



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
CENTRO TECNOLÓGICO
CURSO DE MESTRADO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

PATRÍCIA BRITO SAMPAIO

Avaliação das propriedades funcionais do açaí (*Euterpe
oleracea*) em plasma humano

Belém/PA

2006



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
CENTRO TECNOLÓGICO
CURSO DE MESTRADO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

PATRÍCIA BRITO SAMPAIO

*Avaliação das propriedades funcionais do açaí (*Euterpe oleracea*) em plasma humano*

Dissertação de Mestrado apresentado ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Pará, para obtenção do grau de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

ORIENTADOR : Prof. Dr. Hervé Rogez

Belém/PA

2006

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Biblioteca Setorial do Curso de Mestrado em Engenharia Química

Sampaio, Patrícia Brito

Avaliação das propriedades funcionais do açaí (*Euterpe oleracea*) em plasma humano/ Patrícia Brito Sampaio; orientador, Hervé L. G. Rogez._ 2006.

Dissertação (Mestrado) . Universidade Federal do Pará, Centro Tecnológico, Curso de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Belém, 2006

1. Açaí 2. Antioxidantes 3. Açaí- propriedades funcionais I. Título

CDD.22. ed.613.286



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
CENTRO TECNOLÓGICO
CURSO DE MESTRADO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

PATRÍCIA BRITO SAMPAIO

Avaliação das propriedades funcionais do açaí (*Euterpe oleracea*) em plasma humano

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Hervé Louis Ghislain Rogez
(DEQAL/UFPA Orientador)

Prof. Dr. Luiz Carlos Santana da Silva
(DEF/UFPA Membro)

Prof. Dr. Silvain Henri Darnet
(DEQUAL/UFPA Membro)

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço a Deus, por ter me fortalecido e dado graças, em todos os momentos.

Ao meu orientador e sempre incentivador Prof. Dr. Hervé Rogez, por sua incansável dedicação à pesquisa e aos seus orientados.

Ao meu co-orientador Jesus Souza, pelas sugestões, correções, ensinamentos e direcionamento o meu muito obrigada.

Ao Professor Jean. François Rees e a técnica Cécile Marchand, pelo repasse de técnicas, gentileza, paciência e incentivo na realização das análises no Laboratório de Biologia Animal (BANI) da UCL (LLN, Bélgica).

Ao Evaldo Silva pelo apoio técnico e acolhida na Bélgica.

À Indústria CATA e à prestadora de serviço de alimentação Nutrilife na figura de Sidney Pantoja pelo carinho e apoio na realização do experimento nesta Indústria.

A todos os voluntários que aceitaram participar desta pesquisa, agradeço a confiança em mim depositada.

Ao Sr Dr. Paulo Azevedo, que em nome da pesquisa, emprestou as instalações de seu laboratório para a realização das análises bioquímicas, realizadas pela biomédica Ligya Corrêa, que nos auxiliou neste âmbito, com sua competência e bom humor.

Aos bolsistas da equipe Frutas, do Laboratório de Eng. Química da UFPA: Fagner Aguiar, Anne Suelen, Ana Carla Pelais, Carissa Bichara, Lorena Maciel, Fábio Moura, Evelyn Damasceno, Jozinete Silva, Darly Pompeu, Francly Souto e a Socorro Lopes e em especial a Camila Bastos os quais estiveram sempre solícitos em auxiliar-me.

Aos colegas de mestrado pelos ótimos momentos que passamos (e que ainda passaremos) juntos e por tantas palavras de incentivo nos momentos difíceis.

A todos que colaboraram direta ou indiretamente para a concretização deste trabalho.

Aos amigos que são como irmãos, que sempre nos acompanham nos momentos de incerteza, alegrias e realizações.

Finalmente, aos meus pais Edílson e Graça Sampaio e irmãos Hellen Kátia e Marco Aurélio que tiveram de conviver com a minha ausência em tantos momentos nesses dois últimos anos agradeço todo o amor, apoio, compreensão e respeito.

*“Pequenas modificações da dieta
levam a maiores reduções na
mortalidade geral e coronariana,
num estudo de prevenção
secundária, do que a que foi
obtida até hoje com todos
os estudos com drogas” A. Leaf*

(Leaf A. Dietary prevention of coronary disease.
The Lyon Heart Study *Circulation*; 99: 733-735, 1999.)

RESUMO

O Açaí é uma bebida rica em polifenóis, muito popular na região Amazônica. Com o objetivo de avaliar os efeitos no nível oxidativo sanguíneo, 350 ml de açaí foram adicionados diariamente à dieta de 30 homens voluntários (idade 41 ± 8.9 anos) durante 28 dias. Amostras de sangue foram coletadas em jejum por punção venosa nos dias 0, 10, 20 e 28 e as LDLs foram isoladas nos dias 0 e 28. Substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS) no plasma e LDL, oxidação do LDL induzida pelo cobre (CILO), Parâmetro Antioxidante de Captura de Radicais (TRAP) e capacidade de absorvência do radical oxigênio (ORAC) foram determinados para avaliar o padrão antioxidativo dos voluntários. A análise de Cluster foi utilizada para construir-se dois grupos de voluntários (mais e menos protegidos), de acordo com esses parâmetros antioxidantes no tempo zero. Neste tempo, o TBARS LDL foi 3 vezes maior no cluster 1 que no cluster 2 (3.8 ± 2.3 e 1.2 ± 0.5 , respectivamente) e esta mudança foi significativa para o cluster 1. Em geral, todos os parâmetros apresentaram tendência a aumento do padrão antioxidativo com o consumo de açaí: diminuição do plasma TBARS, aumento no tempo de latência do teste de CILO, estabilidade ou pequeno aumento dos valores de ORAC e TRAP. Essas mudanças, entretanto, não foram significativas estatisticamente ($p > 0.05$). Marcadores bioquímicos séricos e níveis lipídicos foram medidos enzimaticamente, porém nenhum efeito significativo foi observado. Esses resultados sugerem que o consumo de açaí possui efeitos anti-ateroscleróticos através da inibição substancial da peroxidação do LDL em pessoas susceptíveis.

ABSTRACT¹

Açaí is a very popular polyphenol-rich fruit juice in the Amazonian region. In order to evaluate its effects on blood oxidative level, 350 ml açaí juice were added to the daily diet of 30 male volunteers (aged 41 ± 8.9 years) during 28 days. Fasting blood samples were obtained by vein puncture on day 0, 10, 20 and 28 and LDLs were isolated on day 0 and 28. Plasmatic and LDL thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS), copper-induced LDL oxidation (CILO) and plasmatic TRAP (Total radical-trapping antioxidant parameter) and ORAC (Oxygen radical absorbance capacity) values were determined to evaluate the antioxidative status of the subjects. Cluster Analysis was used to build up two groups of subjects (more versus less protected), according to these antioxidant parameters on day 0. At that time, the LDL TBARS were three times higher in cluster 1 than in cluster 2 (3.8 ± 2.3 and 1.2 ± 0.5 , respectively). On day 28, these values had gone down (1.6 ± 0.9 and 1.1 ± 0.6 , respectively) and the change was significant for cluster 1. More generally, all parameters tended to show an improvement of the antioxidative status with açaí: decrease of plasma TBARS, increase of lag time in the CILO test, stability or small increase of ORAC and TRAP values. These changes were however not statistically significant ($p>0.05$). Serum biochemical markers and lipid levels were measured enzymatically, but any significant effect was observed. These results suggest that the consumption of açaí juice has anti-atherosclerotic effects through the substantial inhibition of LDL peroxidation in susceptible subjects.

¹ This Abstract is part of the accepted Short Communication: SAMPAIO, P.B., ROGEZ, H., SOUZA, J.N.S., REES, J-F., LARONDELLE, Y. Antioxidant properties of açaí (*Euterpe oleracea*) in human plasma. XXIII International Conference on Polyphenols, 22-25 August 2006, Winnipeg, Canada, to be published in the *öPolyphenols Communications 2006ö*.

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Teores em Nutrientes do Açaí em Relação à Matéria Seca, projeção por litro de Açaí Médio (a 12,5% de M.S.) e Recomendações Nutricionais.....	17
TABELA 2 - Principais Classes de Lipoproteínas no Plasma Humano.....	25
TABELA 3 - Valores de referência em CT, LDL-C, HDL-C e TG para adultos (>20anos).....	29
b) Reagentes	38
TABELA 4 - Caracterização da bebida açaí oferecida aos voluntários durante a pesquisa.....	41
TABELA 5 - Classificação do Índice de Massa Corpórea (IMC) dos voluntários, de acordo com sua faixa etária.....	42
TABELA 6 - Valores médios e desvios padrões de Triglicerídeos (TG), Colesterol Total (CT) e frações LDL-C e HDL-C em cada cluster durante o período de consumo de açaí.....	43
TABELA 7 - Valores médios e desvios padrões das análises bioquímicas de glicose, fosfatase alcalina e transaminase glutâmico pirúvica (TGP) dos 30 voluntários durante 28 dias de consumo de açaí.	44
TABELA 8 - Valores médios e desvios padrões das análises antioxidantes dos voluntários através da determinação de TBARS LDL e plasmático, dienos conjugados e valores plasmáticos de TRAP e ORAC em cada cluster durante o período de consumo de açaí.....	45
TABELA 9 - Correlações entre as médias normalizadas de todas as experiências realizadas (n = 30) os casos em negrito representam os valores significativos ($p < 0,05$).....	48

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1- Estrutura molecular das antocianinas.....	22
FIGURA 2 - Estrutura da molécula de colesterol.....	24
FIGURA 3 - Formação da placa aterosclerótica.....	27
FIGURA 4 - Fotografia representando as lipoproteínas isoladas em tubo Beckman após a primeira centrifugação.....	35
FIGURA 5 - Fotografia mostrando as lipoproteínas separadas por sua diferença de densidade após a segunda centrifugação.....	36
FIGURA 6 - Molécula de TBARS.....	38
FIGURA 7 ó Representação dos valores médios normalizados dos 4 parâmetros antioxidantes encontrados no tempo 0, utilizados para a divisão dos voluntários (n=30) em dois grupos pelo método de <i>clustering</i>	43
FIGURA 8ó Evolução média no plasma (A) do ORAC e (B) do TRAP, durante o período de 28 dias de consumo do açaí (n=30).	46

LISTA DE ABREVIATURAS

- β -PE - β -Ficoeritrina
- AAPH - 2,2 ϕ -Azobis 2-Amidino Propano Diidrocloreto
- BCA δ Bicinchoninic acid (Ácido bicinchonínico)
- BSA - Bovin Serum Albumin (Albumina Sérica Bovina)
- CG-MS - Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas
- DMF - Dimetilformamida
- EDTA - Ácido Etilenodiamonotetracético
- FA - Fosfatase Alcalina
- FRAP- Ferric Reducing Ability of Plasma (Habilidade Redutora do Ferro Plasmático)
- HDL - High Density Lipoprotein (Lipoproteínas de Alta Densidade)
- HETE - Hidroxieicosatetraenóico
- IMC - Índice de Massa Corporal
- LDL - Low Density Lipoprotein (Lipoproteína de Baixa Densidade)
- MDA - Malonaldeído
- ORAC - Oxygen Radical Absorbance Capacity (Capacidade de Absorbância do Radical Oxigênio)
- PBS - Phosphate Buffered Saline (Solução Tampão Fosfato)
- PUFA - Poliunsaturated Fatty Acids (Ácidos Graxos Poliinsaturados)
- ROS - Reactive Oxygen Species (Espécies Reativas do Oxigênio)
- TBA - Ácido Tiobarbitúrico
- TBARS - Thiobarbituric Acid Reactive Substances (Substâncias Reativas do Ácido Tiobarbitúrico)
- TCA - Ácido tricloroacético
- TGP - Transaminase Glutâmico Pirúvica
- TRAP - Trapping Radical Antioxidant Parameter (Parâmetro Antioxidante de Captura de Radicais)
- TRIS - Trishidroximetil aminometano
- VLDL -Very Low Density Lipoprotein (Lipoproteína de Muito Baixa Densidade)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	14
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1 O AÇAÍ.....	15
2.1.1 Generalidades	15
2.1.2 Composição Nutricional do Açaí.....	16
2.2 RADICAIS LIVRES E REAÇÕES RADICALARES	18
2.2.1 Os radicais livres	18
2.2.3 Medidas da peroxidação lipídica	19
2.3 ANTIOXIDANTES.....	20
2.3.1 Definição	20
2.3.2 Medidas da Capacidade Antioxidante	20
2.3.3 Mecanismos de Ação	21
2.4 ANTOCIANINAS.....	21
2.4.1 Generalidades	21
2.4.2 Mecanismos de Absorção.....	22
2.4.3 Efeitos Farmacológicos	23
2.5 COLESTEROL	24
2.5.1 Generalidades.....	24
2.5.2 Sistema de Transporte do Colesterol no Sangue	25
2.6 OS ANTIOXIDANTES E A ATEROSCLEROSE.....	25
2.6.1 A Formação da Placa de Ateroma e as Doenças Cardiovasculares	25
2.6.2 Antioxidantes como fator de Proteção a Aterosclerose.....	27
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	28
3.1 SELEÇÃO DE VOLUNTÁRIOS.....	28
3.2 AMOSTRAS DE AÇAÍ.....	28
3.3 COLETA E PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS DE SANGUE.....	29
3.4 ANÁLISES LABORATORIAIS	29
3.4.1 Análises bioquímicas	29
3.4.2 Análises de dosagens de antioxidantes.....	30
3.4.3 Avaliação da capacidade antioxidante.....	31
3.4.4 Isolamento das LDL α e parâmetros de oxidação das mesmas	34
3.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	40
3.5.1 Análises sobre o conjunto de indivíduos	40
3.5.2 Análises subdividindo o grupo de voluntários em 2 subgrupos	40
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	41
4.1 CARACTERIZAÇÃO DA BEBIDA AÇAÍ.....	41
4.2 PERFIL DOS VOLUNTÁRIOS.....	42
4.3 FORMAÇÃO DOS GRUPOS ATRAVÉS DA ANÁLISE DE CLUSTER	42
4.4 ANÁLISES BIOQUÍMICAS.....	43

4.5 PARÂMETROS ANTIOXIDANTES.....	44
4.5.1 Análise de susceptibilidade a peroxidação pelo teste TBARS	45
4.5.2 Análise da susceptibilidade das LDL a oxidação e formação de dienos conjugados	45
4.5.3 Análise da capacidade antioxidante do plasma pelos métodos ORAC e TRAP.....	46
4.6 CORRELAÇÃO ENTRE AS ANÁLISES	46
5. CONCLUSÕES	50
6. REFERÊNCIAS.....	51
7. ANEXOS.....	58

1. INTRODUÇÃO

Pesquisas no campo dos flavonóides têm aumentado desde a descoberta do paradoxo francês nos anos setenta, o qual mostrou que o alto consumo de gordura saturada não implica necessariamente numa alta taxa de mortalidade por doenças cardiovasculares. De fato, naquele país, além do alto consumo de gorduras (queijos), há a associação destas ao consumo de vinho tinto e, portanto, de flavonóides (NIJVELDT *et al.*, 2001).

A dieta mais recomendada atualmente como saudável para as populações, principalmente com a meta de reduzir a prevalência de enfermidades cardiovasculares, é a consumida rotineiramente por populações da região do Mediterrâneo. O denominador comum da chamada dieta do Mediterrâneo é: maior ingestão de frutas, verduras e peixes com consumo de vinho tinto, rico em compostos fenólicos e azeite de oliva, este último devido o seu conteúdo em ácido oléico (AZEVEDO, 1999).

A classe dos flavonóides inclui uma imensa variedade de compostos fenólicos apresentando estrutura química C₆-C₃-C₆ (MADHAVI *et al.*, 1995). Entre os flavonóides, as antocianinas merecem um lugar de destaque por apresentarem ações funcionais e por serem responsáveis pela coloração da maior parte das frutas e das folhas. Os frutos do açazeiro constituem um exemplo notório, tendo uma concentração média destes pigmentos de 440 mg/Kg de frutos (ROGEZ, 2000).

As antocianinas são reconhecidas por apresentar propriedades medicinais em vários países. Estas têm sido reportadas sobre seus efeitos positivos em tratamentos de várias doenças resultantes de fragilidade cardíaca, tal como prevenção de colesterol-induzido, aterosclerose e inibição da agregação de plaquetas (CAO *et al.*, 2001).

As antocianinas atuam inibindo a formação de radicais livres, interceptando-os uma vez formados e reparando a lesão induzida por tais elementos. Em termos de desenvolvimento de doença coronariana a inibição da oxidação das lipoproteínas de baixa densidade (LDL_{ox}) é a que tem melhor caracterização (TRIBBLE *et al.*, 1999).

Nesse sentido este trabalho tem por objetivos:

- Avaliar se os flavonóides presentes na bebida açáí podem modificar parâmetros antioxidantes plasmáticos (capacidades antioxidantes ORAC, TRAP, oxidabilidade das LDL_{ox}, etc.) no decorrer de 4 semanas de consumo de açáí;
- Avaliar como os principais parâmetros bioquímicos do plasma (enzimas hepáticas, glicose, colesterol total e frações) evoluem durante 4 semanas de consumo de açáí;

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 O AÇAÍ

2.1.1 Generalidades

A palmeira *Euterpe oleracea* Martius é vulgarmente conhecida no Brasil e na Região Amazônica, como açazeiro. É uma das mais típicas do Pará, possuindo seguramente seu indigenato, em razão de sua importância alimentar, especialmente entre as classes média e baixa (CAVALCANTE, 1976).

Nativo do estuário do Rio Amazonas, o açazeiro é encontrado nas matas de terra-firme, igapó e, sobretudo, nas áreas de várzea. Cresce em forma de touceira, a qual é constituída por estipes, que frutificam na sua fase adulta, com a produção máxima ocorrendo entre 5 a 6 anos de idade (ROGEZ, 2000).

A fruta do açazeiro tem uma forma globulosa arredondada e é composto por caroço e polpa, com diâmetro de 1 a 2 cm e um peso médio de 0,8 a 2,3 g (CAVALCANTE, 1976; BOVI e CASTRO, 1993; OLIVEIRA, 1995).

