UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos
Área de Bromatologia

Avaliação das propriedades anti-hiperlipidêmicas do cupulate®

Thiago Belchior de Oliveira

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientadora:
Prof. Dr. MARIA INÉS GENOVESE

São Paulo
2011

Thiago Belchior de Oliveira

Avaliação das propriedades anti-hiperlipidêmicas do cupulate[®]

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestrado

Prof. Dr. Maria Inés Genovese
Orientador / Presidente

1^o examinador

2^o examinador

São Paulo, ____ de _____ de 2011

Dedico este trabalho a meus pais Carlos Artur e Angélica, a meu irmão Bruno e minha noiva Nájela.

Vocês foram o alicerce dessa conquista.

Agradecimentos

Este trabalho é fruto da paciência, compreensão e persistência de muitas pessoas que não mediram esforços para me ensinar conhecimentos técnicos e lições de vida.

Agradeço a minha orientadora Inés pela oportunidade concedida e confiança depositada em meu trabalho. Minhas amigas e amigos de laboratório e de prosas diversas, Any, Marcela, Ciça, Gabi, Diully, Alice, Alexandre, Wilsinho, Santiago. Obrigado aos funcionários Lúcia, Márcia, Tânia, Aline, Joana, Lurdinha, Luciene, Tatiane, Ivani, Rosa. Aos funcionários do biotério, Flávia, Fátima, Renata, Débora e outros, pelos ensinamentos no tratamento e respeito aos animais.

Sou eternamente grato aos meus amigos (irmãos) de república, Raphael, Ricardo e Marcelo. Estes dividiram comigo suas aspirações, angústias, sonhos, idéias e como de praxe falaram muita besteira e me fizeram rir inúmeras vezes.

Obrigado família, que mesmo fisicamente distante contribuiu enormemente com mais essa realização pessoal. Obrigado Ná, meu amor, por mais esse período de compreensão com a construção de nosso futuro.

Enfim agradeço à FAPESP pela bolsa concedida e auxílio financeiro ao laboratório.

RESUMO

OLIVEIRA, T.B. **Avaliação das propriedades anti-hiperlipidêmicas do cupulate®**. 2011. 116f. Dissertação (mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

O cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Willd. Ex Spreng. K. Shum) é um fruto nativo brasileiro com boa palatabilidade e grande potencial agroeconômico. Suas sementes são usadas no preparo de um produto similar ao chocolate de cacau (*Theobroma cacao* L.), conhecido como cupulate®. Os benefícios do cacau à saúde cardiovascular são amplamente descritos. A proximidade filogenética entre cacau e cupuaçu sugere que este último poderia ter efeitos biológicos semelhantes. Entretanto não há estudos que avaliaram a influência do líquido de cupuaçu em doenças metabólicas. Aqui, nós comparamos a composição centesimal e mineral, os conteúdos de compostos fenólicos totais, proantocianidinas, flavonóides e a capacidade antioxidante in vitro dos líquidos de cupuaçu e cacau. As composições, centesimal e mineral, de ambos foram semelhantes. Todos os outros parâmetros foram significativamente maiores no líquido de cacau, contudo, o perfil de flavonóides foi muito distinto. No cupuaçu predominaram os flavonóides derivados de quercetina enquanto que no cacau, as proantocianidinas corresponderam à maior classe de compostos fenólicos. Foram estudados os efeitos dos extratos fenólicos dos líquidos de cupuaçu e cacau na atividade das enzimas α -amilase e glicosidase. As inibições das atividades enzimáticas foram semelhantes às relatadas na literatura para outras frutas. A fim de investigar a influência dos líquidos de cupuaçu e cacau em algumas disfunções metabólicas, nós estudamos o efeito desses líquidos em um modelo de ratos com diabetes induzida por estreptozotocina e em ratos alimentados com ração hiperlipídica (HL). A administração oral dos líquidos nas doses de 3,6 e 7,2 g/kg de peso corpóreo a ratos diabéticos melhorou significativamente as atividades das enzimas antioxidantes, perfil lipídico e peroxidação lipídica de maneira dose-dependente. Semelhantemente, os extratos fenólicos dos líquidos nas doses 2,1 e 7,2 g/kg de peso corpóreo administrados a animais alimentados com ração hiperlipídica reparou o dano hepático devido à melhora da peroxidação lipídica, capacidade antioxidante plasmática e tecidual com relação dose-dependente. Além disso, a sensibilidade a glicose e insulina nos animais alimentados com ração (HL)

