Universidade de São Paulo
Faculdade de Saúde Pública

**Avaliação da Atividade Antioxidante *in vitro* e
in vivo do Guaraná (*Paullinia cupana*) em pó**

Carolina de Aguiar Martins

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Nutrição em
Saúde Pública para obtenção do título
de Mestre em Ciências

Orientadora: Profa. Elizabeth A.F.S.
Torres

Área de concentração: Nutrição em
Saúde Pública

São Paulo

2010

Avaliação da Atividade Antioxidante *in vitro* e *in vivo* do Guaraná (*Paullinia cupana*) em pó

Carolina de Aguiar Martins

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Nutrição em
Saúde Pública para obtenção do título
de Mestre em Ciências

Orientadora: Profa. Elizabeth A.F.S.
Torres

Área de concentração: Nutrição em
Saúde Pública

São Paulo

2010

É expressamente proibida a comercialização deste documento, tanto na sua forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida **exclusivamente** para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano da tese/dissertação.

*“Deus não impôs aos ignorantes a obrigação de aprender, sem antes ter tomado aos
que sabem o juramento de ensinar”*
Provérbio chinês

*“Os sonhos não determinam o lugar onde vocês vão chegar, mas produzem a força
necessária para tirá-los do lugar em que vocês estão... Nessa matemática você só
aprende a multiplicar quando aprende a dividir, só consegue ganhar quando
aprende a perder, só consegue receber, quando aprende a se doar”*
Augusto Cury

*“Se dois homens vêm andando por uma estrada, cada um com um pão, e, ao se
encontrarem, trocarem os pães, cada um vai embora com um. Se dois homens vêm
andando por uma estrada, cada um com uma idéia, e, ao se encontrarem, trocarem
as idéias, cada um vai embora com duas”*

Provérbio chinês

**À minha mãe,
por todo o apoio sempre e por ser
minha inspiração e exemplo
de vida e dedicação.**

AGRADECIMENTOS

É gratificante olhar para trás e lembrar com emoção da jornada percorrida até aqui e ter a certeza de que valeu a pena e que nada teria sido possível sem tantas pessoas especiais em minha vida.

À minha professora orientadora Profa. Dra. Elizabeth Torres pela oportunidade, confiança e orientação nestes quase 6 anos de convivência desde a Iniciação Científica.

À Profa. Dra. Sandra Roberta Gouvea Ferreira Vivolo pela participação no exame de qualificação e pelas sugestões dadas para a realização deste estudo.

Ao Prof. Marcelo Lima Ribeiro e ao Ms. Demetrius pela contribuição e parceria na realização de análises.

À Dra. Edna Regina Nakandakare, Rodrigo Tallada Iborra e Valéria S. Nunes pela colaboração na exaustiva técnica de isolamento de LDL.

À Marcela Piedade Monteiro (e agora também à Duda), pela grande amizade conquistada durante a realização deste trabalho e pela colaboração na coleta de dados e análises. Pela paciência e por compartilhar desse amadurecimento acadêmico e profissional.

À Dra. Geni Rodrigues Sampaio, profissional dedicada e quase uma “segunda mãe” para o Laboratório de Bromatologia, sempre disposta a ajudar e contribuir. Obrigada por todo o apoio no Mestrado, paciência e colaboração na realização das análises.

À Ms. Rosana Manólio Soares, excelente profissional, pelas sugestões e contribuições no trabalho apresentado.

À Dra. Liania Luzia pela paciência e pelas sugestões valiosas que contribuíram para melhoria do trabalho apresentado.

À Clara Satsuki Mori pela colaboração nas análises de enzimas antioxidantes.

Aos colegas Yara Queiroz e Patrícia Beleza pelos momentos de descontração que propiciaram um agradável convívio no laboratório.

Ao Silvio Vicente pelas “endorfinas” que deram mais energia às análises e pela contribuição nas análises das enzimas antioxidantes.

À Ana Paula Santos pelo bom humor nos momentos difíceis e pelos chocolates nos intervalos da rotina de bancada!

À Lina Yonekura pelas sugestões valiosas e pelo fortalecimento do grupo com um novo núcleo de pesquisa com guaraná, assunto que eu “abraçei” desde a concepção com a Profa. Beth.

Aos colegas de laboratório e bancada pelo companheirismo, amizade e incentivo nos momentos difíceis e pela convivência produtiva que tornaram meu dia-a-dia no laboratório melhor: Tatiane Bottan, Patrícia Beleza, Julianna Shibao, Cecília Carnelosse, Vanessa Castro, Fellipe Bronze, Thaise Mendes e Telma Faraldo.

À Fezinha por ser mais que uma colega de laboratório, pelo companheirismo!

À Patrícia Hinning, Jaqueline Muller, Daniela Amaral e Lucas Iorio pelo carinho, por me ouvirem e me incentivarem sempre.

Às amigas que fiz este ano no Registro do Câncer, pelo carinho e apoio: Sofia, Rita, Aryana, Lucinda, Nazaré, Fernanda, Janaína e Thamyres.

À Dra. Márcia Pádua e Soraia, pela confiança e apoio.

À Larissa Baraldi, Ana Cecília e Mabel pela ajuda e hospitalidade.

À empresa Guaranapis pela doação das amostras de Guaraná em pó e ao Aldo Bacarin (Food Intelligence Consultoria Técnica em Alimentos S/S Ltda) pela doação de embalagens para armazenamento das amostras.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (processo número 2008/0263-1).

Aos voluntários, sem os quais não seria possível a realização desse estudo.

À todas as pessoas que contribuíram de alguma forma para a realização desse projeto.

RESUMO

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE FIGURAS

1. INTRODUÇÃO	3
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
2.1. RADICAIS LIVRES	5
2.2. OXIDAÇÃO LIPÍDICA	7
2.3. ESTRESSE OXIDATIVO	8
2.4. OXIDAÇÃO DA LDL E ATEROSCLEROSE	8
2.5. ANTIOXIDANTES	10
2.6. COMPOSTOS FENÓLICOS	12
2.7. GUARANÁ (<i>PAULLINIA CUPANA</i>)	16
2.8. COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO GUARANÁ E SEUS EFEITOS NA SAÚDE	18
3. JUSTIFICATIVA	24
4. OBJETIVOS	25
4.1. GERAL	25
4.2. ESPECÍFICOS	25
5. MATERIAIS E MÉTODOS	26
5.1. MATERIAIS	26
5.1.1. Amostras de guaraná em pó	26
5.1.2. Solventes e reagentes	26
5.2. CASUÍSTICA E MÉTODOS	27
5.2.1. Extração dos compostos fenólicos do guaraná em pó	28
5.2.2. Composição proximal do guaraná em pó	30
5.2.3. Determinação de resíduo seco dos extratos	30
5.2.4. Quantificação de compostos fenólicos totais nos extratos	31
5.2.5. Avaliação da atividade antioxidante in vitro dos extratos pelo ensaio do DPPH*	31
5.2.6. População de estudo	33
5.2.7. Delineamento do estudo	34
5.2.8. Considerações éticas	35
5.2.9. Avaliação do consumo alimentar	37
5.2.10. Coleta de amostras sanguíneas	37
5.2.11. Avaliação do perfil lipídico e glicemia de jejum	38
5.2.12. Isolamento de eritrócitos	38
5.2.13. Determinação da concentração de hemoglobina em eritrócitos	39
5.2.14. Isolamento de plasma e LDL	39
5.2.15. Concentração de proteína total das LDL	40
5.2.16. Monitoramento da peroxidação lipídica na LDL	40
5.2.17. Medida do perfil antioxidante total do plasma (TAS)	41
5.2.18. Teste da capacidade de absorbância de radical oxigênio (ORAC)	42
5.2.20. Avaliação da atividade das enzimas antioxidantes	43
5.2.21. Ensaio Cometa (Single Cell Gel Electrophoresis – SCGE)	45
6. ANÁLISE ESTATÍSTICA	47
7. RESULTADOS	48
7.1. COMPOSIÇÃO PROXIMAL DO GUARANÁ EM PÓ	48

7.2. QUANTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS NAS AMOSTRAS DE GUARANÁ EM PÓ	48
7.3. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE <i>IN VITRO</i> DOS EXTRATOS PELO ENSAIO DO DPPH [•]	50
7.4. POPULAÇÃO DE ESTUDO E CASUÍSTICA	52
7.5. CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO ESTUDADA.....	54
7.6. CONSUMO ALIMENTAR DOS VOLUNTÁRIOS	55
7.7. VARIAÇÃO DO PERFIL LIPÍDICO.....	56
7.8. MONITORAMENTO DA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA NA LDL	56
7.9. MEDIDA DO PERFIL ANTIOXIDANTE TOTAL DO PLASMA (TAS)	58
7.10. TESTE DA CAPACIDADE DE ABSORBÂNCIA DE RADICAL OXIGÊNIO (ORAC).....	59
7.11. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES	60
7.12. ENSAIO COMETA.....	61
7. DISCUSSÃO	64
7.2. QUANTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS NO GUARANÁ EM PÓ	64
7.3. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE <i>IN VITRO</i> DOS EXTRATOS PELO ENSAIO DO DPPH [•]	68
7.4. CONSUMO ALIMENTAR DOS VOLUNTÁRIOS	70
7.5. VARIAÇÃO DO PERFIL LIPÍDICO	70
7.6. OXIDAÇÃO DA LDL.....	74
7.7. MEDIDA DO PERFIL ANTIOXIDANTE TOTAL DO PLASMA (TAS)	78
7.8. TESTE DA CAPACIDADE DE ABSORBÂNCIA DE RADICAL OXIGÊNIO (ORAC)	79
7.9. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES	81
7.10. ENSAIO COMETA.....	86
8. CONCLUSÕES.....	89
REFERÊNCIAS	90

RESUMO

Martins CA. Avaliação da atividade antioxidante *in vitro* e *in vivo* do Guaraná (*Paullinia cupana*). [Mestrado em Nutrição em Saúde Pública] São Paulo. Faculdade de Saúde Pública da USP; 2010.

Introdução – Estudos indicam que antioxidantes presentes naturalmente em alguns alimentos são capazes de atuar como protetores dos organismos vivos frente aos danos causados pelo estresse oxidativo em macromoléculas como lipídios, proteínas e em DNA. O guaraná (*Paullinia cupana*), planta originária da Amazônia, contém elevadas concentrações de taninos e cafeína, compostos com comprovada atividade antioxidante. Apesar do aumento no consumo de guaraná e de estudos associando seus efeitos benéficos à saúde, há poucas informações sobre suas propriedades antioxidantes *in vivo*. **Objetivos:** avaliar o efeito do consumo de bebida a base de guaraná em pó em humanos. **Métodos** - *In vitro*: amostras de guaraná em pó foram analisadas para determinação da composição proximal; conteúdo de compostos fenólicos totais (Folin-Ciocalteu) e atividade antioxidante pelo ensaio DPPH foram determinados em amostras extraídas com água, metanol, etanol 60% e acetona 35%. *In vivo* e *ex vivo*: amostras de sangue de voluntários saudáveis (n=12) foram coletadas em jejum (J1) e 1h após o consumo da bebida com guaraná em pó foram coletadas novamente amostrar de sangue (G1). Após 15 dias da ingestão diária da bebida foram realizadas duas novas coletas, uma em jejum (J15) e outra após a primeira hora de consumo da bebida (G15). Foi avaliada a resistência da LDL à oxidação *ex vivo* iniciada com cobre pelo ensaio de dienos conjugados. O perfil antioxidante total (TAS) e a capacidade de absorbância de radical oxigênio (ORAC) foram determinados no plasma dos voluntários. Ensaio Cometa foi realizado para verificar danos oxidativos ao DNA em linfócitos dos voluntários. A atividade das enzimas Superóxido Dismutase (SOD), Catalase (Cat) e Glutathione Peroxidase (GPx) foi determinada em eritrócitos. Os resultados das diferentes análises foram apresentados com média e desvio-padrão. Foram utilizados ANOVA e teste de Tukey para verificar se há diferença no teor de compostos fenólicos totais e na atividade antioxidante das amostras extraídas com diferentes solventes. As verificações de aderência à curva normal foram realizadas pelo teste de Kolmogorov-

Smirnov. As comparações das variáveis de distribuição normal para as amostras pareadas foram baseadas no teste “t” de Student. Para todas as inferências foi utilizado o nível de significância menor ou igual a 5%. Para todos estes cálculos estatísticos foi utilizado o programa SPSS versão 16.0 for Windows. **Resultados:** Foi observado aumento significativo no *lag time* de oxidação da LDL tanto após uma hora do consumo da primeira dose de guaraná em pó quanto após uma hora do consumo no 15º dia de intervenção (G1>J1, G15>J15; $p<0,05$). O consumo de uma única dose de guaraná aumentou significativamente a atividade da Cat nos tempos G1 e G15 ($p < 0,05$) e da GPx no tempo G15 ($p<0,05$). Após intervenção com doses repetidas durante 15 dias houve aumento significativo da atividade da Cat e da GPx no jejum do último dia de intervenção quando comparado ao jejum do *baseline* (J15>J1; $p<0,05$). O consumo de guaraná não influenciou a atividade da SOD, tampouco o TAS ($p>0,05$). O consumo da bebida apresentou efeito agudo sobre o ORAC, uma vez que houve aumento significativo desse parâmetro tanto após uma hora do consumo da primeira dose de guaraná em pó quanto após uma hora do consumo no 15º dia de intervenção (G1>J1, G15>J15; $p<0,05$). O ORAC no plasma dos voluntários e avaliação de danos oxidativos ao DNA com desafio por peróxido de hidrogênio apresentaram o mesmo comportamento da resistência da LDL à oxidação: apenas efeito agudo foi observado pelo consumo da bebida (G1>J1, G15>J15; $p<0,05$). Sugere-se que o fracionamento da dose de guaraná em pó seja mais eficiente do que o consumo de uma única dose no dia para a manutenção da concentração dos compostos fenólicos no plasma a fim de promover efeitos pelo consumo de doses repetidas. Os efeitos antioxidantes pelo consumo de uma única dose de guaraná em pó parecem se estender além do tempo de depuração dos compostos fenólicos no plasma. São necessárias ainda novas pesquisas a fim de avaliar a dose e o tempo de intervenção para que sejam observados efeitos em humanos pela ingestão de doses repetidas de guaraná.

Palavras-chave: *Paullinia cupana*, guaraná em pó, compostos fenólicos, atividade antioxidante, LDL, enzimas antioxidantes.

ABSTRACT

Introduction – Studies indicate that antioxidants found naturally in some foods are capable of acting as protectors of living organisms against oxidative stress in macromolecules such as lipids and proteins and in DNA. Guarana (*Paullinia cupana*), a plant from Amazonia, contains high concentrations of tannins and caffeine, compounds with proven antioxidant activity. Despite the increase in consumption of guarana and studies linking their beneficial health effects, there is little information on its antioxidant properties *in vivo*. **Objectives:** investigate the effects of guarana consumption in humans. **Methods:** *In vitro*: guarana powder samples were analyzed for proximal composition; content of total phenolics (Folin-Ciocalteu) and antioxidant activity by DPPH assay were determined in samples extracted with water, methanol, ethanol 60% and acetone 35%. *In vivo* and *ex vivo*: blood samples from healthy volunteers (n = 12) were collected at a twelve-hour overnight fast (J1) and 1h after consumption of the drink with guarana powder the second blood sample was collected (G1). After 15 days of daily ingestion of the drink other two samples were collected: a twelve-hour overnight fast (J15) and again after the first hour of drink consumption (G15). The resistance of LDL to *ex vivo* oxidation initiated by copper was evaluated. The total antioxidant status (TAS) and the oxygen radical absorbance capacity (ORAC) were determined in plasma of volunteers. Comet assay was conducted to determine oxidative DNA damage in lymphocytes of volunteers. The activity of superoxide dismutase (SOD), catalase (Cat) and glutathione peroxidase (GPx) was determined in erythrocytes. ANOVA and test of Tukey were used to verify if there was significant differences in total phenolic contents and antioxidant activity of samples extracted with different solvents. The verification of adherence to the normal curve were performed by the Kolmogorov-Smirnov test. Comparisons of variables of normal distribution for the paired samples were based on “t” test of Student. For all inferences the significance level was less than or equal to 5%. For all these calculations the statistical program SPSS version 16.0 for Windows was used. **Results:** Significant increase in *lag time*

of LDL oxidation was observed, both after one hour of consumption of the first dose of guarana powder and after one hour of consumption in the 15th day of intervention (G1> J1, G15> J15, $p < 0.05$). The consumption of a single dose of guarana significantly increased the activity of Cat in the times G1 and G15 ($p < 0.05$). After intervention with repeated doses during 15 days, there was a significantly increase in the activity of Cat and GPx in fasting of the last day intervention compared to *baseline* fasting (J15> J1, $p < 0.05$). The consumption of guarana didn't influence the activity of SOD neither the TAS ($p > 0.05$). The ORAC in plasma of volunteers and assessment of oxidative damage to DNA challenge with hydrogen peroxide showed the same behavior of the resistance of LDL to oxidation: only acute effect was observed by the consumption of the drink (G1> J1, G15> J15, $p < 0.05$). It is suggested that the fractionation of the dose of guarana powder is more efficient than the consumption of a single dose on day to maintain the concentration of phenolic compounds in plasma to promote the consumption effects of repeated doses. The antioxidant effects by consumption of a single dose of guarana powder seem to extend beyond the time of clearance of phenolic compounds in plasma. New reserches are needed in order to evaluate the dose and duration of intervention for being observed effects in humans by ingestion of repeated doses of guarana.

Key words: *Paullinia cupana*, guarana powder, phenolic compounds, antioxidant activity, LDL, antioxidant enzymes.

Lista de siglas e abreviaturas

Abs	absorbância
AAPH	dicloridrato de 2,2'-azobis amidinopropano
ACAT	Acyl-CoA cholesterol acyltransferase
ApoB100	apolipoproteína B100
ATP	adenosina trifosfato
AVC	acidente vascular cerebral
Cat	catalase
DCV	doenças cardiovasculares
DCNT	doenças crônicas não transmissíveis
DNA	ácido desoxirribonucleico
DPPH·	radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil
DRI	Dietary Reference Intake
e ⁻	elétron
EAG	equivalentes de ácido gálico
ECG	epicatequina galato
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
EGC	epigallocatequina
EGCG	epigallocatequina galato
ERN	espécies reativas do metabolismo de nitrogênio
ERO	espécies reativas do metabolismo do oxigênio
H ⁺	íon hidrogênio
H ₂ O ₂	peróxido de hidrogênio
GSH	glutathione reduzida
GSH-Px	glutathione peroxidase
GSSG	glutathione oxidada
Hb	hemoglobina
HDL	lipoproteína de alta densidade
KBr	brometo de potássio
LDL	lipoproteína de baixa densidade

µg	micrograma
mg	miligrama
mL	mililitro
MDA	malonaldeído
NADPH	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NO	óxido nítrico
NO ₂	dióxido de nitrogênio
O ₂ ⁻	radical superóxido
¹ O ₂	oxigênio singlete
OH [•]	radical hidroxila
ONOO ⁻	peroxinitrito
ORAC	capacidade de absorbância de radical oxigênio
%	porcentagem
PA	padrão analítico
PBS	Phosphate buffered saline
PCNA	antígeno nuclear de proliferação celular
PMSF	phenylmethylsulfonyl fluoride
ROOH	hidroperóxido orgânico
rpm	rotação por minuto
SOD	superóxido dismutase
TAS	perfil antioxidante total do plasma
TBA	ácido tiobarbitúrico
TG	triglicérides
UV	ultravioleta
VLDL	lipoproteína de muito baixa densidade
v/v	relação volume e volume

Lista de tabelas

Tabela 1. Composição proximal do guaraná em pó em base úmida.	48
Tabela 2. Teores médios e desvio padrão de fenólicos totais da amostra de guaraná em pó segundo metodologia de extração e solvente utilizado.	49
Tabela 3. Caracterização da população estudada.	54
Tabela 4. Consumo alimentar dos voluntários no primeiro e no décimo quinto dia de intervenção.	55
Tabela 5. Variação do perfil de lipídios plasmáticos durante a intervenção.	56
Tabela 6. Variação do <i>lag time</i> de oxidação durante a intervenção.	58
Tabela 7. Variação do perfil antioxidante total do plasma durante a intervenção.	59
Tabela 8. Variação da capacidade de absorbância de radical oxigênio durante a intervenção.	60
Tabela 9. Variação da atividade das enzimas antioxidantes SOD, GPx e Cat durante a intervenção.	61
Tabela 10. Efeito da intervenção com guaraná em pó nos níveis de danos oxidativos ao DNA avaliados pelo Ensaio Cometa.	62
Tabela 11. Efeito da intervenção com guaraná em pó nos níveis de danos oxidativos ao DNA induzido por H ₂ O ₂ e avaliados pelo Ensaio Cometa.	63

Lista de figuras

Figura 1. O estresse oxidativo na aterosclerose.	10
Figura 2. Esquema simplificado do metabolismo dos polifenóis (Adaptado de Scabert <i>et al.</i> , 2000).	14
Figura 3. Possíveis vias metabólicas dos compostos fenólicos adquiridos pela dieta. (Adaptado de Scabert <i>et al.</i> , 2000)	15
Figura 4. Fluxograma do beneficiamento do guaraná.	18
Figura 5. Protocolo do estudo experimental.	27
Figura 6 - Extração dos compostos fenólicos do guaraná - método 1.	28
Figura 7 - Extração dos compostos fenólicos do guaraná - método 2.	29
Figura 8. Protocolo de coleta de dados.	35
Figura 9. Cinética de oxidação da LDL pelo contínuo monitoramento da absorbância a 234 nm. Adaptado de: Esterbauer <i>et al.</i> (1989).	41
Figura 10. Teor de compostos fenólicos totais do guaraná em pó obtidos pelo método 1, método 2 e por Majhenic <i>et al.</i> (2007).	50
Figura 11. Percentual de inibição dos extratos pelo método DPPH*, segundo metodologia de extração e solvente utilizado.	51
Figura 12. Fluxograma exclusão e inclusão de voluntários no estudo.	53
Figura 13. Imagens em microscópio confocal de eritrócitos não tratados (a) e eritrócitos incubados com morin (b), resveratrol (c), curcumina(d) e ácido tânico (e).	76
Figura 14. Curvas típicas do teste de capacidade antioxidante por ORAC.	80
Figura 15. Biotransformação de xenobióticos.	82
Figura 16. Modelo esquemático da regulação de Nrf2. Os indutores de ARE, como determinados compostos naturais, promovem a dissociação dos complexos Keap1–Nrf2 através da modificação dos resíduos de cisteína de Keap1 ou fosforilação de Nrf2 pela ação de proteínas quinases, o que provoca a translocação nuclear de Nrf2 e regulação das enzimas antioxidantes e de detoxificação através da modulação dos genes que as codificam.	84
Figura 17. Efeito dose-dependente de eritrócitos incubados com eritrócitos pelo método de quimioluminescência.	87

1. Introdução

O metabolismo aeróbio dos organismos vivos constantemente produz espécies reativas de oxigênio (ERO). A exacerbação de processos que induzem a maior geração de ERO, com desequilíbrio entre antioxidantes e pró-oxidantes, induz danos oxidativos que estão envolvidos na fisiopatologia de diversas doenças crônicas (Dias *et al.*, 1997; Ferreira *et al.*, 1997; Hoog *et al.*, 1998; Frei *et al.*, 1999; Giugliano *et al.*, 2000).

Nas últimas décadas as doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) passaram a liderar as causas de óbito no Brasil e, atualmente, representam cerca de 66% das enfermidades (Machado *et al.*, 2006).

Evidências indicando que a oxidação da lipoproteína de baixa densidade (LDL) exerce papel fundamental no desenvolvimento da aterosclerose são apoiadas por um número crescente de indicadores epidemiológicos e estudos experimentais (Parthasarathy *et al.*, 1992).

Os compostos fenólicos são derivados do metabolismo secundário das plantas e por isso estão largamente distribuídos nos alimentos, sendo a quantidade presente na alimentação humana bastante significativa (Ferrari, 1994). As propriedades antioxidantes dos fenólicos estão relacionadas ao seu potencial de oxirredução, que os permite atuar como agentes redutores, doando hidrogênios e elétrons (Rice-Evans *et al.*, 1997).

A semente do guaraná contém concentrações expressivas de compostos fenólicos (Herman, 1982; Herman, 1986; Seidemann, 1998). O perfil de polifenóis do guaraná se assemelha ao de alimentos como cacau e chá verde, no que diz respeito ao conteúdo de catequinas, epicatequinas e proantocianidinas (Herman, 1982; Herman, 1986; Seidemann, 1998), que são compostos fenólicos aos quais se relacionam diversos efeitos biológicos benéficos *in vitro* e *in vivo*. O guaraná, com suas raízes na cultura amazônica e brasileira, emerge como potencial fonte de polifenóis e como alimento funcional plausível de alcançar difusão mundial de forma semelhante ao que ocorreu com o chá verde, cacau e o vinho.

Essa planta, que já fazia parte da alimentação de tribos indígenas na Amazônia, atualmente apresenta crescente consumo no Brasil e no exterior (Mattei,

1998; Basile *et. al.*, 2005; Majhenic *et. al.*, 2007; Otobone *et. al.*, 2007), representando assim uma forma natural de inclusão de antioxidantes na dieta.

Assim, esse estudo propôs avaliar o efeito da ingestão da bebida a base de guaraná em pó na atividade antioxidante *in vivo* e *ex vivo* sobre o plasma e a LDL de humanos, e verificar possíveis alterações na atividade das enzimas antioxidantes e ao DNA em linfócitos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Radicais livres

A oxidação é parte fundamental da vida aeróbica e do nosso metabolismo. Os radicais livres são produzidos naturalmente ou por alguma disfunção biológica através de processos metabólicos oxidativos e, muitas vezes, são de extrema utilidade, como nas situações em que há necessidade da ativação do sistema imunológico (como exemplo, os macrófagos utilizam o peróxido de hidrogênio para destruir bactérias e outros elementos estranhos); na desintoxicação de drogas; e na produção do fator relaxante derivado do endotélio, o óxido nítrico, extremamente importante nos processos que desencadeiam o relaxamento dos vasos sanguíneos (Moncada *et al.*, 2001).

A produção exacerbada de radicais livres leva a importantes alterações em nível molecular que estão associadas a danos às macromoléculas biológicas como lipídios, proteínas e DNA, gerando alterações teciduais que implicam em inúmeros processos patológicos, como por exemplo: câncer, aterosclerose, doenças neurodegenerativas, diabetes, cirrose, artrite reumatóide etc. (Halliwell e Gutteridge, 2000; Halliwell, 1994).

Os radicais livres são gerados tanto por fontes endógenas quanto exógenas. Por fontes endógenas, originam-se de processos biológicos que normalmente ocorrem no organismo: redução de flavinas e tióis, como resultado da atividade de oxidases, cicloxigenases, lipoxigenases, desidrogenases e peroxidases; presença de metais de transição no interior da célula e de sistemas de transporte de elétrons. As fontes exógenas geradoras de radicais livres incluem tabaco, poluição do ar, solventes orgânicos, anestésicos, pesticidas e radiações (Soares, 2002).

A maior parte dos radicais livres são derivados do metabolismo do oxigênio molecular (O_2) utilizado na cadeia respiratória, que ocorre na membrana interna da mitocôndria para a produção de energia (ATP), sendo, portanto chamados de espécies reativas do metabolismo do oxigênio (ERO), e os principais são:

(1) radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) – formado no organismo principalmente através da cadeia de transporte de elétrons ou por ação de células fagocitárias (neutrófilos, monócitos, macrófagos e eosinófilos) para defesa contra microorganismos invasores na via metabólica catalisada por NADPH oxidase (Babior, 1997). O radical $O_2^{\bullet-}$ é formado pela adição de um elétron na molécula de O_2 em seu estado fundamental, podendo gerar outras espécies de maior reatividade, como peróxido de hidrogênio, hidroxila e peroxinitrito (Halliwell e Gutteridge, 2000);

(2) peróxido de hidrogênio (H_2O_2) – Apesar de não ser um radical livre, pela ausência de elétrons desemparelhados na última camada, é um metabólito do oxigênio extremamente deletério, porque participa da reação que produz o radical $OH^{\bullet}$ (Ferreira e Matsubara, 1997). As mitocôndrias são importantes fontes de $O_2^{\bullet-}$ e, como a presença deste ânion-radical pode causar sérios danos, ele é convertido enzimaticamente pela ação da superóxido dismutase a H_2O_2 , conforme esquema abaixo (Halliwell e Gutteridge, 2000):

O H_2O_2 também pode ser gerado por conversão espontânea resultante da redução bivalente do O_2 na terceira etapa da respiração, que ocorre no interior da mitocôndria, conforme descrito abaixo (Babior, 1997);

(3) radical hidroxila ($OH^{\bullet}$) – é o mais reativo em sistemas biológicos. Sua formação *in vivo* pode estar relacionada com a decomposição do peroxinitrito, do peróxido de hidrogênio e com reações catalisadas por metais de transição, como o ferro, pela reação de Fenton, conforme descrito abaixo (Halliwell e Gutteridge, 2000):

Os íons de metais de transição também podem catalisar a reação entre H_2O_2 e superóxido, conduzindo à produção de radical $OH^{\bullet}$, a chamada Reação de Haber-Weiss (Schneider *et al.*, 2004):

(4) oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) – é a forma excitada do oxigênio molecular e não possui elétrons desemparelhados em sua última camada. Pode ser produzido por reações fotoquímicas ou por outras radiações e reage com um grande número de moléculas biológicas, incluindo lipídios da membrana, iniciando processos de peroxidação (Vasconcelos, 2007).

Óxido nítrico ($\text{NO}^\bullet$) e o peroxinitrito ($\text{ONOO}^\bullet$) fazem parte das “espécies reativas do metabolismo de nitrogênio” (ERN). O óxido nítrico é gerado *in vivo* a partir do aminoácido arginina e está relacionado à formação de outras espécies altamente reativas, como o radical hidroxila e o peroxinitrito. Este último por sua vez é também uma espécie potencialmente tóxica e age diretamente sobre moléculas biológicas (Radi *et al.*, 1991), podendo ser encontrado na fumaça gerada pela queima do cigarro e de materiais orgânicos (Haliwell *et al.*, 1995).

2.2. Oxidação lipídica

Muito embora proteínas, carboidratos e ácidos nucleicos sejam suscetíveis à oxidação, os ácidos graxos insaturados são mais instáveis, devido às suas múltiplas duplas ligações e, portanto, são mais propensos à oxidação (Araujo, 2007). Em sistemas biológicos, a peroxidação lipídica ocorre principalmente em membranas, onde o conteúdo de ácidos graxos insaturados é relativamente alto (Adegoke *et al.*, 1998).

