

ALEXANDRE AZEVEDO NOVELLO

**EXTRAÇÃO DE ANTOCIANINAS DOS FRUTOS DO AÇAÍ DA  
MATA ATLÂNTICA (*Euterpe edulis* Martius) E SUA ATUAÇÃO  
NAS ATIVIDADES ANTIOXIDANTE E ANTIATEROGÊNICA EM  
CAMUNDONGOS APOE -/-**

Dissertação apresentada à  
Universidade Federal de Viçosa, como  
parte das exigências do Programa de  
Pós-Graduação em Ciência da  
Nutrição, para obtenção do título de  
*Magister Scientiae*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2011

**ALEXANDRE AZEVEDO NOVELLO**

**EXTRAÇÃO DE ANTOCIANINAS DOS FRUTOS DO AÇAÍ DA MATA  
ATLÂNTICA (*Euterpe edulis Martius*) E SUA ATUAÇÃO NAS ATIVIDADES  
ANTIOXIDANTE E ANTIATEROGÊNICA EM CAMUNDONGOS APOE -/-**

Dissertação apresentada à  
Universidade Federal de Viçosa, como  
parte das exigências do Programa de  
Pós-Graduação em Ciência da  
Nutrição, para obtenção do título de  
*Magister Scientiae*.

APROVADA: 08 de julho de 2011

---

Prof. João Paulo Viana Leite  
(Coorientador)

---

Prof<sup>a</sup>. Luciana Moreira Lima

---

Prof<sup>a</sup>. Maria do Carmo Gouveia Peluzio  
(Orientadora)

*Dedico esta dissertação à minha amada esposa Aline  
e aos meus filhos Tiago e Paulo.*

*“Os saberes são navios: não se constroem sem saberes e ciência. Mas os navios não são fins em si mesmos. Navios existem por causa das viagens. Antes que o navio fosse pensado e construído, houve o sonho de uma terra a que se chegar. O sonho de cruzar os mares precede a ciência de construir navios. A ciência existe por causa do sonho.”*

*(Rubem Alves)*



## **AGRADECIMENTOS**

À Deus, pela força, paciência, entendimento, cuidado, paz, refúgio e por não desistir de mim.

À Universidade Federal de Viçosa pela oportunidade e excelência em ensino, pesquisa e extensão.

Ao departamento de Nutrição e Saúde pelo carinho, estímulos, apoio estrutural e por acreditar que era possível.

À minha professora orientadora Maria do Carmo Peluzio, pelos ensinamentos, carinho, atenção, alegria e cobranças.

Ao professor João Paulo Leite pela orientação, conduta profissional e envolvimento motivante com a temática.

Aos meus filhos Tiago e Paulo que transformavam o cansaço em estímulo para a conquista.

À minha linda esposa Aline por entender as dificuldades, aguentar o meu humor e mesmo assim estar de braços abertos em todos os momentos.

Aos meus pais Augusto e Maria e avós Manuel e Alda pelo amor, ensinamentos, sacrifícios, exemplos de dignidade e caráter.

À minha irmã Luciana, madrinha, tias e tios, primas e primos por sempre serem referência e sinônimos de alegria e força.

À professora Sylvia Franceschini pelos inúmeros incentivos e por acreditar no meu trabalho na Divisão de Saúde permitindo a conciliação das partes.

Aos meus companheiros de trabalho do Laboratório de Análises Clínicas da Divisão de Saúde que cobriram minhas eventuais ausências com competência e comprometimento.

Ao grupo do Laboratório de Bioquímica Nutricional, Mônica, Carol, Sandra, Nathane, Damiana, Tatiana Fiche, Natália e Toninho, que ajudaram e participaram diretamente dos resultados desta pesquisa.

À Luciana e Cynthia pela paciência, alegria, trabalho, aprendizado, amizade e parceria formada.

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

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

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS</b>	<b>x</b>
<b>LISTA DE TABELAS</b>	<b>xii</b>
<b>RESUMO</b>	<b>xiii</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>xv</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>2</b>
2.1. O açaí	2
2.2. <i>Euterpe edulis</i> Martius	3
2.3. O fruto	4
2.4. Antocianinas e seu efeito protetor	5
2.5. Estrutura química e propriedade antioxidante das antocianinas	5
2.6. Estudos da ação antioxidante das antocianinas	8
2.7. Extração das antocianinas	12
2.8. Aterosclerose	13
2.9. Estudos das antocianinas na prevenção da aterosclerose	16
2.10. Sinvastatina	17
2.11. Modelo experimental e camundongos ApoE -/-	18
<b>3. JUSTIFICATIVA DO ESTUDO</b>	<b>19</b>
<b>4. OBJETIVO GERAL</b>	<b>22</b>
4.1. Objetivos específicos	22
<b>5. METODOLOGIA</b>	<b>22</b>
5.1. Teste cinético de adição de ácido cítrico em etanol 95°	22
5.2. Preparo das soluções de extração das antocianinas com diferentes solventes e agentes acidulantes	23
5.3. Obtenção dos frutos	23
5.4. Despulpamento, teste de extração das antocianinas com diferentes solventes e agentes acidulantes	24
5.5. Dosagem quantitativa das antocianinas totais por espectrometria	25
5.6. Preparo da polpa e liofilização a partir do melhor solvente extrator	26



5.7. Análises cromatográficas do extrato liofilizado de açaí	27
5.7.1. Análises qualitativa e quantitativa das antocianinas do extrato de açaí liofilizado por CLAE	27
5.7.2. Análise de carotenóides do extrato liofilizado de açaí por CLAE	30
5.7.3. Extração e análise de carotenóides	30
5.7.4. Identificação de vitamina C no extrato liofilizado de açaí pela técnica de CLAE	31
5.7.5. Extração e análise de vitamina C	32
5.8. Análises da composição química	32
5.8.1. Composição química centesimal do extrato de açaí liofilizado	32
5.8.2. Quantificação mineral do extrato de açaí liofilizado	32
5.8.3. Perfil Lipídico do extrato de açaí – Análise de Ácidos Graxos	33
5.9. Atividade antioxidante do extrato de açaí liofilizado	34
5.9.1. Avaliação da atividade antioxidante do extrato	34
5.10. Avaliação da atividade antiaterogênica <i>in vivo</i> e exames bioquímicos	35
5.10.1. Animais	35
5.10.2. Dietas	36
5.10.3. Controle de peso corporal e do consumo alimentar	37
5.10.4. Eutanásia e coleta de tecidos	37
5.10.5. Análises bioquímicas dos parâmetros sanguíneos	38
5.10.6. Avaliação das lesões ateroscleróticas na aorta	38
5.10.7. Avaliação da atividade antioxidante	39
5.10.7.1. Atividade enzimática: Catalase no fígado	39
5.10.7.2. Atividade enzimática: Superóxido Dismutase no fígado	39
5.11. Diagrama do estudo	40
5.12. Análise estatística	40
<b>6. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>41</b>
6.1. Testes de extração	41
6.1.1. Teste cinético de adição de ácido cítrico em etanol 95°	41

6.1.2. Preparo das soluções de extração das antocianinas com diferentes solventes e agentes acidulantes	42
6.1.3. Obtenção dos frutos para os testes de extração	43
6.1.4. Teste de extração das antocianinas com diferentes solventes	43
6.2. Preparo da polpa e liofilização a partir do melhor solvente extrator	47
6.3. Análises espectrométricas e cromatográficas do extrato de açaí liofilizado	48
6.3.1. Dosagem espectrométrica do extrato de açaí liofilizado	48
6.3.2. Dosagem quantitativa e qualitativa por CLAE de antocianinas do extrato de açaí liofilizado.	48
6.3.3. Identificação e dosagem de carotenóides do extrato liofilizado de açaí por CLAE	50
6.3.4. Identificação de vitamina C por CLAE	51
6.4. Análises químicas do extrato de açaí liofilizado	51
6.4.1. Composição química centesimal do extrato de açaí liofilizado	51
6.4.2. Composição mineral do extrato de açaí liofilizado	52
6.4.3. Análise fitoquímica	53
6.4.4. Perfil lipídico	54
6.5. Atividade antioxidante	56
6.5.1. Avaliação da atividade antioxidante do extrato	56
6.6. Avaliação da atividade antiaterogênica do extrato de açaí liofilizado e análises bioquímicas	57
6.6.1. Controle de peso corporal e do consumo alimentar	57
6.6.2. Análises bioquímicas dos parâmetros sanguíneos dos animais experimentais	58
6.6.3. Avaliação da atividade antioxidante <i>in vivo</i>	62
6.6.3.1. Avaliação das lesões ateroscleróticas na aorta	62
6.6.4. Avaliação da atividade antioxidante	65
6.6.4.1. Atividade enzimática: Catalase no fígado	65
6.6.4.2. Atividade enzimática: Superóxido Dismutase no fígado	66
<b>7. CONCLUSÃO</b>	<b>68</b>

<b>8. PERSPECTIVAS</b>	<b>69</b>
<b>9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>70</b>
<b>10. ANEXO 1 – PROTOCOLO EXPERIMENTAL DO COMITÊ DE ÉTICA</b>	<b>80</b>

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Palmeira <i>Euterpe edulis</i> Martius - palmeira Juçara, encontrada na Mata Atlântica .....	4
Figura 2 - Estrutura molecular das antocianidinas ou agliconas .....	6
Figura 3 - Estruturas em equilíbrio das antocianinas em meio aquoso. ....	13
Figura 4 - Cromatograma do mix dos padrões de antocianinas. C3G: cianidina 3-O-glucosídeo e C3R: cianidina 3-O-rutinosídeo. Condição: DAD 520 nm, Coluna RP-18 Phenomenex Gemini, 5µm 250 x 4,6 mm, pré-coluna Phenomenex ODS C18 4 x 3 mm .....	28
Figura 5 - Curva padrão da cianidina 3-O-glucosídeo.....	29
Figura 6 - Curva padrão da cianidina 3-O-rutinosídeo .....	29
Figura 7 - Delineamento experimental adotado .....	35
Figura 8 - Placas de ateroma na aorta torácica e arco-aórtico de camundongos ApoE -/- .....	39
Figura 9 - Diagrama do estudo .....	40
Figura 10 - Adições sucessivas de ácido cítrico em etanol 95° versus pH correspondente .....	41
Figura 11 - Curva de comparação de extração utilizando os solventes com HCl 0,1% e Ácido Cítrico 0,3% versus concentração (mg/L) de antocianina obtida dos frutos.....	45
Figura 12 - Ordem decrescente entre os melhores solventes utilizados para a extração das antocianinas do fruto.....	45
Figura 13 - Cromatograma das antocianinas do extrato de açaí liofilizado. C3G: cianidina 3-O-glucosídeo e C3R: cianidina 3-O-rutinosídeo. Condição: DAD 520 nm, Coluna RP-18 Phenomenex Gemini, 5µm 250 x 4,6 mm, pré-coluna Phenomenex ODS C18 4 x 3 mm.....	49
Figura 14 - Cromatograma de carotenóides indicando a presença de β-caroteno .....	51
Figura 15 - Cromatograma do perfil lipídico do extrato de açaí liofilizado.....	54
Figura 16 - Curva do teor do extrato de açaí liofilizado versus % de captura de DPPH.....	56
Figura 17 - Evolução do peso dos camundongos durante os dias do experimento. Dados expressos em média. Não houve diferença	

significativa, teste one way ANOVA complementados pelo teste de Tukey .....	58
Figura 18 - Área total das aortas analisadas entre os grupos. Dados expressos em média com desvio padrão. Não houve diferença significativa entre os grupos, teste one way ANOVA.....	63
Figura 19 - Percentagem de área lesionada das artérias entre os grupos. Não houve diferença significativa entre os grupos, teste one way ANOVA. ....	64
Figura 20 - Atividade da enzima catalase entre os grupos após o tratamento. *p<0,05 comparado com o grupo C+, ANOVA, teste de Tukey. ....	66
Figura 21 - Atividade da enzima superóxido dismutase após o tratamento. *p<0,05 comparado com o grupo C+, ANOVA, teste de Tukey. ....	67

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Antocianidinas e seus grupos substituintes. ....	7
Tabela 2 - Planejamento do melhor solvente para a obtenção de um extrato enriquecido de antocianinas a partir dos frutos do açaí. ....	23
Tabela 3 - Dados das curvas dos padrões de cianidinas. ....	30
Tabela 4 - Composição das dietas experimentais - 2% extrato de açaí liofilizado - (g/kg dieta).....	36
Tabela 5 - Composição das dietas experimentais - 6% extrato de açaí liofilizado - (g/kg dieta).....	37
Tabela 6 - pH final das soluções extratoras após o preparo.....	42
Tabela 7 - Solventes com HCl 0,1% como agente acidulante .....	43
Tabela 8 - Solventes com Ácido Cítrico 0,3% como agente acidulante .....	44
Tabela 9 - Quantidade de antocianinas totais (mg/100g fruto) obtidas pela extração com os respectivos solventes.....	46
Tabela 10 – Quantificação por CLAE das antocianinas do fruto da <i>Euterpe edulis</i> .....	49
Tabela 11 - Comparação da composição centesimal do açaí liofilizado entre alguns estudos.....	52
Tabela 12 - Comparação da composição de minerais dos extratos de açaí liofilizados .....	53
Tabela 13 - Análise fitoquímica do extrato de açaí liofilizado .....	53
Tabela 14 - Valores de Ácidos graxos (%) de maior ocorrência no açaí ( <i>Euterpe oleracea</i> Martius). ....	55
Tabela 15 - Concentrações do extrato de açaí e suas correspondentes absorvâncias e % de captura de radical livre DPPH.....	56
Tabela 16 - Resultados das análises bioquímicas do soro dos camundongos. ....	60
Tabela 17 - Área total da aorta e percentual de área lesionada .....	63

## RESUMO

NOVELLO, Alexandre Azevedo, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2011. **Extração de antocianinas dos frutos do açaí da Mata Atlântica (*Euterpe edulis* Martius) e sua atuação nas atividades antioxidante e antiaterogênica em camundongos ApoE -/-**. Orientadora: Maria do Carmo Gouveia Peluzio. Coorientadores: Helena Maria Pinheiro Sant'Ana e João Paulo Viana Leite

O açaí é um fruto da palmeira do gênero *Euterpe* Martius. Na região amazônica a bebida de açaí é obtida a partir da polpa dos frutos do açazeiro (*Euterpe oleracea* Martius). Na região da Mata Atlântica, pode-se obter o açaí a partir dos frutos da Juçara (*Euterpe edulis* Martius). Esta é uma palmeira endêmica da Mata Atlântica que ocorre desde o Rio Grande do Sul até a Bahia, com distribuição principal na orla Atlântica. Atualmente a *E. edulis* é uma espécie de palmeira ameaçada de extinção. Existem poucos relatos de composição e efeitos benéficos dos frutos desta espécie. Tem-se discutido o seu efeito positivo na saúde, relacionando-se à presença de ácidos graxos insaturados, minerais e compostos fenólicos como as antocianinas. Neste estudo testou-se o melhor solvente para a extração de antocianinas e avaliaram-se seus efeitos antioxidante e antiaterogênico adicionando o extrato da polpa do açaí liofilizado à dieta de camundongos ApoE-/- divididos em quatro grupos experimentais. O Grupo C+, controle positivo, recebeu a dieta padrão AIN-93M, os grupos 2% e 6%, receberam os extratos de açaí na dieta AIN-93M na proporção de 2% e 6%, respectivamente. O grupo Sinv, recebeu o fármaco Sinvastatina na quantidade estimada de 50mg/kg/dia por camundongo. Um quinto grupo, controle negativo, com camundongos C57Bl6 recebeu dieta padrão AIN-93M, durante 75 dias de experimento. Observou-se redução dos níveis das enzimas antioxidantes (catalase e superóxido dismutase) no tecido hepático dos camundongos tratados com açaí, sugerindo que esta atividade pode ter sido suprimida devido ao efeito sinergista das antocianinas. Não houve redução na evolução das placas de ateroma para os grupos que receberam tratamento quando comparados ao controle positivo, porém o açaí foi capaz de reduzir glicose, colesterol total e LDL, demonstrando que não há relação entre a placa e os níveis de colesterol durante este tempo

de tratamento. Os resultados demonstraram que o extrato de açaí liofilizado melhorou a atividade antioxidante, glicemia e o perfil lipídico, porém não foi capaz de minimizar a evolução da placa de ateroma dos camundongos ApoE-/- durante o período de tratamento.



## ABSTRACT

NOVELLO, Alexandre Azevedo, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July of 2011. **Extraction of anthocyanins from the fruits of the Atlantic Forest Acai (*Euterpe edulis* Martius) and its role in the antiatherogenic and antioxidant activities in ApoE  $-/-$  mice.** Adviser: Maria do Carmo Gouveia Peluzio. Co-advisers: Helena Maria Pinheiro Sant'Ana and João Paulo Viana Leite

Açaí is a fruit of the palm trees of the genus *Euterpe* Martius. In the Amazon region the açaí drink is obtained from the pulp of the fruits of "açazeiro" (*Euterpe oleracea* Martius). In the region of the Atlantic Forest can be obtained from the açaí fruit from Juçara (*Euterpe edulis* Martius). This is a palm characteristic of the Atlantic Forest occurring from the Rio Grande do Sul to Bahia, with main distribution in the Atlantic coast. Currently, *E. edulis* is a palm species threatened with extinction. There are few reports of beneficial effects and composition of the fruits from this species. It has been argued that positive effect on health is related to the presence of unsaturated fatty acids, minerals and phenolic compounds such as anthocyanins in this fruit. In this study we tested the best solvent for the extraction of anthocyanins and evaluated their antioxidant and antiatherogenic effects by adding the extract of freeze-dried açaí pulp to the diet of ApoE $-/-$  mice divided into four experimental groups. The group C+ (positive control) received the standard AIN-93M diet, the group 2% and 6% received extracts of açaí in the AIN-93M diet at 2% and 6% respectively, and the group SINV received the drug simvastatin on the estimated amount of 50mg/kg/day for mice. A fifth group, C57BL6 mice (negative control) received standard AIN-93M diet for 75 days of experiment. A reduction in the levels of antioxidant enzymes (superoxide dismutase and catalase) in the liver tissue of mice treated with açaí, suggesting that this activity may have been suppressed due to the synergistic effect of anthocyanins. There was no reduction in the evolution of atherosclerotic plaques for the treated groups compared to the positive control, but açaí was able to reduce glucose, total cholesterol and LDL, showing that there was no relationship between the plaques evolution and cholesterol levels during this treatment time. The results showed that the extract of freeze-dried açaí improved antioxidant activity, blood glucose and lipid profile, but was not able to minimize the development of

atherosclerotic plaque in ApoE<sup>-/-</sup> mice during the treatment period.



## 1. INTRODUÇÃO

Antocianinas (do grego “anthos” que significa flor e “kianos” que significa azul) são pigmentos vegetais importantes, pertencentes à classe de compostos fenólicos chamados coletivamente de flavonóides.<sup>1</sup> Elas pertencem a categoria de produtos naturais, estando presentes em frutos com espectro de cor que varia do vermelho ao azul, hortaliças escuras e cascas de uvas escuras<sup>2</sup>. A estrutura fenólica das antocianinas confere atividade antioxidante por meio da doação ou transferência de elétrons dos átomos de hidrogênio. Vários estudos têm demonstrado os efeitos das antocianinas na saúde, por suas propriedades antioxidantes,<sup>3, 4, 5</sup> com um significativo papel na prevenção de doenças.

O Brasil se posiciona como o maior produtor, consumidor e exportador de açaí do mundo. A região norte do país é responsável por mais de 90% dessa demanda. O açaí da Mata Atlântica provém da palmeira *E. edulis* Martius, ou também conhecida como palmeira Juçara, a qual está ameaçada de extinção devido ao intenso extrativismo do palmito. É uma palmeira nativa e endêmica da Mata Atlântica, que ocorre desde o Rio Grande do Sul até a Bahia, com distribuição principal na orla Atlântica. Os sucessivos ciclos econômicos e a contínua expansão da população humana comprometeram a integração ecológica deste ecossistema<sup>6</sup>. Os frutos do açaí possuem uma coloração roxa intensa devido a alta concentração de antocianina, superior a de outros frutos tropicais, como a acerola, o jambolão e o guajiru.<sup>7</sup>

As antocianinas possuem efeito antioxidante e conseqüentemente protetor contra os radicais livres formados a partir de inúmeras reações no organismo como parte de seu metabolismo normal. Os danos oxidativos induzidos nas células e tecidos têm sido relacionados com a etiologia de doenças, incluindo a aterosclerose. Essa relação parte do pressuposto que a modificação oxidativa da lipoproteína de baixa densidade (LDL) é a responsável pelo início do processo inflamatório no desenvolvimento da aterosclerose. Assim, a LDL em seu estado nativo não apresenta propriedades aterogênicas, sendo necessária a modificação oxidativa dessa lipoproteína, oriunda do desequilíbrio do processo de oxi-redução, para que ela se torne altamente lesiva ao endotélio vascular.<sup>8</sup>

Neste estudo, o extrato de açaí liofilizado obtido dos frutos da palmeira Juçara, ricos em antocianinas e polifenóis, será adicionado à dieta de um

modelo para desenvolvimento da aterosclerose (ApoE -/-), e será avaliada a atuação desta dieta quanto a expressão das enzimas envolvidas nos processos antioxidantes “*in vivo*” (catalase e superóxido dismutase) e na evolução das placas ateroscleróticas destes mesmos animais.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. O açaí

O açaí é uma bebida obtida a partir da polpa dos frutos das palmeiras do gênero *Euterpe*<sup>9</sup>. Na região amazônica o açaí é obtido a partir da polpa dos frutos do açazeiro (*Euterpe oleracea* Martius) e do açazeiro da terra firme (*Euterpe precatoria* Martius). Na região da Mata Atlântica, pode-se obter o açaí a partir dos frutos do palmitreiro ou juçara (*Euterpe edulis* Martius).<sup>9</sup>

O Brasil se posiciona como o maior produtor, consumidor e exportador de açaí do mundo. O Pará é o maior produtor nacional de frutos representando quase 90% da produção brasileira. O único estado fora da região Norte que figura nas estatísticas oficiais é o Maranhão. Na última década a produção brasileira alcançou mais de 100.000 toneladas por ano, movimentando mais de 100 milhões de reais anuais<sup>10</sup>. A produção de açaí de *E. edulis* em estados extra-amazônicos não figura nas estatísticas do IBGE.

A demanda de açaí em nível nacional cresceu muito a partir dos anos 90. Este mercado alavancou devido à descoberta do açaí pelo público jovem de classe média a alta do Brasil extra-amazônico, na busca de um alimento exótico, altamente energético, consumido geralmente junto com outras frutas, guaraná e granola. No mercado nacional o açaí é transformado em sorvetes, doces, bolos, pudins, vinho e outros pratos da culinária. A exportação para os Estados Unidos e Europa demonstra um mercado aberto aos produtos naturais como componentes da receita de saúde.

Desta forma, ganha suma importância a preservação dos palmitreiros produtores que, apesar do grande mercado consumidor, tem a espécie *Euterpe edulis* ameaçada de extinção.

## 2.2 *Euterpe edulis martius*

*Euterpe edulis* Martius é uma palmeira ativa e endêmica da Mata Atlântica (figura 1) que ocorre desde o Rio Grande do Sul até a Bahia, com distribuição principal na orla Atlântica. Ocorre também no Norte da Argentina e Leste do Paraguai<sup>11</sup>. A palmeira é formada por uma densa copa, com um conjunto de grandes folhas e bainhas verdes, de alto valor econômico devido à extração do palmito, sofrendo em virtude disto intenso extrativismo, o que vem comprometendo sua regeneração natural<sup>12</sup>. Pode alcançar 20 metros de altura, possuindo estipe único, sem rebrotamento da base. O corte da palmeira não permite rebrota<sup>13</sup>. Espécie ombrófila, discretamente higrófila. Atualmente a *E. Edulis* é uma espécie de palmeira ameaçada de extinção<sup>14</sup>. Desde a chegada dos primeiros colonizadores a exploração dos recursos (fauna e flora) encontrados na Mata Atlântica têm sido extrativista, sem considerar a conservação das espécies ou dos habitats<sup>15</sup>. Desta forma, a Mata Atlântica perdeu mais de 93% de sua área, restando em torno de 100.000 km<sup>2</sup> de vegetação remanescente. Os sucessivos ciclos econômicos e a contínua expansão da população humana comprometeram a integração ecológica deste ecossistema<sup>16</sup>. Esta tendência tem provocado uma busca por alternativas para expor o uso da terra, proporcionando valor econômico e ecológico das florestas remanescentes. Produtos florestais não-madeireiros podem fornecer uma base para melhorar a conservação das áreas remanescentes florestais, e ao mesmo tempo proporcionar uma contínua fonte de renda para pequenos proprietários de terra. Os frutos da *E. edulis* pode ser incluída entre os produtos florestais não-madeireiros capazes de equilibrar o manejo ecológico com o valor econômico do produto.

Popularmente conhecida como palmeira Juçara ou palmito doce, produz grande quantidade de frutos, através das ráquias com inserção subfoliar (situada na base do palmito). Os frutos maduros adquirem a coloração preta e desprendem-se da infrutescência. No contexto ecológico a espécie tem importância significativa na floresta ombrófila densa por desempenhar papel fundamental na dieta alimentar de herbívoros vertebrados e invertebrados, podendo ser considerada como espécie-chave pois, seus frutos ficam maduros em uma época de escassez geral de alimentos<sup>17</sup>. Seu fruto é conhecido como

açaí da Mata Atlântica ou açaí do Sul, sendo diferente portanto, do açaí do norte que é da espécie de palmeira *Euterpe oleraceae* Martius.



Figura 1 - Palmeira *Euterpe edulis* Martius - palmeira Juçara, encontrada na Mata Atlântica

### 2.3 O fruto

Os frutos são carnosos, fibrosos, com endosperma muito abundante e não ruminado<sup>18</sup>. O padrão de floração e frutificação do palmitreiro *E. edulis* inicia no final da estação de seca (agosto) e se concentra nos meses de outubro e novembro. A maturação dos frutos ocorre nos meses de maio e junho e se estende até novembro.<sup>19</sup>

O processo reprodutivo inicia em torno dos seis anos a partir do plantio. A frutificação em geral é abundante, podendo as palmeiras em condições favoráveis, produzir 216 a 528 cachos/hectare e de 6 a 8 kg de frutos por ano, o que equivale entre 8.000 e 10.000 sementes ou média de 5 kg.<sup>20</sup>

Os frutos da palmeira Juçara apresentam coloração roxa intensa quando estão maduros, devido à presença de pigmentos de antocianinas.