foram aumentadas pelo tratamento com a maior dose do extrato fenólico do líquido de cupuaçu. Embora o líquido de cacau possua maior conteúdo de compostos fenólicos e atividade antioxidante *in vitro* comparado ao cupuaçu, este último mostrou-se mais efetivo na redução do dano causado pela diabetes e dieta hiperlipídica. Essas contradições podem ser explicadas pela diferente composição fenólica entre os dois líquidos. A análise conjunta desses resultados sugere que o líquido de cupuaçu, assim como o cacau, poderia auxiliar no tratamento de distúrbios metabólicos associados com o estresse oxidativo.

Palavras-chave: Cupuaçu. Cacau. Compostos fenólicos. Distúrbios metabólicos. Estresse oxidativo.

Abstract

OLIVEIRA, T.B. **Evaluation of anti-hyperlipidemic activity of cupulate®**. 2011. 116f. Dissertação (mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

Cupuassu (*Theobroma grandiflorum* Willd. Ex Spreng. K. Shum) is a native Brazilian fruit with good flavor and great agro-economic potential. Its seeds are used to prepare a cocoa (*Theobroma cacao* L.) chocolate-like, known as cupulate®. The cocoa beneficial properties to cardiovascular health have been extensively described. Despite the phylogenetic similarity between cocoa and cupuassu suggests that the later could promote the same biological effects, no study has attempted to examine the role of cupuassu liquor on metabolic disorders. Here, we compared the centesimal and mineral composition, contents of total phenolic compounds, proanthocyanidins, flavonoids and *in vitro* antioxidant capacity of cupuassu and cocoa liquors. Centesimal and mineral compositions of both were similar. All the other parameters were significantly higher in cocoa liquor. However, flavonoids profile was quite different, where quercetin derivatives predominated in cupuassu whereas in cocoa, the proanthocyanidins corresponded to the major class of phenolic compounds. Studies were undertaken to determine the effect of phenolic extracts on α -amylase and glucosidase activities. The enzymatic activities inhibitions were close to that previously related to other fruits. To further investigate the role of cupuassu and cocoa liquors on metabolic disturbs, we assessed the effect of these liquors in streptozotocin-induced diabetic and high-fat diet (HFD) rats. Oral administrations of liquors at doses 3.6 and 7.2 g/kg body weight to diabetic rats improved significantly antioxidant enzymes activities, lipid profile and peroxidation in dose-dependent manner. Similarly, liquors phenolic extracts at doses 2.1 and 7.2 g/kg body weight administrated to HFD animals repaired the liver damage by ameliorating lipid peroxidation, plasma and tissue antioxidant capacities in dose dependence. Indeed, HFD animal sensitivity for glucose and insulin was markedly augmented in animals treated with the highest dose of phenolic extract of cupuassu. Although cocoa has higher content of phenolic compounds and *in vitro* antioxidant potential activity than cupuassu, the later showed more effectively in reducing the damage in animal models of diabetes and high-fat diet. These contradictions could be explained due to

differences in phenolic composition in cupuassu and cocoa liquors. Taken together, these results suggest the cupuassu liquor, as well as cocoa liquor, could help in treatment of metabolic diseases associated with oxidative stress.

Keywords: Cupuassu. Cocoa. Phenolic compounds. Metabolic disorders. Oxidative stress.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fluxograma da fabricação do chocolate/cupulate[®] baseado em Mororó (2007).

Figura 2. Estrutura básica dos flavonóides.

Figura 3. Estruturas das principais classes de flavonóides

Figura 4. Procianidina C, um tanino condensado.

Figura 5. (A) Formação dos intermediários reativos a partir do oxigênio molecular. (B) Ações de enzimas antioxidantes. G-SH = glutathione reduzida; G-S-S-G = glutathione oxidada (CHAMPE, 2009).

Figura 6. Divisão dos animais em grupos e determinação dos períodos *baseline* e tratamento.