A oxidação lipídica é uma reação em cadeia iniciada frequentemente pelo radical hidroxila ($\text{OH}^\bullet$). A autooxidação inclui reações de iniciação (formação dos radicais livres do ácido graxo devido à retirada de um hidrogênio do carbono alílico da molécula), propagação (aparecimento de produtos primários de oxidação devido a formação de compostos instáveis que atuam como propagadores da reação) e terminação (formação de produtos finais estáveis ou não reativos pela combinação de radicais livres uns com os outros) (Shahidi *et al.*, 1992).

Os principais produtos finais da oxidação lipídica compreendem os derivados da decomposição de hidroperóxidos, como alcoóis, aldeídos, cetonas, ésteres e outros hidrocarbonetos (Ferrari, 1998).

2.3. Estresse oxidativo

A produção de ERO e ERN, entre outras espécies reativas, é parte integrante do metabolismo humano e é observada em diversas condições fisiológicas, como na ação de algumas enzimas, durante os processos de transferência de elétrons que ocorrem no metabolismo celular e por exposição a fatores exógenos (Vasconcelos, 2007). Contudo, a concentração desses radicais pode aumentar devido à maior geração intracelular ou deficiência dos mecanismos antioxidantes, promovendo a ocorrência de condição pró-oxidante (Cerutti, 1991). O desequilíbrio entre espécies oxidantes e antioxidantes que pode resultar na indução de danos celulares pelos radicais livres tem sido chamado de estresse oxidativo (Sies, 1993). Os danos oxidativos induzidos nas células e tecidos por esta condição têm sido relacionados de forma consistente a várias DCNT (Bianchi *et al.*, 1999).

2.4. Oxidação da LDL e aterosclerose

A aterosclerose é caracterizada pelo acúmulo de colesterol nos macrófagos nas artérias de médio e grande calibre. Este depósito leva a uma proliferação de certos tipos celulares dentro da parede arterial que interferem gradualmente na luz do vaso e impedem o fluxo sanguíneo. Este processo pode ser muito lento com duração de décadas até que uma lesão aterosclerótica interrompa o fluxo de sangue, levando à trombose e comprometimento do fornecimento de oxigênio para órgãos alvo, como coração e cérebro. A perda das funções cardíacas e cerebrais como resultado da diminuição do fluxo sanguíneo são chamadas de infarto agudo do miocárdio e acidente vascular cerebral (AVC), respectivamente (Stocker *et al.*, 2004).

Idade, sexo, obesidade, fumo, hipertensão, *diabetes mellitus* e dislipidemias são os fatores de risco ambientais e genéticos de maior relevância para

a aterosclerose (Stocker *et al.*, 2004). Esses fatores estão associados à geração de radicais livres (Antoniades *et al.*, 2003), com consequentes efeitos deletérios na função vascular através de vários mecanismos (Inoue e Node, 2006). As ERO podem causar danos diretamente na membrana e núcleo das células, além interagirem com substâncias vasoativas formadas no endotélio celular, o que provoca alterações na mobilidade vascular e conduz à oxidação das LDL (Inoue e Node, 2006).

A LDL é a principal transportadora do colesterol sérico (cerca de 70% circula ligado a ela) e fornecedora deste lipídio para os tecidos extra-hepáticos. Apresenta, em média, 22 nm de diâmetro, sendo composta de uma parte central com moléculas de colesterol esterificado (35% da partícula) e de triglicerídeos (10%), ao redor da qual há uma capa de colesterol livre, fosfolipídios e apoproteínas. A meia-vida plasmática é de cerca de dois a três dias e a ApoB100 é sua principal apolipoproteína, que além de sua função estrutural liga-se as receptores específicos em células hepáticas e extra-hepáticas para ser captada e removida da circulação (Stryer *et al.*, 1996; Mahley *et al.*, 2003).

A regulação do receptor de LDL-colesterol é o principal fator que controla as concentrações plasmáticas do colesterol. Defeitos no receptor ou na ApoB100 dificultam a captação celular da partícula, resultando na remoção plasmática deficiente e consequente aumento na concentração plasmática de colesterol (Ficker, 2007). Em concentrações normais a LDL circulante penetra na camada íntima, mas em quantidades excessivas, esta lipoproteína penetra no interior do espaço subendotelial e se fixa à parede arterial, podendo sofrer oxidação pelos radicais livres derivados do metabolismo de células endoteliais, musculares lisas, e também de macrófagos (Batlouni *et al.*, 1997).

Uma vez oxidada a LDL não pode mais ser reconhecida por seus receptores específicos. Além de induzir à ativação de citocinas e agentes quimiotáticos, a LDL oxidada produz muitas moléculas modificadas, com efeitos biológicos diversos, inclusive efeito acentuado na injúria endotelial. Monócitos se diferenciam em macrófagos e captam as LDL modificadas por oxidação. O acúmulo destas no interior dos macrófagos dá origem às células espumosas, que são encontradas no estágio inicial da formação de placas ateroscleróticas (**Figura 1**) (Goldstein *et al.*, 1979; Ficker, 2007; Bonomi *et al.*, 2008).

Figura 1. O estresse oxidativo na aterosclerose. **Fonte:** Bonomini *et al.*, 2008.

A oxidação lipídica pode ser inibida ou reduzida por altas concentrações séricas de compostos antioxidantes nas partículas de LDL (Hodgson *et al.*, 2000; Fuhrman *et al.*, 2001).

2.5. Antioxidantes

A produção contínua de radicais livres durante os processos metabólicos levou ao desenvolvimento de muitos mecanismos de defesa antioxidante para limitar os níveis intracelulares dessas espécies e impedir a indução de danos (Sies, 1993).

De forma geral, o termo antioxidante refere-se a “qualquer substância que, presente em baixas concentrações quando comparada a do substrato oxidável, atrasa ou inibe a oxidação deste substrato de maneira eficaz” (Halliwell e Gutteridge, 2000).

Os sistemas naturais de defesa incluem uma gama variada de substâncias que atuam em três diferentes níveis do processo oxidativo: (1) bloqueando a etapa de iniciação, porque impedem a geração de espécies reativas ou sequestram-nas de forma a impedir sua interação com alvos celulares. Ex: enzimas antioxidantes, tocoferóis, bioflavonóides e carotenóides; (2) bloqueando a etapa de progressão da cadeia radicalar ao sequestrarem radicais intermediários. Ex: tocoferóis (vitamina E),

tocotrienóis, flavonóides e antioxidantes sintéticos; e, finalmente (3) reparando as lesões causadas pelas ERO. Esse processo está relacionado com a remoção de danos da molécula de DNA e a reconstituição das membranas celulares danificadas (Abdalla, 2000; Thomas, 2000; Vandenbroucke *et al.*, 2001).

Os dois principais meios de defesa antioxidantes no organismo podem ser divididos em dois grupos: enzimático e não enzimático. O sistema antioxidante enzimático constitui a primeira defesa endógena aos ataques das espécies reativas de oxigênio, impedindo sua formação ou seqüestrando-as de forma a impedir sua interação com alvos celulares, ou seja, bloqueiam a etapa de iniciação da cadeia radicalar (Rover Júnior *et al.*, 2001). Esse sistema é formado, principalmente, pelas seguintes enzimas antioxidantes: Superóxido Dismutase (SOD), Glutathione peroxidase (GPx) e Catalase (Cat).

A função da SOD é catalisar a reação de dismutação do ânion radical superóxido, gerando oxigênio molecular e peróxido de hidrogênio. Esta é a principal isoenzima nos fluídos extracelulares, mas também ocorre em tecidos (Marklund, 1984; Niki, 2004). Existem três formas de SOD em mamíferos: a cobre-zinco (Cu-Zn-SOD), manganês (Mn-SOD), e a SOD extracelular (EC-SOD). A Cu-Zn-SOD está presente no citosol de todas as células enquanto a Mn-SOD está localizada principalmente nas mitocôndrias. Como indicado pelo nome, a EC-SOD é uma forma extracelular da enzima e encontra-se em equilíbrio entre o plasma e a superfície das células endoteliais, onde exerce sua ação protetora antioxidante (Stocker e Keaney-Jr, 2004).

A glutathione peroxidase (GPx), uma enzima dependente de selênio, coopera com a Cat na remoção de hidroperóxidos (ROOH). A GPx catalisa a redução do peróxido de hidrogênio e outros peróxidos orgânicos às custas da conversão da glutathione reduzida (GSH) à glutathione oxidada (GSSG) (Martins, 2007). Esta enzima é específica quanto ao doador de hidrogênio (GSH), mas pode reduzir vários hidroperóxidos orgânicos, inclusive hidroperóxidos lipídicos (Niki, 2004). Além do seu papel central na atividade da glutathione peroxidase, a glutathione está envolvida em várias outras vias antioxidantes, incluindo seqüestro de radicais livres, no metabolismo do ascorbato e na detoxificação de xenobióticos via glutathione transferase (Stocker e Keaney-Jr, 2004).

A Cat é encontrada principalmente nos peroxissomos celulares e em alguma extensão no citosol, decompondo diretamente o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio molecular, o qual resulta da dismutação do ânion radical superóxido (Wassmann *et al.*, 2004; Stocker e Keane-Jr, 2004). Esta enzima é encontrada no sangue, medula óssea, mucosas, rim e fígado (Ferreira e Matsubara, 1997).

As três enzimas são necessárias para a sobrevivência da célula, mesmo em condições normais. Elas atuam por mecanismos sinérgicos de modo a garantir a proteção celular. Contudo, esta proteção é assegurada apenas quando há manutenção de um equilíbrio na sua atividade, que pode ser afetado na presença de ERO (Michiels *et al.*, 1994).

Os antioxidantes não enzimáticos, em sua maioria, necessitam ser adquiridos pela alimentação. As frutas e vegetais são as principais fontes destes antioxidantes. Dos componentes não enzimáticos da defesa antioxidante destacam-se: alguns oligoelementos (zinco, cobre, selênio etc); vitaminas (ácido ascórbico, vitamina E, vitamina A, riboflavina); piruvato, carotenóides (beta-caroteno, licopeno e luteína); flavonóides e outros compostos derivados de plantas (Finkel, 2000; Barbosa *et al.*, 2007).

A importância comum ao desempenho dos antioxidantes *in vivo* depende dos fatores: tipos de radicais livres formados; onde e como são gerados esses radicais; análise e métodos para a identificação dos danos e doses ideais para obter proteção. Assim, é perfeitamente possível que um antioxidante atue como protetor em determinado sistema, mas que falhe na proteção, ou mesmo que aumente as lesões induzidas em outros sistemas ou tecidos (Halliwell *et al.*, 1995).

2.6. Compostos fenólicos

Os compostos antioxidantes naturais têm sido isolados de diferentes partes de plantas tais como sementes, frutas, folhas e raízes (Mancini-Filho *et al.*, 1998). Entre os compostos naturais capazes de agir como antioxidantes estão incluídos os compostos fenólicos, que são amplamente distribuídos em plantas e tem sido muito estudados por apresentarem atividades farmacológicas, inibirem a

oxidação lipídica e a proliferação de fungos, além de participarem de processos responsáveis pela cor, adstringência e aroma em vários alimentos (Peleg *et al.*, 1998; Moraes-de-Souza, 2007).

A atividade antioxidante de compostos fenólicos deve-se principalmente às suas propriedades redutoras e estrutura química. Sua fórmula química possui pelo menos um anel aromático ao qual está unida uma ou mais hidroxila(s). Estas características desempenham um papel importante na neutralização ou seqüestro de radicais livres e quelação de metais de transição, o que os permite atuar tanto na etapa de iniciação como na etapa de propagação do processo oxidativo (Aruoma *et al.*, 1994; Soares 2002).

Segundo Soares (2002), estes fenólicos estão divididos em dois grandes grupos: os flavonóides e seus derivados e os ácidos fenólicos (ácidos benzóico, hidroxicinâmico e seus derivados e as cumarinas).

Os flavonóides possuem uma estrutura química básica formada por C₆-C₃-C₆. Neste grupo encontram-se as flavonas, flavonóis, isoflavonas, catequinas, antocianinas, taninos, entre outros, dependendo do lugar, número e combinação dos grupamentos participantes da molécula (Mann, 1987). As proantocianidinas, que são também conhecidas como taninos condensados, são dímeros, oligômeros e polímeros de catequinas unidos por ligações entre C₄ e C₈ (ou C₆) (Guyot *et al.*, 1998).

Sabe-se que o metabolismo desses compostos ocorre por uma via comum (Manach *et al.*, 2005). As agliconas podem ser absorvidas no intestino delgado (Scalbert *et al.*, 2000). No entanto, a maioria dos polifenóis está presente em alimentos sob a forma de ésteres, glicosídeos ou polímeros que não podem ser absorvidos na sua forma nativa. Essas substâncias precisam ser hidrolisadas pelas enzimas intestinais ou pela microflora do cólon para sejam absorvidas (Manach *et al.*, 2004). As enzimas glicosídicas podem ocorrer no próprio alimento (ou adicionadas durante o processamento) ou nas células da mucosa gastrointestinal ou ainda serem secretadas pela microflora do cólon (Scalbert *et al.*, 2000). Durante o curso de absorção, os polifenóis são conjugados no intestino delgado e, posteriormente, no fígado. Esse processo inclui as etapas onde de metilação, sulfatação e glucoronidação (Manach *et al.*, 2004) (**Figura 2**).

Figura 2. Esquema simplificado do metabolismo dos polifenóis (Adaptado de Scabert *et al.*, 2000).

Os polifenóis que não são absorvidos no intestino e no estômago são levados para o cólon, onde a microflora os hidrolisa e os metaboliza extensivamente até transformá-los em substâncias mais simples, como os ácidos aromáticos (Scheline *et al.*, 1991; Scalbert *et al.*, 2000). Os produtos do metabolismo microbiano são então absorvidos e conjugados com glicina, ácido glucurônico, ou sulfato (Manach *et al.*, 2004). Após a conjugação, os metabólitos podem ser transportados, ligados à albumina, para os tecidos extra-hepáticos ou para os rins, onde são excretados pela urina (Bravo *et al.*, 1998). Nos tecidos, após serem metabolizados, os compostos podem ser metilados nos rins, antes de serem excretados pela urina (Piskula *et al.*, 1998; Manach *et al.*, 2004). Uma outra via de excreção pode ocorrer através bile que é secretada no duodeno e, ao atingir o cólon, esses compostos são então submetidos à ação de enzimas bacterianas, com posterior reabsorção. Esta reciclagem entero-hepática pode levar a uma maior presença de polifenóis no organismo (Manach *et al.*, 2004) (**Figura 3**).

Figura 3. Possíveis vias metabólicas dos compostos fenólicos adquiridos pela dieta. (Adaptado de Scalbert *et al.*, 2000)

Este é um processo de desintoxicação metabólica comum para muitos xenobióticos, o qual restringe potenciais efeitos tóxicos desses compostos e facilita eliminação dos mesmos pela bile e pela urina (Manach *et al.*, 2004).

2.7. Guaraná (*Paullinia cupana*)

O guaranazeiro (*Paullinia cupana*) pertence à família Sapindaceae e é originário da Amazônia, onde os índios Saterê-Mauê o utilizam há muitos anos (Kuskoski *et al.*, 2004; Fukumasu *et al.*, 2006). Esta planta é encontrada em estado nativo nas regiões compreendidas entre os rios Amazonas, Maués, Paraná do Ramos e Negro (estado do Amazonas) e na bacia do Rio Orinoco, na Venezuela (SUFRAMA, 2003).

O fruto é pequeno e redondo, negro e brilhante, assumindo uma forma de cápsula, em cujo interior há somente uma semente. Uma vez atingida a maturação completa, abre-se parcialmente, deixando à mostra o pelicarpo de cor castanha, parcialmente coberto por uma substância branca (arilo) (Correa, 1984; Faria *et al.*, 2000).

Ducke, um dos primeiros botânicos a estudar o guaraná, classificou a espécie em duas subespécies ou variedades geográficas: *Paullinia cupana* (Kunth) var. *typica* (existente principalmente na Venezuela e Colômbia) e *Paullinia cupana* (Kunth) var. *sorbilis* [(Mart.) Ducke] (oriunda da flora brasileira) (Correia, 1984). Há aproximadamente 195 espécies desse gênero distribuídas na América tropical e subtropical. Destas, pelo menos nove espécies são descritas como nativas do Brasil (Ângelo, 2008), que é praticamente o único país a produzir guaraná em escala comercial em cultivos racionais e sistemáticos, sendo que a maior parte é proveniente do Estado da Bahia, seguido por Amazonas e Mato Grosso (SUFRAMA, 2003). Tais diferenças de produtividade devem-se ao sistema de produção adotado na Bahia e Mato Grosso, que combina de grandes áreas de monocultivo, irrigação, uso intensivo de defensivos agrícolas, entre outros fatores.

Segundo Camargo *et al.* (2006), a produção das sementes de guaraná torradas no país é estimada em 4,3 mil toneladas por ano, sendo 70% da produção

absorvida pela indústria de refrigerante (na forma de xarope) e os 30% restantes abastecem o mercado interno e externo. Uma vez que o mercado local se encontra saturado, o cultivo do guaraná encontra-se em franca expansão, com êxito em especial para os países da Europa.

O rendimento das sementes é de 70%, sendo a forma seca e levemente torrada a única apropriada para consumo (Moraes *et al.*, 2003; Majhenic *et al.*, 2007; SBRT, 2008) e de acordo com o Centro de Pesquisa Agroflorestral da Amazônia Ocidental (2008) são comercializadas de quatro diferentes formas: guaraná em rama (grão torrado), guaraná em bastão (guaraná em rama triturado e pilado, moldado em formato de bastão, seco e defumado), guaraná em pó (grão torrado e moído) e xaropes (produto exclusivo de indústrias de considerável tecnologia e nível de capitalização).

O fluxograma do beneficiamento do guaraná está descrito na **Figura 4**. Os cachos são armazenados em galpões por quatro dias para sofrer leve fermentação e amolecimento da cascas. As sementes podem ser secas ao ar livre ou por processos artificiais. A separação das sementes da casca e do arilo é realizada em máquinas despulpadeiras. As sementes despulpadas são colocadas em uma peneira de arame e lavadas em água corrente, a fim de retirar os restos de casca e arilo que ficam na superfície da semente. Após este processo retira-se o ráquis e os frutos são colocados para secar por 10 a 12 horas ao sol ou em estufas, no caso de empresas providas de mais tecnologia. A torrefação das sementes é realizada em fornos de chapa, com umidade entre 8 a 10%. Em seguida, as sementes são separadas em menores e maiores, em peneiras apropriadas. As sementes no ponto de torrefação ideal são selecionadas pela sua coloração, descascadas e moídas em moinho de martelo, com peneiras finas, a fim de obter o produto na forma de pó (SBRT, 2008).

Figura 4. Fluxograma do beneficiamento do guaraná.

2.8. Composição química do guaraná e seus efeitos na saúde

A composição química do guaraná caracteriza-se pela presença de alcalóides tipo metilxantinas, tais como cafeína, teofilina e teobromina, além de taninos, ácido gálico, saponinas, catequinas, epicatequinas e outros compostos em menor concentração (Herman, 1982; Herman, 1986; Seidemann, 1998).

O guaraná é um dos vegetais mais rico em cafeína, alcalóide purínico identificado como 1,3,7-trimetilxantina. A concentração média deste composto representa cerca de 3 a 6% do peso do fruto. O teor médio de cafeína encontrado no guaraná em pó, dependendo da marca considerada, pode ser até quatro vezes maior

quando comparado ao teor encontrado em pó de café. Essa cafeína pode variar de acordo com a procedência da matéria-prima e as condições de cultivo (região de plantio, o método de cultivo, presença de contaminantes químicos e métodos de secagem) (Moraes *et al.*, 2003; Kuskoski *et al.*, 2004; Tfouni *et al.*, 2007; Caldas, 2008).

Revisão da literatura relacionada ao guaraná revelou poucos estudos, que em sua maioria relatam efeitos estimulantes e melhora na capacidade cognitiva e desempenho físico (Espinola *et al.*, 1997; Kennedy *et al.*, 2004; Haller *et al.*, 2005; Kennedy *et al.*, 2008) e redução da agregação plaquetária (Santos *et al.*, 1989; Bydlowski *et al.*, 1988; Bydlowski *et al.*, 1991). Alguns estudos mais recentes têm relatado efeitos promissores dos fitoquímicos do guaraná na quimioprevenção do câncer, e raros são os estudos que enfocam a atividade antioxidante associada ao seu conteúdo de compostos fenólicos, como pode ser observado no **Quadro 1**.

Fukumassu *et al.* (2006) verificaram que os taninos presentes no guaraná apresentaram efeito quimiopreventivo na hepatocarcinogênese induzida em camundongos pela redução da proliferação celular de células pré-neoplásicas e maior expressão do antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA), que está relacionado ao aumento da proliferação celular devido ao seu papel no metabolismo dos ácidos nucleicos como um componente essencial da replicação e reparação.

Fukumassu *et al.* (2008) demonstraram que o guaraná apresentou um efeito anticarcinogênico em metástase de pulmão em camundongos. Os animais tratados com guaraná apresentaram uma redução de 68,6% na área da carga tumoral comparado ao grupo controle que não foi tratado com guaraná e uma redução de 57,9% no índice de proliferação do tumor.

Em estudo mais recente foi verificado que a administração de *Paullinia cupana* aumentou a sobrevivência de camundongos portadores de Carcinoma Ascítico de Ehrlich (EAC). Esse efeito foi correlacionado com a diminuição da expressão da ciclina D1 que controla rigidamente uma das quatro fases do ciclo celular de mamíferos (Fukumassu *et al.*, 2010) e que é produzida em excesso em uma variedade de carcinomas, sendo por isso considerada um pró-oncogênico (Lu *et al.*, 2003).

Mattei *et al.* (1998) verificaram ausência de toxicidade, por meio de análises histopatológicas, em órgãos de ratos e camundongos tratados com doses elevadas (3,0 mg/mL) de extrato aquoso de guaraná liofilizado.

Em um estudo duplo-cego, placebo-controlado realizado com voluntários jovens e saudáveis que receberam quatro diferentes doses de guaraná (37,5 mg, 75 mg, 150 mg e 300 mg, sendo que a concentração de cafeína em todas foi padronizada em 11 a 12%) foi verificado que as duas doses mais baixas produziram melhores efeitos cognitivos, melhoraram o desempenho da memória secundária e aumento do estado de alerta (Haskell *et al.*, 2007).

A ação farmacológica da cafeína prevalece no sistema nervoso central. Ela atua unindo-se a receptores adenosínicos, o que aumenta o estado de alerta do indivíduo e promove assim uma melhora na associação das idéias e das atividades intelectuais, maior resistência ao cansaço e sensação de bem-estar (Moraes *et al.*, 2003; Kuskoski *et al.*, 2004; Tfouni *et al.*, 2002; Caldas, 2008).

Quadro 1. Exemplos de estudos com guaraná.

Ano	Referência	Intervenção	Resultado do estudo
1989	Santos <i>et al.</i>	Estudo randomizado, placebo-controlado. Tratamento de indivíduos saudáveis com extrato bruto de guaraná em doses de 4 e 8g três vezes ao dia durante dois dias.	- A administração do produto evidenciou níveis plasmáticos dose- dependentes para as metilxatinas envolvidas; - Correlação linear positiva apenas entre níveis plasmáticos de cafeína e a inibição da agregação plaquetária em sangue total, mas não em plasma rico em plaquetas; - Diminuição da agregação plaquetária e da síntese de tromboxano.
1991	Bydlowski <i>et al.</i>	Estudo experimental com modelo animal. Adição de extrato aquoso de guaraná (100mg/mL) em plasma de coelhos.	- Nenhum efeito comportamental foi observado.
1994	Galduroz <i>et al.</i>	Estudo duplo-cego. Administração de guaraná (12,5mg de cafeína), cafeína (12,5mg/dia) e placebo durante três dias em indivíduos saudáveis.	- Animais tratados com dose de 0,3mg/ml apresentaram melhor performance quando submetidos à teste de natação e em ratos mais velhos foi observado efeito protetor para a memória; - Diminuição no déficit de performance em tarefas que exigem memorização.
1997	Espinola <i>et al.</i>	Estudo experimental com modelo animal. Guaraná (0,3 e 3,0mg/ml) administrado em ratos durante períodos de 100 e 200 dias.	- Ausência de toxicidade demonstrada através de análises histopatológicas dos órgãos, mesmo após administração de doses elevadas (3mg/mL).
1998	Mattei <i>et al.</i>	Estudo experimental com modelo animal. Extrato aquoso de guaraná liofilizado administrado em ratos e camundongos.	- Diminuição da secreção e da acidez gástrica; - Possível efeito protetor dos extratos contra as lesões da mucosa gástrica.
2003	Campos <i>et al.</i>	Estudo experimental com modelo animal. Tratamento de ratos com extrato de guaraná (doses de 50 e 100 mg/ Kg) seguida da indução de lesão gástrica com etanol e indometacina	- Redução da incidência e da multiplicação das lesões macroscópicas; - Redução expressiva de lesões pré-neoplásicas e da proliferação de antígenos em camundongos que receberam 2,0mg de guaraná.
2003	Fukumassu <i>et al.</i>	Estudo experimental com modelo animal. Camundongos tratados com N-nitrosodietilamina receberam três diferentes doses de guaraná (0,1, 1,0 ou 2,0mg) através da dieta, sendo sacrificados após 25 dias.	- Aumento na velocidade da performance de tarefas que exigem atenção e melhora da memória secundária, sendo este resultado associado não apenas ao conteúdo de cafeína, mas também de taninos e saponinas presentes nas amostras.
2004	Kennedy <i>et al.</i>	Estudo experimental duplo-cego humanos. Administração de extrato etanólico de guaraná (7 mg), extrato de ginseng (200mg) e extrato de guaraná combinado com ginseng (75mg/100 mg) em indivíduos saudáveis.	- Atividade inibitória contra bactérias Gram-negativas e Gram-positivas.
2005	Basile <i>et al.</i>	Estudo experimental. Utilização de xtrato etanólico de sementes de guaraná.	- Não foram observadas reações adversas, nem mudanças hematológicas e bioquímicas.
2005	Oliveira <i>et al.</i>	Estudo experimental com humanos. Administração de Catuama (extrato de Paullinia cupana, Trichila catigua, Ptychopetalum olcaoides e Zingiber officinale) em indivíduos saudáveis duas vezes por dia durante 28 dias.	- Perda significativa de cafeína para temperaturas acima de 120°C.
2006	Pagliarussi <i>et al.</i>	Estudo experimental. Utilização de Extratos hidroalcóolicos de pó de guaraná.	- 75 mg do extrato (9mg de cafeína) foi a dose mais efetiva em relação à modulação do comportamento, confirmada pelos efeitos significantes nas medidas de memória secundária.
2007	Haskell <i>et al.</i>	Administração de doses únicas de 37,5; 75; 150 e 300mg de extrato de guaraná em indivíduos saudáveis.	- Melhora do humor para todas as doses.

Ano	Referência	Intervenção	Resultado do estudo
2007	Otobone <i>et al.</i>	Estudo experimental com modelo animal. Administração aguda ou crônica de extratos liofilizados (3,0; 30,0; 60,0mg/Kg) e dois diferentes extratos semi-purificados liofilizados (2,0; 4,0 mg/Kg e 2,0; 4,0mg/Kg)) de sementes de guaraná em ratos.	- Administração aguda e crônica não alterou o percentual de passagens dos ratos pelo labirinto desejado.
2008	Ângelo <i>et al.</i>	Estudo experimental de seqüenciamento genético de sementes de guaraná.	- Quantificação de 210 cromossomos na variedade sorbilis da <i>Paullinia cupana</i> ; - Seqüenciamento de segmentos de genes relacionados à síntese de flavonóides e de alcalóides, como a cafeína.
2008	Fukumassu <i>et al.</i>	Estudo placebo-controlado. Cultura de células de melanoma foram injetadas em camundongos no 7º dia de tratamento com guaraná (2,0mg de guaraná/Kg de peso), sendo a administração da planta mantida até o sacrifício dos animais (21º dia).	- Efeito quimioprotetor do guaraná em camundongos durante o processo de carcinogênese; - Redução do dano ao DNA celular; - Aumento da apoptose de células tumorais com conseqüente redução de na área afetada em 68,6% e redução de 57,9% no índice de proliferação tumoral quando comparado ao grupo controle.
2008	Kennedy <i>et al.</i>	Estudo duplo-cego, randomizado com humanos. Administração de suplemento multivitaminático e mineral acrescido de guaraná (222, mg) na forma de tablete efervescente em indivíduos saudáveis.	- Aumento na velocidade de performance em atividades cognitivas após o consumo agudo; - Diminuição da fadiga mental provocada pelas atividades.
2010	Fukumassu <i>et al.</i>	Estudo experimental com modelo animal. Camundongos foram tratados com diferentes doses de guaraná (100 mg, 1000 mg ou 2000 mg/kg de peso/dia) ou água (controle). No 7º dia de intervenção, foram injetadas células de EAC nos animais e o tratamento foi mantido até o 21º dia, quando foi realizado sacrifício. Para a análise de sobrevivência, outros dois grupos de animais foram tratados com água (controle) ou guaraná (2000mg/Kg de peso/dia). No 7º dia de intervenção, foram injetadas células de Carcinoma Ascítico de Ehrlich nos animais e o tratamento foi mantido até a morte natural.	-Aumento da sobrevivência dos animais pela diminuição da expressão da ciclina D1 e fase G1 das células tumorais.

A atividade antioxidante do guaraná tem sido foco de alguns estudos, sendo que atualmente pesquisas já evidenciam os efeitos antioxidantes *in vitro* do *Paullinia cupana* na inibição do processo oxidativo espontâneo devido ao elevado conteúdo de compostos fenólicos, principalmente os taninos (Mattei, 1998; Basile *et al.*, 2005; Majhenic *et al.*, 2007).

Mattei *et al.* (1998) observaram 50% de redução na peroxidação lipídica de sistema modelo homogenato com cérebro de ratos mesmo em presença de baixas concentrações do extrato preparado com pó de semente de guaraná liofilizado (1,2µg de pó de guaraná liofilizado/mL de água). Segundo os autores este resultado está relacionado ao elevado conteúdo de taninos na amostra.

Basile *et al.* (2005) avaliaram a peroxidação lipídica em adipócitos pelo método de MDA. Foi observada redução de 62,5% na peroxidação lipídica após tratamento com extrato etanólico de sementes de guaraná. Os autores também

referem que o resultado encontrado está associado à presença de polifenóis.

Resultado semelhante foi encontrado por Majhenic *et al.* (2007) em diferentes extratos (água, etanol, metanol e acetona) de sementes de guaraná, onde todos apresentaram elevado conteúdo de compostos fenólicos, capacidade de captação de radicais livres e efeito antioxidante.

As evidências de que as sementes de guaraná são fontes de compostos fenólicos com comprovada atividade antioxidante *in vitro* e efeitos benéficos à saúde tornam viável a aplicação de seu extrato na indústria alimentícia, cosmética e farmacêutica.