## **2.4 Antocianinas e seu efeito protetor**

Antocianinas (do grego “anthos” que significa flor e “kianos” que significa azul) são pigmentos vegetais importantes, pertencentes à classe de compostos fenólicos chamados coletivamente de flavonóides.<sup>21</sup> Elas pertencem a categoria de metabólitos secundários, estando presentes em frutos com espectro de cor que varia do vermelho ao azul, hortaliças escuras e cascas de uvas escuras.<sup>22</sup> A função mais importante das antocianinas nas plantas é a sua capacidade de conferir cor em produtos vegetais que elas ocorrem. Desta forma, desempenham um importante papel na atração de animais para polinização e dispersão de sementes. Juntamente com outros flavonóides, desempenham papel na resistência de plantas ao ataque de pragas podendo agir como antioxidantes, fitoalexinas ou como agentes antibacterianos. A estrutura fenólica das antocianinas confere atividade antioxidante através de doação ou transferência de elétrons dos átomos de hidrogênio. Vários estudos têm demonstrado os efeitos na saúde, por suas propriedades antioxidantes,<sup>23, 24, 25, 32</sup> com um significativo papel na prevenção de várias doenças.

Células e tecidos estão constantemente sofrendo agressões devido à ação de radicais livres e espécies reativas do oxigênio, os quais são produzidos durante o metabolismo normal de oxigênio ou são induzidos por danos exógenos. Quando a produção de radicais livres excede a capacidade antioxidante, as espécies radicalares atacam lipídios, proteínas e DNA. Assim, a integridade estrutural e função das membranas celulares, enzimas e material genético fica desestabilizado.<sup>26, 27</sup> Estudos sugerem que um consumo elevado de alimentos ricos em antioxidantes naturais, aumenta a capacidade antioxidante do plasma e reduz o risco de alguns tipos de câncer, doenças cardíacas e acidente vascular cerebral.<sup>3, 27, 28</sup>

## **2.5 Estrutura química e propriedade antioxidante das antocianinas**

As antocianinas são glicosídeos de derivados polihidroxi e polimetoxi de 2-fenilbenzopirílio ou íon flavílico. São componentes do grupo dos flavonóides. São moléculas polares, em função dos grupos substituintes polares (hidroxilas, hidrogênio e metoxilas) e glicosilas ligados aos anéis aromáticos. Com isso, são solúveis em água. Na natureza, encontram-se associadas a moléculas de açúcares e quando livres destes açúcares são denominadas antocianidinas ou



agliconas (figura 2), sendo estas raramente encontradas em material fresco de plantas. Esta forma livre é quimicamente mais instável que a heterosídica. Existem mais de 17 tipos de agliconas na natureza mas apenas seis delas têm distribuição mais frequente, sendo elas: cianidina, delphinidina, petunidina, peonidina, pelargonidina e malvidina (tabela 1). Mais de 600 ocorrências naturais de antocianinas já foram relatadas<sup>29</sup>. Os açúcares mais comuns presentes na antocianinas são glicose, galactose, ramnose, xilose e arabinose. O número de açúcares na estrutura pode variar, assim como sua posição de ligação na molécula<sup>30</sup>. Portanto, a ocorrência primária na natureza das antocianinas é na forma glicosídica ou acilglicosídica com a respectiva antocianidina aglicona.

As antocianinas são compostos reativos devido ao seu estado iônico, apresentando também uma grande sensibilidade a mudanças de temperatura e pH. São doadores efetivos de hidrogênio. Sua capacidade antioxidante é regulada por diferenças na estrutura química. Variando a posição e os grupos químicos nos anéis aromáticos, a capacidade de aceitar elétrons desemparelhados das moléculas de radicais livres também varia.<sup>27</sup> O potencial antioxidante das antocianinas também é dependente do número e posição dos grupos hidroxilas e sua conjugação, assim como da presença de elétrons doadores no anel da estrutura, devido a capacidade que o grupo aromático possui de suportar o desemparelhamento de elétrons.<sup>4</sup>

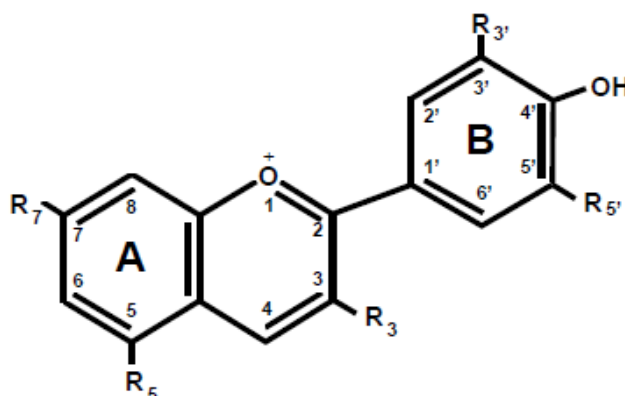


Figura 2 - Estrutura molecular das antocianidinas ou agliconas

Tabela 1 - Antocianidinas e seus grupos substituintes.

Nome	Grupos substituintes							Cor
	3	5	6	7	3'	4'	5'	
Apigenidina (Ap)	H	OH	H	OH	H	OH	H	Laranja
Aurantidinina (Au)	OH	OH	OH	OH	H	OH	H	Laranja
Capesinidina (Cp)	OH	OMe	H	OH	OMe	OH	OMe	Violeta
Cianidina (Cy)	OH	OH	H	OH	OH	OH	H	Vermelho alaranjado
Delfinidina (Dp)	OH	OH	H	OH	OH	OH	OH	Violeta
Europinidina (Eu)	OH	OMe	H	OH	OMe	OH	OH	Violeta
Hirsutinidina (Hs)	OH	OH	H	OMe	OMe	OH	OMe	Violeta
6-Hidroxicianidina (6 OHCy)	OH	OH	OH	OH	OH	H	-	Vermelho
Luteonidina (Lt)	H	OH	H	OH	OH	OH	H	Laranja
Malvidina (Mv)	OH	OH	H	OH	OMe	OH	OMe	Violeta
5-Metilcianidina (5-MCy)	OH	OMe	H	OH	OH	H	-	Vermelho alaranjado
Pelargonidina (Pg)	OH	OH	H	OH	H	OH	H	Laranja
Peonidina (Pn)	OH	OH	H	OH	OMe	OH	H	Vermelho alaranjado
Petunidina (Pt)	OH	OH	H	OH	OMe	OH	OH	Violeta
Pulchelidina (Pl)	OH	OMe	H	OH	OH	OH	OH	Violeta
Rosi	OH	OH	H	OMe	OMe	OH	H	Vermelho
Tricetinidina (Tr)	H	OH	H	OH	OH	OH	OH	Vermelho

Radicais livres podem atrair mediadores inflamatórios, contribuindo para uma resposta inflamatória generalizada e dano tecidual.<sup>32</sup> Como em sua maioria são derivados do metabolismo do O<sub>2</sub>, podemos utilizar a expressão “espécies reativas de oxigênio” (ERO). Em condições fisiológicas do metabolismo celular aeróbio, o O<sub>2</sub> sofre redução tetravalente, com aceitação de quatro elétrons, resultando na formação de H<sub>2</sub>O. Durante esse processo são formados intermediários reativos, como os radicais superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), hidroperoxila (HO<sub>2</sub><sup>·</sup>) e hidroxila (OH<sup>·</sup>), e o peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Normalmente, a redução completa do O<sub>2</sub> ocorre na mitocôndria, e a reatividade destas espécies é neutralizada com a entrada dos quatro elétrons.<sup>31</sup> Como elementos de combate a oxidação, o organismo conta com as enzimas superóxido dismutase, glutathione peroxidase, catalase e compostos antioxidantes como ácido ascórbico, tocoferóis, e carotenóides. Quando a produção dos radicais excede a capacidade antioxidante do organismo, estas espécies de radicais atacam lipídios, proteínas e DNA, desestabilizando a integridade estrutural e função das membranas celulares, enzimas e material genético<sup>32</sup>. O aumento da produção de espécies reativas de oxigênio resulta em consumo dos componentes endógenos antioxidantes, podendo a antocianina ter efeito aditivo a capacidade carreadora dos radicais. Banerjee *et*

*al.*<sup>33</sup>, avaliaram a capacidade antioxidante da casca de ameixa preta, rica em antocianinas, e concluíram que o extrato desta casca confere proteção contra o radical hidroxil, espécie de oxigênio mais reativa, encontrando também efetividade contra o radical superóxido.

## 2.6 Estudos da ação antioxidante das antocianinas

O estudo da atividade antioxidante em alimentos tem confirmado a capacidade sequestradora de radicais livres das antocianinas. A cianidina 3-malonilglicosídeo, identificado como um dos principais compostos fenólicos em folhas de alface vermelha (*Lactuca sativa* L), demonstrou uma atividade captadora do radical alquilperoxil.<sup>34</sup> Outras diferentes cianidinas glicosídicas de leguminosas, demonstraram atividade que consiste na captura de radicais peroxil.<sup>35</sup> As cianidinas da batata ipomoera do cultivar Ayamurasaki, têm uma forte atividade seqüestradora de radicais livres tanto *in vitro* quanto *in vivo*.<sup>36</sup> Entre os polifenóis de diferentes variedades de ameixas a antocianina foi a seqüestradora mais significativa contra o radical superóxido.<sup>37</sup>

Muitos produtos polifenólicos têm considerável habilidade antioxidante “*in vitro*” e “*in vivo*”. Isto é devido à facilidade com que um átomo de hidrogênio de um grupo hidroxil aromático de polifenóis pode ser doado a um radical livre.<sup>38</sup> Existe evidência que a forma aglicona (antocianidina) tem maior efetividade antioxidante do que a forma heterosídica (antocianina) e o número de resíduos de açúcar na posição C3 podem ser muito importantes para o desempenho da atividade antioxidante, que diminuiria com o aumento do número de unidades de açúcar em C3.<sup>39</sup> A utilidade das antocianinas e antocianidinas no tratamento de patologias, onde a produção de radicais livres desempenha um papel fundamental, tem sido sugerido, com o objetivo de estabelecer a sua atividade antioxidante em diferentes condições experimentais.

Acquaviva *et al.*<sup>40</sup> demonstraram que existe dose-dependência da cianidina para a atividade de sequestro dos radicais livres, inibição da xantina oxidase e um efeito protetor do DNA. Em outro estudo,<sup>41</sup> foi demonstrado a eficácia da cianidina-3-glucosídeo, principal antocianina da amora preta, como sequestrador de peroxinitrito, sendo capaz de exercer um efeito protetor contra a disfunção endotelial “*in vitro*” e a insuficiência vascular induzida pelo

peroxinitrito testado em células de veia umbilical humanas. Células humanas de veia umbilical são utilizadas como modelo para estudo de mecanismos envolvidos na patogênese de doenças cardiovasculares e foram utilizadas no trabalho de Chen *et al.*<sup>42</sup>, onde avaliaram a ação antioxidante da delphinidina sobre o estresse envolvido na LDL oxidada, medida com a atividade da superóxido dismutase, malondialdeído (MDA) e nível de Óxido Nítrico (NO). Os autores concluíram que a delphinidina foi efetiva na proteção para das células endoteliais humanas de veia umbilical contra o estresse oxidativo induzido pela LDL oxidada.

Pawlowicz *et al.*<sup>43</sup> determinaram a influência das antocianinas de *chokeberries* na produção de auto-anticorpos para oxidar lipoproteínas de baixa densidade em gestação complicada por retardo do crescimento intrauterino. O experimento foi conduzido com um grupo de estudo de 105 mulheres gestantes, no término do segundo trimestre, com resultados de exames ecográficos abaixo do percentil 5 para a idade gestacional real e divididas em dois grupos aleatoriamente. A antocianina foi administrada para um grupo de 50 mulheres e o outro grupo com 55 gestantes recebeu placebo. Havia um grupo controle com gestantes saudáveis de 60 mulheres. Sendo assim, eles examinaram o nível do estresse oxidativo medido pela concentração de auto-anticorpos necessários para oxidar lipoproteínas de baixa densidade (oLDL). No grupo da antocianina, o teor de oLDL diminuiu de  $1104 \pm 41$  mU/mL, antes do tratamento, para  $752 \pm 36$  mU/mL no primeiro mês, e  $726 \pm 35$  mU/mL no segundo mês, com um  $P < 0.01$ . No grupo placebo, os teores de oLDL mostraram uma tendência de aumento com  $1089 \pm 37$  mU/mL antes do tratamento,  $1092 \pm 42$  mU/mL no primeiro mês, e  $1115 \pm 43$  mU/mL no segundo mês, com  $P > 0.05$ . O título de oLBD no grupo controle foi  $601 \pm 49$  mU/mL antes do tratamento,  $606 \pm 45$  mU/mL no primeiro mês, e  $614 \pm 43$  mU/mL no segundo mês, com  $P > 0.05$ . Os resultados indicaram que as antocianinas, antioxidantes naturais, podem ser úteis no controle do estresse oxidativo em gestação complicada por retardo do crescimento intrauterino.

Um estudo<sup>44</sup> sobre a atividade antioxidante das frações de antocianinas de vinho tinto italiano, mostrou eficácia na eliminação das EROs, na oxidação de lipoproteínas e inibição à agregação plaquetária. Este resultado sugere que as antocianinas são os elementos protetores contra doenças cardiovasculares.

Outro estudo, Gorelik *et al.*<sup>45</sup> relataram que os polifenóis do vinho inibem a absorção de produtos de peroxidação lipídica que por sua vez inibem o estresse oxidativo celular.

Garcia-Alonso *et al.*<sup>46</sup> estudaram a biodisponibilidade de antocianinas de uvas escuras através do extrato de vinho tinto e verificaram a sua capacidade antioxidante no plasma e as condições da proteína quimiotática de monócitos (MCP-1). Caracterizaram o extrato e encontraram 71,2% de antocianina monoglucosídica, 23,8% de antocianina acilada e 5,0% de piranoantocianina. As antocianinas inibiram a atividade do TNF-alfa induzida pelas MCP-1 em cultura de células endoteliais e endoteliomas, concluindo que o papel das antocianinas como antioxidante e reguladores de MCP-1 contribuindo significativamente para os efeitos antiaterogênicos.

Duthie *et al.*<sup>47</sup> investigaram a consequência da deficiência da vitamina E sobre o dano oxidativo ao DNA e lipídios e o efeito protetor da cianidina 3-glicosídeo, 100mg/kg durante 12 semanas, utilizando ratos e colonócitos humanos. A cianidina 3-glicosídeo protegeu o DNA contra danos oxidativos, não alterou a peroxidação lipídica ou danificou o DNA de ratos.

No estudo de Hogan *et al.*<sup>48</sup> utilizou-se um extrato rico de antocianinas proveniente do açaí (*Euterpe oleracea*), e investigaram as propriedades antioxidantes e atividades antiproliferativas de células de glioma cerebral de ratos e células humanas de câncer de mama. Foi confirmada a excepcional fonte de antioxidantes naturais dosados através de DPPH, suprimindo a proliferação de células de glioma cerebral de ratos, mas sem efeito sobre o crescimento em células humanas de câncer de mama.

Tsuda *et al.*<sup>26</sup> avaliaram o efeito de uma dieta com cianidina 3-glicosídeo em lesão de isquemia-reperfusão em fígado de ratos, num modelo de estresse oxidativo, como um antioxidante in vivo. Durante 14 dias, um grupo de ratos foi alimentado com uma dieta controle e um outro grupo foi alimentado com 0,2% de cianidina 3-glicosídeo junto com a dieta controle. Após uma clampagem da artéria hepática, veia porta e ducto biliar durante 15 minutos, deixou-se reperfundir o tecido hepático com tempos de 1 e 4 horas. Foi determinado nos tempos de reperfusão: peroxidação lipídica do fígado e sangue, atividade de enzimas antioxidante e marcadores hepáticos como as aminotransferases. Encontrou-se que a peroxidação lipídica diminuiu no fígado

e sangue quando comparados com o grupo controle, as atividades das enzimas antioxidante foram otimizadas com a presença de cianidina 3-glucosídeo na dieta mas sem diferença estatística com o grupo controle, e as aminotransferases e LDH diminuíram significativamente no grupo com a cianidina indicando proteção após a lesão de isquemia/reperfusão. Foi concluído que a cianidina 3-glucosídeo atuou como antioxidante e suprimiu a lesão induzida por isquemia/reperfusão no fígado induzida pelo dano oxidativo.

Russo *et al.*<sup>49</sup> utilizando a cianidina-3-glicosídeo, realizaram um estudo com fibroblastos humanos, “in vitro”, com uma redução significativa da produção de espécies de radicais livres e impedimento dos danos no DNA genômico, após a indução com uma micotoxina produzida pelo *Aspergillus ochraceus*, com propriedades carcinogênicas, nefrotóxicas e teratogênicas em humanos e animais. Um outro estudo<sup>50</sup> abordou a inibição do proteossoma como um outro mecanismo pelo qual às antocianinas e suas agliconas podem exercer efeitos de promoção da saúde. A atividade do proteossoma controla a degradação de proteínas celulares implicando a transdução do sinal, desenvolvimento, progressão do ciclo celular, processo antigênico e inflamação, oferecendo uma proteção maior para o estresse oxidativo. Foram incubadas em culturas celulares HL-60, 19 substâncias antocianínicas e a quimiotripsina, sendo determinada a inibição da atividade enzimática. Assim, a atividade inibidora do proteossoma pelas antocianinas pôde contribuir para a ação anticarcinogênica, antioxidante, antiinflamatória e neuroprotetora.

A cianidina isolada do extrato do mirtilo, teve um efeito protetor contra doenças oculares pela atividade antioxidante a partir da fotooxidação do A2E, que é um pigmento auto-fluorescente acumulativo em células do epitélio da retina com o passar dos anos, e em alguns distúrbios da retina.<sup>51</sup>

Um estudo<sup>52</sup> avaliou uma planta de jardim, *Hibiscus sabdariffa* L, que contém uma grande quantidade de pigmentos de antocianina e demonstrou inibir a oxidação da LDL e a progressão da aterosclerose mesmo com níveis elevados de colesterol na dieta de coelhos. Ainda foi avaliado o efeito de extratos de antocianinas na formação na célula espumosa a expressão do gene de receptor scavenger, CD36 e seu fator de transcrição sobre as células J774A.1 de macrófagos de ratos. O tratamento das células com extrato-rico de antocianinas (0.05-0.2 mg/mL) evitou o acúmulo de lipídeos, diminuiu a

formação de células espumosas e a expressão da CD36 encontrada, foi diminuída nos níveis do RNAm e da proteína, comprovando que os pigmentos de antocianinas do *Habiscus sabdariffa* tem ação antioxidante. A bioatividade antioxidante do *Habiscus* foi estudada por Wang *et al.*<sup>53</sup> e verificaram que houve diminuição significativa do extravazamento da lactato desidrogenase (LDH) e a formação de malondialdeído (MDA) induzida por um tratamento de terc-butil hidroxiperoxido (t-BHP). A investigação *in vivo* mostrou que o pré-tratamento oral com a antocianina da *Habiscus*, antes de uma dose simples de t-BHP, diminuiu significativamente os níveis séricos dos marcadores enzimáticos hepáticos (aminotransferases) e reduziu a lesão oxidativa hepática. A avaliação histopatológica do fígado revelou que houve redução da incidência de lesões no fígado, incluindo inflamação, infiltração de leucócitos e necrose induzida pelo t-BHP em ratos.

## 2.7 Extração das antocianinas

O crescente interesse pela utilização de elementos naturais na alimentação em substituição aos artificiais tem levado à vários métodos de extração de compostos bioativos. O método de extração, bem como a escolha do solvente a ser utilizado na extração de antocianinas, se torna importante no teor desses compostos presentes no extrato.

O grau de extração das antocianinas depende de uma série de fatores, entre eles da relação volume de solvente/massa de matéria-prima, do tipo de solvente empregado (etanol, metanol, água) e do agente acidulante (ácido clorídrico, ácido cítrico, fórmico, acético, tartárico)

Vários fatores influenciam a estabilidade das antocianinas como a estrutura química, o pH, a temperatura, a luz, presença de oxigênio e degradação enzimática.<sup>54</sup> As antocianinas, dependendo do grau de acidez ou alcalinidade, adotam diferentes estruturas químicas em meio aquoso. Cada uma destas estruturas apresenta, na região do visível, um espectro de absorção característico (figura 3). Em meio ácido, a 25°C, quatro estruturas coexistem em equilíbrio: flavilium (AH), a base quinoidal (A), a pseudo-base ou carbinol (B) e a chalcona (C). As estruturas responsáveis pela coloração das antocianinas são o cátion flavilium e a base quinoidal, sendo o carbinol e a chalcona incolores.

O principal método empregado para obter o extrato bruto consiste em tratar a matéria-prima com metanol acidificado com HCl. No entanto, para alimentos, o emprego do etanol deve ser preferido devido a menor toxicidade em relação ao metanol, embora a extração com metanol seja mais eficiente.<sup>54</sup>

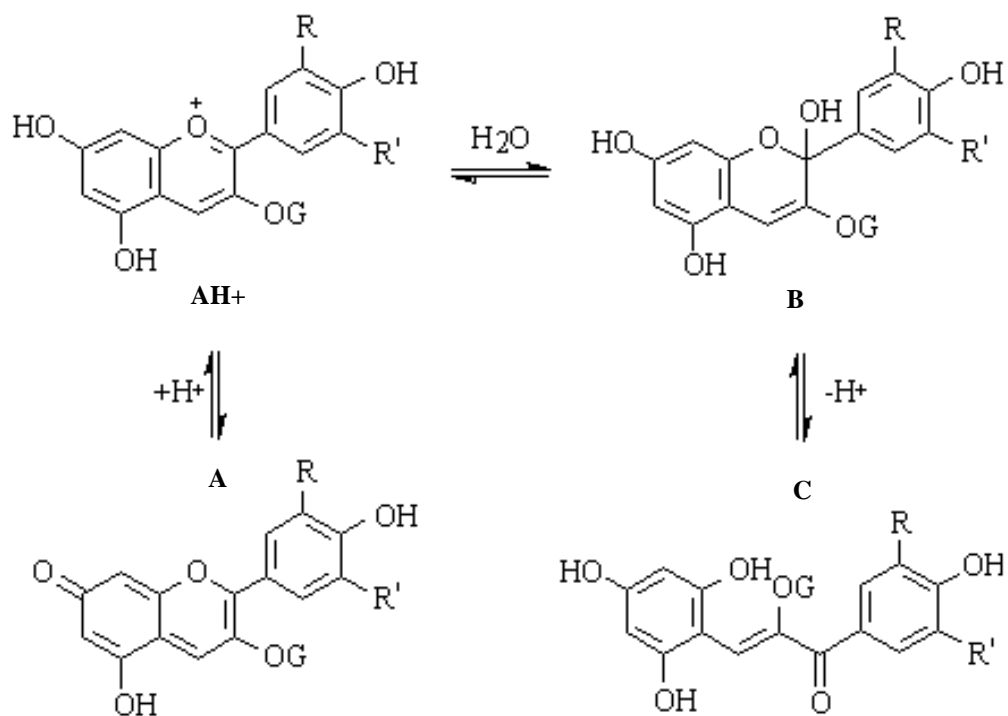


Figura 3 - Estruturas em equilíbrio das antocianinas em meio aquoso.

## 2.8 Aterosclerose

A aterosclerose pode ser definida como um processo inflamatório crônico e degenerativo que acomete as grandes e médias artérias, sendo caracterizada pelo acúmulo, no espaço subendotelial da íntima, de lipídeos, células inflamatórias e elementos fibrosos. A aterosclerose pode se desenvolver em qualquer artéria, porém os vasos sanguíneos mais comumente afetados e de relevância clínica incluem a aorta e as artérias coronárias, carótidas e cerebrais<sup>55</sup>. As células endoteliais situadas em regiões tubulares, onde o fluxo sanguíneo permanece uniforme e laminar, apresentam formas elípticas e alinhadas na direção do fluxo. Já as células situadas em regiões de bifurcação e curvatura, onde o fluxo é turbulento, apresentam formas poligonais e sem orientação, contribuindo para um aumento na permeabilidade à lipoproteína de baixa densidade (LDL), tornando-se, assim, locais de



preferência para a formação das lesões ateroscleróticas<sup>55</sup>. Apesar das características hemodinâmicas terem um papel importante na localização das lesões, elas por si só não são suficientes para a gênese da aterosclerose<sup>56</sup>.