Figura 7. Teor de compostos fenólicos totais (Folin-Ciocalteu) e proantocianidinas totais (butanol acidificado) do líquido de cupuaçu em diferentes misturas de solventes extratores. Letras diferentes sobre as colunas indicam diferença estatística ($p < 0,05$)

Figura 8. Curva de peso dos grupos experimentais ($n=12$ /grupo) durante 40 dias de tratamento.

Figura 9. Consumo diário de água (A) e ração (B) dos grupos experimentais. Os valores são expressos como média $\pm$ desvio-padrão ($n=12$ /grupo). Barras com letras distintas diferem estatisticamente ($p < 0,05$).

Figura 10. Porcentagem do peso corpóreo do fígado (A), cérebro (B) e rins (C) após 40 dias de tratamento. Os valores são expressos como média $\pm$ desvio-padrão ($n=12$ / grupo). Colunas com letras distintas diferem estatisticamente entre si. * indica diferença ($p < 0,05$) em relação ao controle. ***indica diferença ($p < 0,0001$) em relação ao controle.

Figura 11. Dosagem glicêmica dos grupos experimentais durante o período de tratamento. Os valores são expressos como média $\pm$ desvio-padrão ($n=12$ /grupo). Não houve diferença estatística ($p < 0,05$).

Figura 12. Dosagens em mg/dL de triacilgliceróis (A), colesterol total (B) e HDL colesterol (C) dos grupos controle e tratados. Os valores são expressos como média $\pm$ desvio-padrão ($n=12$ /grupo). Letras diferentes sobre as colunas indicam diferença estatística ($p < 0,05$).

Figura 13. Dosagens em mg/dL de uréia (A) e creatinina (B) dos grupos controle e tratados. Os valores são expressos como média $\pm$ desvio-padrão (n=12/grupo). Não houve diferença estatística entre os grupos ($p < 0,05$).

Figura 14. Capacidade antioxidante e peroxidação lipídica em fígados (A), cérebros (B) e rins (C) de ratos com diabetes induzida por estreptozotocina. Os valores são expressos como média $\pm$ desvio-padrão (n=12/grupo). Letras distintas sobre as colunas indicam diferença estatística. * indica diferença estatística ($p < 0,05$) em relação ao controle. **indica diferença estatística ($p < 0,01$) em relação ao controle. ***indica diferença estatística ($p < 0,0001$) em relação ao controle.

Figura 15. Atividade antioxidante e peroxidação lipídica plasmática de ratos *Wistar* com diabetes induzida por estreptozotocina. ORAC (A), FRAP (B) e TBARS (C). Os valores são expressos como média $\pm$ desvio-padrão (n=12/grupo). Letras distintas sobre as colunas indicam diferença estatística. * indica diferença estatística ($p < 0,05$) em relação ao controle. **indica diferença estatística ($p < 0,01$) em relação ao controle.

Figura 16. Atividade das enzimas antioxidantes CAT, SOD e GPx em fígados (A), cérebros (B), rins (C), eritrócitos (D) e plasma (E) de ratos com diabetes induzida por estreptozotocina. Os valores são expressos como média $\pm$ desvio-padrão (n=12/grupo). Letras distintas sobre as colunas indicam diferença estatística. * indica diferença estatística ($p < 0,05$) em relação ao controle. **indica diferença estatística ($p < 0,01$) em relação ao controle. ***indica diferença estatística ($p < 0,0001$) em relação ao controle.

Figura 17. Curva de peso (A) de ratos *Wistar* alimentados *ad libitum* com ração controle ou com ração hiperlipídica (HL) até a 12^a semana do protocolo experimental. Os valores são expressos como média $\pm$ desvio-padrão. (grupo controle n=14, grupo HL n=42).

Figura 18. Consumo médio semanal (A) e total de ração em gramas (B) de ratos *Wistar* alimentados *ad libitum* com ração controle ou com ração hiperlipídica (HL) até a 12^a semana do protocolo experimental. Os valores são expressos como média $\pm$ desvio-padrão. (grupo controle n=14, grupo HL n=42). * $p < 0,05$ e *** $p < 0,0001$ em relação ao grupo controle.

Figura 19. Consumo médio (A) e total de ração em calorias (B) de ratos *Wistar* alimentados *ad libitum* com ração controle ou com ração hiperlipídica (HL) até a 12^a

semana do protocolo experimental. Os valores são expressos como média $\pm$ desvio-padrão. (grupo controle n=14, grupo HL n=42).