A polpa do fruto representa 5 a 15% de seu volume, variando de acordo com tipo e grau de maturidade (PAULA, 1995).

Cada fruto possui um caroço cercado de um penacho de fibras, recoberto por uma fina cutícula oleosa. O caroço possui um pequeno endosperma sólido. O pericarpo é parcialmente fibroso, rico em sílica e pobre em lipídios, proteínas e amido. O endocarpo é pouco lenhoso e seu endosperma é ligado ao tegumento. Na maturidade, o endosperma é rico em celulose, hemicelulose e cristais de inulina, enquanto antes é rico em lipídios. O embrião é pequeno, com um cotilédone rico em grãos de amido e pobre em cristais de inulina (ROGEZ, 2000).

A frutificação do açazeiro pode ocorrer durante o ano inteiro, sendo a estação menos chuvosa, de julho a dezembro, o período de maior abundância e de fruto tuíra, o qual é de maturação ideal, apresentando máculas brancacentas de cerosidade, proporcionando suco de melhor qualidade (CAVALCANTE, 1976).

Os frutos são de cor verde, antes de maduros e permanecem nesta cor no caso das variedades Verde e Tinga. No caso da variedade Preto, os frutos se tornam violeta/púrpura muito escura. As variedades dos frutos se diferenciam de acordo com características fenotípicas e pela presença ou não de antocianinas (ROGEZ, 2000).

Os frutos do açazeiro fornecem um subproduto: òo açái ou bebida açafõ. Conforme Rogez (2000), o preparo desta bebida se faz tradicionalmente em duas etapas: numa primeira, com o amolecimento dos frutos na água morna e numa segunda, pelo despulpamento dos mesmos mediante máquinas convencionais, com a adição de água.

Segundo a Legislação do Ministério da Agricultura (BRASIL, 1997), de acordo com a adição ou não de água e seus quantitativos, o produto é classificado em:

a) Polpa de açái: é a polpa extraída do açái, sem adição de água, por meios mecânicos e sem filtração, podendo ser submetido a processo físico de conservação.

b) Açaí grosso ou especial (tipo A): é a polpa extraída com adição de água e filtração, apresentando acima de 14% de sólidos totais e uma aparência muito densa.

c) Açaí médio ou regular (tipo B): é a polpa extraída com adição de água e filtração, apresentando acima de 11 à 13,9% de sólidos totais e uma aparência densa.

d) Açaí fino ou popular (tipo C): é a polpa extraída com adição de água e filtração, apresentando de 8 à 10,9% de sólidos totais e uma aparência pouco densa.

Para Calzavara (1976), esta bebida faz parte do hábito alimentar da população paraense, principalmente na do interior do Estado e nas pertencentes a camadas de baixa renda, residentes nos centros urbanos. Estes segmentos da população estadual têm a bebida açaí como um dos componentes básicos de sua alimentação.

Na capital do Estado do Pará (Belém), o açaí chega a constituir-se no prato principal das refeições diárias das famílias de baixa renda, complementado, usualmente, por farinha de mandioca, peixe, carne seca ou camarão frito.

Vem ocorrendo uma crescente demanda em nível nacional, principalmente na Região Centro-Sul, nos Estados do Rio de Janeiro e São Paulo, atendendo a um público-alvo específico: a jovem "geração saúde", os quais foram atraídos pelas propriedades calóricas, medicinais e nutricionais da bebida (ROGEZ, 2000).

Este hábito alimentar desencadeia uma atividade produtiva econômica e socialmente relevante na economia informal do Estado do Pará, por ser responsável pela geração de um grande número de empregos informais diretos, que se distribuem na produção e comercialização da bebida, e indiretos, como a produção artesanal de paneiros, os quais são utilizados no armazenamento dos frutos (CALZAVARA, 1976).

2.1.2 Composição Nutricional do Açaí

O consumo médio diário pela população do interior paraense é de aproximadamente um litro de açaí, fino ou médio.

Considerando o consumo de um litro de açaí médio (a 12,5% de matéria seca), pode-se quantificar os nutrientes ingeridos por esta população e compará-los com as recomendações nutricionais, apresentado na Tabela 1 (os valores são expressos em base de matéria seca, em virtude da grande variedade de resultados obtidos em relação ao teor em água do alimento em questão).

Tabela 1. Teores em Nutrientes do Açaí em Relação à Matéria Seca, projeção por litro de Açaí Médio (a 12,5% de M.S.) e Recomendações Nutricionais.

Variável	Geral			Teor	Qtd	% Qtd
	X	S	n	/l açaí	recom.	Recom.
PH	5,23	0,27	129	-	-	-
Matéria graxa (%)	52,64	5,23	124	65,8 g	100	66
Mat. Nitrog. total (%)	10,05	1,15	129	12,6g	40-50	25-31
Glicose (%)	1,55	0,50	32	1,9 g		
Frutose (%)	1,36	0,69	32	1,7 g	55-72	5-7
Sacarose (%)	0,05	0,09	32	0,06 g		
Fibras (%)	25,22	6,71	14	31,5 g	35	90
Anto. (mg/kg frutos)	440	221	60	-	-	-
Cinzas totais (%)	3,09	0,84	127	3,86 g	-	-
Ca (g/kg M.S.)	3,09	1,04	127	386 mg	900	43
P (g/kg M.S.)	1,47	0,52	127	184 mg	800	23
Mg (g/kg M.S.)	1,78	0,53	127	222 mg	375	59
K (g/kg M.S.)	9,90	3,37	127	1,2 g	1,6-3,1	39-75
Na (g/kg M.S.)	0,76	0,42	127	95 mg	575-3500	3-16
Zn (mg/kg M.S.)	17,30	6,42	127	2,2 mg	15	15
Cd (mg/kg M.S.)	0,46	0,15	127	57 µg	-	-
B (mg/kg M.S.)	15,84	4,36	127	2,0 mg	1,3	> 100
Fe (mg/kg M.S.)	20,59	7,26	127	2,6 mg	11	23
Mn (mg/kg M.S.)	323	174	127	40,4mg	2-5	> 100
Cu (mg/kg M.S.)	13,76	4,40	127	1,72mg	1,1	> 100
Ni (mg/kg M.S.)	2,03	0,96	127	254 mg	400	63
Cr (mg/kg M.S.)	5,31	2,23	127	664 µg	50-100	> 100

FONTE: ROGEZ (2000).

Legenda: X = valor médio; S = desvio padrão; n = número de amostras analisadas;

Qte. recom. = quantidade recomendada para um homem adulto de 25 a 45 anos, de peso médio; M.S. = matéria seca; anto. = antocianinas.

O açaí constitui uma excelente contribuição, superior a 65% do valor recomendado, em matéria graxa, α -tocoferol, fibras, manganês, cobre, boro e cromo; mesmo que não existam referências, deve-se inserir neste grupo as antocianinas. Fornece também quantidades notáveis, entre 25% e 65% do valor recomendado, de proteínas, cálcio, magnésio, potássio e níquel. É pobre, inferior a 25% do valor recomendado, em açúcares totais, fósforo, sódio, zinco e ferro (ROGEZ, 2000).

A cor típica do açaí preto é roxo-avermelhada e deve-se à presença de pigmentos naturais chamados antocianinas, substância pertencente à família dos flavonóides, as quais serão abordadas posteriormente.

Segundo Rogez (2000), o teor aproximado de antocianina é de 440mg/kg de frutos (Tabela 1). Expressando-se este teor por 100g de extrato seco, obtém-se um valor médio de 1,02g, ou seja, cerca de 1% da matéria seca é constituída destes antioxidantes. Assim, a ingestão de um litro de açaí médio a 12,5% de teor em matéria seca fornece 1,28g de antocianinas, em média.

Em relação ao perfil de composição do açaí, um fato interessante é a quantidade total de α -tocoferol presente no fruto (45mg / 100g de matéria seca), o que faz deste alimento uma fonte considerável, visto que sua recomendação varia de 5 a 15mg/dia para um adulto. No que diz respeito à matéria

nitrogenada total observa-se um teor elevado (10,05% em relação à matéria seca) em comparação aos outros frutos.

Um litro de açaí médio apresenta apenas 3,7g de açúcares assimiláveis, ou seja, uma média de 2,96% da matéria seca de glicose, frutose e sacarose. Portanto, o açaí não é uma fonte energética de rápida disponibilidade e, ao contrário de mitos estabelecidos, pode a priori ser oferecida aos diabéticos (ROGEZ, 2000).

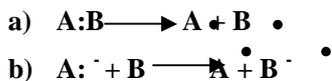
Sua concentração em fibras alimentares totais é extremamente interessante por apresentar 25,22% da matéria seca, em média, ou seja, um litro de açaí médio contém aproximadamente 31,5g de fibras alimentares totais, correspondendo a 90% das recomendações diárias (35g para o adulto) (ROGEZ, 2000).

Por todas essas características, o açaí pode ser considerado um dos frutos mais nutritivos da Amazônia.

2.2 RADICAIS LIVRES E REAÇÕES RADICALARES

2.2.1 Os radicais livres

Os radicais livres são as espécies químicas (átomos ou moléculas) que possuem um ou mais elétrons desemparelhados no orbital atômico, resultado da ruptura homolítica de uma ligação covalente (a) ou de reações de transferências de elétrons (b) (NUTTAL *et al*, 1999).



O campo magnético criado pela rotação ou spin desses elétrons não é compensado pela rotação em sentido inverso de um elétron emparelhado. Essa propriedade permite aos radicais livres interagir com diferentes moléculas, notadamente nas reações em cadeia, sendo o exemplo mais conhecido a peroxidação lipídica (MARCH, 1992).

Os radicais livres do oxigênio ou do nitrogênio não são necessariamente tóxicos. Ao contrário, eles são produzidos por diversos mecanismos fisiológicos a fim de destruir as bactérias no centro das células fagocitárias como os macrófagos ou para regularizar as funções celulares (vasodilatação, proliferação, apoptose). Motivo do qual a toxicidade não resulta de um excesso de radicais provenientes de um defeito da capacidade antioxidante ou de uma produção massiva por desregulação de mecanismos fisiológicos (inflamação) ou da exposição a fontes de oxigênio ligadas ao ambiente (tabagismo, álcool, medicamentos, raios gama ou ultravioletas, herbicidas, ozônio, metais tóxicos). Esse desequilíbrio entre os sistemas de defesa e de produção de radicais livres (balanço antioxidante) envolvidos nas lesões bioquímicas, macromoléculas e células orgânicas é chamado de estresse oxidativo (NUTTAL, 1998).

2.2.2 As espécies reativas do oxigênio

O termo espécies reativas do oxigênio (*Reactive Oxygen Species*) denomina o conjunto de espécies particularmente reduzidas formadas a partir do oxigênio molecular (O_2) como o radical superóxido ($\text{O}_2^{\cdot -}$), hidroxila (OH^{\cdot}), alcóxila (RO^{\cdot}) e peróxila (RO_2^{\cdot}) além de espécies não radicalares derivadas do

oxigênio, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o oxigênio singlete (1O_2), o ácido hipocloroso (HOCl) e ozônio. Eles são constantemente formados no corpo humano e estão implicados na patologia de numerosas doenças (PINCEMAIL *et al*, 2002).

Entre os efeitos negativos bem conhecidos da formação excessiva de ROS nos sistemas biológicos, pode-se citar a peroxidação dos lipídios na membrana, o dano oxidativo dos ácidos nucléicos e carboidratos, além da oxidação da sulfidril e de outros grupos das proteínas (MIDDLETON *et al.*, 2000).

2.2.3 Medidas da peroxidação lipídica

Ao contrário do mecanismo e da significação biológica da peroxidação lipídica que já são largamente debatidos na literatura, não há consenso sobre os métodos de medição.

Os indicadores mais comuns para medição do dano oxidativo dos lipídios são:

- ✓ Medida de hidroperóxidos;
- ✓ Medida de isoprostanas;
- ✓ Medida de dienos conjugados;
- ✓ Medida de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).

Os hidroperóxidos (HETE) e as isoprostanas são biologicamente ativos. Os HETE são produtos estáveis formados durante a peroxidação de lipídios insaturados, como ácidos graxos e colesterol. Eles são quimiotáticos para os neutrófilos e facilitadores da captação de cálcio e da mobilização da proteína quinase C. Os HETE podem ser medidos por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-MS). Esse método mede os hidroxiácidos (álcoois lipídicos) originalmente presentes no material biológico e mais os gerados a partir de peróxidos presentes por redução antes da análise (ARUOMA, 1998; HALLIWELL, 2000).

As isoprostanas constituem uma série de compostos que se assemelham as prostaglandinas e se formam especialmente durante a peroxidação do ácido araquidônico; da mesma forma, outros produtos similares são produzidos a partir de outros PUFA (ARUOMA, 1998). As isoprostanas e seus metabólitos podem ser medidos na urina. Esse teste não é aplicável no caso de testes *in vivo* ou *ex vivo*.

A resistência das LDLs do plasma a oxidação *in vitro* pode ser medida através do tempo de latência na formação de dienos conjugados após a adição de um pró-oxidante, tal como o cobre, que é considerado como o melhor indicador do grau de proteção antioxidante, obtida *in vivo* (FRUEBIS *et al.*, 1997).

Alguns estudos mostram que o efeito inibidor da catequina, quercetina e de outros flavonóides sobre a peroxidação lipídica é geralmente avaliado a partir da dosagem de produtos finais da degradação de ácidos graxos como, por exemplo, os dienos conjugados ou o malonaldeído (COTELLE *et al*, 1996). Esse último é dosado por medida colorimétrica de um produto cromogênio com o ácido tiobarbitúrico (Teste TBARS).

Entretanto, é provado que os peróxidos e os aldeídos que são originados da alimentação, podem ser absorvidos através do intestino e podem potencialmente interferir nas medições de MDA (particularmente na urina), dos TBARS e também dos peróxidos plasmáticos (HALLIWELL, 2000).

A capacidade oxidante pode também ser estimada através das medidas de defesa anti-radicalares, sejam enzimáticas (Ex: catalase e superóxido dismutase) ou não (Ex: glutatona, vitaminas A, E e C).

2.3 ANTIOXIDANTES

2.3.1 Definição

Em circunstâncias normais, existe um grande número de antioxidantes, sintetizados pelas células ou ingeridos através da alimentação que formam uma defesa natural contra os danos induzidos pelas espécies reativas ao oxigênio (ALHO e LEINONEN, 1999; FRANKEL, 2000). Um antioxidante pode ser definido como sendo um composto capaz de parar um mecanismo de alteração radicalar.

2.3.2 Medidas da Capacidade Antioxidante

Existe um grande número de métodos utilizados para medir a oxidação, mas não existe nenhum método padrão de referência. Diversos testes rápidos foram propostos para medir a atividade antioxidante. Alguns problemas surgem devido à utilização de métodos rápidos unidimensionais para avaliar os antioxidantes naturais, que são geralmente multifuncionais (FRANKEL e MEYER, 2000).

Alguns protocolos utilizados para testar os antioxidantes nas matrizes alimentares ou em sistemas biológicos consistem na oxidação de um substrato lipídico ou lipoprotéico sob condições padronizadas e a avaliação da atividade por métodos variados (químicos ou instrumentais) para determinar o quanto a oxidação é inibida.

As características essenciais de todos os testes são: um substrato adaptado, um iniciador de oxidação (indutor) e uma medida apropriada do ponto final da reação. As combinações de substratos, iniciadores e ponto final são numerosas (ROBARDS, 1999).

Dentre esses substratos, podemos citar o ácido linoléico, fosfatidilcolinas, lipossomos, diversos lipídios, lipoproteínas humanas (LDL) ou ainda os fosfolipídios membranares (FRANKEL e MEYER, 2000).

Algumas vezes, com o mesmo reativo, diferentes estratégias analíticas são possíveis como as de medida de inibição a um momento fixado, ao longo da reação ou ainda medidas do tempo de latência ou de descoloração. Uma avaliação correta da atividade antioxidante requer a utilização de vários métodos diferentes incluindo diferentes mecanismos de inibição da oxidação lipídica (ROBARDS, 1999).

Dentre os protocolos de medida da capacidade de captação de radicais livres pelos antioxidantes, pode-se citar:

- O teste do radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazil) (FRANKEL, 2000);
- O teste TRAP (Total radical-trapping antioxidant parameter) (ALHO e LEINONEN, 1999);
- O teste TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity);
- O teste ORAC (Oxygen Radical absorbance Capacity);
- O teste FRAP (Ferric Reducing Ability of Plasma) (BENZIE, 1999).

2.3.3 Mecanismos de Ação

Os antioxidantes são de natureza variada; portanto os mecanismos de ação são igualmente diversos:

- **Capturadores do oxigênio singlete:** Neste caso citam-se os que previnem através da neutralização do oxigênio singlete, desta forma impedindo uma parte importante das reações de degradação. O β -caroteno, o ácido ascórbico ou ainda os flavonóides podem agir desta forma (FRANKEL, 2000).
- **Inibir a ação de enzimas oxidantes:** Como por exemplo, xantina oxidase. Dentre os diferentes antioxidantes que podem agir com esse modo de ação os flavonóides (flavonas), o dióxido de enxofre, a fenilhidrazina e a cisteína.
- **Enzimas antioxidantes:** Elas reconhecem especificamente as biomoléculas degradadas (DNA e proteínas), as eliminam e substituem (HALLIWELL, 1994). Algumas neutralizam diretamente os iniciadores de reações radicalares, seja diminuindo as espécies radicalares, seja reciclando os antioxidantes. Dentre essas enzimas, destacam-se a superóxido dismutase, a catalase, a glutatona peroxidase e a redutase.
- **Queladores de íons metálicos:** o cobre e o ferro são iniciadores importantes de reações radicalares, os queladores de íons metálicos podem os inutilizar na forma de complexos organometálicos (ALHO e LEINONEN, 1999). Os flavonóides, por exemplo, que são compostos de um núcleo B substituído por dois grupamentos hidroxilas em posição orto, são muito eficazes como queladores (COOK, 1996; RICE-EVANS, 1997). Outros compostos como as antocianinas e o ácido cítrico são capazes de complexar o ferro ou o cobre (HALLIWELL, 1995).
- **Antioxidantes capturadores de radicais livres:** é a família mais importante dos antioxidantes e são as moléculas capazes de doar um átomo de hidrogênio a uma espécie radicalar (HALLIWELL, 1995; ALHO e LEINONEN, 1999).

