, apenas 3 horas após a ingestão do extrato foi encontrado uma redução significativa de MCP-1 no plasma e após 24 horas os níveis de MCP-1 voltaram ao normal. Esse fato pode ser decorrente do extrato ter sido administrado aos participantes do estudo em uma única dose e seria interessante a avaliação da ingestão do extrato rico em antocianinas por um período maior. Os resultados desse trabalho sugeriram fortes evidências de que as antocianinas podem interferir na produção da quimiocina MCP-1, e conseqüentemente, reduzir processos inflamatórios.

- c) Inibição da resposta inflamatória e a apoptose de células endoteliais humanas induzidas pelo fator CD40.

O fator imune CD40 e seu ligante (CD40L) são um dos mediadores do processo inflamatório, e estão sendo considerados como potentes ativadores da patogênese da aterosclerose. O CD40 e CD40L são membros do fator de necrose tumoral (TNF) e da família de receptores de TNF (TNFR) e são expressos pela interação de células imunes como os linfócitos T e B e também por células não imunes, como as células endoteliais vasculares. A ligação do CD40 com seu ligante CD40L induz a produção de várias citocinas e

quimiocinas inflamatórias, tais como as interleucinas e MCP-1, respectivamente, além das moléculas de adesão, como a VCAM-1 (molécula-1 de adesão vascular) e ICAM-1 (molécula-1 de adesão intercelular). Essa interação também parece desempenhar um papel importante no desenvolvimento da ruptura da placa aterosclerótica e na regulação da expressão de metaloproteinases da matriz. A VCAM-1 e ICAM-1 são moléculas pró-inflamatórias que atraem linfócitos T e macrófagos para o ateroma, promovendo a iniciação e a progressão da lesão aterosclerótica. As metaloproteinases da matriz são capazes de degradar componentes da matriz extracelular nos vasos sanguíneos e aumentar a vulnerabilidade das placas ateroscleróticas à ruptura e, conseqüente formação de trombos (Mach et al., 1998).

O tratamento com as antocianinas cianidina-3-glicosídeo e peonidina-3-glicosídeo (1,10 e 100 $\mu$ M) por 24 horas em cultura de células endoteliais humanas da veia umbilical atenuou a resposta inflamatória e a apoptose dessas células induzidas por CD40, por reduzir a secreção de moléculas de adesão (VCAM-1 e ICAM-1), a produção e atividade de metaloproteinases de matriz e suprimir a ativação de JNK e p38 induzida por CD40. Os autores mostraram que a ativação de p38 é um dos mecanismos chaves pelo qual o CD40 induz a resposta inflamatória e a estimulação de JNK é necessária para promover a apoptose das células endoteliais estimuladas por CD40 (Xia et al., 2009).

d) Inibição da produção de óxido nítrico e a expressão de iNOS (óxido nítrico sintase induzida) em células de animais.

A iNOS (óxido nítrico sintase induzida) é a enzima responsável pela produção de óxido nítrico em diferentes células, como macrófagos, células endoteliais e hepatócitos, após ativação com lipopolissacarídeos e citocinas. A utilização de agentes que inibem a atividade e/ou a indução da iNOS pode ser útil como terapêutica na redução de processos inflamatórios em diferentes tecidos (Matheus et al.,2006).

Matheus et al. (2006), evidenciaram efeito inibitório de *Euterpe oleracea* (açai) na produção do óxido nítrico e na expressão da iNOS. Nesse trabalho foi

investigado os efeitos de extratos etanólico, de acetato de etila e butanólico de flores, frutos e casca do caule de *Euterpe oleracea* em cultura de células de monócitos e macrófagos de camundongos (RAW 264,7) estimuladas com lipopolissacarídeos e citocinas. As antocianinas predominantes nos extratos foram a cianidina-3-glicosídeo e cianidina-3-raminosídeo, sendo encontradas em maiores concentrações no extrato etanólico dos frutos de *E.oleracea*. Os resultados mostraram que os extratos obtidos a partir dos frutos (100µg/mL) foram mais potentes em inibir a produção de óxido nítrico e expressão da iNOS, provavelmente por terem um maior conteúdo de antocianinas que as outras frações. A redução da viabilidade celular foi encontrada apenas em altas doses dos extratos (acima de 500µg/mL).

#### **4. PROCESSO DE FORMAÇÃO DA ATEROSCLEROSE**

As doenças cardiovasculares são as principais causas de morbidade e mortalidade no mundo ocidental, sendo suas principais manifestações decorrentes dos eventos clínicos da aterosclerose, como o infarto, as embolias e os acidentes vasculares cerebrais (Ishigaki et al., 2008).

A aterosclerose é caracterizada como uma doença inflamatória crônica de origem multifatorial que ocorre em resposta à agressão endotelial, acometendo principalmente a camada íntima de artérias de médio e grande calibre (Lusis, 2000).

A disfunção endotelial é considerada o fator inicial para a formação das placas ateroscleróticas e caracteriza-se por uma resposta inflamatória à injúria da parede vascular. Um conjunto de reações celulares e moleculares a diversos agressores, dentre eles o excesso de radicais livres, a elevação das partículas de lipoproteína de baixa densidade (LDL) no plasma e a presença de LDL oxidada (LDLox) na íntima das artérias são responsáveis pelo comprometimento vascular (Lusis, 2000; Siqueira et al., 2006).

A oxidação da LDL ocorre principalmente na íntima da artéria (Siqueira et al., 2006). As EROs e as ERNs são as principais responsáveis por esta. As EROs incluem o ânion superóxido ( $O_2^-$ ), o radical hidroxil ( $OH^\cdot$ ) e o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), sendo os representantes principais das ERNs o óxido nítrico ( $NO^\cdot$ ) e o peroxinitrito ( $ONO_2^\cdot$ ) (Singh, 2006).

As partículas de LDL difundem-se passivamente pelas células endoteliais por transporte vesicular, podendo aderir à parede do vaso por interações entre a apoproteína B e os proteoglicanos da matriz subendotelial (Lusis, 2000).

A LDLox estimula a camada de células endoteliais a produzir moléculas de adesão celular como VCAM-1 (molécula-1 de adesão vascular), ICAM-1 (molécula-1 de adesão intercelular), fatores de crescimento, como o M-CSF (fator estimulador de colônia de macrófagos) e proteínas quimiotáticas, como MCP-1 (proteína-1 quimiotática para monócitos), resultando na adesão e no recrutamento de monócitos e linfócitos circulantes para dentro do vaso. Os monócitos migram para o espaço subendotelial onde se diferenciam em macrófagos, que por sua vez captam as LDL-ox, pela ação dos seus receptores seqüestradores (Lusis, 2000).

Dentro dos macrófagos, a LDLox é degradada e o colesterol livre é esterificado, resultando em um grande acúmulo de colesterol e a formação de células espumosas, originando a primeira lesão da aterosclerose: a estria gordurosa (Steinberg, 1997).

Posteriormente, as células musculares lisas começam a migrar da camada média da parede arterial para a íntima ou espaço subendotelial, proliferam e secretam colágeno, dando origem à lesão intermediária. Nesta fase, o espessamento da íntima provoca o remodelamento, ou seja, uma dilatação da artéria, compensatória ao estreitamento do lúmen. Mais uma vez, sob o estímulo da LDLox, as células do sistema imune local liberam enzimas, citocinas e fatores de crescimento capazes de induzir necrose local. Ciclos repetidos de acúmulo e ativação de células mononucleares, migração e proliferação das células musculares lisas com produção de colágeno, levam ao aumento progressivo da lesão, até que se estruture uma capa fibrosa ao redor de um núcleo lipídico e de tecido necrótico, a chamada lesão avançada (Ross, 1999).

Como exposto, a LDLox participa de todas as etapas do processo de desenvolvimento da aterosclerose, desde a disfunção endotelial até a evolução final do processo aterosclerótico, com oclusão total do lúmen do vaso (Siqueira et al., 2006). Além dos seus efeitos biológicos citados, produtos derivados da LDLox são citotóxicos, podendo promover a apoptose celular. Outras contribuições da LDLox para o processo inflamatório na aterosclerose é a

inibição da produção de óxido nítrico, que é um vasodilatador, e por estimular a produção de citocinas, como a interleucina-1, e aumentar a agregação plaquetária (Singh, 2006).

Dentre os mecanismos regulatórios da resposta inflamatória, a via do fator nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B) representa uma via crucial no controle da transcrição de vários genes pró-inflamatórios, cujo envolvimento na patogênese da aterosclerose tem sido documentado, a liberação de proteínas de fase aguda, como citocinas, quimiocinas, moléculas de adesão e reguladores da apoptose e da proliferação celular (Winther et al., 2005). A indução à inflamação promovida pela LDLox parece ser decorrente da ativação dessa via pelos seus fosfolípidos oxidados, como a lisolecitina e o ácido lisofosfatídico (Kovanen et al., 2003).

## **5. ANTOCIANINAS NO TRATAMENTO DA LESÃO ATEROSCLERÓTICA**

Na busca da elucidação de possíveis mecanismos de ação das antocianinas sobre o processo aterosclerótico algumas pesquisas foram realizadas, dando enfoque mais específico. Podemos citar os trabalhos de Xia et al. (2006), Mauray et al. (2009) e Miyazaki et al. (2008) que analisaram os efeitos de extratos com alto teor de antocianinas em camundongos com aterosclerose, o extrato de arroz preto, de uvas e de batata doce roxa, respectivamente.

Xia et al. (2006), investigaram a influência de dietas suplementadas com extrato de arroz preto com alto teor antocianina (300mg/Kg/dia) e com sinvastatina (50mg/Kg/dia) na vulnerabilidade de placas ateroscleróticas avançadas em camundongos deficientes na apoproteína E. Após 20 semanas de intervenção, o tamanho da placa aterosclerótica foi reduzido em 18% e 13% nos grupos de animais que receberam o extrato e a sinvastatina, respectivamente. Em ambos os grupos houve redução da frequência de núcleos necróticos grandes, da espessura da cápsula fibrosa e um aumento no conteúdo de colágeno 1, comparado ao grupo controle. Sabe-se que o aumento no conteúdo de colágeno é importante, pois contribui para a estabilização das placas ateroscleróticas. Nos grupos que receberam o extrato e a sinvastatina também houve decréscimo da expressão da iNOS (óxido

nítrico sintase reduzida) e do fator tecidual, que são importantes fatores pró-inflamatórios durante o desenvolvimento e progressão das lesões ateroscleróticas. Em adição, a suplementação na dieta com o extrato de arroz preto melhorou o perfil lipídico plasmáticos dos camundongos, diminuindo os triglicerídeos, colesterol total e a fração não HDL, porém, também reduziu a fração HDL, comparado com o grupo controle. Comparado com o grupo do extrato, o grupo que recebeu sinvastatina apresentou níveis maiores de triglicerídeos e menores de HDL. Os autores atribuíram esses resultados benéficos do extrato ao seu alto conteúdo de antocianinas. Através de cromatografia líquida de alta performance (CLAE), foram identificadas duas antocianinas majoritárias, a cianidina-3-glicosídeo e peonidina-3-glicosídeo, que representaram 43,2% do total de compostos presentes no extrato.

Mauray et al. (2009) observaram efeito antiaterogênico da suplementação na dieta (0,02%) por 16 semanas com dois extratos ricos em antocianinas extraídos de uvas fermentadas e não fermentadas, em camundongos deficientes na apoproteína E. A suplementação na dieta com os extratos de uva não fermentada e fermentada reduziu as lesões ateroscleróticas em 15% e 36%, respectivamente. O melhor resultado foi observado com o extrato de uvas fermentadas, sugerindo que a fermentação gerou novos compostos bioativos mais eficientes na atenuação da progressão da aterosclerose. Entretanto, não foram observadas alterações na capacidade antioxidante no plasma, mensurada pelas técnicas de capacidade de absorção do radical oxigênio (ORAC), peroxidação lipídica hepática e perfil lipídico (colesterol total e triglicerídeos) plasmático e no fígado dos animais.

Miyazaki et al. (2008) avaliaram o potencial antiaterogênico de antocianinas da batata doce roxa adicionadas por 4 semanas na dieta (1%) de camundongos deficientes na apoproteína E com 6 semanas de idade, alimentados com dieta enriquecida de colesterol e gorduras. *In vitro*, estas antocianinas foram capazes de aumentar a resistência da LDL à oxidação, comparado ao ácido L-ascórbico. Comparado ao grupo controle, os animais que receberam a dieta suplementada com antocianinas da batata doce roxa apresentaram uma redução nas lesões ateroscleróticas (45%), nos níveis de TBARS (substâncias que reagem com o ácido tiobarbitúrico) no fígado e nos níveis plasmáticos de VCAM-1 (molécula-1 de adesão da célula vascular).

Entretanto, não foi observado efeito significativo no perfil lipídico no plasma e no fígado destes animais.

A constatação destes diferentes estudos nos estimula à continuação das especulações, principalmente devido à importância dos resultados dos compostos bioativos em relação aos fármacos.

## **6. CONSIDERAÇÕES FINAIS**

As antocianinas possuem grande potencial em reduzir o risco de desenvolvimento da aterosclerose. Os mecanismos envolvidos neste processo são, principalmente, referentes às atividades antioxidantes das antocianinas e a capacidade destes compostos em reduzir fatores pró-inflamatórios. Ainda há lacunas sobre a dose de antocianinas necessária para exercer estes efeitos. Ademais, é necessário ter cautela com a suplementação desses compostos, visto que essa não foi analisada por longos períodos de tempo em humanos. A ingestão de altas doses de substâncias antioxidantes pode exercer efeitos pró-oxidantes deletérios, principalmente se utilizados por longos períodos.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Anderson, D. (1996). Antioxidant defenses against reactive oxygen species causing genetic and other damage. *Mutation Research*, 350 (1), 103-108.

Aviram, L., Dornfeld, L., Rosenblat, M., Volkova, N., Kaplan, M., Coleman, R. (2000). Pomegranate juice consumption reduces oxidative stress, atherogenic modifications to LDL, and plaquet aggregation: studies in human and in atherosclerotic apolipoprotein E- deficient mice. *American Journal of Nutrition*, 71 (5), 1062-1076.

Beltrán-Debón, R., Alonso-Villaverde, C., Aragonés, G., Rodríguez-Medina, I., Rull, A., Micol, V., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutiérrez, A., Camps, J., Jovem, J. (2010). The aqueous extract of Hibiscus sabdariffa calices modulates the production of monocyte chemoattractant protein-1 in humans. *Phytomedicine*, 17, 186-191.

Bordignon Jr., C., Francescato, V., Nienow, A. A., Calvete, E., Reginatto, F. H. (2009). Influência do pH da solução extrativa no teor de antocianinas em frutos de morango. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 29 (1), 183.

Castañeda-Ovando, A., Pacheco-Hernández, M. L., Páez-Hernandez, M. E., Rodriguez, A. J., Galán-Vidal, C.A. (2009). Chemical studies of anthocyanins: A review, *Food Chemistry*, 113, 859.

Chang, Y.C., Huang, K.X., Huang, A.C., Ho, Y.C., Wang, C.J. (2006). Hibiscus anthocyanins-rich extract inhibited LDL oxidation and oxLDL-mediated macrophages apoptosis. *Food and Chemical Toxicology*, 44, 1015-1023.

Chen, P.N., Kuo, W.H., Chiang, C.L., Chiou, H.L., Shou, Y.S., Chuc, S.C. (2006). Black rice anthocyanins inhibit cancer cells invasion via repressions of MMPs and u-PA expression. *Chemico-Biological Interactions*, 163, 218-229.

Eibond, L. S., Reynertson, K. A., Luo, X. D., Basile, M. J., Kennelly, E. J. (2004). Anthocyanin antioxidants from edible fruits, *Food Chemistry*, 84 (1), 23.

Garcia-Alonso, M., Minihane, A.M., Rimbach, G., Rivas-Gonzalo, J.C., Tereza, S. P. (2009). Red wine anthocyanins are rapidly absorbed in humans and affect monocyte chemoattractant protein 1 levels and antioxidant capacity of plasma. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 20 (7), 521-529.

Gris, E. F., Ferreira, E. A., Falcão, L. D., Bordignon-Luiz, M. T. (2007). Caffeic acid copigmentation of anthocyanins from *Cabernet Sauvignon* grape extracts in model systems, *Food Chemistry*, 100 (3), 1289.

Gu, L., Okada, Y., Clinton, S. K. (1998). Absence of monocyte chemoattractant protein 1 reduces atherosclerosis in low density lipoprotein receptor-deficient mice, *Molecular Cell*, 2, 275.

Harborne, J. B. (1994). "*The Flavonoids: advanced in research since 1986*", Chapman and Hall: New York, 5th edition.

Hertog, M.G.L., Hollman, P.C.H., Katan, M.B., Kromhout, D. (1993). Intake of potentially anticarcinogenic flavonoids and their determinants in adults in the Netherlands. *Nutritional Cancer*, 20, 21-29.

Hogan, S., Chung, H., Zhang, L., Li, J., Lee, Y., Dai, Y., Zho, K. (2010). Antiproliferative and antioxidant properties of anthocyanin-rich extract from açai. *Food Chemistry*, 118, 208–214.

Ishigaki, Y., Katagiri, H., Gao, J., Yamada, T., Imai, J., Uno, K., Hasegawa, Y., Kaneko, K., Ogihara, T., Ishihara, H., Sato, Y., Takikawa, K., Nishimichi, N., Matsuda, H., Sawamura, T., Oka, Y. (2008). Impact of plasma oxidized low-density lipoprotein removal on atherosclerosis, *Circulation*, 118 (1), 75-81.

Jorge, P. A. (1997). Endotélio, lípidos e aterosclerose. *Arquivo Brasileiro de Cardiologia*, 68 (2), 129-134.

Kao, E.S., Tseng, T.H., Lee, H.J., Chan, K.C., Wang, C.J. (2009). Anthocyanin extracted from *Hibiscus attenuate* oxidized LDL-mediated foam cell formation involving regulation of CD36 gene. *Chemico-Biological Interactions*, 179, 212–218.

Kong, J., Chia, L., Goh, N., Chia, T., Brouillard, R. (2003). Analysis and biological activities of anthocyanins. *Phytochemistry*, 64, 923-933.

Kovanen, P.T., Pentikainen, M.O. (2003). Circulating lipoproteins as proinflammatory and anti-inflammatory particles in atherogenesis. *Current Opinion in Lipidology*, 14, 411-419.

Lusis, A.J. (2000). Atherosclerosis. *Nature Reviews*, 407, 233-241.

Mach, F., Schonbeck, U., Libby, P. (1998). CD40 signaling in vascular cells: a key role in atherosclerosis? *Atherosclerosis*, 137, 89.

Macz-Pop, G. A., Rivas-Gonzalo, J. C., Pérez-Alonso, J. J., Gonzálezparamás, A. M. (2006). Natural occurrence of free anthocyanin aglycones in beans (*Phaseolus vulgaris* L.), *Food Chemistry*, 94 (3), 448 .

Manach, C., Sacalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., Jiménez, L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *American Journal of Nutrition*, 79 (5), 727-747.

Matheus, M.E., Fernandes, S.B.O., Silveira, C.S., Rodrigues, V.R., Menezes, F.S., Fernandes, P.D. (2006). Inhibitory effects of *Euterpe oleracea* Mart. on nitric oxide production and iNOS expression. *Journal of Ethnopharmacology*, 107, 291-296.

Mauray, A., Milenkovic, D., Besson, C., Caccia, N., Morand, C., Michel, F., Mazur, A., Scalbert, A., Felgines, C. (2009). Atheroprotective Effects of Bilberry Extracts in Apo E-Deficient Mice, *Journal Agricultural Food Chemistry*, 57, 1110.

Mertens-Talcott, S., Rios, J., Jilma-Stohlawetz, R., Pacheco-Palencia, L.A., Meibohm, B., Talcott, S.T., Derendorf, H. (2008). Pharmacokinetics of Anthocyanins and Antioxidant Effects after the Consumption of Anthocyanin-Rich Açai Juice and Pulp (*Euterpe oleracea* Mart.) in Human Healthy Volunteers. *Journal Agricultural Food Chemistry*, 56, 7796–7802.

Miyazaki, K., Makino, K., Iwadate, E., Deguchi, Y., Ishikawa, F. (2008). Anthocyanins from Purple Sweet Potato Ipomoea batatas Cultivar Ayamurasaki Suppress the Development of Atherosclerotic Lesions and Both Enhancements of Oxidative Stress and Soluble Vascular Cell Adhesion Molecule-1 in Apolipoprotein E-Deficient Mice. *Journal Agricultural Food Chemistry*, 56 (11), 485–11492.

Ribeiro, S.M.R., Queiroz, M.E.L.R., Peluzio, M.C.G., Costa, N.M.B., Matta, S.L.P., Queiroz, J.H. (2008). Antioxidantes na dieta. Em: Costa, N.M.B e Peluzio, M.C.G. Nutrição Básica e Metabolismo. Viçosa: UFV, 235 -260.

Rodrigues, R.B., Ler, R.L., Zimmermann, B.F., Papagiannopoulos, M., Fabricius, H., Marx, F. (2006). Total Oxidant Scavenging Capacity of *Euterpe oleracea* Mart. (Açai) Seeds and Identification of Their Polyphenolic Compounds. *Journal Agricultural Food Chemistry*, 54, 4162-4167.

Ross, R. (1999). Atherosclerosis na inflammatory disease. *The New England and Journal Medicine*, 340, 115-126.

Rufino, M.S.M., Alves, R.E., Brito, E.S., Pérez-Jiménez, J., Saura-Calixto, F., Mancini-Filho, J. (2010). Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. *Food Chemistry*, 121, 996-1002.

Santos, G.M., Maia, G.A., Souza, P.H.M., Costa, J.M.C., Figueredo, R.W., Prado, G.M. (2008). Correlação entre atividade antioxidante e compostos bioativos de polpas comerciais de açaí (*Euterpe oleracea Mart*). *Sociedad Latinoamericana de Nutrición*, 58 (2).

Scandalios, J.G. (2005). Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 38(7), 995-1014.

Singh, U., Jialal, I. (2006). Oxidative stress and atherosclerosis. *Pathophysiology*, 13, 129-142.

Siqueira, A.F.A., Abdalla, D.S.P., Ferreira, S.R.G. (2006). LDL: da síndrome metabólica à instabilidade da placa aterosclerótica. *Arquivo Brasileiro de endocrinologia e Metabolismo*, 50 (2), 334-343.

Siriwoharn, T., Wrolstad, R. E., Finn, C. E., Pereira., C.B. (2004). Influence of cultivar, maturity and sampling on blackberry (*Rubus L. Hybrids*) Anthocyanins, polyphenolics, and antioxidant properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52 (26), 8021.

Solomon, A., Golubowicz, S., Yablowicz, Z., Bergman, M., Grossman, S., Altman, A., Kerem, Z., Flaishman, M.A. (2010). EPR Studies of O<sub>2</sub> •-, OH, and 1O<sub>2</sub> Scavenging and Prevention of Glutathione Depletion in Fibroblast Cells by Cyanidin-3-rhamnoglucoside Isolated from Fig (*Ficus carica L.*) Fruits. *Journal Agricultural Food Chemistry*, 58, 7158-7165.

Souza, M.O., Silva, M., Silva, E., Oliveira, R.P.O., Pedrosa, M.L. Diet supplementation with acai (*Euterpe oleracea Mart.*) pulp improves biomarkers of oxidative stress and the serum lipid profile in rats. (2010). *Nutrition*, 26, 804–810.

Steinberg, D. (1997). A critical look at the evidence for the oxidation of LDL in atherogenesis. *Atherosclerosis*, 131, 5-7.

Terci, D. B. L. (2004). “Aplicações analíticas e didáticas de antocianinas extraídas de frutas”. Tese de Doutorado, Instituto de Química – UNICAMP, Campinas, São Paulo.

Tian, Q., Aziz, R. M., Stoner, G. D., Schwartz, S. J. (2005). Anthocyanin determination in black raspberry (*Rubus occidentalis*) and biological specimens using liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Food Science*, 70 (1), 43.

Tonon, R.V., Bradet, C., Hubinger, M.D. (2010). Anthocyanin stability and antioxidant activity of spray-dried açai (*Euterpe oleracea* Mart.) juice produced with different carrier agents. *Food Research International*, 43, 907-914.

Türker, N., Erdogdu, F. (2006). Effects of pH and temperature of extraction medium on effective diffusion coefficient of anthocyanin pigments of black carrot (*Daucus carota* var. L.), *Journal of Food Engineering*, 76 (4), 579.

Winther, M.P.J, Kanters, E., Kraal, G., Hofker, M.H. (2005). Nuclear Factor  $\kappa$ B Signaling in Atherogenesis. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, 25, 904-914.

Wu, X., Beecher, G. R., Holden, J. M., Haytowitz, D.B., Gebhardt, S. E., Prior, R. L. (2006). Concentrations of anthocyanins in common foods in the United States and estimation of normal consumption, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 4069.

Xia, M., Ling, W., Zhu, H., Ma, J., Wang, Q., Hou, M., Tang, Z., Guo, H., Liu, C., Ye, Q. Anthocyanin attenuates CD40-mediated endothelial cell activation and apoptosis by inhibiting CD40-induced MAPK activation. (2009). *Atherosclerosis*, 202, 41-47.

Xia, X., Ling, W., Ma, J., Xia, M., Hou, M., Wang, Q., Zhu, H., Tang, Z. (2006). An Anthocyanin-Rich Extract from Black Rice Enhances Atherosclerotic Plaque Stabilization in Apolipoprotein E–Deficient Mice. *Journal Nutrition*, 136, 2220–2225.

Yi, I., Chen, C., Jin, X., Mi, M., Chang, Hui., Ling, W., Zhang, T. (2010). Structural requirements of anthocyanins in relation to inhibition of endothelial injury induced by oxidized low-density lipoprotein and correlation with radical scavenging activity. *FEBS Letters*, 584, 583-590.

## CAPÍTULO 2

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA, NUTRICIONAL E POTENCIAL ANTIOXIDANTE DA POLPA DOS FRUTOS DE *Euterpe edulis* Mart.**

## 1. INTRODUÇÃO

A Mata Atlântica brasileira é um dos 34 *hotspots* mundiais, sendo esse termo atribuído a toda área considerada prioritária para conservação, que apresenta uma alta biodiversidade associada a um alto grau de endemismo e degradação (Myers et al., 2000). Grande parte da população brasileira vive nestas áreas, desenvolvendo atividades econômicas que necessitam da matéria-prima desse ecossistema, mediante exploração de plantas e animais silvestres para alimentação, combustível, vestuário, medicamentos e abrigo (Brasil, 2006).

A Mata Atlântica é um dos biomas mais devastado e ameaçado do planeta. Uma longa história de exploração de recursos eliminou a grande parte desta floresta tropical, restando atualmente menos de 7% da sua extensão original (Pinto & Brito, 2005).