Os estudos desta patologia investigam a hipótese oxidativa como precursora do processo aterosclerótico. Essa hipótese afirma que a modificação oxidativa da LDL é a característica fundamental para o desenvolvimento da aterosclerose. Assim, de acordo com essa hipótese, a LDL em seu estado nativo não apresenta propriedades aterogênicas, sendo necessária a modificação oxidativa dessa lipoproteína para que ela se torne altamente lesiva ao endotélio vascular.<sup>8</sup>

A disfunção endotelial é considerada o fator inicial na aterogênese e caracteriza-se por uma resposta inflamatória da parede vascular à injúria. Um conjunto de reações celulares e moleculares a diversos agressores, dentre eles o ataque dos radicais livres, a elevação das partículas de LDL no plasma e a presença de LDL oxidada (LDL<sub>ox</sub>) na parede arterial são responsáveis pelo comprometimento do endotélio.<sup>57</sup>

A oxidação da LDL ocorre em pequena proporção ainda na circulação sendo continuada após a entrada da LDL na íntima das artérias, em ambiente pró-oxidante. As partículas responsáveis por esta oxidação da LDL são os radicais livres que podem ser as espécies reativas de oxigênio (EROs) e as espécies reativas de nitrogênio (ERNs). As EROs incluem o ânion superóxido ( $O_2^-$ ), o radical hidroxil ( $OH\cdot$ ) e o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e os representantes principais das ERNs são o óxido nítrico ( $NO\cdot$ ) e o peroxinitrito ( $ONO_2\cdot$ ).<sup>58</sup>

As partículas de LDL difundem-se passivamente através das células endoteliais por transporte vesicular, o qual não requer receptores. Após, elas aderem à parede do vaso por interações entre a apoproteína B, presente na sua estrutura, e os proteoglicanos da matriz subendotelial.<sup>55</sup>

Retidas na íntima, a LDL sofre modificações oxidativas, que parecem ocorrer em dois estágios. O primeiro, antes que os monócitos sejam ativados, resulta na oxidação dos lipídios da LDL, com pequena alteração na apoproteína B, resultando na LDL minimamente oxidada (MM-LDL-OX). A MM-LDL-OX estimula as células endoteliais a produzirem moléculas aterogênicas e pró-inflamatórias, como a proteína quimiotática para monócitos 1 (MCP-1), que

promove a quimiotaxia de monócitos e linfócitos T para o espaço subendotelial; moléculas de adesão e o fator estimulante de colônias de monócitos (M-CSF), que ativa a diferenciação de monócitos em macrófagos.<sup>59</sup> O segundo estágio de oxidação da LDL, formando a LDL oxidada, ocorre quando monócitos são recrutados para a lesão e convertidos em macrófagos, contribuindo com sua enorme capacidade oxidativa. Nesta fase, os lipídios da LDL são adicionalmente oxidados e a parte protéica também é modificada, impedindo o reconhecimento da lipoproteína pelo receptor de LDL, tornando-a reconhecível apenas pelos receptores *scavengers* (removedores) presentes nos macrófagos e células musculares lisas.<sup>60</sup>

Dentro dos macrófagos, a LDLox é degradada, o colesterol livre é esterificado, conferindo às células o aspecto de espuma. O resultado é o grande acúmulo de colesterol e a formação de células espumosas, originando a primeira lesão da aterosclerose: a estria gordurosa.<sup>61</sup>

Posteriormente, as células musculares lisas começam a migrar da camada média da parede arterial para a íntima ou espaço subendotelial, se 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, entre outros, as células do sistema imune local liberam enzimas, citocinas e fatores de crescimento que podem induzir necrose focal. 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.<sup>59</sup>

As lesões avançadas estáveis são mais resistentes à ruptura e se caracterizam por células musculares lisas envoltas de densa matriz de colágeno, com baixo conteúdo de células inflamatórias e de lipídios no centro necrótico. Por outro lado, as regiões onde as lesões apresentam volumoso centro necrótico e um grande infiltrado de células espumosas, capa fibrosa frágil e fina, com pouca quantidade de colágeno, são mais susceptíveis à ruptura, caracterizando lesões instáveis.<sup>62</sup>

A ruptura da capa fibrosa expõe substâncias trombogênicas, levando à formação de um trombo sobrejacente. Este processo, também conhecido por aterotrombose, é um dos principais determinantes das manifestações clínicas da aterosclerose.<sup>63</sup>

A LDLox participa de todas as etapas do processo de aterosclerose, desde a disfunção endotelial até a promoção da vulnerabilidade das placas ateroscleróticas.<sup>57</sup> Além dos seus efeitos biológicos citados, produtos derivados da LDLox são citotóxicos, podendo promover a apoptose celular. Em adição, a LDLox também contribui para o processo inflamatório na aterosclerose por inibir a produção de óxido nítrico, que é um vasodilatador, e por estimular a produção de citocinas, como a interleucina-1, e aumentar a agregação plaquetária.<sup>58</sup>

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, cujo envolvimento na patogênese da aterosclerose tem sido documentado, como citocinas, quimiocinas, moléculas de adesão, proteínas de fase aguda, reguladores da apoptose e da proliferação celular.<sup>64</sup> A indução à inflamação promovida pela LDLox parece ser decorrente da ativação dessa via pelos seus fosfolipídios oxidados, como a lisolecitina e o ácido lisofosfatídico.<sup>65</sup>

A LDLox são também imunogênicas, anticorpos a determinados epitopos (determinantes antigênicos) de LDLox são encontrado no plasma e em lesões associadas a imuno-complexos. Assim, há tanto uma resposta humoral como imunogênica mediada por células, típico de um processo inflamatório.<sup>66</sup>

## **2.9 Estudos das antocianinas na prevenção da aterosclerose**

Os antioxidantes, entre eles os flavonóides como as antocianinas, presentes na dieta podem potencialmente estar envolvidos na prevenção da aterosclerose por inibirem a oxidação da LDL, diminuindo sua aterogenicidade e, conseqüentemente, o risco de doença arterial coronariana<sup>67</sup>.

Um estudo recente<sup>68</sup> investigou o efeito da suplementação de antocianina nos níveis séricos de lipídeos, da proteína de transferência do colesterol esterificado no plasma (CETP), da enzima hepática lecitina colesterol aciltransferase (LCAT) e na capacidade de efluxo do colesterol do soro em 60

indivíduos (40-65 anos) com dislipidemia. Parte dos indivíduos recebeu cápsulas com antocianina (80mg x 4/dia) e o restante consumiu placebo por 12 semanas. A suplementação com antocianina diminuiu significativamente os níveis de LDL (13,63%,  $p$  0,037) e aumentou as concentrações de HDL (12,42%,  $p$  0,024). A massa e a atividade da CETP no plasma diminuíram significativamente em 14,34% e 5,13%, respectivamente; não havendo mudança significativa nos níveis séricos de LCAT no grupo que recebeu as cápsulas de antocianina. O efluxo de colesterol do soro aumentou em 12,09% ( $p$  0,040) após o consumo de antocianina, comparado com o grupo que recebeu placebo. Não houve diferença significativa nas concentrações séricas de colesterol total, triglicerídeos, glicose, apoproteína AI e apoproteína B e ácidos graxos livres entre os grupos.

Um estudo<sup>69</sup> avaliou a ação da antocianina na dose de 40 e 80mg em ratos Wistar com hiperlipidemia induzida por Triton e obtiveram como resultado uma diminuição significativa de 31,6% ( $p < 0,05$ ) nos níveis séricos de colesterol total com o uso da antocianina misturada à dieta dos animais. Outro estudo<sup>70</sup> avaliou o efeito da biochanina A isolada e em associação com os corantes naturais antocianina e carmim sobre o metabolismo lipídico de ratos Wistar com hiperlipidemia induzida por Triton. Todas as substâncias foram testadas na dose de 5mg/Kg de peso corporal. O tratamento com antocianina reduziu significativamente ( $p < 0,05$ ) os níveis séricos de colesterol total e triglicerídeos em 42,93% e 37,12%, respectivamente, comparado ao grupo de animais hiperlipidêmicos. Os melhores resultados foram alcançados com a associação biochanina A e antocianina, a qual reduziu em 64,85% e 76,10% os níveis de colesterol total e triglicerídeos, respectivamente, indicando um efeito sinérgico destes flavonóides.

## **2.10 Sinvastatina**

Estatinas são amplamente prescritos para diminuir o nível de colesterol no plasma, com eficácia comprovada em seres humanos, inibindo a 3-hidroxi-3-metilglutaril (HMG) Coenzima A (CoA) redutase, sendo esta enzima limitante da biossíntese do colesterol. A Sinvastatina está inclusa entre as estatinas com resultados clinicamente relevantes com ação hipocolesterolemiantes. O efeito das estatinas resulta de uma maior captação hepática de LDL através da

expressão de receptores para esta lipoproteína e da redução da biosíntese do colesterol endógeno.<sup>71,72</sup>

As estatinas têm sido utilizadas para retardar a progressão da aterosclerose, melhorar a função endotelial, reduzir marcadores inflamatórios sistêmicos, e reduzir a morbidade e mortalidade cardiovascular.<sup>73</sup> A abordagem com os modelos animais de aterosclerose, que podem responder a tratamentos com estatinas, são fundamentais para a pesquisa desta patologia.

### **2.11 Modelo experimental e camundongos ApoE -/-**

Devido às grandes dificuldades em estudar os mecanismos patogênicos da aterosclerose em humanos, torna-se fundamental a presença de um modelo experimental bem caracterizado para esta patologia.

Os camundongos selvagens (C57Bl6) são altamente resistentes ao desenvolvimento de aterosclerose. Em resposta a uma dieta com baixos níveis de lipídeos e colesterol, estes camundongos apresentam baixos níveis plasmáticos de colesterol em VLDL e LDL e a maioria do colesterol está na fração de HDL, explicando então a resistência desses animais ao desenvolvimento da aterosclerose. A HDL nos camundongos é responsável pelo transporte de mais de 85% do colesterol plasmático, enquanto que em humanos a principal lipoproteína transportadora de colesterol é a LDL (65-85%)<sup>74</sup>.

Apesar destas diferenças, os camundongos possuem, com poucas exceções, o mesmo conjunto de genes que controlam o metabolismo de lipoproteínas em seres humanos, e diante de facilidades como, rápida reprodução, conhecimento amplo da sua genética, formação rápida das lesões ateroscleróticas e pequeno tamanho dos animais, os camundongos emergiram, ao longo das décadas, como os melhores modelos experimentais para o estudo da aterosclerose.<sup>74</sup>

Os camundongos modificados geneticamente são gerados por modulação gênica, onde ocorre a deleção de um alelo específico responsável por codificar uma proteína com alto grau de especificidade. Esses animais são comumente referidos pelo termo coloquial de *Knockout*, sendo simbolizados por -/-. Os camundongos mais utilizados para o estudo da aterosclerose são

gerados pela modulação genética da apoE (apolipoproteína E) e do LDLR (receptor para LDL), ambos fundamentais para o metabolismo lipídico<sup>75</sup>.

A apoE é uma glicoproteína rica em arginina com peso molecular de 34 kdaltons, sintetizada principalmente no fígado e cérebro. Por ser um constituinte da superfície de lipoproteínas, principalmente VLDL, HDL e quilomícrons, a apoE desempenha um papel funcional no *clearance* das lipoproteínas plasmáticas<sup>76</sup>.

A apoE também pode ser sintetizada por monócitos e macrófagos nos vasos sanguíneos, apresentando efeitos locais na homeostase do colesterol e nas reações inflamatórias que ocorrem nos vasos ateroscleróticos, devido ao seu papel na imunomodulação, que afeta a secreção de várias citocinas<sup>77</sup>. Além disso, a apoE inibe a agregação plaquetária, exerce efeitos antiproliferativos, contribui para o efluxo de colesterol das células nas lesões ateroscleróticas e possui propriedades antioxidantes.<sup>76</sup>

Em camundongos deficientes no gene que codifica a apolipoproteína E, ocorre o desenvolvimento prematuro e espontâneo de graves lesões ateroscleróticas. As lesões encontradas nesse modelo animal experimental apresentam um caráter bastante similar com as observadas em seres humanos. Com o uso de dieta comercial, a presença de células espumosas é vista com aproximadamente 10 semanas de idade, lesões intermediárias, contendo células espumosas e células musculares lisas, são observadas com 15 semanas e placas fibrosas aparecem nos animais com 20 semanas de idade. O uso de dieta ocidental hipercolesterolêmica promove a aceleração do processo aterosclerótico nos camundongos<sup>77</sup>.

### **3. JUSTIFICATIVA DO ESTUDO**

O Brasil é um dos países com maior biodiversidade do planeta. 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, por diversos fatores, essas áreas vêm sendo rapidamente destruídas em decorrência da atividade humana.

A Mata Atlântica brasileira é um dos 34 *hotspots* mundiais, sendo esse termo atribuído a toda área considerada prioritária para conservação, havendo

alta biodiversidade associado a alto grau de endemismo e degradação. Uma grande parte da população brasileira vive nestas áreas *hotspots*, desenvolvendo atividades econômicas que necessitam da matéria-prima deste ecossistema, mediante exploração de plantas e animais silvestres para alimentação, combustível, vestuário, remédio e abrigo<sup>78</sup>.

A Mata Atlântica é provavelmente o bioma mais devastado e ameaçado do planeta. Uma longa história de exploração de recursos eliminou a maior parte desta floresta tropical, restando atualmente menos de 7% da sua extensão original.

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.

Dentre as várias substâncias presentes nos alimentos de origem vegetal, consideradas como pigmentos naturais, apresentando propriedades bioativas, capazes de reduzir o risco de diversas patologias humanas, podemos destacar as antocianinas<sup>39</sup>. As antocianinas pertencem a classe de metabólitos secundários vegetais conhecida como flavonóide e são caracterizadas por intensa atividade antioxidante. Esses produtos naturais estão envolvidos na prevenção da aterosclerose por inibirem a oxidação das lipoproteínas de baixa densidade (LDL), diminuindo sua aterogenicidade e, conseqüentemente, o risco de doença arterial coronária<sup>32</sup>.

Importantes fontes de antocianina na dieta humana são encontradas em frutas como o açaí, ameixa, amora, cereja, figo, framboesa, uva, maçã, morango e acerola e nos vegetais, como o repolho roxo, batata roxa, berinjela, etc.

A espécie *E. edulis*, da família Arecaceae, conhecida popularmente como palmeira juçara, produz um palmito comestível, o palmito branco. Por este motivo, é um dos produtos mais explorados na floresta Atlântica. No estado de Minas Gerais, a espécie encontra-se principalmente em áreas remanescentes de Mata Atlântica e tem sido alvo de grande pressão antrópica, sobretudo para a exploração do palmito. Esse fato associado a crescente perda de áreas remanescentes de Mata Atlântica, fez com a organização não governamental Fundação Biodiversitas, responsável pela elaboração da “Lista

da flora brasileira ameaçada de extinção” classificasse a espécie na categoria em “Perigo de extinção”.<sup>14</sup>

Assim, a atual forma de exploração do palmito de *E. edulis* contribui para a degradação do bioma e torna-se um fator de preocupação para a preservação da espécie, uma vez que não há rebrota após o corte para a extração do palmito. No entanto, os frutos de *E. edulis*, como no caso da espécie do mesmo gênero *E. oleracea*, conhecida como açazeiro da Amazônia, cujos seus frutos já são aproveitáveis comercialmente; podem representar boa alternativa à exploração do palmito de *E. edulis*, uma vez que para o aproveitamento dos seus frutos não se faz necessária a derrubada da árvore e suas sementes, que após o processamento da polpa, podem ser aproveitadas para a obtenção de mudas.

Para tal, é importante a realização de pesquisas que busquem avaliar o potencial nutricional e farmacológico das polpas oriundas dos frutos de *E. edulis*, de forma que esse produto possa alcançar um nível de exploração comercial.

Sabe-se, que os frutos dessa espécie possuem uma coloração roxa intensa devido a alta concentração de antocianina, superior a de outros frutos tropicais, como a acerola, o jambolão e o guajiru.<sup>7</sup>

Dessa forma, a exploração sustentável dos frutos do *E. edulis* busca não somente uma possibilidade de obtenção de um alimento funcional, mas também pode representar uma alternativa para a conservação da espécie e para o equilíbrio da cadeia alimentar da Mata Atlântica, uma vez que vários animais se alimentam dos frutos da espécie.

Dentro desse contexto de busca de novos modelos de exploração sustentável dos recursos vegetais da Mata Atlântica, que concilie desenvolvimento com conservação ambiental, o presente projeto tem como objetivo realizar avaliações da capacidade antioxidante e da atividade antiaterogênica dos frutos do *E. edulis*, de modo a obter um extrato com propriedades benéficas a saúde humana, agregando mais valor ao fruto dessa palmeira, diminuindo a exploração indiscriminada do seu palmito e a consequente degradação da espécie.



## **4. OBJETIVO GERAL**

Obter um extrato seco enriquecido de antocianinas a partir dos frutos do açaí da mata atlântica (*Euterpe edulis* Martius) e verificar o efeito deste extrato nas atividades antioxidante e antiaterogênica em camundongos ApoE -/-

### **4.1. Objetivos específicos**

- Selecionar o melhor solvente para extrair as antocianinas dos frutos da *E. edulis* a partir de um gradiente hidroalcolico com diferentes agentes acidulantes.
- Determinar quantitativamente o teor de antocianinas totais do extrato obtido
- Determinar qualitativamente as principais antocianinas constituintes do fruto
- Avaliar a atividade antioxidante e antiaterogênica do extrato de açaí em camundongos ApoE-/-

## **5. METODOLOGIA**

### **5.1. Teste cinético de adição de ácido cítrico em etanol 95°**

Realizou-se uma curva cinética de adição de ácido cítrico em etanol 95° versus pH final da solução, com objetivo de descobrir qual a menor quantidade de ácido cítrico seria eficiente para deixar o pH abaixo de 4,0. A importância desta informação está nas variações estruturais das antocianinas entre o pH ácido e neutro, interferindo na solubilidade e estabilidade. Com adições de 0,3g de ácido cítrico por vez, verificou-se o pH em cada momento até o limite de 5 g de adição de ácido cítrico em 100 mL de etanol 95°. Após verificar qual a menor quantidade de ácido cítrico foi eficiente para alcançar o pH inferior à 4,0, foi efetivado na metodologia de preparo das soluções extratoras.

## 5.2. Preparo das soluções de extração das antocianinas com diferentes solventes e agentes acidulantes

Foram testados cinco solventes extratores com variação de dois agentes acidulantes (tabela 2) a fim de verificar a melhor combinação para a extração das antocianinas. Os cinco solventes extratores testados foram: Álcool Etílico 90%; Álcool Etílico 80%; Álcool Etílico 70%; Álcool Etílico 60% e Água destilada. A concentração alcoólica das soluções foi verificada empregando um alcoômetro Gay-Lussac 20°C, Incoterm®, com graduação alcóolica de 0 à 100°. Os agentes acidulantes a serem testados foram: ácido cítrico 0,3% e HCl 0,1%. Foi importante verificar o pH final da solução de forma que fosse inferior à pH 4,0 devido as variações estruturais das antocianinas entre o pH ácido e neutro, interferindo na solubilidade e estabilidade. Todas as soluções foram armazenadas em frascos de vidro âmbar à temperatura ambiente.

Tabela 2 - Planejamento do melhor solvente para a obtenção de um extrato enriquecido de antocianinas a partir dos frutos do açaí.

Agente Acidulante	HCl 0,1% (A1)	Ácido Cítrico 0,3% (A2)
<b>Solventes</b>		
Álcool 95% – S1	S1A1	S1A2
Álcool 80% – S2	S2A1	S2A2
Álcool 70% – S3	S3A1	S3A2
Álcool 60% – S4	S4A1	S4A2
Água – S5	S5A1	S5A2

*Proporção 2:1 (100 g fruto bruto: 50 mL do Solvente). Cada extração foi realizada em triplicata*

## 5.3. Obtenção dos frutos

Os frutos da Juçara foram obtidos no entorno do Parque Estadual da Serra do Brigadeiro (PESB), localizada na região da zona da mata do estado de Minas Gerais.

A colheita e pós-colheita dos frutos foram realizadas conforme orientações da Embrapa<sup>79</sup> para a colheita e pós-colheita para os frutos do *E. oleracea*, açaí da Amazônia.

Um coletor escalou a palmeira Juçara (*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, através de uma corda, depositado ao solo sobre uma lona para que não houvesse contato direto com o chão, para evitar a contaminação dos frutos. Após a colheita houve uma seleção manual, com a remoção de produtos indesejáveis. Os frutos da Juçara foram debulhados diretamente em caixas de plástico e os frutos verdes e em estado fitossanitário precário ou com qualquer outro defeito, que os tornassem inadequados ao processamento, foram descartados.

O acondicionamento dos frutos foi realizado em caixas de plástico com aberturas laterais, para facilitar a aeração, uma vez que essas caixas são resistentes e de fácil higienização.

Em todas as etapas, os frutos da Juçara não ficaram expostos ao sol, uma vez que a luminosidade excessiva pode favorecer sua deterioração.

#### **5.4. Despulpamento, teste de extração das antocianinas com diferentes solventes e agentes acidulantes**

Os frutos da Juçara foram despulpados no prazo máximo de 8 horas após a colheita, devido sua alta perecibilidade. Durante o processo de despulpa, os frutos da Juçara passaram pelas seguintes fases de beneficiamento, conforme orientações da Embrapa<sup>79</sup> para o processamento dos frutos do *E. oleracea*:

- Pré-lavagem: os frutos são imersos em água para a retirada de impurezas;

- Amolecimento: imersão dos frutos na água entre 40 e 60°C, não devendo exceder esta temperatura, por um período de 10 a 60 minutos, dependendo da maturação. Esta fase tem por finalidade facilitar o despulpamento por amolecimento do epicarpo e mesocarpo dos frutos.

- Lavagem com água clorada: lavagem dos frutos a uma solução com cloro ativo com 20 a 50ppm, por cerca de 20 a 40 minutos;

- Retirada do excesso do cloro: a retirada do cloro se dá por meio da lavagem por aspersão com água potável;

- Despolpamento na etapa de teste dos solventes: Os frutos foram pesados em recipientes plásticos, separados em 100g para a execução do teste com 50 mL do solvente. (proporção fruto:solvente 2:1). Os frutos pesados e o solvente teste foram homogeneizados em batedeira circular durante 4 minutos. Desta forma houve o despolpamento sem o rompimento ou quebra das sementes. Este material foi peneirado e filtrado em algodão, sendo guardado em frascos âmbar, entre - 10 e - 15°C, para a análise do teor das antocianinas totais. Todo o processo foi realizado com as luzes apagadas devido fotosensibilidade das antocianinas. As sementes foram separadas, lavadas e secas para posterior pesagem e correlação com o peso bruto do fruto.

O desempenho do procedimento de extração foi avaliado em função da quantidade total de antocianina extraída, empregando técnica espectrofotométrica no comprimento de onda de 510 nm.

Os solventes descritos foram utilizados durante o despolpamento, em triplicata, com variação dos agentes acidulantes em cada solução teste extratora. Eles foram avaliados pela capacidade de extrair as antocianinas dos frutos. Foram realizadas dosagens quantitativas das antocianinas nas polpas obtidas.

### **5.5. Dosagem quantitativa das antocianinas totais por espectrofotometria**

O conteúdo de antocianinas presente no liofilizado de açaí obtido foi determinado pelo método de absorvância de pH diferencial.<sup>80</sup> As absorvâncias das amostras liofilizadas dos frutos da Juçara foram mensuradas a 510 e 700 nm em tampões em pH 1,0 (ácido hidrocloreto de potássio, 0,025M) e 4,5 (acetato de sódio, 1M). A diferença dos valores de absorvância em pH= 1,0 e pH= 4,5 é diretamente proporcional a concentração de antocianinas, com o cálculo baseado na cianidina-3-glicosídeo, com massa molecular (MM) de 449,2 g/mol, absorvância molar ( $\epsilon$ ) de 26.900 e diluição utilizada (D).

#### **Preparo do tampão cloreto 0,025 mol/L pH=1,0:**

Pesaram-se 1,86g de KCl e diluído em 980 mL de água destilada num bécher. Mediu-se o pH durante a adição de HCl até alcançar pH=1,0. A solução com pH=1,0 foi transferida para um balão de 1L e completado o volume com

água destilada. A solução é estável quando mantida à temperatura ambiente por alguns meses, porém o pH deve ser verificado antes de usar.

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

Pesaram-se 54,43g de acetato de sódio sendo posteriormente diluído em 960 mL de água destilada em um bécher. 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. A solução é estável por alguns meses quando mantida a temperatura ambiente, porém o pH deve ser verificado antes de usar.

Em dois bécheres, pesaram-se 0,05g de polpa de açaí liofilizada solubilizada em 50mL de tampão pH=1,0 (cloreto de potássio 0,025M) e 50 mL de tampão pH= 4,5 (acetato de sódio 0,4M), obtendo um fator de diluição de 1:1000. A análise foi realizada em triplicata para cada extrato. As amostras foram deixadas no ultrasom durante 30 minutos. Após este período, as amostras foram filtradas e vertidas em balão volumétrico de 50 mL e avolumadas com o tampão correspondente. Cada balão volumétrico ficou em repouso durante 30 minutos, protegidos da luz e a temperatura ambiente. Foram realizadas leituras das amostras no espectrofotômetro em 510 nm e 700 nm.

Teor de Antocianinas (mg/L):

$$[(Abs_{510} - Abs_{700})_{pH1} - (Abs_{510} - Abs_{700})_{pH4.5}] \times MM \times D \times 1000 / \epsilon$$

#### **5.6. Preparo da polpa e liofilização a partir do melhor solvente extrator**

Durante o processo de despolpa, os frutos da Juçara passaram pelas mesmas fases de beneficiamento descritas acima com modificações no método de despulpamento devido à maior quantidade de fruto a sofrer o processo.

- Despolpamento: Foi realizado em despolpadeira industrial, seguindo as normas de higiene adequadas. Foi usada a proporção 2:1 de fruto e o melhor solvente para a extração da antocianina.

- Refino: a polpa do açaí foi passada por peneiras devidamente higienizadas para retirada de produtos indesejáveis e envasada em recipientes plásticos previamente higienizadas.

Estas etapas foram importantes para minimizar a probabilidade de contaminação microbiológica dos frutos da Juçara durante o processamento, contribuindo para a conservação do produto.

As sementes foram separadas, lavadas e secas para posterior pesagem e correlação com o peso bruto do fruto.

Após todas as fases, a polpa do fruto obtida foi liofilizada no Departamento de Zootecnia da UFV e armazenada em frascos de vidro, entre – 10 e – 25°C.

## **5.7. Análises cromatográficas do extrato liofilizado de açaí**

### **5.7.1. Análises qualitativa e quantitativa das antocianinas do extrato de açaí liofilizado por CLAE**

As análises qualitativa e quantitativa das antocianinas do extrato de açaí liofilizado foram realizadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), utilizando as condições propostas por SCHAUSS *et al.*<sup>81</sup> e GALLORI *et al.*<sup>82</sup>, 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 100%;
- Detector de arranjo de diodos UV-visível;
- Coluna RP-18 Phenomenex Gemini, 5µm 250 x 4,6 mm e pré-coluna Phenomenex ODS C18 4 x 3 mm;
- Injeção: 50 µL
- Fluxo de 1 mL/minuto;
- Tempo de corrida de 45 minutos;

- Leitura dos cromatogramas a 520 nm.

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 acondicionamento da coluna.

A ressuspensão do extrato de açaí liofilizado foi realizado adicionando 5 mL de HCl 1% em 0,01g de extrato.