Todos esses antioxidantes agem na etapa de propagação das reações radicalares. Sua capacidade antioxidante é influenciada pela força de ligação A-H. Ou ainda, quanto maior o potencial de redução da molécula é elevado (quanto mais a energia de ligação A-H é fraca) mais a atividade antioxidante será importante (HALLIWELL, 1995).

2.4 ANTOCIANINAS

2.4.1 Generalidades

Os flavonóides fazem parte de um vasto grupo de antioxidantes polifenólicos que ocorrem naturalmente em vegetais, frutas e em bebidas como chás e vinhos (HERTOG *et al*, 1993). Os mais importantes grupos de flavonóides são as antocianinas, os flavonóis, as flavonas, as catequinas e as flavanonas.

As antocianinas são os mais abundantes pigmentos naturais existentes, depois da clorofila, visíveis a olho nu.

Quimicamente, as antocianinas (do grego *anthos* = flor, e *kyanos* = azul escuro) são originadas do cátion flavílio, o qual é constituído por um esqueleto de 15 carbonos com anel aromático sustentado por um segundo anel aromático na posição dois (C6-C3-C6), devidamente adicionado a grupos fixados sobre os ciclos aromáticos, principalmente grupos hidroxilas, formando a antocianidina (aglicona). As

antocianidinas ligadas a uma ou mais moléculas de açúcares, principalmente glicose, galactose, raminose, xilose e arabinose formam as antocianinas (Figura 1) (MARKAKIS, 1982; FENNEMA, 1993; STRACK e WRAY, 1993; COULTATE, 1998; CLIFFORD, 2000).

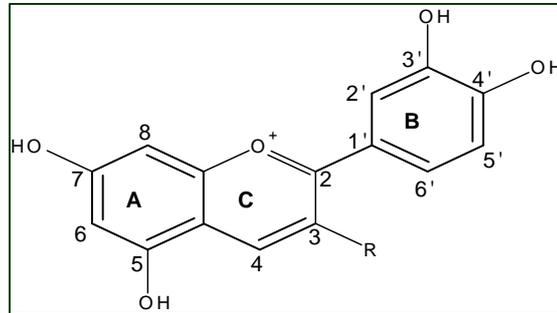


Figura 1. Estrutura molecular das antocianinas

A partir da estrutura básica (polifenólica) dos flavonóides, tem-se uma infinidade de cores através de combinações químicas com os glicosídeos e/ou grupo acil e também através de interação com outras moléculas, originando uma coloração rósea, vermelho, roxo, azul e púrpura das flores, frutos e legumes, bem como da cor roxo avermelhada, característica do açaí preto (WIEBOLD, 1992; STRACK e WRAY, 1993; COULTATE, 1998).

Segundo Lamikanra (1988), os diferentes tipos de antocianinas levam a diferenças de estabilidade, o que permite explicar a preferência de certos frutos ou de certas variedades frutíferas mais estáveis do que outras para fabricação de sucos coloridos.

Esta instabilidade é responsável pela baixa utilização desta substância pela indústria alimentícia, que ainda faz uso preferencial dos corantes artificiais, devido sua maior estabilidade e praticidade (BOBBIO e BOBBIO, 1992).

2.4.2 Mecanismos de Absorção

Foi demonstrado que as antocianinas podem ser absorvidas como moléculas intactas no estômago (PASSAMONTI *et al*, 2003), possivelmente por mecanismo mediado por uma bilitranslocase (PASSAMONTI, VRHOVSEK e MATTIVI, 2002), ou ainda no intestino onde resiste a atividade enzimática da flora intestinal, pois estas moléculas já foram detectadas intactas no plasma e na urina (CAO *et al*, 2001; MATSUMOTO *et al*, 2001; NETZEL *et al*, 2001; SUDA *et al*, 2002).

Por outro lado, efeitos tópicos são discutidos quando moléculas não-absorvidas protegem a mucosa gastrointestinal de danos oxidativos e desse modo retardam o início do câncer no estômago, cólon ou reto (GEE e JOHNSON, 2001; KANNER e LAPIDOT, 2001). Já foi demonstrado que a atividade e a composição da flora intestinal podem ser alteradas depois da ingestão de extratos de ôberrieso contendo compostos de flavonóides incluindo antocianinas (PUUPPONEN- PIMIÃ *et al*, 2001).

Embora precise ser elucidado se as estruturas inteiras ou parte de seus produtos de degradação são os princípios responsáveis por exercer as bioatividades relatadas, alimentos coloridos e enriquecidos com antocianinas podem ser considerados meios para aumentar a ingestão deste pigmento.

2.4.3 Efeitos Farmacológicos

Os flavonóides possuem uma série de propriedades farmacológicas que os fazem atuar sobre sistemas biológicos. Conseqüentemente, muitas dessas propriedades atuam de forma benéfica para a saúde humana.

Já foram identificadas mais de quatro mil substâncias pertencentes ao grupo dos flavonóides (PETERSON e DWYER, 1998). Diversos ensaios *in vivo* e *in vitro* vêm comprovando e determinando a ampla variedade das atividades biológicas dos compostos flavonoídicos. Segundo Ratty e Das (1998), algumas dessas propriedades farmacológicas já foram observadas por Szent-Gyorgi em 1936.

Destacam-se, dentre outros, os seguintes efeitos dos flavonóides sobre os sistemas biológicos: capacidade antioxidativa (constitui a atividade mais elucidada pelos estudos já desenvolvidos); atividades antiinflamatória e de efeito vasodilatador; ação antialérgica; atividade contra o desenvolvimento de tumores, anti-hepatotóxica, antiulcerogênica; atuação antiplaquetária, bem como antimicrobiana e antiviral (HOLLMAN e KATAN, 1999); de diminuição da glicose plasmática (AL-AWWADI *et al*, 2004).

Pesquisas demonstraram que alguns flavonóides atuam na inibição da replicação viral do agente causador da Síndrome da Imunodeficiência Humana ó HIV (LIN *et al*, 1997).

Um estudo epidemiológico alemão (Estudo de Zutphen), sobre doenças coronarianas em homens idosos demonstrou resultados inversamente relacionados com a ingesta de flavonóides e puderam respaldar o efeito protetor exercido por estes compostos, *in vivo*. A maioria dos flavonóides dietéticos eram originados do chá (48%), cebola (29%), maçã (7%) e vinho tinto (1%). O risco de mortalidade por doença coronariana no mais baixo tercil de ingestão de flavonóides foi aproximadamente 2,4 vezes maior do que no tercil de maior ingestão de flavonóides. Isso demonstra o quanto as propriedades antioxidantes e antitrombóticas dos flavonóides contribuem para essa proteção (RICE - EVANS *et al*, 1995).

Sabe-se que os flavonóides podem inibir vários estágios dos processos que estão diretamente relacionados com o início da aterosclerose, como na ativação de leucócitos, adesão, agregação e secreção de plaquetas além de atividades hipolipidêmicas (LIN *et al*, 1986) e aumento de atividades de receptores de LDL (KIRK *et al*, 1998).

Vários estudos estão sendo realizados para determinar o mecanismo de ação e os efeitos farmacológicos das antocianinas na saúde do homem. Satué-Gracia *et al* (1997) acreditam que, por se tratar de uma estrutura polifenólica, as antocianinas apresentam função antioxidante e anti-radicalar, protegendo o organismo contra o acúmulo de depósitos de colesterol nos vasos sanguíneos, processo que leva à aterosclerose.

Um número relevante de estudos sugere que a elevada ingestão de antocianinas pode proteger contra doenças cardiovasculares. Os possíveis efeitos protetores poderiam estar relacionados com as habilidades de alguns polifenóis, na prevenção da oxidação de LDL para uma forma aterogênica, através de atividade de agregação antiplaquetária (DUTHIE *et al*, 2000).

Em estudo realizado por Heinonen *et al* (1998), as antocianinas foram associadas diretamente com as atividades antioxidantes sobre as LDLs. Nesse estudo a oxidação de LDL foi inibida de 53,9 a 83,9%.

A função antioxidante protege o organismo, atuando por inibição da formação de radicais livres, interceptando-os, quando já formados, e reparando a lesão induzida por tais elementos. Em termos de desenvolvimento de doença coronariana, a inibição da oxidação das LDL é a que tem melhor caracterização.

O mecanismo de ação dos flavonóides está relacionado à sua capacidade de seqüestrar os radicais livres gerados. Outros mecanismos também podem ocorrer, tais como quelação metálica (talvez metais como ferro e cobre possam estar relacionados com o aumento da oxidação) ou aglutinação protéica, impedindo o seu ataque sobre as células, evitando a formação de lesões e perda de integridade celular, visto que tais lesões estão relacionadas à etiologia de várias doenças, incluindo as doenças degenerativas, como as cardiopatias e aterosclerose (KÜNHOU, 1976; HAMILTON *et al*, 1997).

Strack e Wray (1993) relataram que as propriedades farmacológicas dessa substância seriam determinadas pela quantidade ingerida e não pelo tipo de antocianina, diferente de Wang *et al* (1997), que mostra que o poder antioxidante varia de acordo com o tipo de antocianina administrado, ou seja, que propriedades farmacológicas destas substâncias são variáveis, segundo seu tipo.

2.5 COLESTEROL

2.5.1 Generalidades

O colesterol é um lipídio pertencendo a classe dos esteróis (Figura 2), os quais estão presentes em todas as células animais (KATCH e McARDLE, 1996).

Os esteróis não são precisamente gordura, pois não contêm ácidos graxos; eles são sintetizados a partir dos produtos de degradação das moléculas desses ácidos (acetil e isopreno), o que confere a esta classe e conseqüentemente ao colesterol várias das propriedades físicas e químicas dos lipídios (GUYTON, 1992).

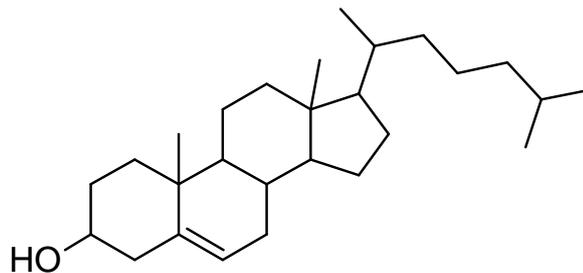


Figura 2. Estrutura da molécula de colesterol

O colesterol pode provir tanto de alimentos de origem animal (colesterol exógeno), em uma proporção avaliada em 0,2 a 2 g/dia, como da sua síntese pelo próprio organismo (colesterol endógeno), cerca de 1,5 a 2 g/dia (KATCH e McARDLE, 1996).

A maior parte do colesterol dietético encontra-se sob a forma de ésteres de colesterol, que são combinações de colesterol livre com uma molécula de ácido graxo

A absorção de colesterol, que é aumentada pela presença de gordura proveniente da dieta, depende da quantidade de gordura ingerida. Somente 50% do colesterol ingerido é absorvido e o pico de absorção

ocorre entre aproximadamente 6 a 9 horas após sua ingestão. Uma dieta rica em colesterol e gorduras, especialmente as saturadas, conduz a um alto nível de colesterol na corrente sanguínea (GUYTON, 1992).

2.5.2 Sistema de Transporte do Colesterol no Sangue

Conforme Campbell (1999), para que o colesterol seja transportado na corrente sanguínea é necessário que haja um empacotamento de sua molécula através de lipoproteínas, as quais estão envolvidas no carreamento de lipídios pela corrente sanguínea. Essas proteínas de transporte são usualmente classificadas por suas densidades (Tabela 2).

Tabela 2. Principais Classes de Lipoproteínas no Plasma Humano.

Classe de Lipoproteínas	Densidade (g/ML)	Pt*	Fl**	Composição (% em peso)		
				Colesterol Livre	Ésteres de Colesterol	Triglicerídios
Quilomícrons	<1,006	2	9	1	3	85
VLDL	0,95 ó 1,006	10	18	7	12	50
LDL	1,006 ó 1,063	23	20	8	37	10
HDL	1,063 ó 1,210	85	124	2	15	4

*Pt = proteínas / **Fl = fosfolipídios.

Fonte: NELSON e COX, 2002.

Além dos quilomícrons, existem outras lipoproteínas, como as de muito baixa densidade (VLDL), de densidade intermediária (IDL), de baixa densidade (LDL) e de alta densidade (HDL). As lipoproteínas LDL e HDL desempenham os principais papéis no desenvolvimento de doenças coronarianas. As porções protéicas destes agregados variam bastante.

Os quilomícrons estão envolvidos no transporte dos lipídeos dietéticos, enquanto que as outras lipoproteínas no dos lipídeos endógenos (CAMPBELL, 1999).

O colesterol dietético suprime a síntese do colesterol pelo organismo; isto ocorre especialmente em outros tecidos, mais que no fígado. O terceiro efeito da presença do colesterol livre na célula é a inibição da síntese dos receptores de LDL.

A lipoproteína de alta densidade (HDL) é chamada de bom colesterol. Ao contrário da lipoproteína de baixa densidade (LDL), que transporta colesterol do fígado para o resto do organismo, a HDL o transporta de volta àquele órgão, a fim de degrada-lo em ácidos biliares. Isto é indispensável para que se tenha baixos níveis de colesterol e LDL na circulação. Fatores já conhecidos que aumentem o nível de HDL, também diminuem a probabilidade de doenças coronarianas. Exercícios regulares aumentam a HDL, enquanto o fumo, o reduz (CAMPBELL, 1999).

2.6 OS ANTIOXIDANTES E A ATEROSCLEROSE

2.6.1 A Formação da Placa de Ateroma e as Doenças Cardiovasculares

A formação da placa de ateroma ou aterosclerose e, em particular, a cardiopatia coronária, relaciona-se a vários fatores de risco, tais como: idade, sexo, obesidade, estresse emocional, baixos níveis de colesterol-HDL, fumo, dietas ricas em gordura saturada e ainda problemas genéticos.

A importância dos fatores de risco está correlacionada com o aumento dos níveis de colesterol no sangue, assim como as atividades pró-oxidantes de radicais livres sobre as lipoproteínas de baixa densidade (LDL) no endotélio (LEITE, 1994).

O quociente colesterol LDL/colesterol-HDL é um indicativo confiável de risco aterogênico. Nas populações onde são altas as concentrações tanto da LDL como da HDL, os indivíduos com menores níveis de HDL estão mais susceptíveis a padecer de cardiopatias coronarianas. Ainda que os níveis de HDL possam estar geneticamente condicionados, a alimentação é um fator determinante (FEINLEB, 1984).

A Figura 3 apresenta a formação de uma placa aterosclerótica. Partículas de LDL e plaquetas penetram no endotélio e causam lesões (1); fatores de crescimento liberados pelas plaquetas estimulam as células musculares abaixo do endotélio, causando proliferação no sítio da lesão. Todo processo é acompanhado pela migração de monócitos e outras partículas de LDL (2); em consequência, ocorre a formação de células espumosas (3). Desenvolve-se então, uma aglomeração na região de fosfolipídios, colesterol e cálcio e, gradualmente, ocorre o endurecimento deste, formando-se saliências fibrosas e resistentes, as quais são as placas de ateroma.

Um estudo epidemiológico realizado com a população mundial revelou que a maior percentagem de mortalidade se deve a desordens metabólicas na célula, principalmente ao *stress* oxidativo (CHANCE *et al*, 1979). O mesmo é induzido por uma pequena proporção do volume de oxigênio que se respira (aproximadamente 2%), podendo provocar câncer (WATTENBURG, 1985; VERMA *et al*, 1988; WATTENBURG, 1990; WEI *et al*, 1990) e/ou enfermidades cardiovasculares (GREGORY *et al*, 1990; HERTOOG *et al*, 1993).

Em condições normais, o efeito deletério mencionado é neutralizado naturalmente por sistemas enzimáticos e substratos que a célula possui, como as enzimas superóxido dismutase, catalase, glutathione peroxidase, as vitaminas C e E e o urato.

Todas as enfermidades degenerativas são resultados da perda de controle do processo oxidativo, iniciando-se em compostos iônicos altamente agressivos, derivados desta fração de oxigênio.

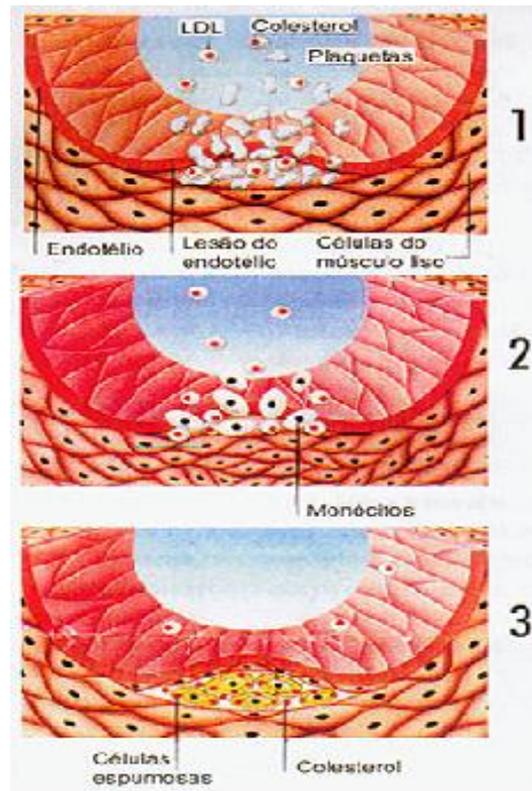


Figura 3. Formação da placa aterosclerótica.

Quando há ataque sobre os ácidos nucléicos, possibilita-se o desenvolvimento de câncer e sobre lipoproteínas de baixa densidade, ocorrem depósitos de placas de colesterol no aparato circulatório, com consequente obstrução de suas vias. Como já visto, as espécies altamente instáveis de oxigênio geradas são chamadas de ROS (Reactive Oxygen Species) das quais destacam-se: ânion superóxido (O_2^-), água oxigenada (H_2O_2), radical hidroxila (OH^-), e hipernitrito ($ONOO^-$) (CIUDAD e VALENZUELA, 2002).