A espécie *Euterpe edulis* Martius, pertencente à família Arecaceae e conhecida popularmente como palmeira juçara, está amplamente distribuída na Mata Atlântica brasileira, principalmente nos estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, São Paulo, Rio de Janeiro, Minas Gerais e Bahia (Lorenzi et al., 2006; Borges et al., 2011).

A palmeira juçara produz um palmito comestível de alta qualidade. Entretanto, a exploração ilegal do seu palmito associada à crescente perda de áreas remanescentes de Mata Atlântica, contribui para a degradação do bioma e torna-se um fator de preocupação para a preservação desta palmeira, uma vez que é necessário derrubá-la para a extração do palmito (Reis, 1996; Ferri & Cavalcanti, 1997).

Um dos produtos pouco utilizados da *E. edulis* são os seus frutos. O despulpamento deles origina um produto similar à polpa do açaí, que é extraído de frutos de palmeiras do mesmo gênero botânico, a *Euterpe oleracea* Martius, conhecida como açaizeiro da Amazônia. O açaí da *E. edulis*, também conhecido como açaí da Mata Atlântica, pode ser consumido de diversas formas, como suco de fruta, sorvete, açaí na tigela, sobremesas, *shakes* e em preparações salgadas. Além disso, a utilização dos frutos de *E. edulis* pode contribuir para a preservação da espécie, uma vez que para o aproveitamento dos seus frutos não se faz necessária a derrubada da árvore e, após o

processamento da polpa, suas sementes podem ser aproveitadas para a obtenção de mudas e para a confecção de artesanatos.

Os frutos da juçara apresentam coloração roxa intensa, devido à presença de pigmentos antociânicos (De Brito et al., 2007; Borges et al., 2011). As antocianinas são metabólitos secundários biossintetizados por plantas e pertencentes ao grupo dos flavonóides (Leite, 2008). Podem ser utilizadas como corantes naturais e têm apresentado grandes benefícios á saúde devido suas atividades biológicas (Cardoso et al., 2011), que incluem propriedades antioxidantes (Garcia-Alonso et al., 2009), antiinflamatórias (Xia et al., 2009), inibição da oxidação da lipoproteína de baixa densidade (Chang et al., 2006), diminuição dos riscos de doenças cardiovasculares (Toufektsian et al., 2008) e de câncer (Chen et al., 2006).

O conhecimento da composição química, fitoquímica e nutricional dos frutos de *E. edulis* é ainda muito limitado, sendo estes pontos importantes para a determinação do potencial nutricional e farmacológico deste fruto e da sua possibilidade de ser considerado um alimento funcional. Assim, este trabalho objetiva caracterizar a composição química, fitoquímica, nutricional e o potencial antioxidante dos frutos de *E. edulis* (PLFE).

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo Geral**

Caracterizar a composição química, fitoquímica, nutricional e o potencial antioxidante da polpa liofilizada dos frutos de *E. edulis* Martius.

### **2.2. Objetivos Específicos**

- Determinar a composição química e nutricional da PLFE, caracterizando a composição centesimal (carboidratos, proteínas, lipídeos, fibras, umidade e cinzas), o teor de minerais (ferro, cálcio, cobre, magnésio, zinco, manganês, sódio, potássio e fósforo) e de vitaminas A e C;
- Realizar uma prospecção fitoquímica dos principais grupos de metabólitos secundários com propriedades bioativas presentes na PLFE;
- Analisar qualitativa e quantitativamente as antocianinas presentes na PLFE por método espectrofotométrico, cromatografia líquida de alta eficiência acoplado com detector fotodiodo (HPLC/DAD) e acoplado com espectrômetro de massa (HPLC/MS);
- Avaliar o potencial antioxidante da PLFE *in vitro* pelo método do radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila).

### **3. METODOLOGIA**

#### **3.1. Coleta do Material Vegetal**

Os frutos maduros de *E. edulis* foram coletados no entorno do Parque Estadual da Serra do Brigadeiro (PESB), importante área remanescente de Mata Atlântica localizada na região da Zona da Mata do Estado de Minas Gerais.

A colheita e pós-colheita dos frutos foram realizadas conforme orientações da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Embrapa, para os frutos de *E. oleracea*, açaí da Amazônia (Embrapa Amazônia Oriental, 2006).

Um coletor subiu na palmeira de *E. edulis* e cortou o cacho de frutos na sua base, tendo cuidado para não desprender muitos frutos do cacho. Após o corte, o cacho de frutos foi depositado sobre uma lona para evitar o contato direto com o solo e, conseqüentemente, a contaminação dos frutos.

Os frutos da juçara foram debulhados em caixas de plástico e os frutos verdes e em estado fitossanitário precário ou com qualquer outro defeito, que os torne inadequados ao processamento, foram descartados.

Em todas as etapas, os frutos de juçara não ficaram expostos ao sol, uma vez que a luminosidade excessiva poderia favorecer sua deterioração.

#### **3.2. Preparo da Polpa dos Frutos de *E. edulis***

Os frutos de *E. edulis* foram despulpados no prazo máximo de 24 horas após a colheita, devido sua alta perecibilidade. Durante o processo de despulpa, os frutos maduros de juçara passaram pelas seguintes fases de beneficiamento, conforme orientações da Embrapa para o processamento dos frutos de *E. oleracea* (Embrapa Amazônia Oriental, 2006):

- Pré-lavagem: os frutos foram imersos em água para a retirada de impurezas;
- Lavagem com água clorada: os frutos foram colocados em uma solução com cloro ativo com 50ppm por 20 minutos;
- Retirada do excesso do cloro: a retirada do cloro ocorreu por meio da lavagem por aspersão com água potável;

- Amolecimento: os frutos foram imersos na água morna (40-60°C) por cerca de 15 minutos. Esta fase tem por finalidade facilitar o despulpamento por amolecimento do epicarpo e mesocarpo dos frutos.
- Despulpamento: consiste na operação de remoção da polpa do fruto. Foi realizado com o auxílio de uma batedeira doméstica, utilizando a proporção de duas partes de fruto para uma parte de água potável.
- Refino: a polpa dos frutos de juçara passou por peneira de malha fina devidamente higienizada.

Após as etapas acima, a polpa dos frutos de *E. edulis* foi embalada em plásticos de polietileno de baixa densidade, armazenadas no freezer a -80°C e posteriormente liofilizadas (Liofilizador Liotop LP510, Liobras®) no Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa (UFV).

### **3.3. Composição Química**

Foram determinados os teores de umidade, cinzas, lipídeos, proteínas, carboidratos da PLFE, conforme técnicas analíticas descritas pela Association of Official Analytical Chemicals (AOAC, 2005). Todas as análises foram realizadas em triplicata no Laboratório de Análise de Alimentos do Departamento de Nutrição e Saúde da UFV.

O teor de umidade foi determinado por secagem de cerca de 10 g da PLFE em estufa a 105°C até peso constante, sendo o resultado expresso em g de água/100 g de polpa liofilizada.

O teor de cinzas (g de cinzas/100 g de polpa liofilizada) foi determinado por incineração de cerca de 5 g da PLFE em mufla, por cerca de 8 horas, que foi aquecida gradativamente até 550°C.

A determinação de lipídeos totais (g de lipídeos/100 g de polpa liofilizada) foi realizada com éter etílico em extrator do tipo Soxhlet, seguida da remoção por destilação do solvente. Para tal, foi utilizado cerca de 5 g da PLFE.

A determinação de nitrogênio total (g de nitrogênio/100 g de polpa liofilizada) foi baseada no método de Kjeldahl tradicional. A concentração de proteína bruta foi calculada pelo produto da quantidade de nitrogênio total (g) pelo fator de conversão 6,25.

A quantificação de carboidratos foi calculada por diferença percentual, subtraindo-se do total da soma de umidade, cinzas, lipídeos totais e proteínas.

Para a análise de fibra alimentar a amostra foi desengordurada, segundo método com extrator do tipo Soxhlet descrito acima. Os teores de fibra alimentar solúveis e insolúveis foram realizados pelo método enzimático-gravimétrico da AOAC (1997), utilizando as enzimas  $\alpha$ -amilase termoresistente, protease e amiloglicosidase *kit dietary fiber total* (Sigma<sup>®</sup>).

### **3.4. Análise de Ácidos Graxos**

Os ácidos graxos da PLFE foram extraídos pelo método de Folch (1957), sendo saponificado e esterificado conforme Hartmann e Lago (1973).

A identificação dos ésteres metílicos de ácidos graxos foi realizada por cromatografia gasosa utilizando o cromatógrafo Shimadzu CG-17<sup>a</sup>, modelo Class, com uma coluna de sílica fundida SP-2560 (polisiloxano biscianopropil), 100 m x 0,25 mm de diâmetro, e um detector de ionização de chama.

A programação da análise apresentada foi de temperatura inicial de 140 °C, sendo isotérmica durante 5 minutos, e posterior aquecimento de 4 °C por minuto até 240 °C, mantendo esta temperatura por 30 minutos. A temperatura do vaporizador foi de 250 °C e a temperatura do detector foi 260 °C. O gás de arraste utilizado foi nitrogênio a 20 cm/segundo, a 175 °C. A divisão da amostra no injetor foi 1/50 e 1  $\mu$ L da solução foi injetada. Os picos foram identificados por comparação dos tempos de retenção com padrões conhecidos de éster metílico (FAME mix, Supelco<sup>®</sup>, EUA) e quantificadas por área de integração automática.

### **3.5. Análise de Minerais**

A determinação dos minerais (ferro, cálcio, cobre, magnésio, zinco, e manganês) foi realizada por espectrometria de absorção atômica de chama (aparelho SpectrAA 220FS, Varian<sup>®</sup>). Os minerais sódio e potássio foram determinados por fotometria de chama (aparelho Corning 400) e o fósforo por método fotocolorimétrico (aparelho fotômetro BEL1105). Para tal, as amostras

da PLFE passaram por uma digestão ácida, com uma mistura de ácido nítrico e ácido perclórico na proporção de 4:1. As análises foram realizadas em triplicata no Departamento de Solos da UFV.

### **3.6. Análise de Carotenóides por HPLC/DAD**

Foi investigada a presença dos carotenóides  $\alpha$ -caroteno,  $\beta$ -caroteno,  $\beta$ -criptoxantina e licopeno. Para análise qualitativa utilizaram-se o padrão de  $\alpha$ -caroteno e  $\beta$ -caroteno isolados do extrato concentrado de cenoura por cromatografia em coluna aberta, segundo o método proposto por Rodriguez-Amaya et al. (1989) com modificações. E os padrões  $\beta$ -criptoxantina e licopeno, foram extraídos do mamão e do tomate, respectivamente, usando a mesma metodologia para os padrões  $\alpha$ -caroteno e  $\beta$ -caroteno. Para a quantificação foi utilizada curva de padronização externa. Os padrões de carotenóides utilizados foram isolados previamente no Laboratório de Análise de Vitaminas do Departamento de Nutrição e Saúde, da UFV. Informações sobre a metodologia de isolamento destes padrões encontram-se no Anexo 1.

Para o preparo da amostra, cerca de 1g de PLFE foi pesada em triplicata, adicionado 60 mL de acetona resfriada (dividida em três volumes de 20 mL), homogeneizados por microtritador, por aproximadamente 5 minutos, e filtrados à vácuo em funil de Büchner utilizando-se papel de filtro no JP41 J. (Prolab, Brasil). Em seguida, o filtrado foi dividido em três frações e cada fração foi transferida para um único funil de separação contendo 50mL de éter de petróleo resfriado, sendo que após a adição de cada fração, esta foi lavada com água destilada para retirada da acetona. Após, acrescentou-se sulfato de sódio anidro ao extrato em éter de petróleo para retirar resíduo de água. Posteriormente, a amostra foi concentrada utilizando evaporador rotativo em temperatura de  $35 \pm 1$  °C, transferida para balão volumétrico de 25,0 mL, sendo o volume completado com éter de petróleo. As amostras foram filtradas em unidades filtrantes com porosidade de 0,45  $\mu$ m, sendo injetados 50  $\mu$ L no HPLC para análise.

As análises de carotenóides foram realizadas por HPLC, sendo utilizadas as condições cromatográficas desenvolvidas por Pinheiro-Sant'Ana *et al.* (1998), as quais incluíram: sistema HPLC, detecção a 450 nm; coluna cromatográfica

RP-18 Phenomenex Gemini (250 x 4,6 mm, 5  $\mu$ m), munida de coluna de guarda Phenomenex (4 mm x 3 mm). Para análise utilizou-se o sistema isocrático e a fase móvel composta de metanol, acetonitrila e acetato de etila: (70:20:10, v/v/v) com fluxo de 1,7 mL min<sup>-1</sup> e tempo de corrida de 15 minutos. Todos os reagentes utilizados foram em grau HPLC.

O valor de vitamina A foi calculado de acordo com as recomendações do Institute of Medicine (2001), em que 1 Equivalente de Atividade de Retinol (RAE) equivale a 1 $\mu$ g de retinol, 12 $\mu$ g de  $\beta$ -caroteno e 24 $\mu$ g de outros carotenóides pró-vitamínicos.

Para análise de carotenóides, utilizou-se o sistema de HPLC (Shimadzu, SCL 10AT VP) constituído de bomba de alta pressão (LC-10AT VP), injetor automático com alça de amostragem de 50  $\mu$ L (SIL-10AF) e detector de arranjo de diodos (DAD) (SPD-M10A). O sistema de HPLC foi controlado pelo *software* Multi System, Class Vp 6.12.

As análises de carotenóides foram realizadas no Laboratório de Análise de Vitaminas do Departamento de Nutrição e Saúde, da UFV. Foram utilizadas três repetições para extração e análise.

### **3.7. Análise de Ácido Ascórbico por HPLC/DAD**

Para análise de vitamina C, utilizou-se sistema HPLC (Shimadzu, SCL 10AT VP) constituído de bomba de alta pressão (LC-10AT VP), injetor automático (SIL-10AF), detector de arranjo de diodos (DAD) (SPD-M10A), *software* Multi System, Class Vp 6.12. O padrão de vitamina C foi o ácido L-ascórbico adquirido da Sigma-Aldrich®.

Foi investigado o conteúdo de ácido ascórbico (AA) na PLFE. A extração e análise do AA foram realizadas de acordo com as condições propostas por Campos et al. (2009) com modificações. Para extração, cerca de 3g da amostra foi ressuspensa e homogeneizada, por aproximadamente 5 minutos, em 15 mL de solução extratora (3% de ácido metafosfórico, 8% de ácido acético, solução de ácido sulfúrico (0,3 N) e 1 mM EDTA em água). O extrato obtido foi centrifugado a 1789 g por 15 minutos, filtrado a vácuo em funil de Büchner e diluído para 25 mL, em balão volumétrico, com água ultrapura. Posteriormente, a amostra foi novamente centrifugada a 1789 g por 15 minutos

e o sobrenadante acondicionado sob refrigeração ( $5 \pm 1$  °C) até o momento da análise.

As análises foram realizadas a partir da injeção de 50 µL dos extratos previamente filtrados em unidades filtrantes com porosidade de 0,45 µm. Para análise do AA as condições cromatográficas utilizadas foram: coluna cromatográfica RP-18 Lichrospher 100 (250 x 4 mm, 5 µm); fase móvel água ultrapura contendo 1 mM de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1mM de EDTA e pH ajustado para 3,0 com H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>; fluxo da fase móvel de 1,0 mL min<sup>-1</sup>. Os cromatogramas foram obtidos com detector DAD a 450 nm.

As análises de AA foram realizadas no Laboratório de Análise de Vitaminas do Departamento de Nutrição e Saúde, da Universidade Federal de Viçosa. Foram utilizadas 3 repetições para extração e análise.

### **3.8. Análise Fitoquímica**

Foi realizada uma triagem fitoquímica da PLFE por cromatografia em camada delgada (CCD) para as principais classes de metabólitos secundários: flavonóides, cumarinas, taninos, antraquinonas, óleos essenciais, triterpenos/esteróides, saponinas e alcalóides. Para tal, a polpa foi ressuspendida em metanol 0,1% HCl.

A triagem fitoquímica foi realizada em suporte cromatoplaca de alumínio Alugram® Sil G/UV, diferentes fases móveis e aspensão empregando reagentes reveladores específicos combinados com a visualização do cromatograma sob luz de comprimento de onda na região do ultravioleta, 254 e 365nm (Wagner & Bladt, 1996). Os resultados obtidos pela cromatografia foram confrontados com padrões de referência específicos para cada classe fitoquímica analisada (Tabela 1). Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico.

**Tabela 1.** Prospecção fitoquímica da polpa liofilizada dos frutos de *E. edulis*.

<b>Classe dos Metabólicos</b>	<b>Fase Móvel</b>	<b>Revelador</b>	<b>Padrão</b>
Flavonóides	acetato de etila-ácido fórmico-ácido acético glacial-água (55:5:5:12)	Solução de AlCl <sub>3</sub> a 5% em etanol (visualização sob luz visível e fluorescência 365 nm e 254 nm)	Rutina
Alcalóides	acetato de etila-metanol-água (50:8,5:6,5)	Reagente de Drangendorff (visualização sob luz visível 365 nm)	Quinina
Esteróides /triterpenos	éter etílico-tolueno (1:1)	Reagente de Lieberman Burchard (visualização sob luz visível 365 nm)	β-sitosterol
Cumarinas	éter etílico-tolueno (1:1)	Solução de KOH a 5% em etanol (visualização sob luz visível e fluorescência 365 nm e 254 nm)	Benzopirona
Polifenóis	Acetato de etila-metanol-água-ácido acético (50:25:25:5)	Reagente de Barton (visualização sob luz visível 365 nm)	Ácido pirogálico
Antraquinonas	Éter etílico-tolueno (1:1)	Solução de KOH a 5% em etanol (visualização sob luz visível e fluorescência 365 nm e 254 nm)	1,8-diidroxiantraquinona
Saponinas	Éter etílico-tolueno (1:1)	Anisaldeído-sulfúrico (visualização sob luz visível 365 nm)	Aescina

### 3.9. Análise de Antocianinas Totais Monoméricas

O conteúdo de antocianinas totais monoméricas foi determinado pelo método espectrofotométrico com pH diferencial, descrito por Cheng & Breen (1991) modificado.

Em um béquer foi diluído 0,05g da PLFE em 50mL de tampão (cloreto de potássio 0,025M) a pH=1,0 ajustado com HCl. Em outro béquer, 0,05g da PLFE foi diluído em 50mL de tampão (acetato de sódio 0,4M) a pH=4,5 ajustado com HCl. Em ambos os casos, o fator de diluição utilizado foi de 1:1000.

As amostras da PLFE diluídas foram transferidas para o ultrassom por 30 minutos para homogeneização. A seguir, foram filtradas em papel de filtro tipo whatman. Os filtrados foram transferidos para balões volumétricos de 50mL e o volume foi completado com o tampão correspondente. Após cerca de 15 minutos foram realizadas as leituras no espectrofotômetro das amostras da PLFE com os dois tampões, ambos empregando dois comprimentos de onda de 510 e 700nm. As análises foram realizadas em triplicata e os resultados foram expressos como mg de equivalentes de cianidina 3-glicosídeo por 100g de peso seco. Para o cálculo do teor de antocianinas totais monoméricas foi utilizada a fórmula abaixo:

$$C \text{ (mg/100g)} = (A_{510} - A_{700})_{\text{pH}1.0} - (A_{510} - A_{700})_{\text{pH}4.5} \times \text{MM} \times \text{FD} \times 100 / \epsilon$$

Onde:

MM = massa molecular da cianidina 3-glicosídeo (449,2 g/mol)

FD = fator de diluição estabelecido

$\epsilon$  = coeficiente de extinção molar da cianidina 3-glicosídeo (29.600).

#### 3.9.1 Preparo do tampão cloreto de potássio 0,025 mol/L pH=1,0:

Foram pesados 1,86g de cloreto de potássio, sendo este diluído em 980 mL de água destilada em um béquer. Para obter solução tampão de pH 1,0 foi adicionado gradativamente HCL a 37%, sendo o potencial hidrogeniônico monitorado com auxílio de potenciômetro até alcançar o pH desejado. A

solução com pH 1,0 foi transferida para um balão de 1L e completado o volume com água destilada.

### **3.9.2 Preparo do tampão acetato de sódio 0,4 mol/L pH=4,5:**

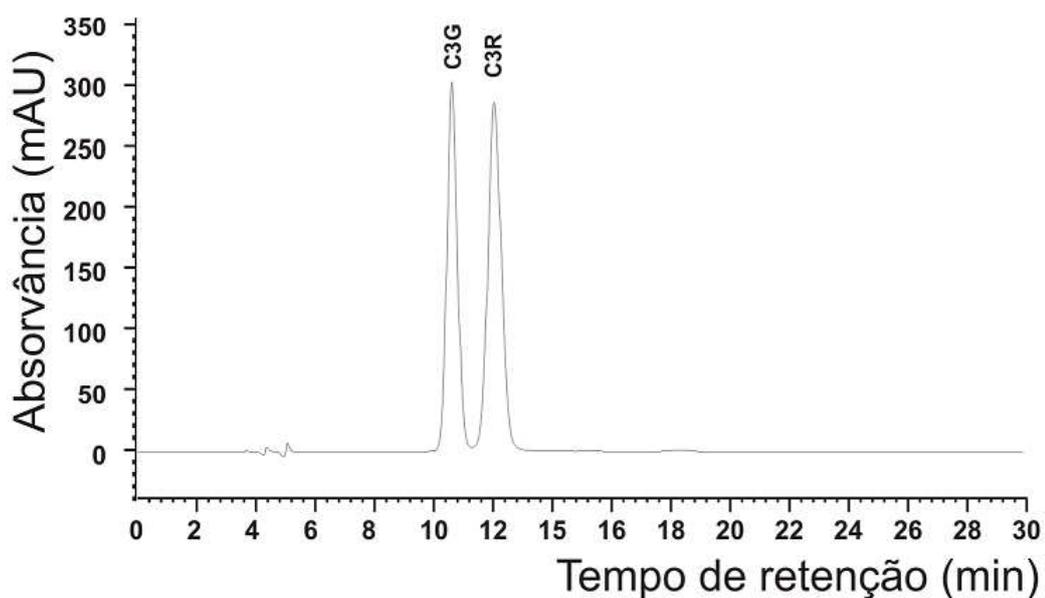
Foram pesados 54,43g de acetato de sódio, sendo posteriormente diluído em 960 mL de água destilada em um béquer. Mediu-se o pH durante a adição de HCl até alcançar pH=4,5. A solução com pH=4,5 foi transferida para um balão de 1L e completado o volume com água destilada.

### **3.10. Análise de Antocianinas por HPLC/DAD**

As análises qualitativa e quantitativa das antocianinas da PLFE foram realizadas por cromatografia líquida de alta eficiência acoplado com detector fotodiodo (HPLC/DAD), utilizando as condições propostas por Schauss et al. (2006), com adaptações a seguir descritas:

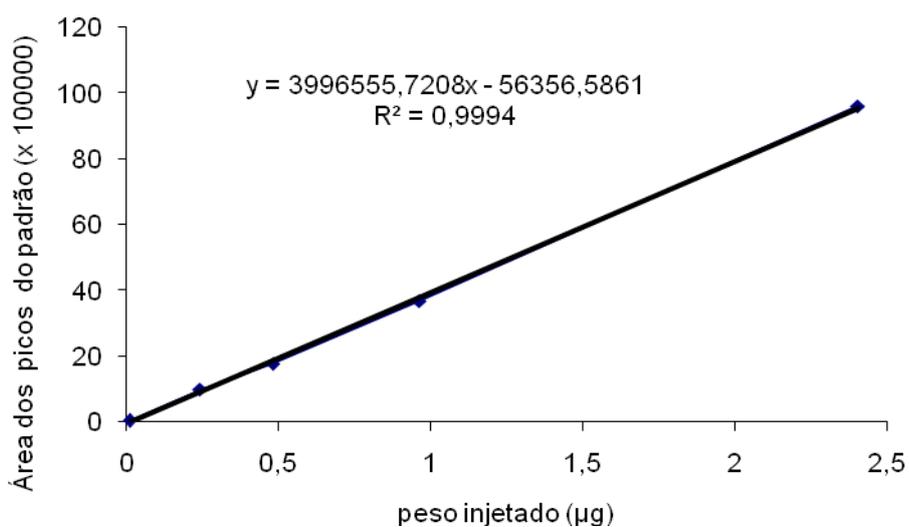
- Fase móvel A: água ultrapura acidificada com ácido fórmico até pH=2,0: acetonitrila (89:11);
- Fase móvel B: acetonitrila (grau HPLC);
- Sistema gradiente: de 0 a 20 minutos, 0% B; 20 a 22 minutos, gradiente linear 50% B; 22 a 27 minutos, 50% B; 27 a 29 minutos, gradiente linear 0% B; 29 à 45 minutos, 0% B, para recondicionamento da coluna;
- Detector de arranjo de diodos: leitura dos cromatogramas a 520 nm;
- Coluna RP-18 Phenomenex Gemini (250 x 4,6 mm; 5µm) e pré-coluna Phenomenex ODS (4 x 3 mm);
- Injeção de 50 µL, fluxo de 1 mL/minuto e tempo de corrida de 45 minutos.

A ressuspensão da PLFE foi realizada adicionando 5 mL de HCl 1% em 0,01g da PLFE. Utilizou-se como padrões externos as antocianinas: cianidina 3-glicosídeo (Sigma-Aldrich®) (C3G) e cianidina 3-rutinosídeo (Sigma-Aldrich®) (C3R). Estes padrões foram ressuspensos separadamente em solução de HCl 1% (10mg do padrão em 5mL de HCl 1%). As absorvidades molares medidas foram 26.900 e 28.840, respectivamente. Injetou-se uma mistura dos padrões para observar a separação e o tempo de retenção de cada antocianina (Figura 1).

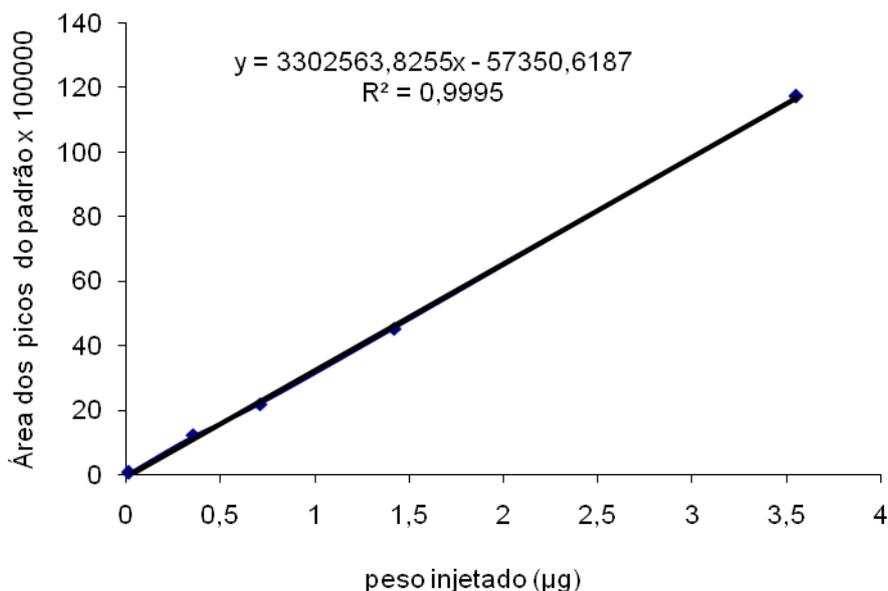


**Figura 1** - Cromatograma do mix dos padrões de antocianinas. C3G: cianidina 3-glicosídeo (tempo de retenção de 10,5 minutos) e C3R: cianidina 3-rutinosídeo (tempo de retenção de 12,6 minutos). Condição: DAD 520 nm, Coluna RP-18 Phenomenex Gemini, 5µm 250 x 4,6 mm, pré-coluna Phenomenex ODS (4 x 3 mm).