3. Justificativa

Embora haja estudos com guaraná na literatura associando seus efeitos à saúde, são poucas as informações relatando suas propriedades antioxidantes. Considerando o consumo crescente de produtos à base de guaraná em pó e os seus efeitos fisiológicos benéficos relatados pela literatura, o presente trabalho avaliou se bebida a base de pó de guaraná, obtida a partir da semente torrada e moída, promove efeito antioxidante em humanos, uma vez que não foram encontrados estudos sobre o potencial antioxidante *in vivo* e *ex vivo* desse alimento no levantamento bibliográfico realizado.

4. Objetivos

4.1. Geral

Avaliar o potencial antioxidante da ingestão de uma única dose e de doses repetidas de guaraná em pó em humanos.

4.2. Específicos

- Determinar a composição proximal, teor de compostos fenólicos e a atividade antioxidante *in vitro* pelo ensaio DPPH de amostras de guaraná em pó;
- Avaliar os produtos de peroxidação lipídica na LDL pelo ensaio de dienos conjugados;
- Determinar o perfil antioxidante total (TAS) e a capacidade de absorbância de radical oxigênio (ORAC) no plasma;
- Verificar possíveis alterações na atividade das enzimas antioxidantes Cat, SOD e GPx em eritrócitos e efeito protetor contra danos oxidativos ao DNA em linfócitos pelo Ensaio Cometa.

5. Materiais e métodos

5.1. Materiais

5.1.1. Amostras de guaraná em pó

As amostras de guaraná em pó do lote 02-2009 (fabricação: fevereiro de 2009) foram doadas pela empresa Guaranapis Industria de Produtos Naturais Ltda (CNPJ: 42.038.059/0001-19) sem conflitos de interesse. As amostras foram enviadas pela sede da empresa, localizada na cidade de Ituberá (BA), por meio de serviço de encomenda expressa até São Paulo, em embalagem de papelão e sem controle de temperatura durante o transporte. Após o recebimento das amostras, as mesmas foram armazenadas em local seco e protegidas da luz.

5.1.2. Solventes e reagentes

Foram utilizados solventes e reagentes de grau analítico como: álcool etílico, álcool metílico, acetona, clorofórmio, ácido clorídrico, ácido bórico, ácido sulfúrico, brometo de potássio, carbonato de sódio, cloreto de potássio, cloreto de sódio, clorofórmio, dimetilsulfóxido, hidróxido de sódio e sulfato de cobre.

Foram utilizados os padrões e reagentes ácido gálico, Trolox, albumina bovina sérica (BSA), 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH), Benzamidina, dicloridrato de 2,2'-azobis (2-Metilpropionamidina) 97% (ABTS+), fluoresceína, phenylmethylsulfonyl fluoride, Solução de Estreptomicina e Triton X-100 da marca Sigma-Aldrich (Alemanha). Também foram utilizados Folin-Ciocalteu e peridrol (Merck®, Alemanha).

Para as análises de isolamento de linfócitos e ensaio cometa foram utilizados os reagentes SYBR Safe™ (Invitrogen), Ficcol Plaque Plus (GE Healthcare), Solução Balanceada de Hank's (Cultilab), soro fetal bovino estéril (Cultilab) e meio RPMI (Cultilab).

Para determinação da atividade das enzimas SOD e GPx foram utilizados kits RANSOD (SD125) e RANSEL (RS 506) (RANDOX Laboratories).

5.2. Casuística e Métodos

A etapa experimental foi dividida em duas fases: testes *in vitro* com amostras de guaraná em pó e testes *in vivo* com humanos. Este protocolo pode ser visto na **Figura 5**.

Figura 5. Protocolo do estudo experimental.

ESTUDO *IN VITRO*

5.2.1. Extração dos compostos fenólicos do guaraná em pó

Foram utilizados quatro diferentes solventes (água destilada, metanol, acetona 35% e etanol 60%) e dois métodos de extração a temperatura ambiente (método 1 e método 2) a fim de obter máximo rendimento no processo de extração dos compostos fenólicos da matriz alimentar estudada.

No método 1, realizado segundo método descrito por Majhenic *et. al.* (2007), foram pesadas 3g de amostra e adicionados 50 mL de solvente. Em seguida foi realizada extração por 2h com agitação magnética, seguindo-se com filtração em funil de Buchner utilizando papel filtro (Nalgon, diâmetro 12,5 e porosidade 3 micra) com auxílio de uma bomba à vácuo. O volume final foi ajustado para 50 mL com o solvente utilizado (**Figura 6**).

Figura 6 - Extração dos compostos fenólicos do guaraná - método 1.

Para o método 2, realizado de acordo com Nuutila *et. al.* (2003), a mesma quantidade de amostra foi pesada. Em seguida, 20 mL de solvente foram adicionados. A amostra foi então agitada por 1h em agitador magnético e ultrassonificada por 20 minutos, sendo em seguida filtrada, utilizando papel filtro (Nalgon, diâmetro 12,5 e porosidade 3 micra). O sobrenadante foi armazenado em balão volumétrico de 50 mL. O resíduo retido no filtro sofreu nova extração com 10 ml de solvente, sendo que o seu sobrenadante foi direcionado para o mesmo balão do anterior. Os sobrenadantes tiveram o volume completado para 50 mL com o solvente utilizado (**Figura 7**).

Os extratos foram mantidos em frasco âmbar em freezer a - 20°C até o momento das análises.

Figura 7 - Extração dos compostos fenólicos do guaraná - método 2.

5.2.2. Composição proximal do guaraná em pó

As análises descritas a seguir foram realizadas em triplicata.

- Umidade: determinado por secagem direta em estufa com ventilação forçada de ar a 105°C (AOAC, 1995);
- Proteínas: determinado pelo método de Micro Kjeldahl, (Instituto Adolfo Lutz, 2004). Foi utilizado o fator 5,75 para conversão de nitrogênio total em proteína bruta.
- Cinzas: determinado pelo método de incineração em mufla a 550°C (Instituto Adolfo Lutz, 2004). Foram pesados aproximadamente 2 g de cada amostra em cadinhos calcinados e tarados;
- Lipídios: foram determinados pelo método de extração de Folch *et al.* (1957). Clorofórmio, metanol e água foram adicionados às amostras devidamente pesadas. A mistura foi homogeneizada por 5 minutos e em seguida foi filtrada. O resíduo foi reextraído com metanol e clorofórmio. O filtrado foi recolhido e a este foi adicionado KCl 0,88% em funil de separação. A fase superior foi descartada e à fase inferior foi adicionada uma mistura de metanol água (1:1). Após agitação da mistura e separação das camadas, a fase superior foi descartada (fase aquosa) e o restante foi filtrado com sulfato de sódio anidro. O clorofórmio do filtrado foi evaporado em rotavapor. A fração lipídica foi ressuspensa em 5 mL de clorofórmio e desta, 1 mL transferido para um vidro relógio previamente tarado e depois colocado em estufa a 100°C, para determinação de lipídios por gravimetria.
- Carboidratos: foi obtido por diferença, ou seja, efetuou-se a somatória dos resultados de umidade, lipídios, proteínas e resíduo mineral, e este valor foi subtraído do valor 100, que se refere ao conteúdo integral (100%) das amostras (AOAC, 1995).

5.2.3. Determinação de resíduo seco dos extratos

O resíduo seco foi determinado para padronização da concentração das diferentes amostras para avaliação da atividade antioxidante pelo *ensaio radical 1,1-difenil-2-2picrilhidrazil (DPPH[•])*.

Utilizou-se o método gravimétrico onde o volume de 1 mL dos extratos

foi transferido para vidro relógio previamente tarado, que foi colocado em estufa a 105⁰C, por 16 horas, seguido de resfriamento em dessecador e pesagem, sendo a operação repetida até peso constante, obtendo o resíduo seco em mg/mL de extrato (AOAC, 1995).

5.2.4. Quantificação de compostos fenólicos totais nos extratos

O teor de compostos fenólicos totais presentes nas amostras foi analisado pelo método desenvolvido por Shahidi *et al.* (1995) modificado por Genovese *et al.* (2003), empregando-se o reagente de Folin-Ciocalteu. Este método baseia-se na redução dos ácidos fosfomolibdico e fosfotúngstico em solução alcalina. A cor azul produzida pela redução do reagente Folin-Ciocalteu pelos fenólicos é medida espectrofotometricamente, no comprimento de onda de 760 nm. Em tubos de ensaio foram adicionados 250 µL de extrato diluído, 250 µL de água destilada e 250 µL de reagente de Folin-Ciocalteu (1:10, v/v). Após 3 minutos, foram adicionados mais 250 µL de solução de carbonato de sódio (75 g/L). A mistura foi homogeneizada em agitador de tubos e as amostras foram incubadas por 30 minutos a 37°C, seguido de resfriamento em temperatura ambiente. A leitura das absorbâncias foi realizada em espectrofotômetro (Shimadzu modelo UV – 1650 PV) em comprimento de onda de 760 nm. O ácido gálico foi utilizado como padrão e água destilada como branco.

Os resultados foram expressos em mg EAG/g de amostra.

5.2.5. Avaliação da atividade antioxidante *in vitro* dos extratos pelo ensaio do DPPH[•]

A capacidade dos extratos de guaraná em seqüestrar radicais livres foi realizada de acordo com o método descrito por Brand Willians *et al.* (1995) e adaptado por Milliauskas *et al.* (2004).

Os extratos foram diluídos em metanol na concentração de 0,3 mg de resíduo seco /mL. Uma alíquota de 3 mL da solução metanólica de DPPH na

concentração de 20µg/mL (preparado diariamente) foi acrescentada a 77µl dos extratos e foram mantidos em temperatura ambiente e sob abrigo de luz por 15 minutos. Em todos os ensaios foi preparado um branco, contendo a solução de DPPH e metanol, que também foi submetido a essas condições.

A alteração na coloração das soluções foi lida em espectrofotômetro (Shimadzu modelo UV – 1650 PV) a um comprimento de onda de 515 nm. Para avaliar a atividade redutora de radical, foi obtida a porcentagem de inibição, conforme a equação:

$$\% \text{ de Inibição} = \left\{ \frac{(\text{Abs. final da amostra} - \text{Abs. do Branco})}{\text{Abs. do DPPH}} \times 100 \right\}$$

ESTUDO *IN VIVO*

5.2.6. População de estudo

O Grupo da Unidade de Pesquisa Café e Coração, vinculado à Unidade de Coronariopatia Crônica do InCor- Instituto do Coração do HC-FMUSP, possui prontuários de pacientes que habitualmente participam de pesquisas desenvolvidas dentro da unidade. Os voluntários do presente estudo foram inicialmente selecionados através de consulta aos prontuários cedidos pelo Grupo da Unidade de Pesquisa Café e Coração.

Critérios de inclusão: voluntários de ambos os sexos, com idade entre 20 e 65 anos e sobrepeso (Índice de Massa Corpórea - IMC - de 25 a 30 kg/m²) (OMS, 2000). Para os parâmetros de perfil lipídico foram adotados: 200 mg/dL < CT < 270 mg/dL; LDL > 100 mg/dL; TG inferior a 400 mg/dl*. Para a glicemia de jejum, foram utilizados valores de glicose plasmática inferiores a 100 mg/dL, nível considerado normal (IDF, 2005).

Critérios de exclusão: doenças cardiovasculares; hipertensão; doenças hepáticas (Mursu *et al.*, 2005); diabetes *mellitus* e pré-diabetes; uso regular ou uso até 2 meses antes do estudo de algum medicamento ou suplemento com propriedades antioxidantes e/ou hipolipemiante; dieta vegetariana; gravidez; tabagismo; consumo moderado de álcool: 1 drinque por dia para mulheres e 2 drinques por dia para homens, sendo que cada drinque corresponde a 350ml de cerveja, 150 ml de vinho ou 40 ml de bebida destilada (USDA, 2005); sensibilidade à cafeína e o não cumprimento das orientações.

Após identificação de pessoas que atendiam aos critérios de inclusão deste estudo, as mesmas foram convidadas por telefone para participarem do processo de triagem, que incluiu avaliações bioquímicas de perfil lipídico (CT, LDL-C, HDL-C e TG) e da glicemia de jejum.

* a equação de Friedewald é imprecisa em pacientes com TG>400mg/dL.

5.2.7. Delineamento do estudo

O estudo foi longitudinal e de intervenção. Os voluntários foram orientados a abster-se do consumo de álcool (Estrunch *et al.*, 2004, Micalef *et. al.*, 2007) e outros alimentos fontes de guaraná durante o período de *washout*, que teve duração de 15 dias, e durante o período de intervenção com o guaraná em pó, também com duração de 15 dias, totalizando assim 30 dias de estudo.

Para definição da quantidade de guaraná consumida pelos voluntários durante a intervenção, foi realizada a coleta da informação de “recomendação de uso” nas embalagens de guaraná em pó de diferentes fabricantes ($n = 10$), disponíveis em supermercados e drogarias do município de São Paulo. Foi observada em todas as embalagens a recomendação de ingestão de 3g de pó de guaraná/dia.

As amostras de guaraná foram pesadas e embaladas em garrafas plásticas individuais pela empresa Food Intelligence Consultoria Técnica em Alimentos S/A Ltda. Os voluntários receberam, junto com as garrafinhas, informações sobre o adequado armazenamento das mesmas, sendo orientados sobre o acondicionamento das embalagens em local fresco, sem umidade e ao abrigo da luz. Foram orientados ainda a somente abrir as embalagens no momento do consumo.

Os voluntários foram também orientados a preparar a bebida pela adição de 300 mL de água fria ou gelada às 3g de pó previamente pesadas. A concentração média de compostos fenólicos fornecidos por dia foi de $140,22 \pm 6,48$ mg (**Tabela 2**).

Após 15 dias de abstenção do consumo de bebidas alcoólicas e guaraná (*washout*) foi realizado o primeiro Recordatório Alimentar de 24h (R1) (**ANEXO 1**), a primeira medida da circunferência da cintura (CC1) e a primeira coleta de sangue (J1) em jejum de 12 horas. As orientações de abstenção do consumo de bebida alcoólica e guaraná foram mantidas ainda durante a intervenção com o guaraná. Em seguida, os voluntários consumiram a bebida à base de guaraná em pó nas dependências do hospital e após a primeira hora do consumo foi coletada a segunda amostra de sangue (G1). Nos treze dias seguintes, os voluntários foram orientados a consumir a bebida diariamente ao acordar, ainda em jejum. Foram esclarecidos ainda de que poderiam realizar o café da manhã logo após o consumo do guaraná (**Figura 8**).

Figura 8. Protocolo de coleta de dados.

Durante os dias em que os voluntários consumiram o guaraná em pó fora das dependências do hospital foi realizado pelo menos um contato por telefone para verificação do seguimento das orientações e confirmação da data da próxima coleta. No 15º dia da intervenção os voluntários compareceram novamente ao hospital e foram submetidos a uma terceira coleta em jejum de 12 horas (J15) e nova coleta de sangue após 1h da ingestão da bebida (G15). Nesse mesmo dia os pacientes foram submetidos a um segundo Recordatório Alimentar (R15) e nova medida de circunferência da cintura (CC15).

5.2.8. Considerações éticas

Os participantes elegíveis assinaram o *Termo de Consentimento Livre e Esclarecido* (ANEXO 2) antes do início da pesquisa, deixando-os cientes do conteúdo, possíveis riscos e finalidade do projeto. As dúvidas que persistiram foram elucidadas nos encontros agendados para as coletas de amostras. Foi assegurada

confidencialidade dos dados e garantia de receberem retorno sobre os resultados de seus exames.

Embora não haja evidências de risco para consumo de guaraná em pó na dosagem recomendada neste estudo, foi aconselhado aos participantes que interrompessem o consumo caso sentissem algum desconforto clínico.

Sendo a coleta de sangue para análise dos parâmetros bioquímicos o único procedimento (método) que poderia ter representado risco ao paciente, cabe mencionar que esse procedimento foi efetuado em cabines individuais, com utilização de material descartável e profissional habilitado para realização da coleta, seguindo padrões pré-estabelecidos de segurança, o que praticamente eliminou qualquer risco maior.

Aos pacientes que se interessaram pelos resultados das análises bioquímicas, foram dadas as informações devidas, após o término do período de intervenção com todos os voluntários.

O presente ensaio foi analisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo (processo nº 166/08), conforme as normas de resolução 196 de 10/10/1996, do Conselho nacional de Saúde, que regulamenta as pesquisas envolvendo humanos (**ANEXO 3**).

Esse trabalho também foi encaminhado ao Comitê de Ética Ambiental da Faculdade de Saúde Pública – USP para análise e detalhamento do descarte de materiais utilizados durante projeto. A aprovação foi concedida por esse comitê em 03/07/2009, na 5ª Sessão Ordinária, sob o número de protocolo 1850 (OF. COEP/207/09) (**ANEXO 4**). Os resíduos químicos produzidos foram acondicionados de forma adequada e encaminhados à empresa especializada em descarte de resíduos químicos (AMBICAMP). O descarte de material biológico foi realizado em sacos de lixo próprios para material infectante, em lixeiras específicas disponíveis no laboratório, sendo que esse material foi entregue ao Centro de Saúde Escola Geraldo Paula Souza (Av. Dr. Arnaldo nº 925 – Cerqueira César – SP. CEP: 01255 000), localizado junto às dependências da Faculdade de Saúde Pública, para posterior recolhimento pela empresa LOGA, contratada pela Limpurb para retirada de lixo hospitalar do local.

O presente estudo foi registrado também no Australian New Zealand Clinical Trials Registry (ANZCTR) sob o número de protocolo ACTRN12609000758202 (01/09/2009).

5.2.9. Avaliação do consumo alimentar

Os dados colhidos nos recordatórios alimentares R1 e R15 foram tabulados no programa *Nut Win (versão 2.0)* da Escola Paulista de Medicina – UNIFESP para verificar possíveis alterações no consumo alimentar de macro e micro nutrientes dos voluntários entre o *baseline* e o final da intervenção.

5.2.10. Coleta de amostras sanguíneas

As amostras de sangue foram coletadas por punção venosa periférica, em um total de 40 mL, por paciente, pelo sistema Vacutainer® (BD – Brasil), nas dependências do ambulatório do Grupo da Unidade de Pesquisa Café e Coração, vinculada à Unidade de Coronariopatia Crônica do InCor- Instituto do Coração do HC-FMUSP. Sendo a coleta de sangue para análise dos parâmetros bioquímicos o único procedimento (método) que poderia ter representado risco ao paciente, cabe mencionar que o procedimento foi efetuado em cabines individuais, com utilização de material descartável e profissional habilitado para realização da coleta, seguindo padrões pré-estabelecidos de segurança, o que praticamente eliminou qualquer risco maior.

O sangue destinado ao isolamento de plasma, LDL, eritrócitos e linfócitos foi colhido sob EDTA (ácido etileno diamino-tetra-acético 1,0 mg/mL) (BD® – Brasil) e a alíquota para avaliação do perfil lipídico e glicemia de jejum foi colhida em tubos gel seco. Os tubos com sangue destinados ao isolamento de plasma, LDL, eritrócitos e linfócitos foram mantidos sob refrigeração em caixas isotérmicas em até uma 1 hora após a coleta até o momento da manipulação no Laboratório de Bromatologia da Faculdade de Saúde Pública.

5.2.11 . Avaliação do perfil lipídico e glicemia de jejum

As amostras de sangue coletadas para determinação de lipídios plasmáticos nos tempos J1, G1, J15 e G15 e determinação de glicemia de jejum, nos tempos J1 e J15 foram analisadas pelo Laboratório de Análises Clínicas do InCor-Instituto do Coração do HC-FMUSP.

As concentrações de CT e TG foram determinadas por métodos colorimétricos enzimáticos; HDL-C, pelo ensaio colorimétrico enzimático homogêneo, por precipitação com sulfato de magnésio e sulfato de dextrano. Para estas dosagens bioquímicas foram utilizados “kits” enzimáticos de modo automatizado.

As concentrações de LDL-C e VLDL-C foram determinadas por diferença, utilizando-se a equação de Friedewald (1972):

$$\text{LDL-C} = \text{CT} - \text{HDL-C} + \text{TG}/5$$

A glicemia de jejum foi determinada no soro, por meio de ensaio enzimático automatizado, utilizando kit comercial.

5.2.12. Isolamento de eritrócitos

Imediatamente após a separação do plasma, foi realizado o isolamento de eritrócitos das amostras de sangue dos voluntários para análise das enzimas antioxidantes. O precipitado obtido no isolamento do plasma foi transferido para tubos falcon de 50 mL. 20 mL de solução salina a 0,9% (p/v) foram adicionados ao precipitado e a mistura foi homogeneizada por inversão lenta. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 3.500 rpm por 10 minutos a 4° C. O sobrenadante foi descartado. Este procedimento foi realizado três vezes e logo após a última centrifugação os eritrócitos que se encontravam no precipitado foram transferidos para microtubos. As amostras foram armazenadas em freezer a -80°C até o momento das análises.

5.2.13. Determinação da concentração de hemoglobina em eritrócitos

A determinação da concentração de hemoglobina foi realizada nas amostras de eritrócitos previamente isoladas. As dosagens foram realizadas por método colorimétrico com reagente de cor estoque (Labtest Diagnóstica – Catálogo 43). O Fe (II) do grupo heme da hemoglobina, oxihemoglobina e carboxihemoglobina foi oxidado ao estado férrico pelo ferricianeto formando hemoglobina (Hi), que se combina com o cianeto ionizado para produzir cianeto de hemoglobina (HiCN), o qual é lido a 540 nm em espectrofotômetro (Shimadzu modelo UV – 1650 PV). Para o cálculo da concentração de hemoglobina em g/dl foi utilizado o fator de calibração, obtido com a solução Padrão de Hemoglobina (Labtest Diagnóstica - Catálogo 47). A concentração de hemoglobina foi expressa em g/mL e g/L e esse dado foi utilizado na expressão dos resultados de atividade das enzimas antioxidantes.

5.2.14. Isolamento de plasma e LDL

As amostras sanguíneas foram centrifugadas a 4°C por 15 minutos a 3500 x g para separação do plasma. Para o isolamento da LDL foram separadas duas alíquotas de 8 mL de plasma de cada voluntário e em cada uma foram acrescentados inibidores de proteases: Aprotinina (6µg/mL), Benzamidina (2 mM), PMSF (1 mM) e solução de Estreptomicina (0,5%) e Gentamicina (0,25%). Essas amostras foram mantidas sob refrigeração (4°C) até a ultracentrifugação. Aproximadamente 8 mL de plasma foram reservados para isolamento de linfócitos e o restante foi congelado a -80°C para outras análises.

A fração LDL foi isolada de acordo com método proposto por Havel *et al.* (1955). A densidade do plasma foi ajustada para 1,019 g/mL através da adição de KBr e posteriormente foi submetido a ultracentrifugação sequencial por 9 horas a 60.000 rpm a 4°C em ultracentrifuga Thermo Scientific Sorvall WX Ultra Series (Rotor T-890). Após remoção da camada superior contendo a fração VLDL, a densidade do plasma foi ajustada para 1,063 g/mL pela adição de KBr e novamente

ultracentrifugada nas mesmas condições descritas acima. A camada superior de LDL foi coletada e imediatamente transferida para membranas de diálise (SPECTRUM® LABORATORIES, porosidade 12-14K).

Todas as amostras de LDL coletadas foram dialisadas a 4°C por 4 h contra PBS com EDTA pH 7,4 (NaCl 13 mM, KCl 0,27 mM, KH₂PO₄ 0,18 mM, Na₂HPO₄ 0,8 mM, EDTA 10 µmol/L). Em seguida, as amostras foram dialisadas overnight contra PBS sem EDTA pH 7,4. Além da diálise overnight, foram realizadas outras 4 diálises de 1 h em PBS sem EDTA.

5.2.15. Concentração de proteína total das LDL

A concentração de proteína total das LDL, realizada logo após a diálise em PBS sem EDTA overnight, foi determinada de acordo com o método colorimétrico descrito por Lowry *et al.* (1951). Neste método ocorre redução dos constituintes ativos do reagente de Folin-Ciocalteu (molibdato, tungstato e ácido fosfórico) na presença de Cu²⁺, por meio das cadeias laterais de alguns aminoácidos que contribuem com quatro elétrons ou pela retirada de dois elétrons de cada unidade tetrapeptídica dos peptídeos e proteínas. Essa reação produz um composto com absorção em 750 nm. Foi utilizada solução padrão de albumina de soro bovino para a curva padrão.

5.2.16. Monitoramento da peroxidação lipídica na LDL

As amostras de LDL isoladas nos tempos J1, G1, J15 e G15 foram utilizadas para o ensaio de dienos conjugados, realizado de acordo com metodologia proposta por Esterbauer *et al.* (1989), com modificações, logo após a última diálise em PBS sem EDTA.

A cinética da oxidação da LDL foi continuamente monitorada pela medida da formação de dienos conjugados, através da monitoração da variação na absorbância a 234 nm, durante 4h, em intervalos de 3 min, a temperatura de 37°C utilizando-se o leitor de placas Spectra Max M5 (Molecular Devices). Com os

valores de leitura das absorbâncias ao longo do tempo foram construídas curvas que foram utilizadas para o cálculo do *lag time* das amostras de LDL. O *lag time* é dado pela intersecção da reta extrapolada da fase de propagação (onde são formados os dienos conjugados) com a linha do tempo (**Figura 9**).

Figura 9. Cinética de oxidação da LDL pelo contínuo monitoramento da absorvância a 234 nm. Adaptado de: Esterbauer *et al.* (1989).

Antes do cálculo todos os valores foram normalizados para a absorvância iniciar do zero. A reta foi obtida com o cálculo da regressão linear dos pontos centrais da fase de propagação (pelo menos 5 pontos) e como critério de escolha dos pontos da reta foi estipulado valor mínimo de $r^2=0,96$.

5.2.17. Medida do perfil antioxidante total do plasma (TAS)

A TAS foi realizada na Faculdade de Veterinária e Zootecnia da USP em sistema automatizado (ANALISADOR BIOQUIMICA LABMAX 240, Labtest) com o “kit” “Total Antioxidant Status” (TAS - NX2332) da Randox Laboratories Ltd. (UK). No sistema é formado o radical ABTS⁺ (2,2'-azino-di-[3-etilbenzotiazolin sulfonato]) que apresenta coloração verde-azulada estável, sendo medido por espectrofotometria a 600 nm. A presença de antioxidantes na amostra diminui esta coloração de modo proporcional à concentração de antioxidantes presentes na mesma. A avaliação da TAS é realizada por meio da exposição da amostra a um

radical livre produzido em quantidades controladas. Conforme exposto nas **Reações 1 e 2** abaixo, a incubação do (2,2'-azino-di-[3-etilbenzotiazolina sulfonato]) ou ABTS[®] com a enzima metahemoglobina peroxidase produz o radical ABTS^{•+}, que apresenta coloração azul-esverdeada estável, com leitura da absorbância a 600 nm pelo espectrofotômetro.

(Reação 1) $\text{Metamioglobina-Fe}^{3+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Ferrilmioglobina-[Fe}^{4+} = \text{O}] + \text{H}_2\text{O}$

(Reação 2) $\text{ABTS} + \text{Ferrilmioglobina-[Fe}^{4+} = \text{O}] \rightarrow \text{ABTS}^{\bullet+} + \text{Metamioglobina}$

A adição da amostra produz a inibição na produção do radical ABTS^{•+}, promovendo a diminuição na absorbância a 600 nm.

5.2.18. Teste da capacidade de absorbância de radical oxigênio (ORAC)

Foram utilizados os métodos descritos por Ou *et al.* (2001) e Prior *et al.* (2003), com adaptações realizadas pelo Laboratório de Bromatologia da Faculdade de Saúde Pública da USP (pesquisadoras responsáveis: Patrícia Beleza, Carolina de Aguiar Martins e Marcela Piedade Monteiro – dados ainda não publicados).

Em microplaca (FLUOTRAC 200; 96 cavidades; fundo plano; cor preta) foram pipetados 50 µL de plasma convenientemente diluído, 150 µL de fluoresceína (93,54 nmol/L) e 50 µL de AAPH (221 mmol/L), dissolvidos em solução-tampão de fosfato 75 mmol/L, pH 7,4. Foi utilizado o padrão Trolox para a curva de calibração em seis diferentes concentrações (2,0; 5; 10; 20; 30 e 40 µM).

O método foi realizado pela medição da fluorescência a 37°C, com excitação de 493 nm e emissão de 515 nm, durante 60 minutos a cada 5 minutos, utilizando-se o leitor de placas SpectraMax M5 Molecular Devices. A partir das leituras obtidas foi gerada uma tabela de dados que foi utilizada para os cálculos das AUC (áreas sob a curva), obtidas pela seguinte expressão:

$$AUC = (0,5 + F_5/ F_0 + F_{10}/ F_0 + F_{15}/ F_0 + \dots + F_{60}/ F_0) \times 5$$

Onde:

F = leitura a cada 5 minutos.

A partir das AUC do branco, Trolox e amostra foi realizado o cálculo do ORAC e os resultados foram expressos em equivalentes de Trolox (μM).

5.2.20. Avaliação da atividade das enzimas antioxidantes

As enzimas antioxidantes foram analisadas em eritrócitos previamente isolados por centrifugações sequenciais, conforme descrito anteriormente.

a) Superóxido Dismutase (SOD)

O método descrito por Flohé e Günzler (1984) é baseado na inibição da reação entre o composto 2-(4-iodofenil)-5-cloreto de feniltetrazol (INT) e o radical superóxido, que originam um composto de coloração avermelhada. A metodologia emprega o sistema xantina e a xantina oxidase (XOD) para gerar radicais $\text{O}_2^{\cdot-}$ através da seguinte reação:

Por sua vez, os radicais superóxido reagem com INT, gerando um composto vermelho, o corante formazan.

A SOD, quando presente na amostra, compete com o composto INT pelos radicais superóxido, inibindo desta forma a produção do corante.

b) Glutathione Peroxidase (GPx)

O ensaio é baseado no método descrito por Paglia e Valentine (1967), no qual a glutathione peroxidase catalisa a oxidação da glutathione pelo hidroperóxido de cumeno (ROOH). Na presença da glutathione redutase (GR) e NADPH, a glutathione oxidada (GSSG) é imediatamente convertida na forma reduzida, com uma oxidação concomitante da NADPH a NADP^+ , como descrito abaixo:

Onde:

GR = glutathione redutase

GPx = glutathione peroxidase

GSH = glutathione

ROOH = hidroperóxido de cumeno

ROH = peróxido de cumeno

GSSG = glutathione oxidada

A concentração de GPx é medida pelo decréscimo na absorbância a 340 nm, devido a oxidação do NADPH a NADP^+ .

