FERNANDO DE OLIVEIRA ROSA

EFEITO METABÓLICO DO CONSUMO DE AÇAÍ (***Euterpe oleracea Mart.***) EM
BEBIDAS COMERCIAIS.

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Biologia Celular e
Tecidual do Instituto de Ciências Biomédicas
da Universidade de São Paulo, para
obtenção do Título de Mestre em Ciências

São Paulo
2013

FERNANDO DE OLIVEIRA ROSA

EFEITO METABÓLICO DO CONSUMO DE AÇAÍ (*Euterpe oleracea* Mart.) EM
BEBIDAS COMERCIAIS.

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Biologia Celular e
Tecidual do Instituto de Ciências Biomédicas
da Universidade de São Paulo, para
obtenção do Título de Mestre em Ciências

Área de concentração: Biologia Celular e
Tecidual

Orientadora: Profa. Dra. Marília Cerqueira
Leite Seelaender

Versão original

São Paulo
2013

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Rosa, Fernando de Oliveira.

Efeito metabólico do consumo de açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) em bebidas comerciais / Fernando de Oliveira Rosa. -- São Paulo, 2013.

Orientador: Profa. Dra. Marília Cerqueira Leite Seelaender.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento. Área de concentração: Biologia Celular e Tecidual. Linha de pesquisa: Caquexia associada ao câncer e metabolismo do tecido adiposo branco.

Versão do título para o inglês: Metabolic effect of the consumption of acai (*Euterpe oleracea* Mart.) in commercial.

1. Citocinas 2. Açaí 3. Antioxidantes 4. Inflamação 5. Metabolismo
6. Fígado I. Seelaender, Profa. Dra. Marília Cerqueira Leite
II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas.
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Tecidual III. Título.

ICB/SBIB0152/2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Fernando de Oliveira Rosa.

Título da Dissertação: Efeito metabólico do consumo de açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) em bebidas comerciais.

Orientador(a): Profa. Dra. Marília Cerqueira Leite Seelaender.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../....., considerou

(☐) **Aprovado(a)**

(☐) **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 – e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **050** nas fls. **102** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a)) **Marília Cerqueira Leite Seelaender**, Coordenador(a) da Linha de pesquisa "*Alterações metabólicas e morfofuncionais mediadas pela atividade física e suplementação nutricional em ratos caquéticos*" do qual participam o(s) alunos **Fernando de Oliveira Rosa, Rodolfo Gonzales Camargo, Henrique Quintas Ribeiro, Luana Sabetay Oliveira Levy, Renata Silvério, Patrícia Esther Rocha, Luiz Carlos Carnevali, Lucas Maceratesi Enjiu, Felipe Fedrizzi Donatto, Michele Joana Alves, Paulo Rogério, Felipe Capel D'Ambrosio, Adriana Jaime Sbampato Assad, Marcos Pisiotano, Rodrigo Xavier das Neves, Julia Laurindo Giacomini** e a pesquisadora **Anelisa Magalhães**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela *COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS* (CEUA) em **19.04.2011**, com validade de **3 anos**.

São Paulo, 20 de abril de 2011.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador
CEUA - ICB/USP

Prof. Dr. ARIEL MARIANO SILBER
Secretário
CEUA – ICB/USP

Ao Pai Celestial, por me guiar todos os dias
e dar saúde necessária para encarar os
desafios.

AGRADECIMENTOS

À minha futura esposa Ticiane Cruz, pelo apoio e força dada em todos os momentos de dificuldade.

À todos os alunos do laboratório e estagiários que passaram por lá, em especial, Rodolfo Camargo, que teve grande participação neste processo desde a época da especialização, Ignácio (Nacho), que por algum motivo não continuou conosco, Érico Caperuto, que me ensinou muito nos primeiros meses de laboratório, Michel Dacar, que me levou ao laboratório e me ajudou a chegar onde estou, Silvio Gomes, pelos momentos de ajuda e motivação, Lucas (Japonês) pela ajuda diária, Felipe Donatto, pelos ensinamentos e pela oportunidade de trabalhar junto, Henrique, pelas piadas e risadas proporcionadas, Patrícia Rocha, Felipe Capel, Telma, Júlia, Michele, Luiz Carnevale, Robson, Daniela Caetano, Rodrigo Xavier, Renata Silvério, Wiltão, Waldeco, Emídio, Vini que ajudaram de alguma forma neste trabalho.

Aos Professores, José Roberto, pela grande motivação dada e companheirismo, Alison Colquhoun, pelo apoio prestado, Emer Suavinho, pelos conselhos e ensinamentos, Rodrigo Martins, pela ajuda nos piores momentos, Sérgio Oliveira, Gláucia Santelli, Patrícia Gama, Marinilce Santos, José César, Fábio Lira, que ajudaram de alguma forma em minha formação.

Aos Técnicos de laboratório, Cruz pela ajuda sempre que solicitada, Patrícia (Prof. Rodrigo Martins) pela inestimável ajuda com os experimentos, Marlene (Prof. Angelo) pela ajuda nos mais críticos momentos, Emília, pela contribuição na fase experimental, Leandro, Gabi, Marloca e todos os outros que trabalham no ICB e tiveram alguma participação.

Aos Alunos de outros laboratórios que muitas vezes ajudaram e apoiaram esta empreitada.

Aos Funcionários do Biotério, Claudião, Fernando e Braz, pela ajuda com os ratos e pelos serviços prestados.

Aos Funcionários da secretaria que sempre deram o máximo de atenção.

Aos Funcionários do ICB, em especial ao "Seu Peninha", que vinha com toda a alegria possível pelas manhãs e trazia bons fluídos para um novo dia de trabalho.

Aos Funcionários da Biblioteca, que sempre me receberam muito bem e me fizeram sentir em casa.

Aos Médicos do HU, Dr. Paulo, Dra. Linda, Dr. Oscar, Dr. Pinhata, que mesmo não fazendo parte do meu projeto me ensinaram muito.

À uma pessoa muito especial, minha orientadora professora Dra. Marília Seelaender, pelo ensinamentos, broncas e momentos vividos que posso garantir que me fazem hoje uma pessoa diferente.

À Capes pelo apoio financeiro

À empresa Metabolic Foods do Brasil, pelo apoio financeiro durante a fase experimental e ao Luiz Svartman pela grande ajuda nos processos de fabricação da bebida.

À minha família pelo apoio necessário e aos amigos que sempre estiveram presentes.

A todas as pessoas que passaram um dia pela minha vida e deixaram uma marca de alguma forma e não estão citadas aqui.

"A fé aprisiona nossos medos, nos liberta,
nos faz voar..."

"Sonha e serás livre de espírito. Luta e serás livre na vida."

Che Guevara

RESUMO

Rosa FO. Efeito metabólico do consumo de açaí (*Euterpe oleracea* MART.) em bebidas comerciais. [dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Tecidual)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2013.

A alimentação não é mais vista apenas como uma fonte de calorias e nutrientes, mas sim como agente capaz de induzir benefícios na prevenção de doenças, bem como na promoção de bem estar físico e mental. Assim, uma boa alimentação da população contribui com a redução de custos em cuidados com a saúde e com o aumento da longevidade. Estratégias nutricionais podem, por exemplo, como no caso da adição de antioxidantes, reduzir o risco de doenças, melhorar a qualidade de vida e aumentar o próprio tempo de vida do indivíduo. O dano oxidativo é um fator causador do desenvolvimento de doenças e os antioxidantes têm a capacidade de prevenir ou atenuar estes processos. Sendo assim, há crescente interesse na ingestão de alimentos naturais e produtos orgânicos, na forma de alimentos funcionais e suplementos dietéticos. Entre os alimentos que, comprovadamente, exercem efeito antioxidante, está o açaí, *Euterpe oleracea* MARTIUS, fruta nativa da região amazônica consumida rotineiramente pela população na forma de polpa, suco, vinho e em outras variedades. Nos últimos anos o açaí tem sido objeto de muita atenção devido ao seu alto potencial antioxidante, anti inflamatório e seu papel como alimento funcional. Sendo assim, foi nosso interesse estudar os efeitos do consumo crônico da fruta, oferecida como consumida pela população em sucos. Os resultados apontam que, quando associado ao consumo de altas taxas de glicose, as propriedades do açaí podem estar reduzidas, uma vez que não foi observada ampla capacidade antioxidante e verificou-se um desvio para o perfil pró-inflamatório no tecido adiposo, induzido pelo consumo de carboidrato em alta concentração.

Palavras-chave: Açaí. Antioxidante. Doenças. Tecido adiposo. Inflamação.

ABSTRACT

Rosa FO. Metabolic effect of the consumption of acai (***Euterpe oleracea* MART.**) in commercial beverages. [dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Tecidual)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2013.

Feeding is no longer seen as just a source of calories and nutrients, but as an agent capable to induce benefits to prevent diseases, and also to promote physical and mental wellbeing. Therefore, a good nutritional status of the population contributes to cost reductions of health care services and increases longevity. Nutritional strategies, for instance the supplementation with antioxidants, could reduce the risk of diseases that are associated with oxidative stress. The oxidative damage is an important factor in aging and in the development of illness, such as insulin resistance, arteriosclerosis, cancer and others. Antioxidants have the ability to prevent or reduce these processes. Hence, there is a growing interest in consuming natural foods and organic products as functional foods and dietary supplements. The açai berry ***Euterpe oleracea* MARTIUS**, a native fruit of Amazonia, recently gained scientific interest due to its high antioxidant and anti inflammatory effects. Açai is frequently consumed by the population as pulp, juice, wine or other varieties that additionally qualifies this fruit as a functional food. Therefore, our interest was to investigate the chronic effects of açai consumption by the population in form of beverages. The results indicate that the açai properties do not prevail, if the consumption is associated with high levels of glucose. The açai properties may be reduced, once the antioxidant ability was not observed, also there was a deviation to pro-inflammatory profile in adipose-tissue, induced by the high levels of carbohydrate consume.