Realizou-se a elaboração das curvas analíticas dos padrões de antocianinas, obtendo as equações para cianidina 3-glicosídeo:  $y=3996555,7208x - 56356,5861$ ,  $R^2 = 0,9994$  (Figura 2) e para cianidina 3-rutinosídeo:  $y=3302563,8255x - 57350,6187$ ,  $R^2 = 0,9995$  (Figura 3).



**Figura 2** - Curva padrão da cianidina 3-glicosídeo (C3G).



**Figura 3** - Curva padrão da cianidina 3- rutinosídeo (C3R).

As análises de antocianinas por HPLC/DAD foram realizadas no Laboratório de Análise de Vitaminas do Departamento de Nutrição e Saúde da UFV. Foram utilizadas três repetições para extração e análise.

### 3.11. Análise de Antocianinas por HPLC-ESI-MS

Para a análise dos compostos antociânicos da PLFE utilizou-se sistema de cromatografia líquida de alta eficiência acoplado a um espectrômetro de massa (HPLC-ESI-MS). A separação foi realizada em coluna de fase reversa C18 (Acclaim 120, Dionex) (2,1 x 150 mm; 5 µm) e pré coluna C18 a 25 °C. As fases móveis consistiram de 1% de ácido fórmico em água (v/v) (solvente A) e 1% de ácido fórmico em acetonitrila (v/v) (solvente B) a uma taxa de fluxo de 0.200 mL/min. O gradiente de eluição utilizado foi: 0 min, 3% B; 40 min, 30% B; 45 min, 100% B; 50 min, 3% B. A monitorização das antocianinas foram realizadas a 310 e 520nm.

O sistema HPLC foi acoplado diretamente ao Agilent Triple Quadrupole serie 6430 (Agilent Technologies, Waldbronn, Alemanha) utilizando ionização por eletrospray (ESI). O espectrômetro de massas (triplo quadrado) foi operado no modo positivo com as seguintes configurações: tensão capilar, 4.0 kV; fluxo

de solvatação de 13 L/min; nebulização do gás nitrogênio 35 psi, temperatura da fonte, 340 °C; tensão 135 V; tempo de permanência, 200 s; MS/MS, escaneamento de 100 a 500 m/z. Para a análise da ionização dos produtos foi utilizado energia de colisão de 20 a 25 eV para as seguintes transições 465> 303, 549> 301, 449> 287, 595> 287 e 433> 271. As leituras cromatográficas foram realizadas no aparelho 1290 Infinity System (Agilent Technologies, Waldbronn, Alemanha), constituído de amostrador G4226A, termostato do amostrador G1330B, DAD G4212A, forno de coluna G1316C e bomba binária G4220A. As análises foram realizadas com o auxílio do *software* MassHunter (Agilent, Waldbronn, Alemanha).

### **3.12. Atividade Antioxidante *in vitro***

A atividade antioxidante da PLFE foi determinada pelo método fotocolorimétrico *in vitro* do radical livre estável orgânico ·DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila). O método de DPPH, descrito por Brand-Williams et al. (1958) é baseado na redução do radical DPPH por antioxidantes, produzindo um decréscimo da absorbância a 515 nm.

Em balão de 100 mL, foi ressuspenso 2,4 mg do reagente de DPPH da Sigma-Aldrich® (Alemanha), com metanol PA, para a formação da concentração de 0,06 mMolar ou 60 µM da solução de DPPH de trabalho. O reagente foi preparado no mesmo dia de uso. Foram preparadas soluções de diferentes concentrações a partir da PLFE: 0,1; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5; 4,0; 5,0; 10,0; 15,0; 20,0 e 25,0 mg/ml. O preparo das soluções a partir do extrato seguiram as orientações de Rufino *et al.* (2007). Uma alíquota de 0,1 mL de cada solução foi adicionada a 3,9 mL de uma solução de DPPH (0,06mM) e deixada em repouso por 30 minutos, em ambiente escuro. Após este intervalo, procedeu-se a leitura espectrofotométrica a 515 nm. Todas as leituras foram realizadas em triplicatas. A concentração média de DPPH capturado na reação foi calculada por análise da curva de calibração por regressão linear (Rufino *et al.*, 2007). O percentual de captura de DPPH foi calculado pela equação abaixo, sendo que a solução DPPH foi usada como controle.

Equação: % captura do radical DPPH = [(absorbância do controle – (absorbância da amostra – absorbância do branco))/ absorbância do controle] x 100.

## **4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **4.1. Composição Química e Nutricional**

Os valores encontrados nas análises de composição química da PLFE, comparados com resultados de trabalhos com a polpa liofilizada de *E.oleracea*, estão apresentados na Tabela 2.

**Tabela 2:** Composição química da polpa liofilizada dos frutos de *E. edulis* e *E. oleracea*.

Análises	Resultados deste trabalho: <i>E.edulis</i>	Schaus <i>et al.</i> (2006): <i>E.oleracea</i>	Menezes <i>et al.</i> (2008): <i>E.oleracea</i>	Unidade por 100g polpa liofilizada
Energia	569,2	533,9	489,39	Kcal
Umidade*	5,71	-	4,92	g ou %
Cinzas*	3,74	-	3,68	g ou %
Proteína*	6,98	8,10	8,13	g ou %
Lípideo*	41,40	32,50	40,75	g ou %
AG**Saturados	27,07	26,10	27,40	%
- palmítico (C16:0)	27,07	25,70	25,56	%
- esteárico (C18:0)	-	1,60	1,84	%
AG** Insaturados	72,93	73,90	57,19	%
Monoinsaturados	33,02	60,60	56,24	%
- oléico (C18:1)	33,02	56,20	52,70	%
Poliinsaturados	39,91	13,30	0,95	%
- linoléico (C18:2)	36,95	12,50	0,95	%
- $\alpha$ -linolênico (C18:3)	2,96	0,80	-	%
Carboidrato*	42,17	52,20	42,53	g ou %
Fibras totais	34,90	44,20	-	g
insolúveis	30,32	-	-	g
solúveis	4,58	-	-	g
Fósforo (P)	130,40	-	54,50	mg
Sódio (Na)	27	-	28,50	mg
Potássio (K)	764	-	900	mg
Cálcio (Ca)	172	260	330	mg
Magnésio (Mg)	117	-	124,40	mg
Zinco (Zn)	1,80	-	-	mg
Ferro (Fe)	8,10	4,40	4,50	mg
Manganês (Mn)	19,60	-	10,71	mg
Cobre (Cu)	1,90	-	-	mg
Vitamina A	3204,70	1002	-	UI
Ácido ascórbico ***	-	<0,1	-	mg

\*Representam a composição centesimal da PLFE.

\*\*Ácidos graxos.

\*\*\* Não foi detectada a presença de vitamina C na polpa liofilizada de *E. edulis*.

A quantidade de proteínas encontrada na PLFE (6,98%) foi coerente com a variação protéica obtida por Borges et al. (2011) para a mesma espécie, que foi de 5,13 a 8,21%, e próximo aos teores observados na polpa liofilizada de frutos de *E. oleracea* por Schauss et al. (2006) e Menezes et al. (2008), que foram de 8,13g e 8,1g de proteína por 100g de liofilizado, respectivamente.

O valor energético elevado da PLFE, 569,2Kcal/100g (calculado baseando-se no teor energético dos lipídeos, carboidratos e proteínas por grama, 9, 4 e 4 Kcal/g, respectivamente), deve-se, principalmente, ao alto conteúdo de lipídeos, 41,4g/100g de polpa liofilizada, que corresponde a 65% das calorias contidas no alimento. Com relação ao perfil lipídico da PLFE, foi identificado um maior conteúdo de ácidos graxos insaturados (72,93%), sendo que destes 33,02% e 39,91% foi constituído de ácidos graxos monoinsaturados e poliinsaturados, respectivamente. E o teor de ácidos graxos saturados na PLFE foi de 27,07%, em relação à percentagem total de lipídeos.

Apesar do alto conteúdo de lipídeos totais da PLFE, esses são compostos, em sua maioria, por ácidos graxos monoinsaturados e poliinsaturados, que são benéficos à saúde humana. Os ácidos graxos monoinsaturados, como o ácido oléico, podem reduzir o risco de doenças cardiovasculares por promover alterações no perfil lipídico plasmático, reduzindo o colesterol total, o LDL, VLDL e triglicerídeos e por reduzir a agregação plaquetária e biomarcadores envolvidos na expressão de genes inflamatórios (Oh et al., 2009; Covas et al., 2009).

Efeito cardioprotetor também tem sido atribuído aos ácidos graxos poliinsaturados, devido, principalmente, ao elevado potencial antiinflamatório dos ácidos graxos da série ômega-3, como o ácido  $\alpha$ -linolênico (18:3) e seus derivados, o ácido eicosapentaenóico ou EPA (20:5) e o ácido docosaexaenóico ou DHA (22:6). Eles podem reduzir processos inflamatórios por competirem com o ácido araquidônico na via das lipoxigenases e cicloxigenases, reduzindo a formação de eicosanóides com maior potencial inflamatório e indiretamente por alterarem a expressão de genes relacionados à inflamação através da ativação de fatores de transcrição (Kalogeropoulos et al., 2010).

Também é atribuído aos ácidos graxos da série ômega-3 a capacidade de reduzir os triglicerídeos, o colesterol total e VLDL e aumentar moderadamente os níveis de HDL plasmáticos (Benatti et al., 2004).

O valor energético e de lipídeos do presente trabalho foi similar aos observados na espécie *E. oleracea* por Menezes et al. (2008) e por Schauss et al. (2006). Em adição, Borges et al. (2011) identificaram uma alta variação no teor de lipídeos entre polpas dos frutos de *E. edulis* (submetida a um branqueamento por 10 minutos a 85°C com posterior secagem a 40°C por 12 horas), que foi de 18,5% a 44,08%. Borges et al. (2011), assim como no nosso trabalho, encontraram uma predominância de ácidos graxos insaturados na polpa dos frutos de *E. edulis*, representados pelos ácidos graxos monoinsaturados, variando de 45,5% a 56,82% do total de lipídeos, principalmente de ácido oléico (44,63% a 55,61%), seguido do ácido linoléico (18,19% a 25,36%) e do  $\alpha$ -linolênico (0,60% a 0,74%) e o teor de ácidos graxos saturados variou de 24,32% a 28,89% do total do conteúdo lipídico.

A PLFE apresentou uma elevada quantidade de carboidratos (42,17g/100g de liofilizado), porém, cerca de 82,76% foi composto por fibras totais, sendo destes 71,89% de fibras insolúveis e 10,85% de fibras solúveis. As fibras insolúveis contribuem para a redução do risco de obesidade e síndrome metabólica e as fibras solúveis são capazes de reduzir os níveis de glicose e colesterol sanguíneos (Costa & Rosa, 2010).

Os minerais encontrados em maior abundância na PLFE foram o potássio e o cálcio (769mg e 172mg por 100g de polpa liofilizada, respectivamente), sendo que estes teores podem contribuir para suprir as necessidades nutricionais de um indivíduo, que equivalem para um adulto saudável, a 4.700mg de potássio (Dietary Reference Intakes - DRIs, 2004) e 1000mg de cálcio por dia (Dietary Reference Intakes - DRIs, 2010). Estes minerais são essenciais para a manutenção da saúde de um indivíduo. O cálcio atua, principalmente, na saúde óssea como constituinte dos cristais de hidroxapatita presente nos ossos e dentes. Além disso, este mineral participa da coagulação sanguínea, da transmissão de impulsos nervosos e na contração e relaxamento muscular (Bronner & Pansu, 1999). E o potássio está envolvido no controle hidroeletrólítico e na regulação da atividade neuromuscular (Cozzolino, 2009).

O conteúdo de ferro na PLFE (8,10mg/100g de liofilizado) foi cerca de duas vezes maior comparado aos encontrados por Schauss et al. (2006) e Menezes et al. (2008) para os frutos de *E. oleracea*, que foram de 4,40 e 4,50mg/100g de liofilizado, respectivamente. Porém, o ferro presente em alimentos de origem vegetal encontra-se em sua forma férrica, que apresenta uma menor biodisponibilidade no organismo. Uma estratégia eficiente para o aumento da biodisponibilidade do ferro dos alimentos vegetais é a associação com alimentos fontes de ácido ascórbico, como goiaba, caju, laranja, acerola e limão (Cozzolino, 2009).

Não foi encontrado a presença de ácido ascórbico e dos carotenóides  $\alpha$ -caroteno,  $\beta$ -criptoxantina e licopeno, apenas do  $\beta$ -caroteno, que foi convertido em retinol para estimar o valor de vitamina A. O teor de vitamina A, encontrado neste trabalho na PLFE (3204,7 UI/100g de liofilizado) foi cerca de três vezes maior comparado ao da *E. oleracea*, 1002 UI/100g de liofilizado (Schauss et al., 2006). A vitamina A é um nutriente importante para o crescimento, desenvolvimento e manutenção dos tecidos corporais, auxilia no desenvolvimento ósseo, sendo fundamental para o processo da visão.

#### **4.2. Prospecção Fitoquímica**

Os resultados encontrados na prospecção fitoquímica estão apresentados na Tabela 3.

**Tabela 3:** Prospecção fitoquímica da polpa liofilizada dos frutos de *E. edulis*.

Classe dos metabólitos	Polpa de açaí liofilizada
Flavonóides	+
Alcalóides	-
Esteróides/triterpenos	-
Cumarinas	-
Polifenóis	+
Antraquinonas	-
Saponinas	+

Nota: +: presente; -: ausente

A presença de flavonóides e polifenóis na PLFE era um resultado esperado, visto que este fruto é conhecido pelo seu teor de antocianinas, que pertence a estas duas classes de metabólitos secundários. Além disso, em um trabalho com a mesma espécie utilizada neste estudo identificou a presença de polifenóis, como os ácidos ferúlico, gálico, protocateico e *p*-cumárico e os flavonóides catequina, epicatequina e quercetina (Borges et al., 2011).

Na PLFE também foi encontrado a presença de saponinas, sendo que este trabalho foi primeiro que identificou este composto nos frutos de *E. edulis*. As saponinas apresentam diversas propriedades biológicas benéficas à saúde, tais como efeito cardioprotetor (Zhang et al., 2003), atividade antifúngica (Zhao et al., 2001) e antiinflamatória (Borges et al., 2013). Portanto, este composto deve ser mais investigado nos frutos de *E. edulis*.

#### **4.3. Análise de Antocianinas Totais Monoméricas**

O conteúdo de antocianinas totais monoméricas presente na polpa liofilizada de *E. edulis* determinado pelo método espectrofotométrico com pH diferencial foi de 301,4 mg/100g de liofilizado.

Borges et al. (2011) analisaram o conteúdo de antocianinas totais monoméricas em frutos de *E. edulis* cultivados no estado de Santa Catarina em diferentes regiões e encontraram uma variação de 14,84 a 409,85mg de antocianinas em 100g de polpa. No nosso trabalho, os frutos de *E. edulis* foram submetidos a uma extração aquosa e no de Borges et al. (2011) foi utilizado uma extração com metanol acidificado com HCL, que é um processo mais eficiente para extração de compostos antioxidantes, como as antocianinas (Francis et al., 1989). Além disso, a polpa dos frutos de *E. edulis* analisada por Borges et al. (2011) passou por um processo de branqueamento com posterior secagem a 40°C, diferente da polpa do nosso estudo, que foi submetida a uma liofilização, que é um processo de desidratação por congelamento e sublimação da água. Assim, é esperado encontrar diferenças no conteúdo de antocianinas entre estas polpas, pois os tipos de solventes utilizados para a extração da polpa e alterações de temperatura influenciam o teor deste metabólito.

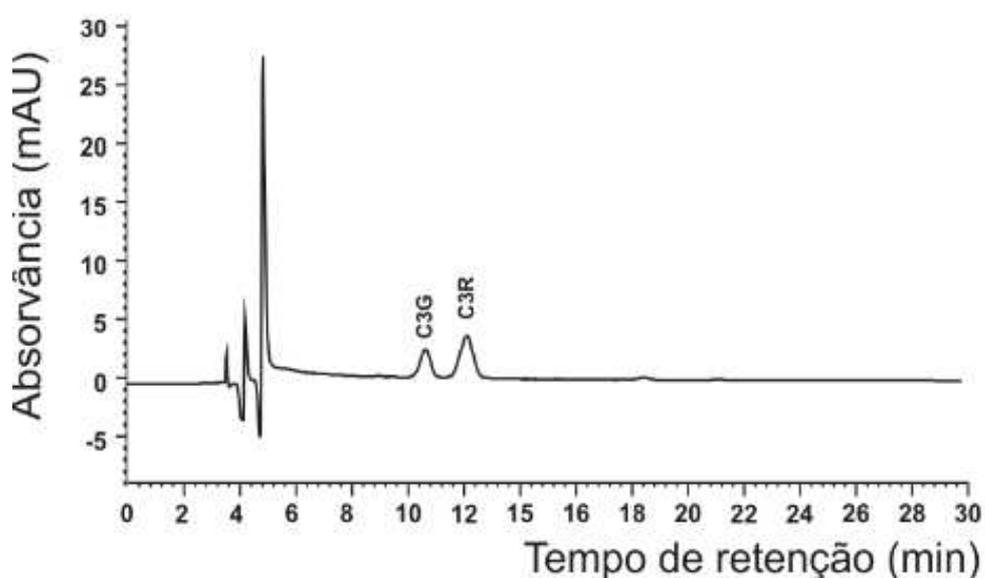
No trabalho de Borges et al. (2011), os autores justificaram esta variação no teor de antocianinas pelas diferenças de cultivo e maturação dos frutos. As palmeiras que apresentaram maiores teores de antocianinas em seus frutos foram as localizadas em altitude média (368m), em que o período de frutificação ocorre nos meses de verão. Também foi observado trabalho de Borges et al. (2011) que a maior incidência de radiação solar sobre o fruto tem um efeito positivo na síntese e acúmulo de antocianinas.

O valor de antocianinas totais encontrado no nosso estudo (301,4 mg/100g de liofilizado) foi compatível com os dados obtidos por De Brito et al. (2007), que foi de 290mg por 100g de polpa liofilizado, ao analisar por HPLC o teor de antocianinas de frutos de *E. edulis* cultivado no estado de São Paulo. Este valor também foi similar aos encontrados no açazeiro da Amazônia, 263mg de antocianina/100g de fruto fresco (Bobbio et al., 2000) e 319mg de antocianina/100g de polpa liofilizada (Schauss et al., 2006).

Rufino et al. (2010), ao avaliar os compostos bioativos de 18 frutos tropicais do Brasil, encontrou maior teor de antocianinas na juçara (*E. edulis*), que foi de 192 mg/100g de matéria fresca, seguido da murta (*Blepharocalyx salicifolius*), puçá-preto (*Mouriri pusa*), açaí (*E. oleracea*) e jaboricaba (*Myrciaria dubia*).

#### 4.4. Análise de Antocianinas por HPLC/DAD e HPLC-ESI-MS

Comparando os tempos de retenção de padrões referentes a duas antocianinas principais dos frutos de *E. edulis* descritas na literatura, pode-se confirmar a presença de cianidina 3-glicosídeo (C3G) e cianidina 3-rutinosídeo (C3R) no cromatograma obtido da amostra, que foram quantificados pelo método de padrão externo. Na Figura 4 encontra-se o cromatograma referente à análise das antocianinas C3G e C3R na PLFE por HPLC/DAD.



**Figura 4** - Cromatograma referente a PLFE. C3G: cianidina 3-glicosídeo e C3R: cianidina 3-rutinosídeo.

O conteúdo de antocianinas analisado por HPLC/DAD foi de 587mg/100g de PLFE, representado pelo somatório das antocianinas cianidina 3-rutinosídeo e da cianidina 3-glicosídeo. A cianidina 3-glicosídeo, representada pelo primeiro pico do cromatograma (Figura 4) apresentou um TR (tempo de retenção) de 10,8 minutos e um teor de 147mg/100g de PLFE. A cianidina 3-rutinosídeo, com tempo de retenção de 12,9 minutos, apresentou um teor de 440mg/100g de PLFE e foi representado pelo segundo pico do cromatograma. Na Tabela 4 encontram-se os valores das antocianinas C3G e C3R, com suas porcentagens relativas.

**Tabela 4** – Quantificação por HPLC/DAD das antocianinas em PLFE.

Antocianinas	Quantidade	% relativa
cianidina 3-glicosídeo	147mg/100g liofilizado	25,04%
cianidina 3-rutinosídeo	440mg/100g liofilizado	74,96%
<b>Total de Antocianinas*</b>	587mg/100g liofilizado	100,00%

\*Somatório das concentrações de cianidina 3-glucosídeo e de cianidina 3-rutinosídeo.

Além das antocianinas encontradas por HPLC/DAD, utilizando o método de HPLC-ESI-MS foi possível identificar outras quatro antocianinas, como peonidina, pelargonidina, delphinidina e cianidina 3-sambunosídeo, totalizando seis tipos de antocianinas identificadas na PFLE (Tabela 5).

**Tabela 5** - Antocianinas identificadas na polpa liofilizada de *E. edulis* por HPLC/MS.

Compostos	Tempo de retenção RT minutos	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	Íon precursor MS <sup>+</sup> (m/z)	Íons produtos MS/MS <sup>+</sup> (m/z)
Cianidina 3-glicosídeo	19,13	520	449	287
Cianidina 3-rutinosídeo	19,58	520	595	287, 449
Cianidina 3-sambunosídeo	18,50	310	581	287
Peonidina 3-rutinosídeo	22,56	520	609	301, 463
Pelargonidina 3- glicosídeo	21,11	520	433	271
Delphinidina 3-glicosídeo	20,12	520	465	303

De Brito et al. (2007) identificaram por espectrometria de massa seis antocianinas nos frutos de *E. edulis*. A cianidina 3-rutinosídeo (52,9%) e a cianidina 3-glicosídeo (45,9%) foram as predominantes na amostra, seguido pela cianidina 3-sambunosídeo, pelargonidina 3-glicosídeo, pelargonidina 3-rutinosídeo e cianidina 3-raminosídeo.

Vários trabalhos com o açaí obtido dos frutos de *E. oleracea* também identificaram a cianidina 3-rutinosídeo e a cianidina 3-glicosídeo como as

principais antocianinas (Gordon et al., 2012; Mulabagal et al., 2012; Schauss et al., 2006; De Rosso et al., 2008; Del Pozo-Insfran et al, 2004).

Nos frutos da espécie *E. precatória*, as antocianinas predominantes foram a cianidina 3-rutinosídeo (90,65%) e a pelargonidina 3-glicosídeo (9,2%). Foi também identificado nesta espécie a cianidina 3-sambunosídeo, porém, em pequenas quantidades e não foi encontrado a cianidina 3-glicosídeo (Del Pozo-Insfran et al, 2004).

Os cromatogramas obtidos da fragmentação dos íons, da monitoração das antocianinas a 310 e 510nm e das antocianinas identificadas da amostra em estudo encontram-se no Anexo 2.

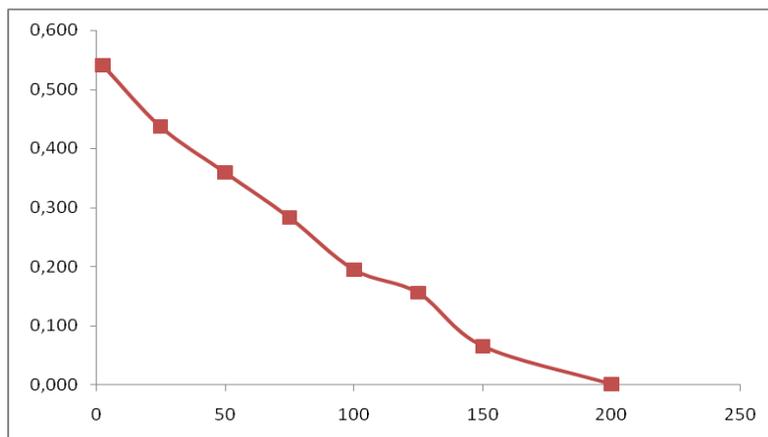
#### 4.5. Atividade Antoxidante (DPPH)

As absorbâncias correspondentes à percentagem de captura do radical livre de DPPH, obtidas após o preparo de concentrações seriadas da PLFE, estão apresentadas na Tabela 6.

**Tabela 6** - Concentrações da PLFE e suas correspondentes absorvâncias e % de captura de radical livre DPPH.

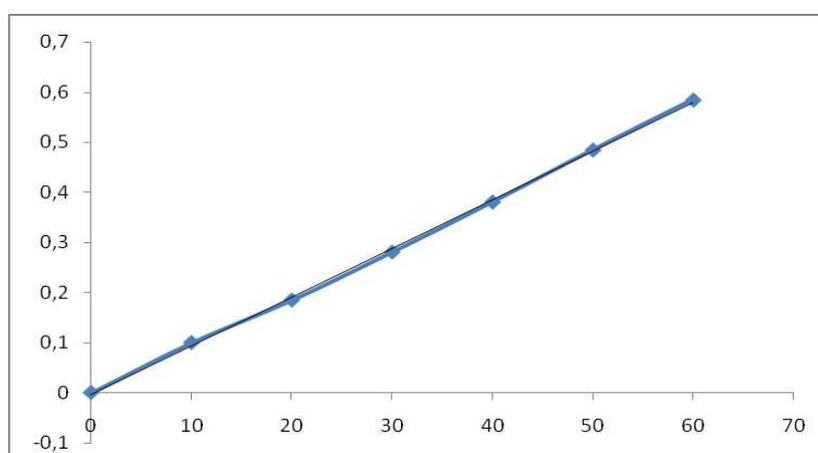
Concentração extrato (mg/L)	ABS média	% captura de radical livre DPPH
2,5	0,541	2,29
25	0,437	21,13
50	0,359	35,10
75	0,283	48,89
100	0,195	64,78
125	0,156	71,88
150	0,066	88,14
200	0,001	99,82

A partir dos valores representados na Tabela 6, foi plotado um gráfico de concentração da PLFE versus a % de captura de DPPH (Figura 5).