Atividade enzimática da SOD e GPx em eritrócitos dos voluntários foi realizada na Faculdade de Veterinária e Zootecnia da USP em sistema automatizado (ANALISADOR BIOQUIMICA LABMAX 240, Labtest) com kits comerciais da RANDOX Laboratories (Crumlin/UK).

c) Catalase (Cat)

A atividade desta enzima foi determinada espectrofotometricamente de acordo com o método descrito por Aebi (1984), pela medida da velocidade de decomposição do peróxido de hidrogênio, em comprimento de onda de 240 nm. O meio de reação contém solução de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) 30 mmol/L em tampão fosfato de potássio 50 mmol/L pH 7,0 preparado no dia da análise e mantido em gelo.

Em uma cubeta de quartzo, foram adicionados 1280 μL de tampão fosfato de sódio pH 7,4, 40 μL de amostra diluída em tampão tampão fosfato pH 7,0 e 680 μL de meio reacional. A mistura foi levemente agitada e a cubeta foi colocada no espectrofômetro para medição da redução da absorbância a 240 nm por 5 minutos a 30°C em espectrofotômetro Shimadzu modelo UV – 1650 PV.

A quantificação da atividade da catalase foi expressa em unidade por minuto por grama de hemoglobina da amostra (U/min/g de Hb).

5.2.21. Ensaio Cometa (Single Cell Gel Electrophoresis – SCGE)

Para a realização do Ensaio Cometa inicialmente foram isolados os linfócitos a partir das amostras de sangue coletadas. Resumidamente, 3 mL de amostra foram colocados cuidadosamente sobre 4 mL de Ficcol Plaque Plus e centrifugados a 3500 x g a 20°C por 30 minutos. O plasma foi descartado e os linfócitos foram transferidos para um tubo falcon de 15 mL. O volume do tubo foi completado para 4 mL com Solução de Hank's e em seguida as amostras foram centrifugadas 100 x g a 20°C por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e este último procedimento foi repetido nas mesmas condições. O precipitado foi suspenso em solução de congelamento (10% de DMSO, 40% de soro fetal bovino estéril e 50% de meio RPMI) e armazenado a -80°C por 6 meses.

Para o Ensaio Cometa a suspensão celular (200 μL) foi tratada com 100 μM de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) a 4°C por 30 minutos.

A versão alcalina deste ensaio foi realizada de acordo com Singh *et al.* (1988): 10 µL da suspensão celular previamente obtida foram misturados à agarose low melting point 0,5% (Promega), postos sobre uma lâmina e cobertos com uma lamínula. Estas foram imersas em uma solução de lise gelada (NaCl 12,5 M, EDTA 100 mM, Tris 10 mM, SDS 1%, pH 10, com 1% Triton X-100 e 10% DMSO) e permaneceram a 4°C overnight. Este procedimento remove o citoplasma e a maior parte das proteínas nucleares, deixando o DNA *supercoiled* em um formato nucleóide. A presença de quebras no DNA relaxa a espiralização do DNA e a subsequente eletroforese alcalina relaxa ainda mais as alças do DNA, que ficam, após a eletroforese, com aspecto de um cometa. O tamanho da cauda de cometa reflete a extensão das rupturas das hélices de DNA e pode ser quantificado por métodos de intensificação de imagem e análise computacional.

Após análise, as lâminas foram expostas a um tampão alcalino (EDTA 1 mM, NaOH 300 mM, pH ~ 13,4) por 40 min a 4°C. A eletroforese foi realizada neste tampão a 4°C por 30 minutos a 25V e 300 mA. Após a corrida as lâminas foram neutralizadas (0,4 M Tris, pH 7,5), coradas com SYBR Safe™ (Invitrogen) e observadas em microscópio de fluorescência. As células foram analisadas usando o software Komet 5.5 (Kinetic Imaging, USA).

A análise de dados foi realizado de acordo com o método descrito por Pool-Zabel *et al.* (1994).

6. Análise estatística

Foram utilizados ANOVA e teste de Tukey para verificar se há diferença no teor de compostos bioativos extraídos das amostras de guaraná em pó com solventes diferentes e na atividade antioxidante das mesmas. O teste de Kolmogorov-Smirnov foi utilizado para verificações de aderência à curva normal nas análises dos resultados *in vivo*. As comparações das variáveis com pressuposição de distribuição normal para as amostras pareadas foram baseadas no teste “t” de Student. Em todas as conclusões obtidas foi utilizado o nível de significância menor ou igual a 5%. Para todos estes cálculos estatísticos, foi utilizado o programa SPSS versão 16.0 for Windows.

7. Resultados

ESTUDO *IN VITRO*

7.1. Composição proximal do guaraná em pó

A composição proximal exprime de forma geral, o valor nutritivo de um alimento e corresponde à proporção dos grupos homogêneos de substâncias presentes em 100g do alimento considerado (Lima & Carvalho, 1998).

Os teores de umidade, proteína, lipídios, carboidratos e cinzas das amostras analisadas estão descritos na **Tabela 1**.

Tabela 1. Composição proximal do guaraná em pó em base úmida.

Nutriente	Valor por 100 g
Umidade	4,25 ± 0,20
Proteínas	12,84 ± 0,13
Lipídios	2,85 ± 0,21
Carboidratos	78,41 ± 0,45
Cinzas	1,65 ± 0,11

Os valores são médias ± desvio padrão; n=9

No valor analisado por 100g, nota-se maior conteúdo de carboidratos na composição proximal do guaraná em pó.

7.2. Quantificação de compostos fenólicos totais nas amostras de guaraná em pó

O cálculo do teor de fenólicos foi realizado a partir da equação da reta obtida pela elaboração da curva padrão do ácido gálico com 5 concentrações (0,004 a 0,008 mg/mL).

Os teores de compostos fenólicos das amostras extraídas pelos métodos 1 e 2 encontram-se na **Tabela 2**, expressos em mg/g de amostra, todos em valores equivalentes de ácido gálico (EAG).

Nota-se que as amostras apresentaram maior teor de compostos bioativos quando a extração foi realizada pelo método 1, uma vez que dentre os 4 solventes utilizados, 3 deles (acetona 35%, etanol 60% e água) apresentaram maior eficiência na extração de compostos bioativos por esse método.

A acetona 35% foi o solvente que extraiu maior quantidade de compostos fenólicos, independente do método de extração.

Não houve diferença estatística entre o teor médio de compostos fenólicos nas amostras extraídas com metanol pelo método 1 e o teor médio das amostras extraídas com água pelo método 2 ($p=0,834$). O mesmo ocorreu para as amostras extraídas com metanol pelo método 2 e as amostras extraídas com água pelo método 1 ($p=0,160$).

Tabela 2 – Teores médios e desvio padrão de fenólicos totais da amostra de guaraná em pó segundo metodologia de extração e solvente utilizado*.

Método de Extração	Solvente	Fenólicos totais (mg EAG**/ g de guaraná)
1	Metanol	29,50±3,39 ^a
	Acetona 35%	151,79±9,90 ^f
	Etanol 60%	128,95±2,65 ^e
	Água	46,74±2,16 ^b
2	Metanol	40,65±2,89 ^b
	Acetona 35%	119,86±5,17 ^d
	Etanol 60%	100,46±5,70 ^c
	Água	32,82±0,90 ^a

Os valores são médias ± desvio padrão; n=9

Para cada tipo de extrato, letras diferentes na mesma coluna representam diferença estatisticamente significativa ($p<0,05$).

*n=9

** Equivalentes de Ácido Gálico

Foi observado também que as amostras extraídas pelo método 1, realizado nas mesmas condições de extração do método proposto por Mahjenic *et al.* (2007), apresentaram conteúdo superiores de compostos bioativos (em mg de EAG/ g de resíduo seco) do que o apresentado pelos autores citados. Para o método 2, realizado com tempo diferente de agitação e uso de ultrassom também foi verificado maior conteúdo de compostos fenólicos em relação aos dados relatados por Mahjenic *et al.* (2007) (**Figura 10**).

Figura 10. Teor de compostos fenólicos totais do guaraná em pó obtidos pelo método 1, método 2 e por Majhenic *et al.* (2007).

7.3. Avaliação da atividade antioxidante *in vitro* dos extratos pelo ensaio do DPPH

Depois de quantificado o teor de fenólicos totais, determinou-se a atividade antioxidante das amostras extraídas com os solventes metanol, acetona

35%, etanol 60% e água pelo ensaio do radical DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil).

De acordo com os dados apresentados na **Figura 11**, nota-se que as amostras extraídas pelo método 1, independente do solvente utilizado, apresentaram maior percentual de inibição.

Em relação ao solvente de extração, foi observado que as amostras extraídas com os solventes acetona 35% e etanol 60% apresentaram os maiores valores de percentual de inibição, independente do método de extração utilizado. As amostras extraídas com água destilada, para os dois métodos de extração avaliados, apresentaram menor percentual de inibição pelo ensaio DPPH.

Figura 11. Percentual de inibição dos extratos pelo método DPPH^{*}, segundo metodologia de extração e solvente utilizado.

ANÁLISES *IN VIVO*

7.4. População de estudo e casuística

Inicialmente foram selecionados 25 voluntários de ambos os sexos por meio de pesquisa de prontuários para realização de análises bioquímicas e entrevista. Desses, 2 (13,33%) não foram encontrados devido a número de telefone desatualizado no prontuário; 2 (13,33%) não se encaixaram dentro dos critérios de inclusão e 2 (13,33%) recusaram-se a participar da pesquisa. Dentre aqueles que aceitaram participar da triagem (n =19), 4 pacientes foram excluídos pois os resultados das análises bioquímicas não se encaixaram dentro dos critérios de inclusão. Dos 15 pacientes incluídos na pesquisa, um foi excluído por sentir tontura durante a primeira coleta de sangue e dois desistiram da participação no estudo durante a intervenção (**Figura 12**).

As recusas e desistências tiveram os seguintes motivos: dificuldade de comparecer no horário da coleta de sangue, impossibilidade para permanecer no hospital durante a coleta (aproximadamente 2h em cada encontro) e recomendação de médico de rede particular para uso de medicação hipolipemiante.

Figura 12. Fluxograma exclusão e inclusão de voluntários no estudo.

7.5. Caracterização da população estudada

As médias das variáveis de idade, peso, IMC, lipídios plasmáticos, glicemia de jejum, CC1 e CC15 da população estudada estão descritas na **Tabela 3**. A idade dessa população variou entre 24 e 63 anos, sendo que apenas um voluntário era do sexo masculino. O IMC variou de 25,68 a 33,79 kg/m². Foi observada média de CC de 99,60 11,60cm para mulheres e o participante do sexo masculino apresentou CC de 98 cm; esses valores estão acima das recomendações preconizadas pela OMS (OMS, 2000).

Tabela 3. Caracterização da População Estudada.

	Valores
Número de Indivíduos	12
Sexo	
M	1
F	11
Idade (anos)	44,58 ± 13,51
Peso (kg)	75,32 ± 10,56
IMC (kg/m²)	29,74 ± 2,94
CC (cm)	
M	98,00
F	99,60 ± 11,80
Glicemia de jejum (mg/dl)	91,18 ± 7,67
CT (mg/dl)	221,82 ± 26,97
LDL-C (mg/dl)	134,00 ± 28,41
HDL-C (mg/dl)	51,73 ± 13,20
TG (mg/dl)	173,91 ± 99,31

Valores expressos como média ± desvio padrão

M = masculino, F = feminino; IMC = índice de massa corpórea;

CC = circunferência da cintura, CT = colesterol total; LDL-C = lipoproteína de baixa densidade; HDL-C: lipoproteína de alta densidade;

TG: triglicérides.

7.6. Consumo alimentar dos voluntários

A partir dos dados coletados nos recordatórios alimentares R1 e R15 foi realizada a avaliação do consumo alimentar dos voluntários. O consumo de energia, carboidratos, lipídios, vitamina C, ferro, cobre e zinco apresentou redução que, no entanto, não foi significativa. O consumo de carboidratos permaneceu estável (Tabela 4).

Tabela 4. Consumo alimentar da população de estudo no primeiro e no décimo quinto dia de intervenção.

Nutriente	R1	R15	p ¹
Energia (Kcal)	1311,56 ± 541,55	1263,38 ± 545,44	0,605
Carboidratos (g)	190,78 ± 77,79	190,92 ± 94,40	0,991
Proteínas (g)	51,56 ± 31,37	49,01 ± 24,83	0,775
Lipídios (g)	39,02 ± 13,93	34,08 ± 15,15	0,188
AG saturados (g)	10,25 ± 6,83	9,30 ± 5,95	0,596
AG monoinsaturados (g)	8,77 ± 5,03	7,93 ± 5,04	0,528
AG poliinsaturados (g)	4,29 ± 2,55	3,85 ± 2,72	0,613
Vitamina C (mg)	81,62 ± 62,79	73,12 ± 62,97	0,738
Ferro (mg)	8,87 ± 5,94	5,7 ± 2,85	0,072
Cobre (mg)	0,81 ± 0,68	0,49 ± 0,33	0,133
Zinco (mg)	4,35 ± 2,98	3,80 ± 0,33	0,552
Manganês (mg)	1,41 ± 0,93	1,97 ± 3,00	0,473

R1: Recordatório alimentar de 24h coletado no 1º de intervenção

R15: Recordatório alimentar de 24h coletado no 15º dia de intervenção

AG: ácidos graxos

Kcal: quilocalorias

p¹: Valor obtido pelo teste “t” pareado

Depois de calculado o consumo alimentar da população de estudo, verificou-se a adequação dos mesmos de acordo com as recomendações da DRI (2001). O consumo de macronutrientes estava adequado nos dois recordatórios avaliados. Nota-se, no entanto, que o consumo de Ferro, Cobre, Zinco e Manganês

está abaixo das recomendações preconizadas.

7.7. Variação do perfil lipídico

Na **Tabela 5** está demonstrado o perfil lipídico da população de estudo ao longo da intervenção. O consumo de guaraná em pó não alterou significativamente os parâmetros avaliados após 1h da ingestão da primeira dose de guaraná, quando comparado aos valores da coleta de jejum desse mesmo dia ($G1 = J1$; $p > 0,05$). Também não foram observadas diferenças estatísticas entre os parâmetros do perfil lipídico após uma hora da ingestão no 15º dia de intervenção e o jejum desse mesmo dia ($J15 = G15$; $p > 0,05$).

Tabela 5. Variação do perfil de lipídios plasmáticos durante a intervenção.

	J1	G1	J15	G15	p ¹		
	(mg/dl)				(J1,G1)	(J15,G15)	(J1,J15)
CT	221,8 ± 26,9	219,9 ± 25,6	211,00 ± 37,4	212,0 ± 35,3	0,410	0,533	0,88
LDL- C	134,0 ± 28,4	134,0 ± 26,5	129,0 ± 36,1	129,0 ± 37,8	1,000	0,878	0,514
HDL –C	51,7 ± 13,2	51,6 ± 12,9	49,6 ± 11,3	49,6 ± 11,7	0,884	0,839	0,180
TG	173,9 ± 99,3	166,7 ± 94,9	158,6 ± 70,0	164,2 ± 74,8	0,389	0,151	0,391

Valores expressos como média ± desvio padrão

p¹: Valor obtido pelo teste “t” pareado

CT = colesterol total

LDL-C = lipoproteína de baixa densidade

HDL-C: lipoproteína de alta densidade

TG: triglicérides

7.8. Monitoramento da peroxidação lipídica na LDL

O ensaio de dienos conjugados com as amostras de LDL isoladas foi inicialmente realizado em espectrofotômetro (Shimadzu modelo UV – 1650 PV), de acordo com metodologia proposta por Esterbauer *et al.* (1989), com modificações. Foi observado que todas as amostras de voluntários diferentes isoladas e cuja cinética da oxidação da LDL foi continuamente monitorada pela medida da formação de

dienos conjugados no mesmo dia apresentaram *lag time* de oxidação semelhante. No entanto, amostras do mesmo voluntário que foram isoladas e analisadas em dias diferentes apresentaram uma variação que impossibilitava a comparação dos dados.

Alguns estudos que avaliaram a resistência da LDL à oxidação pelo método de dienos conjugados relatam que o plasma dos voluntários foi isolado e armazenado em temperaturas inferiores a -70°C , sendo que o isolamento da LDL somente foi realizado após descongelamento do mesmo (Tijburg *et al.*, 1997; van Het Hof *et al.*, 1997; Princen *et al.*, 1998; Cole *et al.*, 1999; Miura *et al.*, 2000; Cartron *et al.*, 2003; Vigna *et al.*, 2003; McPherson *et al.*, 2007).

Em vista do volume insuficiente de plasma armazenado em freezer a -80°C para novo isolamento da LDL dos voluntários foi realizado um novo teste no laboratório de Bromatologia da Faculdade de Saúde Pública (pesquisadores responsáveis: Carolina de Aguiar Martins, Lina Yonekura, Marcela P. Monteiro) ao término da intervenção com as amostras de LDL que não haviam sido utilizadas no primeiro ensaio de dienos conjugados e que estavam armazenadas em freezer a -80°C .

O novo ensaio foi padronizado para leitor de placas, uma vez que esse equipamento possibilita a análise de maior número de amostras em cada teste realizado. Amostras coletadas em diferentes datas e com diferentes tempos de armazenamento em freezer a -80°C (15, 20 e 21 semanas) foram descongeladas e analisadas no mesmo dia e em uma única placa. As amostras de LDL foram diluídas em PBS sem EDTA (NaCl 13mM, 0,27mM KCl 0,27mM, KH_2PO_4 0,18mM, Na_2HPO_4 0,8mM) para uma concentração final de 100 μg de proteína/mL. Logo após a diluição, as amostras foram filtradas em unidade filtrante não estéril 0,22 μm (Millipore). Em microplaca UV Star da Greiner Bio-one (96 cavidades; fundo plano; cor natural) foram pipetados 100 μl de amostra diluída e 300 μl de CuSO_4 50 μM para iniciar a oxidação.

Não foram observadas diferenças no *lag time* de oxidação entre amostras do com diferentes tempos de congelamento (15, 21 e 22 semanas) avaliadas no mesmo dia, indicando que o tempo de estocagem não interferiu nesse parâmetro (dados ainda não publicados) e que a análise de diferentes amostras no mesmo dia possibilita comparação dos resultados.

Assim, todas as amostras de LDL armazenadas em freezer a -80°C foram descongeladas e analisadas pelo ensaio de dienos conjugados no mesmo dia em leitor de placas, sendo que o tempo de armazenamento das amostras em freezer variou entre 2 e 6 meses, de acordo com a data da coleta de cada amostra. Além disso, tomou-se o cuidado de utilizar os mesmos reagentes para análise de todas as amostras.

A partir dos resultados do monitoramento da peroxidação lipídica na LDL pelo ensaio de dienos foi verificado aumento significativo na média de *lag time* de oxidação das amostras, tanto após uma hora de ingestão da primeira dose de guaraná em pó, quanto após uma hora do consumo da bebida no 15º dia de intervenção, quando comparadas às respectivas medidas de jejum ($G1 > J1$, $p = 0,013$; $G15 > J15$, $p = 0,044$).

Tabela 6. Variação do *lag time* de oxidação durante a intervenção.

<i>Lag Time</i> (min)					p^1	
J1	G1	J15	G15	(J1,G1)	(J15,G15)	(J1,J15)
95,2 ± 25	102,1 ± 25	94,8 ± 25	99,2 ± 26	0,013	0,044	0,872

Valores expressos como média ± desvio padrão, $n=12$.

p^1 : Valor obtido pelo teste “t” pareado

Nota-se, no entanto, que mesmo após doses repetidas durante 14 dias de intervenção, não houve influência no *lag time* de oxidação no jejum do último dia de intervenção quando comparado ao jejum do *baseline* ($J1 = J15$; $p = 0,872$).

7.9. Medida do perfil antioxidante total do plasma (TAS)

O perfil de antioxidantes totais no plasma (TAS) nos momentos avaliados está apresentado na **Tabela 7**. Nesse estudo não foi evidenciado efeito agudo no TAS pelo consumo de guaraná em pó, uma vez que não foi observada diferença significativa desse parâmetro ao comparar o *baseline* com o consumo após 1h da

primeira dose de guaraná (J1 = G1; $p=0,748$). Além disso, esse parâmetro também não foi alterado após 1h do consumo de guaraná no 15º dia da intervenção (G15 = J15; $p=0,411$).

Da mesma forma, nota-se que não houve efeito do consumo de guaraná após doses repetidas durante 14 dias de intervenção, uma vez que o TAS do jejum do último dia de intervenção não apresentou diferença significativa quando comparado ao jejum do *baseline* (J1 = J15; $p=0,252$).

Tabela 7. Variação do perfil antioxidante total do plasma durante a intervenção.

TAS (mmol/l)				p^1		
J1	G1	J15	G15	(J1,G1)	(J15,G15)	(J1,J15)
$2,04 \pm 0,15$	$2,09 \pm 0,09$	$2,02 \pm 0,09$	$2,05 \pm 0,12$	0,748	0,411	0,252

Valores expressos como média $\pm$ desvio padrão, $n=12$

p^1 : Valor obtido pelo teste “t” pareado

7.10. Teste da capacidade de absorbância de radical oxigênio (ORAC)

Os resultados de capacidade do ORAC no plasma indicam que houve efeito agudo nesse parâmetro pelo consumo de guaraná, uma vez que foram observados aumento significativos desse parâmetro tanto após uma hora de ingestão da primeira dose de guaraná em pó quanto após uma hora do consumo da bebida no 15º dia de intervenção, quando comparadas às respectivas medidas de jejum ($G1>J1$, $p=0,001$; $G15>J15$, $p=0,004$) (**Tabela 8**).

Tabela 8. Variação da capacidade de absorvência de radical oxigênio durante a intervenção.

ORAC (μ M de equivalentes de Trolox)					p^1	
J1	G1	J15	G15	(J1,G1)	(J15,G15)	(J1,J15)
12574,6	16104,5	12111,3	15720,8	<0,001	0,004	0,075

Valores expressos como média $\pm$ desvio padrão, n=12

p^1 : Valor obtido pelo teste “t” pareado

No entanto, após intervenção com doses repetidas durante 14 dias, não houve influência nesse parâmetro no jejum do último dia de intervenção quando comparado ao jejum do *baseline* (J1 = J15; $p = 0,075$). Este dado sugere não haver efeito residual pelo consumo de guaraná.

7.11. Avaliação da atividade das enzimas antioxidantes

As médias de atividade das enzimas antioxidantes SOD, GPx e Cat estão descritas na **Tabela 9**.

Foi observada uma tendência de aumento na atividade da SOD no jejum do último dia de intervenção quando comparada a sua atividade no *baseline*, mas esse efeito não foi significativo (J15 = J1; $p = 0,198$). Nota-se também que o consumo de guaraná em pó não apresentou efeito agudo sobre a atividade da SOD, uma vez que esse parâmetro não foi alterado significativamente após uma hora de ingestão da primeira dose da bebida e nem após 1 hora do consumo no 15º dia de intervenção (J1 = G1; J15 = G15; $p > 0,05$).

Tabela 9. Variação da atividade das enzimas antioxidantes SOD, GPx e Cat dos voluntários durante a intervenção.

	J1	G1	J15	G15	p ¹		
					(J1,G1)	(J15,G15)	(J1,J15)
SOD (U/g Hb)	1502,4 ± 259,1	1628,2 ± 220,8	1615,6 ± 198,1	1732,8 ± 109,2	0,165	0,953	0,198
GPx (U/g Hb)	47,2 ± 14,6	48,0 ± 14,3	52,8 ± 13,6	55,8 ± 13,1	0,258	0,006	<0,001
Cat (U/g Hb)	1425,0 ± 160,6	1577,0 ± 170,2	1600,9 ± 131,9	1732,8 ± 109,2	0,001	<0,001	0,001

Valores expressos como média ± desvio padrão, n=12.

p¹: Valor de p obtido pelo teste “t” pareado

O consumo de uma única dose de guaraná não influenciou a atividade da enzima GPx no tempo G1, mas aumentou significativamente a atividade da enzima no tempo G15 (J1 = G1, p = 0,258; G15 > J15, p = 0,006).

Foi verificado aumento na atividade da GPx e da Cat dos voluntários no jejum do 15º dia de intervenção em relação ao *baseline* (J15>J1; p<0,05).

A atividade da Cat aumentou significativamente tanto após uma hora de ingestão da primeira dose de guaraná em pó quanto após uma hora do consumo da bebida no 15º dia de intervenção, quando comparadas às respectivas medidas de jejum (G1>J1, p = 0,001 ; G15>J15, p = 0,001).

7.12. Ensaio Cometa

Os resultados do efeito da intervenção sobre níveis de danos oxidativos ao DNA dos linfócitos dos voluntários analisados por meio do ensaio cometa para avaliar a extensão de rupturas das hélices de DNA estão descritos na **Tabela 10**.

Tabela 10. Efeito da intervenção com guaraná em pó nos níveis de danos oxidativos ao DNA dos voluntários avaliados pelo Ensaio Cometa.

Danos ao DNA					p ¹	
J1	G1	J15	G15	(J1,G1)	(J15,G15)	(J1,J15)
0,98±0,19	0,93±0,21	0,92±0,27	0,84±0,18	0,556	0,425	0,514

Os valores representam a média do *tail moment* (TM) ± desvio padrão de 100 células, n=12.

p¹: Valor de p obtido pelo teste “t” pareado

Não foi observada diferença significativa nos níveis de dano ao DNA quando comparado os dados de *baseline* e da coleta após 1h do consumo da primeira dose de guaraná (J1=G1; p = 0,556). O dano oxidativo ao DNA no momento G15 não foi influenciado após 1h do consumo de guaraná no 15º dia (J15 = G15; p = 0,425).

A avaliação do dano oxidativo após consumo de doses repetidas não revelou efeito residual pelo consumo de guaraná, uma vez que não houve alteração significativa na extensão da cauda do cometa no jejum do último dia de intervenção quando comparada ao jejum do *baseline* (J15 = J1; p =0,514).

Avaliou-se também a resistência ao ataque induzido *ex vivo* por H₂O₂ como indicador da capacidade antioxidante. Estes resultados estão descritos na **Tabela 11**.

Tabela 11. Efeito da intervenção com guaraná em pó nos níveis de danos oxidativos ao DNA dos voluntários induzido por H_2O_2 e avaliados pelo Ensaio Cometa.

Danos ao DNA induzidos por 100 μ M de H_2O_2					p^1	
J1	G1	J15	G15	(J1,G1)	(J15,G15)	(J1,J15)
1,39 $\pm$ 0,28	1,25 $\pm$ 0,23	1,21 $\pm$ 0,29	1,08 $\pm$ 0,30	0,003	0,003	0,219

Os valores representam a média do *tail moment* (TM) $\pm$ desvio padrão de 100 células, n=12.

p^1 : Valor de p obtido pelo teste “t” pareado

O consumo de doses repetidas de guaraná por período de 15 dias não influenciou o dano oxidativo ao DNA induzido por H_2O_2 no jejum do 15º dia (J15 = J1, $p = 0,219$). Com relação ao consumo agudo, os dados indicam que houve efeito pelo consumo do guaraná, uma vez que a redução dos níveis de dano ao DNA induzidos por H_2O_2 foi significativa tanto após uma hora de ingestão da primeira dose da bebida quanto após uma hora do consumo no 15º dia (J1 > G1, $p = 0,003$; J15 > G15; $p = 0,003$).

7. DISCUSSÃO

ANÁLISES IN VITRO

7.1. Composição proximal do guaraná em pó

A composição proximal exprime de forma geral, o valor nutritivo de um alimento e corresponde à proporção dos grupos homogêneos de substâncias presentes em 100g do alimento considerado (Lima & Carvalho, 1998).

Em estudo que avaliou a polpa, casca e semente de frutas do cerrado, foi relatado que as sementes das frutas apresentaram elevado teor de proteínas. Os autores relataram que a semente de lobeira apresentou 13,4% (m/m) de proteínas e 3,7% (m/m) de lipídios (Roesler *et al.*, 2007).

Na Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TACO, 2006) os valores de carboidratos e proteínas para amostras de café em pó são similares aos encontrados nas amostras de guaraná em pó: 66% e 15%, respectivamente.

Silva *et al.* (2007) encontraram valores de carboidratos e proteínas em amostras de café em pó similares aos das amostras de guaraná em pó: 62,92 e 15,75g/100g de amostra.

Os resultados da composição proximal de sementes *in natura* e sementes torradas e moídas (como é o caso do café em pó) e os resultados do presente estudo com semente de guaraná torrada e moída sugerem que esta parte dos alimentos apresenta predominância de carboidratos na composição nutricional.

7.2. Quantificação de compostos fenólicos totais no guaraná em pó

As diferentes classes de compostos existentes nas plantas apresentam diferentes polaridades, fato que possibilita selecionar a extração de substâncias ou classes que possuem atividade biológica de interesse dependendo do sistema extração/solvente escolhido (Maciel *et al.*, 2002; Cechinel & Yunes, 1998).

Embora a bebida utilizada no estudo *in vivo* tenha sido preparada pela adição de água às amostras, sabe-se que o tipo de solvente utilizado na extração (Ou *et al.*, 2001; Gray *et al.*, 2002; Yu *et al.*, 2002; Sun Ho, 2005; Yilmaz *et al.*, 2006 ; Chan *et al.*, 2009) e a polaridade do mesmo (Canadanovic-Brunet *et al.*, 2006; Turkmen *et al.*, 2006) podem afetar o rendimento da extração, e conseqüentemente, o conteúdo de compostos de interesse, o que justifica a extração dos compostos das amostras de guaraná do presente estudo com solventes de diferentes polaridades.

Os polifenóis são usualmente extraídos por solventes como água, metanol (Yilmaz *et al.*, 2006; Chan *et al.*, 2009), etanol (Bazykina *et al.*, 2002; Yu *et al.*, 2003; Rockenbach *et al.*, 2006 ; Spigno *et al.*, 2007; Rusak *et al.*, 2008 ; Chan *et al.*, 2009) e acetona (Ou *et al.*, 2001; Rockenbach *et al.* (2006) ; Turkmen *et al.*, 2007; Chan *et al.*, 2009) ou uma mistura desses solventes, em diferentes concentrações, uma vez que as moléculas que contém um radical glicosídeo são solúveis em água e as agliconas (polifenóis sem a molécula de açúcar) que são menos polares, são mais solúveis em outros solventes. Logo, a combinação de solventes pode ser empregada visando maior especificidade de cada um e aumento do rendimento da extração que dependerá da polaridade dos polifenóis presentes na amostra, bem como do grau de polimerização e da interação com outros constituintes da matriz alimentar (Escribano-Bailón & Santos-Buelga, 2003).

Além do tipo de solvente, o método escolhido também tem relação direta na eficiência da extração dos compostos de interesse (Goli *et al.*, 2004). Muitos trabalhos relatam que temperaturas mais elevadas aumentam a solubilidade dos compostos fenólicos no solvente de extração, mas este incremento também pode degradá-los durante o processo (Iversen *et al.*, 1999; Skrede *et al.*, 2000; Cacace *et al.*, 2003). Em experimento realizado por Majhenic *et al.* (2007) os autores concluíram que a temperatura não influencia na extração dos compostos fenólicos do guaraná, o que justifica a utilização apenas de temperatura ambiente na extração das amostras do presente estudo.