Figura 20. Porcentagem do peso corpóreo dos fígados (A), cérebros (B), coxins adiposos periepididimal (C), coxins adiposos retroperitoneal (D) e soma dos coxins adiposos periepididimal e retroperitoneal (E) de ratos *Wistar* alimentados *ad libitum* com ração controle ou com ração hiperlipídica (HL) até a 12ª semana do protocolo experimental. Os valores são expressos como média $\pm$ desvio-padrão. (grupo controle n=14, grupo HL n=42). *p<0,05 em relação ao grupo controle.

Figura 21. Curva glicêmica (A) e área sob a curva (B) do teste de tolerância oral à glicose de ratos *Wistar* alimentados *ad libitum* com ração controle ou com ração hiperlipídica (HL) até a 12ª semana do protocolo experimental. Os valores são expressos como média $\pm$ desvio-padrão. (grupo controle n=14, grupo HL n=42). *p<0,05 em relação ao grupo controle.

Figura 22. Curva glicêmica (A) e constante de decaimento da glicemia (B) do teste de tolerância intraperitoneal à insulina (ipITT) de ratos *Wistar* alimentados *ad libitum* com ração controle ou com ração hiperlipídica (HL) até a 12ª semana do protocolo experimental. Os valores são expressos como média $\pm$ desvio-padrão. (grupo controle n=14, grupo HL n=42). *p<0,05 em relação ao grupo controle.

Figura 23. Glicemia de jejum de ratos *Wistar* alimentados *ad libitum* com ração controle ou com ração hiperlipídica (HL) até a 12ª semana do protocolo experimental. Os valores são expressos com média $\pm$ desvio padrão. (grupo controle n=14, grupo HL n=42). *p<0,05 em relação ao grupo controle.

Figura 24. Perfil lipídico de ratos *Wistar* alimentados *ad libitum* com ração controle ou com ração hiperlipídica (HL) até a 12ª semana do protocolo experimental. Concentrações séricas (mg/dL) de triacilgliceróis (A), colesterol total (B), HDL colesterol (C) e colesterol não HDL (D). Os valores são expressos com média $\pm$ desvio padrão. (grupo controle n=14, grupo HL n=42). *p<0,05 em relação ao grupo controle.

Figura 25. Função hepática de ratos *Wistar* alimentados *ad libitum* com ração controle ou com ração hiperlipídica (HL) até a 12ª semana do protocolo experimental. Atividade enzimática (U/L) de AST (A), ALT (B) e GamaGT (C). Os valores são expressos com média $\pm$ desvio padrão. (grupo controle n=14, grupo HL n=42). *p<0,05 em relação ao grupo controle.

Figura 26. Atividade antioxidante e peroxidação lipídica em fígados (A) e cérebros (B) de ratos *Wistar* alimentados *ad libitum* com ração controle ou com ração hiperlipídica (HL) até a 12ª semana do protocolo experimental. Os valores são expressos como média $\pm$ desvio padrão. (grupo controle n=14, grupo HL n=42). *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 em relação ao grupo controle.

Figura 27. Atividade antioxidante e peroxidação lipídica plasmática de ratos *Wistar* alimentados *ad libitum* com ração controle ou com ração hiperlipídica (HL) até a 12ª semana do protocolo experimental. Os valores são expressos como média $\pm$ desvio padrão. (grupo controle n=14, grupo HL n=42). **p<0,01 em relação ao grupo controle.

Figura 28. Atividade das enzimas antioxidantes CAT, SOD e GPx em fígados (A), cérebros (B), eritrócitos (C) e plasma (D) de ratos *Wistar* alimentados *ad libitum* com ração controle ou com ração hiperlipídica (HL) até a 12ª semana do protocolo experimental. Os valores são expressos como média $\pm$ desvio padrão. (grupo controle n=14, grupo HL n=42). *p<0,05, **p<0,01 em relação ao grupo controle.

Figura 29. Curva de peso de ratos *Wistar* entre a 13ª e a 16ª semana do protocolo experimental. Os valores são expressos como média $\pm$ desvio-padrão (n=7/ grupo).