**Figura 5:** Gráfico com as concentrações seriadas da PLFE, em mg/L (eixo x) versus a % de captura de DPPH (eixo y).

A partir da equação da reta ( $y = -0,0028x + 0,5057$ ;  $R^2 = 0,974$ ) obtida no gráfico da Figura 5, o resultado que corresponde à concentração da PLFE necessário para reduzir em 50% a concentração inicial do radical DPPH (EC50), foi 81,7 mg/L. Pode-se ainda dizer que o EC50 foi 6,8g liofilizado/g DPPH, a partir da curva padrão de diluições seriadas do reagente de DPPH versus absorvância (Figura 6).



**Figura 6:** Gráfico com as concentrações seriadas de DPPH, em mM (eixo x) versus absorvância (eixo y).

Borges et al. (2011) avaliaram a capacidade antioxidante pelo método de DPPH dos frutos de *E. edulis* de cinco palmeiras localizadas em diferentes regiões do Estado de Santa Catarina e encontraram resultados variados, EC50 (g/g DPPH)=0,85, EC50=1,93, EC50=2,48, EC50=4,83 e EC50=2,86.

No trabalho de Borges et al. (2011), os frutos de *E. edulis* foram submetidos a uma extração com metanol acidificado com HCL, diferente do nosso trabalho que foi realizado uma extração aquosa. Assim, é esperado que no estudo de Borges et al. (2011) o conteúdo de antocianinas e, conseqüentemente, a atividade antioxidante do extrato fosse maior que a do nosso trabalho, pois a extração com metanol acidificado é mais eficaz para extração de antocianinas que a aquosa (Francis et al., 1989). Porém, um dos objetivos do nosso trabalho foi avaliar a capacidade antioxidante dos frutos de *E. edulis* extraídos por um solvente não tóxico, como a água, para uso na indústria alimentícia.

## 5. CONCLUSÃO

Há poucos dados sobre a composição química e fitoquímica dos frutos de *E. edulis*. Assim, os resultados encontrados neste trabalho contribuiram para uma melhor elucidação das características deste fruto. A composição dos nutrientes e de antocianinas dos frutos de *E. edulis* são similares ou superiores aos encontrados em trabalhos com o açaí da Amazônia (*E. oleracea*), podendo estas substâncias variarem de acordo com a forma de preparo da polpa.

Os nutrientes encontrados em teores significativos nos frutos de *E. edulis*, como ácidos graxos insaturados, fibras, minerais, como o potássio, cálcio e magnésio e a vitamina A, são de grande relevância, pois os mesmos possuem funções importantes para a manutenção e/ou melhoria da saúde humana. A quantificação das antocianinas majoritárias na PLFE, a cianidina 3-rutinosídeo e a cianidina 3-glicosídeo, e a identificação de outros compostos desta mesma classe são importantes para a especulação do potencial fármaco-biológico dos frutos de *E. edulis*, pois as antocianinas são metabólitos conhecidos por sua atividade antioxidante, antiinflamatória, entre outras.

Além disso, o conhecimento do valor nutritivo e dos compostos com atividades biológicas presentes nos frutos de *E. edulis*, o açaí da Mata Atlântica, pode indicar o potencial deste fruto em ser considerado um alimento funcional e valorizar sua aplicabilidade na indústria alimentícia, como corantes naturais de alimentos, como cosméticos e/ou como nutracêuticos. Ademais, o uso sustentável da espécie *E. edulis* pode contribuir para a mitigação da degradação ambiental do bioma Mata Atlântica, conservando e protegendo seus recursos genéticos.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AOAC (2005). Official methods of analysis (18<sup>a</sup> Ed.). Arlington, VA, USA: *Association of Official Analytical Chemists*.

Ball G.F.M. Vitamin A and the provitamin A carotenóides. (1998). In: Bioavailability and analysis of vitamins in foods. London: Chapman & Hall, cap. 3, 115-161.

Benatti, P., Peluso, G., Nicolai, R., Calvani, M. (2004). Polyunsaturated fatty acids: biochemical, nutritional and epigenetic properties. *J Am Coll Nutr.*, 23, 281-302.

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

Borges, G.S.C., Vieira, F.G.K., Copetti, C., Gonzaga, L.V., Zambiasi, R.C., Filho, J.M., Fett, R. (2011). Chemical characterization, bioactive compounds, and antioxidant capacity of jussara (*Euterpe edulis*) fruit from the Atlantic Forest in southern Brazil. *Food Research International*, 44 (7), 2128-2133.

Borges, R.M., Valen, S.S., Lopes, A.A., Barbi, N.S., Silva, A.J.R. (2013). Saponins from the roots of *Chiococca alba* and their in vitro anti-inflammatory activity. *Phytochemistry Letters*, 6, 96-100.

Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Science and Technology*, 28, p.25-30.

Brasil. Ministério do Meio Ambiente. (2006). O corredor central da mata atlântica: uma escala de conservação da biodiversidade. (1<sup>a</sup> ed.). Ministério do Meio Ambiente, Conservação Internacional e Fundação SOS Mata Atlântica. Brasília. *Ministério do Meio Ambiente; Conservação Internacional*, 46 p.

Bronner F., Pansu D. (1999). Nutritional aspects of calcium absorption. *Journal of Nutrition*, 129, 9-12.

Campos, F.M., Ribeiro, S.M.R., Della Lucia, C.M. Sant'Ana, H.M.P., Stringueta, P.C. (2009). Optimization of methodology to analyze ascorbic and dehydroascorbic acid in vegetables. *Química Nova*, 32 (1), 87-91.

Cardoso, L.M., Leite, J.P.V., Peluzio, M.C.G. (2011). Efeitos biológicos das antocianinas no processo aterosclerótico. *Revista Colombiana Ciências Química Farmaceutica*, 40, 116-138.

Chang, Y.C., Huang, K.X., Huang, A.C., Ho, Y.C., Wang, C.J. (2006). Hibiscus anthocyanins-rich extract inhibited LDL oxidation and oxLDL-mediated macrophages apoptosis. *Food and Chemical Toxicology*, 44, 1015-1023.

Chen, P.N., Kuo, W.H., Chiang, C.L., Chiou, H.L., Shou, Y.S., Chuc, S.C. (2006). Black rice anthocyanins inhibit cancer cells invasion via repressions of MMPs and u-PA expression. *Chemico-Biological Interactions*, 163, 218-229.

Cheng, G. W., Breen, P. J. (1991). Activity of phenylalanine ammonia-lyase (PAL) and concentrations of anthocyanins and phenolics in developing strawberry fruit. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 116, 865-869.

Costa, N. M. B., Rosa, C. O. B. (2010). Alimentos Funcionais - Componentes bioativos e efeitos fisiológicos. *Editora Rubio Ltda*. Rio de Janeiro, RJ, 536 p.

Covas, M., Pharm, D., Konstantinido, V., Fitó, M. (2009). Olive Oil and Cardiovascular Health. *J Cardiovasc Pharmacol.*, v.54, n. 6, 2009.

Cozzolino, S.M.F. Biodisponibilidade de nutrientes. (2009). *Editora Manole*, Rio de Janeiro, RJ, 3ª edição, 1020p.

De Brito, E.S., Araújo, M.C.P., Alves, R.E., Carkeet, C., Clevidence, B.A., Novotny, J.A. (2007). Anthocyanins Present in Selected Tropical Fruits: Acerola, Jambolão, Jussara, and Guajiru. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 55, 9389-9394.

De Rosso, V.V., Hillebrand, S., Montillab, E.C., Bobbio, F.O., Winterhalter, P., Mercadante, A. (2008). Determination of anthocyanins from acerola (*Malpighia emarginata* DC.) and açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) by HPLC–PDA–MS/MS. *Journal of Food Composition and Analysis*, 21, 291-299.

Del Pozo-Insfran, D. D., Brenes, C. H., Talcott, S. T. (2004). Phytochemical composition and pigment stability of acai (*Euterpe oleracea* Mart.). *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 52, 1539-1545.

DRI. Dietary Reference Intakes. (2010). In: Dietary Reference Intakes for calcium and vitamin D. Instituto of the Medicine of the National Academies Press. Disponível em <http://www.iom.edu/vitamind>. Acesso em 19/06/2012.

DRI. Dietary Reference Intakes. (2004). In: Dietary Reference Intakes for water, potassium, sodium, chloride and sulfate. Washington, D. C.: *Instituto of the Medicine of the National Academies Press*, Disponível em <http://www.nap.edu/>. Acesso em 30/03/2012.

DRI. Dietary Reference Intakes. (2000). In: Dietary Reference Intakes for vitamin A, vitamin E, selenium and carotenoids. Washington, D. C.: *Instituto of the Medicine of the National Academies Press*, Disponível em <http://www.nap.edu/>. Acesso em 19/05/2012.

Embrapa Amazônia Oriental. (2006). Sistemas de Produção. (1ª ed.). [http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Acai/SistemaProducaoAcai\\_2ed/index.htm](http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Acai/SistemaProducaoAcai_2ed/index.htm). Acesso em março de 2009.

Ferri, C. P.; Cavalcante, A. S. L. (1997). Pupunha para palmito. (1ª ed.). Ministério da Agricultura e do Abastecimento. *Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária e Abastecimento*, 30p.

Francis, F.J. (1989). Food colorants: anthocyanins. *Critical Review of Food Science and Nutrition*, 28 (4), 273-314.

Folch, J., Lees, M., Sloane-Stanley, G. A. (1957). Simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Journal Biology Chemistry*, 226 (1), 497-509.

Garcia-Alonso, M., Minihane, A.M., Rimbach, G., Rivas-Gonzalo, J.C., Tereza, S. P. (2009). Red wine anthocyanins are rapidly absorbed in humans and affect monocyte chemoattractant protein 1 levels and antioxidant capacity of plasma. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 20 (7), 521-529.

Gordon, A., Cruz, A.P.G., Cabral, L.M.C., Freitas, S.C., Taxi, C.M.A.D., Donangelo, C.M., Mattietto, R.A., Friedrich, M., Matta, V.M., Marx, F. (2012). Chemical characterization and evaluation of antioxidant properties of Açaí fruits (*Euterpe oleracea* Mart.) during ripening. *Food Chemistry*, 133, 256-263.

Hartmann, L., Lago, R.C.A. (1973). Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. *Laboratory Practice*, 22, 475-477.

Institute of Medicine. Dietary Reference Intakes (DRIs): Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium and Zinc. (2001). *National Academy Press*. Disponível em <http://www.nap.edu/>. Acesso em 19/05/2012.

Kalogeropoulos, N., Panagiotakos, D.B., Pitsavos, C., Chrysohoou, C., Rousinou, G., Toutouza, M., Stefanadis, C. (2010). Unsaturated fatty acids are inversely associated and n-6/n-3 ratios are positively related to inflammation and coagulation markers in plasma of apparently healthy adults. *Clinica Chimica Acta*, 411, 584–591.

Leite, J.P.V. (2008). Fitoterapia: bases científicas e tecnológicas. (1ª ed.). São Paulo, *Atheneu*, 328p.

Lorenzi, H., Sartori, S.F., Bacher, L.B., Lacerda M.T.C. (2006). Frutas brasileiras e exóticas cultivadas (de consumo *in natura*). (1ª ed.). São Paulo: *Instituto Plantarum de Estudos da Flora Ltda.*, 627p.

Menezes, E.M.S., Torres, A.T., Srur, A.U.S. (2008). Valor nutricional da polpa de açaí (*Euterpe oleracea* Mart) liofilizada. *Acta Amazonica*. Manaus, 38 (2), 311-316.

Myers, N., Mittermeier, R.A., Mittermeier, C.G., Fonseca, G.A.B., Kent, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. (2000). *Nature*, 403 (6772), 853-858.

Mulabagal, V., Calderón, A. (2012). Liquid chromatography/mass spectrometry based fingerprinting analysis and mass profiling of *Euterpe oleracea* (açaí) dietary supplement raw materials. *Food Chemistry*, 134, 1156-1164.

Oh, Y.T., Lee, J.Y., Lee, J., Kim, H., Yoona, K.S., Choe, W., Kanga, I. (2009). Oleic acid reduces lipopolysaccharide-induced expression of iNOS and COX-2 in BV2 murine microglial cells: Possible involvement of reactive oxygen species, p38 MAPK, and IKK/NF- $\kappa$ B signaling pathways. *Neuroscience Letters*, 464, 93-97.

Pinto, L. P., Brito, C. W. (2005). Mata Atlântica: biodiversidade, ameaças e perspectivas (1ª ed.). *Fundação SOS Mata Atlântica, Conservação Internacional do Brasil*. Belo Horizonte, 472p. (Capítulo 2).

Reis, M. S. (1996). Distribuição e dinâmica da variabilidade genética em populações naturais de palmito (*Euterpe edulis* Martius). Tese de Doutorado em Agronomia/Genética e Melhoramento de Plantas, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”/Universidade de São Paulo, Piracicaba, 210p.

Rodrigues, D.B., Raymundo, L.C., Lee, T.C., Simpson, K.L., Chichester, C.O. (1976). Carotenoid pigment changes in ripening *Momordica charantia* fruits. *Annals of Botany*, 40 (3), 615-624.

Rufino, M.S.M., Alves, R.E., Brito, E.S., Morais, S.M., Sampaio, C.G., Pérez-Jiménez, J., Saura-Calixto, F.D., (2007). Metodologia Científica: Determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH. Comunicado técnico 127. *Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA)*.

Rufino, M.S., Alves, R.R., Brito, E.S., Pérez-Jiménez, J., Saura-Calixto, F., Mancini-Filho, J. (2010). Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. *Food Chemistry*, 121, 996-1002.

Sant'Ana, H.M.P., Stringueta, P.C., Brandão, S.C.C., Azeredo, R.M.C. (1998). Carotenoid retention and vitamin A value in carrot (*Daucus carota* L.) prepared by food service. *Food Chemistry*, 61 (1-2), 145-151.

Schauss, A. G., Wu, X., Prior, R. L., Ou, B., Patel, D., Huang, D., Kababick, J.P. (2006). Phytochemical and nutrient composition of the freeze-dried Amazonian palm berry, *Euterpe oleraceae* Mart. (Açaí). *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 54, 8598-8603.

Toufektsian, M.C., De Lorgeril, M., Nagy, N., Salen, P., Donati, M.B., Giordano, L., Mock, H.P., Peterek, S., Matros, A., Petroni, K., Piliu, R., Rotillo, D., Tonelli, C., De Leiris, J., Boucher, F., Martin, C. (2008). Chronic dietary intake of plant-derived anthocyanins protects the rat heart against ischemiareperfusion injury. *Journal of Nutrition*, 138, 747-752.

Wagner, H., Bladt, S. (1996). Plant Drug Analysis: a Thin Layer Chromatography Atlas. (2<sup>a</sup> ed.). Berlin, *Springer*. 384p.

Zhang, W., Wang, X., Tang, H., Wang, M., Ji, L., Wen, A., Wang, J. (2013). Triterpenoid saponins from *Clematis tangutica* and their cardioprotective activities. *Fitoterapia*, 84, 326-331.

Zhong, H.M., Chen, C.X., Tian, X., Chui, Y.X., Chen, Y.Z. (2001). Triterpenoid saponins from *Clematis tangutica*. *Planta Med*, 67, 484-488.

Xia, M., Ling, W., Zhu, H., Ma, J., Wang, Q., Hou, M., Tang, Z., Guo, H., Liu, C., Ye, Q. (2009). Anthocyanin attenuates CD40-mediated endothelial cell activation and apoptosis by inhibiting CD40-induced MAPK activation. *Atherosclerosis*, 202, 41-47.

## CAPÍTULO 3

**EFEITO DA POLPA DOS FRUTOS DE *Euterpe edulis* Mart. NOS FATORES DE RISCO E LESÕES ATEROSCLERÓTICAS E HEPÁTICAS EM CAMUNDONGOS APO E <sup>-/-</sup>.**

## 1. INTRODUÇÃO

As doenças cardiovasculares (DCV) constituem uma importante causa de morte nos países desenvolvidos e em desenvolvimento. Em geral, as manifestações clínicas das DCV, como infarto do miocárdio, acidente vascular encefálico e doença vascular periférica, são causados por um processo aterosclerótico (Ishigaki et al., 2008). A aterosclerose é uma doença inflamatória crônica, de origem multifatorial, que ocorre em resposta à agressão endotelial. Um conjunto de reações celulares e moleculares a diversos agressores, dentre eles o excesso de radicais livres, a elevação das partículas de lipoproteína de baixa densidade (LDL) no plasma e a presença de LDL oxidada (LDLox) na íntima são alguns dos responsáveis pelo comprometimento vascular (Lusis, 2000).

Modelos animais têm sido utilizados para o estudo de novos fatores envolvidos na aterosclerose e para avaliar o efeito de substâncias, como fármacos e alimentos, na progressão das lesões ateroscleróticas. O camundongo é o modelo animal mais utilizado para esta finalidade, porém, as espécies selvagens são altamente resistentes ao desenvolvimento da aterosclerose. Assim, animais como o camundongo LDLr<sup>-/-</sup> e o ApoE<sup>-/-</sup>, que são deficientes no receptor para LDL e na apoproteína E, respectivamente, têm sido mais utilizados por serem mais apropriados para o estudo da aterosclerose (Breslow, 1996). Os camundongos ApoE<sup>-/-</sup> foram criados por recombinação homóloga de células tronco embrionárias. A deficiência da apoproteína E resulta em níveis de colesterol elevados devido à remoção inadequada de lipoproteínas remanescentes no plasma, como os quilomícrons (QM) e a lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL) (Breslow, 1996; Fazio et al., 1997).

Vários estudos epidemiológicos têm demonstrado a associação inversa entre o consumo de frutas e verduras e o risco de doenças cardiovasculares. Estes alimentos possuem em sua composição substâncias, como minerais, vitaminas, fibras e compostos fenólicos que podem atuar como antioxidantes (Mancini-Filho, 2008). As antocianinas, que são metabólitos secundários biossintetizados por plantas e pertencentes ao grupo dos flavonóides (Leite, 2008), possuem atividades antioxidantes e antiinflamatórias, que podem reduzir

o desenvolvimento e a progressão das lesões ateroscleróticas. (Cardoso et al., 2011). Há evidências que as antocianinas atenuam o estresse oxidativo, aumentam a resistência da LDL à oxidação (Yi et al., 2010) e reduzem fatores pró-inflamatórios, como citocinas, quimiocinas, moléculas de adesão e metaloproteinases (Karlsen et al., 2007; Beltrán-Debón et al., 2010).

A espécie *Euterpe edulis* Martius, da família Arecaceae, popularmente chamada de palmeira juçara e pertencente ao mesmo gênero botânico do açazeiro da Amazônia (*Euterpe oleracea* Martius), é encontrada principalmente em áreas remanescentes de Mata Atlântica do Brasil (Lin, 1988). Os frutos de *E. edulis* apresentam coloração roxa intensa, devido, principalmente, à presença de antocianinas. Como descrito no capítulo 2, o teor de antocianinas da polpa liofilizada dos frutos de *E. edulis* (PLFE) utilizada no presente trabalho é de 301,4 mg/100g, quantidade esta similar a teores encontrados em outros trabalhos com a *E. oleracea* (Bobbio et al., 2000; Schauss et al., 2006) e superior a de outros outros frutos, como acerola (*Malpighia emarginata*), jambolão (*Syzygium cumini*) e guajiru (*Chrysobalanus icaco*), que apresentaram, respectivamente, 48 mg, 79 mg e 104 mg de antocianinas/100 g de liofilizado (De Brito et al., 2007).

Além das antocianinas, os frutos de *E. edulis*, conforme mostrado no capítulo 2, apresentam altos teores de fibras (34,90 g/100 g de PLFE) e ácidos graxos insaturados (30,19 g/100 g de PLFE). As fibras dietéticas, principalmente as solúveis, auxiliam na redução do colesterol plasmático (Fernandes et al., 2005) e os ácidos graxos insaturados possuem atividade antiinflamatória (Kalogeropoulos et al., 2010), que contribuem para a redução do risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares.

Assim, o objetivo deste trabalho é avaliar os efeitos biológicos da PLFE no plasma e nas artérias de camundongos deficientes no gene da apoproteína E e analisar as defesas antioxidantes e alguns constituintes hepáticos destes animais, visto que no fígado ocorre grande parte da oxidação da LDL pelo citocromo P450, que é um dos eventos iniciais da aterosclerose (Aviram et al., 1999).

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo Geral**

Avaliar o efeito da polpa dos frutos de *Euterpe edulis* Mart. nos fatores de risco e lesões ateroscleróticas e hepáticas em camundongos ApoE<sup>-/-</sup>.

### **2.2. Objetivos Específicos**

- Avaliar o efeito da PLFE em camundongos ApoE<sup>-/-</sup> monitorando parâmetros sanguíneos de colesterol total, lipoproteínas de alta densidade (HDL), triglicerídeos e glicose;
- Analisar o efeito da PLFE sobre a atividade de enzimas antioxidantes (superóxido desmutase e catalase) no fígado de camundongos ApoE<sup>-/-</sup>;
- Analisar o efeito da PLFE sobre lesões ateroscleróticas na aorta de camundongos ApoE<sup>-/-</sup>;
- Avaliar o efeito da PLFE na alteração histopatológica no fígado de camundongos ApoE<sup>-/-</sup>.

### **3. METODOLOGIA**

#### **3.1. Coleta do Material Vegetal e Preparo da PLFE**

A forma de coleta dos frutos de *E. edulis* e o modo de obtenção da PLFE estão descritos nos itens 3.1 e 3.2 do Capítulo 2, respectivamente.

#### **3.2. Cuidados Éticos**

O ensaio biológico foi aprovado pelo Comitê de Ética de Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais (CETEA/UFMG) no dia 01/07/2009. Protocolo nº 98/2009 (Anexo 3).

#### **3.3. Animais e Dietas**

Foram utilizados 60 camundongos (10 animais C57BL6 e 50 animais deficientes no gene da apoproteína E - ApoE<sup>-/-</sup>), de ambos os sexos, com 14 semanas de idade, pesando entre 25g e 30g.

Os animais foram provenientes do Biotério do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da UFV e o ensaio biológico foi realizado no Laboratório de Nutrição Experimental do Departamento de Nutrição e Saúde da UFV. Os animais foram mantidos em gaiolas coletivas, separando-se os machos das fêmeas, em ambiente climatizado (temperatura média de 22 °C) e com ciclo claro/escuro de 12 horas.

Os animais receberam água e dieta *ad libitum*. As dietas foram elaboradas de acordo com o American Institute of Nutrition 93 - AIN-93 M (Reeves et al., 1993), sendo confeccionadas manualmente na forma de pellets e mantidas sob refrigeração, protegidas da luz, até o momento da utilização.

Para eliminar variáveis de confusão, as dietas experimentais foram modificadas, de forma que todas as dietas fossem isocalóricas. Para a adição da PLFE às dietas, foi considerado o seu teor de umidade, que foi de 5,71%.

As composições das dietas experimentais estão apresentadas na Tabela 1.

Os animais foram divididos aleatoriamente em 6 grupos experimentais, com 10 animais em cada grupo, conforme descrito abaixo:

**G1:** camundongos C57BL6 (controle negativo – apenas dieta)

**G2:** camundongos apoE<sup>-/-</sup> (controle positivo – apenas dieta)

**G3:** camundongos apoE<sup>-/-</sup> (dieta + 2% de PLFE)

**G4:** camundongos apoE<sup>-/-</sup> (dieta + 6% PLFE)

**G5:** camundongos apoE<sup>-/-</sup> (dieta + 10% PLFE)

**G6:** camundongos apoE<sup>-/-</sup> (dieta + 2% acetato de  $\alpha$ -tocoferol)

Metade dos animais do G1 e G2 sofreram eutanásia no tempo 0 (antes do início do tratamento) para avaliar a ausência e a presença, respectivamente, das lesões ateroscleróticas. Para tal, foi utilizada a técnica de análise *en face* pela coloração Sudan IV (Palinski *et al.*, 1994).

Após 75 dias de tratamento, os animais foram submetidos a jejum de 12 horas e em seguida sofreram eutanásia, sob anestesia com 10mg/Kg de xilazina e 80mg/Kg de quetamina por via intraperitoneal. O sangue foi removido por punção na aorta abdominal e centrifugado a 3.000 rpm x g, por 10 minutos à 4°C. O soro retirado foi armazenado à - 80 °C para posteriores análises. Parte do fígado e a aorta foram removidos cirurgicamente, lavados em tampão salino fosfato (PBS) e imediatamente congelados -80 °C. O lóbulo mediano do fígado foi removido e fixado em formaldeído 4% em tampão fosfato 0,1M (pH=7,2) por 48 horas em temperatura ambiente.

**Tabela 1** - Composição das dietas experimentais administradas aos animais

Ingredientes (em gramas)	Dieta padrão	Dieta 2%	Dieta 6%	Dieta 10%	Dieta 2%
		PLFE	PLFE	PLFE	Acetato de $\alpha$ -tocoferol
Amido	515,7	521,3	537,4	549,2	495,7
Amido dextrinizado (15,5%)	155	155	155	155	155
Sacarose* (10%)	100	91,6	73,2	56	100
Proteína* (caseína) (9%)	90	88,6	85,5	82,5	90
Fibra* (celulose) (5%)	50	41,2	21,8	4,0	50
Mix de mineral (3,5%)	35	35	35	35	35
Mix de vitamina (1%)	10	10	10	10	10
Bitartarato de colina (0,25%)	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
L-cistina (0,18%)	1,8	1,8	1,8	1,8	1,8
Óleo de soja* (4%)	40	31,8	13,8	-	20
PLFE**	-	21,2	64,0	104,0	-
Antocianinas	-	0,45 (mg)	1,40 (mg)	2,29 (mg)	
Acetato de $\alpha$ -tocoferol***	-	-	-	-	20
Total	1000g	1000g	1000g	1000g	1000g

Fonte: Reeves et al. (1993) – modificado. \*Para estes ingredientes foi descontado o valor nutricional do açaí liofilizado (*E. oleracea*), segundo Schauss et al. (2006). \*\*Foi considerado o valor de umidade da PLFE (5,71%). \*\*\*Foi descontada a quantidade de óleo de acetato do  $\alpha$ -tocoferol, de forma que o conteúdo de óleo total da dieta resultasse em 40%.

### 3.4. Peso corporal e ingestão alimentar

Os animais foram pesados semanalmente para avaliar a evolução ponderal. Também foi quantificado o consumo semanal de dieta pelos grupos de animais experimentais. Para tal, as dietas ofertadas aos animais foram pesadas semanalmente, sendo que os dados da diferença entre dieta ofertada e o

restante não consumido e as sobras no fundo das gaiolas foram consideradas para o cálculo da ingestão alimentar semanal.

### **3.5. Análises Sanguíneas**

Foram realizadas dosagens sorológicas de colesterol total, HDL e triglicerídeos por método colorimétrico enzimático. As análises foram realizadas em equipamento Cobas Mira Plus, da Roche®, utilizando os kits Bioclin®, no Laboratório de Análises Clínicas da Divisão de Saúde da UFV.