Keywords: Açai. Antioxidant. Diseases. Adipose tissue. Inflammation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Equilíbrio antioxidante/pró-oxidante.....	20
Figura 2 - Peso corporal inicial e peso corporal ao final do período experimental....	37
Figura 3 - Consumo de ração durante o período experimental.....	38
Figura 4 - Evolução do consumo de ração.....	39
Figura 5 - Consumo médio diário de líquido durante todo período experimental.....	39
Figura 6 - Evolução do consumo de líquidos.....	40
Figura 7 - Consumo calórico durante o período experimental.....	41
Figura 8 - Concentração de insulina no soro.....	42
Figura 9 - Índice glicose/insulina (G/I).....	42
Figura 10 - Produto de Reação do Ácido Tiobarbitúrico (TBARS) no fígado.....	44
Figura 11 - Histologia do fígado.....	47
Figura 12 - Histologia do tecido adiposo epididimal (TAEP).....	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Tabela de composição dos alimentos.....	22
Tabela 2 - Composição de macronutrientes da ração (100g).....	26
Tabela 3 - Composição percentual (%) dos componentes da bebida oferecida aos animais.....	26
Tabela 4 - Primers utilizados na amplificação dos genes de interesse.....	32
Tabela 5 - Peso dos tecidos: fígado (FIG), tecido adiposo epididimal (TAEP), tecido adiposo retroperitoneal (TARP), tecido adiposo mesentérico (TAME), músculo gastrocnêmio (GASTRO).....	36
Tabela 6 - Consumo semanal de ração.....	38
Tabela 7 - Consumo semanal de líquidos.....	40
Tabela 8 - Concentração de triacilglicerol (TAG) no soro, conteúdo de gordura no fígado, colesterol e glicose no soro.....	41
Tabela 9 - Avaliação da função hepática.....	43
Tabela 10 - Expressão proteica e expressão gênica de citocinas (IL-6, IL-10, TNF-ALFA) no tecido adiposo (TAEP).....	46
Tabela 11 - Razão da expressão proteica de citocinas IL-10/TNF-ALFA e IL-6/IL-10 no tecido adiposo (TAEP).....	46
Tabela 12 - Razão da expressão gênica de citocinas IL-10/TNF-ALFA e IL-6/IL-10 no tecido adiposo (TAEP).....	47

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALT - Alanina transaminase

AST - Aspartato transaminase

CDNA - DNA complementar

COBEA - Colégio Brasileiro de Experimentação Animal

COX - Ciclo oxigenase

DCNT - Doenças crônicas não transmissíveis

DEPC - Dietil Pirocarbonato

DNA - Ácido desoxirribonucleico

ERO's - Espécies reativas de oxigênio

FIG - Fígado

GASTRO - Gastrocnêmio

GPD - Glicerol 3 fosfato desidrogenase

GPO - Glicerol fosfato oxidase

HDL - Lipoproteína de alta densidade

HE - Hematoxilina eosina

LDH - Lactato desidrogenase

LDL - Lipoproteína de baixa densidade

LPO - Peroxidação lipídica

NADH - Nicotinamida-Adenina-Dinucleotídeo

NO - Óxido Nítrico

PCR - Reação em cadeia de polimerase

RNA - Ácido ribonucleico

RPM - Rotações por minuto

TACO - Tabela de Composição dos Alimentos

TAEP - Tecido adiposo epididimal

TAG - Triacilglicerol

TAME - Tecido adiposo mesentérico

TARP - Tecido adiposo retroperitoneal

TBARS - Ácido Tiobarbitúrico

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2 OBJETIVOS.....	23
2.1 Objetivo geral	23
2.2 Objetivos específicos.....	23
3 MATERIAL E MÉTODOS	24
3.1 Desenho experimental	24
3.1 Animais	24
3.2 Grupos Experimentais	25
3.3 Suplementação e informações nutricionais	25
3.4 Obtenção das amostras.....	26
3.5 Controle do consumo de alimentos e líquidos	27
3.6 Avaliação da função hepática	27
3.7 Perfil sérico de lipídios	27
3.8 Medida de concentração de glicose no soro	28
3.9 Medida da concentração de Insulina no soro.....	29
3.10 Medidas dos Produtos de Reação do Ácido Tiobarbitúrico (<i>TBARS</i>).....	29
3.12 Análise da expressão gênica das citocinas IL-6, IL-10 e TNF-ALFA.....	29
3.12.1 <i>Procedimentos gerais</i>	29
3.12.2 <i>Extração do RNA</i>	30
3.12.3 <i>Quantificação do RNA total</i>	30
3.12.4 <i>Geração de cDNA por transcrição reversa</i>	31
3.12.5 <i>Ensaio de PCR tempo real</i>	31
3.13 Quantificação de citocinas no tecido	32
3.13.1 <i>Quantificação de proteínas totais no tecido</i>	32
3.13.2 <i>Ensaio de ELISA</i>	33
3.14 Fixação e processamento de tecidos para histologia.....	34
3.15 Extração de lipídios do fígado	35
3.16 Tratamento estatístico	35
4 RESULTADOS.....	36
5 DISCUSSÃO	48
6 CONCLUSÃO	52

REFERÊNCIAS.....53

1 INTRODUÇÃO

A ocorrência de doenças crônicas não transmissíveis (DCNT), tais como dislipidemias, hipertensão, diabetes, aterosclerose e também o câncer tem despertado interesse dos órgãos responsáveis pela saúde pública no que tange à modulação da sua prevalência, através da interferência sobre aspectos na alimentação da população, uma vez que pesquisas que se fundamentam no aumento da expectativa de vida, apresentam nítida evidência associando saúde e nutrição (Mollet, Rowland, 2002). A alimentação não é mais vista apenas como uma fonte de calorias e nutrientes, mas sim como agente de benefício adicional na prevenção de doenças, bem como na promoção de bem estar físico e mental, contribuindo no nível de populações, com a redução de custos em cuidados com a saúde e aumento da longevidade (Corradini, 2013). Neste contexto, há evidências claras de que o aumento da concentração de fatores antioxidantes no plasma está associado a uma menor incidência de doenças coronarianas, entre outras (Souza, 2010; Udani, 2011).

Estratégias nutricionais podem assim, adicionar componentes antioxidantes à dieta, reduzindo o risco de doenças cardiovasculares, como no caso dos polifenóis e diversos outros nutrientes, como ácidos graxos insaturados, fibras alimentares, e fitosteróis; estes alimentos têm a capacidade para alterar a colesterolemia, especialmente o colesterol associado a lipoproteínas de baixa densidade (LDL), e reduzir marcadores inflamatórios e de estresse oxidativo, fatores determinantes para diminuição da aterosclerose (Souza, 2010). O dano oxidativo é um fator causador do desenvolvimento de doenças e os antioxidantes têm a capacidade de prevenir ou atenuar estes processos (Diplock, 1998). O metabolismo está associado com a geração de espécies reativas de oxigênio (ERO's), mesmo sob condições fisiológicas. As ERO's são responsáveis pela degradação de macromoléculas biológicas como DNA, carboidratos, proteínas e lipídios, exercendo efeitos deletérios que acarretam a ativação de mecanismos que participam da fase de iniciação ou progressão de várias doenças (Niki, 2012).

A peroxidação lipídica (LPO), mediada por radicais livres, pode induzir distúrbios na estrutura, alterações da integridade, da permeabilidade, na fluidez e a

perda funcional das membranas, podendo ainda modificar a LDL e a lipoproteína de alta densidade (HDL), induzindo suas formas pró-aterogênicas e pró-inflamatórias e gerando produtos potencialmente tóxicos (Niki, 2012). A modificação de LDL e HDL, por exemplo, é aceita como um importante evento inicial da aterosclerose. Estudos relatam ainda uma associação entre as de LPO e doenças hepáticas em modelos experimentais, quando ocorre o aumento de triacilglicerol (TAG), ocasionando também o acúmulo de gotículas de gordura neste órgão (Niki, 2012).

Os radicais livres são definidos como moléculas que possuem um elétron desemparelhado, geralmente instável e muito reativo podendo ocasionar um efeito citotóxico e servir como mediador para o início de diversas doenças crônicas (Fang et al., 2002). Estes radicais livres de oxigênio ou espécies reativas de oxigênio (ERO's), são produtos do metabolismo celular e assim com as espécies reativas de nitrogênio (ERN's) são muito conhecidas por desempenhar dupla função como espécie, podendo ser de efeito benéfico ou deletério (Valko et al., 2006) e o delicado equilíbrio entre ações vantajosas e os efeitos prejudiciais dos radicais livres são claramente os aspectos mais importantes da vida (Dröge, 2002). O efeito prejudicial dos radicais livres causa potencial dano biológico que é chamado de estresse oxidativo, que em outras palavras é o resultado das reações metabólicas que usam oxigênio e representa uma perturbação do estado de equilíbrio pró-oxidante/antioxidante (figura 14) em organismos vivos, e seu mecanismo contra o estresse oxidativo envolve defesas antioxidantes que incluem a superóxido dismutase (SOD), glutathione-peroxidase (GPx), catalase (CAT) e antioxidantes não enzimáticos como: ácido ascórbico, vitamina E, glutathione (GSH), carotenóides, flavonóides entre outros (Valko et al., 2006; Venkataraman et al., 2013).

Figura 1 - Equilíbrio antioxidante/pró-oxidante

Estudos em animais demonstram que uma dieta contendo antioxidantes fitoquímicos é capaz de remover radicais livres. Entre estes componentes estão os compostos fenólicos e polifenólicos, como catequinas e flavonóides, capazes de aumentar a resistência das células vermelhas do sangue para o estresse oxidativo (Fang et al., 2002).

O termo "alimento funcional" foi usado pela primeira vez no Japão, em 1980, para produtos alimentares enriquecidos com componentes especiais que possuíam efeitos fisiológicos vantajosos (Siró, 2008).

A ingestão de alimentos naturais e produtos orgânicos, tem sido alvo de interesse da população e órgãos de saúde pública. Sendo assim há crescente aumento no consumo de alimentos funcionais e suplementos dietéticos, tendo como resultado o crescimento do número de produtos e vendas associadas (Phillips, Rimmer, 2013). Assim, o consumo de alimentos visa não só fornecer os nutrientes e calorias necessários, mas também promover a saúde e prevenção de doenças, com

o objetivo de melhorar o bem estar físico e mental (Corradini, 2013; Menrad, 2003; Siró, 2008). Os alimentos funcionais estão na classe de alimentos nutracêuticos que supostamente promovem benefícios a saúde, atuando na prevenção ou tratamento de doenças (Phillips, Rimmer, 2013).