2.6.2 Antioxidantes como fator de Proteção a Aterosclerose

A utilização de substâncias antioxidantes, como flavonóides, vitaminas C e E e os carotenóides, com o objetivo de prevenir ou reduzir o desenvolvimento da doença aterosclerótica vem sendo amplamente pesquisada e estudada (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2001).

Estudos sugerem que os flavonóides presentes na dieta podem estar envolvidos na prevenção da aterosclerose, por inibirem a oxidação das LDL, diminuindo sua aterogenicidade e, conseqüentemente, o risco de doença arterial coronariana (SATUÉ-GRACIA *et al*, 1997; DUTHIE *et al*, 2000).

3. MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi aprovado pelo *Comitê de Ética de Pesquisa Envolvendo Seres Humanos* do CEP do Núcleo de Medicina Tropical da Universidade Federal do Pará, protocolo 047/2004 segundo resolução 196/96-do Conselho Nacional de Saúde do Ministério da Saúde CNS/MS, tendo sido assinado termo de consentimento livre e esclarecido (anexo 1) por todos os participantes da pesquisa.

3.1 SELEÇÃO DE VOLUNTÁRIOS

O recrutamento de voluntários foi realizado na empresa Companhia Amazônia Têxtil de Aniaga - CATA, localizada na cidade de Belém/PA, através de entrevista e preenchimento de questionário de identificação e avaliação clínico- nutricional (anexo 2). Foram escolhidos a participar da pesquisa os que atendiam aos seguintes critérios: ser do sexo masculino com idade igual ou superior a 30 anos; gozar de perfeita saúde física e mental; não ser alcoólatras ou praticantes de atividades físicas extenuantes e não fazer uso de medicamentos.

Após o processo de seleção foram escolhidos 32 participantes, os quais trabalhavam em diferentes períodos e funções dentro da indústria. Realizou - se também inquérito alimentar individual (anexo 3) a fim de obter-se real conhecimento acerca dos costumes alimentares dos participantes do estudo. O questionário foi previamente testado para confirmar sua acessibilidade junto ao público alvo.

Foi solicitado aos voluntários que não consumisse açaí no período de 4 semanas antecedendo a primeira coleta de sangue, para que o otempo zero da pesquisa possa servir de branco individualmente.

O ideal seria de ter o dobro de voluntários: desta forma, um grupo ficaria como *placebo* e o segundo consumiria o açaí. Esta metodologia não pôde ser adotada por falta de voluntários de sexo masculino num mesmo local de trabalho, que seja relativamente próximo ao Campus universitário do Guamá.

3.2 AMOSTRAS DE AÇAÍ

A bebida processada e congelada feita a partir dos frutos de açaizeiro (*Euterpe oleracea*) foi adquirida em produtor local (bairro do Marco, Belém/PA), estando classificada como açaí médio, e imediatamente transportada para o Laboratório de Engenharia Química e de Alimentos da Universidade Federal do Pará (UFPA), onde foi acondicionada em freezer a -18°C .

A partir do primeiro dia do experimento, parte da bebida era diariamente descongelada e homogeneizada, antes de ser oferecida aos voluntários, por um período de quatro semanas, no horário do almoço. Cada voluntário recebia 350 mL de açaí média por dia, o que se aproxima da quantidade culturalmente consumida pela população da região amazônica. De 2^a a 6^a, o consumo de açaí era fiscalizado, pois uma pessoa ficava no refeitório da CATA. Nas sextas-feiras, logo após o almoço, cada voluntário recebia um pequeno isopor contendo duas barras de açaí de 350 g para seu consumo individual de sábado e domingo. Nestes dias, não havia possibilidade de fiscalizar o real consumo da bebida.

3.3 COLETA E PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS DE SANGUE

As coletas de sangue foram realizadas no período da manhã estando os participantes em jejum de pelo menos 10 horas. Foram feitas quatro coletas, distribuídas da seguinte forma: a primeira antes da primeira ingestão de açaí, caracterizando o tempo zero e mais três coletas nos tempos de 10, 20 e 28 dias. O volume sanguíneo coletado totalizou 55 mL nas coletas inicial e final (para poder desenvolver análises de oxidabilidade sobre a fração LDL) e 10 mL nas duas coletas intermediárias².

O sangue foi coletado à vácuo em tubos contendo heparina sódica e tubos contendo gel separador do tipo BD vacutainer® (USA), por profissional capacitado. Em seguida, as amostras foram armazenadas sob refrigeração, e posteriormente centrifugadas a + 4°C e 5000 rpm, durante 07 min em Centrifuga Sigma modelo D37520 ref 3K30 (Alemanha) a fim de se obter o plasma, o qual foi dividido em 1 tubo de 15 mL (1ª e 4ª coletas) e em 4 tubos de 2 mL (todas as coletas). Posteriormente saturados com nitrogênio gasoso e armazenados a -80°C.

O plasma proveniente dos tubos heparinizados, foi destinado a análises de dienos conjugados e TBARS sobre a fração LDL, as quais realizaram-se na Universidade Católica de Louvain- Bélgica e ainda ORAC e TRAP no plasma, realizadas na UFPA. O tubo com gel (8 mL), sempre coletado, destinou-se às análises bioquímicas.

3.4 ANÁLISES LABORATORIAIS

3.4.1 Análises bioquímicas

As análises bioquímicas foram realizadas no Laboratório de Análises Clínicas Dr. Paulo Azevedo (Belém-PA), a partir do soro obtido como já descrito anteriormente. As dosagens bioquímicas foram: o Colesterol Total (CT), suas frações HDL-C e LDL-C, Triglicerídeos (TG), as enzimas hepáticas Fosfatase Alcalina (FA) e Transaminase Glutâmica Pirúvica (TGP/ALT) e a glicose através de kits enzimáticos da marca BIOSYSTEMS® e submetidos ao autoanalisador bioquímico Beckman CX5®.

Os valores de normalidade (Tabela 3) são aqueles estipulados pelas III Diretrizes Brasileiras sobre Dislipidemias e Diretriz de Prevenção da Aterosclerose (Sociedade Brasileira de Cardiologia, 2001).

Tabela 3 . Valores de referência em CT, LDL-C, HDL-C e TG para adultos (>20anos)

Parâmetros	Valores (mg/dl) desejáveis	Valores (mg/dl) limitrofes	Valores (mg/dl) Aumentados
Colesterol total	<100	200-239	>240
LDL-C	<130	130-159	>160
HDL-C	>40	-	-
TG	<150	150-200	>200

Fonte: Sociedade Brasileira de Cardiologia, 2001.

² Não foram coletados 55 mL a cada coleta, pois esta retirada quase semanal de sangue poderia afetar o metabolismo do indivíduo (indução de uma maior produção de glóbulos para repor os que estão sendo retirados) e, conseqüentemente, sobrepor uma outra variável no experimento.

3.4.2 Análises de dosagens de antioxidantes

3.4.2.1 Antocianinas

A metodologia foi baseada no método de Askar e Treptow (1993), adaptado por Rogez (2000), utilizando-se o fator de conversão de 21,4041 ao invés de 18,6786, este fator de conversão, levando-se em consideração o coeficiente de absorção molar das duas antocianinas presentes no açaí: a cianidina-3-glicosídeo (38%) e a cianidina-3-rutinosídeo (62%).

a) Reagentes

- Acetato de sódio;
- Cloreto de potássio;
- Ácido clorídrico concentrado;
- Hidróxido de sódio.

b) Equipamento

- Espectrofotômetro UV/visível (Ultrospec2000, Pharmacia Biotech - USA).

c) Pequenos materiais de laboratório

- Cubetas de poliestireno de 10 mm de largura ;
- Tubos do tipo Eppendorf de 2 mL;
- Micropipetas de 0,2, 1 e 5 mL.

3.4.2.2 Polifenóis totais

O conteúdo em polifenóis totais na bebida açaí foi determinado pelo método colorimétrico de Folin-Ciocalteu (SINGLETON, ORTHOFER e LAMUELA-RAVENTOS, 1999) adaptado por Silva *et al* (2006). O conteúdo em polifenóis totais foi calculado a partir da curva padrão de ácido gálico e expresso como mg de equivalentes em ácido gálico (EAG) por grama de matéria seca (MS).

a) Reagentes

- Reagente de Folin-Ciocalteu 2N ;
- Carbonato de sódio (Na_2CO_3) ;
- Padrão de ácido gálico.

b) Equipamento

- Espectrofotômetro UV/visível (Ultrospec2000, Pharmacia Biotech - USA).

c) Pequenos materiais de laboratório

- Cubetas de poliestireno de 10 mm de largura ;
- Tubos do tipo Eppendorf de 2 mL;
- Micropipetas de 0,2, 1 e 5 mL.

3.4.3 Avaliação da capacidade antioxidante

3.4.3.1 Análise ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity)

a) Princípio do método

A dosagem da capacidade antioxidante ORAC criada por Cao *et al* (1995) se baseia na medida da diminuição da concentração de um substrato oxidável, a β -ficoeritrina (β -PE), ao longo do tempo por fluorescência. Entretanto, Huang *et al* (2002) e Ou *et al* (2001) mostraram que outra molécula, a fluoresceína, poderia substituir a β -PE, tendo como vantagem principal ser mais estável e mais reprodutível. Esta foi a metodologia utilizada neste trabalho, a qual foi adaptada por Silva (2002) e Silva (2004).

b) Reagentes

- AAPH (2,2 ϕ -azobis 2-amidino propano diidrocloreto 97 %);
- Fluoresceína de sódio;
- Trolox (equivalente hidrossolúvel da vitamina E :6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil-cromanol-2- ácido carboxílico);
- $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ e KH_2PO_4 necessários a preparação do tampão fosfato;

c) Equipamentos

- Centrífuga Fisher, Bioblock Scientific, type 1-15K, Sigma et rotor 12124 (Tournai ó Bélgica);
- Fluorímetro : Microplate Fluorescence Reader ó Bio-Tek Instruments, Inc (USA);
- pH-mêtro .

d) Pequenos materiais de laboratório

- Microplacas para fluorimetria de 96 poços ó Greiner (Ref. : 655075) (Alemanha);
- Tubos do tipo Eppendorf de 2 mL;
- Micropipetas de 0,01, 0,2 e 1 mL.

e) Procedimento

Adicionou-se na microplaca em cada poço 150 μ L de fluoresceína, posteriormente 25 μ L de plasma diluído 10, 14 e 18 $\times 10^3$ vezes, tampão para o branco e Trolox como padrão nas concentrações de 4, 8, 20 e 40 μ Mol/L. A placa foi incubada por 15 minutos a 37°C. A leitura iniciou-se após a injeção automática de 25 μ L de AAPH.

A diminuição da fluorescência foi acompanhada durante 50 minutos por leituras com intervalos de 1 minuto ($\lambda_{excitação}=485nm$; $\lambda_{emissão}= 520 nm$). Se após 50 minutos a fluorescência não era inferior a 5% do valor inicial, a amostra era diluída e a análise repetida.

A triplicata foi realizada numa mesma horizontal da microplaca, afim de diminuir os erros de leitura.

f) Expressão dos Resultados

O valor numérico utilizado para normalizar o resultado obtido, o valor ORAC, foi obtido a partir da expressão desenvolvida da equação a seguir:

$$\text{Valor ORAC (equivalente Trolox } [\mu\text{M}]) = 20 * \kappa * \frac{S_{\text{amostra}} \text{ ó } S_{\text{branco}}}{S_{\text{trolox}} \text{ ó } S_{\text{branco}}}$$

Onde k é o fator de diluição e S a área sob a curva de diminuição de fluorescência da amostra, do Trolox ou do branco que é calculada como a seguir :

$$S = 0.5 + (f_1 + f_2 + f_3 + f_4 + \dots + f_{49} + f_{50}) / f_0$$

Onde f_0 é a fluorescência inicial e f_i é a fluorescência medida no tempo i .

3.4.3.2 Protocolo TRAP (Trapping Radical Antioxidant Parameter)

a) Princípio do método

O método TRAP foi desenvolvido por Wayner *et al* (1987) e foi modificado. O problema do método original estava na utilização de um eletrodo de oxigênio para fazer uma medida no final das reações, mas este eletrodo proporcionava resultados de baixa repetibilidade. O valor TRAP medido sofreu uma modificação, passando a ser avaliado por quimioluminescência em um teste com uma precisão nitidamente maior (WHITEAD *et al*, 1992; ALHO e LEINONEM, 1999). Esse método utiliza iniciadores azo hidro- ou lipo-solúveis como fonte de um fluxo constante de radicais peroxílicos sob a ação do calor. Sua reação com o substrato luminol, quimioluminescente, leva a formação de intermediários excitados de luminol que emitem a luz detectada por um luminômetro. Os antioxidantes presentes na amostra inibem essa quimioluminescência durante um certo tempo que é proporcional ao potencial antioxidante total da amostra. Esse potencial da amostra é comparado ao do Trolox (ALHO e LEINONEM, 1999; KRASOWSKA *et al*, 2001).

b) Reagentes

- AAPH;
- Trolox;
- Tampão fosfato (PBS);
- Luminol (5-amino-2,3-diidro-1,4-ftalazinediona);
- Ácido bórico (H_3BO_3);
- Dimetilformamida (DMF) (N,N-Dimetilformamida 99 %).

c) Equipamentos

- Fluorímetro a microplaca Microplate Fluorescence Reader Bio-Tek Instruments Inc (USA);
- pHmêtro;

d) Pequenos materiais de laboratório

- Microplacas brancas de fluorimetria de 96 poços ó Greiner (Ref. 655075; Alemanha);
- Erlenmeyer de 100 mL, 2 recipientes de 50 mL e de 200 mL;
- Tubos do tipo Eppendorf;
- Pipetas de 10 mL;
- Micropipetas de 0,01, 0,2 e 1 mL;

e) Procedimento

- Preparação das soluções tampões

+ Solução de tampão borato (50 mM, pH 9,5)

Para uma solução de 100 mL, pesou-se 0,3095 g de ácido bórico. Adicionou-se em torno de 80 mL de água desmineralizada. Sendo importante ajustar o pH antes de aferir o volume a 100 mL.

+ Solução de tampão fosfato (100 μ M, pH 7,4)

Utilizou-se o tampão fosfato para 1L de água ultra-pura.

- Preparação da curva padrão de Trolox

A curva de calibração do Trolox foi feita a partir de uma solução padrão de 40 mM em N,N-dimetilformamida a 99% (10 mg de Trolox em 1 mL de DMF). Diluiu-se em seguida essa solução padrão 40 vezes para chegar a uma concentração de 1 mM. Essa solução foi então diluída afim de obter-se as concentrações de 25 μ M, 100 μ M, 250 μ M e 400 μ M, utilizadas para obtenção da curva padrão.

- Solução de luminol

O luminol (35,4 mg) foi diluído em 500 μ L de NaOH 1N a fim de se obter uma solução padrão, a qual foi diluída 60 vezes no tampão borato a pH 9,5 (100 μ L em 6 mL de tampão). A quimioluminescência do luminol é notavelmente elevada sob condições alcalinas (KRASOWSKA *et al*, 2001), sendo o motivo pelo qual o luminol é preparado em tampão a pH 9,5.

- Solução de AAPH

Diluiu-se 542 mg de AAPH em 15 mL de tampão fosfato para atingir a concentração de 133 mM, em uma solução aquosa neutra; a meia-vida é em torno de 175 horas e a taxa de geração de radicais é constante durante as primeiras horas. A taxa de geração de radicais livres é igual a $1,36 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (KRASOWSKA *et al*, 2001).

e) Leitura TRAP

A leitura TRAP foi realizada em microplacas de fluorimetria branca. Em uma microplaca, injetou-se 50 μ L de tampão fosfato e 25 μ L de plasma diluído 5 vezes e os padrões trolox. O branco foi realizado

somente com tampão fosfato. Em seguida, a placa foi incubada por 5 minutos a 37°C para termostatar seu conteúdo. A leitura iniciou-se após a injeção manual de 50 µL de AAPH e 50 µL de luminol.

A quimioluminescência foi acompanhada no luminômetro por 120 minutos. Cada amostra foi analisada em triplicata.

3.4.4 Isolamento das LDL ϕ s e parâmetros de oxidação das mesmas

3.4.4.1 Isolamento das LDL ϕ s

a) Princípio do método

Normalmente, o fracionamento lipoproteico do plasma (quilomícrons, VLDL, LDL e HDL) por centrifugação é baseado na diferença de densidade das frações. Realmente, aumentando a densidade do plasma de maneira sequencial pela adição de brometo de potássio por um gradiente, descontínuo ou contínuo, o fracionamento pode ser realizado. Os dois métodos requerem uma centrifugação prolongada, podendo ser de até 72 horas para a flotação sequencial e pelo menos 24 horas para a separação por gradiente descontínuo. Os outros métodos mais rápidos que permitem a separação das LDL ϕ (como por electroforese) não conseguem mais que uma pequena quantidade de LDL (< 2mL) (GRAHAM *et al*, 1996). Por este motivo, a separação por gradiente descontínuo e usando ultracentrifugação, foi a técnica utilizada.

A técnica aplicada é uma separação do tipo *double run* (ou seja, duas ultracentrifugações sucessivas) por gradiente descontínuo. O princípio geral é de fixar a densidade do plasma inicial a uma densidade ligeiramente superior a das lipoproteínas (1,25 kg/L) através de uma solução de KBr. Posteriormente faz-se uma ultracentrifugação a 50.000 rpm durante 16 horas, a 7°C. As lipoproteínas encontram-se na superfície do tubo Beckman. Pode-se então retirá-las e fixar a densidade em 1,27 kg/L através da adição de KBr. Em seguida, ultracentrifuga-se em uma solução de NaCl a 0,9%, a 50.000 rpm, durante 3 horas a 7°C. Recupera-se então as LDL ϕ s.