### **3.6. Avaliação das Lesões Ateroscleróticas**

A avaliação das lesões ateroscleróticas no tecido aórtico foi determinada pela deposição lipídica no arco aórtico e nas aortas torácica e abdominal, utilizando a análise *en face* pela coloração Sudan IV (Palinski *et al.*, 1994). As aortas foram dissecadas, removendo cuidadosamente toda a adventícia a partir da válvula aórtica até a bifurcação ilíaca. As aortas foram colocadas em uma solução de 70% de etanol durante cinco minutos. Posteriormente, foram coradas por 10 minutos, sob agitação, em uma solução filtrada contendo 0,5% de Sudan IV, 35% de etanol e 50% de acetona, sendo em seguida descoradas em solução de 80% de etanol, por cinco minutos. As aortas coradas foram abertas longitudinalmente e fotografadas por uma câmera digital Sony DSC-W55, sendo padronizado 5,0 mega-pixel de definição, com função macro ativada e, altura, zoom e luminosidade controlados. A análise da deposição lipídica foi realizada no programa ImagePro Plus 4.5. Os pixels foram convertidos em milímetros quadrados usando uma escala microscópica padrão nas mesmas condições em que aortas foram submetidas, de acordo com o *software*. A soma das áreas das lesões ateroscleróticas foi calculada pelo programa, sendo o resultado expresso em milímetros quadrados.

### **3.7. Determinação da Atividade das Enzimas Antioxidantes**

#### **3.7.1. Superóxido Dismutase (SOD)**

Para determinar a atividade da enzima superóxido dismutase (SOD), 100mg do fígado dos camundongos, estocados sob congelamento a  $-80^{\circ}\text{C}$ , foram homogeneizados em 1 mL de tampão fosfato 50 mM (PBS pH7,2) e centrifugados por 10 min a 6.000 rpm, em  $4^{\circ}\text{C}$ . O sobrenadante foi utilizado para a dosagem da enzima. A atividade da SOD foi determinada usando leitor de microplaca (Asys, UVM 340) a 570 nm, segundo Dieterich et al. (2000) modificado, baseando na capacidade desta enzima em catalisar a reação de redução do superóxido  $\text{O}_2^{\cdot-}$  à peróxido de hidrogênio, diminuindo assim a razão de auto-oxidação do pirogalol. O resultado foi corrigido pelo teor de proteína na amostra, mensurado pelo método colorimétrico descrito por Lowry et al (1951). Este método consiste na adição de hidróxido de sódio e carbonato de cálcio à uma mistura contendo proteínas, além de sulfato de cobre, tartarato de sódio e Folin-fenol Ciocalteau. Nesta determinação, uma coloração azul surge devido a reação da proteína com o íon cobre em solução alcalina. As análises foram realizadas em triplicata.

#### **3.7.2. Catalase (CAT)**

Para determinar a atividade da enzima catalase (CAT), 100mg do fígado dos camundongos, estocados sob congelamento a  $-80^{\circ}\text{C}$ , foram homogeneizados em 1 mL de tampão fosfato 50 mM (PBS pH7,2) e centrifugados por 10 min a 6.000 rpm, em  $4^{\circ}\text{C}$ . O sobrenadante foi utilizado para a dosagem das enzimas. A atividade da CAT foi determinada pela taxa de decaimento do peróxido de hidrogênio lido em espectrofotômetro (Pró-análise UV.1600) a 240 nm no tempo 0, 30 e 60 segundos, segundo descrito por Aebi (1984). Foi feito um branco para cada amostra para zerar o equipamento, que constituiu de 20  $\mu\text{L}$  do sobrenadante da amostra juntamente com 2 mL de tampão fosfato. Para a leitura, foram utilizados 20  $\mu\text{L}$  do sobrenadante da amostra acrescido de 2 mL da solução de tampão fosfato com peróxido. O resultado foi corrigido pelo teor de proteína na amostra, mensurado de acordo

com o método descrito por Lowry et al. (1951). As análises foram realizadas em triplicata.

### **3.8. Análise Histopatológica**

#### **3.8.1. Processamento Histológico do Tecido Hepático**

Para análise histológica, foram utilizados cinco animais de cada grupo. O lóbulo mediano destes animais foi fixado em formaldeído 4% em tampão fosfato 0,1M (pH= 7,2) por 48 horas em temperatura ambiente. Em seguida, fragmentos do fígado obtidos de forma aleatória foram desidratados em etanol, diafanizados em xilol e embebidos em parafina (Novaes et al., 2012). O preparo de tecidos biológicos para microscopia de luz frequentemente conduz à retração do tecido, especialmente quando estes são embebidos em parafina. Para evitar falsas estimativas dos parâmetros estereológicos, a retração tecidual foi calculada. Dois pequenos fragmentos de tecido de cada animal, com um volume previamente determinado (Scherle, 1970) foram cuidadosamente embebidos em parafina. Os fragmentos foram totalmente cortados em um micrótomo rotativo na espessura de 5  $\mu\text{m}$ , de maneira que uma a cada 25 secções histológicas foi montada em lâmina histológica. Os volumes dos blocos de tecido foram microscopicamente determinadas usando o princípio de Cavalieri's (Dorph-Petersen et al., 2001) e comparados ao volume original dos fragmentos determinados previamente à inclusão em parafina. A retração total do tecido hepático foi de 24% e as estimativas estereológicas foram corrigidas usando este índice.

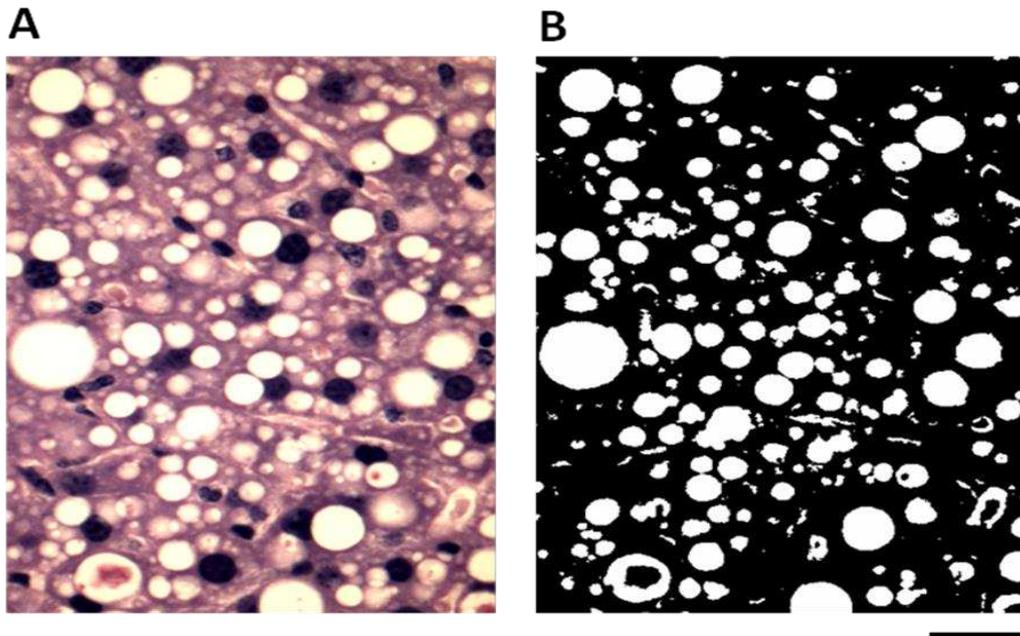
#### **3.8.2 Densidade Volumétrica e Análise de Colágeno**

A densidade volumétrica de hepatócitos ( $Vv[h]$ , %), focos inflamatórios ( $Vv[inf]$ , %) e gotículas de lipídeos ( $Vv[lipid]$ , %) foram estimadas usando cortes histológicos de 4  $\mu\text{m}$  de espessura corados com hematoxilina e eosina (Catta-Preta et al., 2011). Foram analisados 50 campos histológicos de cada grupo obtidos aleatoriamente com objetiva de 40x, e um total de  $3.65 \times 10^4 \mu\text{m}^2$  da área do fígado. Para evitar análises repetidas da mesma área histológica, os

cortes foram avaliados em semi-séries, utilizando 1 em cada 20 secções. Para a análise estereológica, um sistema de teste com 300 pontos foi usado em uma área teste padrão (At) de  $73 \times 10^3 \mu\text{m}^3$  ao nível do tecido. A densidade volumétrica foi estimada por contagem de pontos usando a seguinte fórmula:  $V_v = P_p(\text{estrutura})/P_T$ , em que  $P_p$  é o número de pontos que incidem sobre a estrutura de interesse e  $P_T$  é o número total de pontos do sistema de teste (Novais et al., 2012).

Para determinar a área histológica ocupada por gotículas de lipídeos ( $\text{mm}^3$ ) no tecido hepático foi utilizado o programa Image Pro-plus 4,5<sup>®</sup> (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, EUA). As análises foram realizadas segundo Catta-Preta et al. (2011), da seguinte forma: (a) o tecido hepático foi submetido à uma função de binarização de cor e segmentado em preto e branco, (b) as vesículas de gordura foram selecionadas e representadas pela cor branca; (c) o restante do tecido hepático foi selecionado e representado pela cor preta; (d) a porcentagem da área histológica ocupada pela cor branca em todas as imagens foi mensurada usando a ferramenta de histograma e utilizada como um índice de esteatose hepática (Figura 1).

Para cada grupo, 20 secções de 8  $\mu\text{m}$  de espessura corados com *Sirius red* e *Fast green* foram usados para quantificar os níveis de proteínas colagenosas e não colagenosas no tecido hepático, respectivamente (López-De León e Rojkind, 1985). Nesse método os corantes foram eluídos dos cortes histológicos e a quantidade de proteínas colagenosas e não colagenosas foi analisada em espectrofotômetro nas regiões de absorbâncias 540 nm e 605 nm, respectivamente.



**Figura 1.** Método de análise de imagem para avaliar esteatose hepática (imagem digital de seção embebidas em parafina coradas com hematoxilina e eosina, barra = 40  $\mu\text{m}$ ). A) Imagem original observada no *software* preparação de análise de imagem. B) A mesma imagem é observada após binarização de cor e segmentação em preto e branco puro. A cor branca é atribuída a vesículas de gordura. A área de cor "branca" foi determinada automaticamente com a ferramenta histograma.

### 3.8.3 Densidade Numérica e Cariometria

O número de hepatócitos em um espaço tridimensional foram estimados usando o método do *disector* óptico, conforme Mandarim de Lacerda, 2003. Este método consiste de dois planos paralelos contendo as partículas de interesse entre eles. Um volume de referência foi criado com duas seções ópticas paralelas automaticamente separados por  $4\mu\text{m}$  de distância ( $h$ ) e dois planos de referência, ambos contendo um quadro de teste com área padronizada ( $A_T = 2670 \mu\text{m}^2$ ). A altura de seção ( $h = 4\mu\text{m}$ ) foi definida usando o microscópio óptico BX-50<sup>®</sup> (Olympus, Tokyo, Japão) com uma lente objetiva de imersão em óleo de 100x (Olympus Uplan, NA= 1.35).

As densidades numéricas de hepatócitos ( $N_v[h]$ , células por  $\text{mm}^3$ ) e de células intersticiais ( $N_v[ic]$ , células por  $\text{mm}^3$ ) foram estimadas a partir de 10 pares de *disector* obtidos aleatoriamente para cada animal, sendo definida como  $N_v [h; ic] = Q \cdot [núcleos] / h \times A_T$ , onde  $Q[núcleos]$  representa o número

de perfis de núcleos contados na área de teste ( $A_T$ ) na secção de referência do *disector* (plano superior) (Mandarim de Lacerda, 2003). Os núcleos dos hepatócitos com uma distância menor que o eixo geométrico médio calculado dos núcleos ( $8\mu\text{m}$ ) entre eles foram considerados como pertencendo à mesma célula e contados apenas uma vez (Novaes et al., 2012).

O número representativo de *disectors* usado na análise estereológica para cada animal foi determinado considerando a estabilização do coeficiente de variação (CV) para o número de núcleos de hepatócitos em amostras crescentes e aleatórias de *disectors* (5, 10, 15, 20 e 25). Assim, foi calculada a média aritmética e o CV para cada tamanho de amostra. Quando o aumento do número de *disectors* não resultou em diferença significativa do CV entre 3 amostras consecutivas, o menor tamanho de amostra foi considerado como o número mínimo representativo (Novaes et al., 2012). Usando este método, a variação do número de núcleos hepatócitos foi estabilizada a partir de uma amostra de 10 *disectors*.

O volume de 50 núcleos de hepatócitos para cada animal foi determinada de acordo com Sala et al., (1994). Todas as análises morfológicas foram realizadas utilizando o *software* de análise de imagem Image Pro-plus 4,5<sup>®</sup> (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, EUA).

### **3.9. Análises Estatísticas**

Os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão. A normalidade na distribuição dos dados foi verificada usando o teste Shapiro-Wilk. Os dados com distribuição normal foram submetidos à Análise de Variância Unifatorial (one-way ANOVA) seguido pelo teste de Tukey para comparações múltiplas. Os dados com distribuição não normal foram submetidos ao teste de Kruskal-Wallis seguido teste de Dunns para comparações múltiplas. Comparações dentro do mesmo grupo foram realizadas pelo teste t pareado para variáveis com distribuição normal ou Wilcoxon para variáveis com distribuição não normal. Todos os testes foram realizados utilizando o *software* estatístico GraphPad Prism 5,01 (GraphPad Software, Inc, CA, EUA). Resultados com  $p < 0,05$  foram considerados significativos.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Peso Corporal e Ingestão Alimentar

A Tabela 2 mostra a variação da média de peso dos animais antes e após o ensaio biológico. Comparando o peso final e inicial dos animais do mesmo grupo, houve diferença significativa no controle negativo (G1), que apresentou uma perda de 1,58 g e no G5, composto por camundongos ApoE<sup>-/-</sup> que receberam uma dieta com 10% de PLFE, que apresentou um ganho de peso de 5,0 g após o experimento.

A ingestão alimentar média dos grupos foi: 3,27 g ± 0,39 (G1), 3,95 ± 0,53 (G2), 3,72 ± 0,50 (G3), 3,74 ± 0,21 (G4), 3,74 ± 0,28 (G5) e 3,77 ± 0,51 (G6), não tendo sido encontrado diferenças significativas na ingestão alimentar entre os grupos, com exceção do G2 que apresentou uma maior ingestão alimentar.

**Tabela 2.** Peso corporal dos grupos experimentais antes e após o ensaio biológico.

	Peso inicial (g)	Peso final (g)
G1	22,89 ± 2,09	21,31 ± 2,79*
G2	24,05 ± 1,8	23,50 ± 2,07
G3	24,25 ± 0,43	24,30 ± 2,07
G4	23,62 ± 2,00	22,65 ± 1,65
G5	21,31 ± 1,20	26,32 ± 1,95*
G6	24,28 ± 0,57	24,11 ± 0,33

\*Diferença estatística, p<0,05; teste t pareado.

O consumo diário de antocianinas (mg) dos grupos, calculado de acordo com as doses na dieta de PLFE dos grupos G3 (2%), G4 (6%) e G5 (10%), com o consumo diário de dieta de cada grupo e com o conteúdo de antocianinas analisado por HPLC/DAD, que foi 587mg/100g de PLFE (resultado demonstrado no item 4.4 do Capítulo 2), encontra-se na Tabela 3.

**Tabela 3.** Consumo de antocianinas (mg) por dia e por Kg de peso corporal dos grupos de animais que receberam 2 (G3), 6 (G6) e 10% (G5) de PLFE.

	<b>Consumo de antocianinas (mg/dia)</b>	<b>Consumo de antocianinas (mg)/ Kg de peso corporal</b>
G3	0,45	18,5
G4	1,40	59,27
G5	2,29	107,46

Considerando a ingestão diária de dieta pelos animais do G6 (3,77g/dia) e o total de  $\alpha$ -tocoferol acrescentado na dieta (2% em relação a dieta), o consumo de acetato de  $\alpha$ -tocoferol diário foi de 75,4 mg/dia.

Hertog et al. (1993) avaliaram o consumo médio diário de flavonóides, que foi de 0,33 mg/kg de peso corporal para um homem com peso médio de 75 kg. Mesmo com este baixo nível de ingestão, os autores identificaram uma relação inversamente proporcional entre o consumo de flavonóides e a mortalidade por doenças cardíacas em humanos.

#### **4.2. Análises Sanguíneas**

Os valores sanguíneos de colesterol total, HDL colesterol, triglicerídeos e glicose dos grupos experimentais, após 75 dias de tratamento, estão apresentados na Tabela 4.

**Tabela 4.** Valores sanguíneos de colesterol total, HDL colesterol, triglicerídeos e glicose dos grupos experimentais.

Grupos	Colesterol (mg/dL)	HDL (mg/dL)	Triglicerídeos (mg/dL)	Glicose (mg/dL)
<b>G1</b>	118.17 ± 13.17 <sup>a</sup>	68.92 ± 6.79 <sup>a</sup>	98.00 ± 20.48 <sup>a</sup>	166.57 ± 18.97 <sup>a</sup>
<b>G2</b>	457.60 ± 84.36 <sup>b</sup>	32.60 ± 5.38 <sup>b</sup>	97.20 ± 28.78 <sup>a,b</sup>	142.20 ± 45.93 <sup>a</sup>
<b>G3</b>	428.78 ± 42.94 <sup>b</sup>	29.33 ± 3.32 <sup>b,c</sup>	55.22 ± 22.33 <sup>b,c</sup>	145.20 ± 42.06 <sup>a</sup>
<b>G4</b>	399.46 ± 66.17 <sup>b</sup>	25.31 ± 4.23 <sup>c,d</sup>	41.15 ± 17.09 <sup>c</sup>	142.15 ± 30.09 <sup>a</sup>
<b>G5</b>	364.36 ± 54.30 <sup>b</sup>	16.36 ± 5.11 <sup>e</sup>	62.29 ± 12.35 <sup>b,c</sup>	241.00 ± 52.12 <sup>b</sup>
<b>G6</b>	406.20 ± 102.83 <sup>b</sup>	19.60 ± 6.84 <sup>d,e</sup>	92.80 ± 35.14 <sup>a,b</sup>	-

Dados foram expressos como média e desvio padrão (media ± DP). <sup>a,b,c,d,e</sup> Letras diferentes nas colunas indicam diferenças estatísticas,  $p < 0.05$ ; teste de Kruskal-Wallis. G1: controle negativo C57Bl/6; G2: controle positivo apoE<sup>-/-</sup>; G3: apoE<sup>-/-</sup> + dieta com 2% de PLFE; G4: apoE<sup>-/-</sup> + dieta com 6% de PLFE; G5: apoE<sup>-/-</sup> + dieta com 10% de PLFE; G6: apoE<sup>-/-</sup> + dieta com 2% de acetato de  $\alpha$ -tocoferol. Os níveis de glicose não foram avaliados no grupo G6, pois o material biológico coletado não foi suficiente para todas as análises.

Comparado ao grupo composto por animais normais C57Bl/6 (G1 - controle negativo), o nível plasmático de colesterol do controle positivo apoE<sup>-/-</sup> (G2) foi superior, o valor de HDL foi menor e os teores de triglicerídeos e glicose não alteraram.

Os resultados com relação às concentrações de colesterol e glicose eram esperados, visto que os camundongos apoE<sup>-/-</sup> normalmente apresentam níveis de colesterol plasmático superiores (Zhang et al., 1992) e glicemia normal em comparação ao controle selvagem (Kawashima et al., 1994).

Com relação aos triglicerídeos plasmáticos, os camundongos apoE<sup>-/-</sup> não necessariamente possuem concentrações elevadas em relação aos animais normais (Huang et al., 1998). A apoproteína E parece atuar na atividade da lipase lipoprotéica (LPL), enzima que catalisa a hidrólise dos triglicerídeos dos quilomícrons e das lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL), em dois sentidos. Embora a ApoE possa aumentar a atividade da LPL, quantidades elevadas de ApoE podem inibir a atividade desta enzima, aumentando assim

os níveis plasmáticos de triglicerídeos (Peter et al., 2009). Trabalhos mostraram que as concentrações de triglicerídeos em animais com deficiência de ApoE foram superiores aos animais normais apenas quando associado a uma dieta rica em sacarose, em gorduras saturadas e colesterol (Huang et al., 1998) e em animais obesos geneticamente modificados (Hofmann et al., 2008).

Os níveis de colesterol não diferiram estatisticamente entre os grupos de animais que receberam PLFE nas três doses administradas, 2, 6 e 10%, e os que receberam 2% de acetato de  $\alpha$ -tocoferol na dieta, comparado com o controle apoE<sup>-/-</sup> positivo.

Com relação aos valores da fração HDL colesterol, as doses de 6 e 10% da PLFE e a de 2% de acetato de  $\alpha$ -tocoferol promoveram uma redução significativa neste parâmetro, comparado aos animais apoE<sup>-/-</sup>.

Em relação ao G2, controle positivo apoE<sup>-/-</sup>, houve redução de 57,66% nos níveis de triglicerídeos sanguíneos dos animais que receberam a proporção de 6% de PLFE na dieta (G4).

Os trabalhos que avaliaram alimentos ou extratos ricos em polifenóis em camundongos apoE<sup>-/-</sup> apresentaram resultados diferenciados com relação ao perfil lipídico plasmático. O efeito não hipocolesterolêmico observado no nosso trabalho também foi encontrado por Xie et al. (2011) ao avaliar o efeito do consumo na dieta com 5% de suco liofilizado de açaí (*E. oleracea*) por 20 semanas em camundongos apoE<sup>-/-</sup> e por Miyazaki et al. (2008), que pesquisaram o consumo de batata roxa doce, rica em antocianinas, em modelo de animais apoE<sup>-/-</sup>. Porém, outras pesquisas com extratos ricos em antocianinas encontraram uma redução dos níveis plasmáticos de colesterol em camundongos apoE<sup>-/-</sup> (Xia et al., 2006; Peluzio et al., 2011).

Similar aos resultados do G6 (2% de acetato de  $\alpha$ -tocoferol), Peluzio et al. (2001), Cyrus et al. (2003) e Koga et al. (2004) também não encontraram redução dos níveis de colesterol em camundongos Apo E<sup>-/-</sup>, LDL<sup>-/-</sup> e coelhos, respectivamente, tratados com diferentes doses de  $\alpha$ -tocoferol, apesar de terem encontrado bons resultados com relação a progressão das lesões ateroscleróticas.

Assim, como encontrado no presente trabalho, Xia et al. (2006) ao avaliarem a suplementação na dieta de camundongos apoE<sup>-/-</sup> com 300mg/Kg/dia do extrato etanólico liofilizado do arroz preto, rico em

antocianinas, identificaram redução dos níveis plasmáticos da fração HDL. Entretanto, este resultado não foi observado no trabalho de Xie et al. (2011), em que houve um aumento dos níveis de HDL no plasma de camundongos apoE<sup>-/-</sup> alimentados com suco de açaí (*E. oleracea*).

A redução dos teores de triglicerídeos encontrada no plasma dos animais do G4, que receberam 6% de PLFE na dieta, também foi observada nos camundongos apoE<sup>-/-</sup> que receberam extrato aquoso de uva Niagara isolado ou combinado com a suplementação de acetato de  $\alpha$ -tocoferol (Peluzio et al., 2011) e extrato de arroz preto (Xia et al. 2006) e em ratos que receberam polpa de açaí (*E. oleracea*) (Santos et al., 2010). Por outro lado, Xie et al. (2011) não encontraram variação dos teores de triglicerídeos em camundongos apoE<sup>-/-</sup> alimentados com suco de açaí (*E. oleracea*).

Além das antocianinas, outros nutrientes presentes nos frutos de *E. edulis*, como as fibras e os ácidos graxos insaturados, podem contribuir para a melhora do perfil lipídico, reduzindo os níveis plasmáticos de colesterol, LDL e triglicerídeos (Fitó et al., 2007). No capítulo 2 (item 4.1) foi identificado na PLFE um alto conteúdo de fibras (30,32g e 4,58g de fibras insolúveis e solúveis, respectivamente/100g liofilizado) e ácidos graxos insaturados (33,02% e 39,91% de ácidos graxos monoinsaturados e poliinsaturados, respectivamente, em relação à percentagem total de lipídeos).

As fibras dietéticas, principalmente as solúveis, podem alterar a digestão e a absorção dos lipídeos dietéticos e/ou aumentar a excreção fecal dos ácidos biliares e esteróis neutros, tendo como resposta hepática o aumento da produção de sais biliares a partir do substrato colesterol, reduzindo a concentração desse elemento na circulação sanguínea (Fernandes et al., 2005). Já os ácidos graxos insaturados podem aumentar a expressão ou a atividade de receptores de LDL no fígado (Fernandes et al., 2005), reduzindo seu conteúdo na circulação. Os ácidos graxos insaturados, especificamente os monoinsaturados, podem ainda reduzir a agregação plaquetária e aumentar a fibrinólise e o tempo de coagulação, reduzindo o estado pró-trombótico e reduzir marcadores inflamatórios (Estruch et al., 2006; Esposito et al., 2004), e consequentemente, ser benéfico na redução do risco de desenvolvimento da aterosclerose.

No presente trabalho, os animais alimentados com 6% de PLFE na dieta apresentaram redução de triglicerídeos, passando de  $97.20 \pm 28.78\text{mg/dL}$  (G2) para  $41.15 \pm 17.09\text{mg/dL}$  (G4).

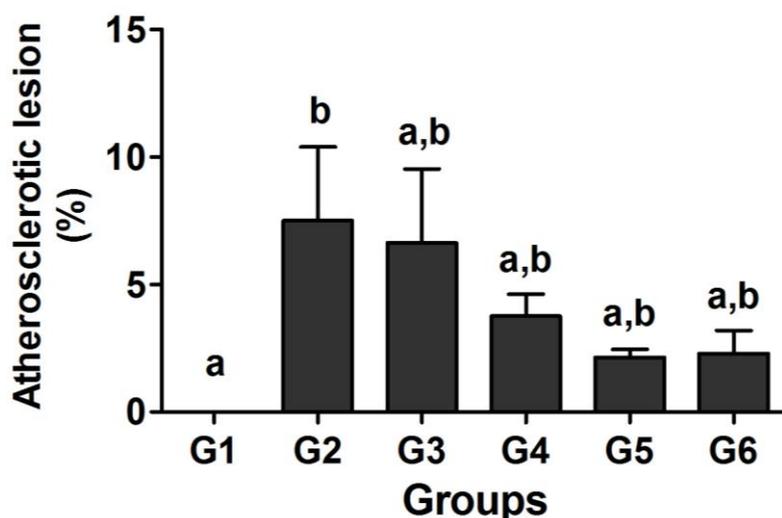
Com relação aos níveis de colesterol, o tempo de estudo pode não ter sido suficiente para promover uma redução neste parâmetro, visto que camundongos apoE<sup>-/-</sup> apresentam níveis muito elevados de colesterol sérico.