Entre os alimentos que, comprovadamente, exercem efeito antioxidante, o açaí, ***Euterpe oleracea* MARTIUS 1824**, pertencente à família das palmeiras ***Arecaceae*** é uma fruta nativa da região amazônica consumida rotineiramente pela população na forma de polpa, suco, vinho e em outras variedades (Guerra, 2011; Kang, 2010; Sun, 2010). O açaí é um fruto arredondado com cerca de 2 gramas de peso (17% do fruto é comestível) e sua cor é roxa quase preta (Souza, 2012). Essa fruta tornou-se um dos principais produtos da Amazônia e é exportada para outras regiões do mundo, inclusive América do Norte, principalmente depois de ter sido considerado "superalimento" (Souza, 2012). Nos últimos anos o açaí tem sido objeto de muita atenção devido ao seu alto potencial antioxidante e seu papel como alimento funcional (Kang, 2010; Guerra, 2011). Entre seus componentes estão descritos os polifenólicos antioxidantes, principalmente a presença de antocianinas, que uma vez absorvidas por meio da dieta, podem causar redução no dano celular oxidativo e uma redução no dano oxidativo induzido pelo exercício (Mertens-Talcot, 2008). Sua composição (polpa e óleo) inclui altas concentrações de ácidos fenólicos, taninos, flavonóides e lignanas (Chin et al., 2008; Guerra, 2011; Pacheco-Palencia et al., 2008; Pacheco-Palencia et al., 2008b; Seeram, 2008). Schauss et al. (2006), em análise dos componentes do açaí, constataram que entre os fenólicos presentes neste fruto destacam-se os flavonóides, principalmente a classe das antocianinas, sendo que a cianidina 3-glicosídeo e a cianidina 3-rutinosídeo são as mais predominantes. Outros flavonóides foram também identificados, tais como a epicatequina, catequina, homoorientina, orientina, isovitexina e taxifolina deoxihexose.

A Tabela Brasileira de Composição dos alimentos, TACO (2011) mostra os principais componentes da planta:

Tabela 1 - Tabela de composição dos alimentos.

Composição centesimal - TACO 2011								
Umidade	Energia		Proteína	Lipídeos	Colesterol	Carboidrato	Fibra Alimentar	Cinzas
(%)	(kcal)	(kJ)	(g)	(g)	(mg)	(g)	(g)	(g)
88,7	58	243	0,8	3,9	NA	6,2	2,6	0,3

Composição centesimal Açaí - TACO 2011. Referente a 100 gramas de polpa de açaí congelada (Item 168). NA (não aplicável).

Evidências indicam que os fitoquímicos incluindo os flavonóides, tais como as proantocianinas e antocianinas podem retardar o processo de envelhecimento e aumentar a expectativa de vida (Sun, 2010). Muitos estudos demonstram que os flavonóides são considerados os principais polifenóis do açaí, detendo atividade antioxidante, além de apresentar propriedades anti-inflamatórias (Kang, 2010; Souza, 2012), atuando na inibição de complexos enzimáticos que sintetizam os eicosanóides, fatores indutores de inflamação e dor, as ciclo-oxigenases 1 e 2 (COX). Essa capacidade é atribuída aos polifenóis (Guerra, 2011; Mertens-Talcott, 2008). Os polifenóis epicatequina, catequinas e antocianinas, demonstram ação antioxidante aumentando a biodisponibilidade de NO, promovendo vasodilatação e atua como anti-hipertensivos (Costa, 2012). A polpa do açaí possui alta atividade antioxidante, particularmente contra o superóxido e peróxilas. Tanto estudos *in vivo* como *in vitro*, mostram que a polpa pode exercer proteção a eritrócitos humanos e em células polimorfonucleadas contra o estresse oxidativo (Sun, 2010) e potencialmente atenuar a inflamação.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo do presente trabalho foi analisar se as propriedades antioxidantes e anti inflamatórias alegadas ao açaí estão mantidas nas bebidas comerciais disponíveis no mercado com alto teor de açúcar.

2.2 Objetivos específicos

- Verificar o consumo de ração e líquidos entre os grupos;
- Verificar o peso dos animais antes e depois do período experimental;
- Verificar o peso dos tecidos após o período experimental;
- Determinar o perfil de lipídios no soro;
- Determinar a concentração de glicose no soro;
- Determinar a insulinemia;
- Verificar a concentração de gordura neutra presente no fígado;
- Analisar a expressão gênica de citocinas pró e anti inflamatórias no tecido adiposo;
- Analisar a expressão proteica de citocinas pró e anti-inflamatórias no tecido adiposo;
- Analisar a integridade morfológica do fígado e tecido adiposo.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Desenho experimental

Foram utilizados 20 animais machos, distribuídos em 3 grupos suplementados *ad libitum* por 45 dias com bebida comercial (cedida pelas empresas Horizonte Ltda. e Metabolic Foods do Brasil, Patrocinadora do estudo) à base de polpa de açaí em várias combinações de sabor, como habitualmente consumido pela população. Os grupos foram denominados: Controle (C), Controle Glicose (CG) e Suplementado (S)

A suplementação foi oferecida como única forma de líquido em substituição à água. Os bebedouros receberam uma camada de tinta escura para bloqueio da luz visando preservar as propriedades antioxidantes da bebida. O preparo da bebida foi realizado diariamente e foi reposta quando realizado o controle da ingestão dos animais. A ração foi administrada *ad libitum* (ração granulada Nuvilab® CR-1 Nutrivital Nutrientes Ltda.) e sua ingestão aferida. Ao final do período experimental todos os animais foram sacrificados após um jejum de 12 horas para obtenção dos tecidos. Os procedimentos de manipulação experimental dos animais foram realizados de acordo com as normas estabelecidas no *Guide to the care and use of experimental animals of the Canadian Council on Animal Care* e Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). O protocolo de experimentação animal foi registrado e aprovado pela Comissão de Ética do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, sob nº050/102-02.

3.1 Animais

Foram utilizados ratos machos adultos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*), fornecidos pelo Biotério Central do Instituto de Ciências Biomédicas. Os animais foram mantidos no Biotério de Experimentação do departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento (ICB - I/USP). Com aproximadamente 5 semanas de vida, os animais passaram por um período de adaptação e ganho de peso para início do período experimental. Os animais foram mantidos em regime de foto período de 12h claro: 12h escuro (período claro iniciando-se às 7:00h), sob

temperatura de $23^{\circ} \pm 1^{\circ}$ C. Os animais foram mantidos em caixas individuais (1 animal por caixa).

3.2 Grupos Experimentais

Os animais foram divididos nos seguintes grupos:

- Ratos controle - (C) - Mantidos em condições normais com água e ração (ração granulada Nuvilab® CR-1 Nutrivital Nutrientes Ltda.) *ad libitum*.
- Ratos controle glicose - (CG) - Mantidos em condições normais com mesma ração administrada aos animais do grupo controle, com adição de todos os componentes da bebida comercial com exceção da polpa de açaí.
- Ratos suplementados - (S) - Mantidos em condições normais com a mesma ração administrada aos animais do grupo controle e suplementados com bebida à base de açaí.

3.3 Suplementação e informações nutricionais

A bebida comercial à base de polpa de açaí foi semelhante à consumida por seres humanos com adição de diferentes polpas de frutas em sua constituição (Banana e Morango). A suplementação com açaí foi oferecida na forma de rodízio de sabores: natural, banana e morango, trocados a cada dia. A bebida foi preparada a partir de polpa de açaí congelada em barra tipo médio ou regular (polpa extraída com adição de água e filtração, apresentando acima de 14% de sólidos totais e uma aparência muito densa) da marca Frooty®, açúcar tipo orgânico da marca União®, xarope de guaraná da marca Fresk®, xarope de glicose e polpa de frutas congeladas da marca De Marchi®. A formulação da bebida está ilustrada na tabela 3. O valor calórico da bebida comercial utilizada foi de 83Kcal/100mL (por tanto, a suplementação oferecida foi isocalórica). O consumo calórico total durante todo período experimental foi calculado com base nas tabelas 1,2 e 3.

Tabela 2 - Composição de macronutrientes da ração (100g)

Macronutrientes	Quantidade (gramas)
Carboidratos	53,0
Proteínas	22,0
Lipídios	4,5

* Informações cedidas pela Nuvilab®

Tabela 3 - Composição percentual (%) dos componentes da bebida oferecida aos animais

Componentes da bebida	Açaí Natural	Açaí Morango	Açaí Banana
	%	%	%
Xapore de Guaraná	2,22	2,21	2,21
Açúcar Orgânico	11,44	11,40	11,40
Xarope de Glicose	4,44	3,75	3,76
Açaí Médio	51,83	40,23	40,24
Água Filtrada	30,29	35,53	35,55
Polpa de Morango	-	6,70	-
Polpa de Banana	-	-	6,71

3.4 Obtenção das amostras

O sacrifício dos animais foi realizado após 45 dias de suplementação e após jejum de 12 horas, através de decapitação, sem anestesia. O sangue foi colhido em tubos e centrifugado a 3000 rpm em uma centrífuga da marca Hettich modelo Rotina 35R com rotor n°1717, 15 minutos, 4° C, para obtenção do soro, que dividido em alíquotas de 400µl. As amostras foram armazenadas em freezer de baixa temperatura (-80°C). Também foram obtidos os seguintes compartimentos adiposos: tecido adiposo retroperitoneal (TARP) de ambas laterais, tecido adiposo mesentérico (TAME) e tecido adiposo epididimal (TAEP) bilateralmente. Além disso, foi retirado o fígado (FIG) e músculo gastrocnêmio (GASTRO) do membro posterior direito do animal. Após pesados os tecidos foram armazenados em tubos previamente autoclavados contendo Trizol® para análise de expressão gênica.

3.5 Controle do consumo de alimentos e líquidos

O controle da ingestão de ração foi realizado através de aferição em balança manual da marca Ohaus® modelo Triple Beam Balance 700 series, calibrada diariamente e o consumo de líquido de todos os grupos aferido através da medida em proveta graduada da marca Pyrex®. O controle do consumo de ração e líquidos foi realizado individualmente.

3.6 Avaliação da função hepática

O princípio do método consiste em AST (TGO) catalizar especificamente a transferência do grupo amina do ácido aspártico para o cetoglutarato, com formação de glutamato e oxalacetato. O oxalacetato é reduzido a malato por ação da malato desidrogenase (MDH), enquanto NADH é oxidada à NAD^+ . A redução da absorbância de 340 nm, consequentemente à oxidação do NADH, é monitorada fotometricamente, sendo diretamente proporcional à atividade da AST na amostra. A ALT(TGP) catalisa especificamente a transferência do grupo amina da alanina para o cetoglutarato, com a formação de glutamato e piruvato. O piruvato é reduzido à lactato por ação da lactato desidrogenase (LDH), enquanto o NADH é oxidado a NAD. A redução da absorbância é semelhante ao procedimento de AST. Todos os procedimentos para os métodos cinéticos acima descritos foram reproduzidos com a utilização de kit comercial (Labtest®, Brasil) seguindo as recomendações do fabricante e as leituras foram realizadas em espectrofotometro da marca Beckman Coulter modelo DU® 640.