Para poder conservar as LDL ϕ s é necessário realizar uma diálise por 48 horas numa solução de Tris/EDTA e depois filtrar com o filtro Milipore[®] de 22µm acoplado a uma seringa. Pode-se assim conservar o material isolado sob refrigeração por 1 mês, ao abrigo da luz.

Antes de realizar os testes com as LDL ϕ s, é necessário desprotegê-las por uma diálise na mesma solução de Tris sem EDTA durante 2 horas e meia.

b) Reagentes

- Brometo de potássio;
- Cloreto de sódio;
- Tris (Trizma[®]Base, Tris ó hidroximetilaminometano ref: 819623 ICN Biomedicals -USA) ;
- EDTA (ácido etilenodiamonotetracético, C₁₀H₁₆N₂O₈).

c) Equipamentos

- Seladora de Tubos Beckman (ref 342428) (USA);
- Ultracentrífuga Beckman L8-70, (ref 70569) (USA) e rotor Ti 65.

d) Pequenos materiais de laboratório

- Erlenmeyer e béquer de 200 ou 250 mL;
- Seringas de 10 e 20 mL;
- Agulhas 2 × 100 mm (ref : 13.205) Unimed (Lausanne ó Suíça);
- Agulhas microlança 3 19GA 1 ½ 1,1 ×40 TW.PM Becton (Maryland-USA);
- Agulha longa 2 x 100mm Unimed (ref : 13205) (Suíça);
- Tubos Beckman Quick-Seal de 16 × 76 mm, (ref : 342413- USA);
- Membrana Spectra/Por®, MWCO:6-8,000 (ref :132645 Spectrum Laboratories-USA);
- Filtro para seringa Millex de 22 µm Milipore (ref : SLGV 0.25 BS -USA);
- Tubos do tipo Eppendorf estéreis.

e) Procedimento

O plasma é primeiramente descongelado em banho-maria a 37°C. A densidade do plasma foi ajustada em 1,25 g/mL. Para tanto, acrescentou-se KBr até a densidade desejada e acompanhou-se o peso de 1 mL do mesmo para confirmar a densidade.

O plasma foi colocado em tubos Beckman com a ajuda de seringa de 20 mL com agulha de 2 × 100 mm. Os tubos devem ser preenchidos até a linha limite, para em seguida serem selados termicamente com ajuda de uma tampa metálica.

Os tubos foram centrifugados a 50.000 rpm, durante 16 horas à 7°C. Essa etapa permite separar as proteínas das lipoproteínas.

As lipoproteínas foram recuperadas da superfície do tubo (=fração laranja) (Figura 4) com auxílio de uma agulha e seringa de 10 mL, sendo em média 5 mL por tubo.

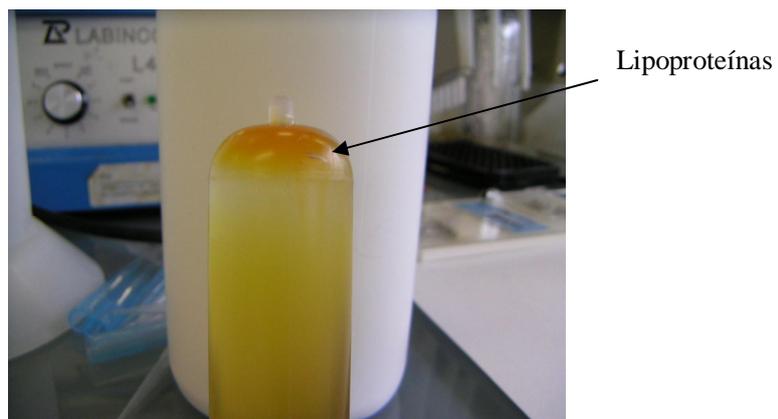


Figura 4 . Fotografia representando as lipoproteínas isoladas em tubo Beckman após a primeira centrifugação.

A densidade das lipoproteínas foi ajustada a 1,27 com KBr, como já descrito. Novos tubos Quick-seal foram preenchidos com em média 10 mL de uma solução de NaCl à 0,9 %. As lipoproteínas foram adicionadas ao fundo do tubo com uma agulha longa de 2 x 100 mm e seringa de 10 mL. Completou-se o volume com o NaCl. Os tubos eram então selados e centrifugados a 50.000 rpm, durante 3 horas, a 7°C. As

LDL ϕ s (fração amarelo-escuro observada na Figura 5) foram retiradas do tubo com auxílio de uma seringa de 10 mL e agulha com microlança 3.

As LDL ϕ s foram em seguida dialisadas por uma solução Tris/EDTA a fim de proteger e permitir a conservação. Para preparar 5L desta solução, adicionou-se 43,83g de NaCl, 6,057g de Tris, ajustou-se o pH a 7,2-7,4 e acrescentou-se 0,5g de EDTA. Em seguida filtrou-se a solução e acondicionou-se a mesma em tubos estéreis.

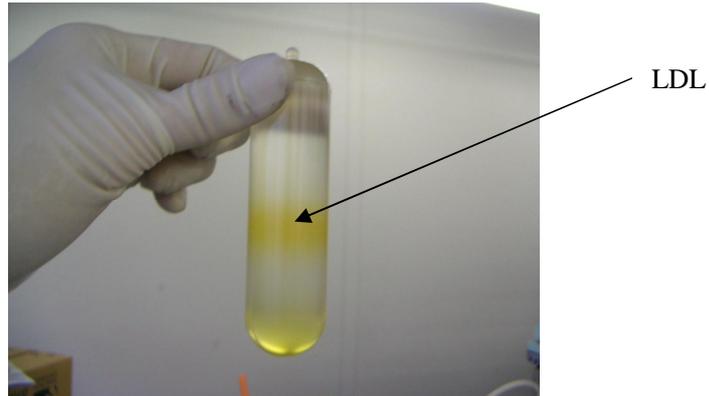


Figura 5. Fotografia mostrando as lipoproteínas separadas por sua diferença de densidade após a segunda centrifugação.

3.4.4.2 Teste de dienos conjugados

a) Princípio do método

Como mencionado na revisão bibliográfica deste trabalho, há provas cada vez mais evidentes que a oxidação das LDL ϕ s é importante no desenvolvimento da aterosclerose. Grandes esforços são realizados na investigação e desenvolvimento de métodos para medir a oxidação lipídica das LDL ϕ s e de identificar os fatores que influenciam neste processo (PUHL *et al*, 1994). A susceptibilidade das LDL à oxidação *in vitro* é influenciada pelo seu ambiente, o que determina o estresse oxidativo ao qual as lipoproteínas são expostas, e as características inerentes de composição das LDL ϕ s que determinam o grau de resistência a esse estresse (PROUDFOOT *et al*, 1997).

Uma abordagem para medir a susceptibilidade das LDL ϕ s à oxidação é de acompanhar a absorbância a 234 nm, da qual presume-se que está ligada à formação de dienos conjugados nas LDL isoladas durante uma exposição à íons cúpricos ou geradores de radicais livres azo, *in vitro*. Na presença de antioxidantes, o aparecimento dos dienos conjugados, e por conseguinte a absorbância, será retardada proporcionalmente à capacidade antioxidante dos extratos (STULNIG *et al*, 1996). Segundo a literatura, a utilização de uma solução de cobre é aparentemente mais adequada para induzir a oxidação (KONTUSH e BEISIEGEL, 1999). Foi observado que a ligação dos flavonóides com os íons Cu⁺² desempenha apenas um papel secundário na atividade destes compostos (DUFALL *et al*, 2003). As LDL ϕ s isoladas devem ser diluídas numa mesma concentração em proteínas. É necessário, portanto, dosar a quantidade de proteínas presentes nas LDL pelo método de Smith (1985) antes de começar a análise (GRAHAM *et al*, 1996; DUFALL *et al*, 2003).

b) Reagentes

- Fração LDL isolada a partir do plasma;
- Sulfato de cobre (II) hidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) (ref: VCB 765779 Bélgica)
- Tampão fosfato (PBS ou Phosphate Buffered Saline);
- Tris (Trizma® Base, Tris - hidroximetilaminometano);
- Cloreto de sódio.

c) Equipamentos

- Espectrofotômetro : Spectra Max 190 ó Molecular devices®; Logiciel: Soft Max Pro (USA);
- Agitador Van der Heyden ó MS1 Minishaker IKA® (Bélgica).

d) Pequenos materiais de laboratório

- Membrana Spectra/Por®, MWCO: 6-8,000 (132645), Spectrum Laboratories (USA);
- BCA Protein Assay Reagent Kit, (ref : 23227, Pierce - USA);
- Microplacas UV-Plate 96 poços Flat Bottom, COSTAR® 3635, Corning, New-York (USA).

e) Procedimento

- Desproteção das LDLs

A desproteção das LDLs deve ser feita pouco antes da realização das análises, uma vez que, desprotegidas, elas duram apenas uma semana. Para desprotegê-las, refez-se a diálise como para a proteção, com a mesma solução Tris, porém sem EDTA. Para 2 L dessa solução, adicionou-se 17,532 g de NaCl e 2,4228 g de Tris, e ajustou-se o pH a 7,2-7,4. As LDL foram colocadas na membrana para diálise e imersas na solução, permanecendo em câmara fria no escuro. A solução foi trocada três vezes após meia hora e a última vez após uma hora.

- Dosagem das proteínas

O *BCA Protein Assay* é uma formulação baseada na ação do ácido bicinchonínico (BCA) para a detecção e a quantificação das proteínas totais. Esse método combina a redução de Cu^{2+} em Cu^{1+} pelas proteínas em meio alcalino com a detecção colorimétrica muito sensível e seletiva do cátion cobre (Cu^+) utilizando um reagente único contendo o ácido bicinchonínico. O produto roxo da reação é formado pela quebra de 2 moléculas de BCA com um íon cobre. Esse complexo hidrossolúvel apresenta uma forte absorvância a 562 nm que é linear com as concentrações crescentes em proteínas (SMITH *et al*, 1985).

A curva padrão foi feita com diferentes concentrações de albumina sérica bovina (BSA): 2.000 $\mu\text{g/mL}$, 1.500 $\mu\text{g/mL}$, 1.000 $\mu\text{g/mL}$, 750 $\mu\text{g/mL}$, 500 $\mu\text{g/mL}$, 250 $\mu\text{g/mL}$, 125 $\mu\text{g/mL}$, 25 $\mu\text{g/mL}$ e 0 $\mu\text{g/mL}$ (branco).

O reagente foi obtido misturando-se 50 partes do reagente BCA A com uma parte do reagente BCA B.

Em uma microplaca, injetou-se 25 µL dos padrões e das LDL diluídas 3 vezes, onde adicionou-se 200 µL do reagente. A microplaca foi agitada durante 30 segundos, depois foi coberta e incubada durante 30 minutos à 37°C. Em seguida, deixou-se resfriar a temperatura ambiente e leu-se a absorbância a 562 nm.

A concentração em proteínas das LDL foi obtida a partir da curva padrão de BSA.

- Dosagem de dienos conjugados

As LDLs isoladas e desprotegidas foram diluídas em PBS a uma concentração final de 100 µg de LDL proteína/L.

Uma solução padrão de cobre a 4 %, 0,16 mol/L, foi preparada em água. Em uma microplaca UV, injetou-se 170 µL de LDL e adicionou-se 30 µL de cobre. A reação foi acompanhada pelo Espectrofotômetro a 234 nm e 37°C por 4 horas. O tempo de latência necessário à iniciação da oxidação das LDLs foi calculado a partir da curva de oxidação.

3.4.4.3 Medida da oxidabilidade das LDLs e do plasma pelo método TBARS

a) Princípio do método

Sob condições ácidas e quentes do teste TBA, hidroperóxidos e diversos precursores de aldeído são decompostos em TBARS (thiobarbituric acid reactive substance), os quais são ligados à susceptibilidade a peroxidação em amostra de sangue. Por conseguinte, a determinação de TBARS nos tecidos biológicos pode ser interpretada como uma medida da susceptibilidade oxidativa. Os TBARS são formados pela decomposição oxidativa dos PUFAs. O malonaldeído forma uma ligação 1:2 com o ácido tiobarbitúrico (TBA) e o produto composto (Figura 6) pode ser medido por fluorimetria ou por espectrofotometria

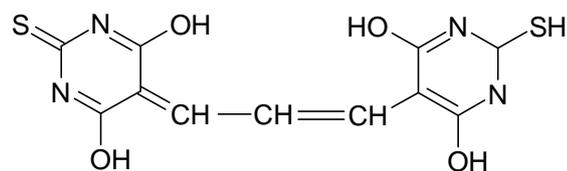


Figura 6. Molécula de TBARS

b) Reagentes

- Amostras de LDLs isoladas a partir do plasma como já descrito anteriormente e, também, plasma congelado;
- Tris (Trizma®Base, Tris-hidroximetil aminometano);
- Cloreto de sódio (NaCl);
- Ácido tricloro-acético (TCA);
- Ácido tiobarbitúrico (TBA);
- Malonaldeído bis dimetil acetal (MDA ref : 10838-3 Aldrich -Alemanha);
- Tampão fosfato (PBS);
- 1-butanol, C₄H₁₀O;
- Hidróxido de sódio, NaOH 1 M.

c) Equipamentos

- Fluorímetro : Ascent F.L. Fluoroscán ó Labsystems ; Logiciel : Ascent Software 2.4.2. (Finlândia);
- Centrífuga Jouan-BR4i-Vel (Leuven, Bélgica), Rotor Jouan S20;
- Estufa;
- Agitador Van der Heyden ó MS1 Minishaker IKA® (Bélgica).

d) Pequenos materiais de laboratório

- Membrana Spectra/Por®, MWCO :6-8,000 (132645), molecular porous membrane tubing, Spectrum Laboratories (USA);
- BCA Protein Assay Reagent Kit, Prod # 23227, Pierce (USA);
- Microplacas brancas, LIA-Plate.Weiss. 96K, Greiner bio-one, réf : 655075, Alemanha;
- Capa em teflon para microplaca;
- Tubos do tipo Eppendorf.

e) Procedimento

- Preparação do padrão de MDA

O branco é a solução de tampão fosfato, PBS. O padrão é o malonaldeído diluído em PBS a diferentes concentrações : $2 \cdot 10^{-2}$ M, $2 \cdot 10^{-4}$ M, $1,6 \cdot 10^{-5}$ M, e sucessivamente, diluído de 2 em 2 até a concentração de $3,1 \cdot 10^{-9}$ M.

- Preparação das LDL ϕ s e do Plasma

As LDL isoladas e desprotegidas foram submetidas à dosagem de proteína através do kit BCA Protein Assay Reagent. As LDL ϕ s foram diluídas em PBS a uma concentração final de 200 μ g de proteína LDL/L. O plasma foi também submetido a mesma dosagem de proteínas porém utilizando-se a diluição de 100 vezes e a concentração de proteínas de 1000 μ g de proteínas/L.

- Preparação das soluções

- Uma solução de TCA a 15 % foi preparada a partir de uma solução stock de 66,66%.
- A solução de NaOH a 0,3N foi preparada com 60 mL de NaOH 1N em 140 mL de água ultrapura.
- A solução de TBA a 0,67 % foi preparada com a solução de NaOH 0,3N preparada anteriormente da seguinte forma: 1,34 g de TBA/200 mL de NaOH 0,3N.

f) Dosagem dos TBARS

Em uma microplaca de fluorometria branca, injetou-se 30 μ L de LDL ϕ s diluídas, de PBS (branco) e 30 μ L dos padrões (diluições do MDA). Em seguida, adicionou-se através de micropipeta multicanal 24 μ L de TCA 15% e 48 μ L de TBA 0,67%. A microplaca foi coberta por uma capa em teflon para evitar a evaporação, e colocada em estufa a 95°C, durante 30 minutos. Após resfriamento adicionou-se 100 μ L de butanol e misturou-se bem com a pipeta. Após isso a microplaca foi centrifugada a 1.500 rpm durante 5

minutos a 4°C. A leitura da absorbância foi realizada em fluorímetro (Excitação : 515 nm e Emissão : 555 nm).

A concentração em MDA é determinada através de uma curva de calibração.

3.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

3.5.1 Análises sobre o conjunto de indivíduos

Os resultados obtidos foram organizados em protocolos de trabalho, na forma de planilhas do Software Microsoft® Office Excel 2003. Numa primeira planilha foram organizados os valores reais obtidos para cada voluntário (linhas) e para cada análise (colunas), sendo que cada valor é a média da triplicata realizada (todas as análises sendo feitas em triplicata). Foi realizada uma análise de variância ANOVA acima destes valores para avaliar se haviam diferenças significativas entre as coletas do tempo 0 e aquelas dos tempos 10, 20 e 28 dias.

Numa segunda planilha, seguindo o mesmo padrão de linhas e colunas, os valores normalizados foram colocados, cada valor sendo normalizado em relação ao valor obtido para aquele voluntário, naquela análise e no tempo zero. Trataram-se estatisticamente esses resultados pelo teste pareado t de Student para detectar, individualmente, se haviam diferenças significativas entre o tempo 0 e os demais.

As análises foram correlacionadas, usando a planilha dos valores normalizados, para ver se havia correlações significativas entre as variáveis de resposta.

3.5.2 Análises subdividindo o grupo de voluntários em 2 subgrupos

O termo Análise de Cluster (*clustering*) foi usado primeiramente por Tryon, em 1939 e atualmente abrange um número de diferentes algoritmos de classificação. Esta ferramenta estatística auxilia os pesquisadores na dificuldade que têm de organizar (sub) grupos partindo da observação de dados significativos.

Com base em hipóteses a respeito do número de grupos, ocorre aglomeração dos casos ou variáveis e então o método produzirá conjuntos diferentes entre si o máximo possível. Esta formação de (sub) grupos apresenta dois objetivos: (1) minimizar a variabilidade dentro dos conjuntos e (2) maximizar a variabilidade entre conjuntos. Uma imagem verdadeira usada por pesquisadores é de dizer que o *clustering* é um tipo de ão contrárioö.