Utilizou-se como padrão externo as antocianinas: cianidina 3-O-glucosídeo, da empresa Sigma-Aldrich, com nome de produto “cloreto de curomanina”, nº 52976, maior que 95% de pureza, PM 484,84; e cianidina 3-O-rutinosídeo, da empresa Sigma-Aldrich, com nome de produto “keracyanin chloride”, nº 36428, maior que 95% de pureza, PM 630,97. Estas foram ressuspensas separadamente em solução de HCl 1% (10 mg do padrão em 5 mL de HCl 1%) e as absorvidades molares foram respectivamente 26900 e 28840. Injetou-se um mix dos padrões para observar o tempo de retenção de cada antocianina (figura 4).

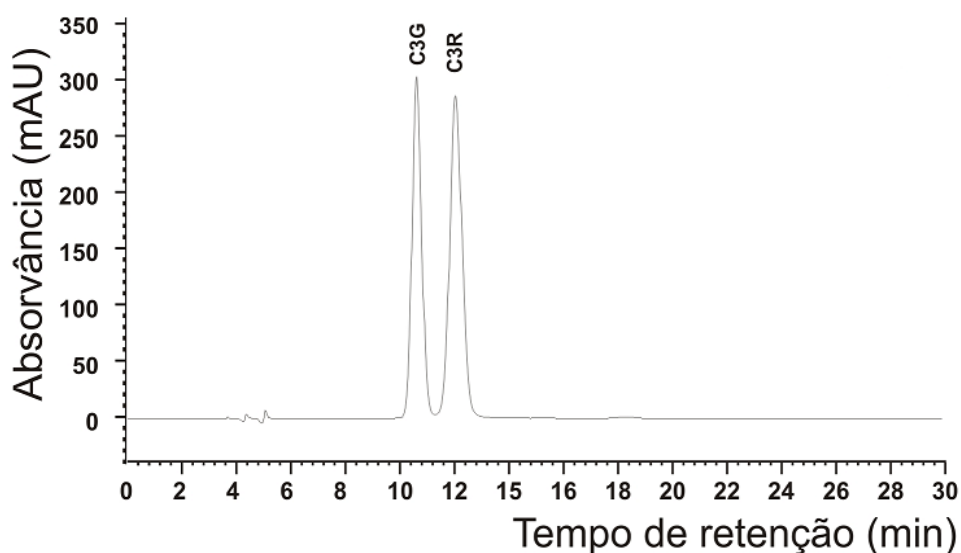


Figura 4 - Cromatograma do mix dos padrões de antocianinas. C3G: cianidina 3-O-glucosídeo e C3R: cianidina 3-O-rutinosídeo. Condição: DAD 520 nm, Coluna RP-18 Phenomenex Gemini, 5µm 250 x 4,6 mm, pré-coluna Phenomenex ODS C18 4 x 3 mm

Realizou-se a elaboração das curvas analíticas dos padrões de antocianinas, obtendo as equações para cianidina 3-O-glucosídeo:  $y=3996555,7208x - 56356,5861$ ,  $R^2 = 0,9994$  (figura 5) e para cianidina 3-O-

rutinosideo:  $y=3302563,8255x - 57350,6187$ ,  $R^2 = 0,9995$  (figura 6). Os dados para a elaboração das curvas dos padrões estão descritos na tabela 3.

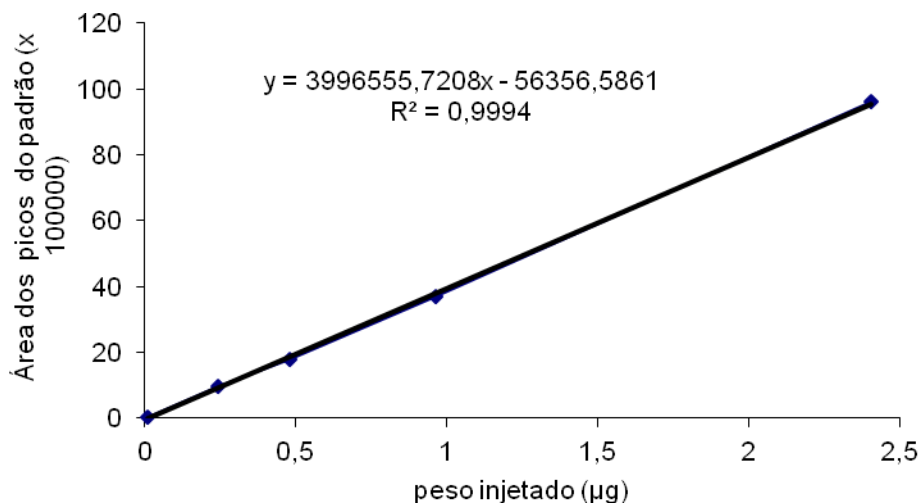


Figura 5 - Curva padrão da cianidina 3-O-glucosideo

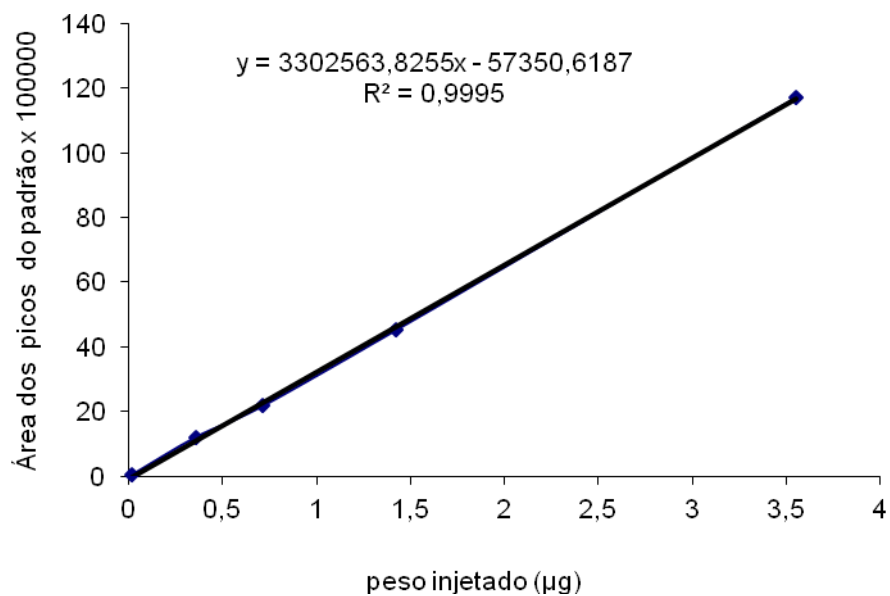


Figura 6 - Curva padrão da cianidina 3-O-rutinosideo



Tabela 3 - Dados das curvas dos padrões de cianidinas.

Curva padrão cianidina 3-O-glucosídeo		Curva padrão cianidina 3-O-rutinosídeo	
peso injetado ( $\mu\text{g}$ )	área do pico	peso injetado ( $\mu\text{g}$ )	área do pico
2,405	9606157	3,55	11721469
0,962	3686199	1,42	4524331
0,481	1773113	0,71	2177507
0,2405	988703	0,355	1217198
0,00962	42410	0,0142	50611

As análises de antocianinas 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.

### 5.7.2. Análise de carotenóides do extrato liofilizado de açaí por CLAE

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

Para análise qualitativa utilizou-se o padrão de  $\beta$ -caroteno isolado do extrato concentrado de cenoura por cromatografia em coluna aberta.<sup>83</sup>

Durante as etapas de extração, as amostras e os extratos foram mantidos sob proteção da luz solar e artificial pela utilização de vidrarias âmbar, papel alumínio e cortinas do tipo *blackout*, e sob proteção do oxigênio por meio da utilização de tampas.

Para a quantificação do  $\beta$ -caroteno, foi utilizada curva de padronização externa.

### 5.7.3. Extração e análise de carotenóides

Investigou-se a ocorrência de  $\alpha$ -caroteno,  $\beta$ -caroteno,  $\beta$ -criptoxantina e licopeno no extrato de açaí liofilizado. Os carotenóides foram extraídos segundo o método proposto por Rodriguez-Amaya *et al.*<sup>84</sup> com modificações.

Cerca de 1g do extrato do açaí foi pesado 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. Em seguida, o filtrado foi transferido para um funil de separação contendo 50 mL de éter de petróleo resfriado, em três frações, sendo cada fração lavada com água destilada para retirada total da acetona. Acrescentou-se sulfato de sódio anidro ao extrato em éter de petróleo para retirar qualquer resíduo de água que, porventura, tivesse restado e que pudesse prejudicar a evaporação do material. Posteriormente, o extrato em éter foi concentrado utilizando evaporador rotativo em temperatura de  $35 \pm 1$  °C, transferido para balão volumétrico de 25,0 mL, sendo o volume completado com éter de petróleo. Os extratos foram filtrados em unidades filtrantes com porosidade de 0,45 µm, sendo injetados 50 µL na coluna cromatográfica para análise.

As análises de carotenóides foram realizadas por CLAE, sendo utilizadas as condições cromatográficas desenvolvidas por Pinheiro-Sant'Ana *et al.*<sup>85</sup> as quais incluíram: sistema CLAE, DAD; coluna cromatográfica RP-18 Phenomenex Gemini, 250 x 4,6 mm, 5 µm, munida de coluna de guarda Phenomenex ODS (C18), 4 mm x 3 mm. Para análise utilizou-se fase móvel composta de metanol: acetato de etila: acetonitrila (70:20:10, v/v/v) com fluxo de 1,7 mL min<sup>-1</sup> e tempo de corrida de 15 minutos. Os cromatogramas foram obtidos a 450 nm.

As análises de carotenóides 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.

#### **5.7.4. Análise de vitamina C no extrato liofilizado de açaí por CLAE**

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

O padrão de vitamina C foi o ácido L-ascórbico adquirido da Sigma-Aldrich® (Alemanha).

As análises de vitamina C 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.

Durante as etapas de extração, as amostras e o extrato foram mantidos sob proteção da luz solar e artificial pela utilização de vidrarias âmbar, papel alumínio e cortinas do tipo *blackout*, e protegidos do oxigênio por meio da utilização de tampas e de ambiente com gás nitrogênio nas vidrarias.

#### **5.7.5. Extração e análise de vitamina C**

Foi investigado o conteúdo de ácido ascórbico (AA) no extrato de açaí liofilizado. A extração e análise do AA foram realizadas de acordo com as condições propostas por Campos *et al.*<sup>86</sup> com modificações. Para extração, cerca de 3g do extrato de açaí liofilizado foram ressuspensos e homogeneizados, por aproximadamente 5 minutos, em 15 mL de solução extratora (3% de ácido metafosfórico, 8% de ácido acético, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0,3 N) e 1 mM EDTA). 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, o extrato foi novamente centrifugado a 1789 g, por 15 minutos e o sobrenadante acondicionado sob refrigeração (5 ± 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; sistema CLAE, DAD, 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 a 450 nm

### **5.8. Análises da composição química**

#### **5.8.1. Composição química centesimal do extrato de açaí liofilizado**

A composição química centesimal foi determinada, avaliando-se os teores de umidade, cinzas, lipídeos, proteínas e carboidratos. O teor de umidade foi determinado por secagem direta da amostra em estufa a 105°C, o

teor de cinzas por incineração em mufla a 550°C e posterior resfriamento em dissecador até a temperatura ambiente, ambas por diferença do peso inicial. A determinação de lipídeos totais ou extrato etéreo foi realizado por secagem da amostra em estufa a 105°C seguida por extração com éter, em extrator do tipo Soxhlet, e posterior remoção do solvente empregado por destilação.<sup>87</sup> O teor de proteínas foi medido pelo método de *Kjeldahl* clássico e a quantificação de carboidratos foi obtida pelo cálculo da diferença percentual, subtraindo-se do total da soma de umidade, cinzas, lipídeos e proteínas.

### **5.8.2. Quantificação mineral do extrato de açaí liofilizado**

Na análise de quantificação dos minerais do extrato dosou-se: fósforo (método fotocolorimétrico, aparelho fotômetro BEL1105), potássio (método de fotometria de chama, aparelho Corning 400), cálcio, magnésio, sódio, zinco, ferro, manganês e cobre (todos estes pelo método de absorção atômica, aparelho SpectrAA 220FS, empresa Varian). As análises foram realizadas no Departamento de Solos da Universidade Federal de Viçosa. Para os analitos dosados através do método de absorção atômica, foi necessário executar a digestão da amostra utilizando os ácidos nítrico e perclórico. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

### **5.8.3. Perfil lipídico do extrato de açaí – análise de ácidos graxos**

O açaí liofilizado foi submetido à extração dos ácidos graxos conforme recomendação de extração de lipídios por FOLCH,<sup>88</sup> sendo saponificado e esterificado conforme HARTMANN & LAGO.<sup>89</sup> 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 uma 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 µL da

solução foi injetada. Os picos foram identificados por comparação dos tempos de retenção com padrões conhecidos de éster metílico (FAME mix, Supelco®, EUA) e quantificadas por área de integração automática.

## **5.9. Atividade antioxidante do extrato de açaí liofilizado**

### **5.9.1. Avaliação da atividade antioxidante do extrato**

A atividade antioxidante do extrato de açaí liofilizado foi determinada pelo método fotolorimétrico *in vitro* do radical livre estável orgânico DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil). O método de DPPH, descrito por Brand-Williams *et al.*<sup>90</sup>, é baseado na redução do radical DPPH por antioxidantes, produzindo um decréscimo da absorbância a 515 nm. A presença desta atividade dependerá da capacidade dos antioxidantes presentes no extrato de açaí liofilizado em transferir elétrons ao radical DPPH.

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 a partir do extrato de açaí liofilizado de diferentes concentrações: 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.*<sup>91</sup> para a determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH.

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 espectrométrica à 515 nm. Todas as leituras foram realizadas em amostras triplicatas. A concentração média de DPPH capturado na reação foi calculada por análise da curva de calibração por regressão linear.<sup>91</sup> O percentual de DPPH foi calculado pela equação abaixo, sendo que a solução DPPH foi usada como controle.

$$\% \text{ captura do radical DPPH} = [( \text{absorbância do controle} - (\text{absorbância da amostra} - \text{absorbância do branco})) / \text{absorbância do controle}] \times 100.$$

## 5.10. Avaliação da atividade antiaterogênica *in vivo* e exames bioquímicos

### 5.10.1. Animais

Foram utilizados 40 camundongos adultos *knockout* para apolipoproteína E (APOE  $-/-$ ) e 10 camundongos adultos *C57Bl/6*, com 14 semanas de vida, procedentes do Biotério Central do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, da Universidade Federal de Viçosa, MG, Brasil. Os animais foram mantidos sob condições controladas de luminosidade (ciclos de 12 horas claridade /escuridão), temperatura ( $21 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) e umidade relativa do ar (60% - 70%). Todos os procedimentos envolvidos no protocolo experimental foram aprovados pelo Comitê de Ética do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Viçosa, processo nº 56/2010 (Anexo 1). O experimento foi conduzido em conformidade com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA.

No delineamento experimental (figura 7) os animais foram divididos aleatoriamente em 5 grupos: grupo G1 - Controle Negativo (*C57Bl/6*  $n=10$ ), recebeu dieta AIN-93M; o grupo G2 - Controle Positivo (*knockout ApoE*  $n=10$ ), recebeu dieta AIN-93M; o grupo G3 (*knockout ApoE*  $n=10$ ), recebeu dieta AIN-93M com Açai 2%; o grupo G4 (*knockout ApoE*  $n=10$ ) recebeu dieta AIN-93M com Açai 6%; G5 (*knockout ApoE*  $n=10$ ) recebeu dieta AIN-M93 com 50 mg/kg/dia de Sinvastatina.

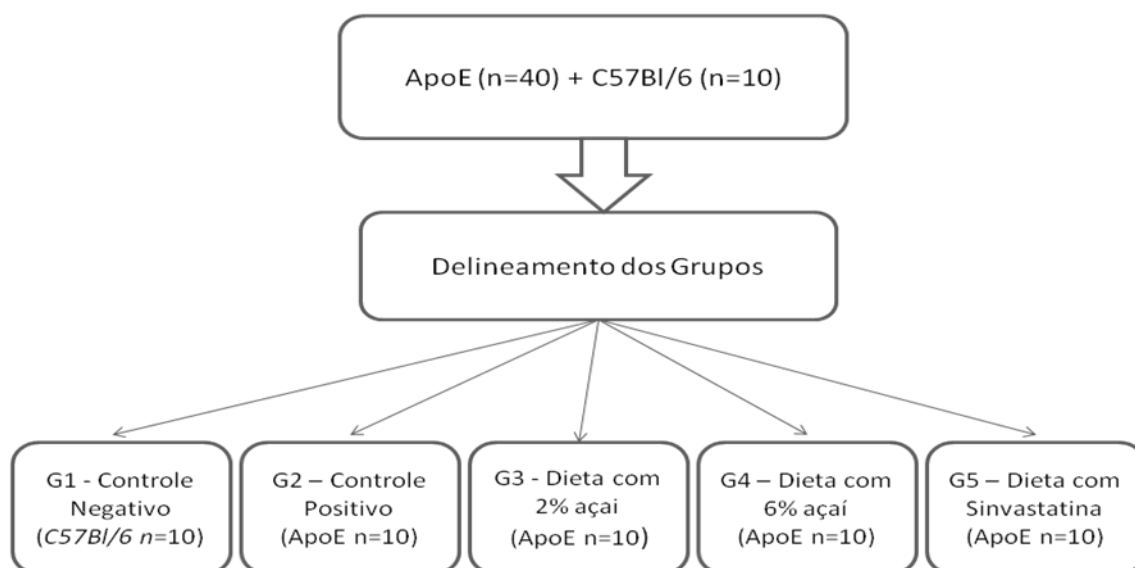


Figura 7 - Delineamento experimental adotado

### 5.10.2. Dietas

As dietas foram elaboradas de acordo com a AIN-93M,<sup>92</sup> sendo confeccionadas manualmente e mantidas sob congelamento (-18 a 0°C), protegidas da luz, até o momento da utilização.

Para os grupos que receberam 2% e 6% do extrato de açaí liofilizado, a composição da dieta foi modificada, levando em consideração os valores de umidade, carboidrato, proteína, lipídios e fibras dietéticas do extrato. O valor da quantidade de fibras foi baseado na composição do açaí do Norte (*Euterpe oleraceae* Martius)<sup>81</sup>. As tabelas 4 e 5 mostram a composição das dietas experimentais de 2% e 6% respectivamente.

Para o grupo que recebeu a intervenção do fármaco foi adicionado à dieta AIN-93M, a quantidade de 50mg/kg/dia, sendo o peso médio dos camundongos 20g e o consumo diário de 4g de dieta/dia. Esta quantidade de Sinvastatina foi utilizada no estudo de Xia *et al.*<sup>93</sup> com obtenção de redução na placa de ateroma dos camundongos ApoE<sup>-/-</sup> que consumiram o fármaco. Para que houvesse uma melhor absorção do fármaco, foi adicionado o tensoativo polissorbato 80 (tween 80), em pó, junto à Sinvastatina na dieta. A Sinvastatina foi adquirido da Galena Química e Farmacêutica LTDA, com teor de pureza de 99,2%.

Tabela 4 - Composição das dietas experimentais - 2% extrato de açaí liofilizado - (g/kg dieta)

<b>Ingredientes</b>	<b>Dieta AIN-93M (g)</b>	<b>AIN-93M com 2% de Açaí liofilizado (g)</b>
Amido (qsp)	515,7	521,3
Amido dextrinizado (15,5%)	155	155
Sacarose(10%)	100	91,6*
Proteína (caseína) (9%)	90	88,6*
Fibra (celulose) (5%)	50	41,2*
Mix de mineral (3,5%)	35	35
Mix de vitamina (1%)	10	10
Bitartarato de colina (0,25%)	2,5	2,5
L-cistina (0,18%)	1,8	1,8
Açaí	-	21,2
Óleo (4%)	40	31,8*
	1000g	1000g

**\*Para estes ingredientes foi descontado a concentração dos nutrientes presentes no fruto. Em 100g de Açai da Mata Atlântica liofilizado há 7g de proteínas, 41g de lipídios, 42g de carboidratos e aproximadamente 44,2g de fibras dietéticas (SCHAUSS *et al.*)<sup>81</sup>**

Tabela 5 - Composição das dietas experimentais - 6% extrato de açai liofilizado - (g/kg dieta)

<b>Ingredientes</b>	<b>Dieta AIN-93M (g)</b>	<b>AIN-93M com 6% de Açai liofilizado (g)</b>
Amido (qsp)	515,7	537,4
Amido dextrinizado (15,5%)	155	155
Sacarose(10%)	100	73,2*
Proteína (caseína) (9%)	90	85,5*
Fibra (celulose) (5%)	50	21,8*
Mix de mineral (3,5%)	35	35
Mix de vitamina (1%)	10	10
Bitartarato de colina (0,25%)	2,5	2,5
L-cistina (0,18%)	1,8	1,8
Açai	-	64
Óleo (4%)	40	13,8*
	1000g	1000g

**\*Para estes ingredientes foi descontado a concentração dos nutrientes presentes no fruto. Em 100g de Açai da Mata Atlântica liofilizado há 7g de proteínas, 41g de lipídios, 42g de carboidratos e aproximadamente 44,2g de fibras dietéticas (SCHAUSS, *et al.*)<sup>81</sup>**

### 5.10.3. Controle de peso corporal e do consumo alimentar

Semanalmente, os camundongos foram pesados para observar o crescimento ponderal. Também foi realizada a quantificação do consumo alimentar. Para tanto, as dietas ofertadas aos animais foram pesadas semanalmente, sendo que os dados da diferença entre a dieta ofertada e o restante não consumido e sobras no fundo da gaiola foram utilizados para o cálculo do consumo de dieta semanal.

### 5.10.4. Eutanásia e coleta de tecidos

Após 75 dias, os animais sofreram eutanásia com asfixia de CO<sub>2</sub>. Foi retirada a dieta de todos os grupos 12 horas antes do sacrifício, permanecendo o livre acesso à água. Foram coletadas amostras de sangue, fígado, baço, cérebro, rins, coração e aorta de todos os animais. O sangue foi coletado por



punção na aorta abdominal e centrifugado a 1750 g, durante 10 minutos à 4°C, para separação do soro que foi armazenado à - 80°C para posteriores análises. O fígado e cérebro foram congelados à - 80°C. Baço, rins, coração e aorta foram estocados em formol para posteriores análises.

#### **5.10.5. Análises bioquímicas dos parâmetros sanguíneos**

Dosaram-se no soro dos camundongos os seguintes parâmetros: colesterol total (método enzimático-colorimétrico, peroxidase), colesterol HDL (método enzimático-colorimétrico, direto), triglicerídeos (método enzimático-colorimétrico, peroxidase), glicose (método enzimático-colorimétrico, glicose oxidase), creatinina (método colorimétrico, Jaffé modificado), creatinina fosfoquinase - CPK (método cinético UV), aspartato aminotransferase – TGO/AST (método cinético UV), alanina aminotransferase – TGP/ALP (método cinético UV). O resultado do colesterol-LDL foi calculado pela equação de Friedewald ( $LDL-C = \text{Colesterol Total} - \text{Colesterol HDL} - \text{Triglicerídeos}/5$ ), onde Triglicerídeos/5 representa o colesterol-VLDL. As análises foram realizadas no aparelho Cobas Mira Plus, da Roche, utilizando os kits da empresa Bioclin/Quibasa, no laboratório de análises clínicas da Divisão de Saúde da UFV.

#### **5.10.6. Avaliação das lesões ateroscleróticas na aorta**

As lesões ateroscleróticas (deposição lipídica) foram determinadas nas aortas torácicas e arco-aórtico dos camundongos (figura 8), utilizando-se o método “*en face*” com a coloração de Sudan IV, segundo Palinski *et al.*<sup>94</sup> Utilizou-se a câmera digital da Sony DSC-W55 para a captura das imagens das lesões, sendo padronizado 5,0 mega-pixel de definição, com a função macro ativada e altura fixa. As fotos foram carregadas no programa ImagePro-Plus e utilizado um zoom de 50%. A soma das áreas das lesões ateroscleróticas foi calculada pelo programa, sendo o resultado expresso em milímetros quadrados. Para garantir que não houvesse diferença entre os animais quanto ao tamanho total da aorta analisada, a área total da aorta também foi mensurada e comparada com as demais.