3.7 Perfil sérico de lipídios

A determinação da concentração de TAG no soro foi medida à partir da reação que adota a enzima L- α -glicerol fosfato oxidase (GPO), que reage com o glicerol fosfato pela reação da lipase glicerol quinase. Com a presença de GPO e oxigênio o glicerol fosfato é oxidado para produzir diidroxiacetona fosfato e peróxido de hidrogênio, que reage com um cromogênio, com desenvolvimento de cor. O glicerol 3 fosfato produzido na reação catalisada pela glicerol quinase forma um composto (formazan) colorido proporcional ao teor de triacilglicerol. O glicerol-3-

fosfato desidrogenase (GPD) formando NADH, que reage com 2-p-iodofenil-3-nitrofenil-5-fenil tetrazolium pela ação da diaforase para produzir o corante formazan teve sua intensidade colorimétrica determinada por espectrofotometria em espectrofotometro da marca (Beckman Coulter modelo DU® 640), com máximo de absorvância de 505nm (reação de Trinder)(Motta, 2009). Este método enzimático foi empregado com a utilização de kit comercial (Labtest®, Brasil).

Para obtenção dos valores de colesterol foi utilizado o método que hidroliza os ésteres de colesterol apartir da enzima colesterol esterase, presente no soro formando colesterol livre e ácidos graxos. Este colesterol livre que está presente no soro mais o que é produzido por hidrólise é oxidado em presença de colesterol oxidase formando coles-4-en-3-one e água oxigenada. Através de oxidação, a água oxigenada forma o composto colorido quinoneimida e sua intensidade é determinada por espectrofotometria (Beckman Coulter modelo DU® 640), com máximo de absorvância de 500nm (Motta, 2009). Este método enzimático foi empregado com a utilização de kit comercial (Labtest®, Brasil). Todos os procedimentos acima realizados com amostras em triplicata. Para melhor aproveitamento do kit as amostras de soro foram diluídas 5 vezes e pipetadas em placas de 96 poços utilizando volume de reagentes proporcional à diluição das amostras. Este procedimento foi realizado para ambos os ensaios e também utilizado na dosagem de glicose no soro.

3.8 Medida de concentração de glicose no soro

A concentração de Glicose (mg/dL) no soro foi determinada pelo método enzimático que consiste na ação da enzima glicose oxidase produzindo peróxido de hidrogênio, que pela ação da peroxidase e na presença de fenol e 4-aminoantipirina produz um composto corado chamado quinoneimina com máximo de absorção de 500 nm, sendo a cor formada proporcional à presença de glicose encontrada nas amostras (Bergmeyer, 1986) e a determinação deste composto foi realizada por espectrofotometria (Beckman Coulter modelo DU® 640). Para este ensaio foi utilizando kit comercial (Labtest®) seguindo as recomendações do fabricante realizando o ensaio com amostras em duplicatas.

3.9 Medida da concentração de Insulina no soro

A concentração de insulina foi determinada por RIA (radioimmunoassay) utilizando-se kit comercial (Coat-A-Count - DPC, Los Angeles, CA, USA). Ambos os métodos consistem no princípio de reação antígeno/anticorpo marcado com ^{125}I (radiação gama). A leitura e quantificação dos hormônios foram realizadas em equipamento Packard® Cobra II. Todas as amostras foram analisadas em duplicatas.

3.10 Medidas dos Produtos de Reação do Ácido Tiobarbitúrico (TBARS)

A concentração de TBARS foi avaliada no plasma, fígado e TAEP. As amostras foram preparadas em uma diluição de 5 vezes em solução tampão fosfato pH 7,4 (PBS). Uma alíquota foi reservada à dosagem de proteína. Foi adicionado 1ml de HCL 25%, 1,0 mL NaOH 0,05M e 1,0 mL TBA 1% respectivamente para 1,0 mL do homogeneizado. As amostras foram levadas ao banho fervente por 10 minutos e então colocadas em gelo por 5 a 10 minutos, após os quais adicionou-se 3,0 mL de Butanol seguido de agitação em vórtex por 15 segundos. Posteriormente, foram levadas a centrifuga durante 30 minutos a 1000 RPM, com fase superior retirada e a leitura feita em 532 nm de absorbância em Espectrofômetro (DU 640 Beckman Coulter), por método descrito por Winterboun (1985).

3.12 Análise da expressão gênica das citocinas IL-6, IL-10 e TNF-ALFA.

3.12.1 Procedimentos gerais

Para realização desta análise foram tomados os seguintes cuidados em todas as etapas do processo: utilização de material fornado (livre de RNases) descartável; toda vidraria foi autoclavada e logo depois levada ao forno a uma temperatura de 250 °C por 4 horas; manipulação das amostras e materiais com luvas e água tratada com dietil-pirocarbonato (água Sigma-DPEC 0,01% vol. em 3 vezes de 200 mL, sob agitação magnética por 12 horas e logo depois autoclavada, para inativação (Sambrook, 1989).

3.12.2 Extração do RNA

Para analisar a expressão gênica no tecido adiposo (TAEP) das citocinas IL-6, IL-10 e TNF alfa, as amostras foram retiradas do freezer -80 °C e descongeladas em gelo. O RNA total do fígado e TAEP, foi extraído com a utilização do reagente Trizol® (100 mg de tecido por ml do fígado e 300 mg de tecido por mL para o tecido adiposo de Trizol®). Os tecidos foram homogeneizados com o auxílio do aparelho Politron modelo PT 3100, que teve sua haste tratada com DEPC ativa, a fim de inativar quaisquer RNAses que pudessem interferir com a qualidade do experimento e logo após as amostras foram incubadas por 10 minutos em temperatura ambiente. Todas as amostras foram precipitadas com cerca de 200 µl de clorofórmio e centrifugadas por 15 minutos a 12000 g com uma temperatura de 4 °C para obtenção do RNA total, que em seguida foi precipitada com 500 µl de álcool isopropílico e incubada por 10 minutos à temperatura ambiente. Após a formação dos *pellets*, as amostras foram lavadas com etanol 75% e depois centrifugadas por 5 minutos a 7500 g com uma temperatura de 4 °C. Depois de removido o álcool, os *pellets* secaram por 15 minutos em temperatura ambiente e logo depois as amostras foram solubilizadas em água-DEPC inativa.

3.12.3 Quantificação do RNA total

Para quantificação da concentração e pureza do RNA total utilizou-se o equipamento Biomate 3 (ThermoScientific, Austin, Texas, EUA) para leitura em 260 e 280 nm (OD_{260} ; OD_{280}), como proporcional à concentração de RNA total na amostra (Sambrook, 1989). Como valor de referência (Branco), utilizou-se água DEPC inativa. Cada amostra de RNA total (1µl) foi transferida à cubeta leitora do aparelho para leitura e a quantidade de RNA total foi calculada pelo próprio aparelho através da fórmula:

$$\text{RNA Total } (\mu\text{g}) = OD_{260} \times 40 \mu\text{g}/(1OD_{260} \times 1\text{ml}) \times (\text{fator de diluição}) \times \text{volume total da amostra (ml)}$$

Antes de realizar a síntese de cDNA, foram utilizadas somente as amostras que apresentaram a razão $OD_{260}/OD_{280} > 1,8$. Isso nos indicou uma extração de RNA total com menos contaminantes como proteínas e cromóforos UV.

3.12.4 Geração de cDNA por transcrição reversa

Para realizar a síntese do DNA complementar foi utilizada a combinação do RNA total extraído de cada amostra (7 μ L) com um mix de reação (13 μ L) e para isso utilizou-se 3 μ g de RNA total por amostra em um volume de 7 μ L. Para aquelas amostras que atingiram a quantidade de 3 μ g de RNA total em menos de 7 μ L foi adicionado água Milli-q para completar o volume total de 7 μ L. Foi preparado um mix de reação (13 μ L) para cada amostra contendo 10 U de inibidor de RNase (1 μ L), *random primers* (2 μ L), 10 nmol de desoxirribonucleotídeos trifosfatados (dNTPs) (2 μ L), ditioneitol (2 μ L), 10U de transcriptase reversa M-MLV (2 μ L) e tampão de reação 10x (4 μ L), (100 mM de TRIS-HCL, 500 nM de KCL, 150 nM de $MgCl_2$ em água Milli-q autoclavada). Após todo este processo todos os tubos eppendorfs devidamente identificados foram levados ao termociclador modelo GeneAmp® PCR System 9700 (Life Technologies, Carlsbad, California, EUA) em um único ciclo à temperatura de 25 °C por 5 minutos, 42 °C por 60 minutos, 70 °C por 15 minutos e 4 °C por 5 minutos.

3.12.5 Ensaio de PCR tempo real

Os primers utilizados foram desenhados com base em sequências disponíveis no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>) e utilizando o auxílio dos sites Spidey (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/spidey/spideyweb.cgi>) e Primer3 (http://biotools.umassmed.edu/biopps/primer3_www.cgi). Para verificar a especificidade de cada primer foi utilizado o site Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/blast.cgi>). Todos os primers foram sintetizados pela empresa Invitrogen com suas sequências mostradas na tabela 4 abaixo:

Tabela 4 - Primers utilizados na amplificação dos genes de interesse

Gene	Sense (5' - 3')	Antisense (5' - 3')	NM
RPL19	gagggacgcttcatttcttg	catggagcacatccacaaac	031103.1
IL-6	tccttcctaccccaacttcc	accacagtgaggaatgtcca	012589.2
IL-10	ggccatgaatgagtttgaca	cgagggtttccaaggagttg	012854.2
TNF Alfa	ccaccacgctcttctgtcta	ccgcttggtggttgctac	012675.3

Para realizar a reação em cadeia de polimerase foi utilizado o equipamento de modelo ABI 7300 Realtime PCR system da marca Life Technologies para um pool de cDNA das amostras em várias concentrações de primers, a fim de determinar uma melhor diluição das amostras e concentração dos primers (Nascimento, 2010). Após essa determinação realizou-se a amplificação de amostra por amostra utilizando 12 µL do reagente Syber Green, 5 µL dos primers diluídos, 2,5 µL de água Milli-q e 5 µL de cDNA de cada amostra, totalizando um volume de reação de 25 µL. Os ciclos de amplificação foram realizados em termociclador e as amostras foram amplificadas em duplicatas.

Para o cálculo dos resultados da expressão gênica, os níveis de mRNA foram determinados pelo método comparativo Ct (Livak, 2001). Para cada amostra analisada, um valor ΔCt foi obtido subtraindo os valores do gene controle RPL do gene de interesse. O valor ΔCt médio do grupo controle foi então subtraído a partir da amostra para derivar um valor de $\Delta\Delta Ct$. A expressão de cada gene foi avaliada por $2^{-\Delta\Delta Ct}$ e a significância foi avaliada posteriormente por teste estatístico.