Os níveis de glicose não diferiram entre os grupos, com exceção do grupo em que foram administrados 10% de PLFE na dieta (G5). Neste grupo houve um aumento nos teores de glicose, comparado ao G2 (camundongos apoE<sup>-/-</sup>), que talvez possa ser justificado pelo teor considerável de carboidratos totais na PLFE (42,17g/100g de liofilizado), mesmo que a maior parte deste seja constituído por fibras dietéticas (71,89% de fibras insolúveis e 10,85% de fibras solúveis em relação ao teor total de carboidratos), segundo dados do item 4.1 do Capítulo 2. Neste sentido, seria interessante analisar o teor de açúcares totais presentes no fruto.

### **4.3. Lesões Ateroscleróticas**

No início do experimento, metade dos animais do G1 e G2 sofreram eutanásia visando a comparação de lesões ateroscleróticas entre os grupos. Os resultados confirmaram a ausência de lesões ateroscleróticas nos camundongos normais C57Bl/6 e a presença de placas de ateroma iniciais nos animais apoE<sup>-/-</sup> (1,97% da área total das artérias apresentaram lesões).

Como observado na Figura 2, após 10 semanas de intervenção, não foi observada diferença significativa em relação às áreas de lesões ateroscleróticas entre os grupos de animais que receberam dieta com PLFE e com  $\alpha$ -tocoferol em comparação ao controle positivo ( $p < 0,05$ , teste de Dunns), mesmo com uma redução numérica significativa das lesões. O grupo G1, representado por camundongos C57Bl/6 não apresentou lesões ateroscleróticas.



**Figura 2.** Percentagem de lesões ateroscleróticas dos grupos experimentais. Dados foram expressos como média e desvio padrão (media  $\pm$  DP). <sup>a,b</sup> Letras diferentes nas colunas indicam diferenças estatísticas,  $p < 0.05$ ; teste de Dunns. G1: controle negativo C57Bl/6; G2: controle positivo apoE<sup>-/-</sup>; G3: apoE<sup>-/-</sup> + dieta com 2% de PLFE; G4: apoE<sup>-/-</sup> + dieta com 6% de PLFE; G5: apoE<sup>-/-</sup> + dieta com 10% de PLFE; G6: apoE<sup>-/-</sup> + dieta com 2% de acetate de  $\alpha$ -tocoferol. Número de animais por grupo=5.

Alguns trabalhos sugerem que alimentos ricos em polifenóis, como as antocianinas, podem retardar a progressão e aumentar a estabilização das placas ateroscleróticas. Xia et al. (2006), investigaram a influência de uma dieta suplementada com 300mg/Kg/dia do extrato etanólico liofilizado do arroz preto, rico em antocianina, na vulnerabilidade de placas ateroscleróticas avançadas em camundongo apoE<sup>-/-</sup> com 30 semanas de idade. Após 20 semanas de intervenção (140 dias), o tamanho da placa foi reduzido em 18% no grupo que recebeu o extrato rico em antocianina e em 13% no grupo com sinvastatina, comparado ao grupo controle positivo.

Existem algumas variáveis, como a idade do animal e o tempo de intervenção, que parecem ser importantes para a obtenção de bons resultados com relação à redução de placas ateroscleróticas em animais.

Camundongos apoE<sup>-/-</sup> fêmeas, com 4 semanas de idade, apresentaram uma redução de 58% das lesões ateroscleróticas ( $p < 0,001$ ) após o consumo de dieta AIN93G contendo 5% de suco liofilizado de açaí (*E. oleracea*) por 20 semanas (Xie et al., 2011).

Foi observada menor área de placas de ateroma com o consumo por 12 semanas de 80 mL/dia de extrato aquoso de *E. oleracea* por coelhos com aterosclerose induzida por uma dieta rica em colesterol. Porém, não foram encontradas diferenças nos aspectos histológicos destas placas, como o conteúdo de fibras elásticas, colágeno, células musculares lisas e de macrófagos. (Feio et al., 2012).

Peluzio et al. (2011) avaliaram o efeito do consumo por 11 semanas do extrato aquoso de uva Niagara (cerca de 9,7 mL por dia) isolado ou combinado com a suplementação de 400 mg de acetato de  $\alpha$ -tocoferol/Kg de dieta em camundongos apoE<sup>-/-</sup>, com 11 semanas de idade e tratados anteriormente com dieta aterogênica por seis semanas. A análise morfológica revelou que os tratamentos não foram capazes de diminuir o tamanho das lesões, porém, houve uma interrupção na evolução das placas ateroscleróticas nos animais que foram alimentados com  $\alpha$ -tocoferol combinado com extrato de uva, evidenciando um efeito sinérgico positivo.

Estes trabalhos fortalecem a hipótese que o consumo de alimentos ricos em antocianinas, pode contribuir para retardar o desenvolvimento de lesões ateroscleróticas. No entanto, no nosso estudo, a administração da PLFE não foi capaz de reduzir as placas ateroscleróticas nos camundongos apoE<sup>-/-</sup>.

No presente trabalho, os camundongos apoE<sup>-/-</sup>, com 14 semanas de idade, consumiram dieta contendo a PLFE por 10 semanas. Já nos trabalhos de Xia et al. (2006) e Xie et al. (2011), por exemplo, a duração foi de 20 semanas. E especificamente no trabalho de Xie et al. (2011), onde foi avaliado o consumo de suco liofilizado de açai (*E. oleracea*) e obteve-se o melhor resultado (redução de 58% das lesões), os animais eram mais novos (4 semanas de idade). Os camundongos apoE<sup>-/-</sup> apresentam células espumosas aproximadamente com 10 semanas de idade e com 8 semanas é possível encontrar a formação esporádica destas células (Breslow, 1996). Assim, ao contrário do nosso trabalho, o de Xie et al. (2011) foi baseado na prevenção da formação de placas de ateroma em animais que desenvolvem espontaneamente a aterosclerose. Na pesquisa de Peluzio et al. (2011), que a idade dos animais no início dos tratamentos foi semelhante a do nosso trabalho, foi encontrado uma interrupção na progressão das lesões apenas com a combinação de um extrato rico em polifenóis com o  $\alpha$ -tocoferol.

Diante disso, é interessante que se investigue os efeitos do consumo dos frutos de *E. edulis* em animais mais novos e por um tempo maior, pois há grandes indícios que frutos ricos em antocianinas podem retardar a progressão e aumentar a estabilidade das placas ateroscleróticas.

A mesma justificativa pode ser utilizada para o grupo de animais que consumiram dieta com acetato de  $\alpha$ -tocoferol, visto que trabalhos já mostraram que a administração de vitamina E retardou a progressão e/ou reduziu o tamanho das lesões ateroscleróticas (Peluzio et al., 2011; Kaliora et al., 2006; Peluzio et al., 2001).

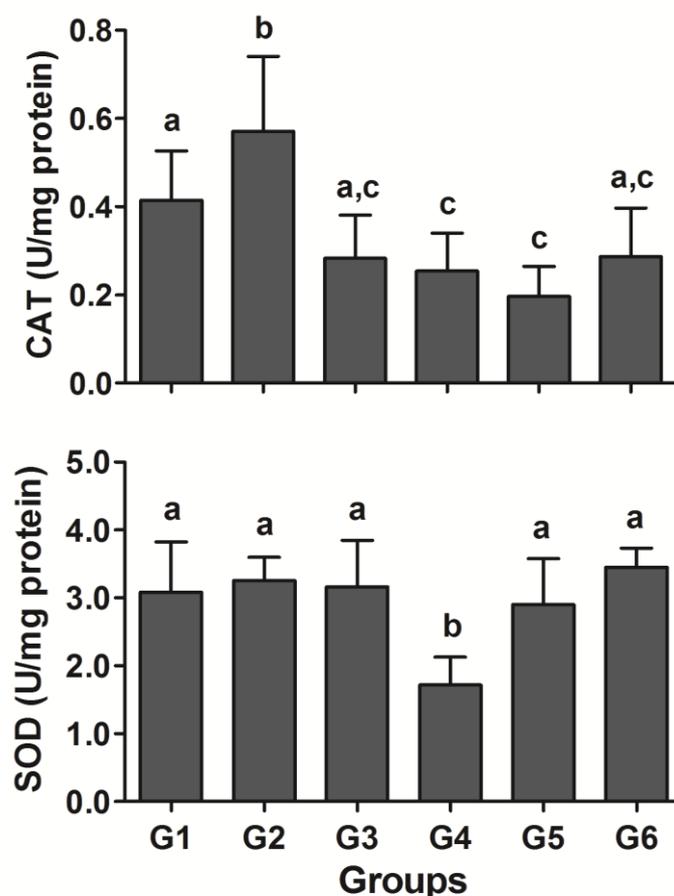
#### **4.4. Enzimas Antioxidantes**

Nas Figuras 3 e 4 estão apresentados os resultados da atividade das enzimas catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD) (U/mg de proteína) no fígado dos animais utilizados neste estudo.

A atividade da catalase foi maior no controle positivo (animais apoE<sup>-/-</sup>) em relação ao controle normal (animais C57Bl/6), sugerindo que houve alteração do balanço redox no processo da aterosclerose, com consequente aumento da atividade de uma das enzimas antioxidantes, neste caso a catalase, na tentativa de se estabelecer um equilíbrio redox.

Os resultados demonstraram atividade antioxidante da PLFE, acarretando a diminuição significativa da atividade da catalase nos animais dos grupos G3, G4 e G5 em relação ao controle positivo (G2). O grupo que recebeu acetato de  $\alpha$ -tocoferol (G6) também apresentou diminuição da atividade da catalase em relação ao G2. A maior redução da atividade da catalase foi encontrada nas doses de 6% e 10% de PLFE (G4 e G5, respectivamente), sendo esta também inferior aos dos animais normais (G1).

Com relação a atividade da enzima superóxido dismutase, o grupo que recebeu 6% de PLFE na dieta (G4) foi mais efetivo, pois apresentou diminuição neste parâmetro, em relação aos animais normais (G1) e ao controle positivo (G2).



**Figuras 3 e 4:** Atividade das enzimas catalase e superóxido dismutase (U/mg de proteína) no fígado. Dados foram expressos como média e desvio padrão (media  $\pm$  DP). <sup>a,b,c</sup> Letras diferentes nas colunas indicam diferenças estatísticas,  $p < 0.05$ ; teste de Kruskal-Wallis. G1: controle negativo C57Bl/6; G2: controle positivo apoE<sup>-/-</sup>; G3: apoE<sup>-/-</sup> + dieta com 2% de PLFE; G4: apoE<sup>-/-</sup> + dieta com 6% de PLFE; G5: apoE<sup>-/-</sup> + dieta com 10% de PLFE; G6: apoE<sup>-/-</sup> + dieta com 2% de acetate de  $\alpha$ -tocoferol. Número de animais por grupo=10.

No presente trabalho foram investigadas as defesas antioxidantes do tecido hepático. O fígado apresenta conteúdo substancial de proteínas e enzimas com capacidade antioxidante e é responsável pela detoxificação de várias substâncias, sendo que os produtos metabólicos nocivos produzidos em outros órgãos podem indiretamente afetá-lo (Ji 1993; Burneik et al., 2006). Além disso, o fígado é um dos principais locais para a oxidação da LDL pelo citocromo P450 (Aviram et al., 1999), que é um dos eventos mais importantes para o início da aterosclerose. Assim, o balanço oxidativo do fígado é de

fundamental importância para compreensão dos mecanismos da aterosclerose e vem sendo estudado (Ramirez-Tortosa et al., 2008; Ishigaki et al., 2008).

A enzima superóxido dismutase catalisa a dismutação do superóxido em oxigênio e peróxido de hidrogênio e a catalase decompõe o peróxido de hidrogênio em oxigênio e água, reduzindo a concentração desta espécie reativa no organismo, e conseqüentemente a sua toxicidade (Powers e Jackson, 2008). O aumento da atividade destas enzimas antioxidantes pode ser observado na tentativa de eliminar radicais nocivos ao organismo que estão elevados em situações de estresse oxidativo (Miao e St.Clair, 2009).

Além das defesas antioxidantes endógenas representada pelas enzimas como a superóxido dismutase, glutatona peroxidases, glutatona redutase, catalase, tioredoxinas, peroxirredoxinas e inúmeras outras redutases, existem mecanismos não enzimáticos que atuam no estresse oxidativo (Ribeiro *et al.*, 2008). Estes mecanismos são constituídos por um grande número de compostos de baixo peso molecular, ingeridos pela dieta, como as vitaminas A, C e E, o peptídeo glutatona e os flavonóides (Ribeiro et al., 2008; Singh e Jialal, 2006).

Com a ingestão regular na dieta de substâncias antioxidantes, pode ocorrer uma redução do estresse oxidativo, não havendo a necessidade em aumentar a atividade de enzimas endógenas antioxidantes. Esta justificativa pode ser utilizada para explicar os resultados encontrados no presente estudo, onde houve uma diminuição da atividade da CAT no fígado dos animais que receberam a PLFE em todas as doses e com o acetato de  $\alpha$ -tocoferol e a oferta da PLFE a 6% ter reduzido a atividade da SOD a nível hepático.

Os resultados encontrados neste trabalho são similares a outras pesquisas. Souza et al. (2010), observaram uma redução nas enzimas antioxidantes SOD e glutatona peroxidase no soro de ratos hipercolesterolêmicos que foram alimentados com uma dieta suplementada com polpa de açaí (*E. oleracea*).

Tsuda et al. (1999) relataram que a alimentação de ratos com cianidina 3-O-glucosídeo suprimiu significativamente a atividade antioxidante de enzimas *in vivo*. Eles defenderam que a cianidina 3-O-glucosídeo administrada por via oral é absorvida pelo intestino e distribuída através do fluxo sanguíneo aos tecidos, onde ela e seus metabólitos reagem com espécies reativas de oxigênio diminuindo os danos teciduais hepáticos.

A cianidina 3-O-glucosídeo e a cianidina 3-O-rutinosídeo, encontrada em onze polpas comerciais de *E. oleracea*, como sendo as duas principais antocianinas deste fruto, apresentaram boa capacidade antioxidante contra radicais peroxil, peroxinitro e hidroxila (Lichtenthahler et al., 2005).

As antocianinas, que estão presentes na PLFE, são consagradas por sua atividade antioxidante (Chang et al., 2006). Em adição, foi encontrado na PLFE um conteúdo de vitamina A considerável (item 4.1 do Capítulo 2), que, assim como as antocianinas, também apresentam atividade antioxidante.

A redução da atividade da SOD no fígado dos animais que receberam a PLFE a 6% (G4) foi maior até que a do grupo com acetato de  $\alpha$ -tocoferol, que é considerado um dos mais potentes antioxidantes lipossolúveis encontrados na natureza. (O'Byrne et al., 2002).

A ação antioxidante do  $\alpha$ -tocoferol resulta da doação de um átomo de hidrogênio de sua molécula ao radical peroxil, formando o hidroperóxido estável denominado radical tocofenil. Este radical pode reagir com os radicais cromanoxil, alcoxil ou peroxil, podendo ser transformados novamente em  $\alpha$ -tocoferol (O'Byrne et al., 2002). As principais fontes alimentares de vitamina E são os óleos vegetais como o de girassol e o de oliva, cuja forma predominante é o  $\alpha$ -tocoferol e os demais óleos, como o de soja, rico em  $\gamma$ -tocoferol (Cyrus et al., 2003).

Por outro lado, outros estudos mostraram que o consumo de compostos fenólicos pode aumentar a atividade de enzimas antioxidantes ou não exercer nenhum efeito (Alia et al., 2003; Breinholt et al., 1999; Dragsted et al., 2004). Estes resultados contraditórios indicam que a atividade das defesas antioxidantes dependem de diversos fatores, como a origem do estresse oxidativo, o modelo animal utilizado, tipo e fonte do antioxidante dietético estudado, entre outros.

Apesar dos tratamentos com a PLFE e com o acetato de  $\alpha$ -tocoferol não terem atuado diretamente na aterosclerose, reduzindo as placas de ateroma, estas substâncias podem reduzir fatores de risco associados a esta doença como o estresse oxidativo (Beltrán-Debón et al., 2010; Xia et al., 2009; Cyrus et al., 2003).

#### 4.5. Análises Histopatológicas

Foram investigados componentes hepáticos nos camundongos apoE<sup>-/-</sup> (Tabela 5) que possam correlacionar indiretamente com a aterosclerose.

No controle apoE<sup>-/-</sup> (G2), comparado ao grupo de animais sem mutação dos genes (G1), houve aumento de todos estes parâmetros, evidenciando um possível quadro de esteatose e fibrose hepática nestes animais.

Em relação aos animais do controle positivo (G2), com a administração na dieta de 10% de PLFE (G5), foi observada redução significativa ( $p < 0,05$ ) no tamanho e no volume das gotículas de lipídeos, no percentual de infiltrado inflamatório e na quantidade de colágeno no interfício dos animais. Com a oferta de acetato de  $\alpha$ -tocoferol também foi encontrada redução destes dois últimos parâmetros.

**Tabela 5.** Efeito do tratamento com a PLFE na densidade volumétrica de componentes hepáticos de camundongos apoE<sup>-/-</sup>.

Grupos	Vv [infiltrado inflamatório] (%)	Vv [lipídeos] (%)	Gotículas de lipídeos (mm <sup>2</sup> x10 <sup>2</sup> )	Colágeno ( $\mu$ g/mg proteína)
G1	0.29 $\pm$ 0.10 <sup>a</sup>	3.94 $\pm$ 1.06 <sup>a</sup>	2.89 $\pm$ 0.94 <sup>a</sup>	9.26 $\pm$ 2.17 <sup>a</sup>
G2	2.96 $\pm$ 1.35 <sup>b</sup>	40.22 $\pm$ 7.49 <sup>b</sup>	28.66 $\pm$ 4.73 <sup>b</sup>	25.47 $\pm$ 4.15 <sup>b</sup>
G3	2.74 $\pm$ 1.10 <sup>b</sup>	38.94 $\pm$ 6.11 <sup>b</sup>	28.49 $\pm$ 4.04 <sup>b</sup>	23.92 $\pm$ 3.28 <sup>b</sup>
G4	2.19 $\pm$ 1.16 <sup>b</sup>	38.18 $\pm$ 6.40 <sup>b</sup>	27.87 $\pm$ 3.15 <sup>b</sup>	23.64 $\pm$ 4.46 <sup>b</sup>
G5	1.12 $\pm$ 0.51 <sup>c</sup>	29.55 $\pm$ 5.16 <sup>c</sup>	20.25 $\pm$ 3.37 <sup>c</sup>	15.36 $\pm$ 3.19 <sup>c</sup>
G6	1.04 $\pm$ 0.63 <sup>c</sup>	31.32 $\pm$ 5.73 <sup>b,c</sup>	21.86 $\pm$ 3.82 <sup>b,c</sup>	15.09 $\pm$ 3.01 <sup>c</sup>

Vv: densidade volumétrica. Dados foram expressos como média e desvio padrão (media  $\pm$  DP). <sup>a,b,c</sup> Letras diferentes nas colunas indicam diferenças estatísticas,  $p < 0,05$ ; teste de Kruskal-Wallis. G1: controle negativo C57Bl/6; G2: controle positivo apoE<sup>-/-</sup>; G3: apoE<sup>-/-</sup> + dieta com 2% de PLFE; G4: apoE<sup>-/-</sup> + dieta com 6% de PLFE; G5: apoE<sup>-/-</sup> + dieta com 10% de PLFE; G6: apoE<sup>-/-</sup> + dieta com 2% de acetato de  $\alpha$ -tocoferol. Número de animais por grupo=5.

A esteatose hepática, o exemplo mais comum de doença hepática crônica, é caracterizada pelo aumento de deposição de triglicerídeos nos hepatócitos. Apesar da história natural da lesão hepática ainda não estar completamente elucidada, esta doença tem sido cada vez mais pesquisada, tendo em vista sua associação frequente com fatores de risco cardiovasculares (Hamaguchi et al., 2005). A esteatose hepática tem sido questionada até como um possível marcador da aterosclerose (Targher et al., 2006). Knopfholz et al. (2012) observaram a associação entre esteatose hepática e sua gravidade, mensurada por ultrassonografia, com a calcificação coronária mais acentuada em indivíduos com síndrome metabólica.

Na esteatose hepática, ocorre a secreção de algumas citocinas pelos hepatócitos, instalando um permanente estado de inflamação hepática, que pode liberar fatores sistêmicos e pró-trombóticos, que podem aumentar a progressão da aterosclerose e promover a ruptura de placas de ateroma (Hamaguchi et al., 2005).

O tecido conjuntivo hepático é constituído por células e pela matriz extracelular, composta por sua porção fibrilar (representada por vários tipos de colágeno) e não-fibrilar (material amorfo, gelatinóide, incluindo glicosaminoglicanos e proteoglicanos). Em condições fisiológicas há um equilíbrio entre a síntese da matriz extracelular (fibrogênese) e a sua ruptura (fibrinólise), quando há um excesso da mesma (Friedman, 2004).

Fatores inflamatórios, degenerativos ou neoplásicos estimulam o processo de fibrogênese. Havendo predomínio da fibrogênese, em relação à fibrólise, ocorrerá um acúmulo de tecido fibroso, constituindo a fibrose hepática, cujas principais características são a síntese de colágeno pelas células do tecido conjuntivo e sua deposição na matriz extracelular. Além do colágeno, outros elementos da matriz extracelular são sintetizados na fibrose, como a elastina, proteoglicanos e proteínas de constituição (Poynard et al., 2004).

Quando a síntese e deposição de colágeno na matriz extracelular são recentes, este pode ser degradado quando é cessado o estímulo fibrogênico. Porém, caso este estímulo permaneça, o colágeno fibrilar evoluirá com modificações químicas que o tornarão mais resistente à degradação (Friedman, 2004).

O estresse oxidativo constitui um fator importante para o desenvolvimento de doenças degenerativas, incluindo a fibrose tecidual em diferentes órgãos, tais como o pulmão, fígado e os rins (Iglesias De La Cruz et al., 2000).

No presente trabalho, houve melhora do estresse oxidativo, através da redução da atividade da catalase em todos os tratamentos com a PLFE e com o acetato de  $\alpha$ -tocoferol e da atividade da superóxido dismutase pela dose de 6% de PLFE na dieta dos camundongos apoE<sup>-/-</sup>. Assim, sugere-se que a melhora da esteatose e fibrose hepática promovida pela dose de 10% de PLFE e pelo acetato de  $\alpha$ -tocoferol tenha ocorrido devido às propriedades antioxidantes destes compostos. Em adição, a PLFE é constituída por substâncias que exercem efeitos antiinflamatórios, como as antocianinas e os ácidos graxos monoinsaturados, que podem retardar a evolução da esteatose e da fibrose hepática.

## **5. CONCLUSÃO**

Os tratamentos com a PLFE e o acetato de  $\alpha$ -tocoferol não foram capazes de inibir a formação das lesões ateroscleróticas nos camundongos ApoE<sup>-/-</sup>. Entretanto, estes tratamentos foram eficientes na redução de fatores de risco associados à aterosclerose, como o estresse oxidativo, a esteatose, a fibrose e processos inflamatórios hepáticos.

Atividade antiinflamatória da PLFE na dose de 10% pode ser destacada, através da redução de infiltrados inflamatórios, das gotículas de lipídeos e de colágeno no fígado dos camundongos apoE<sup>-/-</sup>, componentes estes associados a processos inflamatórios como a esteatose e a fibrose hepática

Porém, ainda é necessário que novas pesquisas sejam realizadas para um maior entendimento com relação a melhor dose a ser utilizada destes compostos, que promova efeitos satisfatórios sem causar danos indesejáveis ao organismo.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aebi, H. (1984). Catalase *in vitro*. *Methods in Enzymology*, 105, 121-126.
- Aviram, M., Kent, U.M., Hollengberg, P.F. (1999). Microsomal cytochromes P450 catalyze the oxidation of low density lipoprotein. *Atherosclerosis*, 143 (2), 253-260.
- Beltrán-Debón, R., Alonso-Villaverde, C., Aragonés, G., Rodríguez-Medina, I., Rull, A., Micol, V., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutiérrez, A., Camps, J., Jovem, J. (2010). The aqueous extract of *Hibiscus sabdariffa* calices modulates the production of monocyte chemoattractant protein-1 in humans. *Phytomedicine*, 17, 186-191.
- Borges, G.S.C., Vieira, F.G.K., Copetti, C., Gonzaga, L.V., Zambiasi, R.C., Filho, J.M., Fett, R. (2011). Chemical characterization, bioactive compounds, and antioxidant capacity of jussara (*Euterpe edulis*) fruit from the Atlantic Forest in southern Brazil. *Food Research International*, 44 (7), 2128-2133.
- Breinholt, V., Lauridsen, S.T., Dragsted, L.O. (1999). Differential effects of dietary flavonoids on drug metabolizing and antioxidant enzymes in female rat. *Xenobiotica*, 29, 1227-40.
- Breslow, J.L. (1996). Mouse models of atherosclerosis. *Science*, 272, 685-688.
- Burneik, R.C., Diniz, Y.S., Galhardi, C.M., Rodrigues, H.G., Ebaid, G.M., Faine, L.A. (2006). Interaction of hypercaloric diet and physical exercise on lipid profile, oxidative stress and antioxidant defenses. *Food Chemistry Toxicol*, 44, 1167-1172.
- Cardoso, L.M., Leite, J.P.V., Peluzio, M.C.G. (2011). Efeitos biológicos das antocianinas no processo aterosclerótico. *Revista Colombiana Ciências Química Farmaceutica*, 40, 116-138.
- Catta Preta, M., Mendonca, L.S., Fraulob Aquino, J., Aguila, M.B., Mandarim de Lacerda, C.A. (2011). A critical analysis of three quantitative methods of assessment of hepatic steatosis in liver biopsies. *Virchows Archiv*, 459, 477-485.
- Cyrus, T., Yao, Y., Rokach, J., Tang, L.X., Pratico, D. (2003). Vitamin E reduces progression of atherosclerosis in low-density lipoprotein

receptordeficient mice with established vascular lesions. *Circulation*, 107(4), 521-523.

De Brito, E.S., Araújo, M.C.P., Alves, R.E., Carkeet, C., Clevidence, B.A., Novotny, J.A. (2007). Anthocyanins Present in Selected Tropical Fruits: Acerola, Jambolão, Jussara, and Guajiru. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 55, 9389-9394.

Dieterich, S., Bieligk, U., Beulich, K., Hasenfuss, G., Prestle, J. (2000). Gene Expression of Antioxidative Enzymes in the Human Heart: Increased Expression of Catalase in the End-Stage Failing Heart. *Circulation*, 101, 33-39.

Dragsted, L.O., Pedersen, A., Hermetter, A., Basu, S., Hansen, M., Haren GR (2004). The 6-a-day study: effects of fruit and vegetables on markers of oxidative stress and antioxidative defense in healthy nonsmokers. *American Journal Clinical Nutrition*, 79, 1060-1072.