Os solventes que apresentaram melhor rendimento para a extração de compostos fenólicos das amostras de guaraná em pó avaliadas foram acetona e etanol.

Possivelmente, tal fato pode ser atribuído à polaridade dos solventes testados, visto que a acetona extrai compostos de polaridade intermediária (Vizzoto & Pereira, 2009). Além disso, alguns autores relatam que solventes de alta polaridade, como é o caso da água, não resultam em extrações eficientes (Liu *et al.*, 2000, Chirinos *et al.*, 2006), o que também é coerente com os resultados obtidos, uma vez que a água foi o solvente menos eficiente nos dois métodos avaliados. Portanto, é possível que os compostos fenólicos do guaraná apresentem características moderadamente polares e, conseqüentemente, mais solúveis em acetona, como é o caso das proantocianidinas, presentes em grande quantidade no guaraná (Majhenic *et al.*, 2007).

Corroborando com os resultados encontrados, Caetano *et al.* (2009) verificaram que, independente da temperatura empregada no processo de extração, a maioria dos compostos fenólicos presentes no resíduo agroindustrial de acerola foi solubilizada em acetona e etanol, sendo que a água foi o solvente menos eficiente na extração dos compostos fenólicos.

Esses resultados também estão de acordo com o estudo feito por Turkmen *et al.* (2006), onde amostras de chá preto (*Camellia sinensis* L.) e chá mate (*Ilex paraguariensis*) foram extraídas com água destilada, acetona em três concentrações (50%, 80% e 100%), etanol e metanol. Os autores concluíram que a acetona foi o solvente que extraiu a maior quantidade de polifenóis.

Rockenbach *et al.* (2006) extraíram os compostos fenólicos de amostras de bagaço das uvas tintas *Vitis vinifera*, var. *Tannat* e *Ancelota*, com os solventes etanol e acetona, em diferentes concentrações (0, 30, 50, 70 e 100%). Os autores também verificaram que a acetona foi o solvente mais eficiente na extração de compostos fenólicos das duas variedades de uvas analisadas. Segundo os autores, as características físico-químicas destes sistemas de solventes assemelham-se em maior grau às características da maioria dos compostos fenólicos presentes nas amostras que foram avaliadas.

Segundo Tabart *et al.*, (2007) a acetona e o metanol tem características específicas para a extração de substâncias fenólicas. Além disso, o metanol é o melhor solvente para a extração de catequinas, ao passo que um melhor rendimento de procianidinas é obtido com acetona, o que confirma os resultados do presente

estudo. As misturas de acetona e água são mais eficientes para extração de polifenóis de matrizes associadas a proteínas, uma vez que elas parecem degradar complexos formados por proteínas-polifenóis (Hussein, Fattah, & Salem, 1990; Kallithraka, Garcia Viguera, Bridle, & Bakker, 1995), o que permite maior extração dos compostos bioativos.

A água, considerada um solvente universal, apesar de não apresentar eficiência de extração quando empregada isoladamente, conforme citado anteriormente, em combinação com outros solventes orgânicos, contribui para criar um meio moderadamente polar favorecendo a extração de fenólicos (Naczki & Shahidi, 2004; Shi *et al.*, 2005) e, segundo alguns autores, essas misturas de solventes alcoólicos e água são mais eficientes do que um solvente puro no sistema de extração (Yilmaz & Toledo, 2006; Pinelo *et al.*, 2005).

A solubilidade dos compostos fenólicos em um determinado solvente é uma característica peculiar do fitoquímico, o que explica a inexistência de um procedimento universal e aponta para a necessidade de seleção criteriosa do método de extração para cada fonte natural de antioxidante. Neste sentido, considerando que nos vegetais há polifenóis com polaridade diversificada, recomenda-se o uso de solventes com diferentes polaridades de modo a garantir eficiência na extração destes constituintes (Naczki e Shahidi, 2004).

Jimoh *et al.* (2007) avaliaram o teor de compostos fenólicos de extratos metanólicos de folhas de *Paullinia pinata*, também da família Sapindaceae, e encontraram um valor médio de compostos fenólicos de 33,4 mg/g, em equivalentes de ácidos tânico. Este valor está próximo aos valores encontrados para o extrato metanólico obtido pelo método 1 com as amostras de *Paullinia cupana* do presente estudo.

Já Soong *et al.* (2004) compararam o teor de compostos fenólicos entre as partes comestíveis e as sementes de tamarindo e avocado. Foi verificado maior teor de compostos fenólicos nas sementes: $94,5 \pm 4$ mg EAG/g no tamarindo e $88,2 \pm 2,2$ mg EGA/g no avocado. Segundo os autores, as sementes possuem grande concentração desses compostos. Esses dados sugerem que o elevado conteúdo de compostos fenólicos encontrados no guaraná em pó tenha relação com a sua fonte: a semente do fruto *Paullinia cupana*. Em vista disso, muitas sementes poderiam ser utilizadas

como aditivos naturais, o que não ocorre, pois essa parte das frutas não recebe muita atenção quanto ao seu potencial antioxidante (Bagetti *et al.*, 2009) e suas aplicações comerciais.

Assim, o rendimento da extração depende do solvente utilizado (Ou *et al.*, 2001; Gray *et al.*, 2002; Yu *et al.*, 2002; Sun *et al.*, 2006), do método aplicado e das propriedades físico-químicas da matrix do alimento (Yu *et al.*, 2002).

7.3. Avaliação da atividade antioxidante *in vitro* dos extratos pelo ensaio do DPPH[•]

Entre os métodos químicos aplicados para determinar a capacidade antioxidante de um composto, o método DPPH[•] é um dos mais utilizados por ser considerado prático, rápido e estável (Espin *et al.*, 2000), além de apresentar resultados consistentes (Awika, Rooney *et al.*, 2003).

Este ensaio é baseado na habilidade dos compostos antioxidantes presentes na amostras em reduzirem o radical DPPH, processo que pode ocorrer pelo mecanismo de transferência de elétrons ou pela doação de hidrogênio ao radical (Foti *et al.*, 2004). A redução do DPPH[•] produz um decréscimo na absorbância a 515 nm pela perda de coloração roxa do radical (Pérez-Jimenez *et al.*, 2006).

O tipo de solvente utilizado na extração dos compostos fenólicos também refletiu nos resultados de DPPH, uma vez que as amostras extraídas com acetona e etanol, além de apresentarem maior conteúdo de compostos fenólicos, também foram aquelas que exibiram maior percentual de inibição, independente do método de extração, o que indica semelhança no perfil de resultados de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante pelo método DPPH[•].

Corroborando com estes dados, Tabart *et al.* (2007) avaliaram a atividade antioxidante de folhas e botões de groselha preta extraídas com diferentes solventes pelo método DPPH[•] e também concluíram que as amostras extraídas com acetona foram as mais eficientes no sequestro do radical.

Segundo Zhou & Yu (2004), mudanças na polaridade do solvente alteram a habilidade de dissolução de determinados grupos de compostos antioxidantes, afetando a transferência de elétrons e átomos de hidrogênio, que são os pontos

chaves na medida da capacidade antioxidante (Pérez-Jimenez *et al.*, 2006). Em estudo realizado por Pinelo *et al.* (2004) foi demonstrado que a polaridade do solvente tem influência inversamente proporcional à atividade antioxidante da amostra extraída por ele, uma vez que o etanol apresentou a melhor atividade pelo método do DPPH[•]. Assim, era esperado que as amostras de guaraná extraídas com o solvente de polaridade média (acetona a 35% e etanol a 60%) apresentassem maior atividade antioxidante pelo método DPPH[•] em virtude de seu maior conteúdo de compostos fenólicos.

Em trabalho recente com polpa, semente e casca de frutas do cerrado foi demonstrada associação significativa entre concentração de fenólicos totais e a capacidade de sequestrar radicais livres, visto que amostras com maior concentração de compostos bioativos apresentaram maior atividade antioxidante pelo método DPPH[•] (Roosler *et al.*, 2007). Segundo os autores, esses resultados sugerem relevante contribuição dos compostos fenólicos nesse método de avaliação de atividade antioxidante de alimentos.

A correlação entre fenólicos totais e a atividade antioxidante pode depender do método escolhido e das características hidrofóbicas ou hidrofílicas do sistema e dos antioxidantes testados (Barclay *B*, 1999; Pinelo *et al.*, 2004; Zhou *et al.*, 2004).

Desta forma, os resultados sugerem que a extração seletiva de antioxidantes naturais é de grande importância e necessária na avaliação da atividade antioxidante dos compostos de interesse pelo método DPPH[•].

ANÁLISES IN VIVO

7.4. Consumo alimentar dos voluntários

Uma vez que não foram observadas diferenças significativas entre o consumo alimentar dos voluntários no início e ao final do estudo, sugere-se que os resultados observados possam ser atribuídos à intervenção com o guaraná.

7.5. Variação do perfil lipídico

Diversos estudos prospectivos já demonstraram que elevadas concentrações de LDL-C são o maior fator de risco para doença cardiovascular (Grundy *et al.*, 2004). Nos indivíduos dislipidêmicos as partículas de LDL circulantes parecem estar mais expostas à oxidação do que em indivíduos normolipidêmicos e, portanto, a presença de elevado número de partículas lipoprotéicas com capacidade pró-inflamatória contribuiria para um aumento da disfunção endotelial e, conseqüentemente, elevação do risco cardiovascular (Yologlu *et al.*, 2005).

Alguns estudos de intervenção realizados com alimentos considerados fontes de compostos antioxidantes corroboram com dados desse estudo, no qual não houve influência da intervenção com guaraná no perfil de lipídios plasmáticos. Natella *et al.* (2002) não observaram efeito no perfil lipídico de voluntários saudáveis após 1h e 2h do consumo de 200mL de café (161 ± 9 mg de polifenóis em EAG/ xícara) ou chá preto (87 ± 9 mg de polifenóis em EAG/xícara). Em estudo realizado por van Heert Hof *et al.* (1997) também não foi observada alteração no perfil de lipídios plasmáticos de voluntários saudáveis após 4 semanas de consumo diário de 900mL (3 g de extrato seco/dia) de chá verde (21,4% de catequinas) ou chá preto (7,17% de catequinas). Ishikawa *et al.* (1997) também não observaram efeito no CT, TG e HDL-C de indivíduos saudáveis (n=14) após o consumo diário de 5 xícaras de chá verde por 4 semanas.

Está claro que os compostos presentes nos alimentos devem ser biodisponíveis de alguma forma para que possam exercer seus efeitos biológicos (Manach *et al.*, 2005). Grandes avanços nos últimos anos foram obtidos em relação ao conhecimento do mecanismo de absorção e metabolismo de polifenóis (Day *et al.*, 2001; Rowland *et al.*, 2003).

Estudos com animais sugerem que os compostos fenólicos são capazes de interagir com transportadores de colesterol presentes na borda em escova do intestino, impedindo que uma parte dos lipídios da dieta seja absorvida, o que reduziria a quantidade de colesterol nos quilomícrons remanescentes (Loest *et al.*, 2002; Conseil *et al.*, 1998; Leslie *et al.*, 2001, Pal *et al.*, 2005). A redução de substrato disponível poderia assim diminuir a produção e secreção da apolipoproteína responsável pelo transporte do colesterol até o fígado, a ApoB48 (Pal *et al.*, 2005), pois em condições onde não há substrato disponível para a produção de quilomícrons ela é degradada (Innerarity *et al.*, 1996).

Um estudo com ratos ovariectomizados para reproduzir modelo para a menopausa demonstrou que os compostos fenólicos de chá verde reduziram a absorção linfática do colesterol de forma dose-dependente (Loest *et al.*, 2002). Em estudos com células Caco-2 foi observada redução da secreção de ApoB48 após tratamento com vinho sem álcool e vinho com álcool (Takechi *et al.*, 2004; Pal *et al.*, 2005). Já em estudo com mulheres hipercolesterolêmicas na menopausa o consumo crônico de vinho tinto (400 mL) não produziu efeitos na apoB48 após 6 semanas de intervenção.

Blade *et al.* (2010), em revisão sobre efeitos hipolipemiantes das proantocianidinas, apontou que as diferenças no efeito das intervenções com extratos ou alimentos sobre a secreção de quilomícron são dependentes do conteúdo de proantocianidina, assim como da concentração e da composição de cada extrato. Outros autores observaram que os compostos fenólicos reduzem a esterificação do colesterol no enterócito (Stein *et al.*, 1999; Theriault *et al.*, 2000; Vidal *et al.*, 2005), etapa essencial para promover o aumento do gradiente de difusão a favor da sua entrada e incorporação na ApoB48 (Pahn *et al.*, 2001; Iqbal *et al.*, 2009). Vidal *et al.* (2005) sugerem que essa redução da esterificação do colesterol não está associada à modulação de expressão gênica das enzimas responsáveis por este processo – ACAT

1 (Acyl-CoA cholesterol acyltransferase 1) e ACAT 2 (Acyl-CoA cholesterol acyltransferase 2) - uma vez que os níveis de mRNA dessas enzimas não sofreram alterações após administração de procianidinas em células Caco-2. Nesse sentido, os compostos fenólicos poderiam interferir na fase de translação das proteínas precursoras de ACAT1 e ACAT 2 (Vidal *et al.*, 2005). Assim, a redução na absorção do colesterol levaria a alterações na homeostase do colesterol hepático, incluindo redução na secreção de lipoproteínas hepáticas como a VLDL e a LDL.

Ainda no estudo realizado por Vidal *et al.* (2005) foi demonstrado que o extrato de polifenóis de maçã apresentou efeito de dose-dependente na redução da esterificação do colesterol e na secreção de ApoB48 em células Caco-2/TC7 de humanos, o que contribuiu para o efeito hipolipemiante destes compostos *in vivo*. Estudos com células hepáticas HepG2 sugerem que os compostos fenólicos também podem agir no fígado inibindo a secreção de ApoB-100 (Pal *et al.*, 2003; Montagut *et al.*, 2009; Del Bas *et al.*, 2008), além de reduzir a atividade de enzimas relacionadas à biossíntese de ácidos graxos, TG e colesterol (Pal *et al.*, 2003; Del Bas *et al.*, 2008, Del Bas *et al.*, 2009). O mecanismo pelo qual os compostos fenólicos agem inibindo a atividade dessas enzimas ainda não foi elucidado, uma vez que os resultados de estudos com compostos fenólicos que avaliaram a atividade dessas enzimas são conflitantes e podem estar associados a diferenças entre as espécies de animais utilizadas e a dose de composto administrado (Blade *et al.*, 2010). Dentre as possíveis vias de atuação dos compostos fenólicos sugere-se que ocorra inibição na expressão gênica dessas enzimas (Del Bas *et al.*, 2008; Del Bas *et al.*, 2009). Ou ainda que atuem na mesma via utilizada por drogas que apresentam esse efeito sobre as enzimas relacionadas à biossíntese de lipídios: inibição da fase de translação (Chang *et al.*, 2001).

Em estudo duplo-cego com mulheres na menopausa que consumiram 36g de polifenóis liofilizados de uva por 4 semanas foram observadas reduções nas concentrações de TG, ApoB e LDL-C (Zern *et al.*, 2005). Os autores sugerem que os polifenóis da uva foram responsáveis pelas alterações observadas em vista da modificação no empacotamento da VLDL através da alteração na atividade das enzimas hepáticas e na secreção de apoB, acompanhadas da redução da esterificação do colesterol. Assim, uma redução na secreção de partículas de VLDL alterou a

concentração plasmática de TG, o que afetou o metabolismo lipoprotéico como um todo. Segundo Zern *et al.* (2005), uma redução da quantidade de substrato disponível teve efeito na cascata de delipidação, o que justifica a observada redução nos níveis de LDL-C.

Outros estudos sugerem ainda que compostos fenólicos da uva atuam inibindo a expressão de genes relacionados à síntese de TG no fígado (Del Bas *et al.*, 2008, Del Bas *et al.*, 2009).

Gomikawa *et al.* (2008) conduziram uma intervenção (n = 5) onde o delineamento do estudo incluiu o fracionamento do consumo de chá verde ao longo do dia: 1,5g de chá 3x/dia durante 2 semanas. Os autores verificaram redução nos níveis de CT e de LDL-C dos voluntários já na primeira semana de acompanhamento. Essa redução foi ainda mais significativa na segunda semana da intervenção (semana 0 < semana 2; p = 0,04).

Segundo Bladé *et al.* (2010), os trabalhos com modelos que utilizam células isoladas são os mais úteis quando o objetivo é identificar o mecanismo responsável pelo fenômeno observado. Além disso, apenas os estudos com animais demonstraram claramente o efeito positivo dos compostos fenólicos na redução dos lipídios plasmáticos (Le *et al.*, 2008; Del Bas *et al.*, 2009; Yin *et al.*, 2009). Já em estudos com humanos podemos encontrar influência positiva (Stein *et al.*, 1999; Vinson *et al.*, 2001; Devaraj *et al.*, 2002; Grassi *et al.*, 2005; Avellone *et al.*, 2006; Zern *et al.*, 2005; Naissides *et al.*, 2006; Castilla *et al.*, 2006; Pignatelli *et al.*, 2006; Jimenez *et al.*, 2008; Castilla *et al.*, 2008), neutra (Aviram *et al.*, 2000; Cordain *et al.*, 2000; Abu-Amsha *et al.*, 2001; Chou *et al.*, 2001; Freedman *et al.*, 2001; Wan *et al.*, 2001; Taubert *et al.*, 2003; Vigna *et al.*, 2003) ou negativa (De Rijke *et al.*, 1996) no metabolismo dos lipídios pelo consumo desses compostos. A diferença das doses, composição dos extratos e o tipo de alimento administrado seria uma das justificativas para os diferentes resultados encontrados em estudos com humanos, o que justifica a necessidade de maiores investigações a fim de determinar a dose mínima de cada composto para promover influência significativa na redução dos lipídios plasmáticos.

Além disso, nos estudos com humanos onde foi observado resultado positivo, observa-se que a dose de compostos fenólicos foi relativamente alta

comparada a quantidade consumida habitualmente (Wan *et al.*, 2001; Zern *et al.*, 2005; Naissides *et al.*, 2006; Jimenez *et al.*, 2008, Kar *et al.*, 2009) ou ainda que o delineamento do estudo realizou a intervenção com administração de várias doses ao longo do dia (Vinson *et al.*, 2001, Castilla *et al.*, 2008; Gomikawa *et al.*, 2008).

A proposta inicial do presente estudo foi avaliar o efeito antioxidante pelo consumo de uma dose que corresponde àquela recomendada em embalagens disponíveis para o consumidor. Assim o delineamento do estudo foi baseado nessas especificações.

Em vista dos efeitos dose-dependentes relatados em alguns estudos (Loest *et al.*, 2002; Vidal *et al.*, 2005), sugere-se que a dose de 3 g de guaraná em pó ($140,22 \pm 6,48$ mg de polifenóis) administrada aos voluntários do presente estudo não tenha sido suficiente para atuar no metabolismo do colesterol e promover redução significativa nos lipídios plasmáticos.

Além disso, de acordo com o exposto sobre a influência do delineamento do estudo quanto ao número de doses administradas ao longo do dia, sugere-se que o fracionamento da dose de guaraná em pó seja mais eficiente do que o consumo de uma única dose no dia.

Deve-se considerar ainda que elevadas concentrações de compostos fenólicos estejam associadas a possíveis efeitos citotóxicos em células do fígado, o que pode prejudicar os seus efeitos biológicos benéficos (Schmidt *et al.*, 2005), reforçando assim a necessidade de mais estudos sobre a dose de guaraná em pó necessária para atuar na redução dos lipídios plasmáticos.

7.6. Oxidação da LDL

Os resultados do presente estudo indicam que o guaraná em pó apresentou efeito agudo no *lag time* de oxidação da LDL após uma hora do consumo da bebida, tanto no 1º quanto no 15º dia da intervenção.

Semelhante resultado foi encontrado por Hodgson *et al.* (2000). Os autores realizaram intervenção com 20 voluntários saudáveis do sexo masculino com idade entre 35 e 73 anos. Amostras foram coletadas no *baseline* e 60 minutos após a

ingestão de infusão de chá preto (7,6 g de folhas em 400 mL de água quente). O chá preto aumentou significativamente o *lag time* de oxidação em $5,4 \pm 2,9$ min quando comparado com o controle (água).

Já em relação à intervenção com doses repetidas, o guaraná não apresentou o efeito sobre a oxidação da LDL, visto que não houve alteração significativa no *lag time* de oxidação no jejum do 15º dia em relação ao *baseline*.

Esses resultados corroboram com o estudo de van Heert Hof *et al.* (1997). Os autores não observaram efeito no *lag time* de oxidação em intervenção com 900 ml (3 g de extrato seco/dia) de chá verde (21,4% de catequinas) ou chá preto (7,17% de catequinas) em 48 voluntários que consumiram as bebidas a bebida diariamente por um período de 4 semanas. Os autores sugerem que as concentrações de flavonóides presentes no plasma após consumo da bebida eram provavelmente menores do que a quantidade necessária para produzir tal efeito.

Efeito no *lag time* de oxidação da LDL pelo consumo de doses repetidas de compostos fenólicos foi relatado por Miura *et al.* (2000). O delineamento da intervenção incluiu o consumo de polifenóis de chá verde de forma fracionada no dia: 300 mg de polifenóis de chá verde (equivalente a 740 mL de chá) na forma de suplemento antes do café da manhã e 300 mg de polifenóis de chá verde antes do jantar. Foi observado que o *lag time* de oxidação teve aumento significativo de 13,7 minutos ao final do experimento.

Uma das hipóteses para explicar o mecanismo pelo qual os compostos fenólicos exercem proteção a LDL é a formação de um complexo entre os polifenóis e o cobre adicionado durante a catálise da peroxidação lipídica da partícula. Acredita-se que radicais livres gerados pela reação de Fenton na reação de oxidação mediada por cobre, como no ensaio de dienos, são inicialmente neutralizados pelos antioxidantes presentes na interface água-lipídio da LDL, incluindo a vitamina E da partícula (Halliwell *et al.*, 1989; Halliwell *et al.*, 1990; Viana *et al.*, 1996). Apesar da solubilidade dos lipídios, é o grupo OH dos compostos fenólicos que interage com essa interface. Somente após o consumo dos antioxidantes exógenos é que os ácidos graxos e outros lipídios da membrana da LDL são oxidados (Viana *et al.*, 1996), o que prolonga o tempo de início de oxidação da partícula.

Em estudo recente de Koren *et al.* (2010) os autores demonstraram que os compostos fenólicos apresentam a capacidade de ligar-se a superfície de eritrócitos e, possivelmente a outras células do sangue como plaquetas e linfócitos, o que permite ao complexo formado atuar como depósito dessas substâncias e também promover aumento na capacidade antioxidante do sangue. A capacidade de ligação dos polifenóis à superfície dos eritrócitos foi confirmada pelos autores por microscopia confocal, onde foi possível observar que os quatro polifenóis marcados por técnica de fluorescência (resveratrol, morin, curcuma e ácido tânico) ligaram-se aos eritrócitos (**Figura 13**).

Figura 13. Imagens em microscópio confocal de eritrócitos não tratados (a) e eritrócitos incubados com morin (b), resveratrol (c), curcumina(d) e ácido tânico (e). Fonte: Koren *et al.*, 2010.

De acordo com esses dados sugere-se o aumento no *lag time* de oxidação da LDL após consumo de uma única dose da bebida tenha sido pela ligação dos compostos fenólicos do guaraná à superfície da LDL, prolongando assim o início da oxidação da partícula.

As propriedades biológicas dos compostos fenólicos dependem da sua biodisponibilidade no plasma após atravessarem a barreira intestinal (Scalbert *et al.*, 2000). Dados sobre a absorção e farmacocinética dos compostos fenólicos do guaraná em pó não foram avaliados no presente estudo. No entanto, dados de outros estudos sobre o metabolismo desses compostos relatam que seu aparecimento no plasma ocorre de 1 a 7 horas após a sua ingestão, dependendo da sua estrutura química e que esses, geralmente encontram-se conjugados com o ácido glucurônico ou como compostos sulfatados e metilados (Manach *et al.*, 2004; Nardini *et al.*, 2002; Scalbert *et al.*, 2005). Manach *et al.* (2005) realizaram levantamento bibliográfico de

97 estudos sobre a cinética e a extensão da absorção de compostos fenólicos. Segundo os autores, catequinas, ácido gálico e flavonóides não se acumulam no plasma em quantidades significativas após consumo de doses repetidas em virtude de seu rápido metabolismo e curta meia-vida.

A meia-vida de isoflavonas é em torno de 4 a 8h (Cassidy *et al.*, 2000; Setchell *et al.*, 2003; Shelnutt *et al.*, 2000) e da quercetina em torno de 11 a 28 horas (Graefe *et al.*, 2001). Compostos como antocianinas apresentam meia-vida em torno de 2h (Cao *et al.*, 2001) e flavonóis aproximadamente 2 a 3h (Bell *et al.*, 2000; Hollman *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2002).

Em estudo realizado por Ziegler *et al.* (2005) não foi observado efeito na oxidação da LDL 24h, 48h, 72h e 96h após o consumo de 300ml de um dos 4 tipos de vinhos avaliados (3 marcas de vinhos tintos e uma marca de vinho branco) em voluntários saudáveis (idade = 27 ± 5 anos; IMC médio = 22 ± 2 kg/m²). Segundo os autores, a concentração dos flavonóides no plasma após a ingestão de uma única dose de 300 ml de vinho era inferior àquela necessária para proteger a LDL da oxidação, devido à sua baixa biodisponibilidade. Em intervenção com polpa de açaí em ensaio com humanos foi determinado o conteúdo de antocianinas no plasma dos voluntários por HPLC e constatou-se a presença dessas apenas entre 0,5 e 4h após o consumo do alimento. Após 12h do consumo desses alimentos os níveis de compostos fenólicos no plasma encontravam-se próximos dos níveis basais (Mertens-Talcott *et al.*, 2008). Esses dados sugerem que a manutenção da concentração desses compostos no plasma exige administração com intervalos de tempo curtos para que sejam encontradas quantidades significativas desses compostos no plasma após a absorção, em virtude da meia-vida curta desses compostos (Warden *et al.*, 2005). Caso as doses sejam consumidas com longos intervalos entre elas, as concentrações plasmáticas flutuarão e não haverá quantidade suficiente para exercer efeito antioxidante após a ingestão (van Het Hof *et al.*, 1999).

De acordo com esses resultados, sugere-se que a quantidade de guaraná em pó não tenha sido suficiente a ponto de manter elevada a concentração dos compostos fenólicos no plasma após a sua absorção de modo a exercer efeito residual na resistência da LDL à oxidação e que há necessidade de uma concentração mínima de substâncias antioxidantes no plasma para que os mesmos exerçam efeito na

resistência da LDL à oxidação (van heat Hof *et al.*, 1997; Ziegler *et al.*, 2005).

Estudos que relatam aumento da resistência da LDL à oxidação após doses repetidas realizaram intervenção com quantidade de alimento e/ou compostos fenólicos isolados e/ou alimentos adicionados desses compostos superior à ingerida normalmente pela dieta (Nigddikar *et al.* 1998; Miura *et al.*, 2000). Assim, novos estudos são necessários para determinar a concentração de guaraná em pó que deve ser consumida a fim de promover efeitos residuais no *lag time* de oxidação da LDL.

7.7. Medida do perfil antioxidante total do plasma (TAS)

A capacidade antioxidante total (TAS) dos voluntários não foi influenciada pelo consumo agudo de guaraná em pó, tampouco pelo consumo de doses repetidas da bebida.

Em concordância com esses resultados, Coimbra *et al.* (2006) não observaram aumento do perfil antioxidante do plasma pelo método TAS em 34 indivíduos que consumiram 1L de chá verde/dia durante 4 semanas. Estudo realizado por Cartron *et al.* (2003) verificou que após 3 semanas de consumo de 250 mL de vinho tinto ou 300 mL de champagne ou 300mL de vinho branco a capacidade antioxidante do plasma de 8 voluntários do sexo masculino não sofreu alterações. Além disso, não foram encontradas catequinas no plasma dos voluntários no jejum do 21º dia da intervenção. Segundo os autores, esses dados sugerem que a excreção dos compostos fenólicos é eficiente a ponto de não haver quantidades significativas no plasma após 24h do consumo a fim de exercer efeitos na TAS. Os autores avaliaram ainda a TAS de 3 voluntários após o consumo de 300 mL de vinho tinto, em intervalos de 60 minutos, durante 24h. De acordo com os resultados expostos por Cartron *et al.*(2003) o pico da capacidade antioxidante ocorreu entre 3 e 4h após o consumo de bebida, retornando próximo dos níveis basais após 24h do consumo do vinho.

Natella *et al.* (2002) verificaram aumento significativo da capacidade antioxidante em amostras de plasma colhidas 1h após a ingestão de 200 mL de café. Esses dados confirmam resultados encontrados em intervenção do tipo *crossover*

com 24 voluntários que receberam diferentes tratamentos (300 mL de chá preto ou chá verde ou água quente), em dias separados e de forma randomizada. O consumo de chá verde e chá preto aumentou significativamente a capacidade antioxidante do plasma, medida pelo método FRAP, sendo que o pico de atividade foi por volta de 60 minutos.

Semelhante resultado foi citado em estudo realizado por Serafini *et al.*(1996), no qual a população de estudo apresentou aumento significativo da capacidade antioxidante após o consumo de chá verde e de chá preto, sendo que o pico da capacidade antioxidante do plasma foi observado entre 30 e 60 minutos após a ingestão.

Em estudo realizado com 10 voluntários saudáveis que avaliou o efeito da administração de diferentes doses de chá verde (150 mL, 300 mL e 400 mL) foi constatado um aumento de 7,0% no perfil antioxidante total do plasma após 60 minutos e 6,2% após 120 minutos ($p < 0,01$) da ingestão de 300 ml do chá verde. Este aumento foi ainda maior após consumo de 450 ml da bebida: 12,0% após 60 minutos e 12,7% após de 120 minutos, revelando efeito-dose dependente.

Considerando a farmacocinética de absorção dos compostos fenólicos, o seu efeito-dose dependente na TAS e que a manutenção da concentração desses compostos no plasma exige administração com intervalos de tempo curtos para que sejam encontradas quantidades significativas desses compostos no plasma após a absorção, em virtude da meia-vida curta desses compostos (Warden *et al.*, 2005), sugere-se que a quantidade de polifenóis presente na dose de guaraná ($140,22 \pm 6,48$ mg) não tenha sido suficiente a ponto de manter elevada a concentração plasmática dos compostos fenólicos a ponto de exercer efeito pelo consumo de uma única dose e de doses repetidas na TAS dos voluntários.

7.8. Teste da capacidade de absorbância de radical oxigênio (ORAC)

O teste da capacidade de absorbância de radical oxigênio, além de ser amplamente utilizado para avaliar a capacidade antioxidante em amostras biológicas (Prior *et al.*, 2003), é o único método que avalia não só o tempo de proteção, mas

também a extensão da mesma, não se limitando ao valor final, como ocorre nas análises utilizando-se o DPPH (Ou *et. al.*, 2001).