3.13 Quantificação de citocinas no tecido

3.13.1 Quantificação de proteínas totais no tecido

Para quantificação das proteínas totais nos tecidos foi utilizado o kit *Protein Assay-Bradford Method Biotechnology Grade* (E535, AMRESCO, Inc. USA), que é um procedimento baseado no método colorimétrico descrito por Bradford, et al. (1976), o método utiliza o corante *Coomassie Brilliant Blue G-250*, que induz alteração de cor após a ligação com as proteínas desconhecidas pela formação de

um complexo que pode ser detectado por espectrofotometria de luz em comprimento de onda a 595 nm. Os valores da proteína desconhecida foram comparados com a curva padrão de albumina (0,05 - 0,5 µg/ µL) que foram pipetadas em duplicatas contendo 10 µL por poço. As amostras previamente diluídas em 100 vezes foram adicionadas à placa e após este procedimento foi adicionado 190 µL de *Coomassie Brilliant Blue*, diluído em 10 vezes. A leitura foi realizada em espectrofotômetro (DU 640 Beckman Coulter) a 595 nm. Os dados de absorbância (eixo x) foram plotados junto aos valores referentes às diferentes concentrações da curva padrão (eixo y), e após a análise da regressão linear, os valores foram expressos em µg/ µL de proteína tecidual (Bradford, 1976).

3.13.2 Ensaio de ELISA

Para dosagem das citocinas foi utilizado o método *enzyme-linked immunoabsorbent assay* por kit DuoSet Elisa da marca R&D System, Inc., Minneapolis, USA). Inicialmente as amostras de tecido foram pesadas em 300 mg e homogeneizadas em 1 mL de tampão RIPA (150 mM de NaCl, 5 mM EDTA, 10 mM Tris-HCL, 0,1% Triton X100, pH 7,4) e foi adicionado a cada amostra 5 µL de inibidor de protease e após esta etapa as amostras foram diluídas em reagente diluente BSA 1% em 10, 50, 100 e 300 vezes para testar a melhor diluição. As citocinas analisadas foram: IL-6, IL-10 e TNF ALFA, uma para cada de 96 poços que tiveram que ser sensibilizadas com 100 µL de anticorpo monoclonal anti-rato IL-6, IL-10 e TNF ALFA (anticorpo de captura) e incubadas *overnight* em temperatura ambiente. Após este tempo os poços foram lavados 3 vezes com tampão de lavagem Tween 20 0,05% e posteriormente a placa foi bloqueada com 300 µL de solução de bloqueio BSA 1% para evitar ligações inespecíficas, e incubadas por mais 1 hora. Após o período recomendado a placa foi lavada novamente como descrito acima com o tampão de lavagem. Após o bloqueio as amostras foram adicionadas em 100 µL assim como os padrões diluídos previamente com reagente diluente BSA 1%. Dois poços foram reservados para caracterização do Branco e neles foi adicionado apenas o reagente diluente. A placa foi incubada por 2 horas em temperatura ambiente e então os poços foram lavados por mais 3 vezes com tampão de lavagem.

Depois de realizadas as lavagens foi adicionados 100 μ L do anticorpo de detecção para cada citocina correspondente que foram diluídos previamente em reagente diluente na concentração especificada pelo fabricante e incubados por 2 horas em temperatura ambiente. Após o tempo estabelecido os poços foram novamente lavados com tampão de lavagem. Foi adicionado então 100 μ L de Streptoavidina-HRP na proporção de 1:250 por poço e foram incubados por 30 minutos em ambiente escuro. Os poços foram lavados novamente com tampão de lavagem e foi adicionada solução de substrato contendo a mistura dos reagentes de cores A (H_2O_2) e B (Tetrametilbenzidina) na diluição de 1:1 por poço e incubada por 30 minutos em temperatura ambiente em sala escura. Para interromper a reação e proceder com a leitura foi adicionado à placa 50 μ L de H_2SO_4 30% por poço. A leitura foi realizada utilizando filtro de 450 nm.

3.14 Fixação e processamento de tecidos para histologia

O material foi fixado em paraformaldeído 4% e permaneceu por 24 horas neste fixador, em seguida foi transferido para álcool 70° processado para inclusão em *Paraplast Plus*® (Ref. P3683, Sigma-Aldrich, St Louis, USA). As lâminas foram confeccionadas em cortes de 5 μ m de espessura utilizando a técnica de coloração de Hematoxilina-Eosina (HE).

Coloração com Hematoxilina-Eosina (HE)

Para o processo de coloração as lâminas passaram pelo processo de desparafinização e a hidratação deixando-as em estufa a 56°C por uma hora, e posteriormente passando por uma série de xilol (3 lavagens) e alcoóis decrescentes (100, 96 e 70%), respectivamente. A coloração foi realizada por 1 minuto em solução de hematoxilina filtrada e após lavagem em água, seguida de incubação por 1 minuto em solução de eosina filtrada, controlando-se a intensidade ao microscópio. A desidratação foi realizada em série de alcoóis crescentes (96 e 100%) e xilol (3 lavagens), e então realizada montagem das lâminas com permount (Fischer Scientific, Fisher Chemalert Guide, Permound®, New Jersey, USA). Para análise das lâminas foi utilizado o microscópio da marca Olympus®, modelo EX 51 e com auxílio do software Image-Pro Plus 5.1. A captura das imagens foi realizada por câmera fotográfica acoplada ao mesmo microscópio da marca Olympus®, modelo Q Color 5.

3.15 Extração de lipídios do fígado

O método consiste em homogeneizar o tecido com uma mistura de clorofórmio-metanol (2:1) e lavagem do extrato por adição de água (2ml) ou de uma solução salina. A mistura resultante separa em duas fases, visto que a fase inferior é o extrato total de lipídeos puro. O procedimento de lavagem remove essencialmente todos os não-lipídeos à partir do extrato com uma perda concomitante de cerca de 0,3 por cento dos lipídeos do tecido. As vantagens e limitações deste procedimento foram estabelecidas para o cérebro (substâncias branca e cinzenta), para o fígado e para o músculo, de acordo com o método descrito por Folch (1957).

3.16 Tratamento estatístico

A distribuição de frequência dos parâmetros estimados foi analisada pela "one way" ANOVA. Quando diferenças significativas entre grupos forem detectada ($p < 0,05$), foi utilizado teste post-hoc de Tukey para comparações múltiplas. Para o cálculo estatístico da evolução do consumo foi realizado "two way" ANOVA e quando as diferenças significativas entre grupos forem detectadas ($p < 0,05$), foi utilizado teste post-hoc de Bonferroni para comparações múltiplas. A tabulação dos dados foi realizada com o software Microsoft Excel 2010 e para análise estatística foi utilizado o software GraphPad Prism5.

4 RESULTADOS

Os animais utilizados para os experimentos após um período de adaptação tiveram o peso e controle de consumo de líquidos e alimentos medidos diariamente. Para o início da coleta de dados os ratos tiveram seu peso inicial analisado e posteriormente os mesmos foram divididos em grupos para que a média de peso estivesse semelhante e sem diferença estatística assim como apresentado na figura 2 (C, grupo controle, n=5, CG, grupo controle glicose, n=5, S, suplementado, n=10, $P=0,9253$, ANOVA one way).

O peso dos animais foi analisado semanalmente, como mostra a figura 2 (C, grupo controle, n=5, CG, grupo controle glicose, n=5, S, suplementado, n=10, $P=0,3184$, ANOVA one way) não houve diferença significativa. Os pesos dos tecidos também foram avaliados na tabela 5 (C, grupo controle, n=5, CG, grupo controle glicose, n=5, S, suplementado, n=5) e também não apresentaram diferença estatística.

Tabela 5 - Peso dos tecidos: fígado (FIG), tecido adiposo epididimal (TAEP), tecido adiposo retroperitoneal (TARP), tecido adiposo mesentérico (TAME), músculo gastrocnêmio (GASTRO).

Grupos	FIG (g)	TAEP (g)	TARP (g)	TAME (g)	GASTRO (g)
C n=5	10,060±0,499	4,011±0,401	3,717±0,665	1,544±0,0813	1,945±0,114
CG n=5	9,066±0,641	3,979±0,366	3,423±0,576	1,467±0,216	1,642±0,159
S n=10	9,415±0,396	4,090±0,331	3,273±0,324	1,563±0,150	1,726±0,0827
	$P=0,4609$	$P=0,9747$	$P=0,8019$	$P=0,9185$	$P=0,2416$

(C, grupo controle, n=5, CG, grupo controle glicose, n=5, S, suplementado, n=10, $P>0,05$)

O consumo de ração e líquidos também foi avaliado durante o período experimental e foi notado que o consumo de ração, como visto na figura 3 (C, grupo controle, n=5, CG, grupo controle glicose, n=5, S, suplementado, n=10, ANOVA one way), foi maior no grupo C em relação ao grupo CG, $p<0,001$ e em C em relação a S, $p<0,001$. O consumo de ração de cada semana também foi calculado como mostra a tabela 6 (C, grupo controle, n=5, CG, grupo controle glicose, n=5, S, suplementado, n=10, ANOVA one way) e observamos que houve diferença estatística em quase todas as semanas indicando um menor consumo de ração nos grupos com intervenção nutricional, salvo na semana 7. O consumo de líquidos ao final do período experimental foi calculado assim como o consumo de ração, como

podemos observamos na figura 5 (C, grupo controle, n=5, CG, grupo controle glicose, n=5, S, suplementado, n=10, ANOVA one way), o consumo de líquidos foi menor entre o grupo C em relação ao grupo CG, $p < 0,001$ e C em relação ao grupo S, $p < 0,001$. O consumo semanal também foi calculado, e não foi percebida diferença significativa a cada semana, no entanto em todas as semanas pode-se notar que houve um consumo menor de líquido por parte do C em relação aos demais grupos. Para verificar a evolução do consumo de ração entre as semanas ao longo do período experimental foi utilizada análise estatística ANOVA two way, assim como observado na figura 4. A análise apontou diferença significativa na semana 4 entre C em relação a CG, $P < 0,01$ e C em relação a S, $P < 0,001$, na semana 6 entre C em relação a S, $P < 0,05$, na semana 7 entre C em relação a CG $P < 0,01$ e C em relação a S, $P < 0,01$ e a variação do consumo em relação as semanas apresentou diferença estatística de $P < 0,001$ entre as semanas. Da mesma forma foi calculada a evolução do consumo de líquidos, que apresentou diferença estatística apenas na variação do consumo semanal com $P = 0,0002$ entre os grupos.