No caso deste trabalho, como mencionado anteriormente, não foi possível ter um grupo *placebo* como ãbrancoö. A Análise por *clustering* foi utilizada a fim de separar os voluntários em dois grupos de acordo com os parâmetros antioxidantes no tempo 0 (antes do consumo de açã), ou seja: ORAC, dienos conjugados, plasma e LDL TBARS. Obteve-se assim um primeiro grupo cujos parâmetros antioxidantes eram ãnormaisö (quer dizer numa faixa de normalidade em termos fisiológicos), e um segundo grupo cujos mesmos parâmetros estavam fora desta normalidade. Os valores reais foram re - analisados por ANOVA (desta vez, comparando os dois subgrupos entre eles) e os valores normalizados de cada cluster foram novamente analisados através do Teste pareado t de *Student* para amostras independentes.

Tanto as análises ANOVA quanto de *Student* foram feitas com auxílio do software STATISTICA®, versão 5.1, sendo adotado 5% ($p < 0,05$) para o índice de hipótese de nulidade.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados analíticos, indivíduo por indivíduo, encontram-se no apêndice 1, estando eles expressos como a média da triplicata realizada.

4.1 CARACTERIZAÇÃO DA BEBIDA AÇAÍ

Os resultados das análises realizadas na bebida açaí utilizada no experimento são expressos na Tabela 4. O açaí oferecido possuía 14,0% de matéria seca, o que o classifica como açaí do tipo grosso (BRASIL, 1997).

O açaí teve como dosagem média de antocianinas o valor de 1.890 mg/L. Rogez (2000) estipula que o açaí médio (com 12,5% MS) contém cerca de 1.280 mg/L de antocianinas, significando que, com 14% de MS, esta média passaria a 1.435 mg/L. Como o açaí utilizado neste experimento alcançou a marca dos 1.890 mg/L, podemos considerar que seu teor era bom e que os frutos a partir dos quais ele foi preparado deviam ser do tipo *tuíra*, conforme classificação proposta por Rogez (2000).

Tabela 4. Caracterização da bebida açaí oferecida aos voluntários durante a pesquisa.

Análises	Resultados
Matéria Seca	14,0%
Antocianinas	1.890 ± 94,5 mg/L
Polifenóis Totais	5.152 ± 309,1 mg EAG/L
ORAC	192,7 ± 24,08 mmol ET/L

Legenda: EAG - Equivalente em ácido gálico, ET - Equivalente Trolox

A quantidade de polifenóis totais foi de 5.152 mg EAG/L, observando que as antocianinas representam cerca de 34% dos polifenóis encontrados no açaí (em acordo com os dados obtidos por LOIR, 2004). Os resultados encontrados em chá verde e preto, uma das maiores fontes de polifenóis, variam entre 16 to 73.5 g_{GAE}/Kg_{BU} (Prior & Cao, 1999). Os valores obtidos no açaí estão bem abaixo. A grande diferença é que se consomem apenas umas gramas de chá enquanto se consome 100 vezes mais açaí numa única ingestão (350mL no nosso experimento, por exemplo). Nestas quantidades, os polifenóis totais consumidos pelos voluntários, tornaram-se bem expressivos.

A capacidade antioxidante através da medida ORAC resultou em 192,7 mmol ET/L, confirmando que o açaí tem um valor de destaque neste quesito. De fato, pode-se comparar esses valores com aqueles de outros alimentos bem conhecidos, tais como as ameixas (62.4), morangos (35.8), groselhas pretas (62.2), os legumes rabanete (9.5), batata (de casca vermelha) (13.2), cenoura (12.2), brócolis (15.9), as amêndoas (44.5), pistache (79.8), as frutas secas: tâmara (39.0), uva passa (30.4), ameixa (85.8), e o farelo de arroz (242.9) (WU *et al.*, 2004). O valor obtido pelo açaí é, portanto, de destaque, sendo apenas superado, nesta relação, pelo farelo de arroz.

4.2 PERFIL DOS VOLUNTÁRIOS

A pesquisa desenvolveu-se com 32 voluntários, porém os resultados a seguir relatam valores obtidos sobre 30 voluntários apenas. De fato, dois deles tiveram que ser excluídos do tratamento de resultados: um deles por apresentar taxas altas de glicemia (acima de 110mg/dL), indicando que ele era diabético³ e o segundo por ter abandonado o experimento na 3ª coleta.

Os 30 voluntários selecionados tinham entre 27 e 57 anos de idade (média de 41 com desvio padrão populacional de 8,9) e índice de massa corporal (IMC) médio de 24,59 (\pm 3,51). Os voluntários foram classificados de acordo com o resultado do IMC segundo Bray (1992) por grupos de idade, como pode ser observado na Tabela 5. Nenhum dos voluntários estava dentro das categorias de obesidade II ou III ou de desnutrição, caso não poderiam ter sido selecionados para o experimento. Os voluntários classificados com sobrepeso e obesidade grau I foram informados do fato, orientados a redução de peso após o fim do experimento e a relação dos nomes foi encaminhada ao setor médico da Empresa.

Tabela 5. Classificação do Índice de Massa Corpórea (IMC) dos voluntários, de acordo com sua faixa etária.

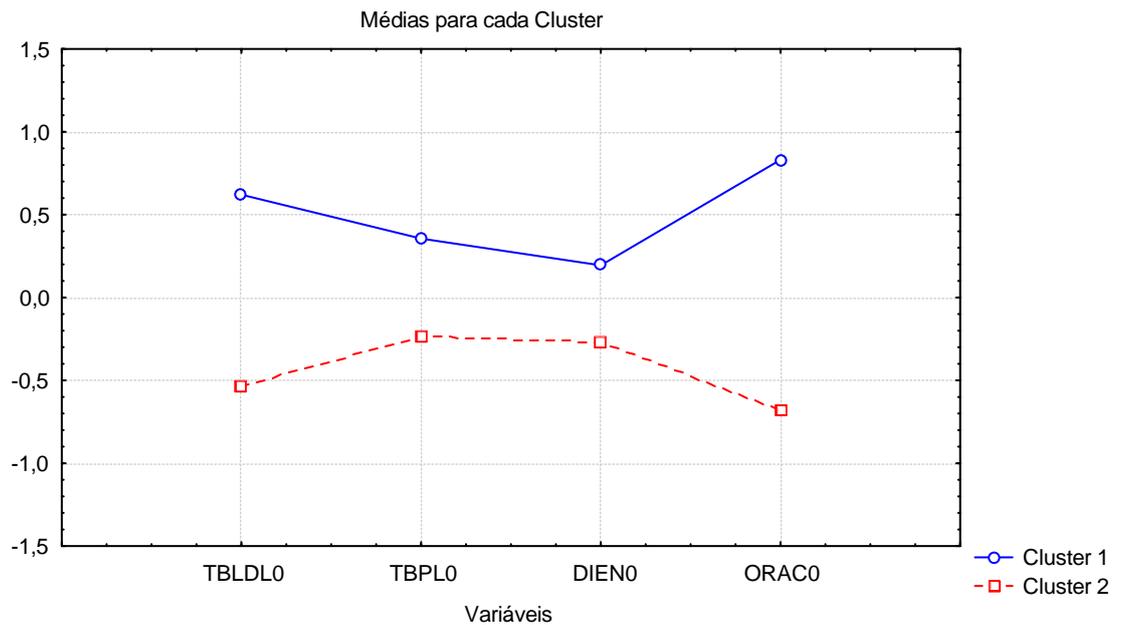
Classificação (IMC em Kg/m ²)	27-37 anos	38-47 anos	48-57 anos
Baixo Peso (>18,5)	0	0	0
Peso Normal (18,5-24,9)	9	6	5
Sobrepeso (25-29,9)	3	2	3
Obesidade Grau I (30-34,9)	0	2	0
Obesidade Grau II (35-39,9)	0	0	0
Obesidade Grau III (>39,9)	0	0	0

Aproximadamente 56% dos voluntários relataram o consumo de algum tipo de bebida alcoólica semanalmente, o consumo de vinho tinto não foi relatado durante a entrevista. Nenhum deles fazia uso de medicamentos ou suplementos vitamínicos.

4.3 FORMAÇÃO DOS GRUPOS ATRAVÉS DA ANÁLISE DE CLUSTER

As médias das triplicatas das diferentes análises realizadas foram submetidas à análise de Cluster, com o objetivo de dividir-se a população estudada em dois grupos distintos a partir dos parâmetros de oxidabilidade no tempo 0 (antes do experimento), ou seja, das seguintes análises: TBARS plasma, TBARS LDL, formação de dienos conjugados, ORAC. Obtiveram-se então dois grupos: cluster 1, constituído de 13 participantes e cluster 2 com 17 voluntários (Figura 7).

³ Salienta-se que este voluntário desconhecia ser diabético e que, assim que obtivemos os resultados de glicemia, o mesmo foi encaminhado por nós para fazer mais exames e adotar uma dieta adequada.



Legenda: TBLDL (análise TBARS sobre a fração LDL); TBPL (TBARS do plasma); DIEN (dienos conjugados); ORAC (capacidade antioxidante ORAC no plasma).

Figura 7. Representação dos valores médios normalizados dos 4 parâmetros antioxidantes encontrados no tempo 0, utilizados para a divisão dos voluntários (n=30) em dois grupos pelo método de *clustering*.

4.4 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

A Tabela 6 apresenta os valores médios com os desvios obtidos para os parâmetros dos lipídios séricos no tempo 0 (antes de consumir açaí) e nos tempos de 10, 20 e 28 dias consumindo açaí: triglicerídeos (TG), colesterol Total (CT) e frações LDL-C e HDL-C. Os resultados são apresentados para os dois grupos formados (clusters 1 e 2) e, em seguida, para o conjunto dos 30 voluntários.

Os valores dos lipídios séricos são mais elevados no cluster 1, porém estes valores não evoluíram significativamente no decorrer das 4 semanas deste experimento, estando todas as médias dentro dos parâmetros de normalidade.

Observa-se no cluster 1 (Tabela 6) tendência de diminuição do colesterol total e LDL-C enquanto o HDL-C é constante, fazendo com que a relação LDL-C/HDL-C tenha valores menores, esta razão sendo um índice de risco para doenças cardiovasculares segundo (CASTELLI, 1983).

Tabela 6. Valores médios e desvios padrões de Triglicerídeos (TG), Colesterol Total (CT) e frações LDL-C e HDL-C em cada cluster durante o período de consumo de açaí.

	Tempo (dias)	TG (mg/dl)	CT (mg/dl)	LDL - C (mg/dl)	HDL - C (mg/dl)
Cluster ^a 1 (n=13)	0	173,3±103,2	184,5±30,4	117,0±26,9	47,9 ±9,6
	10	163,2±79,6	182,4±33,8	114,5±31,6	48,8±9,2
	20	153,5±72,7	174,5±26,7	109,2±25,1	48,3±8,4
	28	183,9±90,6	176,6±32,2	110,7±27,2	48,8±9,3
Cluster ^a 2 (n=17)	0	113,5±56,4	159,0±35,1	105,4±28,8	41,9±7,3
	10	141,3±84,0	159,8±26,2	102,4±21,5	43,9±7,0

	20	129,0±67,6	161,3±31,4	104,1±27,0	44,3±6,4
	28	148,3±74,7	165,0±31,6	107,3±25,5	43,4±6,8
Valores médios (n=30)	0	136,93±83,06	170,1±34,39	110,4±28,12	44,5±8,74
	10	150,34±79,93	170,6±31,11	108,5±26,53	46,1±8,27
	20	139,63±69,67	167,6±29,21	106,8±25,46	46,0±7,47
	28	162,33±81,90	170,6±31,36	109,1±25,46	46,0±8,21

^a Análise de Cluster foi usada a fim de se construir dois grupos (voluntários mais e menos protegidos, de acordo com parâmetros antioxidantes ORAC, dienos conjugados, plasma e LDL TBARS) no tempo 0.

Em ambos os grupos, observam-se uma tendência no aumento dos triglicerídeos formados provavelmente em consequência do aumento do aporte lipídico diário. De fato, lembrando-se que 52% da matéria seca do açaí é feita de lipídios (ROGEZ, 2000), calcula-se que os voluntários ingeriam 25,5g de lipídios a mais por dia. É normal que o organismo apresente esta tendência no aumento de TG. Talvez, este mesmo aumento justifique a elevação da glicemia (Tabela 7), pois sabe-se que o aumento de TG pode ser correlacionado a um aumento leve de glicose plasmática através da liberação de glicerol, o qual pode entrar imediatamente na gliconeogênese (NELSON e COX, 2000).

As análises de glicose e enzimas hepáticas não foram agrupadas em cluster, por serem análises de apoio ao estudo, objetivando apenas confirmar o estado de saúde dos voluntários. Estes valores são apresentados na tabela 7.

Tabela 7. Valores médios e desvios padrões das análises bioquímicas de glicose, fosfatase alcalina e transaminase glutâmico pirúvica (TGP) dos 30 voluntários durante 28 dias de consumo de açaí.

Dias	Glicose (mg/dL)	Fosfatase Alcalina (U/L)	TGP (U/L)
0	76,8± 8,6	82,8± 21,7	24,9±6,5
10	86,5±9,4	79,3±19,3	28,6±10,6
20	90,0±10,8	80,13±19,7	26,5±8,0
28	85,0±9,2	80,40±19,7	26,2±8,2

No que se refere à glicose, o aumento foi significativo durante as quatro semanas de estudo ($p < 0,05$), sendo este aumento mais acentuado na terceira semana ($p < 0,01$).

As enzimas hepáticas mantiveram-se dentro dos padrões de normalidade (FA 65-300 U/L e TGP 8-53 U/L) durante o experimento para todos os participantes, confirmando a baixa toxicidade hepática do açaí e, em particular, dos polifenóis, fato já constatado por Clifford (2000).

4.5 PARÂMETROS ANTIOXIDANTES

A Tabela 8 apresenta os valores das análises que serviram como base para a formação dos dois grupos (clusters) acima dos valores de oxidabilidade do LDL e capacidade antioxidante do plasma antes do período de consumo do açaí (tempo 0). Pode - se notar que o Cluster 1 é o que possuía valores iniciais mais elevados, porém o TBARS LDL foi o único parâmetro que apresentou diferença significativa entre os clusters ($p < 0,05$). As análises serão discutidas separadamente a seguir.

Tabela 8. Valores médios e desvios padrões das análises antioxidantes dos voluntários através da determinação de TBARS LDL e plasmático, dienos conjugados e valores plasmáticos de TRAP e ORAC em cada cluster durante o período de consumo de açaí.

	Tempo (dias)	LDL TBARS (nmolMDA/g LDL)	Plasma TBARS (nmol MDA/ml)	Dienos Conjugados Tempo de latência (minutos)	Plasma ORAC (mmol TE/L)	Plasma TRAP (μ mol TE/L)
Cluster ^a 1 (n=13)	0	3,8 \pm 2,3	215,0 \pm 76,2	64,4 \pm 39,1	20,0 \pm 2,2	15,5 \pm 6,0
	10		176,1 \pm 88,6		18,9 \pm 2,2	18,1 \pm 9,1
	20		181,3 \pm 82,9		18,0 \pm 2,8	17,8 \pm 7,5
	28	1,6 \pm 1,0	160,2 \pm 80,5	70,5 \pm 41,6	19,3 \pm 3,4	17,7 \pm 6,8
Cluster ^a 2 (n=17)	0	1,2 \pm 0,5	158,8 \pm 91,0	50,4 \pm 12,2	14,7 \pm 2,5	19,6 \pm 8,0
	10		152,3 \pm 98,6		15,6 \pm 2,4	21,8 \pm 11,1
	20		143,3 \pm 88,6		17,1 \pm 4,7	20,9 \pm 8,2
	28	1,1 \pm 0,6	126,9 \pm 64,0	53,9 \pm 17,1	17,5 \pm 5,1	20,6 \pm 9,8
Valores médios (n=30)	0	2,4 \pm 2,0	180,9 \pm 86,5	56,7 \pm 27,5	17,0 \pm 3,3	18,2 \pm 7,6
	10		164,1 \pm 90,3		17,0 \pm 2,5	20,6 \pm 10,4
	20		169,7 \pm 96,2		17,6 \pm 3,8	20,2 \pm 8,6
	28	1,3 \pm 0,8	142,2 \pm 71,8	61,3 \pm 30,6	18,0 \pm 4,2	19,5 \pm 8,5

^a Análise de Cluster foi usada a fim de se construir dois grupos (voluntários mais e menos protegidos, de acordo com os parâmetros antioxidantes ORAC, dienos conjugados, plasma e LDL TBARS) no tempo 0.

4.5.1 Análise de susceptibilidade a peroxidação pelo teste TBARS

Houve uma redução significativa ($p < 0,05$) nos valores de TBARS LDL nos indivíduos agrupados no Cluster 1 (Tabela 8), os quais apresentavam valores iniciais mais altos de oxidabilidade.

Esse resultado positiva contraria o estudo de Loir (2004) realizado também com LDL isolado, porém *in vitro* e adicionando extratos de *Euterpe oleracea*.

Diversos estudos *in vitro* e *in vivo* (LONG e CHEUNG, 2005; AKÇAY *et al*, 2004) apontam uma correlação positiva entre a quantidade de polifenóis de plantas e proteção a peroxidação das LDL, estando essa peroxidação intimamente ligada a formação das placas de ateroma no interior das artérias e conseqüente obstrução dessas vias.

Os valores médios de TBARS no plasma não diminuíram de forma estatisticamente significativa em ambos os grupos ($p > 0,05$) (Tabela 8), apesar de a média decrescer durante o período do estudo. Diversos outros estudos com humanos já relacionaram a ingestão de polifénóis com o decréscimo do índice de TBARS no plasma (MIURA *et al*, 2000; BUB *et al*, 2003; AKÇAY *et al*, 2004).

Esses resultados sugerem que o consumo de açaí possui efeito anti-aterosclerótico através da inibição significativa da peroxidação do LDL - C em homens nos quais seus valores iniciais estavam superiores, podendo ser qualificados de pessoas susceptíveis a doença.