Figura 30. Consumo médio (A) e total de ração em gramas (B) de ratos *Wistar* entre a 13ª e a 16ª semana do protocolo experimental. Os valores são expressos como média $\pm$ desvio-padrão (n=7/ grupo). Barras com letras distintas diferem estatisticamente (p<0,05).

Figura 31. Consumo médio (A) e total de ração em calorias (B) de ratos *Wistar* entre a 13ª e a 16ª semana do protocolo experimental. Os valores são expressos como média $\pm$ desvio-padrão (n=7/ grupo).

Figura 32. Porcentagem do peso corpóreo dos fígados (A), cérebros (B), coxins adiposos periepididimal (C), coxins adiposos retroperitoneal (D) e soma dos coxins adiposos periepididimal e retroperitoneal (E) de ratos *Wistar* eutanasiados na 16ª semana do protocolo experimental. Os valores são expressos como média $\pm$ desvio-padrão (n=7/ grupo).

Figura 33. Curva glicêmica (A) e área sob a curva (B) do teste de tolerância oral à glicose (oGTT) de ratos *Wistar* na 16ª semana do protocolo experimental. Os valores são expressos como média $\pm$ desvio-padrão (n=7/ grupo). Letras distintas sobre as colunas indicam diferença estatística (p>0,05).

Figura 34. Curva glicêmica (A) e constante de decaimento da glicemia (B) do teste de tolerância intraperitoneal à insulina (ipTT) de ratos *Wistar* na 16ª semana do protocolo experimental. Os valores são expressos como média $\pm$ desvio-padrão (n = 7/ grupo). Letras distintas sobre as colunas indicam diferença estatística ($p > 0,05$).

Figura 35. Perfil lipídico na 16ª semana de protocolo experimental. Concentrações séricas (mg/dL) de triacilgliceróis (A), colesterol total (B), HDL colesterol (C) e colesterol não HDL (D). Os valores são expressos com média $\pm$ desvio padrão (n= 7/ grupo).

Figura 36. Função hepática de ratos *Wistar* alimentados *ad libitum* com ração controle ou com ração hiperlipídica (HL) na 16ª semana do protocolo experimental. Atividade enzimática (U/L) de AST (A), ALT (B) e GamaGT (C). Os valores são expressos com média $\pm$ desvio padrão (n=7/ grupo). Letras diferentes sobre as colunas diferem estatisticamente ($p < 0,05$).

Figura 37. Atividade antioxidante e peroxidação lipídica tecidual em fígados (A) e cérebros (B) de ratos *Wistar* alimentados *ad libitum* com ração controle ou com ração hiperlipídica (HL) na 16ª semana do protocolo experimental. Os valores são expressos com média $\pm$ desvio padrão (n=7/ grupo). Letras diferentes sobre as colunas diferem estatisticamente ($p < 0,05$).

Figura 38. Atividade antioxidante e peroxidação lipídica plasmática de ratos *Wistar* alimentados *ad libitum* com ração controle ou com ração hiperlipídica (HL) na 16ª semana do protocolo experimental. Os valores são expressos com média $\pm$ desvio padrão (n=7/ grupo). Letras diferentes sobre as colunas diferem estatisticamente ($p < 0,05$).

Figura 39. Atividade das enzimas antioxidantes CAT, SOD e GPx em fígado (A), cérebro (B), eritrócitos (C) e plasma (D) de ratos *Wistar* alimentados *ad libitum* com ração controle ou com ração hiperlipídica (HL) até a 16ª semana do protocolo experimental. Os valores são expressos como média $\pm$ desvio padrão. Letras diferentes sobre as colunas diferem estatisticamente ($p < 0,05$).

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Teores de ácidos graxos (% do total de lipídios) dos líquidos de cupuaçu e cacau.

Tabela 2. Composição das rações controle e hiperlipídica em gramas/1000 kcal.

Tabela 3. Composição centesimal do líquido de cupuaçu e cacau (%).

Tabela 4. Influência das condições de extração nos teores de compostos fenólicos totais e proantocianidinas totais dos líquidos de cupuaçu e cacau.

Tabela 5. Compostos fenólicos totais, proantocianidinas totais (PAC) pelos métodos de butanol acidificado e pelo método DMAC e capacidade antioxidante pelos métodos DPPH e ORAC dos extratos dos líquidos de cupuaçu e cacau.