Figura 2 - Peso corporal inicial e peso corporal ao final do período experimental

(C, grupo controle, n=5, CG, grupo controle glicose, n=5, S, suplementado, n=10, $P = 0,9253$, para peso inicial e $P = 0,3184$, para peso corporal ao final do período experimental)

(C, grupo controle, n=5, CG, grupo controle glicose, n=5, S, suplementado, n=10, P=0,3184)

Figura 3 - Consumo de ração durante o período experimental

(C, grupo controle, n=5, CG, grupo controle glicose, n=5, S, suplementado, n=10, *** P<0,0001 para C x CG e C x S).

Tabela 6 - Consumo semanal de ração

	C (g)	CG (g)	S (g)
semana 1	23,22±0,86**	15,92±0,57*	20,11±1,19
semana 2	24,93±0,34**	16,78±0,27	20,22±1,44*
semana 3	25,42±0,31***	16,16±0,11*	18,29±0,74***
semana 4	30,80±4,12*	16,39±2,28	18,00±2,33
semana 5	24,88±0,78***	15,44±1,03	16,12±0,85**
semana 6	23,94±0,64**	14,06±1,55	15,03±0,89**
semana 7	31,90±6,65	17,53±1,32	19,97±4,33

(C, grupo controle, n=5, CG, grupo controle glicose, n=5, S, suplementado, n=10, semana 1 = ** P<0,01 para C x CG e P<0,05 para CG x S; semana 2 = **P<0,01 para C x CG e *P<0,05 para CG x S; semana 3 = ***P<0,001 para C x CG e C x S, *P<0,05 para CG x S; semana 4 = *P<0,05 para C x CG; semana 5 = ***P<0,001 para C x CG, P<0,01 para C x S; semana 6 = **P<0,01 para C x CG e C x S; semana 7 = P>0,05 para todos os grupos).

Figura 4 - Evolução do consumo de ração

(C, grupo controle, n=5, CG, grupo controle glicose, n=5, S, suplementado, n=10, semana 4 = ** $P < 0,01$ para C x CG, ### $P < 0,001$ para C x S; semana 6 = # $P < 0,01$ para C x S; semana 7 = ## $P < 0,01$ para C x S, demais semanas $P > 0,05$ entre os grupos, $P < 0,001$ para variação do consumo entre as semanas).

Figura 5 - Consumo médio diário de líquido durante todo o período experimental

(C, grupo controle, n=5, CG, grupo controle glicose, n=5, S, suplementado, n=10, *** $P < 0,001$ para C x CG e C x S).

Tabela 7 - Consumo semanal de líquidos

	C (g)	CG (g)	S (g)
semana 1	46,87±3,53	69,81±13,25	69,80±9,21
semana 2	54,14±3,22	87,68±17,61	81,66±11,14
semana 3	52,45±3,12	90,19±16,34	92,03±20,53
semana 4	53,53±0,62	93,74±14,47	92,13±11,44
semana 5	57,13±4,72	95,97±14,53	95,10±15,70
semana 6	56,63±1,30	81,18±16,94	102,50±26,15
semana 7	64,65±6,85	83,82±1,51	83,39±2,79

(C, grupo controle, n=5, CG, grupo controle glicose, n=5, S, suplementado, n=10, $P>0,05$ para todos os grupos e semanas).

Figura 6 - Evolução do consumo de líquidos

(C, grupo controle, n=5, CG, grupo controle glicose, n=5, S, suplementado, n=10, $P<0,0002$ para variação do consumo entre as semanas).

O consumo calórico apresentado na figura 7, apresentou diferença significativa para todos os grupos ($P<0,001$ para C em relação a S e CG em relação S, $P<0,01$ para C em relação CG). Para o cálculo do consumo de calorias entre os grupos foram utilizadas as tabelas 1, 2 e 3.

Figura 7 - Consumo calórico médio diário por animal durante período experimental

(C, grupo controle, n=5, CG, grupo controle glicose, n=5, S, suplementado, n=10, ***P<0,001 para C x S e CG x S, **P<0,01 para C x CG)

As concentrações de TAG, colesterol e glicose no soro estão ilustradas na tabela 8. A concentração de TAG no soro não apresentou diferença significativa entre os grupos com $P>0,05$, o mesmo aconteceu com o colesterol que apesar de estar diminuído nos grupos CG e S, não atingiu valores com diferença significativa em relação grupo C. O conteúdo de gordura no fígado também foi quantificado e não foi observado nenhuma diferença significativa entre os grupos.

Tabela 8 - Concentração de triacilglicerol (TAG), colesterol e glicose no soro, conteúdo de gordura no fígado, colesterol e glicose no soro

	C	CG	S	P
TAG mg/dl	66,82±6,19	80,45±4,67	70,83±3,96	0,2240
colesterol mg/dl	66,83±8,29	61,99±4,94	58,28±5,06	0,6159
glicose mg/dl	96,76±4,17	104,20±7,63	102,80±4,22	0,6485
mg TAG/mg (FIG)	80,91±5,97	88,18±5,60	77,80±5,63	0,4977

(C, grupo controle, n=5, CG, grupo controle glicose, n=5, S, suplementado, n=10, valor de P expresso na tabela)

A concentração de glicose não apresentou grandes diferenças entre os grupos, tampouco diferença estatística. Insulina dosada no soro (figura 8) não apresentou diferença significativa. O índice G/I expresso na figura 9 (C, grupo

controle, n=5, CG, grupo controle glicose, n=5, S, suplementado, n=10), também não apresentou diferença estatística ($P>0,05$).

Figura 8 - Concentração de insulina no soro

(C, grupo controle, n=5, CG, grupo controle glicose, n=5, S, suplementado, n=10, $P>0,05$)

Figura 9 - Índice glicose/insulina (G/I)

(C, grupo controle, n=5, CG, grupo controle glicose, n=5, S, suplementado, n=10, $P>0,05$)

Na avaliação da função hepática, realizada no intuito de se avaliar toxicidade do tratamento, ilustrada na tabela 9 (AST/ALT) os grupos não apresentaram diferença significativa em ambos os testes, $P>0,05$.

Tabela 9 - Avaliação da função hepática

	AST/TGO	ALT/TGP
	U/L	U/L
C	91,34±7,116	24,22±2,93
CG	111,70±14,99	23,15±5,80
S	100,70±13,38	19,39±2,35

(C, grupo controle, n=5, CG, grupo controle glicose, n=5, S, suplementado, n=10, $P>0,05$ para ambos ensaios).

O produto de reação do Tiobarbitúrico (TBARS) foi medido tanto no fígado (figura 7), como no tecido adiposo (TAEP) (figura 10). No fígado foi notada diferença significativa entre os grupos CG e S, $P<0,05$, porém não houve diferença significativa em relação ao grupo C. Para o ensaios foi utilizado o valor de n (C, grupo controle, n=5, CG, grupo controle glicose, n=5, S, suplementado, n=10, ANOVA one way).

Figura 10 - Produto de Reação do Ácido Tiobarbitúrico (TBARS) no fígado

(C, grupo controle, n=5, CG, grupo controle glicose, n=5, S, suplementado, n=10, *P<0,05 para CG x S).

As expressões gênica e expressão proteica de citocinas foram analisadas no tecido adiposo (TAEP) como mostra a tabela 10, houve diferença significativa apenas na expressão proteica de TNF-ALFA, IL-6 e IL-10 não apresentaram diferença estatística. A Expressão gênica de citocinas não apresentou diferença significativa entre IL-6, IL-10 e TNF-ALFA entre os grupos.

Tabela 10 - Expressão proteica e expressão gênica de citocinas (IL-6, IL-10, TNF-ALFA) no tecido adiposo (TAEP)

	IL-6		IL-10		TNF-ALFA	
	citocinas	expressão gênica	citocinas	expressão gênica	citocinas	expressão gênica
	pg/μg de proteína	2-ΔΔ Ct	pg/μg de proteína	2-ΔΔ Ct	pg/μg de proteína	2-ΔΔ Ct
C	0,22±0,01	1,09±0,36	0,74±0,05	1,12±0,45	0,35±0,02***	2,82±2,67
CG	0,24±0,01	1,53±0,66	0,69±0,09	0,87±0,67	0,27±0,01**	14,34±13,95
S	0,24±0,01	0,59±0,28	0,65±0,02	1,54±0,52	0,23±0,01	3,66±2,61

(C, grupo controle, n=5, CG, grupo controle glicose, n=5, S, suplementado, n=10, para dados referentes a expressão proteica de IL-6, IL-10 e TNF-ALFA, ***P<0,001 para C x S, **P<0,01 para C x CG em TNF-ALFA, P>0,05 para IL-6 e IL-10 em todos os grupos. C, n=3, CG, n=3 e S, n=4 para expressão gênica de IL-6 e IL-10, P>0,05, C, n=3, CG, n=3 e S, n=3 para expressão gênica de TNF-ALFA, P>0,05).

A análise morfológica do fígado (figura 12) não demonstrou diferença entre os grupos C (A), CG (B) e S (C). Observou-se em todos os grupos, manutenção do arranjo lobular hepático, sem ocorrência de inclusões lipídicas aumentadas nos hepatócitos (esteatose), ou infiltração inflamatória. A análise morfológica do tecido adiposo epididimal (TAEP) (figura 13) mostrou que não houve diferença provocada pelos diferentes tratamentos (CG ou S) em relação a C. Os adipócitos apresentaram-se tipicamente arredondados/poligonais, e não foi detectada fibrose ou infiltração imunitária.

Tabela 11 - Razão da expressão proteica de citocinas IL-10/TNF-ALFA e IL-6/IL-10 no tecido adiposo (TAEP)

	IL-10/ TNF-ALFA	IL-6/IL-10
C	2,10±0,11	3,40±0,25
CG	2,52±0,17	2,95±0,33
S	2,54±0,28	2,72±0,15

(C, grupo controle, n=5, CG, grupo controle glicose, n=5, S, suplementado, n=10, para dados referentes a expressão proteica de citocinas, razão IL-6/IL-10, P<0,05).

Tabela 12 - Razão da expressão gênica de citocinas IL-10/TNF-ALFA e IL-6/IL-10 no tecido adiposo (TAEP)

	IL-10/ TNF-ALFA	IL-6/IL-10
C	5,39±5,10	1,04±0,21
CG	0,25±0,09	0,96±0,11
S	0,94±0,51	0,73±0,42

(C, grupo controle, n=3, CG, grupo controle glicose, n=3, S, suplementado, n=3, para dados referentes a expressão gênica de citocinas, razão IL-6/TNF-ALFA, P>0,05, razão IL-6/IL-10, P<0,05).