4.5.2 Análise da susceptibilidade das LDL a oxidação e formação de dienos conjugados

Na oxidação da LDL induzida pelo Cu^{2+} , pode-se observar que a média do tempo de latência tendeu a aumentar (Tabela 8), principalmente no cluster 1, que tinha os valores mais altos de oxidabilidade

através da análise de TBARS. Este aumento tem como consequência o retardo no início da formação dos dienos conjugados, porém esses aumentos não foram estatisticamente significativos ($p > 0,05$).

No trabalho realizado por Bub *et al* (2003) a partir do consumo de sucos de frutas ricas em polifenóis também não foi encontrado aumento significativo do tempo de latência.

Entretanto, no trabalho realizado por Miura *et al* (2000) utilizando o chá verde, o qual é rico em polifenóis (flavan-3-óis), foi observado um aumento significativo ($p < 0,05$) na fase de latência, em média de 15 minutos durante as duas semanas de estudo.

4.5.3 Análise da capacidade antioxidante do plasma pelos métodos ORAC e TRAP

Ocorreu apenas estabilização ou pequeno aumento nos valores de ORAC e TRAP nos dois grupos de voluntários, as mudanças não sendo estatisticamente significativas ($p > 0,05$) (Tabela 8).

Os valores médios do ORAC não aumentaram de forma significativa durante o período do estudo ($p > 0,05$), devido aos desvios populacionais serem muito altos, porém observa-se uma tendência de aumento (Figura 8). Esse comportamento está de acordo com o encontrado no estudo de Cao *et al* (1998), nos resultados de ORAC- β -PE, num grupo jovem (20-40 anos) que consumiu um dos tipos de dieta rica em frutas e vegetais por 15 dias (valor ORAC da dieta 3,3 mmol equivalente Trolox/dia)

Os resultados médios gerais encontrados na análise TRAP mostraram aumento significativo na capacidade antioxidante do plasma nos períodos de 10 e 20 dias ($p < 0,05$), porém esse resultado não foi significativo entre o tempo inicial (0 dia) e o fim de estudo (28 dias), onde observa-se o alcance a um chamado *plateau* fisiológico de capacidade antioxidante (Figura 8), descrito por Cao *et al* (1998).

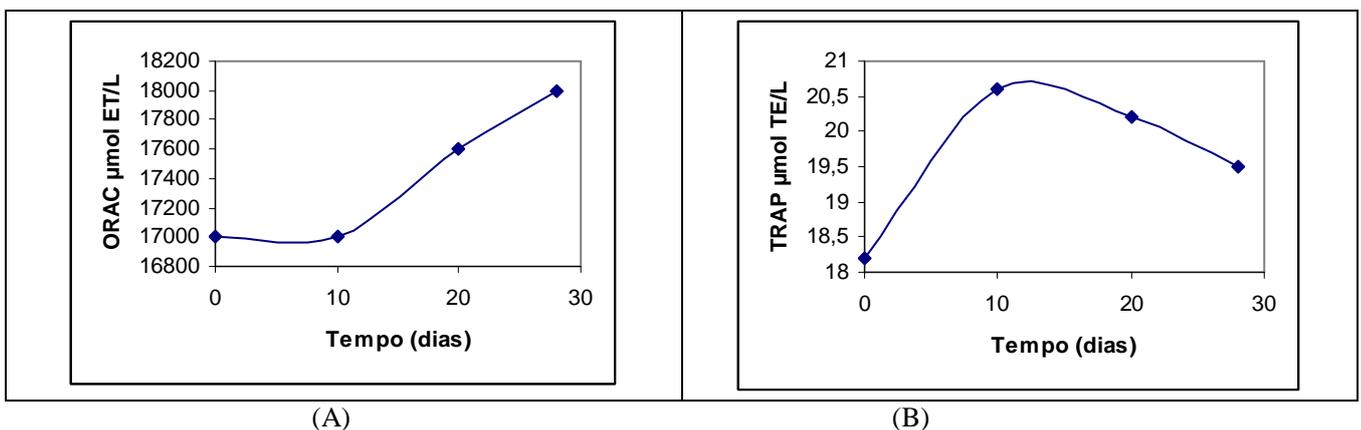


Figura 8. Evolução média no plasma (A) do ORAC e (B) do TRAP, durante o período de 28 dias de consumo do açáí (n=30).

4.6 CORRELAÇÃO ENTRE AS ANÁLISES

A Tabela 9 representa as correlações encontradas entre as médias normalizadas das análises realizadas. Os valores foram normalizados acima do seu valor inicial *branco* (tempo 0) para que seja melhor avaliar o impacto individual do consumo do açáí no período do estudo.

Como esperado, o colesterol total e suas frações (LDL-C e HDL-C) são todos inter-relacionados de forma significativa. Observa-se também que os valores de TBARS plasmáticos correlacionam-se em dois momentos (tempo 20 e 28 dias) com a glicemia. Essa relação já foi descrita por Greismacher *et al* (1995) em pacientes diabéticos tipo II, já que há um aumento no estresse oxidativo através da exposição das proteínas a glicose, levando a glicosilação e com isso diminuição da ação de enzimas como a glutathione peroxidase e superóxido dismutase. As análises de capacidade antioxidante plasmática ORAC e TRAP não tiveram correlações com as demais análises realizadas.

Tabela 9. Correlações entre as médias normalizadas de todas as experiências realizadas (n = 30) os casos em negrito representam os valores significativos (p < 0,05).

	COL10	COL20	COL28	HDL10	HDL20	HDL28	LDL10	LDL20	LDL28	TG10	TG20	TG28	GLIC10	GLIC20	GLIC28	FA10	FA20
COL10																	
COL20	0,66																
COL28	0,60	0,60															
HDL10	0,77	0,52	0,46														
HDL20	0,65	0,77	0,48	0,73													
HDL28	0,70	0,57	0,78	0,75	0,73												
LDL10	0,94	0,55	0,55	0,72	0,60	0,66											
LDL20	0,54	0,93	0,46	0,44	0,64	0,44	0,48										
LDL28	0,58	0,55	0,97	0,44	0,44	0,73	0,55	0,44									
TG10	0,26	0,39	0,40	-0,07	-0,06	0,19	0,17	0,40	0,35								
TG20	0,19	0,27	0,45	0,16	-0,08	0,19	0,09	0,19	0,43	0,55							
TG28	0,36	0,49	0,68	0,20	0,16	0,43	0,32	0,44	0,61	0,72	0,69						
GLIC10	0,06	0,17	0,17	-0,12	-0,09	-0,06	-0,01	0,26	0,20	0,21	0,09	0,11					
GLIC20	-0,14	0,07	-0,06	-0,17	-0,06	-0,20	-0,13	0,18	-0,08	0,06	-0,04	0,08	0,65				
GLIC28	-0,17	0,05	0,02	-0,26	-0,06	-0,22	-0,18	0,08	-0,04	0,14	0,02	0,18	0,49	0,66			
FA10	0,17	0,41	0,16	0,06	0,42	0,12	0,13	0,33	0,17	0,08	-0,09	0,04	-0,26	-0,46	-0,16		
FA20	0,18	0,44	0,15	0,10	0,30	0,11	0,07	0,40	0,14	0,04	0,17	-0,02	0,03	-0,13	-0,18	0,60	
FA28	0,18	0,30	0,49	0,13	0,21	0,33	0,15	0,21	0,50	0,23	0,19	0,28	0,02	-0,21	-0,06	0,60	0,41
TGP10	0,12	0,02	-0,40	0,06	0,15	-0,17	0,05	0,06	-0,38	-0,11	-0,44	-0,39	-0,06	-0,01	-0,10	0,21	0,10
TGP20	0,16	0,03	-0,11	0,02	0,08	-0,09	0,05	0,00	-0,08	-0,22	-0,29	-0,43	0,08	0,09	-0,25	-0,14	0,21
TGP28	0,33	0,24	0,38	0,15	0,19	0,32	0,21	0,14	0,37	0,02	-0,02	-0,08	0,09	0,03	-0,12	-0,03	0,33
TBLDL28	-0,01	0,41	0,11	0,07	0,29	0,09	-0,07	0,46	0,13	-0,02	0,02	0,08	-0,09	-0,06	-0,12	0,21	0,13
TBPL10	0,01	0,08	0,45	0,03	0,14	0,19	-0,02	-0,02	0,41	0,07	0,16	0,20	0,34	0,30	0,57	0,02	0,07
TBPL20	0,14	0,22	0,36	0,06	-0,02	0,14	0,02	0,21	0,28	0,31	0,25	0,26	0,39	0,39	0,58	-0,25	0,04
TBPL28	-0,03	0,07	0,42	0,03	0,10	0,15	-0,08	0,01	0,37	-0,02	0,13	0,14	0,31	0,15	0,44	-0,01	0,06
DIELDL28	0,16	0,11	0,26	-0,03	0,05	0,19	0,24	0,11	0,32	0,31	0,09	0,22	-0,30	-0,42	-0,21	0,44	0,01
ORAC10	-0,04	0,17	0,16	0,07	0,14	0,10	0,07	0,35	0,19	0,05	-0,01	0,30	-0,03	0,03	0,10	0,09	0,01
ORAC20	0,00	0,10	-0,14	0,01	0,04	-0,16	-0,11	0,11	-0,12	0,00	-0,12	-0,02	-0,24	-0,28	-0,29	0,26	0,12
ORAC28	0,04	0,00	-0,03	0,12	-0,03	-0,09	-0,08	0,01	0,03	0,03	-0,06	-0,01	-0,13	-0,26	-0,17	0,10	-0,12
TRAP10	-0,10	-0,17	-0,31	-0,09	-0,19	-0,26	-0,16	-0,21	-0,32	-0,04	0,05	-0,14	0,19	0,23	0,22	-0,22	0,02
TRAP20	0,14	0,11	0,24	0,11	0,10	0,25	0,13	-0,01	0,25	0,22	0,08	0,13	0,07	-0,03	0,07	0,01	-0,19
TRAP28	-0,40	-0,54	-0,36	-0,22	-0,38	-0,36	-0,44	-0,59	-0,36	-0,20	-0,04	-0,19	-0,12	0,00	0,07	-0,16	-0,20

	FA28	TGP10	TGP20	TGP28	TBLDL28	TBPL10	TBPL20	TBPL28	DIELDL28	ORAC10	ORAC20	ORAC28	TRAP10	TRAP20	TRAP28
COL10															
COL20															
COL28															
HDL10															
HDL20															
HDL28															
LDL10															
LDL20															
LDL28															
TG10															
TG20															
TG28															
GLIC10															
GLIC20															
GLIC28															
FA10															
FA20															
FA28															
TGP10	-0,03														
TGP20	-0,25	0,51													
TGP28	0,16	0,03	0,67												
TBLDL28	-0,07	0,10	0,12	0,04											
TBPL10	0,27	-0,26	-0,16	0,10	-0,08										
TBPL20	0,09	-0,10	0,06	0,27	0,04	0,59									
TBPL28	0,21	-0,25	-0,06	0,07	0,10	0,80	0,66								
DIELDL28	0,37	-0,06	-0,15	0,11	0,15	-0,29	-0,25	-0,33							
ORAC10	0,00	-0,11	-0,36	-0,41	0,25	0,00	0,02	0,05	0,12						
ORAC20	-0,09	0,11	0,07	-0,18	0,29	-0,28	-0,15	-0,17	0,05	0,32					
ORAC28	-0,04	0,14	0,04	-0,18	0,16	-0,09	0,11	0,06	-0,01	0,33	0,81				
TRAP10	-0,30	0,09	0,15	0,11	-0,20	0,03	0,06	-0,14	-0,32	-0,38	0,11	0,00			
TRAP20	0,04	-0,18	-0,01	0,25	-0,19	0,16	0,07	-0,04	0,11	-0,45	-0,26	-0,15	0,39		
TRAP28	-0,22	-0,07	-0,11	-0,18	-0,14	0,14	-0,11	0,03	-0,21	-0,39	0,17	0,14	0,59	0,21	

5. CONCLUSÕES

O presente trabalho objetivou estudar a ação dos polifenóis presentes na bebida açaí, particularmente as antocianinas em humanos, no plasma e na fração LDL do colesterol. Os resultados encontrados mostraram que o consumo de açaí a 14% de matéria seca, 1.890 mg de antocianinas/L, 5.152 mg de polifenóis /L (em EAG) e apresentando uma atividade antioxidante de 192,7 mmol ET/L, tem um efeito positivo na oxidabilidade das LDL's através do método TBARS, sendo este um efeito qualitativo, já que o quantitativo tanto do colesterol total quanto das frações (HDL-C e LDL-C) não sofreu modificações no mesmo período.

A capacidade antioxidante do plasma medida através do protocolo de análise TRAP foi aumentada nos primeiros 20 dias de consumo, efeito intimamente relacionado à prevenção dos efeitos oxidativos prejudiciais à saúde humana.

Após o agrupamento através da metodologia de Clusters, pode-se observar que houve melhoria na oxidabilidade tanto do LDL quanto do plasma no grupo com maior oxidabilidade inicial, verificado através da análise TBARS.

Pretende-se a partir desse estudo, incentivar à pesquisa sob aspectos funcionais não só dos frutos de *Euterpe oleracea*, mas também de outros frutos amazônicos, a fim de estimular a produção, consumo e valorização destes produtos.

6. REFERÊNCIAS

AKÇAY, Y.; YILDIRIM, H.; GÜVENÇ, U.; SÖZMEN, E. The effects of consumption of organic and nonorganic red wine on low-density lipoprotein oxidation and antioxidant capacity in humans. **Nutrition Research**, 5416554, 2004.

AL-AWWADI, N.; AZAY, J.; POUCHERET, P.; CASSANAS, G.; KROSNIAK, M.; AUGER, C.; GASC, F.; ROUANET, J.-M.; CROS, G.; TEISSEDE, P.-L. Antidiabetic activity of red wine polyphenolic extract, ethanol, or both in streptozotocin-treated rats. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 52(4): 1008-1016, 2004.

ALHO H.; LEINONEN J., Total antioxidant measured by chemiluminescence methods, **Methods in Enzymology**, 299: 3-15, 1999.

ARUOMA, OI., Free radicals, oxidative stress, and antioxidants in human health and disease. **Journal of the American Chemical Society**, 57 (2): 199-212, 1998.

ASKAR, A.; TREPTOW, H. **Quality assurance in tropical fruit processing**. Ed. Springer- Verlag, 1993, 238p.

AZEVEDO, A. Prevention of acute coronary events through the Mediterranean diet. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, 73: 453-454, 1999.

BENZIE, I.F.F., STRAIN, J. J., Ferric reducing/Antioxidant power assay: Direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration, **Methods in Enzymology**, 199: 15-27, 1999.

BOBBIO, A; BOBBIO, F. O. **Química do processamento de alimentos**. 2 ed. São Paulo: Varela, 1992. 151p.

BOVI, M. L. A.; CASTRO, A; ASSAÍ, CLAY, J. W; CLEMENT, C. R, Income generating forest and conservation in Amazonia, **FAO Forestry Paper**, Rome FAO United Nations, 58-67, 1993.

BRASIL, Ministério da Agricultura. Coordenação de Inspeção Vegetal. Decreto nº 2.314, de 4 de setembro de 1997, art. 87, inciso II. Regulamentos Técnicos para Fixação dos Padrões de Identidade e Qualidade para polpa das seguintes frutas: acerola, cacau, cupuaçu, graviola, açaí, maracujá, caju, manga, goiaba, pitanga, uva, mamão, cajá, melão, mangaba, e para suco das seguintes frutas: maracujá, caju, caju alto teor de polpa, caju clarificado ou cajuína, abacaxi, uva, pêra, maçã, limão, lima ácida e laranja. **Diário Oficial**, Brasília, DF. Nº 01, DE 7 DE JANEIRO DE 2000.

BRAY, A. Pathophysiology of obesity. **American Journal of Clinical Nutrition**, pp 488S-494S, 1992.

BUB, A.; ACHIM, B.; BERNHARD, W.; BLOCKHAUS, M.; KARLIS, B.; LIEGIBEL, U.; HARALD, M.; POOL-ZOBEL, B., RECHKEMMERA, G. Fruit juice consumption modulates antioxidative status, immune status and DNA damage. **Journal of Nutritional Biochemistry**, 90698, 2003.

CALZAVARA, B. B. G. As possibilidades do açazeiro no estuário amazônico. **Boletim da Faculdade de Ciências Agrárias do Pará**, Belém/PA, 1976.103p.

CAMPBELL, M. K. **Biochemistry**. Harcourt Brace e Company. 3rd ed. Flórida, EUA, 1999. 126p.

CAO, G.; MUCCITELLI, U.; SANCHEZ-MORENO, C; PRIOR, L. Anthocyanins are absorbed in glycated forms in elderly women: a pharmacokinetic study. **American Journal of Clinical Nutrition**, 9206926, 2001.

CAO, G.; PRIOR, R.L., Measurement of Oxygen Radical Absorbance Capacity in biological samples, **Methods in Enzymology**, 50-62, 1999.

CAO, G.; VERDON C.P.; WU A.H.B.; WANG, H.; PRIOR R.L., Automated assay of oxygen radical absorbance capacity with the COBAS FARA II, **Clinical Chemistry** 1738-1744, 1995.

CAO, G; BOOTH, S; SADOWSKI, J; PRIOR, R. Increases in human plasma antioxidant capacity after consumption of controlled diets high in fruit and vegetables. **American Journal of Clinical Nutrition**, 108161087, 1998.

CASTELLI, W; ABBOT, W; NAMARA P. Summary estimates of cholesterol used to predict coronary heart disease. **Circulation**, 67: 730-734, 1983.

CAVALCANTE, F. L. de M. **Avaliação farmacológica da eficácia hipocolesterolêmica da *Anomura muricata* e da *Cróton cajucara* (sacaca) em ratos normais**. Laboratório de etnofarmacologia. Departamento de Fisiologia (Farmacologia). Universidade Federal do Pará. Belém, 1990.

CAVALCANTE, P. B. **Frutos comestíveis da Amazônia**. 2.ed. Belém: Falangôla, 1976. 154p.

CHANCE, B.; SIES, H.; BOBERIS, A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organisms. **Physiology Review**.527-605, 1979.