O método ORAC é baseado na proteção de uma sonda fluorescente (fluoresceína) contra o ataque de um radical livre (AAPH). O meio reacional é composto de fluoresceína e o radical livre estável AAPH dissolvidos em tampão fosfat, pH = 7,4. Após a adição da amostra e condicionamento a 37°C, o caráter antioxidante da amostra protege a fluoresceína do radical livre, mantendo a fluorescência por tempo maior.

Curvas típicas desse experimento podem ser observadas na **Figura 14**.

Figura 14. Curvas típicas do teste de capacidade antioxidante por ORAC.

Os resultados ORAC no plasma da população do presente estudo revelaram que o consumo de guaraná em pó apresentou efeito significativo apenas pelo consumo de uma única dose da bebida. Esse resultado é semelhante ao perfil do resultado encontrado no ensaio de dienos conjugados com amostras de LDL, no qual também não foram observados efeitos pelo consumo de doses repetidas de guaraná em pó.

Corroborando com esses resultados, em ensaio randomizado do tipo *crossover*, McKay *et al.* (2010) não observaram efeitos significativos no ORAC do plasma de voluntários que consumiram 21 ou 42g de noz/dia durante 6 semanas.

Ensaio realizado por Mertens-Talcott *et al.* (2008) com 12 indivíduos avaliou o efeito do consumo de polpa e suco de açaí em dose equivalente a 7mL/Kg de peso/dia. Esse estudo verificou que a concentração máxima de antocianinas no plasma ocorreu entre 2h e 2,2h, sendo que a concentração retornou aos níveis basais após 12hs da ingestão.

Segundo Cao *et al.* (2001) o efeito antioxidante no plasma observado pela administração aguda de antocianinas está relacionado à biodisponibilidade e velocidade de excreção desses compostos, visto que a excreção desses compostos pela urina ocorre rapidamente, ficando disponíveis no plasma em tempo suficiente apenas para exercer efeitos agudos.

Assim, considerando a meia-vida curta dos compostos fenólicos, sugere-se que a quantidade de guaraná em pó não tenha sido suficiente a ponto de manter elevada a concentração dos compostos fenólicos no plasma após a sua absorção para promover efeito residual na capacidade antioxidante medida pelo método ORAC.

7.9. Avaliação da atividade das enzimas antioxidantes

Como citado nos resultados do presente estudo, a atividade da Cat foi influenciada tanto pelo consumo agudo quanto pelo consumo de doses repetidas. Já o aumento na atividade da GPx ocorreu somente após consumo de doses repetidas e após 1h do consumo da bebida no último dia de intervenção, enquanto que a SOD não sofreu influência do consumo de compostos fenólicos.

Xenobióticos são substâncias químicas estranhas aos sistemas biológicos, e dentre eles incluem-se os compostos naturais, drogas e agentes ambientais. O metabolismo desses compostos pode ser dividido em duas reações consecutivas. A fase I da reação é mediada pelo sistema citocromo P450 mono-oxigenase, que modifica os compostos através de reações de oxidação e redução. As enzimas de fase II, dentre as quais incluem-se glutathione-S-transferase (GST), NAD(P)H quinona redutase-1 (NQO1 ou QR1), UDP-glucuronosyl transferase (UGT), heme oxigenase (HO-1), aldeído desidrogenase, aldo-keto-redutase, microsomal epoxide hidrolase, g-glutamato cisteína ligase (g-GCL), glutathione sintetase, G-glutamyl transpeptidase

(Lee *et al.*, 2005), SOD, Cat e GPx, que atuam na conjugação dos produtos de fase I com diferentes moléculas hidrofílicas, promovendo assim a detoxificação e eliminação desses reativos intermediários. Os xenobióticos muitas vezes servem como ligantes dos ativadores de transcrição para os genes das enzimas de fase I, enquanto que os genes das enzimas de fase II são induzidos por metabólitos das enzimas de fase I, que são altamente eletrofílicos (**Figura 15**). A caracterização das regiões reguladoras dos genes das enzimas de fase II revelou que eletrófilos ativam transcricionalmente a expressão desses genes através do elemento responsivo ao antioxidante (ARE) (Motohashi *et al.*, 2004), que são regiões regulatórias específicas do código genético das enzimas antioxidantes e detoxificantes sensíveis a determinados estímulos (ARE).

Figura 15. Biotransformação de xenobióticos. Fonte: Motohashi *et al.*, 2004.

A indução de enzimas antioxidantes de fase II por agentes quimioprotetores demonstrou também ser uma estratégia eficaz na proteção das células contra os vários estágios da carcinogênese tanto em experimentos realizados com animais como em estudos clínicos (Sheweita *et al.*, 2000; Surh *et al.*, 2003; Zhao *et al.*, 2004). Essas enzimas convertem agentes cancerígenos em metabólitos

inativos que são facilmente eliminados do corpo, evitando assim que eles venham a reagir com o DNA celular (Kwak *et al.*, 2004).

Em uma análise do mecanismo de indução de enzimas antioxidantes de fase II foi observado que o Nrf2 (“nuclear factor-E2-related-factor”) é essencial para mediar a indução do ARE (Keum *et al.*, 2003; Kobayashi *et al.*, 2005). Esse fator regula expressão basal e induzida de genes antioxidantes e desintoxicantes e atua como uma proteína de ligação ao DNA, que reconhece a sequência do ARE. Portanto, a ativação de Nrf2 tem sido considerada como uma estratégia eficaz para a indução das enzimas de fase II e quimioprevenção do câncer (Motohashi *et al.*, 2004; Zhao *et al.*, 2010).

A proteína citoplasmática Keap1 interage com Nrf2 e reprime a sua função, atuando como regulador negativo da atividade do Nrf2, até que a célula seja exposta a um estímulo eletrofílico (Motoshi *et al.*, 2004). A exposição a ativadores endógenos como as ERO e ERN, e exógenos, tais como metais pesados indutores de Nrf2 e agentes quimiopreventivos provoca modificações covalentes ou reações de oxidação nos resíduos de cisteína de Keap1, o que altera a conformação da molécula e induz a dissociação do complexo Nrf2-Keap1. Em virtude dessa dissociação, ocorre a liberação de Nrf2 (Dinkova-Kostova *et al.*, 2005). A dissociação do complexo Nrf2-Keap1 pode ser direta ou indireta. A ativação direta promove oxidação ou modificação covalente dos grupos tiol contidos em Keap1 induzida pela ativação de quinases citosólicas, como a proteína quinase C (PKC) (Huang *et al.*, 2002; Pi *et al.*, 2007), a caseína quinase 2 (CK2) (Bloom *et al.*, 2003) e a proteína quinase PERK (“proline-rich extensin-like receptor kinase”) (Cullinan *et al.*, 2003; Cullinan *et al.*, 2004). A ativação indireta ocorre pela fosforilação de Nrf2 por proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs) (Yu *et al.*, 2000) ou pela fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K). Após a liberação de Nrf2, este forma um heterodímero com a proteína Maf e é translocado para o núcleo, onde ativa a transcrição de genes de enzimas de desintoxicação através dos ARE (Itoh *et al.*, 1997) (**Figura 16**).

Figura 16. Modelo esquemático da regulação de Nrf2. Os indutores de ARE, como determinados compostos naturais, promovem a dissociação dos complexos Keap1–Nrf2 através da modificação dos resíduos de cisteína de Keap1 ou fosforilação de Nrf2 pela ação de proteínas quinases, o que provoca a translocação nuclear de Nrf2 e regulação das enzimas antioxidantes e de detoxificação através da modulação dos genes que as codificam. Fonte: Zhao *et al.*, 2010.

Avc *et al.* (2008) observaram aumento significativo das enzimas SOD e GPx pelo consumo crônico de 0,1g de alho/ Kg de peso/dia em 13 voluntários idosos (de 70,69 a 84,23 anos), enquanto que atividade da Cat não sofreu alterações significativas. Fernandez-Pachon *et al.* (2009) verificaram que expressão da SOD em voluntários saudáveis aumentou ao final de 7 dias de intervenção com uma dieta pobre em compostos fenólicos e consumo diário de 300 mL de vinho tinto, enquanto que a expressão da Cat não apresentou alterações significativas. Os autores sugerem que a resposta da atividade dessas enzimas ao consumo de compostos antioxidantes não seja regulada da mesma forma .

Yeh *et al.* (2006) investigaram o efeito da suplementação com ácido gentístico, (GAE), ácido gálico (GA), ácido ferúlico, (FA) e ácido p-cumárico (p-CA) em doses equivalentes a 100 mg/ Kg de peso/ por 14 dias seguidos sobre a atividade e expressão da enzimas CuZn-SOD, Gpx e Cat em fígado de ratos. Foram

observados aumentos tanto na atividade quanto na expressão das enzimas hepáticas de fase II após a suplementação com os 4 ácidos fenólicos, quando comparado aos animais controle. Segundo os autores, o aumento tanto na expressão do RNA quanto na atividade das enzimas após a suplementação sugere que os compostos fenólicos atuem na transcrição dos genes que codificam essas enzimas.

Em estudo semelhante sobre o efeito da suplementação com a mesma dosagem para os quatro ácidos fenólicos citados acima sobre a atividade e expressão das enzimas de fase II em coração de ratos, os autores observaram que a atividade da SOD e Cat aumentou significativamente após suplementação em relação ao grupo controle. A atividade da GPx porém, foi significativamente maior apenas pelo consumo de GAE, FA e p-CA. Todos os ácidos fenólicos promoveram aumento nos níveis de expressão de mRNA de CuZnSOD, enquanto que a suplementação com GAE não promoveu aumento nos níveis de expressão de mRNA da GPx e Cat. Os níveis de expressão da proteína Nrf2 também aumentaram nos tecidos do coração. Esses resultados sugerem importante associação no aumento da concentração de Nrf2 na indução da expressão de genes de enzimas antioxidantes de fase II que são mediados pelo ARE, sugerindo que o consumo de compostos fenólicos pode atuar na modulando a expressão dos genes que as codificam através de alterações na etapa de transcrição (Yeh *et al.*, 2009). Esses dados sugerem a modulação da atividade de das enzimas antioxidantes não apresenta o mesmo padrão de resposta frente ao estímulo por um determinado composto antioxidante, o que está de acordo com os resultados observados no presente estudo em vista das diferenças na atividade das enzimas antioxidantes após intervenção com guaraná em pó.

Assim, os efeitos antioxidantes do guaraná parecem se estender além do tempo de depuração dos compostos fenólicos no plasma, provavelmente devido à regulação dos genes das enzimas antioxidantes e detoxificantes.

Porém, ainda existem questões relacionadas ao tempo de indução das enzimas fase II a partir do estímulo pelo consumo dos compostos fenólicos do guaraná e a relação dose-resposta para essa indução, o que sugere maior investigação sobre o guaraná e possíveis efeitos de seus compostos fenólicos na indução das enzimas antioxidantes.

7.10. Ensaio Cometa

O Ensaio Cometa pode ser usado para estudar os efeitos de compostos antioxidantes de maneiras diferentes. A versão alcalina desse ensaio pode ser utilizada para avaliar os níveis basais de danos ao DNA pela determinação de quebras de duplas fitas em células eucarióticas. No entanto, esse ensaio não é sensível quando níveis de danos endógenos ao DNA são menores. Assim, foi também utilizada a versão desse ensaio no qual se determina a proteção exercida pelos antioxidantes contra um agente oxidante, o peróxido de hidrogênio (Wasson *et al.*, 2000). Essa última versão do método é chamada de desafio contra o radical peróxido. O grau de migração do DNA nuclear é correlacionado com a extensão do dano na célula, mensurado pelo comprimento da cauda do cometa (Cemeli *et al.*, 2009; Liao *et al.*, 2009). O conceito de “*tail moment*”, calculado pelo comprimento da cauda do cometa como uma medida da migração do conteúdo do DNA nuclear, foi introduzido por Olive *et al.* (1990).

Os resultados desse ensaio com os linfócitos da população de estudo apresentaram o mesmo perfil dos dados de análise de resistência da LDL à oxidação: apenas o consumo agudo de guaraná em pó influenciou os danos oxidativos ao DNA, sendo que a redução dos mesmos foi significativamente menor tanto após 1h do consumo da bebida no primeiro dia de intervenção quanto após 1h do consumo da bebida no 15º de intervenção.

Em intervenção por 4 semanas com suco misto de *blueberry* (mirtillo) e maçã foi relatado aumento da proteção contra lesões oxidativas ao DNA celular de 8 indivíduos saudáveis (Weisel *et al.*, 2006).

Por outro lado, alguns estudos revelam que elevadas concentrações de alguns compostos com atividade antioxidante podem ter um efeito pró-oxidante, o que pode gerar ou agravar danos ao DNA da célula. Em estudo com vitamina C e zinco foi relatado aumento do dano induzido em linfócitos por peróxido de hidrogênio quando esses nutrientes foram administrados em doses elevadas, sendo que a proteção apenas foi observada quando administrados em doses menores (Harreus *et al.*, 2005). Azmi *et al.* (2006) relevou que o resveratrol, em elevadas concentrações também aumenta a quebra de fitas de DNA pelo ensaio cometa.

A vitamina C e ácido caféico em elevadas concentrações também parecem aumentar as quebras das duplas fitas de DNA em linfócitos (Bhat *et al.*, 2006; Bhat *et al.*, 2007). ECGC de extrato de chá verde em concentrações elevadas (>20mM) também está associado ao aumento de dano ao DNA celular (Elbling *et al.*, 2005).

Assim, deve haver cautela em relação à quantidade necessária do composto antioxidante para produzir os efeitos benéficos desejados, uma vez que nem sempre elevadas concentrações utilizadas em alguns estudos são alcançadas normalmente pela dieta (Wasson *et al.*, 2008), o que demonstra a necessidade de mais testes sobre a dosagem de guaraná em pó que seja segura de modo a não aumentar os danos ao DNA e que promova efeitos benéficos.

Conforme citado anteriormente, Koren *et al.* (2010) demonstraram que compostos fenólicos apresentam a capacidade de ligar-se a superfície de eritrócitos e, possivelmente a outras células do sangue como plaquetas e linfócitos. Os autores observaram também efeito dose-dependente do resveratrol sobre a ligação com as células vermelhas pela medida da quimioluminescência dependente de luminol (LCDL), indicando que uma maior concentração de compostos fenólicos favorece a ligação à superfície das células.

Figura 17. Efeito dose-dependente de eritrócitos incubados com eritrócitos pelo método de quimioluminescência. Fonte: Koren *et al.* (2010).

Em vista do exposto, sugere-se que a redução nos níveis de dano ao DNA dos linfócitos dos voluntários avaliado pelo desafio contra o radical peróxido seja devido à possível capacidade de aderência dos compostos fenólicos a superfície dessas células. Conforme dados sobre a relação dose-dependente na capacidade de

aderência dos compostos à superfície celular (Koren et *al.*, 2010), sugere-se ainda que as 3g de guaraná em pó forneceram quantidade de compostos fenólicos suficiente apenas para exercer efeitos pelo consumo de uma única dose e que após 24h do consumo da bebida os polifenóis do guaraná já haviam sido consumidos na neutralização dos radicais livres gerados pelo metabolismo aeróbio, não restando quantidade suficiente para exercer proteção ao DNA celular após 24h do consumo do guaraná.

8. Conclusões

- ❖ Os resultados do presente estudo sugerem que o guaraná em pó apresenta elevadas quantidades de compostos fenólicos e que o consumo de uma única dose da bebida aumentou o *lag time* de oxidação da LDL tanto no 1º quanto no 15º dia da intervenção. O mesmo foi observado nos resultados de ORAC no plasma e danos oxidativos ao DNA avaliados pelo Ensaio Cometa em linfócitos dos voluntários, uma vez esses parâmetros foram influenciados apenas pelo consumo de uma única dose da bebida;
- ❖ A TAS dos voluntários não foi influenciada pelo consumo agudo de guaraná em pó, tampouco pelo consumo de doses repetidas da bebida;
- ❖ A atividade da Cat foi influenciada tanto pelo consumo agudo quanto pelo consumo de doses repetidas. Já o aumento na atividade da GPx ocorreu somente após consumo de doses repetidas e após 1h do consumo da bebida no último dia de intervenção, enquanto que a SOD não sofreu influência do consumo de compostos fenólicos. Esses dados sugerem que há diferenças na modulação da atividade dessas enzimas;
- ❖ Sugere-se que o fracionamento da dose de guaraná em pó seja mais eficiente do que o consumo de uma única dose no dia para a manutenção da concentração dos compostos fenólicos no plasma a fim de promover efeitos pelo consumo de doses repetidas;
- ❖ Os efeitos antioxidantes pelo consumo de uma única dose de guaraná em pó parecem se estender além do tempo de depuração dos compostos fenólicos no plasma. Assim sugere-se que estudos sejam realizados sobre a biodisponibilidade e farmacocinética dos compostos fenólicos do guaraná;
- ❖ São necessárias ainda novas pesquisas a fim de avaliar a dose e o tempo de intervenção para que sejam observados efeitos em humanos pela ingestão de doses repetidas de guaraná em pó.

Referências

1. Abdalla, D.S.P. Estresse oxidativo e alimentação. In: Tirapegui J (ed) **Nutrição: Fundamentos e aspectos atuais**. São Paulo: Atheneu. 2000: 179-200.
2. Abu-Amsha Caccetta, R., Burke, V., Mori, T. A., Beilin, L. J. *et al.*, Red wine polyphenols, in the absence of alcohol, reduce lipid peroxidative stress in smoking subjects. **Free Radic Biol Med**. 2001; 30, 636.
3. Adegoke GO *et al.* Antioxidants and lipid oxidation in food – a critical appraisal. **Journal of Food Science and Techonology**. 1998. 35; (4): 283-98.
4. Aebi H. Catalase in vitro. *Methods in Enzymology*, New York 1984; 105: 121-6.
5. Alderman EL, Corley SD, Fisher LD, Chaitman BR, Faxon DP, Foster ED, Killip T, Sosa JA, Bourassa MG. Five-year angiographic follow-up of factors associated with progression of coronary artery disease in the Coronary Artery Surgery Study (CASS). CASS Participating Investigators and Staff. **J Am Coll Cardiol**. 1993; 22: 1141–54.
6. Allentoff AJ, Bolton JL, Wilks A, Thompson JA, Ortiz de Montellano PR. Heterolytic versus homolytic peroxide bond cleavage by sperm whale myoglobin and myoglobin mutants. **J Am Chem Soc**. 1992; 114: 9744–49.
7. Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. **Biochem J**. 2001; 357: 593– 615.
8. Amberger A, Maczek C, Jurgens G, Michaelis D, Schett G, Trieb K, Eberl T, Jindal S, Xu Q, Wick G. Co-expression of ICAM-1, VCAM-1, ELAM-1 and Hsp60 in human arterial and venous endothelial cells in response to cytokines and oxidized low-density lipoproteins. **Cell Stress Chaperones**. 1997; 2: 94–103.
9. Anderson D, Phillips BJ, Yu TW, Edwards AJ, Ayesh R, Butterworth KR. The effects of vitamin C supplementation on biomarkers of oxygen radical generated damage in human volunteers with "low" or "high" cholesterol levels. **Environmental and Molecular Mutagenesis**. 1997; 30:161-174.
10. Ângelo PCS. Guarana (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*), an anciently consumed stimulant from the Amazon rain forest: the seeded-fruit transcriptome. **Plant Cell Rep**. 2008; 27:117–124.
11. Antolovich M. Sample preparation in the determination of phenolic compounds in fruits. Critical Review. **Analyst**. 2000; 125: 989-1009.
12. Araujo, FA. **Café (*Coffea Arábica* L.) submetido a diferentes condições de torrefação: caracterização química a avaliação da atividade antioxidante e sensorial**. [Dissertação de doutorado apresentada a Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP]. São Paulo, 2007.
13. Arendt BM, Ellinger S, Kekic K, Geus L, Fimmers R, Spengler U, Müller WU, Goerlich R. Single and repeated moderate consumption of native or dealcoholized red wine show different effects on antioxidant parameters in blood and DNA strand breaks in peripheral leukocytes in healthy volunteers: a randomized controlled trial. **Nutr J**. 2005; 14 (4): 4:33
14. Aruoma OI. Nutrition and health aspects of free radicals and antioxidants. **Food Chemistry and Toxicology**. 1994; 32: 671- 683.
15. [AAOC] Association of Official Analytical Chemists. **Official Methods of**

- Analysis.** 16^a ed. Arlington; 1995.
16. Avellone G, Di Garbo V, Campisi D, De Simone R. *et al.* Effects of moderate sicilian red wine consumption on inflammatory biomarkers of atherosclerosis. **Eur J Clin Nutr.** 2006; 60, 41–47.
 17. Avc A, Atl T, Ergüder IB, Varl M, Devrim E, Aras S, Durak I. Effects of garlic consumption on plasma and erythrocyte antioxidant parameters in elderly subjects. **Gerontology.** 2008; 54:173–176.
 18. Aviram M, Dornfeld L., Rosenblat, M., Volkova, N. *et al.*, Pomegranate juice consumption reduces oxidative stress, atherogenic modifications to LDL, and platelet aggregation: studies in humans and in atherosclerotic apolipoprotein E deficient mice. **Am J Clin Nutr.** 2000; 71, 1062–1076.
 19. Azmi AS, Bhat SH, Hanif S, Hadi SM. Plant polyphenols mobilize endogenous copper in human peripheral lymphocytes leading to oxidative DNA breakage: a putative mechanism for anticancer properties. **FEBS Lett.** 2006; 580: 533–538.
 20. Awika JM, Rooney L W, Wu X, Prior RL, Cisneros-Zevallos L. Screening methods to measure antioxidant activity of Sorghum (*Sorghum bicolor*) and Sorghum Products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry.** 2003; 51, 6657–6662.
 21. Babior BM. **Braz. J. Med. Biol. Res.** 1997; 30 (141).
 22. Barbosa E, Moreira EAM, Faintuch J, Pereima MJL. Suplementação de antioxidantes: enfoque em queimados. **Rev Nutr.** 2007; 20(6):693-702.
 23. Baker TA, Milstien S, Katusic ZS. Effect of vitamin on the availability of the tetrahydrobiopterin in human endothelial cells. **J Cardiovasc Pharmacol.** 2001; 37: 333-338.
 24. Basile A, Ferrara L, Del Pezzo M, Meled G, Sorbo S, Bassi P, Montesano D. Antibacterial and antioxidant activities of ethanol extract from *Paullinia cupana* Mart. **J Ethnopharmacol.** 2005; 102: 32–36.
 25. Batlouni M. Hipótese Oxidativa da Aterosclerose e Emprego dos Antioxidantes na Doença Arterial Coronária. **Arq Bras Cardiol.** 1997; 68 (1): 55-63.
 26. Bazykina NI, Nikolaevskii AN, Filippenko TA, Kaloerova VG 2002. Optimization of conditions for the extraction of natural antioxidants from raw plant materials. **Pharm Chem J.** 2002; 36: 100-103.
 27. Bełtowski J, Wójcicka G, Górny D, Marciniak A. The effect of dietary induced obesity on lipid peroxidation, antioxidant enzymes and total plasma antioxidant capacity. **J Physiol Pharmacol.** 2000; 51:883–896.
 28. Bell JRC, Donovan JL, Wong R, et al. (-)-Catechin in human plasma after ingestion of a single serving of reconstituted red wine. **Am J Clin Nutr.** 2000;71: 103–8.
 29. Bhat SH, Azmi AS, Hanif S, Hadi SM. Ascorbic acid mobilizes endogenous copper in human peripheral lymphocytes leading to oxidative DNA breakage: a putative mechanism for anticancer properties. **Int. J. Biochem. Cell Biol.** 2006;38:2074-2081.
 30. Bhat SH, Azmi AS, Hadi SM. Prooxidant DNA breakage induced by caffeic acid in human peripheral lymphocytes: involvement of endogenous copper and a putative mechanism for anticancer properties. **Toxicol. Appl. Pharmacol.** 2007;218:249-255.
 31. Bianchi, MLP, Antunes LMG. Radicais livres e os principais antioxidantes da

- dieta. **Rev Nutr Campinas**. 1999; 12(2): 123-130.
32. Bloom DA, Jaiswal AK. Phosphorylation of Nrf2 at Ser 40 by protein kinase C in response to antioxidants leads to the release of Nrf2 from INrf2, but is not required for Nrf2 stabilization/accumulation in the nucleus and transcriptional activation of antioxidant response element-mediated NAD(P)H:quinone oxidoreductase-1 gene expression. **J Biol Chem** 2003; 278(45):44675–82.
 33. Bonomini F, Tengattini S, Fabiano A, Bianchi R, Rezzani R. F. **Histol Histopathol**. 2008; 23: 381-390.
 34. Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel Wissenschaft und Technologie**. 1995; 28: 25–30.
 35. Bravo L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. **Nutr Rev**. 1998; 56:317–33.
 36. Bydlowski SP, Yunker RL, Subbiah MTR. A novel property of an aqueous guarana extract (*Paullinia cupana*). Inhibition of platelet aggregation in vitro and in vivo. **Braz J of Medical and Biol Res**. 1988; 21: 535–538.
 37. Cacace JE, Mazza G. Optimization of extraction of anthocyanins from Black currants with aqueous ethanol. *Jour of Food Sci*. 2003: 240-248.
 38. Caldas C. Grupo de pesquisa sequência genoma do guaraná. **Revista Eletrônica de Jornalismo Científico**. Disponível em: <http://www.comciencia.br/comciencia/handler.php?section=3¬icia=400>. Acesso em [2008 Mar 10].
 39. Caetano ACS, Melo EA, Lima VLAG, Maciel MIS. Extração de antioxidantes de resíduos agroindustriais de acerola. **Braz J Food Technol**. 2009; 12(2): 155-160.
 40. Camargo MCR, Tfouni SAV, Vitorino SH, Menegário TF, Toledo. Determinação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAS) em guaraná em pó (*Paullinia Cupana*). **Cienc. Tecnol Aliment**. 2006; 26(1): 230-234.
 41. Campos AR, Barros AIS, Santos FA, Rao VSN. Guarana (*Paullinia cupana* Mart.) offers protection against gastric lesions induced by ethanol and indomethacin in rats. **Phytother Res** 2003 (17): 1199–202. Cao, G, Muccitelli HU, Sanchez-Moreno C, Prior RL. Anthocyanins are absorbed in glycated forms in elderly women: a pharmacokinetic study. **Am. J. Clin. Nutr**. 73:920–926; 2001.
 42. Canadanovic-Brunet JM, Djilas SM, Cetkovic GS, Tumbas VT, Mandic AI, Canadanovic VM. Antioxidant activities of different *Teucrium montanum* L. extracts. **International Journal of Food Science and Technology**. 2006; 41: 667–673.
 43. Cao G, Muccitelli HU, Sanchez-Moreno C, Prior RL. Anthocyanins are absorbed in glycated forms in elderly women: a pharmacokinetic study. **Am J Clin Nutr**. 2001;73:920–6.
 44. Cardona F, Túnez I, Tasset I *et al*. Circulating antioxidant defences are decreased in healthy people after a high-fat meal. **Br J Nutr**. 2008; 10:1–5.
 45. Cartron E, Fouret G, Carbonneau MA, Lauret C, Michel F, Monnier L, Descomps B, Léger CL. Red-wine beneficial long-term effect on lipids but not on antioxidant characteristics in plasma in a study comparing three types of wine--description of two O-methylated derivatives of gallic acid in humans. **Free Radic Res**. 2003; 37(9):1021-35.
 46. Cassidy A, Hansley B, Lamuela-Raventos RM. Isoflavones, lignans and

- stilbenes—origins, metabolism and potential importance to human health. **J Sci Food Agric.** 2000; 80: 1044–62.
47. Castilla P, Echarrí R, Davalos A, Cerrato F. *et al.*, Concentrated red grape juice exerts antioxidant, hypolipidemic, and antiinflammatory effects in both hemodialysis patients and healthy subjects. **Am J Clin Nutr.** 2006; 84: 252–262.
 48. Castilla, P., Davalos, A., Teruel, J. L., Cerrato, F. *et al.*, Comparative effects of dietary supplementation with red grape juice and vitamin E on production of superoxide by circulating neutrophil NADPH oxidase in hemodialysis patients. **Am J Clin Nutr.** 2008; 87, 1053–1061.
 49. Cemeli E, Baumgartner, A, Anderson D. Antioxidants and the Comet assay. **Mutation Research.** 2009; 681: 51–67.
 50. Cerutti PA. Oxidant stress and carcinogenesis. **European Journal of Clinical Investigation.** 1991; 21(1): 1-5.
 51. Chang J, Chen, T, Chan P, Chen Y. *et al.*, The in vitro inhibitory effect of tannin derivatives on 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase on vero cells. **Pharmacology.** 2001, 62, 224–228.
 52. Chiabrando C, Avanzini F, Rivalta C, Colombo F, Fanelli R, Palumbo G, Roncaglioni M. Long-term vitamin E supplementation fails to reduce lipid peroxidation in people at cardiovascular risk: analysis of underlying factors. **Curr Control Trials Cardiovasc Med.** 2002;3:5.
 53. Chou E J, Keevil JG, Aeschlimann S, Wiebe DA *et al.*, Effect of ingestion of purple grape juice on endothelial function in patients with coronary heart disease. **Am J Cardiol.** 2001; 88, 553–555.
 54. Chirinos R, Rogez H, Campos D, Pedreschi R, Larondelle Y. Optimization of extraction conditions of antioxidant phenolic compounds from mashua (*Tropaeolum tuberosum* Ruíz & Pavon) Tubers. **Separation and Purification Technology** 2006; 55: 217-225.
 55. Conseil G, Baubichon-Cortay H, Dayan G, Jault JM, Barron D, Di Pietro A. Flavonoids: a class of modulators with bifunctional interactions at vicinal ATP and steroid-binding sites on mouse P-glycoprotein. **Proc Natl Acad Sci USA.** 1998; 95:9831–6.
 56. Correia, P. In: Souza Araújo AAS, Mercuri LP, Seixas SRS, Storpirtis I S, Matos JR. Determinação dos teores de umidade e cinzas de amostras comerciais de guaraná utilizando métodos convencionais e análise térmica. **Rev Bras de Ciências Farmacêuticas.** 2006; 42 (2): 269-277.
 57. Centro de Pesquisa Agroflorestal da Amazônia Ocidental [CPAA]. **O que é o guaraná?** Disponível em <http://www.cpaa.embrapa.br/portfolio/sistemadeproducao/guarana/docs/oque.html> > Acesso em [2008 Jan 14].
 58. Chan SW, Lee CY, Yap CF, Wan AWM, Ho CW. Optimisation of extraction conditions for phenolic compounds from limau purut (*Citrus hystrix*) peels. **International Food Research Journal.** 2009; 16: 203-213.
 59. Collins BH, Horska A, Hotten PM, Riddoch C, Collins AR. Kiwifruit protects against oxidative DNA damage in human cells and in vitro. **Nutr Cancer** 2001;39:148-153.
 60. Collins AR, Harrington V, Drew J, Melvin R. Nutritional modulation of DNA repair in a human intervention study. **Carcinogenesis.** 2003;24:511-515.