Esposito, K., Marfella, R., Ciotola, M. Effect of a Mediterranean-style diet on endothelial dysfunction and markers of vascular inflammation in the Metabolic syndrome: a randomized trial. (2004). *Journal of the American Medical Association*, 292, 1440–1446.

Estruch, R., Martí'nez-Gonza'lez, M.A., Corella, D. Effects of a Mediterranean-style diet on cardiovascular risk factors: a randomized trial. (2006). *Annals of Internal Medicine*, 145, 1-11.

Fazio, S., Babaev, V.R., Murray, A.B. (1997). Increased atherosclerosis in mice reconstituted with apolipoprotein E null macrophages. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94, 4647-4652.

Feio, C.A., Izar, M.C., Ihara, S.S., Kasma, S.H., Martins, C.M., Feio, M.N., Maués, L., Borges, N.C., Moreno, R.A., Póvoa, R.M., Fonseca, F.A. (2012). Euterpe oleracea (açai) Modifies Sterol Metabolism and Attenuates Experimentally-Induced Atherosclerosis. *Journal of Atherosclerosis and Trombosis*, 19 (3), 237-245.

Fernandez, M.L., West, K.L. (2005). Mechanisms by which dietary fatty acids modulate plasma lipids. *Journal Nutrition*, 135, 2075-2078.

Fitó, M., Guxens, M., Corella, D. For the PREDIMED Study Investigators. Effect of a traditional Mediterranean diet on lipoprotein oxidation: a randomized controlled trial. (2007). *Archives of Internal Medicine*, 167, 1195–1203,

Friedman, S.L. Mechanisms of disease: mechanisms of hepatic fibrosis and therapeutic implications. (2004). *Nature Clinical Practice/Gastroenterology & Hepatology*, 1, 98-105.

Hamaguchi, M., Kojima, T., Takeda N. (2005). The metabolic syndrome as a predictor of nonalcoholic fatty liver disease. *Annals of Internal Medicine*, 143 (10), 722-728.

Hertog, M.G.L., Feskens, E.J.M., Kromhout, D., Hollman, P.C.H., Katan, M.B. (1993). Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. *Lancet*, 342(8878), 1007-1011.

Hofmann, S.M., Perez-Tilve, D., Greer, T.M., Coburn, B.A., Grant, E., Basford, J.E., Tschop, M.H., Hui, D.Y. (2008). Defective lipid delivery modulates glucose tolerance and metabolic response to diet in apolipoprotein E-deficient mice, *Diabetes*, 57 5-12.

Huang, X.Q., Liu, S.C., Rall, Jr., J.M. Taylor, A. Von Eckardstein, G., Mahley, R.W. (1998). Overexpression and accumulation of apolipoprotein E as a cause of hypertriglyceridemia, *Journal Biological Chemistry*, 273, 26388-26393.

Iglesias De La Cruz, M.C., Torres, R.M.P., De Lucio, C.F.J., Puyol, R.M., Puyol, R.D. (2000). Phenotypic modifications of human mesangial cells by extracellular matrix: the importance of matrix in the contractile response to reactive oxygen species. *Experimental Nephrology*, 8, 97-103

Ishigaki, Y., Katagiri, H., Gao, J., Yamada, T., Imai, J., Uno, K., Hasegawa, Y., Kaneko, K., Ogihara, T., Ishihara, H., Sato, Y., Takikama, K., Nishimichi, N., Matsuda, H., Sawamura, T., Oka, Y. (2008). Impact of plasma oxidized low-density lipoprotein removal on atherosclerosis. *Circulation*, 118 (1), 75-83.

Ishigaki, Y., Katagiri, H., Gao, J., Yamada, T., Imai, J., Uno, K., Hasegawa, Y., Kaneko, K., Ogihara, T., Ishihara, H., Sato, Y., Takikawa, K., Nishimichi, N., Matsuda, H., Sawamura, T., Oka, Y. (2008). Impact of plasma oxidized low-density lipoprotein removal on atherosclerosis, *Circulation*, 118 (1), 75-81.

Ji, L.L. (1993). Antioxidant enzyme response to exercise and aging. *Medicine Science Sports Exercise*, 25, 225-231.

Kaliora, A.C., Dedoussis, G.V.Z., Schmidt (2006). Review Dietary antioxidants in preventing atherogenesis. *Atherosclerosis*, 187, 1-17.

Kalogeropoulos, N., Panagiotakos, D.B., Pitsavos, C., Chrysohoou, C., Rousinou, G., Toutouza, M., Stefanadis, C. (2010). Unsaturated fatty acids are inversely associated and n-6/n-3 ratios are positively related to inflammation and coagulation markers in plasma of apparently healthy adults. *Clinica Chimica Acta*, 411, 584–591.

Karlsen, A., Retterstøl, L., Laake, P., Paur, I., Kjølrsrud-Bøhn, S., Sandvik, L., Blomhoff, R. (2007). Anthocyanins inhibit nuclear factor-kappaB activation in monocytes and reduce plasma concentrations of pro-inflammatory mediators in healthy adults. *Journal Nutrition*, 137,1951-1954.

Kawashima, Y., Chen, J., Sun, H., Lann, D., Hajjar, R.J., Yakar S. (1994). Apolipoprotein E deficiency abrogates insulin resistance in a mouse model of type 2 diabetes mellitus. *Arteriosclerosis Thrombosis*, 14 (1), 133-140.

Knopfholz, J., Radominski, R., Alessi, A., Warzawiak, D., Olandoski, M., Neto, J.R.F., Cunha, C.L.P. (2012). Esteatose hepática e calcificação coronariana em pacientes assintomáticos portadores de síndrome metabólica. *Revista Brasileira Clínica Médica*, 10 (1), 11-14.

Koga, T., Kwan, P., Zubick, L., Ameho, C., Smith, D., Meydani, M. (2004). Vitamin E supplementation suppress macrophage accumulation and endothelial cell expression of adhesion molecules in aorta of hypercholesterolemic rabbits. *Atherosclerosis*, 176, 265-72.

Leite, J.P.V. Fitoterapia: bases científicas e tecnológicas. São Paulo: *Atheneu*, 328p., 2008.

Lichtenthahler, R., Rodrigues, R.B., Maia, J.G.S., Papagiannopoulos, M., Fabricius, H., Marx, F. (2005). Total oxidant scavenging capacities of Euterpeoleraea Mart. (Açaí) fruits. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 56, 53-64.

Lin, S.S. (1988). Efeito no tamanho e maturidade sobre a viabilidade, germinação e vigor do fruto de Palmiteiro. *Revista Brasileira de Sementes*, 8 (1), 57-66.

López De León, A., Rojkind, M. A. (1985). Simple micromethod for collagen and total protein determination in formalin-fixed paraffin-embedded sections. *Histochemistry & Cytochemistry*, 33, 737-743.

Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr, A.L.; Randall, R.J. (1951). Protein measurement with folin phenol reagent. *Journal Biology Chemistry*, 193, 265-275.

Lusis, A.J. (2000). Atherosclerosis. *Nature Reviews*, 407, 233-241.

Mancini-Filho, J. Alimentos funcionais nas doenças cardiovasculares. In: Alimentos funcionais. Viçosa: Costa, N.M.B.; Rosa, C.O.B (Ed.), 202p., 2008.

Mandarim de Lacerda, C.A. (2003). Stereological tools in biomedical research. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 75, 469-86.

Miao, L.S.T., Clair, D.K. (2009). Regulation of superoxide dismutase genes: Implications in disease, *Free Radic. Biol. Med.*

Miyazaki, K., Makino, K., Iwadate, E., Deguchi, Y., Ishikawa, F. (2008). Anthocyanins from Purple Sweet Potato Ipomoea batatas Cultivar Ayamurasaki Suppress the Development of Atherosclerotic Lesions and Both Enhancements of Oxidative Stress and Soluble Vascular Cell Adhesion Molecule-1 in Apolipoprotein E-Deficient Mice. *Journal Agricultural Food Chemistry*, 56 (11), 485–11492.

Novaes, R.D., Gonçalves, R.V., Marques, D.C., Cupertino, M.C., Peluzio, M.C.G., Leite, J.P.V., Maldonado, I.R.S.C. (2012). Effect of bark extract of *Bathysa cuspidata* on hepatic oxidative damage and blood glucose kinetics in rats exposed to paraquat. *Toxicologic Pathology*, 40, 62-70.

O'Byrne, D.J., Devaraj, S., Grundy, S.M., Jialal, I. (2002). Comparison of the antioxidant effects of Concord grape juice flavonoids  $\alpha$ -tocopherol on markers of oxidative stress in healthy adults. *American Journal Clinical Nutrition*, 76 (6), 1367-1374.

Palinski W, Ord VA, Plump AS, Breslow JL, Steinberg D, Witztum JL. (1994). ApoE-deficient mice are a model of lipoprotein oxidation in atherogenesis. Demonstration of oxidation-specific epitopes in lesions and high titers of autoantibodies to malondialdehyde-lysine in serum. *Arteriosclerosis Thrombosis*, 14, 605-616.

Peluzio, M.C.G., Homem, A.P.P., Cesar, G.C., Azevedo, G.S., Amorim, R., Cara, D.C., Saliba, H., Vieira, E.C., Arantes, R.E., Alvarez-Leite. J. (2001). Influences of alpha-tocopherol on cholesterol metabolism and fatty streak development in apolipoprotein E-deficient mice fed an atherogenic diet. *Brazilian Journal Medical Biology Research*, 34, 1539-45.

Peluzio, M.C.G., Teixeira, T.F.S., Oliveira, V.P., Sabarense, C.M., Dias, C.M.G.C., Abranches, M.V., Maldonado, I.R.S.C. (2011). Grape extract and  $\alpha$ -Tocopherol effect in cardiovascular disease model of Apo E  $-/-$  Mice. *Acta Cirúrgica Brasileira*, 26 (4), 253-259.

Powers, S.K., Jackson, M.J. (2008). Exercise-Induced Oxidative Stress: Cellular Mechanisms and Impact on Muscle Force Production. *Physiol Rev.*, 88, 1243-1276.

Poynard, T., Imbert-Bismut, F., Munteanu, M., Messous, D., Myers, R.P., Thabut, D. (2004). Overview of the diagnostic value of biochemical markers of liver fibrosis (FibroTest, HCV FibroSure) and necrosis (ActiTest) in patients with chronic hepatitis C. *Gastroenterology & Hepatology*, 3, 1-12.

Ramirez-Torrosa, M.C., Granados, S., Ramirez-Torrosa, C.L., Ochoa, J.J., Camacho, P., Carcía-Valdés, L., Battino, M., Quiles, J.L. (2008). Oxidative stress status in liver mitochondria and lymphocyte DNA damage of atherosclerotic rabbits supplemented with water soluble coenzyme Q10. *Biofactors*, 32 (1), 263-273.

Reeves, P.G.; Nielsen, F.H.; Fahey, G.C. (1993). AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American institute of nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *Journal of Nutrition*, 123, p.1939-1951.

Ribeiro, S.M.R., Queiroz, M.E.L.R., Peluzio, M.C.G., Costa, N.M.B., Matta, S.L.P., Queiroz, J.H. (2008). Antioxidantes na dieta. Em: Costa, N.M.B e Peluzio, M.C.G. Nutrição Básica e Metabolismo. *Viçosa: UFV*, 235 -260.

Scherle, W. (1970). A simple method for volumetry of organs in quantitative stereology. *Mikroskopie*, 26, 57-63.

Singh, U., Jialal, I. (2006). Oxidative stress and atherosclerosis. *Pathophysiology*, 13, 129-142.

Souza, M.O., Silva, M., Silva, E., Oliveira, R.P.O., Pedrosa, M.L. Diet supplementation with acai (*Euterpe oleracea* Mart.) pulp improves biomarkers of oxidative stress and the serum lipid profile in rats. (2010). *Nutrition*, 26, 804–810.

Targher, G., Bertolini, L., Padovani, R. (2006). Relations between carotid artery wall thickness and liver histology in subjects with nonalcoholic fatty liver disease. *Diabetes Care*, 29 (6), 1325-1330.

Tsuda, T., Horio, F., Kitoh, J., Osawa, T. (1999). Protective effects of dietary cyanidin 3-O- $\beta$ -D-Glucoside on liver ischemia-reperfusion injury in rats. *Archives Biochemistry and Biophysics*, 368 (2), 361-366.

Xia, M., Ling, W., Zhu, H., Ma, J., Wang, Q., Hou, M., Tang, Z., Guo, H., Liu, C., Ye, Q. Anthocyanin attenuates CD40-mediated endothelial cell activation and apoptosis by inhibiting CD40-induced MAPK activation. (2009). *Atherosclerosis*, 202, 41-47.

Xia, X., Ling, W., Ma, J., Xia, M., Hou, M., Wang, Q., Zhu, H., Tang, Z. (2006). An Anthocyanin-Rich Extract from Black Rice Enhances Atherosclerotic Plaque Stabilization in Apolipoprotein E-Deficient Mice. *Journal Nutrition*, 136, 2220-2225.

Xie, C., Kanga, J., Burrisa, R., Ferguson, M.E., Schauss, A.G., Nagarajana, S., Wua, X. (2011). Açai juice attenuates atherosclerosis in ApoE deficient mice through antioxidant and anti-inflammatory activities. *Atherosclerosis*, 216, 327-333.

Yi, I., Chen, C., Jin, X., Mi, M., Chang, Hui., Ling, W., Zhang, T. (2010). Structural requirements of anthocyanins in relation to inhibition of endothelial injury induced by oxidized low-density lipoprotein and correlation with radical scavenging activity. *FEBS Letters*, 584, 583-590.

Zhang, S.H., Reddick, R.L., Piedrahita, J.A., Maeda, N. (1992). Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apolipoprotein E. *Science*, 258, 468-471.

## CONCLUSÃO GERAL

Os resultados encontrados neste trabalho sobre os compostos presentes na PLFE e sobre os efeitos desta polpa nos fatores de risco relacionados à aterosclerose contribuem para uma melhor elucidação das características deste fruto e estimula a realização de novas pesquisas sobre as atividades biológicas dos frutos de *E. edulis*. Além disso, incentiva o uso sustentável da espécie, contribuindo para a conservação dos recursos genéticos da Mata Atlântica.

Os frutos de *E. edulis* apresentam quantidades significativas de nutrientes, como fibras, ácidos graxos insaturados,  $\beta$ -caroteno e antocianinas. Os tratamentos com a PLFE e o acetato de  $\alpha$ -tocoferol não foram capazes de inibir a formação das lesões ateroscleróticas nos camundongos ApoE<sup>-/-</sup>. Entretanto, estes tratamentos foram eficientes na redução de fatores de risco associados à aterosclerose, como o estresse oxidativo, a esteatose, a fibrose e processos inflamatórios hepáticos.

## Anexo 1

### Metodologia sobre o isolamento dos padrões de carotenóides realizados no Laboratório de Análise de Vitaminas do Departamento de Nutrição e Saúde da UFV.

#### 1. Isolamento dos padrões de carotenóides

Os padrões de  $\alpha$  e  $\beta$ -caroteno foram extraídos de cenoura (*Daucus carota* L.) por cromatografia em coluna aberta, de acordo com Rodriguez-Amaya (1989) modificado. Cerca de 40 g de cenoura foram triturados em acetona resfriada (350 mL) e transferidos para éter de petróleo (300 mL). O extrato assim obtido foi concentrado em evaporador rotativo por 5 minutos. Para concentrar ainda mais o extrato sem estender o tempo de exposição ao calor foi empregado fluxo de nitrogênio, até obter um volume de cerca de 3 mL. A coluna cromatográfica foi empacotada com óxido de magnésio e Celite® (1:2). Foi empregada coluna de vidro com cerca de 50 cm de comprimento e 5 cm de diâmetro e recheio de cerca de 15 cm de altura. Para que o empacotamento da coluna ocorresse sem a formação de bolhas ou rachaduras que poderiam impedir uma eficiente separação dos padrões, foi aderida em toda a parede externa da coluna, uma gaze umedecida com acetona.

O extrato foi vagorosamente acrescentado no topo da coluna. Após a penetração do extrato na fase estacionária, adicionou-se aos poucos a fase móvel composta por 2% de éter etílico em éter de petróleo até a separação do  $\alpha$  e  $\beta$ -caroteno. A fase estacionária foi retirada da coluna de vidro, conforme descrito a seguir:

- Retirou-se a fase estacionária previamente seca virando a coluna cuidadosamente ao contrário em uma superfície plana;
- A parte da coluna contendo o  $\alpha$ -caroteno (cor amarela) e  $\beta$ -caroteno (cor laranja) foram seccionadas;
- Para retirada total do  $\alpha$ -caroteno e  $\beta$ -caroteno da fase estacionária empregou-se fase móvel contendo 5% de água em acetona e, em seguida, uma solução de 10% de água em acetona;

- A mistura foi então filtrada a vácuo em funil de Büchner utilizando-se papel de filtro para separar a fase móvel contendo o composto de interesse na fase estacionária.
- Em seguida, o filtrado foi transferido em cinco volumes de 20 mL, para um funil de separação, onde foram adicionados 50 mL de éter de petróleo refrigerado, para a transferência dos pigmentos da acetona para o éter. Após a adição de cada parte de filtrado, a mistura foi lavada com água destilada 3 vezes para retirar toda a acetona;
- Acrescentou-se sulfato de sódio anidro ao extrato em éter de petróleo para retirar o resíduo de água;
- O padrão assim obtido foi transferido para frascos de vidro âmbar, seco sob fluxo de nitrogênio, lacrado e armazenado a  $-18 \pm 1$  °C.

Para obtenção do padrão de licopeno, cerca de 40 g de tomate foram utilizados, sendo a extração feita conforme descrito para cenoura. A coluna cromatográfica foi empacotada com óxido de magnésio e Celite® (1:1) previamente ativados por 4 horas a  $110 \pm 1$  °C. Foi empregada coluna de vidro de cerca de 50 cm de comprimento e 5 cm de diâmetro e recheio de cerca de 20 cm de altura, recoberta externamente com gaze umedecida em acetona. Foram empregadas fases móveis com concentrações crescentes de éter etílico em éter de petróleo (2 a 5%) e concentrações crescentes de acetona em éter de petróleo (5 a 100%) para separação do carotenóide, da seguinte forma:

- Após a penetração do extrato de carotenóides na fase estacionária adicionou-se cerca de 20 mL de fase móvel (2% de éter etílico em éter de petróleo) e aguardou-se a sua passagem;
- Em seguida foi sendo adicionada, aos poucos, fase móvel composta por 5% de éter etílico em éter de petróleo (20 mL);
- Após a passagem dessas fases adicionou-se ao topo da coluna fase móvel composta por 2% de acetona em éter de petróleo (20 mL);
- A concentração de acetona na fase móvel foi gradativamente aumentada até 20% (5, 10, 15 e 20%), utilizando-se 20 mL de cada concentração;
- Continuou-se a elevar a proporção de acetona na fase móvel empregando 20 mL de fases móveis contendo 30, 40, 50, 60, 80 e por último 100% de acetona;
- Retirou-se a fase estacionária da coluna de vidro, deixando-a secar antes e virando cuidadosamente ao contrário em uma superfície plana;

- A parte da coluna contendo o licopeno (cor vermelha) foi seccionada;
  - As demais etapas foram iguais às descritas para o  $\alpha$  e  $\beta$ -caroteno.
- Para obtenção do padrão de  $\beta$ -criptoxantina, cerca de 80 g de mamão foram preparados conforme descrito para a cenoura e o tomate. A coluna cromatográfica foi empacotada com óxido de magnésio e Celite® (1:2) previamente ativados por 4 horas a  $150 \pm 1$  °C. Foi empregada coluna de vidro com cerca de 50 cm de comprimento e 5 cm de diâmetro e recheio de cerca de 20 cm de altura, recoberta externamente com gaze umedecida em acetona. Foram empregadas fases móveis com concentrações crescentes de éter etílico em éter de petróleo (2 a 4%) e concentrações crescentes de acetona em éter de petróleo (1 a 100%) para separação da  $\beta$ -criptoxantina, da seguinte forma:
- Após a penetração do extrato de carotenóides na fase estacionária adicionou-se cerca de 20 mL de fase móvel (2% de éter etílico em éter de petróleo) e aguardou-se a sua passagem;
  - Em seguida foi sendo adicionada, aos poucos, fase móvel composta por 4% de éter etílico em éter de petróleo (20 mL);
  - Após a passagem dessas fases adicionou-se ao topo da coluna outra fase móvel composta por 1% de acetona em éter de petróleo (20 mL);
  - A concentração de acetona na fase móvel foi aumentada empregando 20 mL de fases móveis contendo 8, 10 e 100% de acetona;
  - Retirou-se a fase estacionária da coluna de vidro;
  - A parte da coluna contendo a  $\beta$ -criptoxantina (cor laranja) foi seccionada;
  - As demais etapas foram iguais às descritas para o  $\beta$ -caroteno.

A confirmação da identidade dos padrões foi feita baseada nos seguintes parâmetros: ordem de eluição das frações em suas respectivas colunas ( $\alpha$ -caroteno: primeiro;  $\beta$ -caroteno: segundo; licopeno: último e  $\beta$ -criptoxantina: penúltimo); coloração dos pigmentos eluídos (amarelo para o  $\alpha$ -caroteno, laranja para  $\beta$ -caroteno e  $\beta$ -criptoxantina e vermelho para licopeno); tempo de retenção esperado por HPLC e espectros de absorção característicos.

## **2. Preparo dos padrões de carotenóides**

A pureza dos padrões de carotenóides ( $\alpha$ -caroteno: 88,3%;  $\beta$ -caroteno: 90,3%;  $\beta$ -criptoxantina: 86,9% e licopeno: 83,7%) foi verificada por HPLC e a

quantificação realizada por espectrofotometria, baseando-se na absorvância máxima, segundo a lei de Lambert-Beer. Para os padrões de carotenóides utilizou-se a seguinte equação:  $C (\mu\text{g/mL}) = \text{ABS} \times 10^4 / E^{1\%}_{1\text{cm}}$ , onde C = concentração; ABS = absorvância máxima;  $E^{1\%}_{1\text{cm}}$  = coeficiente de absorvidade molar.

A Tabela 1 apresenta os coeficientes de absorvidade específicos e os comprimentos de onda utilizados para a determinação da concentração real dos padrões de carotenóides analisados.

**Tabela 1:** Coeficientes de absorvidade molar e comprimentos de onda máximos utilizados para cálculo da concentração real dos carotenóides.

Compostos	Solvente	$\lambda_{\text{Max}}$ (nm)	Coeficiente de absorvidade	Referência
$\alpha$ -caroteno	Éter de petróleo	443	2800	(Ball, 1998)
$\beta$ -caroteno	Éter de petróleo	450	2592	(Ball, 1998)
$\beta$ -criptoxantina	Éter de petróleo	449	2386	(Ball, 1998)
Licopeno	Éter de petróleo	469	3450	(Ball, 1998)

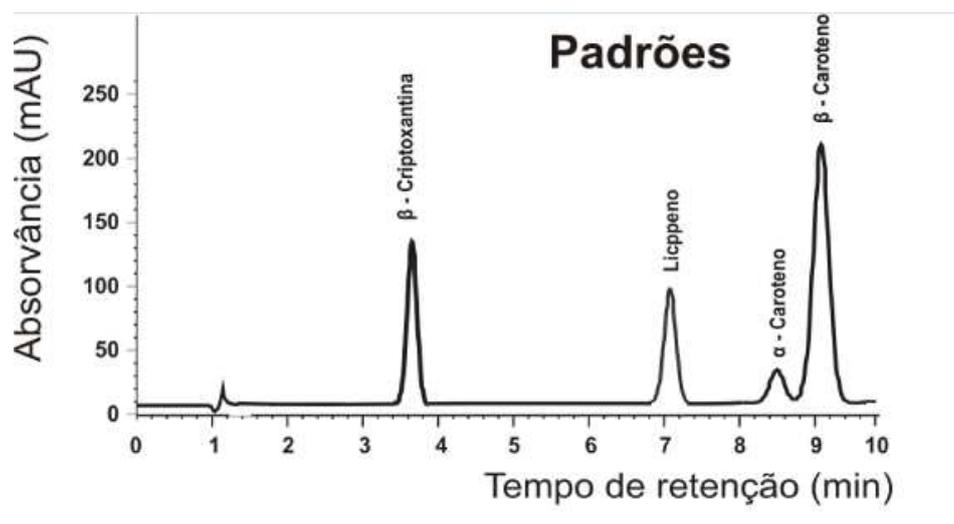
### 3. Identificação e Quantificação de Carotenóides

A identificação qualitativa dos compostos foi realizada injetando-se uma mistura de padrões de carotenóides e comparando-se os tempos de retenção obtidos para os padrões e para as amostras analisados sob as mesmas condições e pela comparação dos espectros de absorção do padrão e dos picos de interesse nas amostras, utilizando-se o DAD.

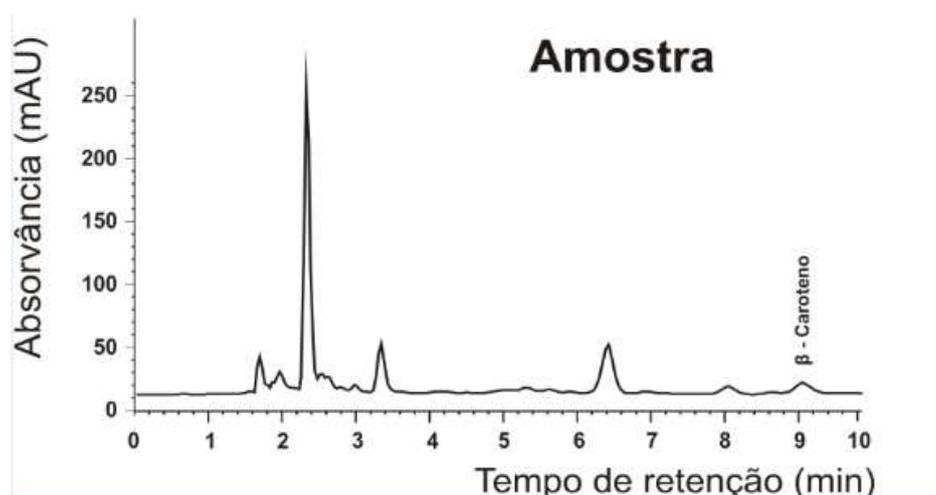
Para a quantificação dos compostos, foram utilizadas curvas de padronização externas. A construção das curvas analíticas foi realizada por meio de injeção, em duplicata, de seis concentrações crescentes de soluções dos padrões na faixa de 0,033 e 2,060  $\mu\text{g}$  para  $\alpha$ -caroteno; 0,004 e 1,433  $\mu\text{g}$  para  $\beta$ -caroteno; 0,004 a 1,433  $\mu\text{g}$  para  $\beta$ -criptoxantina; 0,0003 e 0,0546  $\mu\text{g}$

para licopeno. Desse modo, foi feita uma correlação linear entre as áreas dos picos e as concentrações injetadas de cada composto.