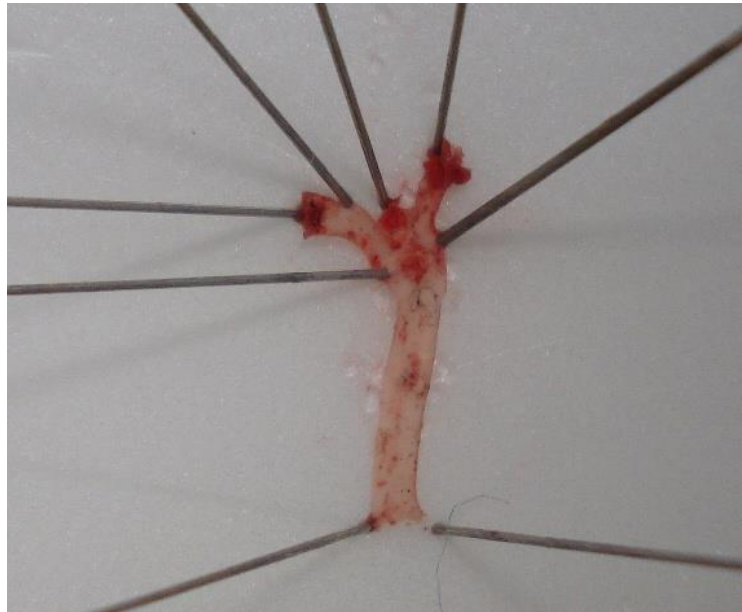


Figura 8 - Placas de ateroma na aorta torácica e arco-aórtico de camundongos ApoE -/-

#### **5.10.7. Avaliação da atividade antioxidante**

##### **5.10.7.1. Atividade enzimática: Catalase no fígado**

Para determinar a atividade da enzima Catalase (CAT), 100mg do fígado dos camundongos que estavam congelados à  $-80^{\circ}\text{C}$  foram homogeneizados em 1 mL de tampão fosfato 50 mM (PBS 7,2) e centrifugados por 10min a 6000 rpm, em  $4^{\circ}\text{C}$ . O sobrenadante foi utilizado para a dosagem da enzima. Foi preparado em balão de 25 mL uma solução de  $40\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  avolumado com tampão PBS. Do sobrenadante obtido após a centrifugação foi retirado  $10\mu\text{L}$  e adicionado 1 mL do tampão PBS na cubeta do espectrofotômetro para zerar o aparelho. Foi adicionada na mesma cubeta vazia, 1 mL de PBS com  $\text{H}_2\text{O}_2$ . A atividade da CAT foi determinada pela taxa de decaimento do peróxido de hidrogênio lido em espectrofotômetro (Pró-analise UV.1600) a 240nm, segundo descrito anteriormente.<sup>95</sup>

##### **5.10.7.2. Atividade enzimática: Superóxido Dismutase no fígado**

Para determinar a atividade da enzima de Superóxido Dismutase (SOD), 100mg do fígado dos camundongos que estavam congelados à  $-80^{\circ}\text{C}$  foram homogeneizados em 1 mL de tampão fosfato 50 mM (PBS 7,2) e centrifugados por 10min a 6000 rpm, em  $4^{\circ}\text{C}$ . O sobrenadante foi utilizado para a dosagem da enzima. A atividade da SOD foi determinada segundo a habilidade da

superóxido dismutase retirar o  $O_2^-$ , diminuindo assim a razão de autooxidação do pirogalol, usando leitor de microplaca (Asys, UVM 340) a 570nm. O conteúdo de proteínas foi mensurado de acordo com o método descrito por Lowry *et al.*<sup>96</sup>

### 5.11. DIAGRAMA DO ESTUDO

O estudo apresentou as seguinte etapas representadas no diagrama (figura 9).



Figura 9 - Diagrama do estudo

### 5.12. Análise estatística

Para análise estatística foi utilizado o programa SPSS 17.0.

Inicialmente foi verificado a frequência (média, mediana, desvio-padrão, mínimo, máximo) de todos os grupos. Os dados foram analisados usando o teste de Kolmogorov-Sminorv para verificar a simetria e igualdade de variância (distribuição normal). O teste paramétrico de análise de variância, ANOVA, foi usado para comparações envolvendo 3 ou mais grupos. O teste de comparações múltiplas de Tukey foi utilizado quando o teste ANOVA detectava diferença estatística. O teste não paramétrico Kruskal Wallis foi usado quando o teste ANOVA era contra indicado (não mostrava distribuição normal). Para situações em que o teste Kruskal Wallis não detectava diferença estatística mas o valor era próximo de  $p < 0,05$ , utilizou-se o teste de diferenças mínimas significantes de Dunn's.

Os resultados foram apresentados como “Média±Desvio Padrão (DP)” quando apenas o teste one way ANOVA foi exigido. Quando o teste não paramétrico Kruskal Wallis foi exigido, os resultados (valores) foram apresentados como “Mediana (Média±DP)”. Para todos os testes utilizados, o erro máximo permitido para assumir a existência de diferença entre os grupos foi de 5% ( $p=0,05$ ).

## 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.1. Testes de extração

#### 6.1.1. Teste cinético de adição de ácido cítrico em etanol 95°

Com o objetivo de monitorar o pH do solvente de extração pela adição de ácido cítrico para alcançar o pH cerca de 4,0, realizou-se uma curva cinética de adição desse agente acidulante em etanol 95°. Verificou-se que a concentração necessária para alcançar o pH desejado foi 0,3g de ácido cítrico em 100 mL de etanol à 95°, obtendo portanto uma concentração de 0,3% de ácido cítrico na solução etanólica. Observou-se (figura 10) um decréscimo acentuado no pH da solução com a primeira adição de 0,3g de ácido cítrico, alcançando um tamponamento no potencial de hidrogenação com as sucessivas adições.

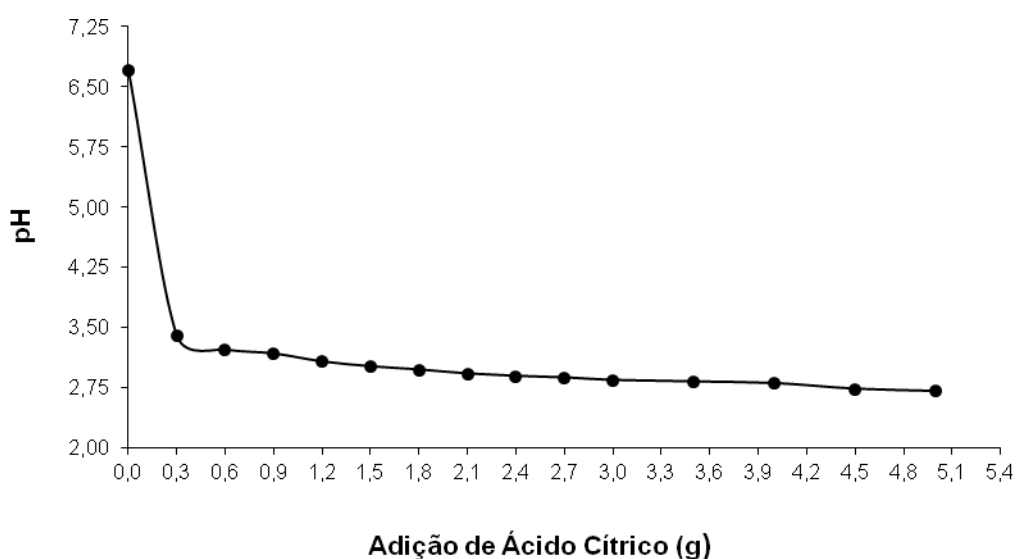


Figura 10 - Adições sucessivas de ácido cítrico em etanol 95° versus pH correspondente

A instrução normativa<sup>97</sup> do Ministério da Agricultura e Abastecimento, sobre os padrões de qualidade para polpa de fruta, permite a adição de ácido cítrico como ingrediente opcional na polpa do açaí como agente acidulante e conservante.

A resolução n.º 04 do Conselho Nacional de Saúde,<sup>98</sup> do Ministério da Saúde, aprovou o ácido cítrico como aditivo intencional, sendo considerado como coadjuvante da tecnologia de fabricação de alimentos. A resolução estabeleceu que a adição de ácido cítrico como acidulante tem como limite máximo a concentração de 0,3g/100mL ou 0,3g/100g em produtos de fruta. Na possibilidade de ingestão da polpa de açaí obtida em nossas análises, o ácido cítrico está dentro dos limites de aditivos acidulantes estabelecidos pela legislação.

### 6.1.2. Preparo das soluções de extração das antocianinas com diferentes solventes e agentes acidulantes

O pH de cada solução extratora foi medido para verificar que não haveria instabilidade ou rearranjos nas moléculas de antocianinas que são variáveis com o pH. Todas as soluções alcançaram o pH < 4,0 desejável. Os resultados estão apresentados na tabela 6.

Tabela 6 - pH final das soluções extradoras após o preparo.

Agente Acidulante	HCl 0,1% (A1)	Ácido Cítrico 0,3% (A2)
Solventes		
Etanol 95% – S1	S1A1 (pH 1,72)	S1A2 (pH 3,44)
Etanol 80% – S2	S2A1 (pH 2,23)	S2A2 (pH 3,30)
Etanol 70% – S3	S3A1 (pH 2,15)	S3A2 (pH 3,12)
Etanol 60% – S4	S4A1 (pH 2,10)	S4A2 (pH 2,90)
Água – S5	S5A1 (pH 1,87)	S5A2 (pH 2,32)

### 6.1.3. Obtenção dos frutos para os testes de extração

Coletaram-se em duas palmeiras Juçara os frutos para o experimento de extração. A coleta foi realizada ao final do mês de abril de 2010. A primeira palmeira com nove metros de altura gerou 6,742 kg de frutos maduros e 0,520 kg de frutos verdes (7,71%), sendo estes últimos desprezados. A segunda palmeira, de seis metros de altura, gerou 4,512 kg de frutos maduros e 0,200 kg de frutos verdes (4,43%), sendo este último também desprezado. Em dois cachos da palmeira Juçara foram obtidos 11,260 kg de frutos maduros para o experimento de extração. O peso médio das sementes foi de 59,3% do peso bruto dos frutos. Nesta coleta, os cachos apresentaram bom rendimento de fruto maduro, ficando de acordo com a estimativa do IPEA<sup>20</sup> de 62,5% em média de peso das sementes. Dependendo da época do ano, o peso das sementes pode ser superior à 80% do peso dos frutos. A coleta foi realizada no período de maturação dos frutos.<sup>19</sup>

### 6.1.4. Teste de extração de antocianinas com diferentes solventes

As polpas de açaí obtidas pelo despulpamento com diferentes solventes extratores propostos tiveram seu teor de antocianinas quantificado por espectrometria. Os resultados do teor de antocianinas totais encontrados com os solventes etanólicos, utilizando HCl 0,1% como agente acidulante, são apresentados em mg/L na tabela 7.

Tabela 7 - Solventes com HCl 0,1% como agente acidulante

Solventes + HCl 0,1%	Antocianinas totais $\pm$ SD (mg/L)
Etanol 95°	797,54 $\pm$ 124,24
Etanol 80°	1067,39 $\pm$ 56,41
Etanol 70°	1015,29 $\pm$ 117,12
Etanol 60°	549,06 $\pm$ 124,36
Água destilada	127,25 $\pm$ 17,03

Observamos que o etanol 80° obteve o melhor resultado de extração das antocianinas, 1067,39 mg/L. O solvente com menor capacidade de extração foi

a água destilada. Quando aumentados a fração aquosa do solvente etanol a força extratora vai diminuindo devido a alteração da polaridade da solução.

Os resultados do teor de antocianinas totais encontrados com os solventes etanólicos, utilizando Ácido Cítrico 0,3% como agente acidulante, são apresentados em mg/L na tabela 8.

Tabela 8 - Solventes com Ácido Cítrico 0,3% como agente acidulante

Solventes + Ácido Cítrico 0,3%	Antocianinas totais $\pm$ SD (mg/L)
Etanol 95°	1248,41 $\pm$ 134,26
Etanol 80°	1249,74 $\pm$ 21,61
Etanol 70°	1140,20 $\pm$ 99,56
Etanol 60°	655,93 $\pm$ 81,06
Água destilada	241,80 $\pm$ 91,95

Observou-se que o etanol 80° obteve o melhor resultado de extração das antocianinas, 1249,74 mg/L, porém não foi muito distante do valor do etanol 95°, 1248,41 mg/L. O desvio-padrão do etanol 95° foi de 134,26 mg/L deixando a variação do erro mais ampla. O solvente com menor capacidade de extração foi novamente a água destilada com resultado de 241,80 mg/L.

Ao compararmos a capacidade de extração das antocianinas do fruto verificou-se uma maior eficiência nos solventes que utilizaram o ácido cítrico como agente acidulante. Em todas as graduações etanólicas o agente ácido cítrico foi superior ao agente HCl. Abaixo, apresenta-se uma curva comparativa (figura 11) dos solventes *versus* a concentração de antocianina obtida dos frutos.

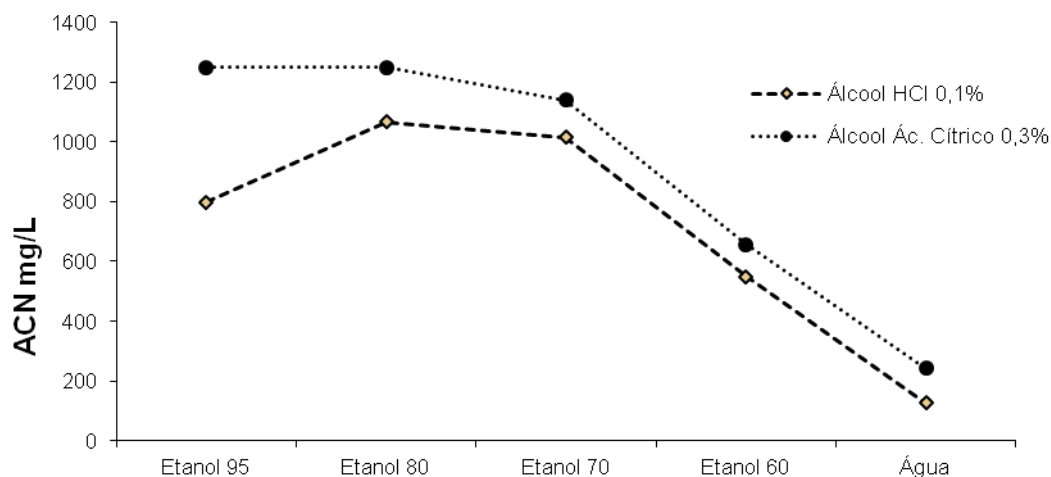


Figura 11 - Curva de comparação de extração utilizando os solventes com HCl 0,1% e Ácido Cítrico 0,3% versus concentração (mg/L) de antocianina obtida dos frutos.

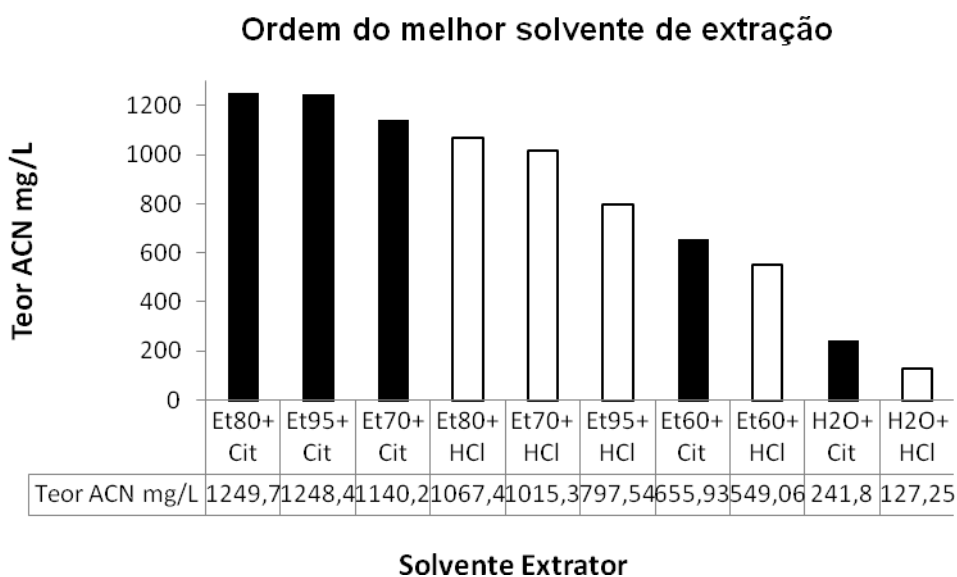


Figura 12 - Ordem decrescente entre os melhores solventes utilizados para a extração das antocianinas do fruto.

Com os resultados apresentados até aqui é possível fazer uma ordem decrescente entre os melhores solventes extratores (figura 12). Observa-se que os três melhores solventes são os adicionados de ácido cítrico. Isto é devido à ação acidulante e conservante deste agente. Embora o etanol 80° e 95° adicionado com ácido cítrico tenham valores de extração muito semelhantes, a escolha pelo etanol 80° como o solvente de preferência para a



extração foi devido a solução ser mais aquosa, portanto mais econômica, ter obtido um desvio padrão menor que o etanol 95°, o que confere um menor erro analítico e por fim, um valor da concentração de antocianina superior.

Portanto, obteve-se como melhor solvente extrator o etanol 80° com o ácido cítrico 0,3%. Em ordem decrescente de eficácia de solução: Etanol 80° + Ácido Cítrico 0,3% > Etanol 95° + Ácido Cítrico 0,3% > Etanol 70° + Ácido Cítrico 0,3% > Etanol 80° + HCl 0,1% > Etanol 70° + HCl 0,1% > Etanol 95° + HCl 0,1% > Etanol 60° + Ácido Cítrico 0,3% > Etanol 60° + HCl 0,1% > Água destilada + Ácido Cítrico 0,3% > Água destilada + HCl 0,1%.

Os solventes contendo ácido cítrico foram os que resultaram em maior teor de antocianinas no extrato. Isso demonstra a importância deste agente acidulante como um conservante do flavonóide durante o processo.

Com os resultados obtidos pela extração fez-se a transformação de unidade para quantidade em miligramas de antocianina por 100 g de fruto (tabela 9).

Tabela 9 - Quantidade de antocianinas totais (mg/100g fruto) obtidas pela extração com os respectivos solventes.

Solventes e agentes acidulantes	Antocianinas totais $\pm$ SD (mg/100g fruto)
Etanol 95° + HCl 0,1%	79,7 $\pm$ 12,4 a
Etanol 80° + HCl 0,1%	106,7 $\pm$ 5,6 a,b
Etanol 70° + HCl 0,1%	101,5 $\pm$ 11,7 a,b,c
Etanol 60° + HCl 0,1%	54,9 $\pm$ 12,4 a,d
Água destilada + HCl 0,1%	12,7 $\pm$ 1,7 e
Etanol 95° + Ácido Cítrico 0,3%	124,8 $\pm$ 13,4 b,c,f
Etanol 80° + Ácido Cítrico 0,3%	124,9 $\pm$ 2,1 b,c,f,g
Etanol 70° + Ácido Cítrico 0,3%	114,0 $\pm$ 9,9 b,c,f,g
Etanol 60° + Ácido Cítrico 0,3%	65,5 $\pm$ 8,1 a,d
Água destilada + Ácido Cítrico 0,3%	24,1 $\pm$ 9,1 e

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de significância.

Para CONSTANT,<sup>99</sup> o melhor solvente de extração de antocianinas do açaí – *Euterpe oleraceae*, foi o etanol 70° com HCl até pH 2,0. Porém, o

objetivo do estudo foi pesquisar a variação do solvente com diferentes pHs e agentes acidulantes. Encontraram-se o ácido cítrico e ácido tartárico como o segundo e terceiro melhores agentes acidulantes respectivamente. No estudo não foi testado o álcool 80°. A metodologia de extração utilizada foi diferente do presente estudo, onde o fruto ficava over-night no solvente e eram realizadas várias extrações no mesmo fruto. Eles obtiveram uma média de  $103,24 \pm 3,34$  mg de antocianina em 100 mL da polpa obtida.

OZELA *et al.*,<sup>100</sup> obtiveram 926,1 mg e 356,7 mg de antocianina por 100 g de polpa de açaí, no período de safra e entressafra respectivamente. BOBBIO *et al.*,<sup>101</sup> obtiveram  $50 \pm 5$  mg de antocianina por 100g do fruto do açaí, que seria equivalente à 263 mg por 100 g de polpa. IADEROZA *et al.*,<sup>102</sup> encontraram 336 mg de antocianina por 100 g do frutos de açaí. Já ROGEZ,<sup>103</sup> encontrou 44 mg de antocianina por 100 g do fruto de açaí.

A variação destes valores pode também ser atribuída a variabilidade inerente do fruto. DA SILVA *et al.*,<sup>104</sup> demonstraram que ao obter cinco amostras de açaí, da palmeiras da espécie *Euterpe edulis*, de cinco diferentes regiões de Santa Catarina, e dosar suas antocianinas, encontraram:  $72,50 \pm 3,1$ ;  $14,84 \pm 2,11$ ;  $207,94 \pm 1,68$ ;  $79,80 \pm 3,19$ ;  $409,85 \pm 2,33$  mg/100g de fruta. Valores estes distintos entre um mesmo fruto de regiões diferentes.

FRANCIS<sup>54</sup> afirmou que a extração utilizando metanol é a mais eficiente para antocianinas. Porém, o nosso objetivo foi buscar uma aplicabilidade para a indústria de alimentos e para a farmacoterapia, o que inviabiliza o uso do metanol devido a sua alta toxicidade. SILVA<sup>105</sup> obteve dados que demonstraram não haver diferença para a extração com metanol e etanol como solventes.

## **6.2. Preparo da polpa e liofilização a partir do melhor solvente extrator**

Tendo selecionado o melhor solvente extrator para antocianinas, etanol 80° com ácido cítrico 0,3%, fez-se o despulpamento de novos frutos de açaí. Obteve-se 10,013 kg de fruto de açaí e utilizou-se uma despulpadeira industrial. Para essa quantidade de fruto utilizaram-se 5 litros do solvente, perfazendo a proporção 2:1. O peso das sementes foi de 5,335 kg, obtendo-se 53,28% do peso do fruto. Houve um rendimento de 4,678 kg de polpa do fruto

(46,72%). Essa quantidade foi liofilizada e gerou 0,701 kg de extrato de açaí liofilizado, obtendo-se 15% do peso da polpa do fruto.

Observou-se que o peso das sementes foi inferior ao primeiro experimento dos testes dos solventes. O extrato obtido através da despulpadeira apresentou fibras, enquanto os frutos despulpados na bateadeira ficaram com as sementes integras. Isso vem demonstrar que com a utilização da despulpadeira industrial extrai-se mais fibras das polpas provenientes das sementes do que as obtidas de bateadeiras.

### **6.3. Análises espectrométricas e cromatográficas do extrato de açaí liofilizado**

#### **6.3.1. Dosagem espectrométrica do extrato de açaí liofilizado**

O conteúdo de antocianinas totais presente no extrato de açaí liofilizado foi determinado pelo método de absorvância de pH diferencial e encontrou-se 2471,4 mg/100g de liofilizado.

#### **6.3.2. Dosagem quantitativa e qualitativa por CLAE de antocianinas do extrato de açaí liofilizado**

A partir do cromatograma obtido pela técnica de CLAE e utilizando os padrões de duas antocianinas do açaí descritas em literatura, cianidina 3-O-glucosídeo e cianidina 3-O-rutinosídeo, confirmou-se qualitativamente a presença destas. Em seguida, quantificou-se estas antocianinas. Apresenta-se (figura 13) o cromatograma da quantificação das principais antocianinas do liofilizado do açaí, onde C3G representa a cianidina 3-O-glucosídeo e C3R a cianidina 3-O-rutinosídeo.

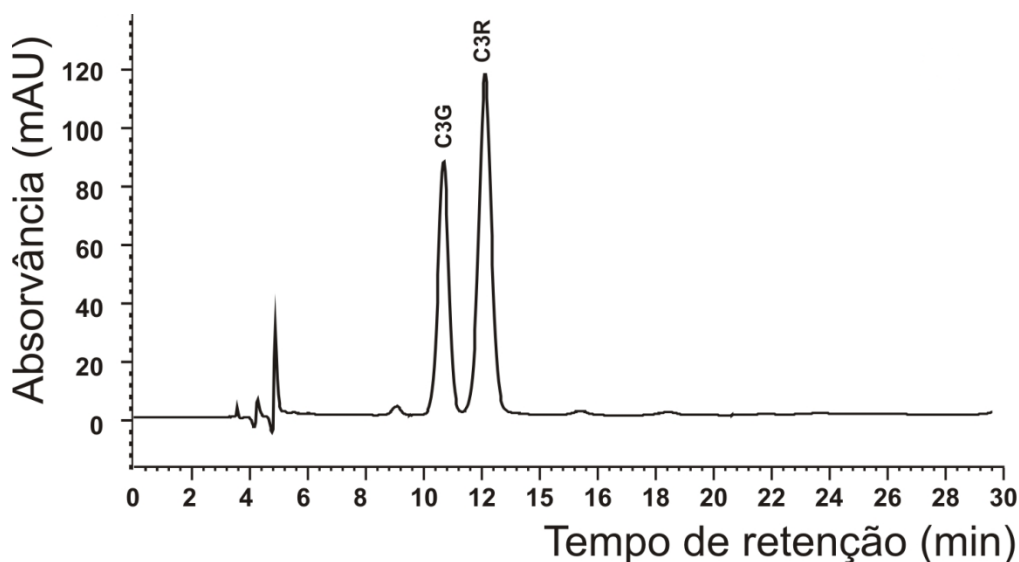


Figura 13 - Cromatograma das antocianinas do extrato de açaí liofilizado. C3G: cianidina 3-O-glucosídeo e C3R: cianidina 3-O-rutinosídeo. Condição: DAD 520 nm, Coluna RP-18 Phenomenex Gemini, 5µm 250 x 4,6 mm, pré-coluna Phenomenex ODS C18 4 x 3 mm

O primeiro pico do cromatograma indica a cianidina 3-O-glucosídeo, com tempo de retenção de dez minutos, quantificada no extrato de açaí com o teor de 9,524 mg/g liofilizado (ou 952,4 mg/100g liofilizado). A cianidina 3-O-rutinosídeo, com tempo de retenção de onze minutos e meio, apresentou um teor de 16,305 mg/g de liofilizado (ou 1630,5 mg/100g liofilizado) e foi representado pelo segundo pico do cromatograma. A soma destas antocianinas representa a quantidade das antocianinas do fruto de 25,829 mg/g de liofilizado (ou 2582,9 mg/100g liofilizado). Valores na tabela 10.

Tabela 10 – Quantificação por CLAE das antocianinas do fruto da *Euterpe edulis*.

Antocianinas		% relativa
cianidina 3-O-glucosídeo	9,524 mg/g liofilizado ou 952,4 mg/100g liofilizado	36,88%
cianidina 3-O-rutinosídeo	16,301 mg/g liofilizado ou 1630,5 mg/100g liofilizado	63,12%
<b>Total de Antocianinas</b>	<b>25,829 mg/g de liofilizado ou 2582,9 mg/100g liofilizado</b>	<b>100,00%</b>

Comparando os resultados obtidos de antocianinas totais do extrato de açaí, a partir dos métodos espectrométrico e CLAE, demonstrou-se uma boa correlação entre eles podendo o primeiro método ser utilizado como um *screening* de teor para os extratos de açaí.

POMPEU D.R. *et al.*,<sup>106</sup> obtiveram rendimento similar ao nosso estudo quanto às antocianinas do açaí do norte, 62% cianidina 3-O-rutinosídeo e 38% cianidina 3-O-glucosídeo.

DEL POZO-INSFRAN *et al.*,<sup>107</sup> quantificaram as antocianinas da *Euterpe oleraceae* por CLAE e encontraram a cianidina 3-O-glucosídeo e a perlagonidina 3-O-glucosídeo com os respectivos valores de  $1040 \pm 58.2$  e  $74.4 \pm 2.90$  mg/L de polpa fresca. Eles não encontraram cianidina 3-O-rutinosídeo.