61. Conseil G, Baubichon-Cortay H, Dayan G, Jault JM, Barron D, Di Pietro A. Flavonoids: a class of modulators with bifunctional interactions at vicinal ATP and steroid-binding sites on mouse P-glycoprotein. **Proc Natl Acad Sci.** 1998; 95:9831–6.
62. Cordain L, Melby CL, Hamamoto AE, O'Neill DS. *et al.*, Influence of moderate chronic wine consumption on insulin sensitivity and other correlates of syndrome X in moderately obese women. **Metabolism.** 2000; 49, 1473–1478.
63. Cullinan SB, Zhang D, Hannink M, Arvisais E, Kaufman RJ, Diehl JA. Nrf2 is a direct PERK substrate and effector of PERK-dependent cell survival. **Mol Cell Biol** 2003; 23(20):7198–209.
64. Cullinan S, Gordan J, Jin J, Harper J, Diehl J. The keap1-BTB protein is an adaptor that bridges Nrf2 to a Cul3-based E3 ligase: oxidative stress sensing by a Cul3-Keap1 ligase. **Mol Cell Biol** 2004; 24(19):8477–86.
65. Cullinan SB, Diehl JA. PERK-dependent activation of Nrf2 contributes to redox homeostasis and cell survival following endoplasmic reticulum stress. **J Biol Chem** 2004; 279(19):20108–17.
66. Davi G, Ciabattini G, Consoli A, Mezzetti A, Falco A, Santarone S, Pennese E, Vitacolonna E, Bucciarelli T, Costantini F, Capani F, Patrono C. *In vivo* formation of 8-iso-prostaglandin F2 alpha and platelet activation in diabetes mellitus: effects of improved metabolic control and vitamin E supplementation. **Circulation.** 1999; 99:224–229.
67. da Silva RF, Ascheri JLR, Pereira RGFA. Composição centesimal e perfil de aminoácidos de arroz e pó de café. **Aliment Nutr.** 2007; 18: 3: 325-330.
68. Day AJ, Williamson G. Biomarkers for exposure to dietary flavonoids: a review of the current evidence for identification of quercetin glycosides in plasma. **Br J Nutr.** 2001; 86:S105–10.
69. Debry PE, Ash A, Neklason DW, Methersal JE. Role of multidrug resistance P-glycoprotein in cholesterol esterification. **J Biol Chem.** 1997; 272:1026–31.
70. Del Bas JM, Ricketts ML, Baiges I, Quesada H. *et al.*, Dietary procyanidins lower triglyceride levels signaling through the nuclear receptor small heterodimer partner. **Mol Nutr Food Res.** 2008, 52, 1172–1181.
71. Del Bas, J. M., Ricketts, M.-L., Vaque', M., Sala, E. *et al.*, Dietary procyanidins enhance transcriptional activity of bile acid-activated FXR in vitro and reduce triglyceridemia in vivo in a FXR-dependent manner. **Mol Nutr Food Res.** 2009; 53, 805–814.
72. De Rijke Y, Demacker P, Assen N, Sloots L *et al.*, Red wine consumption does not affect oxidizability of low-density lipoproteins in volunteers. **Am J Clin Nutr.** 1996; 63, 329–334.
73. Déprez S, Mila I, Huneau J-F, Tomé D, Scalbert A. Transport of proanthocyanidin dimer, trimer and polymer across monolayers of human intestinal epithelial Caco-2 cells. **Antioxid Redox Signal.** 2001; 3: 957–67.
74. Devaraj S, Vega-Lopez S, Kaul N, Schonlau, F *et al.*, Supplementation with a pine bark extract rich in polyphenols increases plasma antioxidant capacity and alters the plasma lipoprotein profile. **Lipids.** 2002; 37, 931–934.
75. Diaz MN, Frei B, Vita JA, Keany JF. Antioxidants and Atherosclerotic Heart Disease. **N England J Med.** 1997; 337 (6): 1158-1166.
76. Dinkova-Kostova AT, Holtzclaw WD, Kensler TW. The role of Keap1 in cellular

- protective responses. **Chem Res Toxicol** 2005;18 (12):1779–91.
77. Elbling L, Weiss RM, Teufelhofer O, Uhl M, Knasmueller S, Schulte-Hermann R, Berger W, Micksche M. Green tea extract and (–)-epigallocatechin-3-gallate, the major tea catechin, exert oxidant but lack antioxidant activities. **FASEB J.** 2005;19:807-809.
 78. Enayat S, Banerjee S. Comparative antioxidant activity of extracts from leaves, bark and catkins of *Salix aegyptiaca* sp. **Food Chemistry.** 2009; 116: 23–28.
 79. Escribano-Bailón MT, Santos-Buelga C. Methods in polyphenol analysis. Polyphenol Extraction from Foods. **The Royal Society of chemistry** 2003: 1-15.
 80. Espinola EB, Dias RF, Mattei R, Carlini EA. Pharmacological activity of Guarana (*Paullinia cupana* Mart.) in laboratory animals. **J Ethnopharmacol.** 1997; 55: 223- 29.
 81. Esterbauer H, Striegl G, Phuhl H, Rotheneder. Continuous monitoring of *in vitro* oxidation of human low density lipoprotein. **Free Rad Res Comms.** 1989; 6 (1): 67-75.
 82. Estrunch *et al.* Different effects of red wine and gin consumption on inflammatory biomarkers of atherosclerosis: a prospective randomized crossover trial. Effects of wine on inflammatory markers. **Atherosclerosis.** 2004; 175: 117-123.
 83. Kwak MK, Wakabayashi N, Kensler TW. Chemoprevention through the Keap1-Nrf2 signaling pathway by phase 2 enzyme inducers. **Mutat Res.** 2004; 555:133–48.
 84. Liu FF, Ang CYW, Springer D. Optimization of extraction conditions for active components in *Hypericum perforatum* Using Surface methodology. **Journal of Agriculture and Food Chemistry.** 2000; 48: 3364-3371.
 85. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL. and Randall RJ. Protein measurement with the Folin-Phenol reagents. 1951. **J Biol Chem.** 193: 265-275.
 86. Faria JJP. Manual de Produção do Guaraná. Edição SEBRAE. Cuiabá. 2000.
 87. Fernández-Pachón MS, Villaño D, Troncoso AM, García-Parrilla MC. Antioxidant Capacity of Plasma after Red Wine Intake in Human Volunteers. **J Agric Food Chem.** 2005. 53: 5024-5029.
 88. Fernández-Pachón MS, Bakkali F, Villaño D, Troncoso AM, García-Parrilla MC. Acute intake of red wine does not affect antioxidant enzymes activities in human subjects. **Int J Vitam Nutr Res.** 2006; 76(5): 291-8.
 89. Ferrari CKB. Oxidação lipídica em alimentos e sistemas biológicos: mecanismos gerais e implicações nutricionais e patológicos. **Rev Nutr Campinas.** 1998; 11(1): 3-14.
 90. Ferreira ALA, Matsubara LS. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Rev Ass Med Brasil.** 1997; 43(1): 61-8.
 91. Festa F, Cristaldi M, Ieradi LA, Moreno S, Cozzi R. The Comet assay for the detection of DNA damage in *Mus spretus* from Donana National Park. **Environmental Research.** 2003; (91): 54–61.
 92. Finkel T, Holbrook NJ. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. **Nature.** 2000; 408:239–47.
 93. Ficker ES. Efeitos do processamento físico sobre a remoção plasmática de nanopartículas lipídicas que se ligam a receptores de LDL e sobre a oxidação da lipoproteína em indivíduos hipercolesterolêmicos. São Paulo, 2007. [Tese de Doutorado apresentada a Faculdade de Medicina da USP].

94. Foti MC, C Daquino C, et al. (2004). Electron-Transfer Reaction of Cinnamic Acids and Their Methyl Esters with the DPPH• Radical in Alcoholic Solutions. *The Journal of Organic Chemistry*. 2004; 69(7): 2309-2314.
95. Flohé L, Gunzler WA. Assays of glutathione peroxidase. **Methods in Enzymology**. 1984; 105: 114-21.
96. Folch J, Lees M, Sloane SGH. A simple method for the isolation and purification of total lipide from animal tissues. **J Biol Chem**. 1957; 226: 497-509.
97. Frankel EN, Kanner I, German JB, Parks E, Kinsella JE. Inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein by phenolic substances in red wine. **Lancet**. 1993; 341: 454-7.
98. Fredholm BB, Battig K, Holmen J, Nehlig A, Zwartau EE. Actions of Caffeine in the Brain with Special Reference to Factors That Contribute to Its Widespread Use. **Pharmacological Reviews**. 1999; 51(1):83-133.
99. Freedman, J. E., Parker, C., Li, L., Perlman, J. A. *et al.*, Select flavonoids and whole juice from purple grapes inhibit platelet function and enhance nitric oxide release. **Circulation** 2001, 103, 2792–2798.
100. Friedwald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of concentrations of low density cholesterol in plasma without the use of preparative ultracentrifuge. **Clin Chem Baltimore**. 1972; 499-502.
101. Fukumasu H, Silva T C da, Avanzo JL, Lima CE de, Mackowiak I I, Atroch A, Spinosa H de S, Moreno FS, Dagli MLZ. Chemopreventive effects of *Paullinia cupana* Mart var. *sorbilis*, the guarana, on mouse hepatocarcinogenesis. **Cancer Lett** 2006; 233: 158–64.
102. Fukumasu H, Avanzo JL, Nagamine MK, Barbuto JA, Rao KV, Dagli MLZ. *Paullinia cupana* Mart var. *sorbilis* guaraná reduces cell proliferation and increases apoptosis of B16/F10 melanoma lung metastases in mice. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. 2008; 41: 305-310.
103. Fukumasu H, Latorre AO, Zaidan-Dagli ML. *Paullinia cupana* Mart. var. *sorbilis*, Guarana, Increases Survival of Ehrlich Ascites Carcinoma (EAC) Bearing Mice by Decreasing Cyclin-D1 Expression and Inducing a G0/G1 Cell Cycle Arrest in EAC Cells. **Phytother Res**. 2010.
104. Fuhrman B, Aviram M. Flavonoids protect LDL from oxidation and attenuate atherosclerosis. **Curr Opinion Lipidol**. 2001; 12(1):41-8.
105. Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M *et al.* Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. **J Clin Invest**. 2004;114:1752–1761.
106. Frei B. On the role of vitamin C and other antioxidants in atherogenesis and vascular dysfunction. **Proc Soc Exp Biol Med**. 1999; (222): 196–204.
107. Galduróz JCF, Carlini EA. Acute effects of the *Paulinia cupana*, “Guaraná” on the cognition of normal volunteers. **São Paulo Medical Journal**. 1994. 112(3):607-11.
108. Genovese MI, Santos RJ, Hassimoto NMA, Lajolo FM. Determinação do conteúdo de fenólicos totais em frutas. **Rev Bras Cien Farm**. 2003; 39: 167-9.
109. Gibbons G, Wiggins D, Brown A, Hebbachi A. Synthesis and function of hepatic very-low-density lipoprotein. **Biochem Soc Trans**. 2004, 32, 59–64.
110. Gimeno SGA, Ferreira SRG. **Fatores da Dieta nas Doenças Cardiovasculares**. In: Kac G (org.). *Epidemiologia Nutricional*. 20 ed. Atheneu.

2007. Cap. 21, p. 371-87.
111. Giugliano D. Dietary antioxidants for cardiovascular prevention. **Nutr Metab Cardiovasc Dis.** 2000; (10): 38–44.
 112. Graefe EU, Wittig J, Mueller S, et al. Pharmacokinetics and bioavailability of quercetin glycosides in humans. **J Clin Pharmacol.** 2001; 41: 492–9,
 113. Grassi D, Necozione S, Lippi C, Croce G *et al.*, Cocoa reduces blood pressure and insulin resistance and improves endothelium-dependent vasodilation in hypertensives. **Hypertension.** 2005; 46, 398–405.
 114. Guyot S, Marnet N, Laraba D, Sanoner P, Drilleau J-F. Reversed-phase HPLC following thiolysis for quantitative estimation and characterization of the four main classes of phenolic compounds in different tissue zones of a French cider apple variety (*Malus domestica* Var. Kermerrien). **J Agric Food Chem.** 1998;46:1698–705.
 115. Goldstein JL, Schrott Hg, Hazzard WR *et al.* Hyperlipidemia in coronary heart disease. Genetic analysis of lipid levels in 176 families and delineation of a new inherited disorder, combined hyperlipidemia. *J Clin Invest.* 1973; 52: 1544-68.
 116. Gray D *et. al.* Antioxidant activity of oat extracts added to human LDL particles and in free radical trapping assays. **Journal of Cereal Science.** 2002; 36(2): 209-218.
 117. Haller *et al.* Short-term metabolic and hemodynamic effects of ephedra and guarana combinations. **Clinical, Pharmacology & Therapeutics.** 2005; 77(6): 560-71.
 118. Halliwell B, Murcia MA, Chirico S, Aruoma OI. Free radicals and antioxidants in food and in vivo: what they do and how they work. **Crit Rev Food Sci Nutr** 1995; 35(172): 7-20.
 119. Halliwell B, Gutteridge JMC. **Free radical in medicine and biology.** London; Clarendon Press 2000; 543.
 120. Haskell CF, Kennedy DO, Wesnes KA, Milne AL, Scholey AB. A Double-blind, placebo-controlled, multi-dose evaluation of the acute behavioural effects of guaraná in humans. **Journal of Psychopharmacology.** 2007.
 121. Harreus U, Baumeister P, Zieger S, Matthias C. The influence of high doses of vitamin C and zinc on oxidative DNA damage. **Anticancer Res.** 2005;25:3197-3201.
 122. Havel RJ, Eder HA, Bragdon JH. The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum. **J Clin Invest.** 1955; 34: 1345-53.
 123. Herman AR. Vida Natural. **O Guaraná: Sua cultura, propriedades, formas de preparação e uso.** 1986. 2nd ed. Global/Ground, São Paulo, Brasil, 77p.
 124. Hertog M, Feskens E, Hollman P, Katan M, Kromhout D. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: The Zutphen Elderly Study. **Lancet.** 1993: 3421- 4007.
 125. Higdon JV, Frei B. Tea catechins and polyphenols: health effects, metabolism, and antioxidant functions. **Crit Rev Food Sci Nutr.** 2003; 43:89–143.
 126. Hodgson J *et al.* Acute effects of ingestion of black and green tea on lipoprotein oxidation. **Am J Clin Nutr.** 2000; 7: 1103-7.

127. Hogg N. Free radicals in disease. **Semin Reprod Endocrinol.** 1998; (16): 241–248.
128. Hollman PCH, Arts ICW. Flavonols, flavones and flavanols—nature, occurrence and dietary burden. **J Food Sci Agric.** 2000; 80: 1081–93.
129. Hollis JH, Houchins JA, Blumberg JB, Mattes RD. Effects of Concord grape juice on appetite, diet, body weight, lipid profile, and antioxidant status of adults. **J Am Coll Nutr.** 2009; 28(5): 574–82.
130. Huang HC, Nguyen T, Pickett CB. Phosphorylation of Nrf2 at Ser-40 by protein kinase C regulates antioxidant response element-mediated transcription. **J Biol Chem** 2002; 277(45):42769–74.
131. IDF. Clinical Guidelines Task Force. Global Guideline for Type 2 Diabetes. Brussels: International Diabetes Federation. 2005. Disponível em: www.idf.org. [Acessado em Aug 18 2010].
132. Inoue T and Node K. Vascular failure: A new clinical entity for vascular disease. **J Hypertens.** 2006; 24: 2121–2130.
133. Innerarity TL, Boren J, Yamanaka S, Olofsson SO. Biosynthesis of apolipoprotein B48-containing lipoproteins. Regulation by novel post-transcriptional mechanisms. **J Biol Chem.** 1996; 271:2353–6.
134. Iqbal J, Hussain M. Intestinal lipid absorption. **Am J Physiol Endocrinol Metab.** 2009; 296: E1183–E1194, 2009.
135. Ishikawa *et al.* Effect of tea flavonoid supplementation on the susceptibility of low-density lipoprotein to oxidative modification. **Am J Clin Nutr.** 1997; 66:261–6.
136. Ishikawa Y, Hayase W, Haratake Y, Hirano N, Matuura H, Mizowaku A, Murakami A, Yamamoto M. Effect of ground green tea drinking for 2 weeks on the susceptibility of plasma and LDL to the oxidation *ex vivo* in healthy volunteers. **Kobe J Med Sci.** 2008; 54 (1): E62–E72.
137. Iversen CK. Blackcurrant nectar: effect of processing and storage on anthocyanin and ascorbic acid content. **J Food Sci.** 1999; 64: 37–41.
138. Itoh K, Chiba T, Takahashi S, Ishii T, Igarashi K, Katoh Y, *et al.* An Nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements. **Biochem Biophys Res Commun.** 1997; 236(2):313–22.
139. Jimenez, J. P., Serrano, J., Tabernero, M., Arranz, S. *et al.*, Effects of grape antioxidant dietary fiber in cardiovascular disease risk factors. **Nutrition** 2008; 24, 646–653.
140. Jimoh FO, Sofidiya MO, Afolayan AJ. Antioxidant properties of the methanol extracts from leaves of *Paullinia pinnata*. **Journal of Medicinal Food.** 2007; 10(4): 707–11.
141. Kaikkonen J, Porkkala-Sarataho E, Morrow JD, Roberts LJ 2nd, Nyyssonen K, Salonen R, Tuomainen TP, Ristonmaa U, Poulsen HE, Salonen JT. Supplementation with vitamin E but not with vitamin C lowers lipid peroxidation *in vivo* in mildly hypercholesterolemic men. **Free Radic Res.** 2001; 35:967–978.
142. Kar P, Laight D, Rooprai HK, Shaw KM, Cummings, M., Effects of grape seed extract in type 2 diabetic subjects at high cardiovascular risk: a double blind randomized placebo controlled trial examining metabolic markers, vascular tone,

- inflammation, oxidative stress and insulin sensitivity. **Diabet Med.** 2009; 26, 526–531.
143. Kennedy DO *et al.* Improved cognitive performance and mental fatigue following a multi-vitamin and mineral supplement with added guaraná (*Paullinia cupana*). **Appetite.** 2008; 50:506-13.
 144. Kennedy DO, Haskell CF, Wesnes KA, Scholey AB. Improved cognitive performance in human volunteers following administration of guarana (*Paullinia cupana*) extract: comparison and interaction with Panax ginseng. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior.** 2004; 79: 401-11.
 145. Keum YS, Owuor ED, Kim BR, Hu R, Kong AN. Involvement of Nrf2 and JNK1 in the activation of antioxidant responsive element (ARE) by chemopreventive agent phenethyl isothiocyanate (PEITC). **Pharm Res.** 2003;20:1351–6.
 146. Kobayashi M, Yamamoto M. Molecular mechanisms activating the Nrf2-Keap1 pathway of antioxidant gene regulation. **Antioxid Redox Signal.** 2005; 7:385–94.
 147. Koren E, Kohen R, Ginsburg I. Polyphenols enhance total oxidant-scavenging capacities of human blood by binding to red blood cells. **Experimental Biology and Medicine.** 2010; 235: 689–699.
 148. Kuskoski EM, Roseane F, García AA, Troncoso GAM. Propiedades químicas y farmacológicas del fruto guaraná (*Paullinia cupana*). **Revista de La Facultad de Química Farmacêutica.** 2005; 12(2): 45-52.
 149. Kwak MK, Wakabayashi N, Kensler TW. Chemoprevention through the Keap1-Nrf2 signaling pathway by phase 2 enzyme inducers. *Mutat Res.* 2004; 555:133–48.
 150. Lee MJ, Maliakal P, Chen L, et al. Pharmacokinetics of tea catechins after ingestion of green tea and (-)-epigallocatechin-3-gallate by humans: formation of different metabolites and individual variability. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.** 2002;11:1025–32.
 151. Leslie EM, Mao Q, Oleschuk CJ, Deeley RG, Cole SP, Lee JS, Surh YJ. Nrf2 as a novel molecular target for chemoprevention. *Cancer Lett* 2005;224(2):171–84.
 152. Levine M, Wang Y, Padayatty SJ, Morrow J. A new recommended dietary allowance of vitamin C for healthy young women. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 2001; 98:9842–9846.
 153. Liao W, McNutt MA, Zhu W. The comet assay: A sensitive method for detecting DNA damage in individual cells. **Methods.** 2009. doi:10.1016/j.ymeth.2009.02.016.
 154. Liu S, JE, Lee IM, Cole SR, Hennekens CH, Willett WC, Buring JE. Fruit and vegetable intake and risk of cardiovascular disease: the Women's Health Study. **Am J Clin Nutr.** 2000;72:922–8.
 155. Loest HB, Noh SK, Koo SI. Green tea extract inhibits the lymphatic absorption of cholesterol and α -tocopherol in ovariectomized rats. **J Nutr.** 2002; 132:1282–8.
 156. Lörliger J. **The use of antioxidants in foods.** In: O.I. Aruoma and B. Halliwell. *Free Radicals and Food Additives.* London. 1991. p. 121–150.

157. Lourenço CF, Gaco B, Barbosa RM, Freitas V, Laranjinha J. LDL Isolated from Plasma-Loaded Red Wine Procyanidins Resist Lipid Oxidation and Tocopherol Depletion. **J Agric Food Chem.** 2008. 56: 3798–3804.
158. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL. and Randall RJ. Protein measurement with the Folin-Phenol reagents. 1951. **J Biol Chem.** 193: 265-275.
159. Lu F, Gladden AB, Diehl JA. An alternatively spliced cyclin D1 isoform, cyclin D1b, is a nuclear oncogene. **Cancer Res.** 2003; 63: 7056–7061.
160. Machado JS, Frank AA, Eliane de Abreu Soares EA. Fatores dietéticos relacionados à doença de Alzheimer. **Rev Bras Nutr Clin.** 2006; 21(3):252-7.
161. McKay DL, Chen CY, Yeum KJ, Matthan NR, Lichtenstein AH, Blumberg JB. Chronic and acute effects of walnuts on antioxidant capacity and nutritional status in humans: a randomized, cross-over pilot study. **Nutr J.** 2010 May 12; 9:21.
162. Majhenic L, Kerget MS, Knez ZE. Antioxidant and antimicrobial activity of guarana seed extract. **Food Chem.** 2007; 104: 1258-68.
163. Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jiménez L. Polyphenols: food sources and bioavailability. **Am J Clin Nutr.** 2004; 79: 727-47.
164. Manach C, Williamson G, Morand C, Scalbert A, Rémésy C. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies1. **Am J Clin Nutr.** 2005;81(suppl):230S– 42S.
165. Mancini-Filho J, Van-Koijj A, Mancini DAP, Cozzolino FF, Torres RP. Antioxidant activity of cinnamon (*Cinnamomum Zeylanicum*, *Breyne*) extracts. **Boll. Chim Farmac** 1998; 137(11): 443-447.
166. Mann J. **Secondary metabolism.** Oxford: Clarendon. 2ª ed. 1987. 374p.
167. Maron DJ, Lu GP, Cai NS, Wu ZG, Li YH, Chen H, Zhu JQ, Jin XJ, Wouters BC, Zhao J. Cholesterol-lowering effect of a theaflavin-enriched green tea extract. randomized controlled trial. **Arch Intern Med.** 2003; 163: 1448-1453.
168. Manson MM, Gescher A, Hudson EA, Plummer SM, Squires MS, Prigent A. Blocking and suppressing mechanisms of chemoprevention by dietary constituents. **Toxicol Lett** 2000;112–113:499–505.
169. Martinello F. **Avaliação da atividade biológica do extrato de *Tamarindus indica* L. sobre o metabolismo lipídico e na carcinogênese coloretal em hamster.** [Dissertação de Doutorado apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas]. Ribeirão Preto, 2006.
170. Martins MMR. **Influencia da atividade física e do ambiente sobre os níveis de glutathione peroxidase e perfil lipídico em terceira idade.** Dissertação de mestrado apresentado ao Centro Universitário Feevale. Novo Hamburgo, 2007.
171. Mattei R, Dias RF, Espinola EB, Carlini EA, Barros SBM. Guarana (*Paullinia cupana*): toxic behavioral effects in laboratory animals and antioxidant activity *in vitro*. **J Ethnopharmacol.** 1998; 60:111–6.
172. Mazza G, Kay CD, Cottrell T. Holub, B. J. Absorption of anthocyanins from blueberries and serum antioxidant status in human subjects. **J Agric Food Chem.** 50:7731–7737; 2002.
173. Meagher EA, Barry OP, Lawson JA, Rokach J, FitzGerald GA. Effects of vitamin E on lipid peroxidation in healthy persons. **JAMA.** 2001;285: 1178–1182.

174. 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 Açai Juice and Pulp (*Euterpe oleracea* Mart.) in Human Healthy Volunteers. **J Agric Food Chem.** 2008; 56: 7796–7802.
175. Micallef M, Lexis L, Lewandowski P. Red wine consumption increases antioxidant status and decreases oxidative stress in the circulation of both young and old humans. **Nutr J.** 2007; 27(6): 1-8.
176. Michiels C, Raes M, Toussaint O, Remacle J. Importance of Se-glutathione peroxidase, catalase and Cu/Zn-SOD for cell survival against oxidative stress. **Free Radic Biol Med.** 1994; 17 (3): 235-248.
177. Miliauskas G, Venskutonis PR, Van Beek TA. Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. **Food Chemistry.** 2004; 85: 231–7.
178. Miura Y, Chiba T, Miura S, Tomita I, Umegaki K, Ikeda M, Tomita T. Green tea polyphenols (flavan-3-ols) prevent oxidative modification of low density lipoproteins: na ex vivo study in humans. **J Nutr Bioch.** 2000; 11: 216-200.
179. Moller P, Viscovich M, Lykkesfeldt J, Loft S, Jensen A, Poulsen HE.. Vitamin C supplementation decreases oxidative DNA damage in mononuclear blood cells of smokers.
180. Moncada S, Higgs A. Nitric oxide: role in human disease. Encyclopedia of Life Sciences. 2001.
181. Montagut G, Baiges I, Valls J, Terra X. *et al.*, A trimer plus a dimer-gallate reproduce the bioactivity described for an extract of grape seed procyanidins. **Food Chem.** 2009, 116, 265–270.
182. Moraes MLL, Micke GA, Fujiya NM, Tavares MFM. Separação e análise de metilxantinas em extratos de guaraná e erva mate por eletroforese capilar. **Rev Anal** 2003; (5): 44-50.
183. Moraes-de-Souza RA. **Potencial antioxidante e composição fenólica de infusões de ervas consumidas no Brasil.** [Dissertação de mestrado apresentada à Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz da USP]. São Paulo, 2007.
184. Motohashi H, Masayuki Y. Nrf2–Keap1 defines a physiologically important stress response mechanism. Trends in Molecular Medicine. 2004; 10 (11): 549-557.
185. Nacz M, Shahidi F. Extraction and analysis of phenolics in food. **Journal of Chromatography.** 2004; 1054(1-2): 95-111.
186. Naissides M, Mamo JCL, James AP, Pal S., The effect of chronic consumption of red wine on cardiovascular disease risk factors in postmenopausal women. **Atherosclerosis.** 2006; 185, 438–445.
187. Natella F, Nardini M, Belevi F, Scaccini C. Coffee drinking induces incorporation of phenolic acids into LDL and increases the resistance of LDL to ex vivo oxidation in humans. *Am J Clin Nutr.* 2007; 86(3): 604-609.
188. Nardini M, Cirillo E, Natella F, Scaccini C. Absorption of phenolic acids in human after coffee consumption. **J Food Agric Chem.** 2002; 50 (20): 5735-5741.
189. Nelson SK, Bose SK, Gary KG, Myhill P, McCord JM. The induction of human superoxide dismutase and catalase *in vivo*: A fundamentally new approach to antioxidant therapy. *Free Radical Biology & Medicine.* 20006; 40: 341 – 347.