A quantificação dos compostos nos frutos foi realizada a partir das curvas analíticas e equações de regressão obtidas para  $\beta$ -criptoxantina ( $y = 1661804,24x + 18345,98$ ;  $R^2 = 0,998$ ); licopeno ( $y = 4383677,42x + 2996,19$ ;  $R^2 = 0,999$ ),  $\alpha$ -caroteno ( $y = 1730130,16x - 8057,58$ ;  $R^2 = 0,999$ ) e  $\beta$ -caroteno ( $y = 1389460,94x + 24320,87$ ;  $R^2 = 0,996$ ). Os cromatogramas dos padrões e da amostra da PLFE estão apresentados nas Figuras 1 e 2 deste Anexo.



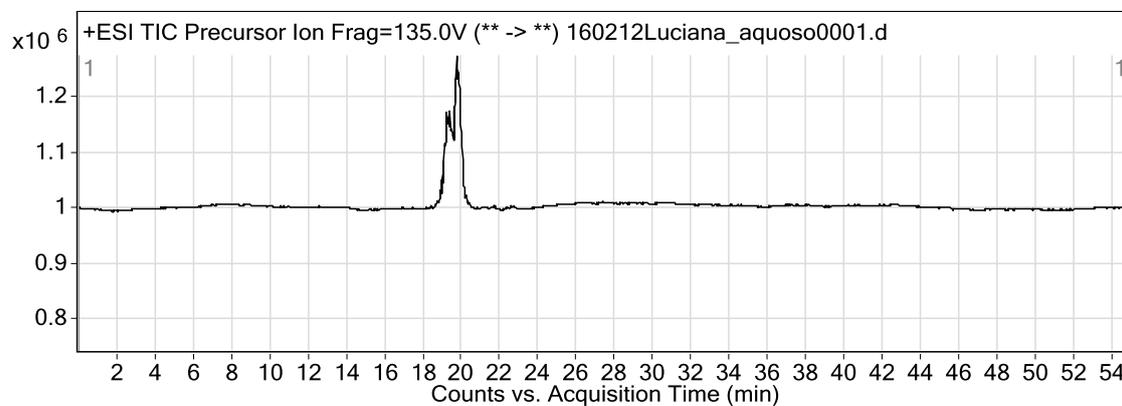
**Figura 1** - Cromatograma dos padrões de carotenóides.



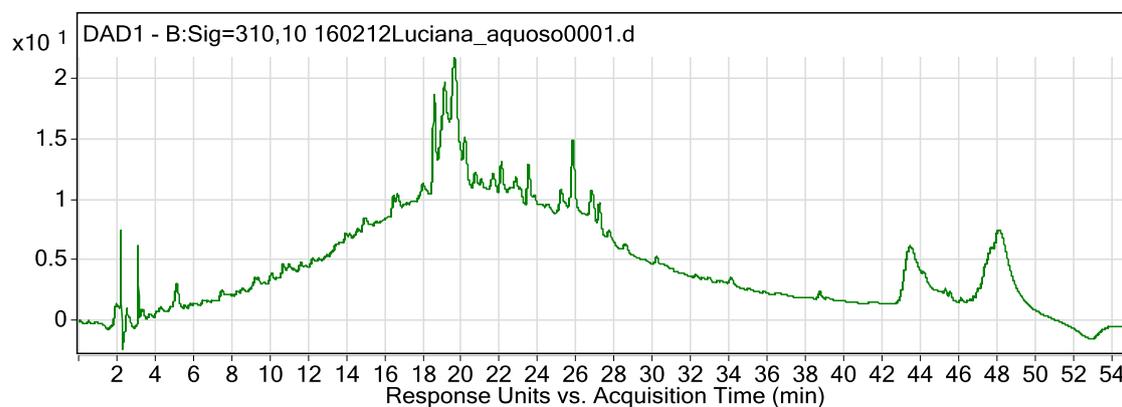
**Figura 2** - Cromatograma da amostra de PLFE.

## Anexo 2:

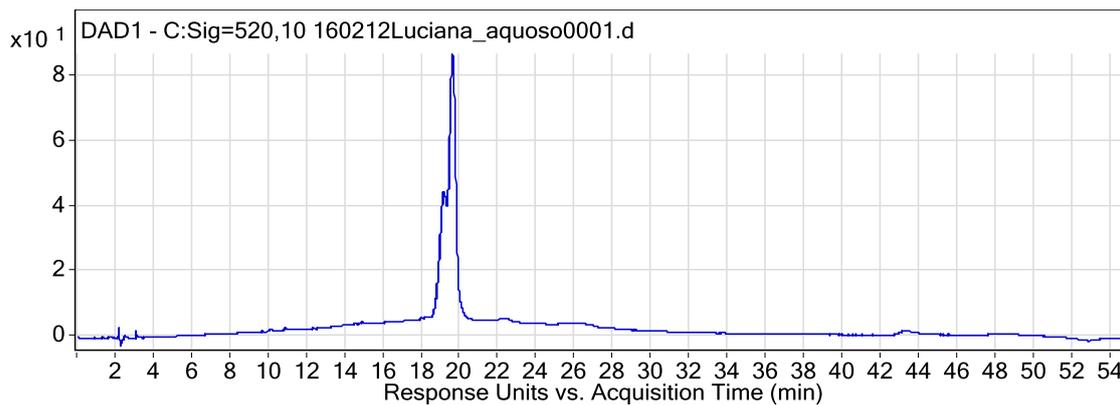
### Cromatogramas obtidos da análise de antocianinas por HPLC ESI/MS.



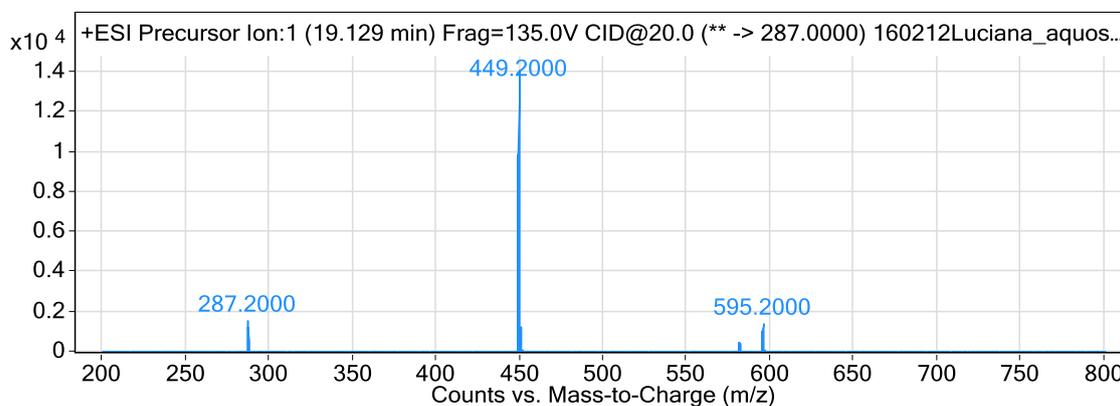
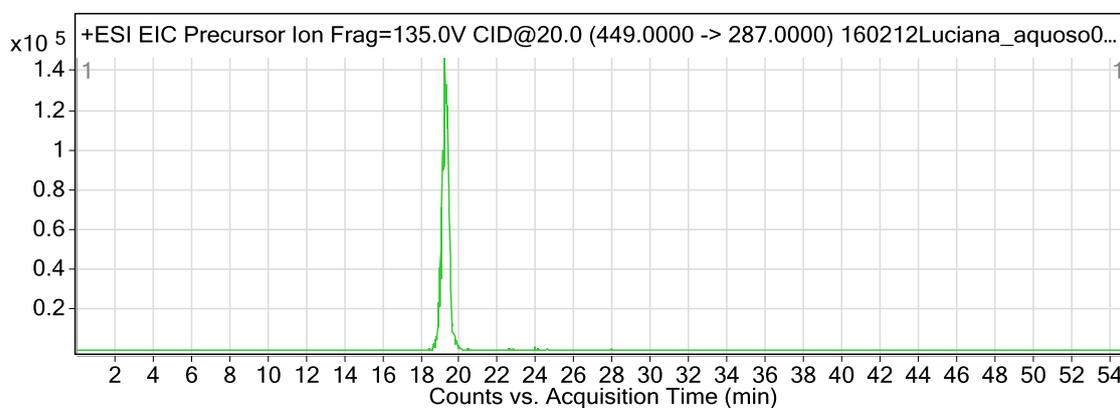
**Figura 3** - Cromatograma de fragmentação dos íons precursores através HPLC ESI/MS.



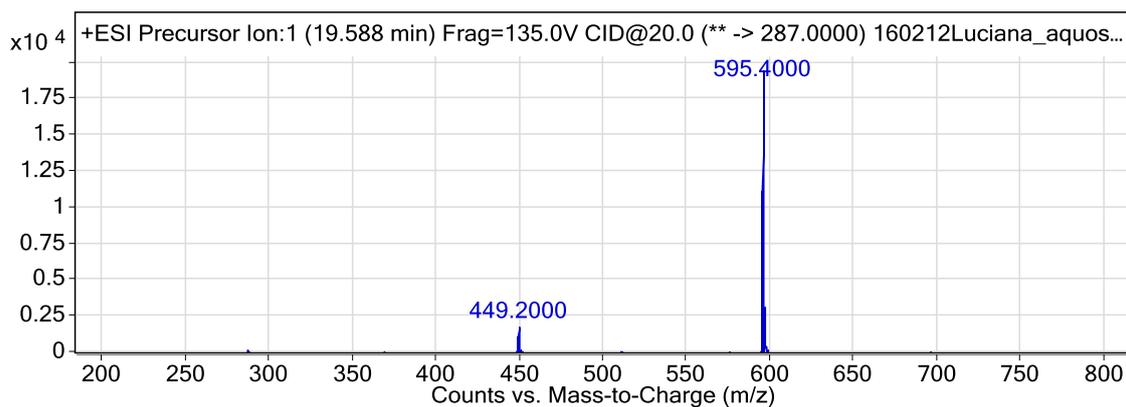
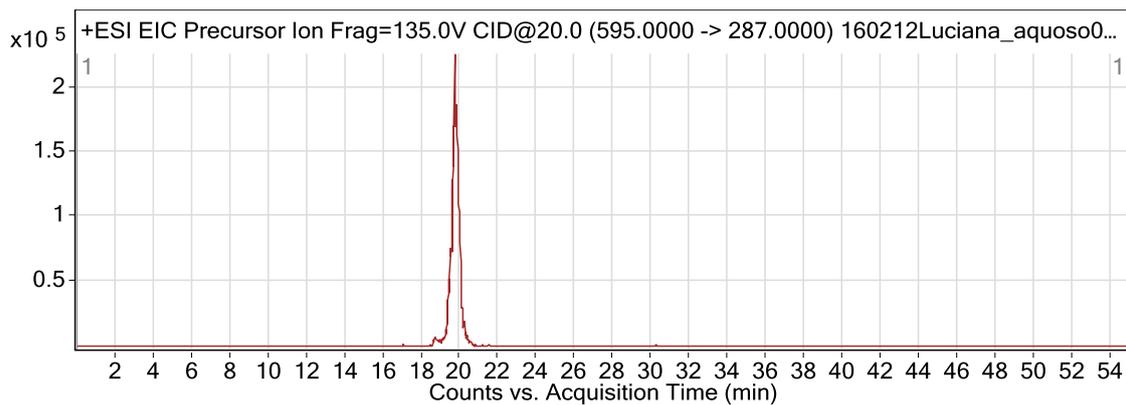
**Figura 4** - Cromatograma da monitoração das antocianinas na polpa liofilizada de *E. edulis* a 310 nm através de HPLC ESI/MS.



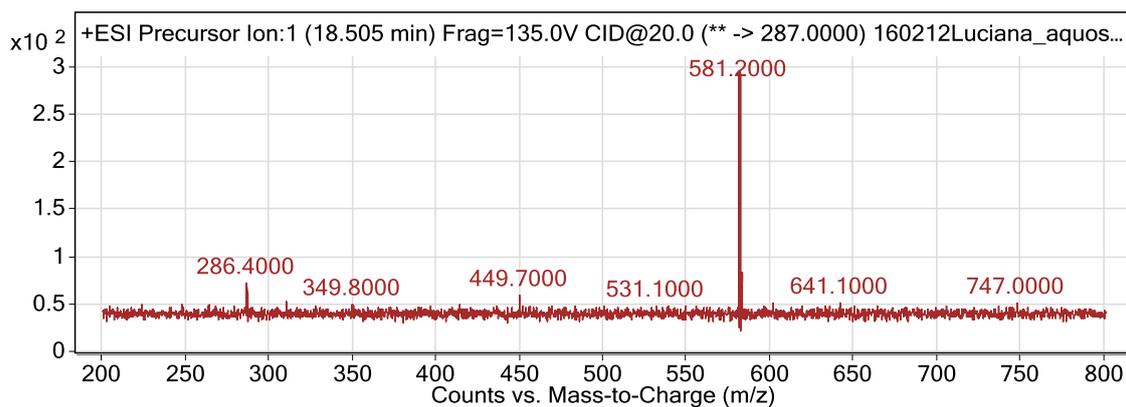
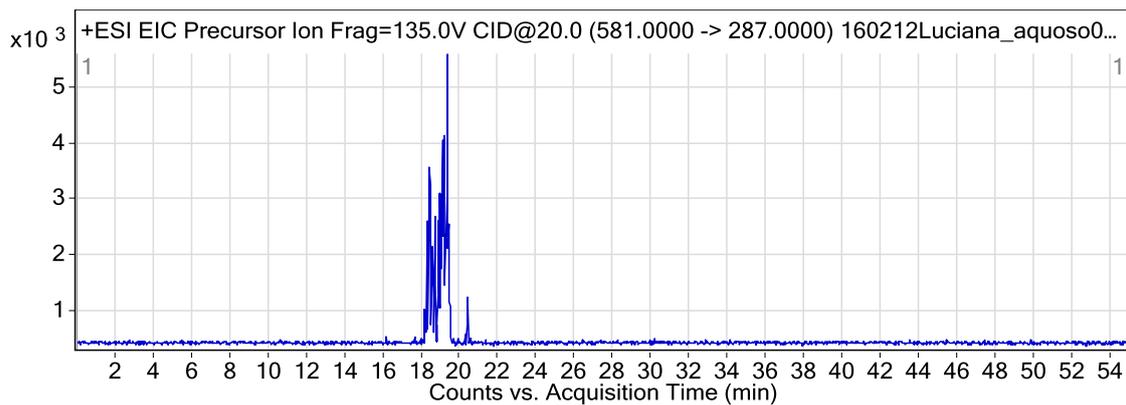
**Figura 5** - Cromatograma da monitoração das antocianinas na polpa liofilizada de *E. edulis* a 520 nm através de HPLC ESI/MS.



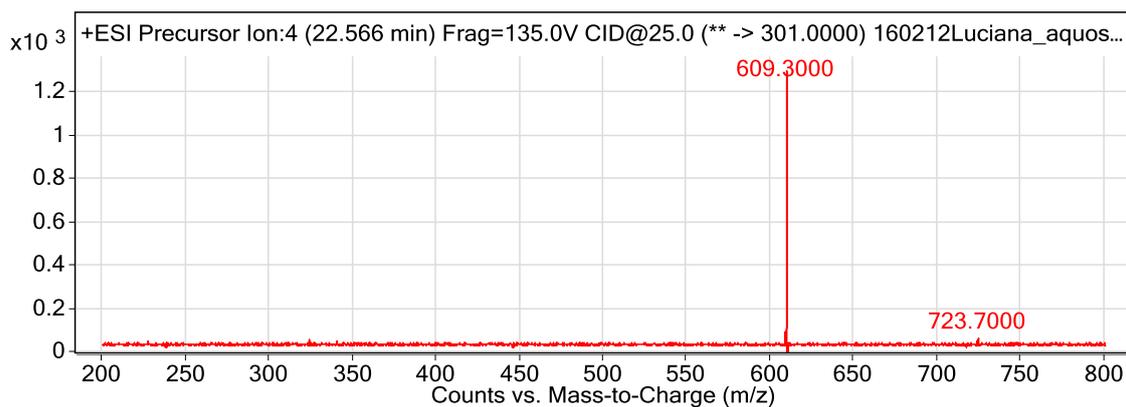
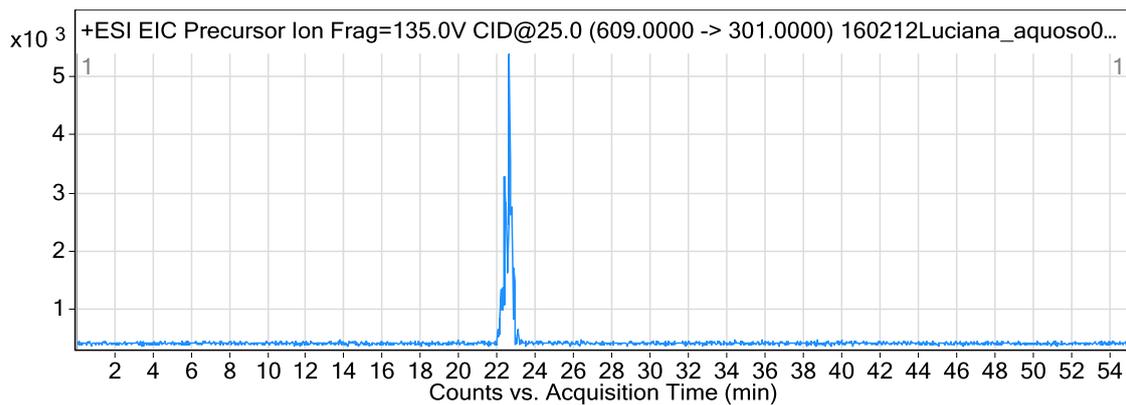
**Figura 6** - Cromatogramas da cianidina 3-glicosídeo presente na polpa liofilizada de *E. edulis* obtido por HPLC ESI/MS.



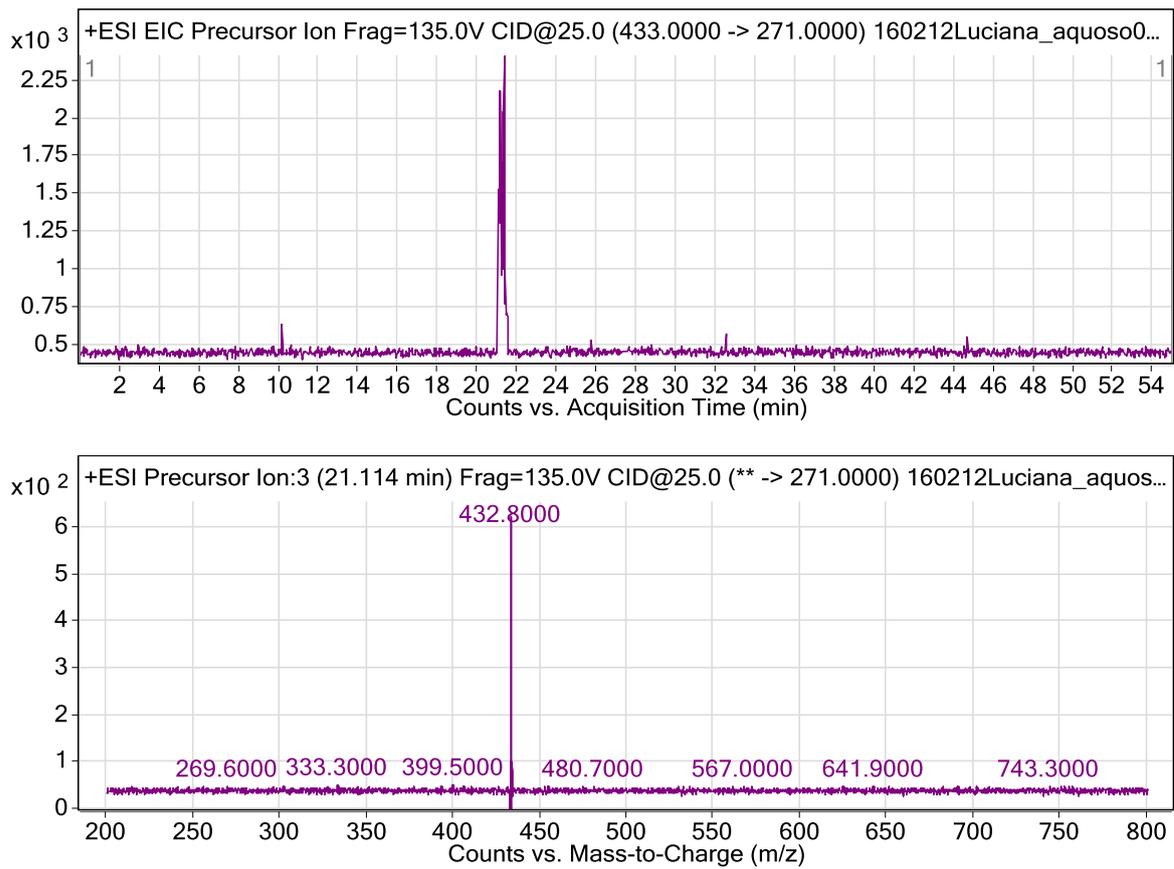
**Figura 7** - Cromatogramas da cianidina 3-rutinosídeo presente na polpa liofilizada de *E. edulis* obtido por HPLC ESI/MS.



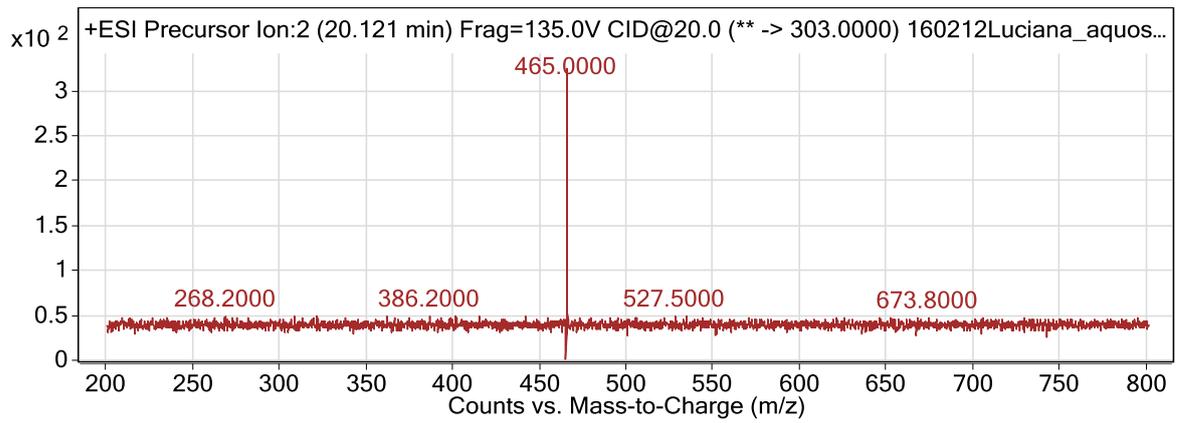
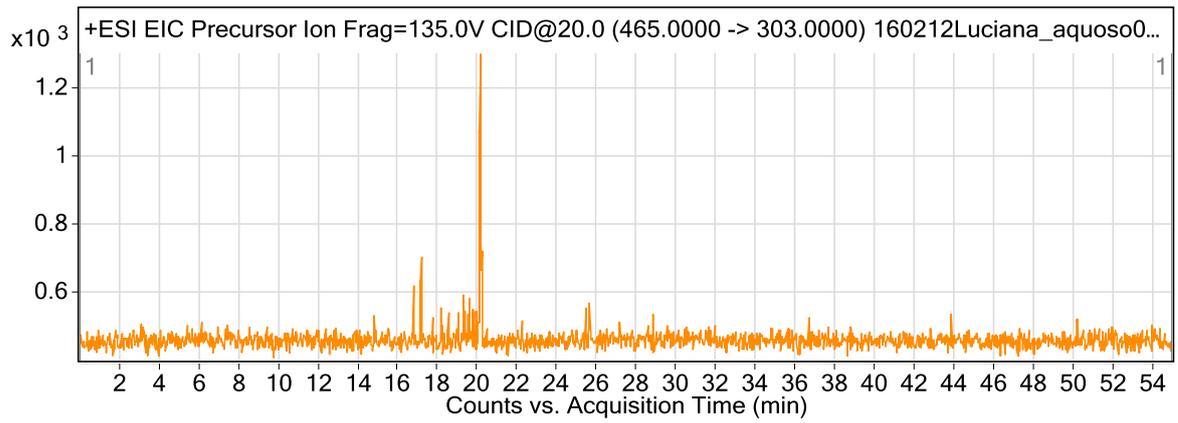
**Figura 8** - Cromatogramas da cianidina 3-sambunosídeo presente na polpa liofilizada de *E. edulis* obtido por HPLC ESI/MS.



**Figura 9** - Cromatogramas da peonidina 3-rutinosídeo presente na polpa liofilizada de *E. edulis* obtido por HPLC ESI/MS.



**Figura 10** - Cromatogramas da pelargonidina 3-rutinosídeo presente na polpa liofilizada de *E. edulis* obtido por HPLC ESI/MS.



**Figura 11** - Cromatogramas da delphinidina 3-glicosídeo presente na polpa liofilizada de *E. edulis* obtido por HPLC ESI/MS.

## Anexo 3

### Certificado do Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFMG



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL  
- C E T E A -**

**CERTIFICADO**

Certificamos que o **Protocolo nº 98/2009**, relativo ao projeto intitulado "**Avaliação bromatológica, fitoquímica, antioxidante e da atividade antiaterogênica dos frutos de Euterpe Edulis Martius**", que tem como responsável(is) **João Paulo Viana Leite**, está(ão) de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo **Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG)**, tendo sido aprovado na reunião de **1/07/2009**.

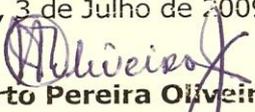
Este certificado expira-se em **1/07/2014**.

**CERTIFICATE**

We hereby certify that the **Protocol nº 98/2009**, related to the project entitled "**Evaluation bromatologic phytochemical antioxidant and of the antiatherogenic activity of the fruits of Euterpe Edulis Martius**", under the supervisors of **João Paulo Viana Leite**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the **Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG)**, and was approved in **July 1, 2009**.

This certificate expires in **July 1, 2014**.

Belo Horizonte, 3 de Julho de 2009.

  
**Prof. Humberto Pereira Oliveira**  
**Coordenador do CETEA/UFMG**

**Universidade Federal de Minas Gerais**  
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha  
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005  
31270-901 - Belo Horizonte, MG - Brasil  
Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592  
[www.ufmg.br/bioetica/cetea](http://www.ufmg.br/bioetica/cetea) - [cetea@prpq.ufmg.br](mailto:cetea@prpq.ufmg.br)

(Mod.Cert. v1.0)