ROSSO *et al.*,<sup>108</sup> estudaram as antocianinas presentes na polpa do açaí e identificaram e quantificaram por CLAE as suas cianidinas. Eles confirmaram, por espectrometria de massa, a presença da cianidina 3-O-glucosídeo, cianidina 3-O-rutinosídeo, perlagonidina 3-O-glucosídeo e peonidina 3-O-glucosídeo. As duas primeiras foram as cianidinas majoritárias sendo que a cianidina 3-O-rutinosídeo alcançou 88% e a cianidina 3-O-glucosídeo 12% de representatividade das antocianinas totais. Estas duas majoritárias antocianinas também foram encontradas em outros estudos.<sup>81,82,109</sup> As antocianinas cianidina 3-O-sambubioside, peonidina 3-O-glucosídeo e peonidina 3-O-rutinosídeo foram detectadas em menores quantidades em um estudo.<sup>81</sup>

### **6.3.3. Identificação e dosagem de carotenóides do extrato liofilizado de açaí por CLAE**

A identificação de carotenóides no extrato de açaí liofilizado mostrou a presença de  $\beta$ -caroteno (figura 14). Sua quantificação apresentou um resultado de 2,390mg/100g de liofilizado. Convertendo este valor obtêm-se 3983 UI de vitamina A/100g de liofilizado.

SCHAUSS *et al.*<sup>81</sup> encontraram 1002 UI de vitamina A/100g de liofilizado.

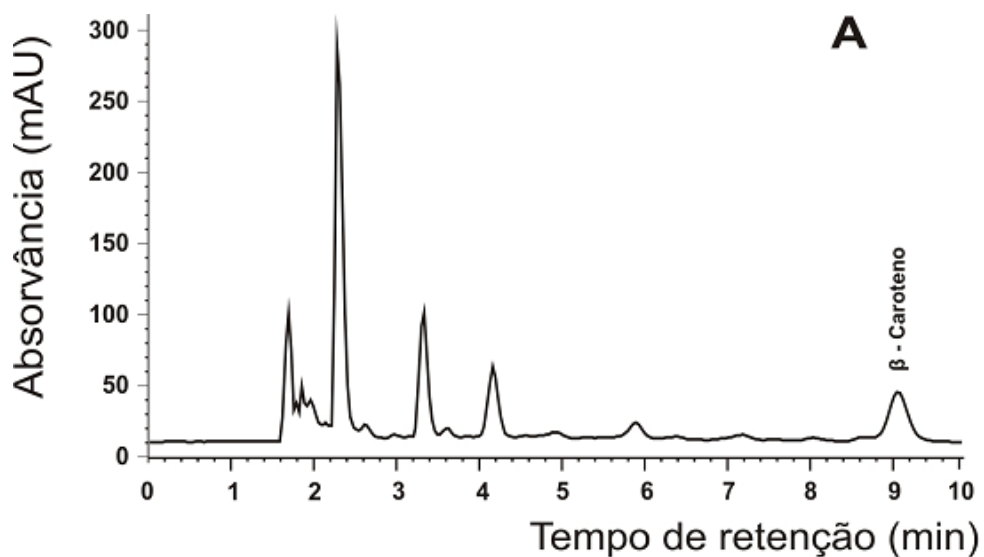


Figura 14 - Cromatograma de carotenóides indicando a presença de  $\beta$ -caroteno

#### 6.3.4. Identificação de vitamina C por CLAE

Não foi detectado a presença de vitamina C no liofilizado dosado.

RUFINO *et al.*<sup>110</sup> encontraram  $84 \pm 10$  mg de vitamina C/100g de polpa açaí de *Euterpe oleraceae*, enquanto que SCHAUSS *et al.*<sup>81</sup> encontraram  $<0,1$  mg de vitamina C/100g matéria seca.

### 6.4. Análises químicas do extrato de açaí liofilizado

#### 6.4.1. Composição química centesimal do extrato de açaí liofilizado

Obteve-se a seguinte composição centesimal a partir do extrato de açaí liofilizado: proteínas 6,59%; lipídios totais 16,80%; carboidratos 67,84%; cinzas 2,37%. Na tabela 11 comparou-se a composição centesimal do açaí liofilizado em alguns estudos.

Tabela 11 - Comparação da composição centesimal do açaí liofilizado entre alguns estudos

	(1)*	(2)*	(3)*
Umidade	6,43	-	4,92
Cinzas	2,37	-	3,68
Proteínas (g)	6,59	8,1	8,13
Lipídeos totais (g)	16,80	32,5	40,75
Carboidratos (g)	67,84	52,2	42,53

(1) Extrato de açaí liofilizado deste estudo

(2) SCHAUSS *et al.*<sup>81</sup>: Polpa liofilizada *Euterpe oleracea*

(3) Menezes *et al.*<sup>111</sup> Polpa liofilizada *Euterpe oleracea*

\*Amostras representadas em (%)

DA SILVA *et al.*<sup>104</sup> demonstraram que os frutos da *E. edulis* tem uma grande variação lipídica (18,45-44,08%), proteica (5,13-8,21%) e de cinzas (1,55-3,32%), dependentes da estação do ano e lugar em que foram realizadas as colheitas.

#### 6.4.2. Composição mineral do extrato de açaí liofilizado

Obteve-se a seguinte composição mineral a partir do extrato de açaí liofilizado (mg/100g do liofilizado): fósforo 26,7 mg; potássio 892,2 mg; cálcio 100 mg; magnésio 98 mg; sódio 149,3 mg; zinco 2,07 mg; ferro 5,2 mg; manganês 23,9 mg; cobre 1,11 mg. Na tabela 12 comparou-se o resultado deste estudo com a matéria seca de açaí de outros estudos.

Tabela 12 - Comparação da composição de minerais dos extratos de açaí liofilizados

Mineral	(1)*	(2)*	(3)*
Cálcio (mg)	100	260,0	330,0
Ferro (mg)	5,2	4,4	4,5
Sódio (mg)	149,3	-	28,5
Potássio (mg)	892,2	-	900
Fósforo (mg)	26,7	-	54,5
Magnésio (mg)	98	-	124,4
Manganês (mg)	23,9	-	10,7
Zinco (mg)	2,07	-	-
Cobre (mg)	1,11	-	-

(1) Extrato de açaí liofilizado deste estudo

(2) SCHAUSS *et al.*<sup>81</sup>: Polpa liofilizada *Euterpe oleracea*

(3) Menezes *et al.*<sup>111</sup> Polpa liofilizada *Euterpe oleracea*

\*Amostras representadas por mg/100 g matéria seca

#### 6.4.3. Análise fitoquímica

O extrato de açaí liofilizado da *E. edulis*, ressuspendido em metanol 0,1% HCl, foi submetido a prospecção fitoquímica a fim de verificar classes de metabólitos secundários presentes. Os resultados encontrados estão apresentados na tabela 13.

Tabela 13 - Análise fitoquímica do extrato de açaí liofilizado

Classe dos metabólitos	Padrão	Extrato de açaí
Flavonóides	Rutina	+
Alcalóides	Quinina	-
Esteróides/triterpenos	$\beta$ -sitosterol	-
Cumarinas	Benzopirona	-
Polifenóis	Ácido pirogálico	+
Antraquinonas	1,8-diidroxiantraquinona	-
Saponinas	Aescina	+



#### 6.4.4. Perfil lipídico

A análise do perfil lipídico do extrato de açaí liofilizado apresentou o cromatograma (figura 15) com as seguintes porcentagens: Ácido Palmítico C16:0 27,09%; Ácido Oleico C18:1 (ômega 9) 32,96%; Ácido linoléico C18:2 (ômega 6) 32,91% e Ácido linolênico C18:3 (ômega 3) 1,83%.

DA SILVA *et al.*<sup>104</sup> demonstraram que os frutos da Juçara têm um alto teor lipídico (18,45-44,08%), sendo os ácidos graxos de maior proporção: o ácido oléico (44,17-55,61%) e ácido linoléico (18,19-25,36%).

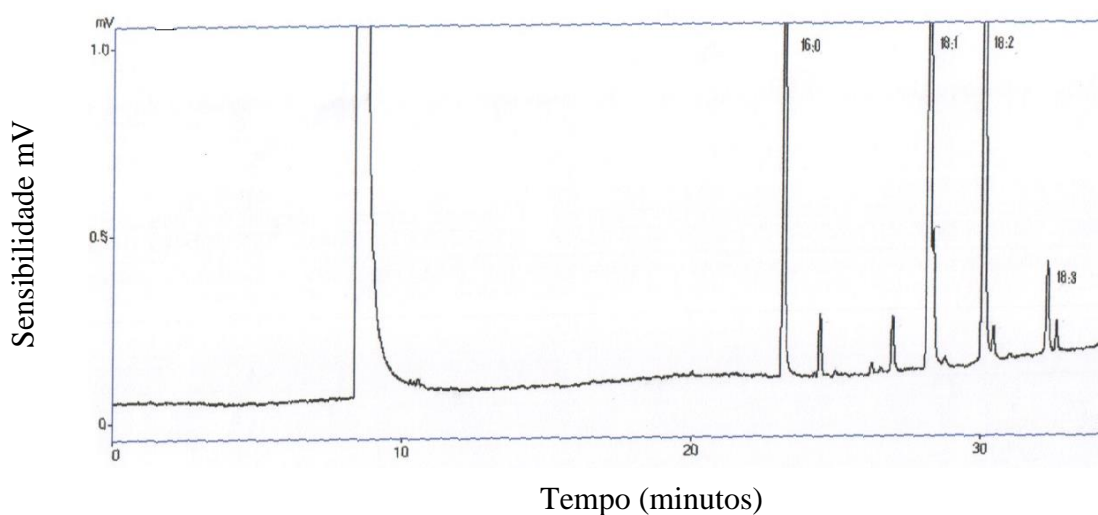


Figura 15 - Cromatograma do perfil lipídico do extrato de açaí liofilizado.

Na tabela 14 apresenta-se os resultados de estudos do perfil lipídico de amostras de açaí, para comparação dos dados deste estudo.

Tabela 14 – Valores de Ácidos graxos (%) de maior ocorrência no açaí (*Euterpe oleracea* Martius).

	1	2	3	4	5
<b>Ácidos Graxos</b>					
<b>Saturado</b>					
- Palmítico	27,09	24,01	25,56	26,18	24
<b>Monoinsaturado</b>					
- Oléico	32,96	56,2	52,7	52	48,2
<b>Poliinsaturado</b>					
- linoléico	32,91	12,5	0,95	7,28	21,4
- linolênico	1,83	0,8	-	0,55	0,9

(1) Extrato de açaí liofilizado deste estudo, proveniente da *Euterpe edulis*

(2) Schaus *et al.*<sup>81</sup> Polpa liofilizada *Euterpe oleracea*

(3) Menezes *et al.*<sup>111</sup> Polpa liofilizada *Euterpe oleracea*

(4) Nascimento *et al.*<sup>112</sup> polpa média fresca

(5) Schirmann<sup>113</sup> polpa fresca *Euterpe edulis*

Schirmann<sup>113</sup> analisou o perfil de ácidos graxos de cinco polpas de açaí do sul do Brasil proveniente da espécie *E. edulis*. A média de lipídeos totais em 100g de matéria seca foi de 30%, sendo que desse, 72,2% foi composto por ácidos graxos insaturados e 27,8% de ácidos graxos saturados. Com relação aos ácidos graxos insaturados, 50% eram monoinsaturados e 22,3% poliinsaturados. Dos ácidos graxos monoinsaturados, os mais representativos foram o oléico (48,2%) e o palmitoléico (1,6%). Os mais abundantes dos ácidos graxos poliinsaturados foram o linoléico (21,4%) e o linolênico (0,9%). O palmítico e o esteárico foram os encontrados em maior quantidade nos ácidos graxos saturados, 24% e 1,9%, respectivamente.

O elevado teor de ácidos insaturados do açaí é importante, pois esses trazem diversos benefícios à saúde, como a redução do risco de doenças cardiovasculares. Ademais, matérias primas ricas em ácidos graxos monoinsaturados e poliinsaturados são de grande interesse para as indústrias de alimentos e bebidas que buscam alternativas para elaboração de produtos mais saudáveis.<sup>114</sup>

## 6.5. Atividade antioxidante

### 6.5.1. Avaliação da atividade antioxidante do extrato

Para a avaliação da atividade antioxidante do extrato de açaí liofilizado utilizou-se o método de captura do radical livre DPPH (2,2-difenil-1-picril hidrazil). Prepararam-se concentrações seriadas do extrato de açaí (tabela 15) e obtiveram-se absorvâncias correspondendo à % de captura do radical livre de DPPH.

Tabela 15 - Concentrações do extrato de açaí e suas correspondentes absorvâncias e % de captura de radical livre DPPH

Concentração extrato (mg/L)	ABS média	% captura de radical livre DPPH
2,5	0,550	4,29
12,5	0,466	18,85
25	0,379	33,99
37,5	0,298	48,20
50	0,231	59,80
62,5	0,176	69,43
75	0,121	78,94
87,5	0,002	99,65

A partir destes valores tabelados plotamos um gráfico de concentração do extrato de açaí *versus* a % de captura de DPPH (figura 16).

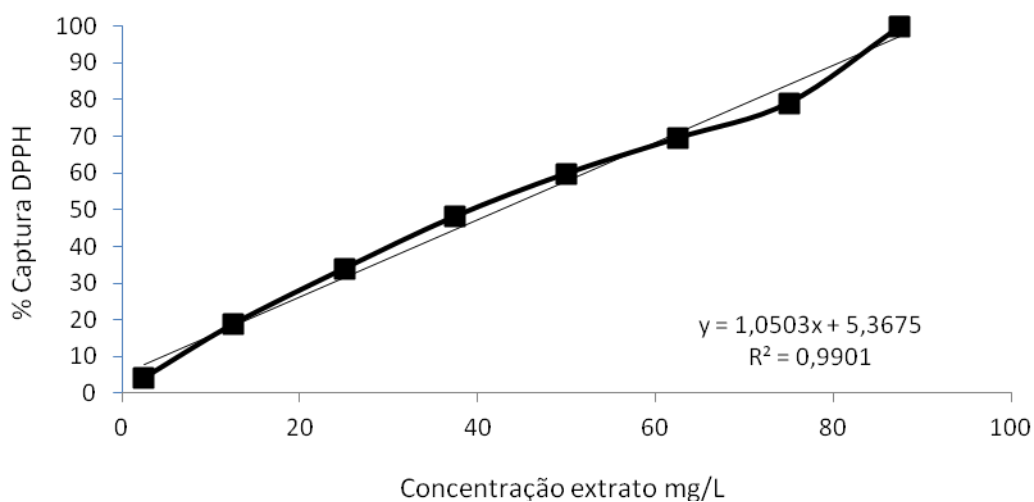


Figura 16 - Curva do teor do extrato de açaí liofilizado versus % de captura de DPPH

A partir da equação da reta obtida no gráfico do teor do extrato de açaí liofilizado *versus* % de captura de DPPH, o resultado que corresponde à concentração do extrato necessário para reduzir em 50% a concentração inicial do radical DPPH (EC50), foi 42,72 mg/L.

Pode-se ainda dizer que o EC50 foi 3,55 g liofilizado/g DPPH, a partir da curva padrão de diluições seriadas do reagente de DPPH *versus* absorvância.

DA SILVA *et al.*<sup>104</sup> mediram a capacidade antioxidante dos frutos de *E. edulis* de cinco palmeiras através do método de DPPH e encontrou resultados variados, EC50(g/g DPPH)=0,85, EC50=1,93, EC50=2,48, EC50=4,83 e EC50=2,86. Isto vem demonstrar que a região de crescimento da palmeira influencia os compostos fenólicos, e que conseqüentemente influencia a atividade antioxidante do fruto.

## **6.6. Avaliação da atividade antiaterogênica do extrato de açaí liofilizado e análises bioquímicas**

### **6.6.1. Controle de peso corporal e do consumo alimentar**

Não houve diferença significativa entre os pesos dos animais nos diferentes grupos no início do experimento ( $p < 0,05$ ). Ao final do experimento também não foi observada nenhuma diferença significativa do peso dos animais entre os diferentes grupos de tratamento ( $p < 0,05$ ). Não houve diferença significativa do consumo alimentar médio entre os grupos. Na figura 17, demonstrou-se a evolução do peso dos camundongos durante os dias do experimento. Na tabela 14 demonstrou-se o consumo diário médio da dieta pelos camundongos.

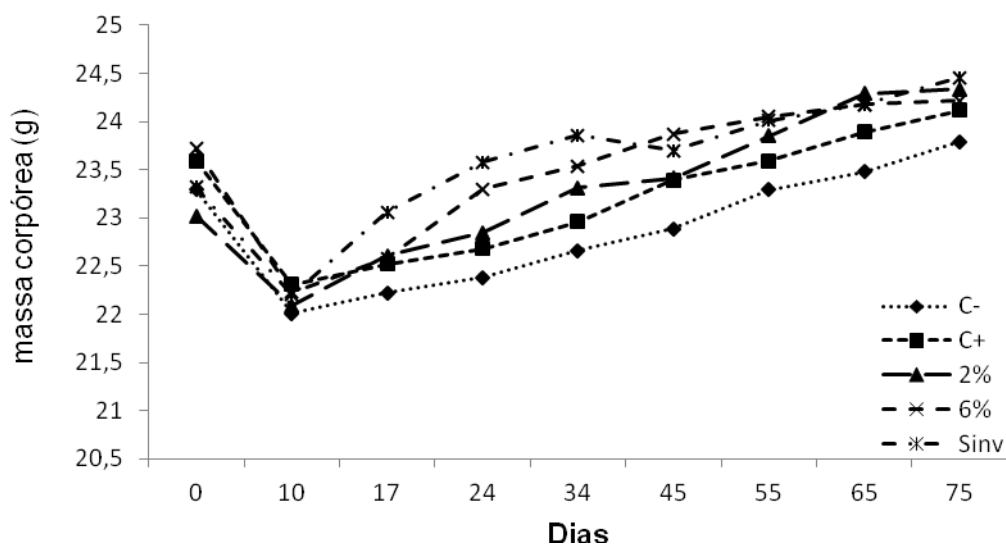


Figura 17 - Evolução do peso dos camundongos durante os dias do experimento. Dados expressos em média. Não houve diferença significativa, teste one way ANOVA complementados pelo teste de Tukey

Tabela 14: Consumo diário médio da dieta pelos camundongos

Grupos	Consumo médio diário em gramas
Controle – (C57)	3,51 ± 0,36
Controle + (APOE)	3,79 ± 0,38
2% extrato	3,94 ± 0,40
6% extrato	4,08 ± 0,40
Sinvastatina	3,94 ± 0,37

Dados expressos em média ± DP. Não houve diferença significativa, teste one way ANOVA

### 6.6.2. Análises bioquímicas dos parâmetros sanguíneos dos animais experimentais

A partir do soro dos camundongos foram analisados os parâmetros bioquímicos do perfil lipídico, glicose, creatinina e as enzimas aspartato aminotransferase – AST/TGO e alanina aminotransferase – ALT/TGP. Foi dosado também a creatinina fosfoquinase (CPK). Os resultados estão expressos na tabela 16.

Para o colesterol total, os grupos G3 e G4 apresentaram redução estatisticamente significativa em comparação ao G2 ( $338,10 \pm 35,83$  mg/dL e  $292,70 \pm 37,67$  mg/dL *versus*  $415,20 \pm 51,26$  mg/dL, respectivamente). Para LDL-colesterol os grupos G3 ( $292,40 \pm 33,99$  mg/dL) e G4 ( $252,12 \pm 37,79$  mg/dL), apresentaram redução significativa comparado com o G2 ( $371,40 \pm 51,16$  mg/dL). Não houve diferença significativa entre os grupos à base da dieta com açaí e o controle G2 para triglicerídeos e HDL-colesterol. O grupo da Sinvastatina promoveu um aumento significativo do HDL-colesterol comparado com todos os grupos em estudo, porém aumentou também o nível de triglicerídeos comparados com os grupos G2 e G4. Para a glicose, os grupos G3, G4 e G5 apresentaram redução significativa em comparação ao grupo G2 (com os resultados  $93,30 \pm 14,1$  mg/dL,  $93,90 \pm 14,93$  mg/dL e  $95,6 \pm 17,58$  mg/dL respectivamente, comparados com o G2 ( $142,20 \pm 45,93$  mg/dL). Não houve diferença significativa entre os grupos para as enzimas utilizadas como marcadoras de hepatotoxicidade (AST/TGO e ALT/TGP), assim como o marcador utilizado para nefrotoxicidade (creatinina).

Os resultados demonstraram uma ação benéfica do extrato de açaí liofilizado introduzido na dieta dos camundongos. A dieta com açaí fez com os grupos que consumiram o extrato apresentassem valores inferiores de colesterol total, LDL e glicose. Não houve indícios de possíveis efeitos nefro e hepatotóxicos.

Tabela 16 - Resultados das análises bioquímicas do soro dos camundongos

	<b>(G1) Controle -</b>	<b>(G2) Controle +</b>	<b>(G3) 2% ext. açai</b>	<b>(G4) 6% ext. açai</b>	<b>(G5) Sinvastatina</b>
<b>Glicose</b> <sup>a</sup>	161,78 ± 0,12	142,20 ± 45,93	93,30 ± 1,41 <sup>b</sup>	93,90 ± 14,93 <sup>b</sup>	95,6 ± 17,58 <sup>b</sup>
<b>Colesterol Total</b> <sup>a</sup>	108,22 ± 10,38	415,20 ± 51,26	338,10 ± 35,83 <sup>b</sup>	292,70 ± 37,67 <sup>b</sup>	366,60 ± 61,15
<b>HDL</b> <sup>a</sup>	64,67 ± 5,02	29,00 ± 3,61	29,50 ± 3,68	26,00 ± 1,33	38,10 ± 10,70 <sup>b, c, d</sup>
<b>LDL</b> <sup>a</sup>	21,38 ± 7,14	371,40 ± 51,16	292,40 ± 33,99 <sup>b</sup>	252,12 ± 37,79 <sup>b</sup>	307,92 ± 58,60 <sup>d</sup>
<b>Triglicerídeos</b> <sup>a</sup>	110,89 ± 20,93	74 ± 10,02	81,00 ± 29,50	72,90 ± 18,18	102,90 ± 25,15 <sup>b, d</sup>
<b>Coles/HDL</b> <sup>a</sup>	1,67 ± 0,12	14,62 ± 3,23	11,55 ± 1,41 <sup>b</sup>	11,32 ± 1,87 <sup>b</sup>	10,03 ± 2,25 <sup>b</sup>
<b>LDL/HDL</b> <sup>a</sup>	0,33 ± 0,11	13,10 ± 3,12	10,00 ± 1,42 <sup>b</sup>	9,75 ± 1,83 <sup>b</sup>	8,45 ± 2,19 <sup>b</sup>
<b>TGO</b>	138,44 ± 108,00	113,80 ± 26,97	139,90 ± 46,59	33,40 ± 19,88	125,9 ± 47,23
<b>TGP</b>	36,56 ± 16,40	22,20 ± 7,50	38,60 ± 19,80	1874,70 ± 871,26	33,00 ± 13,76
<b>CPK</b>	2613,33 ± 2238,64	1195,40 ± 498,97 <sup>e, f</sup>	3932,60 ± 2939,90 <sup>e</sup>	0,81 ± 0,39	2498,30 ± 2347,16 <sup>f</sup>
<b>Creatinina</b>	0,50 ± 0,7	1,39 ± 0,78	0,73 ± 0,49	116,20 ± 27,89	1,11 ± 0,83

Resultados: Média (mg/dL) ± DP. Para TGO e TGP: Média (U/L) ± DP.

a, p < 0,05 (ANOVA)

b, p < 0,05 comparado com grupo controle positivo

c, p < 0,05 comparado com extrato 2% açai.

d, p < 0,05 comparado com extrato 6% açai

e, teste de Dunn's (p < 0,05) entre os grupos 2 e 3

f, teste de Dunn's (p < 0,05) entre os grupos 2 e 5

As relações colesterol total/HDL e LDLc/HDLc, que são indicadores de risco cardiovascular mensurados, apresentaram redução significativa para os grupos G3, G4 e G5 em comparação ao grupo G2. Portanto, o consumo da dieta contendo o extrato de açaí liofilizado reduziu o risco cardiovascular quando comparado com o grupo controle que não ingeriu esta dieta.

A ação hipocolesterolemia do extrato de açaí liofilizado também tem sido descrito para outros alimentos ricos em compostos fenólicos, tais como uva vermelha, maçã e chá verde.<sup>115,116,117</sup> Os autores acima mencionados sugerem que compostos fenólicos inibem a absorção intestinal de lipídeos da dieta por formarem complexos com essas biomoléculas e assim interferirem com o processo de emulsificação, solubilização e hidrólise das micelas.

Um estudo<sup>118</sup> sugeriu que extratos ricos em compostos fenólicos agem de modo a aumentar a atividade hepática da enzima 7 $\alpha$ -hidroxilase, promovendo um aumento da excreção fecal de ácidos biliares e esteróides neutros. Desta forma, explicaram a redução de Colesterol Total, LDL e VLDL no soro em ratos com hipocolesterolemia após a dieta com extratos ricos em compostos fenólicos.

Outros nutrientes do extrato de açaí como ácidos graxos insaturados, fibras e fitosteróis também desempenham importantes efeitos na melhora do perfil lipídico. A ingestão de ácidos graxos insaturados leva à redução dos níveis de colesterol total e LDL na circulação,<sup>119</sup> por aumentar a expressão ou a atividade de receptores de LDL no fígado.<sup>120</sup> As fibras dietéticas sequestram e promovem a excreção de sais biliares, e em resposta o fígado produz mais sais biliares, em consequência mais colesterol é captado da circulação e os fitosteróis por apresentarem a estrutura química similar a do colesterol, competem pela absorção intestinal.

MIYAZAKI *et al.*<sup>121</sup> utilizaram batata-roxa doce em modelo de APOE-/-, também não encontraram diferença significativa nos resultados de colesterol HDL, triglicerídeos, AST/TGO e ALT/TGP entre os grupos controle e tratamento.