190. NEPA – Núcleo de Estudo e Pesquisa em alimentação. **Tabela Brasileira de Composição dos Alimentos – TACO**. Campinas; Formula Editora. 2006
191. Niki E. Antioxidants and atherosclerosis. **Biochem Soc Transact**. 2004; 32: 156-9.
192. Nuutila AM, Puupponen-Pimia R, Aarni M, Oksman-Caldentey K-M. Comparison of antioxidant activities of onion and garlic extracts by inhibition of lipid peroxidation and radical scavenging activity. **Food Chemistry** 2003; 81: 485-93.
193. Oldham KM, Wise SR, Chen L, Stacewicz-Sapuntzakis M, Burns J, Bowen PE. A longitudinal evaluation of oxidative stress in trauma patients. **J Parenter Enteral Nutr**. 2002; 26(3): 189-97
194. Oliveira *et al*. Clinical toxicology study of na herbal medicinal extract of *Paullinia cupana*, *Trichilia catigua*, *Ptychopetalum olacoides* and *Zingiber officinale* (Catuana®) in Healthy Volunteers. **Phytother Res**. 2005; 19; 54-7.
195. Oliveira AC, Valentim IB, Silva CA, Bechar EJH, Barros MP, Mano CM, Goulart MO. Total phenolic content and free radical scavenging activities of methanolic extract powders of tropical fruit residues. **Food Chemistry**. 2009;155: 469–75.
196. Olusi SO. Obesity is an independent risk factor for plasma lipid peroxidation and depletion of erythrocyte cytoprotective enzymes in humans. **Int J Obes Relat Metab Disord** 2002; 26:1159–1164.
197. Organização Mundial da Saúde. **Obesity: preventing and managing the global epidemic**. Report WHO Consultation. Geneva. 2000.
198. Ozata M, Mergen M, Oktenli C *et al*. Increased oxidative stress and hypozincemia in male obesity. **Clin Biochem**. 2002; 35:627–631.
199. Otobone FJ, Sanches ACC, Nagae R, Martins JVC, Sela VR, Mello JCP de e Audi EA. Effect of Lyophilized Extracts from Guaraná Seeds [*Paullinia cupana* var. *sorbilis* (Mart.) Ducke] on Behavioral Profiles in Rats. **Phytother. Res**. 2007; 21: 531–535.
200. Ou B, Hampsch-Woodill M, Pior R. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. **Journal of the Agricultural and Food Chemistry**. 2001; 49(10): 4619-26.
201. Pádua Souza RMR, Sobral DP, Paz SMRS, Martins MCC, Prevalência de sobrepeso e obesidade entre funcionários plantonistas de unidades de saúde de Teresina, Piauí. **Rev Nutr Campinas**. 2007; 20(5):473-482.
202. Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med*. 1967. 1967; 70 (1):158-196.
203. Pal S, Ho N, Santos C, Dubois P, et al. Red wine polyphenolics increase LDL receptor expression and activity and suppress the secretion of ApoB100 from human HepG2 cells. **J Nutr**. 2003; 133, 700–706.
204. Pal S, Ho SS, Takechi R. Red wine polyphenolics suppress the secretion of ApoB48 from human intestinal caco-2 cells. **J Agric Food Chem**. 2005, 53, 2767–2772.
205. Pagliarussi RS, Freitas LAP, Bastos JK. A quantitative method for the analysis of xanthine alkaloids in *Paullinia cupana* (guaraná) by capillary column

- gas chromatography. *J Sep Sci* 2002; 25: 371-374.
206. Parthasarathy S, Steinberg D, Witztum JL. The role of oxidized low density lipoproteins in the pathogenesis of atherosclerosis. **Annu Rev Med.** 1992; 43:219–225.
 207. Peleg H, Bodine KK, Nobile AC. The influence of acid on adstringency of alum and phenolic compounds. **Chemical Senses.** 1998; 23 (3): .371-78.
 208. Phan CT, Tso P. Intestinal lipid absorption and transport. **Front. Biosci.**2001; 6: D229–D319.
 209. Pi J, Bai Y, Reece JM, Williams J, Liu D, Freeman ML, et al. Molecular mechanism of human Nrf2 activation and degradation: role of sequential phosphorylation by protein kinase CK2. **Free Radic Biol Med** 2007; 42(12): 1797–806.
 210. Pignatelli, P., Ghiselli, A., Buchetti, B., Carnevale, R. *et al.* Polyphenols synergistically inhibit oxidative stress in subjects given red and white wine. **Atherosclerosis** 2006; 188, 77–83.
 211. Pinelo M et al. Interaction among phenolics in food fortification: negative synergism on antioxidant capacity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington. 2004; 52: 1177-1180.
 212. Pool-Zobel BL, Lotzmann N, Knoll M, Kucheumeister F, Lambertz R, Leucht U, SchOder HG, Schmezer P. Detection of Genotoxic Effects in Human Gastric and Nasal Mucosa Cells Isolated from Biopsy Samples. **Environm Mol Mut** 1994; 24: 23-45.
 213. Pérez-Jiménez J, Saura-Calixto F. Effect of solvent and certain food constituents on different antioxidant capacity assays. **Food Res Intern.** 2006; 39 (7): 791-800.
 214. Piskula MK, Terao J. Accumulation of (–)-epicatechin metabolites in rat plasma after oral administration and distribution of conjugation enzymes in rat tissues. **J Nutr.**1998; 128:1172–8.
 215. Porrini M, Riso P, Brusamolino A, Berti C, Guarnieri S, Visioli F. Daily intake of a formulated tomato drink affects carotenoid plasma and lymphocyte concentrations and improves cellular antioxidant protection. **Br J Nutr.** 2003; 93–99.
 216. Princen *et al.* Antioxidant Levels and on LDL Oxidation in Smokers. No Effect of Consumption of Green and Black Tea on Plasma Lipid and on LDL Oxidation in Smokers. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.** 1998; 18: 833-841.
 217. Prior R L, Hoang H, Gu L, Wu X, Bacchiocca, Howard L, Hampsh-Woodill M, Huang D, Ou B, Jacob R. Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORAC_{FL}) of plasma and other biological and food samples. **Journal of Agricultural and Food Chemistry.** 2003, 51:3273-3279.
 218. Renaud D, De Lorgeril M. Wine, alcohol, platelets, and the French Paradox for coronary heart disease. **Lancet.** 1992: 339-1523.
 219. Renaud S, de Lorgeril M, Delaye M, Guidollet J, Jacquard F, Mamelie N, Martin JL, Monjaud I, Salen P, Toubol P. Cretan Mediterranean Diet for Prevention of Coronary Heart Disease. **Am. J. Clin. Nutr.** 1995; 61: 1360–1365.

220. Rice- Evans CA, Miller NJ; Paganda G. Antioxidant properties of phenolic compounds. **Trends Plant Sci.** 1997; 4:152-159.
221. Roberts LJ, Oates JA, Fazion S, Gross MD, Linton MF, Morrow JD. Alpha tocopherol supplementation reduces plasma F₂-isoprostane concentrations in hypercholesterolemic humans only at doses of 800 IU or higher. *Free Radic Biol Med.* 2002;33:S412
222. Rockenbach II, Silva GL, Rodrigues E, Kuskoski EM, Fett R. Influência do solvente no conteúdo total de polifenóis, antocianinas e atividade antioxidante de extratos de bagaço de uva (*Vitis vinifera*) variedades *Tannat* e *Ancelota*. **Ciênc. Tecnol. Aliment.** 2008; 28(Supl.): 238-244.
223. Rover Júnior L, Höehr NF e Kubota APVLT. **Sistema Antioxidante Envolvendo o Ciclo Metabólico da Glutathione Associado a Métodos Eletroanalíticos na Avaliação do Estresse Oxidativo.** *Quim. Nova.* 2001; 24(1):112-119.
224. Rowland I, Faughnan M, Hoey L, Wahala K, Williamson G, Cassidy A. Bioavailability of phyto-oestrogens. **Br J Nutr.** 2003; 89(suppl 1):838–52.
225. Scalbert A, Williamson G. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. **J Nutr.** 2002;130:2073S–85.
226. Scalbert A *et al.* Dietary Polyphenols and the Prevention of Diseases. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition.** 2005; 45(4): 287-306.
227. Santos SR *et al.* A monitorização plasmática das metilxantinas do guaraná e a importância na agregação plaquetária. **Rev Soc Toxicol.** 1989; 2(1)20-4.
228. Scalbert A, Williamson G. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. **J Nutr.** 2000; 130: 2073S–85S.
229. Scheline RR.CRC. **Handbook of mammalian metabolism of plant compounds.** Boca Raton, FL: CRC Press. 1991.
230. Schneider CD, Oliveira AR. Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. **Rev Bras Med Esporte.** 2004; 10(4): 308-313.
231. Seidemann J. Guarana (*Paullinia cupana* HB.K.) – an active agent from the tropical rain forest. **Tropenlandwirt.** 1998: 49–63.
232. Serafini M, Ghiselli A, Ferro-Luzzi A. *In vivo* antioxidant effect of green and black tea in man. *Eur. J. Clin. Nutr.* 1996; 50, 28–32
233. Seong-Hee Ko, Seong-Won Choi, Sang-Kyu Ye, Be-Long Cho, Hyun-Sook Kim, Myung. Chung. Comparison of the Antioxidant Activities of Nine Different Fruits in Human Plasma. **J Med Food.** 2005; 8(1): 2005, 41–46.
234. Serviço Brasileiro de Respostas Técnicas (SBRT). **Fabricação de xarope de guaraná, extrato de guaraná e guaraná em pó.** Disponível em: <<http://www.sbrt.ibict.br>> Acesso em [2008 Jan 14].
235. Sheweita SA. Drug-metabolizing enzymes: mechanisms and functions. **Curr Drug Metab** 2000;1:107–32.
236. Setchell KD, Faughnan MS, Avades T, et al. Comparing the pharmacokinetics of daidzein and genistein with the use of 13C-labeled tracers in premenopausal women. **Am J Clin Nutr.** 2003; 77:411–9.
237. Shahidi F, Janitha PK, Wanasundara PD. Phenolic antioxidants. **Crit Rev Food Sci Nutr.** 1992; 32:67-103.
238. Schmidt M, Schmitz HJ, Baumgart A, et al. Toxicity of green tea extracts and

- their constituents in rat hepatocytes in primary culture. **Food Chem Toxicol.** 2005;43:307–14. Shahidi, F.; Naczki, M. Methods of analysis and quantification of phenolic compounds. *Food Phenolic: Sources, Chemistry, Effects and Applications*; Technomic Publishing Company, Inc.: Lancaster, PA, 1995: 287–293.
239. Shelnutt SR, Cimino CO, Wiggins PA, Badger TM. Urinary pharmacokinetics of the glucuronide and sulfate conjugates of genistein and daidzein. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.** 2000; 9: 413–9.
 240. Shi J, Nawaz H, Pohorly J, Mittal G, Kakuda I, Jiang Y. Extraction of polyphenolics from plant material for functional foods - engineering and technology. **Food Reviews International** 2005; 21: 139-166.
 241. Sies H. Review: strategies of antioxidant defense. **Eur J Biochem.** 1993; 215: 213-9.
 242. Singh RB, Niaz MA, Sharma JP, Kumar R, Bishnoi I, Begon R. Plasma levels of antioxidant vitamins and oxidative stress in patients with acute myocardial infarction. **Acta Cardiol.** 1994; 41: 441-452.
 243. Soares, SE. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Rev Nutr Campinas** 2002; 15(1): 71-81.
 244. Soares M, Welter L, Kuskoski EM, Gonzaga L, Fett R. Compostos fenólicos e atividade antioxidante da casca de uvas Niágara e Isabel. **Revista Brasileira de Fruticultura Rev Bras Frutic.** 2008; 30 (1).
 245. Sociedade Brasileira de Cardiologia. **III Diretrizes Brasileiras Sobre Dislipidemias e Diretriz de Prevenção da Aterosclerose do Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia.** 2001.
 246. Soong Y, Barlow PJ. Antioxidant activity and phenolic content of selected fruit seeds. **Food Chemistry.** 2004; 88: 411-17.
 247. Spigno G, Tramelli L, De Faveri DM. Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics. *Journal of Food Engineering.* 2007; 81: 200–208.
 248. Stein JH, Keevil JG, Wiebe DA, Aeschlimann S, Folts JD. Purple grape juice improves endothelial function and reduces the susceptibility of LDL cholesterol to oxidation in patients with coronary artery disease. **Circulation.** 1999; 100, 1050–1055.
 249. Stoker R, Keaney-Jr J F. Role of oxidative modifications in atherosclerosis. **Physiol Rev.** 2004; 84: 1381-78.
 250. Sun T, Ho C. Antioxidant activities of buckwheat extracts. **Food Chemistry.** 2005; 90(4): 743-749.
 251. Sung H, Nah J, Chun S, ParkH, Yang SE Min WK. *In vivo* antioxidant effect of green tea. **Eur J Clin Nutr.** 2000; 54: 527–529.
 252. Superintendência da Zona Franca de Manaus (SUFRAMA). Projeto Potencialidades regionais Estudo de Viabilidade Econômica. Guaraná. Julho 2003. Disponível em: <http://www.suframa.gov.br/publicacoes/proj_pot_regionais/guarana.pdf>. Acesso em [2008 Jul 21].
 253. Surh YJ. Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. **Nat Rev Cancer.** 2003;3:768–80.
 254. Tabart J, Kevers C, Sipel A, Pincemail J, Defraigne JO, Dommes J.

- Optimisation of extraction of phenolics and antioxidants from black currant leaves and buds and of stability during storage. **Food Chemistry**. 2007; 105: 1268–1275.
255. Takechi R, Hiramatsu N, Mamo JSP. Red wine polyphenolics suppress the secretion and the synthesis of apo B48 from human intestinal caco-2 cells. **Biofactors**. 2004, 22, 181–183.
 256. Taubert D, Berkels R, Roesen R, Klaus W. Chocolate and blood pressure in elderly individuals with isolated systolic hypertension. **J Am Med Assoc**. 2003; 290: 1029–1030.
 257. Tfouni SAV, Camargo MCR, Menegário TF, Toledo, MCF. Contribuição do guaraná em pó (*Paullinia cupana*) como fonte de cafeína na dieta. **Rev Nutr Campinas**. 2002; 20 (1): 63-8.
 258. Thomas M.J. The role of free radicals and antioxidants. **Nutrit**. 2000; 16(7/8):16-18.
 259. US Department of Health and Human Services and US Department of Agriculture (HHS/USDA). *Dietary Guidelines for Americans, 2005*. 6th Edition, Washington, DC: U.S. Government Printing Office. 2005.
 260. van het Hof KH, Boer HS, Wiseman SA, Lien N, Weststrate JA, Tijburg LB. Consumption of green or black tea does not increase resistance of low-density lipoprotein to oxidation in humans. **Am J Clin Nutr**. 1997; 66: 1125-1132.
 261. van het Hof KH, Wiseman SA, Yang CS, Tijburg LB. Plasma and lipoprotein levels of tea catechins following repeated tea consumption. **Proc Soc Exp Biol Med**. 1999; 220: 203–9.
 262. Vasconcelos SML, Goulart, MOF, Moura JBF, Manfredini V, Benfato MS, Kubota LT. Espécies reativas de Oxigênio e de Nitro gênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Quim. Nova**. 2007; 30 (5): 1323-1338.
 263. Vandenbroucke, ID, Vericel E, Janiel C, Carreras M, Lecomte M, Lagarde M. Dual regulation of glutathione peroxidase by docosahexaenoic acid in endothelial cells depending on concentration and vascular bed origin. **Free Rad Biol Med**. 2001; 30: 895-904.
 264. Vasques ANJ, Pereira PF, Gomide RM, Batista MC, Campos MTF, Sant'ana LFR, Rosado LEFPL, Priore SE. Influência do Excesso de Peso Corporal e da Adiposidade Central na Glicemia e no Perfil Lipídico de Pacientes Portadores de Diabetes Mellitus Tipo 2. **Arq Bras Endocrinol Metab**. 2007; 51-9.
 265. Vidal R, Hernandez-Vallejo S, Pauquai T, Texier O *et al.*, Apple procyanidins decrease cholesterol esterification and lipoprotein secretion in caco-2/tc7 enterocytes. **J Lipid Res**. 2005, 46, 258–268.
 266. Vigna GB, Costantini F, Aldini G, Carini M. et al., Effect of a standardized grape seed extract on low-density lipoprotein susceptibility to oxidation in heavy smokers. **Metabolism**. 2003; 52, 1250–1257.
 267. Vinson, J. A., Teufel, K., Wu, N., Red wine, dealcoholized red wine, and especially grape juice, inhibit atherosclerosis in a hamster model. **Atherosclerosis**. 2001; 156, 67–72.
 268. Vizzotto M, Pereira MC. **Metodologia Científica: Otimização do Processo de Extração de Compostos Fenólicos Antioxidantes de Mirtilo (*Vaccinium ashei* Reade)**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2009; 19 p. (Embrapa Clima Temperado. Boletim de pesquisa e desenvolvimento, 101)

269. Xu B, Chang SKC. A comparative study on phenolic profiles and antioxidant activities of legumes as affected by extraction solvents. **Journal of Food Science**.
270. Yeh CT, Yen GC. Induction of Hepatic Antioxidant Enzymes by Phenolic Acids in Rats Is Accompanied by Increased Levels of Multidrug Resistance–Associated Protein 3 mRNA Expression. Biochemical, Molecular, and Genetic Mechanisms. **J Nutr** 2006; 136: 11-15.
271. Yeh CT, Yen GC. Effects of phenolic acids on human phenolsulfotransferase in relation to their antioxidant activity. **J Agric Food Chem**. 2003; 51: 1474–9. 2007; 72(2): 159-166.
272. Yilmaz, Y, Toledo RT. Oxygen radical absorbance capacities of grape/wine industry byproducts and effect of solvent type on extraction of grape seed polyphenols. **Journal of Food Composition and Analysis**. 2006; 19: 41–48.
273. Yologlu S, Sezgin AT, Sezgin N, Ozdemir R, Yesilada E, Topal E. Determination of risk factor i obese and non-obese patients with coronary artery disease. **Acta Cardiol**. 2005; 60:625-9.
274. Young JF, Dragsted LO, Haraldstóttir J, Daneshvar B, Kall MA, Loft S, Nilsson L, Nielsen SE, Mayer B, Skibsted LH, Huynh-Ba T, Hermetter A, Sandström. Green tea extract affects markers of oxidative status postprandially: lasting antioxidant effect of flavonoid-free diet. **British Journal of Nutrition**. 2002; 87: 343-355.
275. Yu R, Chen C, Mo YY, Hebbar V, Owuor ED, Tan TH, et al. Activation of mitogen-activated protein kinase pathways induces antioxidant response element-mediated gene expression via a Nrf2-dependent mechanism. **J Biol Chem** 2000; 275(51):39907–13.
276. Yu L *et. al.* Antioxidant properties of hard winter wheat extracts. **Food Chemistry**. 2002; 78(4): 457-461.
277. Warden BA, Smith LS, Beecher GR, Balentine DA, Clevidence BA. Catechins are bioavailable in men and women drinking black tea throughout the day. **J Nutr**. 2001;131: 1731–7.
278. Wan Y, Vinson JA, Etherton TD, Proch J et al. Effects of cocoa powder and dark chocolate on ldl oxidative susceptibility and prostaglandin concentrations in humans. **Am J Clin Nutr**. 2001; 74, 596–602.
279. Wassmann S, Wassmann K, Nickenig G. Modulation of oxidant and antioxidant enzyme expression and function in vascular cells. **Hypertension**. 2004; 44: 381-386.
280. Wasson GR, McKelvey-Martin VJ, Downes CS. The use of the comet assay in the study of human nutrition and cancer. *Mutagenesis*. 2008; 23: 153–162.
281. Weisel T, Baum M, Eisenbrand G, An anthocyanin/polyphenolic-rich fruit juice reduces oxidative DNA damage and increases glutathione level in healthy probands. **Biotechnol. J**. 2006; 1:388-397
282. Williamson G, Manach C. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. II. Review of 93 intervention studies. **Am J of Clin Nut**. 2005; 81: 243S–255S.
283. Wilms LC, Hollman PC, Boots AW, Kleinjans JC. Protection by quercetin and quercetin-rich fruit juice against induction of oxidative DNA damage and formation of BPDE-DNA adducts in human lymphocytes. **Mutat. Res**. 2005;582:155-162.

284. Zhang DD, Lo SC, Cross JV, Templeton DJ, Hannink M. Keap1 is a redoxregulated substrate adaptor protein for a Cul3-dependent ubiquitin ligase complex. **Mol Cell Biol** 2004; 24(24):10941–53.
285. Zhao Z, Egashira Y, Sanada H. Ferulic acid is quickly absorbed from rat stomach as the free form and then conjugated mainly in liver. **J Nutr.**2004;134:3083–8.
286. Zhou K, Yu L.**Effects of extraction solvent on wheat bran antioxidant activity extimation.** Lebensm- Wiss. Technol.. London. 2004; 37(4): 717- 721.
287. Zern TL, West KL, Fernandez ML. Grape polyphenols decrease plasma triglycerides and cholesterol accumulation in the aorta of ovariectomized guinea pigs. **J Nutr.** 2003;133:2268–72.
288. Zern, T. L., Wood, R. J., Greene, C., West, K. L. *et al.*, Grape polyphenols exert a cardioprotective effect in pre- and postmenopausal women by lowering plasma lipids and reducing oxidative stress. *J. Nutr.* 2005, *135*, 1911–1917.
289. Ziegler S, Kostner K, Thallinger C, Bur A, Brunner M, Wolzt M, Joukhadar C. Wine Ingestion Has No Effect on Lipid Peroxidation Products. **Pharmacology.** 2005; 75: 152-6.

ANEXO 1

Avaliação da Atividade Antioxidante do Guaraná (*Paullinia cupana*)

Nome: _____ Idade: _____ Data: ____/____/____

FICHA DE AVALIAÇÃO NUTRICIONAL

Peso (Kg)	Altura (m)	IMC (Kg/m ²)	Classificação:
Peso Ideal (kg)	EXAMES: Glicemia:		
CA (cm)	Colesterol total:		
	HDL:		
	LDL:		
	Triglicérides:		

ALIMENTAÇÃO HABITUAL

Hábito intestinal:

Ingestão de líquidos:

Atividade física:

Café da Manhã (: hrs)	Lanche (: hrs)
Lanche (: hrs)	Jantar (: hrs)
Almoço (: hrs)	Colação (: hrs)

Café		Balas (choco/café)		Vinho	
Chá mate/ preto		Capuccino		Bebidas destiladas	
Achocolatado		Refrigerante		Doces (choco/café)	
Chocolate		Cerveja		outros	

Conduta nutricional:

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE SAÚDE PÚBLICA
Av. Dr. Arnaldo, 715 - CEP: 01246-904 - São Paulo.
Fone: 3061-7857 ou 3061-7748
Fone/Fax: (011) 3061-7130.

ANEXO 2

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Resolução n. 196, de 10 de outubro de 1996, segundo o Conselho Nacional de Saúde.

Título da Pesquisa: Avaliação da atividade antioxidante do guaraná (*Paullinia cupana*)

População de estudo: voluntários selecionados pelo Grupo da Unidade de Pesquisa Café e Coração vinculada à Unidade de Coronariopatia Crônica do InCor- Instituto do Coração do HC-FMUSP.

Objetivo da Pesquisa: avaliar o potencial antioxidante do guaraná sobre o plasma e a LDL de humanos pela ingestão de bebida a base de pó de guaraná.

Participação na Pesquisa: a participação neste estudo implica nos seguintes procedimentos:

- 4 (quatro) coletas de amostras de sangue (volume de 40,0 ml para cada coleta) por profissional capacitado, sendo que a primeira coleta de sangue será realizada em jejum (T = 1) após 15 dias de acompanhamento (*washout*). Em seguida, os voluntários deverão ingerir a bebida a base de pó de guaraná e após duas horas do consumo será coletada segunda amostra de sangue (T=2). Os voluntários deverão consumir a bebida diariamente em jejum durante 15 dias (período de intervenção). No 30º dia os voluntários serão submetidos a uma terceira coleta em jejum (T=3) e nova coleta de sangue após 2h da ingestão da bebida (T= 4);
- coleta de informações alimentares do paciente obtidas pela aplicação de Recordatório de 24 horas;
- o voluntário deverá permanecer em repouso durante o período de exame (2 horas).

Riscos: durante a execução do projeto todos os materiais serão descartáveis. Esta pesquisa não envolve risco a integridade física e moral do voluntário.

Benefícios: as informações obtidas nesta pesquisa serão úteis cientificamente para avaliar a variação no grau de proteção às reações de oxidação em plasma e LDL de humanos após intervenção com bebida a base de pó de guaraná.

Compensações: O voluntário receberá um lanche após as coletas de amostras de sangue e reembolso de gastos despendidos com transporte público (ônibus e/ou metrô) até o local de coleta das amostras (Instituto do Coração do HC-FMUSP. Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 44. Cerqueira Cesar. CEP: 05403900 - São Paulo, SP – Brasil). Após a conclusão da fase experimental os voluntários serão informados a respeito dos principais resultados obtidos.

Confiabilidade: Será garantido total sigilo a respeito da participação nesta pesquisa. Os dados obtidos neste estudo poderão ser divulgados em publicações, congressos, porém sem a identificação do voluntário.

Direito de recusa ou desistência: o voluntário poderá desistir de participar nesta pesquisa a qualquer momento. Caso isto ocorra, terá que devolver todos os materiais fornecidos pela equipe de pesquisadores sem maiores consequências.

Maiores informações:

PESQUISADORES:

Mestranda: Carolina de Aguiar Martins

Coordenadora-Chefe: Profa. Assoc. Elizabeth Aparecida Ferraz da Silva Torres.

Laboratório de Bromatologia, Departamento de Nutrição da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo. Av. Dr. Arnaldo, 715. CEP: 01246-904, SP. Telefones: (11)3061-7748 e/ou (11) 3061-7857.

Colaborador: Dr. Luiz Antônio Machado César - Grupo da Unidade de Pesquisa Café e Coração vinculada à Unidade de Coronariopatia Crônica do InCor- Instituto do Coração do HC-FMUSP. Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 44. Cerqueira Cesar. CEP: 05403900 - São Paulo, SP – Brasil. Telefone: (11)3069-5387. Fax (11) 3069-5348

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – COEP/FSP

Av. Dr. Arnaldo, 715 – Assessoria Acadêmica – CEP: 01246-904 – São Paulo – SP

Telefones: (55-11) 3061-7779/ 7742 e-mail:coep@fsp.usp.br site: www.fsp.usp.br

Eu, voluntário saudável, declaro estar ciente do compromisso assumido na minha colaboração com esta pesquisa e desejo participar da mesma.

São Paulo, ____ de _____ de 2010

Assinatura do voluntário

Assinatura do pesquisador

Nome do Voluntário:.....

R.G. nº :..... Sexo: () M () F

Data de Nascimento:...../...../.....

Endereço:.....Nº:.....Apto:.....

Bairro:.....Cidade:.....

CEP:.....Telefones:.....

ANEXO 3

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – COEP/FSP

Universidade de São Paulo
Faculdade de Saúde Pública

Of.COEP/ 166/ 08

Protocolo 1817

Projeto de Pesquisa AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE IN VIVO E IN VITRO DO GUARANA

Pesquisador(a) Carolina de Aguiar Martins

11 de JULHO de 2008.

Prezado(a) Orientador(a),

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo - COEP analisou, em sua 6.ª/08 Sessão ORDINÁRIA, realizada em 04/07/2008, de acordo com os requisitos da Resolução CNS/196/96 e suas complementares, o protocolo de pesquisa acima intitulada e o considerou **APROVADO**.

Cabe lembrar que conforme Resolução CNS/196/96 são deveres do (a) pesquisador (a):

1. Comunicar, de imediato, qualquer alteração no projeto e aguardar manifestação deste CEP (Comitê de Ética em Pesquisa), para dar continuidade à pesquisa;
2. Manter sob sua guarda e em local seguro, pelo prazo de 5 (cinco) anos, os dados da pesquisa, contendo fichas individuais e todos os demais documentos recomendados pelo CEP, no caso eventual auditoria;
3. Comunicar, formalmente a este Comitê, quando do encerramento deste projeto;
4. Elaborar e apresentar relatórios parciais e finais;
5. Justificar, perante o CEP, interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

Atenciosamente,

Cláudio Leone
Professor Associado

Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa – FSP/COEP

Ilm.ª Sr.ª
Prof.ª Dr.ª ELIZABETH APARECIDA F. DA S. TORRES
DEPARTAMENTO DE NUTRIÇÃO

ANEXO 4

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – COEP/FSP

Universidade de São Paulo
Faculdade de Saúde Pública

OF.COEP/207/09

São Paulo, 05 de junho de 2009.

Prezado(a) Pesquisador(a),

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo - COEP **encaminhou** o protocolo de pesquisa n.º **1850**, intitulado "**(CEA) AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE IN VIVO E IN VITRO DO GUARANÁ**", sob responsabilidade do(a) pesquisador(a) **Elizabeth Aparecida Ferraz da Silva Torres**, para apreciação do Sub-Comitê de Ética Ambiental.

O Sub-Comitê de Ética Ambiental da Faculdade de Saúde Pública analisou as informações sobre os resíduos químicos do projeto sob sua responsabilidade, concluindo pela sua aprovação, haja vista que os resíduos a serem gerados encontram-se dentro da categoria que a Faculdade de Saúde Pública está licenciada, aduzindo que o destino dado aos mesmos será adequado, de acordo com as normas estabelecidas pelo Comitê Interno de Biossegurança.

Cabe informar que a Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo possui desde 10 de novembro de 2004, "Certificado de Aprovação para o Destino de Resíduos Industriais", sob n.º 45001604, expedido pela CETESB (Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental), específico para o destino de "reagentes de laboratórios" que tem como procedimento padrão a contratação de empresa licenciada para o transporte e incineração desses resíduos.

Diante do exposto, O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo - COEP/FSP, em sua **5.ª/09 Sessão Ordinária** realizada em **03/07/2009** considera o protocolo de pesquisa **APROVADO**.

Atenciosamente,

Cláudio Leone
Professor Titular

Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa - COEP

Ilm.ª Sr.ª

Prof.ª Assoc. Elizabeth Apa. F. da Silva Torres
Departamento de Nutrição
Faculdade de Saúde Pública – USP

CURRICULO LATTES – CAROLINA DE AGUIAR MARTINS

Possui graduação em Nutrição pela Universidade de São Paulo (2007) e atualmente é aluna regular do curso de Pós-Graduação em Nutrição em Saúde Pública pela Universidade de São Paulo. Tem experiência na área de ciência de alimentos atuando principalmente nos seguintes temas: atividade antioxidante, oxidação lipídica e guaraná.

Endereço para acessar este CV:

<http://lattes.cnpq.br/6374157518730067>

Dados Pessoais

Nome Carolina de Aguiar Martins

Nascimento 29/08/1984 - São Paulo/SP - Brasil

Formação Acadêmica/Titulação

2008	Mestrado em Nutrição em Saúde Pública. Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil Título: AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE <i>IN VITRO</i> E <i>IN VIVO</i> DO GUARANÁ (<i>Paullinia cupana</i>) Orientador: Elizabeth Aparecida Ferraz da Silva Torres Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
2003 - 2007	Graduação em Nutrição. Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil
2000 - 2002	Ensino Médio (2o grau). Colégio Universitário Taboão da Serra, CUTS, Brasil
1992 - 1999	Ensino Fundamental (1o grau). Colégio Visconde de Porto Seguro, PS, Brasil

CURRICULO LATTES – ELIZABETH APARECIDA FERRAZ DA SILVA TORRES

Concluiu o Doutorado em Ciência dos Alimentos (São Paulo, SP) pela Universidade de São Paulo, em 1988. Foi Visiting Scholar na MSU de 1986 a 1987, como bolsista Fulbright Commission. Professora Associada - desde 2000 na Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo. Publicou 83 artigos em periódicos especializados e 126 trabalhos em anais de eventos. Possui 4 livros publicados, 1 processo, 1 software e 1 patente técnica além de outros 30 itens de produção técnica. Participou de 11 eventos no exterior e 78 no Brasil. Supervisionou 1 pós-doutor com bolsa da FAPESP e supervisiona um Jovem Pesquisador com auxílio e bolsa da FAPESP. Orientou 22 dissertações de Mestrado, 11 teses de Doutorado e co-orientou 1 tese de Doutorado, em complemento orientou 22 trabalhos de Iniciação Científica nas áreas de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Nutrição e Saúde Coletiva. Recebeu 6 Prêmios/Homenagens. Atua diretamente na área de Ciência e Tecnologia de Alimentos com ênfase em quatro linhas de pesquisa: 1) Lipídios, ácidos graxos, colesterol, fitoesterol e seus produtos de oxidação. 2) Antioxidantes e substâncias bioativas. 3) Carnes, Aves e Pescados 4) Microsossomos, Lipossomos e Sistemas Modelo. Em suas atividades profissionais, interagiu com 165 colaboradores em co-autorias de trabalhos científicos. Em seu CV Lattes, os termos mais frequentes na contextualização da produção científica, tecnológica e artístico cultural, são: aulas ministradas, comissões, grupos de trabalho, valor nutricional, segurança alimentar, lipídios, qualidade higiênico sanitária, substitutos de gordura, alimentos funcionais e tecnologia de alimentos. Em 09/09/2010 apresentou fator H=8 na base SCOPUS.

Última atualização do currículo em 30/09/2010

Endereço para acessar este CV:

<http://lattes.cnpq.br/9804923403746874>