CIUDAD, B.; VALENZUELA, B. Contenido de flavonoles en uvas para vino cultivadas en el Valle de Casablanca, Chile. **Agricultura Técnica** 62: 79 - 86, 2002.

CLIFFORD, M. Anthocyanins-nature, occurrence and dietary burden. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 80:1063-1072, 2000.

COOK, N.C, SAMMAN, S, Flavanoids-Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources, **Journal of Nutritional Biochemistry**, 7: 66-76, 1996.

COTELLE, N; BERNIER, L; CATTEAU, P; POMMERY, J; WALLET, J.C; GAYDOU E.M. Antioxidant properties of hydroxy-flavones, **Free Radical Biology and Medicine**, 20: 35-43, 1996.

COULTATE, T. P. **Manual de química y bioquímica de los alimentos**. 2 ed. Zaragoza, España: Acribia, 1998, 366p.

DENIS, H. **Analyse du pouvoir antioxydants et de la concentration en anthocyanines de fruits rouges** óensaios de correlação, Trabalho de conclusão de curso de engenheiro químico e de bioindúst.Universidade Católica de Louvain, Louvain-la-Neuve, Bélgica, 100 p, 2001.

DUFALL, K.G.; NGADJUI, B.T.; SIMEON, K.F.; ABEGAZ, B.M.; CROFT K.D., Antioxidant activity of prenylated flavonoids from the West African medicinal plant *Dorstenia mannii*, **Journal of Ethnopharmacology**, 87, 67-72, 2003.

DUTHIE, G. G.; DUTHIE, S. J.; KYLE, J. A. M. Plant polyphenols in cancer and heart disease: implications as nutritional antioxidants. **Nutrition Research Reviews**, 13, 79-106, 2000.

FEINLEB, M. The magnitude and nature of the decrease in coronary artery disease mortality rate. **American Journal of Cardiology**.54:2c-6c. 1984.

FENNEMA, O.R., **Química de los alimentos**, Ed. Acribia, Zaragoza, España, , 1993. 1.095 p

FRANKEL, E.N.; MEYER, A.S., The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants, **Journal of Food Science and Agricultural**. 80: 1925-1941, 2000.

FRUEBIS, J.; BIRD, D.A.; PATTINSON, J.; PALINSKI, W. Extent of antioxidant protection of plasma LDL is not a predictor of the antiatherogenic effect of antioxidants. **Journal of Lipids Research**, 38: 2455- 2464, 1997.

GEE, J. M.; JOHNSON, I. T. Polyphenolic compounds: interactions with the gut and implications for human health. **Current Medicinal Chemistry**, 8: 124561255, 2001.

GRAHAM, J.M.; HIGGINS, J.A.; GILLOT, T.; WILKINSON, J.; FORD, T.; BILLINGTON, D., A novel method for the rapid separation of plasma lipoproteins using gradients of iodixanol, **Atherosclerosis**, 124: 125-135, 1996.

GREGORY, J.; FOSTER, K.; TYLER, H.; WISEMAN, M. The dietary and nutritional survey of British adults. **Her Majesty's Stationary Office (HMSO)**, London, England, 1990.

GREISMACHER, A; KINDHAUSER, M; ANDERT, S. Enhanced serum levels of thiobarbituric-acid reactive substances in diabetes mellitus. **American Journal of Medicine**, 98: 469675, 1995.

GUYTON, A. C. **Tratado de Fisiologia Médica**. 8 ed. Guanabara-Koogan, Rio de Janeiro, 1992.

HALLIWELL B. Lipid peroxidation, antioxidants and cardiovascular disease: how should we move forward? **Cardiovascular Research**, 47: 410-418, 2000.

HALLIWELL, B., AESCHBACH, R., LOLIGER J., ARUOMA, OI. The characterization of antioxidants, **Food and Chemical Toxicology**, 33: 601-617, 1995.

HALLIWELL, B. Free Radicals and Antioxydant: A personal view, **Nutrition Reviews**, 52: 253-265, 1994

HAMILTON, R. J; KALU, C; PRISK, E; PADLEY, F.B; PIERCE, H. Chemistry of free radicals in lipids. **Food Chemistry**, 60: 193-199, 1997.

HEINONEN, I. M., MEYER, A. S., FRANKEL, E. N. Antioxidant activity of berry phenolics on human low-density lipoprotein and liposome oxidation. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, 46: 4107-4112, 1998.

HERTOG, M.G.L.; FESKENS, E.J.M.; HOLLMAN, P.; KATAN, M.B.; KROMHOUT. D. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease the Zutphen elderly study. **The Lancet**, 342: 1007-101, 1993.

HOLLMAN, P.; KATAN, M.B. Dietary flavonoids: Intake, health effects an bioavailability. **Food and Chemical Toxicology**, 37: 937-942, 1999.

HUANG, D.; OU, B., HAMPSCHE-WOODILL, M., FLANAGAN, J.A., PRIOR, R.L., High-Throughput assay of oxygen radical absorbance capacity (ORAC) using a multichannel liquid handling system coupled with a microplate fluorescence reader in 96-well format, **Journal of Food and Agricultural Chemistry**, 50: 4437-4444, 2002.

KANNER, J.; LAPIDOT, T. The stomach as a bioreactor: dietary lipid peroxidation in the gastric fluid and the effects of plant-derived antioxidants. **Free Radical Biology & Medicine**, 31: 138861395, 2001.

KATCH, F. I.; McARDLE, W. D. **Nutrição, exercício e saúde**. 4 ed. São Paulo: Medsi, 1996.

KIRK, E.A.; SUTHERLAND, P.; WANG, S.; SHAIT, A.; LEBOEUF, R.C. Dietary isoflavones reduce plasma cholesterol and atherosclerosis in C57BL/6 mice but not LDL-receptor-deficient Mice. **Journal of Nutrition**. 128: 954-954, 1998.

KONTUSH, A.; BEISIEGEL, U.; Measurement of oxidizability of blood plasma, **Methods in Enzymology**, 299: 35-49, 1999.

KRASOWSKA, A.; ROSIAK, D.; SZKAPIAK, K.; OSWIECIMSKA, M.; WITEK, S.; LUKASZEWICZ, M.; The antioxidant activity of BHT and new phenolic compounds PYA and PPA measured by chemiluminescence, **Cellular & Molecular Biology Letters**, 6: 71-81, 2001.

KÜNHAU, J. The flavonoids, a class of semi-essential food components: their role in human nutrition. **World Review of Nutrition and Dietary**, 24: 117-191, 1976.

LAMIKANRA, O. Development of anthocyanin pigments in muscadine (*Vitis rotundifolia Michx*). Grapes. **Horticultural Sciences**, 23: 597-599, 1988.

LEITE, P.F. **Risco cardiovascular: Fatores metabólicos e nutricionais, diagnóstico e tratamento**. Editora Acta Médica Ltda., 1994, 175p.

LIN, B.B.; CHEN, H.L.; HUANG, P.C.; Effects on instant Pauchong Tea, Cathecin, and Caffeine on serum cholesterol and serum low-density-lipoprotein in mice. **Nutrition Reports International**, 34: 821-829, 1986.

LIN, M.; ANDERSON, H.; FLAVIN, M.T.; PAI, Y.S. In vitro anti-HIV activity of bioflavonoids isolated from rhus succedanea and garciana multiflora. **Journal of Natural Products**, 60: 884-888, 1997.

LOIR, A. **Etude comparative de l'effet antioxydant, in vitro, de composés phénoliques de 5 plantes amazoniennes, sur le sang humain**. Trabalho apresentado para obtenção do título de bioengenheiro. Unidade de Bioquímica da Nutrição, Faculdade de ciências Agronômicas, Universidade Católica de Louvain, 2004.

LONG, K.M.; CHEUNG, P.C.K. Antioxidant activity of extracts from the fruiting bodies of *Agrocybe aegerita* var. Alba. **Food Chemistry**, 89: 5336539, 2005.

MADHAVI, D. L.; DESHPAND, S. S.; ESALUNKHE, D. K., **Food antioxidants: technological, toxicological and health perspectives**, Ed. Dekker, New York, 1995, 487p.

MARCH, J. **Free radicals in advanced organic chemistry ó Reactions, Mechanisms & Structure**, Ed. John Willey & Sons, 4 ed, 1992.

MARKAKIS, P. **Anthocyanins as food colors**. New York, USA: Academic Press, 1982, 262 p.

MATSUMOTO, H.; INABA, H.; KISHI, M.; TOMINAGA, S.; HIRAYAMA, M; TSUDA, T. Orally administered delphinidin 3-rutinoside and cyanidin 3-rutinoside are directly absorbed in rats and humans and appear in blood as the intact forms. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 49: 154661551, 2001.

MIDDLETON, E; KANDASWAMI, C; THEOHARIDES, T.C. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. **Pharmacology Review**, 52: 673-751, 2000.

MIURA, Y; CHIBA, T; MIURA, S; TOMITA, I; UMEGAKI, K; MASAHIKO, I; TOMITA, T. Green tea polyphenols (flavan 3-ols) prevent oxidative modification of low density lipoproteins: An ex vivo study in humans. **Journal of Nutrition Biochemistry**, 11: 216-222, 2000.

NELSON, D.; COX, M. **Lehninger Princípios de Bioquímica**. 3ª ed. São Paulo, Sarvier, 2002.

NETZEL, M.; STRASS, G.; JANSSEN, M.; BITSCH, I.; BITSCH, R.. Bioactive anthocyanins detected in human urine after ingestion of blackcurrant juice. **Journal of Environmental pathology, Toxicology and Oncology**, 20: 89695, 2001.

NIJVELDT, R. J.; NOOD, E.; DEC, H.; BOELENS, P.G.; NORREN, K.; PAM, L. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications, **American Journal of Clinical Nutrition**, 74: 418-425, 2001.

NUTTAL, L.; KENDALL, M.; MARTIN, U. Antioxidant therapy for the prevention of cardiovascular disease. **QJM: An International Journal of Medicine**, 92, 1999.

OLIVEIRA, M. S. P. **Avaliação do modo de reprodução e de caracteres quantitativos em 20 acessos de açazeiro (*Euterpe oleracea* Mart. ARECACEAE) em Belém-PA.** Recife-PE, Brasil, 1995, 146p. Tese de Mestrado em Botânica da Universidade Federal Rural de Pernambuco.

OU, B.; HAMPSCH-WOODILL, M.; FLANAGAN, J.A.; PRIOR, R.L., Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe, **Journal of Food and Agricultural Chemistry**, 49: 4619-4626, 2001.

PASSAMONTI, S.; VRHOVSEK, U.; MATTIVI, F. The interaction of anthocyanins with bilitranslocase. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 296: 6316636, 2002.

PASSAMONTI, S.; VRHOVSEK, U.; VANZO, A.; MATTIVI, F. The stomach as a site for anthocyanins absorption from food. **FEBS Letters**, 544: 2106213, 2003.

PAULA, J. E. Anatomia de *Euterpe oleracea* Mart. (*Palmae* da Amazônia). **Acta Amazônica**, 3: 265-278, 1995.

PETERSON, J.; DWYER J. Flavonoids: Dietary occurrence and biochemical activity. **Nutrition Research**, 18: 1995-2018, 1998.

PINCEMAIL, J; BONJEAN, K; CAYEUX, K; DEFRAIGNE J. Mécanismes physiologiques de la défense antioxydante Physiological action of antioxidant defences. **Nutrition clinique et métabolisme** 16 : 2336239, 2002.

PRIOR, R.L., CAO, G.H. Antioxidant capacity and polyphenolic components of teas: Implications for altering in vivo antioxidant status. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, 220: 255-261, 1999.

PROUDFOOT, J.M.; PUDDEY, I.B.; BEILIN, L.J.; STOCKER, R.; CROFT, K.D. Unexpected dose response of copper concentration on lipoprotein oxidation in serum: discovery of a unique peroxidase-like activity of urate/albumin in the presence of high copper concentrations, **Free Radical Biology & Medicine**, 23: 699-705, 1997.

PUHL, H.; WAEG, G.; ESTERBAUER, H.; Methods to determine oxidation of low-density lipoproteins, **Methods in Enzymology**, 233: 425-441, 1994.

PUUPPONEN-PIMIÄ, R.; NOHYNEK, L.; MEIER, C.; KÄHKÖ NEN, M.; HEINONEN, M.; HOPIA, A.; OKSMAN-ALDENTY, K.-M. Antimicrobial properties of phenolic compounds from berries. **Journal of Applied Microbiology**, 90: 4946507. 2002.

RATTY, A., K.; DAS, P. N. Effects of flavonoids on nonenzymatic lipid peroxidation: structure-activity relationship. **Biochemical Medicine and Metabolic Biology** 39: 69-79, 1998.

RICE-EVANS, C.; HALLIWELL, B.; LUNT, G.G. Free Radicals and Oxidative Stress: Environment, Drugs and Food Aditivies. **Biochemical Society Symposium** 61, London, Portland Press, 1995.

RICE-EVANS, C.A., MILLER, N.J., PAGANGA, G., Antioxidant properties of phenolic compounds, **Trends in plant science**, 2: 152-159, 1997.

ROBARDS, K., PRENZLER, P.D., TUCKER, G., SWATSITANG, P., GLOVER, W., Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits, **Food Chemistry**, 66: 401-436, 1999.

ROGEZ, H. **Açaí: Preparo, Composição e Melhoramento da Conservação**. Belém: Edufpa, 2000. 313p.

SATUÉ-GRACIA, M. T.; HEINONEN, M.; FRANKEL, E. N. Anthocyanins as antioxidants on human low-density lipoprotein and lecithin-liposome systems. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, 45: 3362-3367, 1997.

SILVA, E. M.; SOUZA, J.N.S; ROGEZ, H; REES, J.F; LARRONDELE, Y. Antioxidant activities and polyphenolic contents of fifteen selected plant species from the Amazonian region. **Food Chemistry**; IN PRESS, 2006.

SILVA, E. **Otimização de métodos de análise de antocianinas: poder antioxidante e quantificação rápida**. 12002. 126f. Dissertação de Mestrado do Curso de Engenharia Química - Centro Tecnológico, Universidade Federal do Pará. Belém, 2002.

SILVA, K. L. **Estudo preliminar da extração de antioxidantes hidrossolúveis de plantas amazônicas**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química)- Universidade Federal do Pará. Belém, 2004.

SINGLETON, V.L; ORTHOFER, R; LAMUELA ó RAVENTOS Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means Folin- Ciocalteu Reagent. **Methods in Enzimology**, 299: 152-178, 1999.

SMITH. P. K.; KROHN, R.I.; HERMANSON, G.T.; MALLIA, A.K.; GARTNER, F.H.; PROVENZANO, M.D.; FUJIMOTO, K.; GOEKE, N.M.; OLSON, B.J.; KLENK, D.C. Measurement of protein using bicinchoninic acid. **Anal Biochemistry**. 150 : 76-85, 1985.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. **III Diretrizes Brasileiras sobre Dislipidemia e Diretriz de Prevenção da Aterosclerose**, 2001.

SOUZA, J., **Caractérisation et quantification des anthocyanines du fruit de l'açaiyer (*Euterpe oleracea*)**, Trabalho de Conclusão de Curso apresentado para obtenção do diploma de Estudos aprofundados em Ciência e Tecnologia de Alimentos- UCL Bélgica, 2000.

STRACK, D.; WRAY, V. HARNBORNE, J. B. **Anthocyanins in Plant phenolics**, Academic Press, London, UK, series Methods in Plant Biochemistry, v.1, 325-355, 1993.

STULNIG, T.M.; JÜRGENS, G.; CHEN, Q.; MOLL, D.; SCHÖNITZER, D.; JAROSCH, E.; WICK, G. Properties of low density lipoproteins relevant to oxidative modifications change paradoxically during aging, **Atherosclerosis**, 126: 85-94, 1996.

SUDA, I.; OKI, T.; MASUDA, M., NISHIBA, Y., FURUTA, S., MATSUGANO, K., SUGITA, K., & TERAHARA, N. Direct absorption of acylated anthocyanin in purple-fleshed sweet potato into rats. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 50: 167261676, 2002.

TRIBBLE, D. L.; BARCELLOS-HOFF, M. H.; CHU, B. M.. Ionizing radiation accelerates aortic lesion formation in fat-fed mice via SOD-inhibitable processes. **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology** 19: 1387-1392 1999.

VERMA, A.K.; JOHNSON, J.A.; GOULD, M.N.; TANNER. M.A. Inhibition of 7, 12-dimethylbenz (a) anthracene and N-nitro methylurea induced rat mammary cancer by dietary flavonol quercetin. **Cancer Research**, 48, 1988.

WANG, H.; CAO, G.; PRIOR, R. L. Oxygen radical absorbing capacity of Anthocyanins, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 45: 304-309, 1997.

WATTENBURG, L.W. Inhibition of carcinogenesis by minor nutrient constituents of the diet. **Proceedings of the Nutrition Society**, 49, 1990.

WATTENBURG, L.W., Chemoprevention of cancer. **Cancer Research**, 45, 1985.

WAYNER, D. M.; BURTON, G. W.; INGOLD, K. U. The relative contributions of vitamin E, urate, ascorbate and proteins to the total peroxy radical-trapping antioxidant activity of human blood plasma. **Biochimica et Biophysica Acta** 924: 408-419, 1987.

WEI, H.; TYE, L.; BRESNICK, E.; BIRT, D.F., Inhibitory effect of apigenina, a plant flavonoid, on epidermal ornithine decarboxylase and skin tumour promotion in mice. **Cancer Research**, 50,1990.

WHITEHEAD, T.P.; THORPE, G.H.G.; MAXWELL, S.R.J.; Enhanced chemiluminescent assay for antioxidant capacity in biological fluids, **Analytica Chimica Acta**, 266: 265-277, 1992.

WIEBOLD, B. The color purple. **UM Agronomy Technical Report**, 10 , 1992.

WU, X., GU, L., HOLDEN, J., HAYTOWITZ, D.B., GEBHARDT, S.E., BEECHER, G., PRIOR, R.L. Development of a database for total antioxidant capacity in foods: a preliminary study. **Journal of Food Composition and Analysis**, 17: 407-422, 2004.

7. ANEXOS