GRACE *et al.*<sup>122</sup> demonstraram que um extrato rico de antocianinas de mirtilo teve efeito hipoglicemiante em camundongos C57B1/6J diabéticos, diminuindo a glicose em 51%, enquanto que a metformina, um medicamento hipoglicemiante, obteve redução de 27% nos mesmos animais. CIGNARELLA



*et al.*<sup>123</sup> obtiveram atividade hipoglicemiante com infusão de folhas de mirtilo, assim como VALCHEVA-KUZMANOVA *et al.*<sup>124</sup> obtiveram o mesmo resultado com suco de frutas vermelhas (*chokeberry*), ricas em antocianinas. Enquanto o mecanismo exato do efeito hipoglicemiante não é bem estabelecido, alguns estudos<sup>125</sup> demonstraram a capacidade das antocianinas em estimular a secreção de insulina em células  $\beta$ -pancreáticas de roedores, *in vitro*. Além disso, o consumo de frutas e legumes ricos em polifenóis foi relatado com capacidade de diminuir a incidência de diabetes tipo 2 por meio de um efeito protetor antioxidante nas células  $\beta$ -pancreáticas.<sup>126,127</sup>

O grupo G5, o qual foi administrado a droga Sinvastatina, obteve um efeito inesperado de diminuição da glicose plasmática. Uma pesquisa<sup>128</sup> com ratos Zucker demonstrou evidências de melhora da resistência à insulina em virtude do tratamento com estatinas. SWEANY *et al.*<sup>129</sup> indicaram uma melhora do controle glicêmico em pacientes tratados com sinvastatina. Em um estudo retrospectivo<sup>130</sup> revelou-se que cinco anos de tratamento com prevastatina reduziu a incidência de diabetes em 30% numa população. Os autores sugeriram que uma ação anti-inflamatória estaria envolvida. Em uma meta-análise,<sup>131</sup> indicou-se que o tratamento com estatinas levaria a uma redução de eventos cardiovasculares, com benefícios para pacientes com diabetes tipo 2. Estatinas também poderiam contribuir para a prevenção do diabetes devido à redução de lipídios e aos efeitos pleiotrópicos, que são ações generalizadas diferentes do mecanismo de ação primário ao qual foi atribuído à droga. Segundo FURUYA,<sup>132</sup> entre estes efeitos estão: melhora da disfunção endotelial, aumento da biodisponibilidade do óxido nítrico, propriedades antioxidantes e inibição de resposta inflamatória.

O mecanismo exato da diminuição dos níveis de glicose através das estatinas não é conhecido até o momento, cabendo ressaltar a importância de estudos da homeostase glicêmica na ação desta classe de drogas.

### **6.6.3. Avaliação da atividade antioxidante *in vivo***

#### **6.6.3.1. Avaliação das lesões ateroscleróticas na aorta**

Não houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) para a área total analisadas das aortas entre os grupos (figura 18). Com a confirmação de que as aortas

possuíam áreas semelhantes entre os grupos, tornou-se possível analisar as áreas das placas de ateroma e relacionar às áreas das lesões.

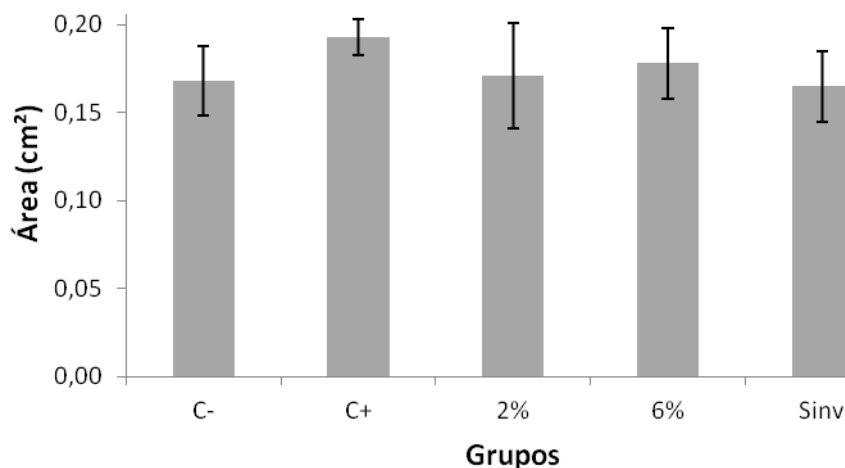


Figura 18 - Área total das aortas analisadas entre os grupos. Dados expressos em média com desvio padrão. Não houve diferença significativa entre os grupos, teste one way ANOVA.

O grupo C- (controle negativo das lesões) é apresentado apenas com o interesse de mostrar o arco-aórtico e aorta sem lesões, não sendo, portanto, foco de comparações com os demais grupos.

Na tabela 17 apresentamos a área total da aorta e % da área lesionada separada por grupos. Nenhum grupo apresentou redução da placa com significância estatística ( $p < 0,05$ ). Alguns camundongos dos grupos que consumiram a dieta com extrato liofilizado de açaí apresentavam visualmente lesões menos evoluídas. Na figura 19 observamos a % de área lesionada das artérias entre os grupos.

Tabela 17 - Área total da aorta e percentual de área lesionada

	Área total da Aorta (cm <sup>2</sup> )	% de Área Lesionada
<b>C-</b>	0,168 ± 0,02	-
<b>C+</b>	0,193 ± 0,01	10,343 ± 1,908
<b>2%</b>	0,171 ± 0,03	7,886 ± 5,014
<b>6%</b>	0,178 ± 0,02	8,425 ± 3,842
<b>Sinv</b>	0,165 ± 0,02	6,585 ± 5,090

Dados expressos em média com desvio padrão. Não houve diferença significativa entre os grupos, teste one way ANOVA.

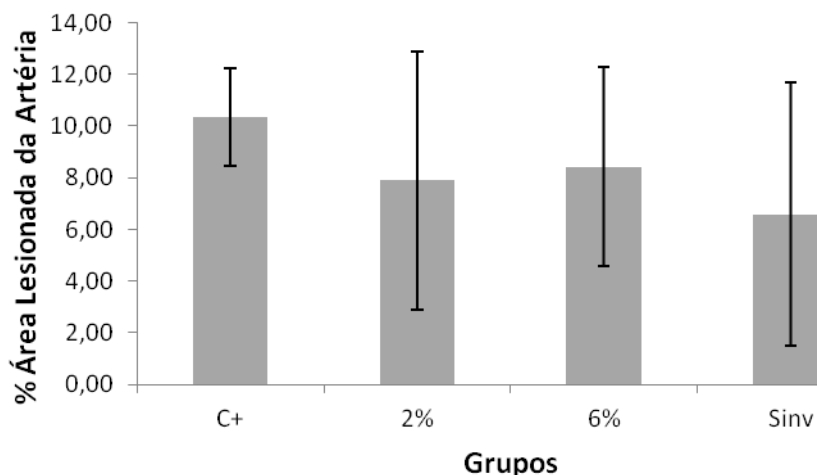


Figura 19 - Percentagem de área lesionada das artérias entre os grupos. Não houve diferença significativa entre os grupos, teste one way ANOVA.

Sabe-se que nos camundongos APOE<sup>-/-</sup> as lesões aparecem como nódulos amarelados (células espumosas) com 10 semanas de vida, porém na oitava semana a adesão de células mononucleares e a formação esporádica de células espumosas podem ser notadas. Sendo assim, nossos animais com 14 semanas de vida poderiam ter lesões já evoluídas, ocasionando um alto desvio padrão no resultado do tratamento experimental. É de grande valia iniciar um estudo com animais mais jovens afim de observarmos a prevenção da formação da placa.

Xia *et al.*<sup>93</sup> investigaram a influência do extrato rico em antocianina do arroz preto na vulnerabilidade de placas ateroscleróticas em camundongos knockout ApoE. Após 20 semanas (140 dias) de intervenção, o tamanho da placa foi reduzido em 18% no grupo que recebeu o extrato rico em antocianina e em 13% no grupo com sinvastatina em relação ao controle dieta normal. Neste trabalho o consumo da dieta com extrato de açaí liofilizado foi de 75 dias o que nos leva a questionar se o estudo alcançaria resultados com significância estatística para a placa de ateroma durante maior tempo de pesquisa.

Estudos<sup>133,134,135</sup> demonstraram que não há correlação entre os níveis de colesterol total no plasma e as lesões ateromatosas em camundongos APOE -/-. Embora tenhamos obtido bons resultados na diminuição do perfil lipídico não observamos significância estatística para a redução da placa ateromatosa em nossos animais.

#### **6.6.4. Avaliação da atividade antioxidante**

A capacidade antioxidante do fígado foi investigada através da quantificação da atividade enzimática da catalase e da superóxido dismutase.

##### **6.6.4.1. Atividade enzimática: Catalase no fígado**

A determinação da atividade da enzima catalase (CAT) foi baseada na sua capacidade de hidrolisar o peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), transformando em água e oxigênio molecular. Para a atividade da CAT, o grupo C+ apresentou maior atividade da enzima em relação ao controle selvagem C- mostrando a diferença do estresse inerente ao modelo *knockout* ApoE. Os resultados obtidos nos grupos 2% e 6% mostraram a diminuição da atividade da catalase com significância estatística comparados ao grupo C+, demonstrando que o extrato de açaí liofilizado adicionado à dieta supriu, em parte, a atividade antioxidante da catalase no fígado de forma a diminuir a sua concentração atuante na hidrólise do peróxido de hidrogênio. A figura 20 mostra a variação da atividade da enzima catalase entre os grupos após o tratamento.

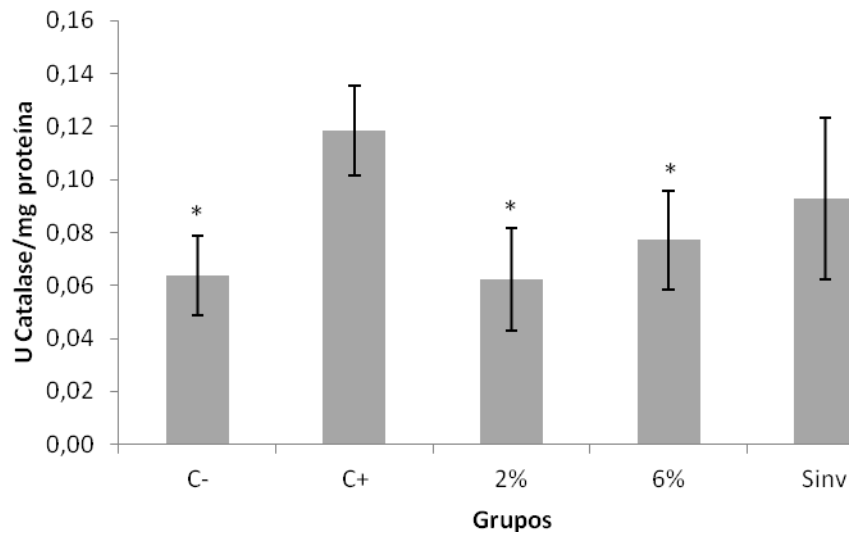


Figura 20 - Atividade da enzima catalase entre os grupos após o tratamento. \* $p < 0,05$  comparado com o grupo C+, ANOVA, teste de Tukey.

#### 6.6.4.2. Atividade enzimática: Superóxido Dismutase no fígado

A determinação da atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) foi baseada na sua capacidade de dismutação do radical superóxido, diminuindo a oxidação do pirrogalol. Para a atividade da SOD, o grupo C+ apresentou maior atividade da enzima em relação ao controle selvagem C- mostrando a diferença do estresse inerente ao modelo *knockout* ApoE. Os resultados obtidos nos grupos 2% e 6% mostraram a diminuição da atividade da SOD com significância estatística comparados ao grupo C+, demonstrando que o extrato de açaí liofilizado adicionado à dieta supriu, em parte, a atividade antioxidante da superóxido dismutase no fígado de forma a diminuir a sua concentração. A figura 21 mostra a variação da atividade da enzima SOD entre os grupos após o tratamento.

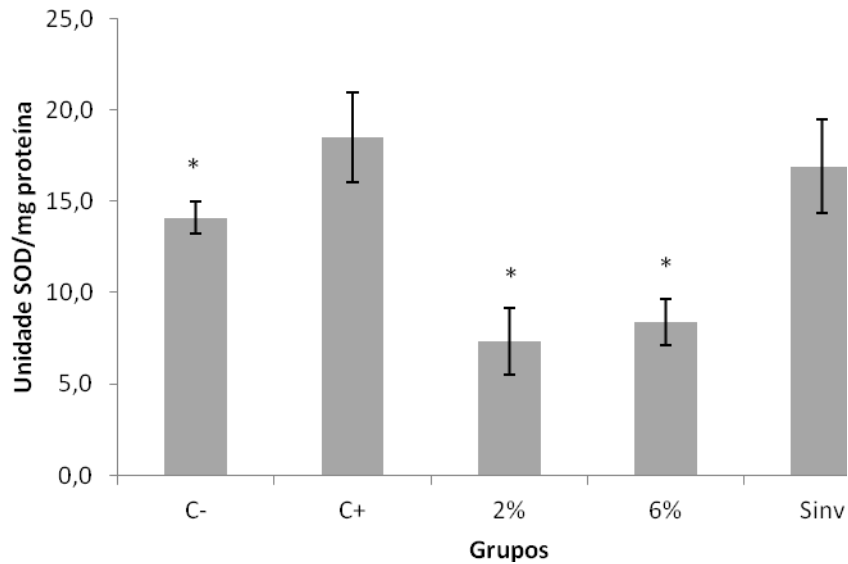


Figura 21 - Atividade da enzima superóxido dismutase após o tratamento. \* $p < 0,05$  comparado com o grupo C+, ANOVA, teste de Tukey.

HASSIMOTTO *et al.*<sup>136</sup> estudaram a absorção e metabolismo da cianidina-3-O-glucosídeo e da cianidina-3-O-rutinosídeo e demonstraram que mesmo uma pequena absorção de antocianinas em ratos Wistar é suficiente para aumentar a capacidade antioxidante do plasma.

Um estudo<sup>109</sup> identificou a cianidina 3-O-glucosídeo e a cianidina 3-O-rutinosídeo como as duas principais antocianinas de onze polpas comerciais e não comerciais de *Euterpe oleracea* e estas apresentaram boa capacidade antioxidante contra os radicais peróxil, peroxinitrito e radicais hidroxila. CHUN O.K. *et al.*<sup>137</sup> mostraram a atividade antioxidante da aglicona cianidina diante do radical superóxido entre todos os polifenóis de diferentes variedades de ameixas e exerceu um efeito protetor contra a toxicidade induzida por hidroperóxidos em cultura de fibroblastos humanos pulmonar.

TSUDA *et al.*<sup>26</sup> 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 SOD é um dos mais efetivos antioxidantes enzimáticos intracelulares por catalizar a dismutação do radical superóxido em oxigênio molecular ( $O_2$ ) e

em uma espécie menos reativa, o  $H_2O_2$ . Contudo, o  $H_2O_2$  em níveis aumentados, é também tóxico para o organismo e deve ser detoxificado pela catalase e/ou peroxidases. A CAT, presente nos peroxissomos, é muito eficiente na conversão do  $H_2O_2$  em água e em oxigênio molecular. Em condições normais, há um equilíbrio entre as reações que envolvem os oxidantes (EROs) e os antioxidantes, sendo mantidas as condições de vida. Entretanto, na ocorrência de um excesso de EROs e/ou uma deficiência de antioxidantes é estabelecido o processo de estresse oxidativo, podendo culminar com efeitos nocivos para o organismo.

## 7. CONCLUSÃO

Para a extração das antocianinas totais do açaí da palmeira da Mata Atlântica, espécie *Euterpe edulis* Martius, o solvente mais eficiente foi o etanol 80° com o agente acidulante ácido cítrico na concentração de 0,3%. A adição de 0,3g de ácido cítrico em 100 mL de etanol 80° foi o suficiente para alcançar o pH desejável da solução para a extração, sem ocasionar hidrólises na molécula do flavonóide e, conseqüentemente, na estimativa precisa do teor das antocianinas totais.

A quantidade de antocianinas totais, dosadas por HPLC, do extrato de açaí liofilizado foi de 2582,9 mg/100g de matéria seca. A cianidina 3-O-glucosídeo e a cianidina 3-O-rutinosídeo representam 36,88% e 63,12%, respectivamente, do teor das antocianinas encontradas no açaí da Mata Atlântica.

O teor de  $\beta$ -caroteno no extrato de açaí liofilizado foi de 2,39mg/100g de matéria seca. Na composição química do açaí encontrou-se 6,59% de proteínas, 16,80g de lipídeos totais e 67,84% de carboidratos. Na composição mineral do extrato liofilizado de açaí destacamos o teor de ferro 5,2 mg/100g, zinco 2,07 mg/100g e manganês 23,9 mg/100g de matéria seca. A análise fitoquímica demonstrou a presença de flavonóides, polifenóis e saponinas no açaí. O perfil lipídico indicou a presença majoritária de ácidos graxos insaturados.

A atividade antioxidante do fruto dosado como forma de captura de DPPH correspondeu à 42,72 mg/L para reduzir em 50% (EC50) a concentração

inicial do radical livre ou também como 3,55 g extrato de açaí liofilizado/g DPPH.

Os camundongos APOE -/- utilizados no ensaio biológico não apresentaram variação entre os grupos no controle de peso e consumo alimentar do início ao término do experimento. O açaí melhorou o perfil lipídico dos parâmetros do colesterol total e colesterol LDL. Com isso, as relações de risco: colesterol total/HDL-c e LDL-c/HDL-c dos grupos tratados com açaí diminuíram comparados ao grupo knockout ApoE (C+). Não houve redução das áreas das placas de ateroma dos grupos tratados. A glicemia dos camundongos tratados com açaí e da sinvastatina foi reduzida, demonstrando o efeito hipoglicemiante do extrato e a necessidade de estudos da homeostase glicêmica do fármaco, devido a possibilidade dos efeitos pleiotrópicos das estatinas. Não houve alteração nas enzimas hepáticas e na creatinina dos animais, demonstrando que houve segurança hepato e nefrotóxica para a ingestão de 2% e 6% de açaí na dieta.

As antocianinas presentes no extrato liofilizado de açaí tiveram uma boa contribuição para os resultados das enzimas catalase e superóxido dismutase investigadas nos fígados dos camundongos. A atividade antioxidante *in vivo* das enzimas SOD e CAT apresentaram redução após a dieta demonstrando que suas ações foram suprimidas pela presença dos antioxidantes naturais do açaí após absorção e metabolização do extrato liofilizado dos grupos de 2% e 6% de açaí.

## **8. PERSPECTIVAS**

A exploração sustentável dos frutos da *E. edulis* busca não somente uma possibilidade de obtenção de um alimento funcional ou nutracêutico, mas também pode representar uma alternativa para a conservação da espécie e para o equilíbrio da cadeia alimentar da Mata Atlântica, uma vez que, vários animais se alimentam dos frutos da espécie. É importante a realização de pesquisas que busquem avaliar o potencial nutricional e farmacológico dos frutos de *E. edulis*, de forma que esse produto possa alcançar um nível de domesticação da espécie e estudo de manejo, de modo a obter propriedades benéficas a saúde humana, agregando mais valor ao fruto dessa palmeira,



diminuindo a exploração indiscriminada do seu palmito e a consequente degradação da espécie.

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- <sup>1</sup> KONG JM, CHIA LS, GOH NK, CHIA TF, BROUILLARD R. Analysis and biological activities of anthocyanins. *Phytochemistry* 64;923-933: 2003
- <sup>2</sup> DOWNHAM A, COLLINS P. Colouring our foods in the last and next millennium. *Int J Food Sci Technol.*35(1);5-22: 2000
- <sup>3</sup> MARTINEZ-FLORES S, GONZALEZ-GALEGO J, CULEBRAS JM, TUNÓN MJ. Los flavonóides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutr Hosp.*17(6);271-8: 2002
- <sup>4</sup> KUSKOSKI EM et al., Actividad antioxidante de pigmentos antocianicos. *Cienc Tecnol Aliment* 24(4);691-3: 2004
- <sup>5</sup> QIN et al.. Anthocyanin supplementation improves serum LDL- and HDL-cholesterol concentrations associated with the inhibition of cholesteryl ester transfer protein in dyslipidemic subjects. *Am J Clin Nutr.* 90;485–92: 2009
- <sup>6</sup> LAGOS, AR, MILLER BLA. Hotspot Brasileiro Mata Atlântica. *Saúde & Ambiente em Revista.* v.22 p35-45; 2007
- <sup>7</sup> BRITO, ES; ARAÚJO, MCP; ALVES, RE; CARKEET, C; CLEVIDENCE, BA; NOVOTNY, JÁ. Anthocyanins Present in Selected Tropical Fruits: Acerola, Jambolão, Jussara, and Guajiru. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, v.55, n.23,2007.
- <sup>8</sup> WITZTUM, S., STEINBERG, D. The oxidative modification hypothesis of atherosclerosis: does it hold for humans? *Trends in Cardiovascular Medicine*, vol. 11, n. 3;p.93-102:2001.
- <sup>9</sup> MAC FADDEN, JA produção de açaí a partir do processamento dos frutos do palmito (Euterpeedulis Martius) na Mata Atlântica. Dissertação (Mestrado em Agroecossistemas) Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis-SC. 100f. 2005.
- <sup>10</sup> INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). Produção da Extração Vegetal e da Silvicultura. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br>. Acessado em Julho 2010
- <sup>11</sup> LORENZI, H., MOREIRA DE SOUZA, H., DE M. COSTA, JT., DE CERQUEIRA, LSC. & FERREIRA, E. Palmeiras Brasileiras e Exóticas Cultivadas. Instituto Plantarum. Nova Odessa, SP, 1-416: 2004
- <sup>12</sup> REIS, A. KAGEYAMA, PY.; REIS, MS. DOS & FANTINI, A. Demografia de Euterpeedulis Martius (Arecaceae) em uma floresta ombrófila densa montana, em Blumenau (SC). *Sellowia* 45/48:5-37. 1996
- <sup>13</sup> TSUKAMOTO FILHO, AA.; MACEDO, RLG.; VENTURIN,N.; MORAIS, AR. Aspectos fisiológicos e silviculturais do palmito (Euterpeedulis Martius) plantado em diferentes tipos de consórcios no município de Lavras, MG. *Revista Cerne*, v7, n1, 2001

- 
- <sup>14</sup> BIODIVERSITAS. Lista da Flora Brasileira Ameaçada de Extinção. Disponível em: [www.biodiversitas.org.br/floraBr/](http://www.biodiversitas.org.br/floraBr/). Acesso em junho de 2011.
- <sup>15</sup> MARCOS SC., MATOS DMS. Estrutura de Populações de Palmitero (*Euterpeedulis* Mart.) em Áreas com Diferentes Graus de Impactação na Floresta da Tijuca, RJ. *Floresta e Ambiente*. v.10, n.1, p.27 - 37, jan./jul 2003
- <sup>16</sup> LAGOS, AR, MILLER BLA. Hotspot Brasileiro, Mata Atlântica. *Saúde & Ambiente em Revista*. v.22 p35-45; 2007
- <sup>17</sup> SEOANE, CES et al..Efeitos da fragmentação florestal sobre a imigração de sementes e a estrutura genética temporal de populações de *Euterpe edulis* Mart. *Rev. Inst. Flor* , v.17, n. 1, p. 25-43.;2005
- <sup>18</sup> QUEIROZ, MH. Biologia do fruto, da semente e da germinação do palmitero *Euterpe edulis* Martius – *Arecaceae*. *Sellowia*. n.49/52, p.39-59, 2000.
- <sup>19</sup> FISCH,STV. Dinâmica de *Euterpe edulis* na Floresta Ombrófila densa Atlântica em Pindamonhangaba. Tese (Doutorado) - Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo. São Paulo. 126p;1998.
- <sup>20</sup> INSTITUTO DE PESQUISA E ESTUDOS FLORESTAIS (IPEA). Disponível em: <http://www.ipef.br/identificacao/euterpe.edulis.asp> Acessado em Julho 2011
- <sup>21</sup> KONG JM, CHIA LS, GOH NK, CHIA TF, BROUILLARD R. Analysis and biological activities of anthocyanins. *Phytochemistry* 64;923-933: 2003
- <sup>22</sup> DOWNHAM A, COLLINS P. Colouring our foods in the last and nest millennium. *Int J Food Sci Technol* 35(1);5-22: 2000
- <sup>23</sup> MARTINEZ-FLORES S, GONZALEZ-GALEGO J, CULEBRAS JM, TUNÓN MJ. Los flavonóides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutr Hosp* 17(6);271-8: 2002
- <sup>24</sup> KUSKOSKI EM et al., Actividad antioxidante de pigmentos antocianicos. *Cienc Tecnol Aliment* 24(4);691-3:2004.
- <sup>25</sup> QIN et al.. Anthocyanin supplementation improves serum LDL- and HDL-cholesterol concentrations associated with the inhibition of cholesteryl ester transfer protein in dyslipidemic subjects. *Am J Clin Nutr* 90;485–92: 2009.
- <sup>26</sup> TSUDA T, HORIO F, KITO J, OSAWA T. Protective effects of dietary cyanidin 3-O-β-D-Glucoside on liver ischemia-reperfusion injury in rats. *Archives Biochemistry and Biophysics* 368 (2);361-366:1999.
- <sup>27</sup> PRIOR, RL. Fruits and vegetables in the prevention of cellular oxidative damage. *Am J Clin Nutr* 78 (suppl) 570-578: 2003.
- <sup>28</sup> GALVANO F, LA FAUCI L, VITAGLIONE P, FOGLIANO V, VANELLA L, FELGINES C. Bioavailability, antioxidant and biological properties of the natural free-radical scavengers cyanidin and related glycosides. *Ann Ist Super Sanita*. 43(4);382-393: 2007
- <sup>29</sup> WU X, BEECHER GR, HOLDEN, JM, HAYTOWITZ DB, GEBHARDT SE, PRIOR RL, Concentrations of anthocyanins in common foods in the United States and estimation os normal consumption. *J. Agric. Food Chem*. 54;4069-75:2006