Figura 11- Histologia do fígado

Fotomicrografia mostrando microestrutura do fígado de ratos wistars dos grupos: C (A), CG (B) e S (C). A, B, C) flechas (→) apontam a presença de hepatócitos; cabeças de setas (▶) demonstram os capilares sinusóides hepáticos. (*) Veia centro lobular, (+) Ramificação da veia porta (C), (X) Ducto biliar (C), (∅) Ramo da artéria hepática (C). (∅+X) Tríade portal (C). Técnica de Coloração: Hematoxilina Eosina (HE). Escala de barra: 50µm.

Figura 12 - Histologia do tecido adiposo epididimal (TAEP)

Fotomicrografia da microestrutura do tecido adiposo de ratos wistar dos grupos: C (A), CG (B) e S (C). A, B, C) flechas (→) indicam núcleos de adipócitos comprimidos contra a membrana celular. Adipócitos (*). Técnica de Coloração: Hematoxilina Eosina (HE). Escala de barra: 50µm.

5 DISCUSSÃO

O açaí é consumido pela população brasileira frente à alegada capacidade de trazer benefícios na promoção da saúde e diminuição de incidências de doenças em função de sua ação antioxidante. No entanto, o açaí comercialmente disponível na forma de bebidas e sucos contêm elevados níveis de glicose, sendo de nosso interesse analisar se os efeitos esperados pelo consumo da fruta são observados também nestas, que agregam alto teor de carboidratos em sua formulação. Adicionalmente, além de possivelmente comprometer os efeitos benéficos do açaí, o alto teor de carboidratos nas bebidas poderia estar relacionado *per se*, à indução de efeitos deletérios e comprometimento do metabolismo.

O ganho de peso corporal não é necessariamente associado a dietas ricas em gordura, uma vez que ratos submetidos a uma dieta rica em gordura não apresentaram ganho de massa corporal significativo em relação ao grupo com mesmo consumo calórico, mas sim o aumento do consumo de calorias pode proporcionar um aumento da gordura corporal (Petro et al., 2004). Mesmo com intervenção nutricional, os grupos não apresentaram diferença significativa no peso corporal e nos compartimentos adiposos, contudo os animais suplementados ingeriram menos ração como forma compensatória. Os carboidratos representam uma fonte de energia muito importante para grande número de espécies animais, mas é do açúcar que vem a preferência pelo consumo (Sclafani, 1986), fato atribuído ao maior consumo de bebida contendo glicose em nosso trabalho. A suplementação induziu redução no consumo de ração proporcionalmente, de forma a compensar as calorias totais, assim não nos surpreendeu o fato de que nem o peso corporal, tampouco o peso dos tecidos tenha sido diferente entre os grupos.

Para verificar se foi mantida a integridade morfológica e se houve dano à função hepática, realizou-se análise histológica e mediu-se indicadores bioquímicos de função hepática (tabela 10) Não houve qualquer alteração significativa desses parâmetros, corroborando com resultados encontrados em estudo realizado por Souza e col. (2010), quando os ratos submetidos à suplementação com polpa açaí não apresentaram níveis de hepatotoxicidade em relação aos ratos do grupo controle. Esses autores trabalharam apenas com a fruta. No presente trabalho

analisou-se o efeito da apresentação em forma de bebida comercial. Para os animais, não houve indícios de dano hepático, como também comprovado pela análise do conteúdo de gordura no órgão (para aferição de eventual estabelecimento de esteatose)

Procedeu-se adicionalmente análise de diferentes depósitos adiposos para averiguar se havia maior acúmulo de gordura. O tecido adiposo é sabidamente um órgão heterogêneo, com marcante diferença incidente sobre aspectos morfológicos, bioquímicos, fisiológicos, moleculares e de resposta à doenças (Lira et al., 2009). Na vigência de doença crônica, como diabetes e obesidade, entre outras, os depósitos adiposos apresentam diversas possíveis alterações, como fibrose apoptose de adipócitos, aumento de área e volume celular, infiltração imunitária (Batista et al., 2009). Nenhuma alteração desse tipo foi encontrada nos tecidos dos animais estudados. Tampouco se verificou diferença entre os sítios adiposos analisados frente à suplementação. Cabe salientar que, entretanto, os depósitos adiposos em seres humanos respondem de forma distinta àquela de roedores, sob diversas circunstâncias. Portanto, não é impossível que em indivíduos, o consumo crônico dessas bebidas resulte em modificações dos parâmetros estudados.

Ainda na intenção de se examinar efeitos benéficos ou deletérios da suplementação sobre o metabolismo intermediário, analisou-se a relação glicose/insulina, o chamado índice GI, indicativo de sensibilidade à insulina (Das, 2013) Sabe-se que a insulina tem correlação positiva com a massa adiposa (Suzuki, 2012).

A insulina é sintetizada nas células β do pâncreas e secretada rapidamente após uma refeição, promovendo efeitos hipoglicemiantes. Esse hormônio também atua como um sinal anorexígeno dentro do sistema nervoso central (SNC) (Suzuki, 2012). Verificamos que os compartimentos adiposos dos animais não apresentaram diferença significativa com referência ao conteúdo de gordura e aspectos morfológicos (tabela 5), porém quando analisamos a insulina no soro podemos notar um aumento no grupo CG, que contudo, não atingiu diferença estatística, em relação aos demais grupos. Pode-se afirmar, dessa forma, que não houve prejuízo à sensibilidade à insulina dentro do período de suplementação. Períodos mais longos, contudo, poderiam propiciar resultados distintos (Petro et al., 2004).

O açaí em sua composição também contém significativa quantidade de flavonóides, representados pelas antocianinas que proporcionam à atividade antioxidante a fruta (Gallori, 2004). Nossos resultados sugerem que houve uma atividade antioxidante (tabela 7) nos grupos suplementados quando comparados ao grupo C, no entanto esta atividade ocorreu especificamente no TAEP, demonstrando o efeito protetor contra o dano causado pela oxidação de lipídios e proteínas (Guerra, 2011), no fígado a mesma análise foi realizada, no entanto, os resultados demonstraram efeito antioxidante em S em relação a CG, porém não apresentou diferença estatística em relação à C. O efeito antioxidante promovido pela fruta é visto de forma positiva ante a preocupação com o excesso de espécies reativas que podem conduzir a várias formas de dano celular tais como, peroxidação de lipídios de membrana, agressão a proteínas dos tecidos e membranas, as enzimas e DNA podendo ocasionar inúmeras enfermidades (Husain, 1987), sendo o desequilíbrio entre o excesso na produção destas moléculas altamente reativas e a velocidade de remoção pelo sistema de defesa antioxidante um quadro de estresse oxidativo (Halliwell, 2007).

O motivo pelo qual o açaí seria uma alternativa de tratamento não medicamentoso, é marcada pela sua capacidade antioxidante em dietas ricas em polifenóis, que são muito associadas em estudos epidemiológicos ao baixo risco de desenvolvimento de doenças incluindo câncer e patologias neurodegenerativas (Lin, 2007) e também a ação dos fitoquímicos presentes na fruta podem ser potenciais reguladores das atividades enzimáticas bem como do metabolismo, modulando receptores de núcleo e expressão gênica, além de reparar danos oxidativos causados no DNA (Seeram, 2007). O efeito do antioxidante do açaí foi suficiente para sobrepujar o efeito pró-oxidante da glicose no fígado, mas não foi diferente dos animais do grupo controle.

O consumo contínuo de carboidratos em altas doses está ligado ao aparecimento de diversas doenças, como a obesidade e a síndrome metabólica (Lanaspa et al., 2013). Estas doenças, por sua vez, têm como característica a presença de uma leve e crônica inflamação sistêmica e local, no tecido adiposo branco (Batista, 2013). Para avaliar se o consumo de açaí seria capaz de alterar o grau de inflamação no tecido adiposo branco, presente até mesmo em organismos saudáveis, mas sedentários (Lira et al., 2013), avaliou-se a expressão gênica e

proteica de 2 citocinas inflamatórias (TNF-ALFA e IL-6) e da principal citocina anti-inflamatória, a IL-10 (Rubio-Perez, Morillas-Ruiz, 2012).

Diversos estudos apontam a ação anti-inflamatória do açaí (Souza, 2010, Sun, 2010, Udani, 2011). Entretanto os resultados indicam que a suplementação com glicose causou desequilíbrio na razão IL-10/TNF-ALFA (expressão gênica), que não pode ser corrigido pela presença de açaí na bebida ofertada. Essa razão é amplamente utilizada na determinação do grau de inflamação em quadros patológicos (Lira et al., 2013). Assim, pode-se afirmar que, quando combinado à glicose presente em sucos comerciais o açaí perde seu efeito benéfico de potencial redutor da inflamação.

6 CONCLUSÃO

Os resultados ora apresentados demonstraram que embora desprovida de toxicidade a suplementação com açaí na forma de sucos com alto teor de glicose não traz benefícios à saúde. Contrariamente, o consumo crônico dessas bebidas parece modular o perfil inflamatório no tecido adiposo branco de forma indesejável. Sugere-se adicionalmente que se consumida por período mais longo, a suplementação possa ainda induzir eventuais alterações metabólicas desfavoráveis, como redução da sensibilidade à glicose. Dessa maneira, indica-se o consumo do açaí como fruta e não processado na forma de sucos.

REFERÊNCIAS*

Batista ML Jr, Olivan M, Alcantara PS, Sandoval R, Peres SB, Neves RX, Silverio R, Maximiano LF, Otoch JP, Seelaender M. Adipose tissue-derived factors as potential biomarkers in cachectic cancer patients. *Cytokine*. 2013;61(2):532-9.

Bergmeyer HU. *Methods of enzymatic analysis*. 6ª ed. Verlag Chemie:Weinheim, 1984;141-8.

Bradford MM, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding, *Anal. Biochem*. 72 (1976) 248–254.

Chan CC, Lee KC, Huang YH, Chou CK, Lin HC, Lee FY. Regulation by Resveratrol of the Cellular Factors Mediating Liver Damage and Regeneration after Acute Toxic Liver Injury. *Gastroenterol Hepatol*. 2013;23.

Chin YW, Chai HB, Keller WJ, Kinghorn AD. Lignans and other constituents of the fruits of *Euterpe oleracea* (Acai) with antioxidant and cytoprotective activities. *J Agric Food Chem*. 2008;56(17):7759-64.

Corradini C, Lantano C, Cavazza A. Innovative analytical tools to characterize prebiotic carbohydrates of functional food interest. *Anal Bioanal Chem*. 2013; 405(13):4591-605.

da Costa CA, de Oliveira PR, de Bem GF, de Cavalho LC, Ognibene DT, da Silva AF, Dos Santos Valença S, Pires KM, da Cunha Sousa PJ, de Moura RS, Resende AC. *Euterpe oleracea* Mart.-derived polyphenols prevent endothelial dysfunction and vascular structural changes in renovascular hypertensive rats: role of oxidative stress. 2012;385(12):1199-209.