Tabela 6. Flavonóides (mg/100 g de amostra b.s.) do líquido de cupuaçu.

Tabela 7. Atividade inibitória de α -amilase e α -glicosidase por extratos purificados em poliamida obtidos dos líquidos de cupuaçu e cacau.

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

kg: quilograma	cm: centímetro
®: marca registrada	cm ² : centímetro ao quadrado
%: por cento	DPPH: 2,2-difenil-1-picrilhidrazil
° C: grau Celsius	EC: código enzimático
μ: micro	<i>et al.</i> : e colaboradores
μg: micrograma	g: grama
μL: microlitro	Kcal: quilocalorias
μM: micromolar	Kg: quilograma
B.s.: base seca	KJ: quilojoule
B.u.: base úmida	L: litros
CEAGESP: Companhia de entrepostos e armazéns gerais de São Paulo	M: molar
CLAE/EM: Cromatografia líquida de alta eficiência acoplado a espectrometria de massas.	mg: miligrama
RMN: Ressonância magnética nuclear.	mg Hb: miligrama de hemoglobina
DCNT: doenças crônicas não transmissíveis.	mL: mililitro
LDL: Lipoproteína de baixa densidade	mM: milimolar
HDL: Lipoproteína de alta densidade	m/v: massa por volume
GLUT: transportador de glicose	nm: nanômetro
MDA: malonaldeído	DNS: ácido dinitrosalicílico
SOD: superóxido dismutase	PBS: tampão fosfato de sódio
GPx: glutathione peroxidase	HL: hiperlipídica
CAT: catalase	ORAC: Capacidade de absorção do radical oxigênio
GSSG: glutathione oxidada	FRAP: Ferric reducing antioxidant power
G-SH: glutathione reduzida	pH: potencial hidrogeniônico
Cu: cobre	TROLOX: Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromana-2-carboxílico
Zn: zinco	TBARS: espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico.
Mn: manganês	AST: aspartato aminotransferase
CEPLAC: Comissão executiva da lavoura cacaueira.	ALT: alanina aminotransferase
	GamaGT: gamaglutamil transferase

oGTT: teste oral de tolerância à glicose

ipITT: teste intraperitoneal de tolerância à insulina

KiTT: constante da taxa de desaparecimento da glicose plasmática.

HCl: ácido clorídrico

U: unidade de atividade enzimática

mg/dL: miligrama por decilitro.

AUC: área sob a curva.

PAC: proantocianidinas.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	20
1.1	Cupuaçu e cupulate®	20
1.2	Compostos fenólicos das sementes de cupuaçu e de cacau	23
1.3	Compostos fenólicos e DCNT	25
1.4	Atividade inibitória de α -glicosidase e α -amilase	27
1.5	Ácidos graxos dos líquidos de cupuaçu e cacau	28
1.6	Modelos animais de DCNT	29
1.7	Estresse oxidativo associado à diabetes e obesidade	30
1.8	Peroxidação lipídica e enzimas antioxidantes	30
2	OBJETIVOS	32
3	MATERIAIS E MÉTODOS	33
3.1	Materiais	33
3.2	Equipamentos	33
3.2.1	Equipamentos usados na produção de cupulate®/chocolate	33
3.2.2	Equipamentos utilizados nas análises	33
3.3	Métodos	34
3.3.1	Produção do cupulate® e chocolate	34
3.3.2	Composição centesimal	35
3.3.2.1	Determinação de umidade	35
3.3.2.2	Determinação de cinzas	35
3.3.2.3	Determinação de proteínas	35
3.3.2.4	Determinação de lipídios	35
3.3.2.5	Determinação de carboidratos	36
3.3.2.6	Determinação de fibras	36
3.3.2.7	Composição mineral	36
3.3.3	Análise de flavonoides	36
3.3.3.1	Extração de flavonoides	36
3.3.3.2	Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	37