- 
- <sup>30</sup> ZUANAZZI, JAS, MONTANHA, JA, Farmacognosia: da planta ao medicamento. 5ª ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/ Editora da UFSC. p. 577-614. 2003
- <sup>31</sup> COHEN MV. Free radicals in ischemic and reperfusion myocardial injury: is this time for clinical trials? *Ann Intern Med* 111;918-31:1989
- <sup>32</sup> WANG et al.. Antioxidant and antiinflammatory activities of anthocyanins and their aglycon, cyanidin, from tart cherries. *J. Nat Prod* 62;294-96: 1999
- <sup>33</sup> BENERJEE A, DASGUPTA N, DE B, In vitro study of antioxidant activity of *Syzygium cumini* fruit. *Food Chemistry* 90(4);727-733: 2005
- <sup>34</sup> CALDWELL CR. Alkylperoxyl radical scavenging activity of red leaf lettuce (*Lactuca sativa* L) phenolics. *J Agric Food Chem.*51;4589-95:2003
- <sup>35</sup> ROSSETTO M, LANTE A, VANZANI P, SPETTOLI P, SCARPA M, RIGO A. Red chicories as potent scavengers of highly reactive radicals: a study on their phenolic composition and peroxyl radical trapping capacity and efficiency. *J Agric Food Chem.*53;8169-75:2005
- <sup>36</sup> KANO M, TAKAYANAGI T, HARADA K, MAKINO K, ISHIKAWA F. Antioxidative activity of anthocyanins from purple sweet potato, *Ipomoea batatas* cultivar Ayamurasaki. *Biosci Biotechnol Biochem* 69;979-88: 2005
- <sup>37</sup> CHUN OK, KIM DO, LEE CY. Superoxide radical scavenging activity of the major polyphenols in fresh plums. *J Agric Food Chem* 51;8067-72: 2003
- <sup>38</sup> RICE-EVANS CA, MILLER, NJ, PAPANGA G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic-acids. *Free Radic. Biol. Med* 20;933-956:1996
- <sup>39</sup> GALVANO F, LA FAUCI L et al.. Cyanidins:metabolism and biological properties. *J Nutr Biochem*15(1);2-11:2004
- <sup>40</sup> ACQUAVIVA R, RUSSO A, GALVANO F, GALVANO G et al.. Cyanidin and cyanidin 3-O-Beta-D-glucoside as DNA cleavage protectors and antioxidants. *Cell Biol Toxicol* 19;243-52: 2003
- <sup>41</sup> SERRAINO I, DUGO L, DUGO P, MONDELLO L et al.. Protective effects of cyanidin 3-O-glucoside from blackberry extract against peroxynitrite-induced endothelial dysfunction and vascular failure. *Life Sci* 73;1097-114: 2003
- <sup>42</sup> CHEN C., YI L., JIN X., MI M., ZHANG T. LING W., YU B. Delphinidin attenuates stress injury induced by oxidized low-density lipoprotein in human umbilical vein endothelial cells. *Chemico-Biological Interactions.*; 183(1);105-112:2010
- <sup>43</sup> PAWLOWICZ P, WILCZYNSKI J, STACHOWIAK G, HINCZ P. Administration of natural anthocyanins derived from chokeberry retardation of idiopathic and preclampic origin. Influence on metabolism of plasma oxidized lipoproteins: the role of antibodies to oxidize low density lipoproteins. *Ginekol Pol.*71(8);848-853:2000
- <sup>44</sup> GHISELLI A, NARDINI M, BALDI A, SCACCINI C. Antioxidant activity of different phenolic fractions separated from an Italian red wine. *Journal of Agricultural and food chemistry.* 46(2);361-367:1998

- 
- <sup>45</sup> GORELIK S, LIGUMSKY M, KOHEN R, KANNER J. A novel function of red wine polyphenols in humans: prevention of absorption of cytotoxic lipid peroxidation products. *Faseb J.* 22;41-6:2008
- <sup>46</sup> GARCIA-ALONSO M., MINIHANE AM., RIMBACH G., RIVAS-GONZALO JC., PASCUAL-TERESA S. Red wine anthocyanins are rapidly absorbed in humans and affect monocyte chemoattractant protein 1 levels and antioxidant capacity of plasma. *J. Nutritional Biochemistry.* 20;521-529:2009
- <sup>47</sup> DUTHIE SJ, GARDNER PT, MORRICE PC, WOOD SG et al.. DNA stability and lipid peroxidation in vitamin E-deficient rats in vivo and colon cells in vitro-modulation by dietary anthocyanin, cyanidin3-glycoside. *Eur J Nutr* 44;195-203:2005
- <sup>48</sup> HOGAN S, CHUNG H, ZHANG L, LI J, LEE Y, DAÍ Y, ZHOU K. Antiproliferative and antioxidant properties of anthocyanin-rich extract from açai. *Food Chemistry.* 118(2);208-214:2010
- <sup>49</sup> RUSSO A, LA FAUCI L, ACQUAVIVA R, CAMPISI A, RACITI G, SCIFO C, RENIS M, GALVANO G, VANELLA A, GALVANO F. Ochratoxin A-induced DNA damage in human fibroblast: protective effect of cyaniding 3-O-beta-d-glucoside. *J Nutr Biochem* 16;31-37:2005
- <sup>50</sup> DREISEITEL A, SCHREIER P, OEHME A, LOCHER S, ROGLER G, HEIDI P, HAJAK G, SAND PG. Inhibition of proteasome activity by anthocyanins and anthocyanidins. *Biochem Biophys Resear Communic.* 372(1);57-61:2008
- <sup>51</sup> JANG YP, ZHOU J, NAKANISHI K, SPARROW JR. Anthocyanins protect against A2E photooxidation and membrane permeabilization in retinal pigment epithelial cells. *Photochem Photobiol* 81;529-536: 2005
- <sup>52</sup> KAO ES et al.. Anthocyanin extracted from *Hibiscus attenuate* oxidizes LDL-mediated foam cell formation involving regulation of CD36 gene. *Chemico-Biological Interactions.* 179;212-218:2009
- <sup>53</sup> WANG CJ, WANG JM, LIN WL, CHU CY, CHOU FP, Tseng TH. Protective effect of *Hibiscus* anthocyanins against tert-butyl hydroperoxide-induced hepatic toxicity in rats. *Food and Chemical Toxicology.* 38(5);411-416:2000
- <sup>54</sup> FRANCIS F J. Food colorants: anthocyanins. *Critical Review of Food Science and Nutrition.* v.28, p.273-314:1989
- <sup>55</sup> LUSIS, A.J. Atherosclerosis. *Nature Reviews,* v.407;p.233-241:2000.
- <sup>56</sup> VANDERLAAN, AP.; REARDON, AC.; GETZ, SG. Site specificity of atherosclerosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology,* v.24, p.12-22, 2004.
- <sup>57</sup> SIQUEIRA, AFA.; ABDALLA, DSP.; FERREIRA, SRG. LDL: da síndrome metabólica à instabilidade da placa aterosclerótica. *Arq. Bras. Endocrinol Metabol.,* v. 50, nº 2, p. 334-343, 2006.
- <sup>58</sup> SINGH, U.; JIALAL, I. Oxidative stress and atherosclerosis. *Pathophysiology,* v. 13, p. 129-142, 2006.
- <sup>59</sup> ROSS, R. Atherosclerosis – an inflammatory disease. *N Engl J Med,* v. 340, p. 115-126, 1999.

- 
- <sup>60</sup> BROWN MS. & GOLDSTEIN JL. - Scavenging for receptors. *Nature*; v.343, p. 508-09, 1990.
- <sup>61</sup> STEINBERG, D. A critical look at the evidence for the oxidation of LDL in atherogenesis. *Atherosclerosis*. v. 131, suppl, p. S5-S7, 1997.
- <sup>62</sup> LEE, RT.; LIBBY, P. The unstable atheroma. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. v.17, p.1859-1867, 1997.
- <sup>63</sup> SPOSITO, AC. et al.. IV Diretriz Brasileira sobre dislipidemias e prevenção da aterosclerose: Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia. *Arq. Bras. Cardiol*. vol.88, suppl.1, pp. 2-19, 2007
- <sup>64</sup> WINTHER, MPJ; KANTERS, E.; KRAAL, G; HOFKER, MH. Nuclear Factor  $\kappa$ B Signaling in Atherogenesis. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, v. 25, p. 904-914, 2005.
- <sup>65</sup> KOVANEN, PT.; PENTIKAINEN, MO. Circulating lipoproteins as proinflammatory and anti-inflammatory particles in atherogenesis. *Curr Opin Lipidol*, v. 14, p. 411-419, 2003.
- <sup>66</sup> BATLOUNI, M. Hipótese oxidativa da aterosclerose e emprego de antioxidantes na doença arterial coronária. *Arq. Bras. Cardiol.*, v.68, n° 1, p. 55-63, 1997.
- <sup>67</sup> CHANG, YC.; HUANG, KX.; HUANG, AC.; HO, YC.; WANG, CJ. Hibiscus anthocyanins-rich extract inhibited LDL oxidation and oxLDL-mediated macrophages apoptosis. *Food and Chemical Toxicology*, v. 44, p. 1015–1023, 2006.
- <sup>68</sup> QIN Y et al.. Anthocyanin supplementation improves serum LDL and HDL cholesterol concentration associated with the inhibition of cholesteryl ester transfer protein in dyslipidemic subjects. *The American Journal of Clinical Nutrition* 90;485-92: 2009
- <sup>69</sup> SILVA, RC.; VALENTE, STX.; OLIVEIRA, TT.; NAGEM, TJ.; PINTO, AS.; COSTA, NBM. Efeitos de corantes naturais nos níveis séricos de colesterol-HDL em ratos hiperlipidêmicos. *Revista Brasileira de Análise Clínica.*, v.32, n.3, p.201-204, 2000.
- <sup>70</sup> OLIVEIRA, TT.; PEREIRA, WL.; PINTO, AS.; SANTOS, CA. Efeito regulatório de flavonóides e de carmim nos níveis de lipídeos em ratos Wistar. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.54, n.1, 2002
- <sup>71</sup> LIAO JK, LAUFS U. Pleiotropic effects of statins. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2004.
- <sup>72</sup> MIIDA T, HIRAYAMA S, NAKAMURA Y. Cholesterol-independent effects of statins and new therapeutic targets: ischemic stroke and dementia. *J Atheroscler Thromb*. 11;253–264:2004
- <sup>73</sup> GRÖNROS J. et al. Effects of rosuvastatin on cardiovascular morphology and function in an ApoE-knockout mouse model of atherosclerosis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 295: H2046–H2053, 2008

- 
- <sup>74</sup> HOFKER MH.; VAN VLIJMEN, BJ.; HAVEKES, LM. Transgenic mouse models to study the role of APOE in hyperlipidemia and atherosclerosis. *Atherosclerosis*. v.137;p.1-11:1998
- <sup>75</sup> DAUGHERTY, A. Mouse models of atherosclerosis. *American Journal of the Medical Sciences*, v. 323;p.3-10:2002.
- <sup>76</sup> DAVIGNON, J.; COHN, JS.; MABILE, L.; BERNIER, L. Apolipoprotein E and atherosclerosis: insight from animal and human studies. *Clinica Chimica Acta*, v.286; p. 115-143:1999.
- <sup>77</sup> MEIR, K.; LEITERSDORF, E. Atherosclerosis in the apolipoprotein E-deficient mouse: a decade of progress. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology* v.24; p.1006-1014:2004.
- <sup>78</sup> Conservação Internacional e Fundação SOS Mata Atlântica. Brasília. Ministério do Meio Ambiente; Conservação Internacional. 46 p; 2006
- <sup>79</sup> EMBRAPA. Sistema e produção do açaí, 2005. Disponível em: <http://sistemaproducao.cnptia.embrapa.br/Acai/SistemaProducaoAcai1ed/index.htm>. Acesso em agosto de 2010.
- <sup>80</sup> GIUSTI, M.; WROLSTAD, RE. Characterization and Measurement of Anthocyanins by UV-Visible Spectroscopy. New York: John Wiley & Sons, 2001.
- <sup>81</sup> SCHAUSS, AG.; WU, X.; PRIOR, RL.; OU, B.; PATEL, D.; HUANG, D.; KABABICK, JP. Phytochemical and nutrient composition of freeze-dried amazonian palm berry, *Euterpeoleraceae* Mart. (Acai). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. v. 54;p.8598-8603:2006.
- <sup>82</sup> GALLORI, S.; BILIA, A.; BERGONZI, M.; BARBOSA, W.; VINCIERI, F. Polyphenolic Constituents of Fruit Pulp of *Euterpeoleracea*, Mart. (Açaí palm). *Chromatographia*, New York, v. 59, n. 11/12, p.739-743;2004.
- <sup>83</sup> RODRIGUEZ-AMAYA, DB. Critical review of provitamin A determination in plant foods. *Journal of Micronutrient Analysis [S.I.]*, v. 5; p.191-225:1989.
- <sup>84</sup> RODRIGUEZ-AMAYA, DB. et al.. Carotenoid changes in ripening *Momordica charantia*. *Annals of Botany [S.I.]*, v. 40;p.615-624:1976.
- <sup>85</sup> PINHEIRO-SANT'ANA, HM. et al.. Carotenoid retention and vitamin A value in carrot (*Daucus carota* L.) prepared by food service. *Food Chemistry [S.I.]*, v.61, n.1-2; p.145-151:1998
- <sup>86</sup> CAMPOS, FM. et al.. Optimization of methodology to analyze ascorbic and dehydroascorbic acid in vegetables. *Química Nova [S.I.]*, v.32;p.87-91:2009.
- <sup>87</sup> A.O.A.C. Association of Official Analytical Chemistry. Official Methods of Analysis of A. O. A. C. 14 ed. Whashington; A. O. A. C., 1989.
- <sup>88</sup> FOLCH, J.; LEES, M.; SLOANE-STANLEY, G. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* v. 226, n.1;p.497 – 509; 1957.

- 
- <sup>89</sup> HARTMANN, L.; LAGO, RCA. Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. *Lab. Pract.* v. 22;p.475-477:1973
- <sup>90</sup> BRAND-WILIAMS, W.; CUVELIER, ME.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Science and Technology*, v.28;p.25-30:1995
- <sup>91</sup> RUFINO, MSM., et al.. Determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH. Comunicado técnico EMBRAPA. 2007.
- <sup>92</sup> REEVES, PG.; NIELSEN, FH.; FAHEY, GC. 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*. v.123;p.1939-51, 1993
- <sup>93</sup> XIA X. et al. An Anthocyanin-Rich Extract from Black Rice Enhances Atherosclerotic Plaque Stabilization in Apolipoprotein E-Deficient Mice. *J. Nutr.* 136: 2220–2225, 2006
- <sup>94</sup> PALINSKI, W.; ORD, VA.; PLUMP, AS.; BRESLOW, JL.; STEINBERG, D.; WITZTUM, JL. 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. *Arterioscler. Thromb.*, v.14 n.4;p. 605-616:1994.
- <sup>95</sup> AEBI, H. Catalase in Vitro. *Methods of Enzimology*, v.105; p.121-127:1984
- <sup>96</sup> LOWRY, OH.; ROSEBROUGH, NJ.; FARR, AL.; RANDALL, RJ.; Protein measurement with folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* v.193; p.265-75:1951
- <sup>97</sup> MINISTÉRIO DA AGRICULTURA E ABASTECIMENTO. Instrução normativa nº 12 de 10 de setembro de 1999. Padrões de identidade e qualidade para polpa de frutas.
- <sup>98</sup> MINISTÉRIO DA SAÚDE. Conselho Nacional de Saúde, resolução nº 4 de 24 de novembro de 1988. Revisão das tabelas de aditivos intencionais.
- <sup>99</sup> CONSTANT, PBL. Extração, caracterização e aplicação de antocianinas de açaí (*Euterpe oleracea*, M.). Tese doutorado/ DTA: UFV, 2003
- <sup>100</sup> OZELA, EF., STRINGHETA, PC., LIMA, AAS, FARIAS, MITS. estudo comparativo do teor de antocianinas presentes no açaí (*Euterpe oleracea* M), nos períodos de safra e entressafra. Livro de Programas e Resumos III Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos. Campinas, FEA, p.55 1999.
- <sup>101</sup> BOBBIO, FO., DRUZIAN, JI., ABRÃO, PA., BOBBIO, PA., FADELLI, S. Identificação e quantificação das antocianinas do fruto do açaizeiro (*Euterpe oleracea*) Mart. *Revista da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos*. v. 20, n. 3;p. 388-390:2000.
- <sup>102</sup> IADEROZA, M., BALDINI, ISD., BOVI, MLA. Anthocyaninins from fruits of açaí (*Euterpe oleracea*, Mart). *Trop. Sci.* v. 32;p 41-46:1992.
- <sup>103</sup> ROGEZ, H. Açaí: preparo, composição e melhoramento da conservação Belém: UFPA, 311p; 2000.

- 
- <sup>104</sup> DA SILVA CBG., et al., Chemical characterization, bioactive compounds, and antioxidant capacity of jussara (*Euterpeedulis*) fruit from the Atlantic Forest in southern Brazil, *Food Research International* (2011), doi:10.1016/j.foodres.2010.12.006
- <sup>105</sup> SILVA SR. Extração e estabilidade de pigmentos antociânicos de frutos de Maria-Pretinha (*Solanum americanum*. Mili.). Tese de Mestrado. Viçosa, Universidade Federal de Viçosa. 76 p. 1996
- <sup>106</sup> POMPEU, DR.; SILVA, EM.; ROGEZ, H. Optimization of the solvent extraction of phenolic antioxidants from fruits of *Euterpeoleracea* using response surface methodology. *Bioresour. Technol.*, 100(23):6076-82.2009
- <sup>107</sup> DEL POZO-INSFRAN. D. et al., Phytochemical composition and pigment stability of acai (*Euterpeoleracea* Mart.). *J. Agric. Food Chem.* 52;1539-1545:2004
- <sup>108</sup> ROSSO VV. et al., Determination of anthocyanins from acerola (*Malpighia emarginata* DC.) and ac- ai (*Euterpeoleracea* Mart.) by HPLC–PDA–MS/MS. *Journal of Food Composition and Analysis* 21;291–299:2008
- <sup>109</sup> LICHTENTHAHLER, R., RODRIGUES, RB., MAIA, JGS., PAPAGIANNOPOULOS, M., FABRICIUS, H., MARX, F., Total oxidant scavenging capacities of *Euterpeoleracea* Mart. (Açaí) fruits. *International Journal of Food Sciences and Nutrition* 56;53–64:2005.
- <sup>110</sup> RUFINO MSM., et al.. Free radical-scavenging behaviour of some north-east Brazilian fruits in a DPPH\_ system *Food Chemistry* 114;693–695:2009
- <sup>111</sup> MENEZES, EMS.; TORRES, AT.; SRUR, AUS. Valor nutricional da polpa de açaí (*Euterpe oleracea* Mart) liofilizada. *Acta Amaz.*, Manaus, v. 38;n. 2:2008.
- <sup>112</sup> NASCIMENTO, RJS., COURI, S., ANTONIASSI, R., FREITAS, SP. Composição em ácidos graxos do óleo da polpa de açaí extraído com enzimas e com hexano. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v.30, n.2;p.498-502:2008.
- <sup>113</sup> SCHIRMANN, GS. Composição em ácidos graxos do açaí (*Euterpe edulis*) de diversas regiões de Santa Catarina. Dissertação do Programa de Pós-Graduação em Agroecossistemas do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 91p, 2009
- <sup>114</sup> HORNSTRA, G. Importance of polyunsaturated fatty acids of the n-6 and n-3 families for early human development. *European Journal of Lipid Science and Technology*, v. 103;p. 379-389:2001.
- <sup>115</sup> APRIKIAN, O. et al., Lyophilized apple counteracts the development of hypercholesterolemia, oxidative stress, and renal dysfunction in obese Zucker rats. *J. Nutr.* 132;1969-1976:2002
- <sup>116</sup> NAISSIDES, M.; MAMO, JCL.; JAMES, AP.; PAL,S. The effect of acute red wine polyphenol consumption on post prandial lipaemia in postmenopausal women. *Atherosclerosis*. 1770;401-408:2004
- <sup>117</sup> BOSE, M. et al., The major green tea polyphenol, (-)-epigallocatechin-3-gallate, inhibits obesity metabolic syndrome, and fatty liver disease in high-fat-fed mice. *J. Nutr.* 138:1677-1683:2008



- 
- <sup>118</sup> AKILA, M.; DEVARAJ, H. Synergistic effect of tincture of *Crataegus* and *Mangifera indica* L. extract on hyperlipidemic and antioxidant status in atherogenic rats. *Vascul Pharmacol.* 49;173-177:2008.
- <sup>119</sup> HU, FB. et al., Dietary fat intake and the risk of coronary heart disease in women. *New Eng J Med.* 337;1491-1499:1997
- <sup>120</sup> FERNANDEZ, ML.; WEST, KL.; Mechanisms by which dietary fatty acids modulate plasma lipids. *J Nutr.* 135;2075-2078:2005
- <sup>121</sup> MIYAZAKI et al., 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 *J. Agric. Food Chem.* 56;11485–11492:2008
- <sup>122</sup> GRACE MH. et al.. Hypoglycemic activity of a novel anthocyanin-rich formulation from lowbush blueberry, *Vaccinium angustifolium* Aiton/ *Phytomedicine* 16;406–415:2009
- <sup>123</sup> CIGNARELLA, A., NASTASI, M., CAVALLI, E., PUGLISI, L., Novel lipid-lowering properties of *Vaccinium myrtillus* L. leaves, a traditional antidiabetic. *Thromb. Res.* 84;311–322:1996.
- <sup>124</sup> VALCHEVA-KUZMANOVA, S., KUZMANOV, K., MIHOVA, V., KRASNALEV, I., BORISOVA, P., BELCHEVA, A., Antihyperlipidemic effect of *Aronia melanocarpa* fruit juice in rats fed a high-cholesterol diet. *Plant Foods Hum. Nutr.* 62;19–24:2007.
- <sup>125</sup> JAYAPRAKASAM, B., VAREED, SK., OLSON, LK., NAIR, MG., Insulin secretion by bioactive anthocyanins and anthocyanidins present in fruits. *J. Agric. Food Chem.* 53:28–31;2005.
- <sup>126</sup> ANDERSON, RA., POLANSKY, MM., Tea enhances insulin activity. *J. Agric. Food Chem.* 50;7182–7186:2002
- <sup>127</sup> LANDRAULT, N., POUCHERET, P., AZAY, J., KROSNIAK, M., KROSNIAK, FM., GASC, F., JENIN, C., CROS, G., TEISSEDE, P., Effect of a polyphenols-enriched chardonnay white wine in diabetic rats. *J. Agric. Food Chem.* 51;311–318:2003.
- <sup>128</sup> WONG V. et al.. Atorvastatin induces insulin sensitization in Zucker lean and fatty rats. *Atherosclerosis.* 184(2);348-55:2006
- <sup>129</sup> SWEANY et al.. Effects of Simvastatin Versus Gemfibrozil on Lipids and Glucose Control in Patients with Non-Insulin-Dependent Diabetes Mellitus. *Clinical Therapeutics.* v.17, n.2;1995
- <sup>130</sup> FREEMAN DJ. et al.. Pravastatin and the development of diabetes mellitus: evidence for a protective treatment effect in the West of Scotland Coronary Prevention Study. *Circulation* 103;357-362:2001.
- <sup>131</sup> KEARNEY PM et al.. Efficacy of cholesterol-lower-ing therapy in 18,686 people with diabetes in 14 randomised trials of statins: a meta-analysis. *Lancet* 371;117-125:2008.
- <sup>132</sup> FURUYA DT. Efeitos da Atorvastatina sobre a inflamação e resistência à insulina em camundongos obesos. Tese. USP. 2008.

- 
- <sup>133</sup> XIE et al.. Açáí juice attenuates atherosclerosis in ApoE deficient mice through antioxidant and anti-inflammatory. *Atherosclerosis* 216;327– 333:2011
- <sup>134</sup> YANG, H.; ZHOU, L.; WANG, Z. L.; ROBERTS, L.J.; LIN, X.; ZHAO, Y.; GUO, Z. Overexpression of antioxidant enzymes in ApoE-deficient mice suppresses Benzo(a)pyrene-accelerated atherosclerosis. *Atherosclerosis*, v.207,n.1;p.51-58:2009.
- <sup>135</sup> BRAZ JR, DJ.; GUTIERREZ, PS.; DA LUZ, PL. Coronary fat content evaluated by morphometry in patients with severe atherosclerosis has no relation with serum lipid levels. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v.40,n.4;p.467-473:2007.
- <sup>136</sup> HASSIMOTTO NMA, GENOVESE MI., LAJOLO FM. Absorption and metabolism of cyanidin-3-glucoside and cyanidin-3-rutinoside extracted from wild mulberry (*Morus nigra* L.) in rats. *Nutrition Research* 28;198–207:2008
- <sup>137</sup> CHUN OK, KIM DO, LEE CY. Superoxide radical scavenging activity of the major polyphenols in fresh plums. *J Agric Food Chem* 51;8067-72:2003

### **CERTIFICADO**

A Comissão de Ética para Uso de Animais (CEUA) / UFV certifica que o processo n.º 56 / 2010, intitulado “Extração, atividades antioxidante e antiaterogênica dos frutos do açaí da Mata Atlântica (*Euterpe edulis Martius*” coordenado pela Professora Maria do Carmo Gouveia Peluzio do Departamento de Nutrição e Saúde está de acordo com o Código de Ética Profissional do Médico Veterinário, com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e com a legislação vigente, tendo sido aprovado por esta Comissão em 16/11/2010.

### **CERTIFICATE**

The Ethic Committee in Animal Use / UFV certify that the process number 56/ 2010, named “Extraction, antioxidant and antiatherogenic activities of açai fruit of the Atlantic forest (*Euterpe edukis martius*) ” is in agreement with the Medical Veterinary Professional Ethics Code, with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA) and with actual Brazilian legislation. This Departmental Commission on November 16, 2010 approved this process.

Viçosa, 16 de novembro de 2010

\_\_\_\_\_  
**Comissão de Ética para o Uso de Animais da UFV**  
(CEUA / UFV)