Das P, Bhattacharjee D, Bandyopadhyay SK, Bhattacharya G, Singh R. Association of obesity and leptin with insulin resistance in type 2 diabetes mellitus in Indian population. *Indian J Physiol Pharmacol*. 2013;57(1):45-50.

Diplock AT, Charleux JL, Crozier-Willi G, Kok FJ, Rice-Evans C, Roberfroid M, Stahl W, Viña-Ribes J. Functional food science and defence against reactive oxidative species. *Br J Nutr*. 1998;1:77-112.

* De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. [updated 2011 Jul 15]. Available from: <http://www.icmje.org>

Dröge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev.* 2002;82(1):47-95.

Fang YZ, Yang S, Wu G. Free radical, antioxidants, and nutrition. *Nutrition.* 2002 18(10):872-9.

Farooqi IS, Matarese G, Lord GM, Keogh JM, Lawrence E, Agwu C, Sanna V, Jebb SA, Perna F, Fontana S, Lechler RI, DePaoli AM, O'Rahilly S. Beneficial effects of leptin on obesity T cell hyporesponsiveness and neuroendocrine/metabolic dysfunction of human congenital leptin deficiency *J Clin Invest.* 2002;110(8):1093–103.

Folch J, Lees M, Sloane G, Tanley GH. A simple method for the isolation and purification of lipides from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 1956; 226 (1), 497-509.

Gallori S Bilia AR Bergonzi MC Barbosa WLR Vincieri FF. Polyphenolic constituents of fruit pulp of *Euterpe oleracea* Mart. (acai palm). *Chromatographia* 2004;59:739-43.

Gallori S, Bilia AR, Bergonzi MC, Barbosa WLR, Vincieri FF. Polyphenolic constituents of fruit pulp of *Euterpe oleracea* Mart. (acai palm). *Chromatographia* 2004;59:739-43.

Guerra JF Magalhães CL Costa DC Silva ME Pedrosa ML. Dietary acai modulates ROS production by neutrophils and gene expression of liver antioxidant enzymes in rats. *J Clin Biochem Nutr.* 2011;49(3):188-94.

Guerra JF, Magalhães CL, Costa DC, Silva ME, Pedrosa ML. Dietary acai modulates ROS production by neutrophils and gene expression of liver antioxidant enzymes in rats. *J Clin Biochem Nutr.* 2011;49(3):188-94.

Hagan S, Niswender KD. Neuroendocrine regulation of food intake. *Pediatric Blood & Cancer.* 2012;58(1):149–53.

Halaas JL, Gajiwala KS, Maffei M, Cohen SL, Chait BT, Rabinowitz D, Lallone RL, Burley SK, Friedman JM. Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. *Science.* 1995;269(5223):543–6.

Halliwell B Gutteridge JMC. Measurement of reactive species. In: *Free Radicals in Biology and Medicine.* New-York: Oxford University Press. 2007; 268–340.

Husain SR Cillard J Cillard P. Hydroxyl radical scavenging activity of flavonoids. *Phytochemistry* 1987;26:2489-91.

Kang J, Li Z, Wu T, Jersen GS, Schauss AG, Wu X. Anti-oxidant capacities of flavonoid compound isolated from acai pulp (*Euterpe oleracea* Mart). *Food Chem.* 2010; 122(3):610-17.

Könner AC, Brüning JC. Selective insulin and leptin resistance in metabolic disorders. *Cell Metab.* 2012 Aug 8;16(2):14

Lanaspa MA, Ishimoto T, Li N, Cicerchi C, Orlicky DJ, Ruzicky P, Rivard C, Inaba S, Roncal-Jimenez CA, Bales ES, Diggie CP, Asipu A, Petrash JM, Kosugi T, Maruyama S, Sanchez-Lozada LG, McManaman JL, Bonthron DT, Sautin YY, Johnson RJ. Endogenous fructose production and metabolism in the liver contributes to the development of metabolic syndrome. *Nat Commun.* 2013;4:2434.

Lin J, Rexrode KM, Hu F, Albert CM, Chae CU, Rimm EB, Stampfer MJ, Manson JE. Dietary intakes of flavonols and flavones and coronary heart disease in US women. *Am J Epidemiol.* 2007;165:1305-13.

Lin J, Rexrode KM, Hu F, Albert CM, Chae CU, Rimm EB, Stampfer MJ, Manson JE. Dietary intakes of flavonols and flavones and coronary heart disease in US women. *Am J Epidemiol.* 2007;165:1305-13.

Lira FS, Rosa JC, Zanchi NE, Yamashita AS, Lopes RD, Lopes AC, Batista ML Jr, Seelaender M. Regulation of inflammation in the adipose tissue in cancer cachexia: effect of exercise. *Cell Biochem Funct.* 2009;27(2):71-5.

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. 2001;25(4):402-8.

Menrad K. Market and marketing of functional food in Europe. *J Food Eng* 2003; 56: 181–188.

Mertens-Talcott SU, Rios J, Jilma-Stohlawetz P, Pacheco-Palencia LA, Meibohm B, Talcott ST, Derendorf H. Pharmacokinetics of anthocyanins and antioxidant effects after the consumption of anthocyanin-rich acai juice and pulp (*Euterpe oleracea* Mart.) in human healthy volunteers. *J Agric Food Chem.* 2008 Sep 10;56(17):7796-802.

Mollet B, Rowland I. Functional foods. At the frontier between food and pharma. *Curr Opin Biotechnol.* 2002;13:483–5.

Motta VT. *Bioquímica de laboratório.* 5^a ed. São Paulo: Educs, 2009.

Nascimento S. Tecnologia de PCR e RT-PCR em tempo real e suas aplicações na área médica. *RBM.* 2010; 7-19.

Niki E. Do antioxidants impair signaling by reactive oxygen species and lipid oxidation products? *FEBS Lett.* 2012;586(21):3767-70.

Owyang C, Heldsinger A. Vagal control of satiety and hormonal regulation of appetite. *Journal of Neurogastroenterology and Motility.* 2011;17(4) 338–348.

Pacheco-Palencia LA, Mertens-Talcott S, Talcott ST. Chemical composition antioxidant properties and thermal stability of a phytochemical enriched oil from Acai (*Euterpe oleracea* Mart.). *J Agric Food Chem*. 2008;56:4631-6.

Pacheco-Palencia LA, Talcott ST, Safe S, Mertens-Talcott S. Absorption and biological activity of phytochemical-rich extracts from acai (*Euterpe oleracea* Mart.) pulp and oil in vitro. *J Agric Food Chem*. 2008; 28;56(10):3593-600.

Petro AE, Cotter J, Cooper DA, Peters JC, Surwit SJ, Surwit RS. **Fat, carbohydrate, and calories** in the **development** of **diabetes** and **obesity** in the C57BL/6J mouse. *Metabolism*. 2004;53(4):454-7.

Phillips MM, Rimmer CA. Functional foods and dietary supplements. *Anal Bioanal Chem*. 2013;405(13):4323-4.

Pimentel GD, Seelaender M, Lira FS. Inflammation in disease: mechanism and therapies. *Mediators Inflamm*. 2013;2013:829209.

Rubio-Perez JM, Morillas-Ruiz JM. A review: inflammatory process in Alzheimer's disease, role of cytokines. *ScientificWorldJournal*. 2012;2012:756357.

Sambrook J, Protein structure. Chaperones, paperones. *Nature*. 1989 16;342(6247):224-5.

Schauss AG, Wu X, Prior RL, Ou B, Pastel D, Huang D, Kababick JP. Phytochemical and nutrient composition of the freeze-dried Amazonian Palm Berry *Euterpe oleraceae* Mart. (Acai). *J Agric Food Chem*. 2006;54:8598-603.

Schwartz MW, Woods SC, Porte D Jr, Seeley RJ, Baskin DG. Central nervous system control of food intake. *Nature*. 2000; 404(6778):661-71.

Sclafani A. Carbohydrate taste, appetite, and obesity: an overview. *Neurosci Biobehav Rev*. 1987;11(2):131-53.

Seeram NP, Heber D. Impact of berry phytochemicals on human health: Effects beyond antioxidation. *ACS Symposium*. 2007; 956 (21) 326-336.

Seeram NP, Aviram M, Zhang Y, Henning SM, Feng L, Dreher M, Heber D. Comparison of antioxidant potency of commonly consumed polyphenol-rich beverages in the United States. *J Agric Food Chem*. 2008;56(4):1415-22.

Seeram NP, Heber D. Impact of berry phytochemicals on human health: Effects beyond antioxidation. *ACS Symposium*. 2007;956(21):326-36.

Siró I, Kápolna E, Kápolna B, Lugasi A. Functional food. Product development, marketing and consumer acceptance--a review. *Appetite*. 2008;51(3):456-67.

Souza MO, Silva M, Silva ME, Oliveira RP, Pedrosa ML. Diet supplementation with acai (*Euterpe oleracea* Mart.) pulp improves biomarkers of oxidative stress and the serum lipid profile in rats. *Nutrition*. 2010;26:804–10.

Souza MO, Souza E Silva L, de Brito Magalhães CL, de Figueiredo BB, Costa DC, Silva ME, Pedrosa ML. The hypocholesterolemic activity of açai (*Euterpe oleracea* Mart.) is mediated by the enhanced expression of the ATP-binding cassette, subfamily G transporters 5 and 8 and low-density lipoprotein receptor genes in the rat. *Nutr Res*. 2012;32(12):976-84.

Sun X, Seeberger J, Alberico T, Wang C, Wheeler CT, Schauss AG, Zou S. Açai palm fruit (*Euterpe oleracea* Mart.) pulp improves survival of flies on a high fat diet. *Exp Gerontol*. 2010;45(3):243-51.

Suzuki K, Jayasena CN, Bloom SR. Obesity and appetite control. *Exp Diabetes Res*. 2012; 824305.

Udani JK, Singh BB, Vijay J, Singh VJ. Barrett ML. Effects of Acai (*Euterpe oleracea* Mart.) berry preparation on metabolic parameters in a healthy overweight population: A pilot study. *Nutrition Journal*. 2011;10:45.

Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol*. 2007;39(1):44-84.

Venkataraman K, Khurana S, Tai TC. Oxidative stress in aging-matters of the heart and mind. *Int J Mol Sci*. 2013;14(9):17897-925.

Winterbourn CC, Gutteridge JM, Halliwell B. , Doxorubicin-dependent lipid peroxidation at low partial pressures of O₂. , *J Free Radic Biol Med*. 1985;1(1):43-9.

Winterbourn CC. Free-radical production and oxidative reactions of hemoglobin. *Environ Health Perspect*. 1985;64:321-30.