3.3.4	Determinação de compostos fenólicos totais e capacidade antioxidante <i>in vitro</i>	38
3.3.4.1	Extração	38
3.3.4.2	Redução do reagente de Folin-Ciocalteu (Compostos fenólicos Totais)	38
3.3.4.3	Quantificação de proantocianidinas totais	39
3.3.4.3.1	Extração	39
3.3.4.3.2	Método do butanol acidificado	39
3.3.4.3.3	Método de 4-dimetilaminocinamaldeído (DMAC)	39
3.3.4.4	Seqüestro de radicais livres (DPPH)	40
3.3.4.5	Capacidade de absorção do radical oxigênio (ORAC)	40
3.3.5	Determinação da atividade inibitória da α -glicosidase	41
3.3.5.1	Extração	41
3.3.5.2	Inibição de α -glicosidase	41
3.3.6	Determinação da atividade inibitória de α -amilase	42
3.3.6.1	Extração	42
3.3.6.2	Inibição da α -amilase	42
3.3.7	Determinação dos efeitos da ingestão de líquido de cupuaçu e cacau em dois protocolos experimentais com ratos <i>Wistar</i>	44
3.3.7.1	Modelos experimentais com ratos	44
3.3.7.1.1	Diabetes induzido por estreptozotocina	44
3.3.7.1.2	Modelos experimentais de ratos tratados com ração hiperlipídica	45
3.3.7.2.2	Produção das rações controle e hiperlipídica	48
3.3.7.2.3	Purificação das amostras para obtenção dos extratos fenólicos	49
3.3.7.2	Análises	49
3.3.7.2.1	Capacidade antioxidante plasmática	49
3.3.7.2.2	Determinação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)	49
3.3.7.2.3	Atividade das enzimas antioxidantes	50
3.3.7.2.4	Parâmetros bioquímicos	51

3.3.7.2.5	Teste oral de tolerância à glicose (oGTT) e teste intraperitoneal de tolerância à insulina (ipITT)	51
3.3.8	Análise estatística	51
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	53
4.1	Determinação da composição centesimal do líquido de cupuaçu e cacau.	53
4.1.1	Análise de minerais	54
4.2	Teores de compostos fenólicos e capacidade antioxidante	55
4.2.1	Eficiência de extração	55
4.2.2	Compostos fenólicos totais, capacidade de seqüestro do DPPH• e ORAC.	58
4.3	Purificação em C18 e poliamida	59
4.3.1	Compostos fenólicos totais	59
4.3.1.1	Compostos fenólicos totais do líquido de cupuaçu	60
4.3.1.2	Compostos fenólicos totais do líquido de cacau	60
4.3.2	Proantocianidinas totais	60
4.3.2.1	Líquido de cupuaçu	60
4.3.2.2	Líquido de cacau	61
4.4	Identificação e quantificação dos flavonóides	61
4.5	Determinação do potencial biológico	64
4.5.1	Determinação da atividade inibitória <i>in vitro</i> de α -amilase e α -glicosidase	64
4.5.2	Determinação do efeito <i>in vivo</i> em modelo animal de estresse oxidativo	66
4.5.2.3	Avaliação da capacidade antioxidante, peroxidação lipídica e enzimas antioxidantes	71
4.5.3	Modelo experimental com ratos tratados com dieta hiperlipídica	76
4.5.3.1	Períodos do protocolo experimental	77
4.5.3.1.1	Baseline (até a 12ª semana)	77
4.5.3.1.1.1	Atividade antioxidante plasmática e tecidual	83
4.5.3.1.2	Período tratamento (13ª a 16ª semana)	86
4.5.3.1.2.1	Atividade antioxidante plasmática e tecidual	91

5	CONCLUSÕES	95
5.1	Caracterização das amostras	95
5.2	Experimento in vivo 1	96
5.3	Experimento in vivo 2	96
	REFERÊNCIAS	97
	ANEXOS	112

INTRODUÇÃO

1.1. Cupuaçu e cupulate®

O cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum* Willd. Ex Spreng. K. Shum) é uma planta pertencente às florestas tropicais, encontrado em estados brasileiros como o Pará e Maranhão. Pertence à família Theobroma (Sterculiaceae), composta de 22 espécies de plantas tropicais do continente americano, dentre elas o cacau (*Theobroma cacao* L.). Há considerável interesse econômico pelo cupuaçu, considerado um dos mais importantes frutos tipicamente amazônicos, devido a sua polpa extremamente aromática, além da semente, a partir da qual se obtém o cupulate® (VILLACHICA, 1996).

O fruto do cupuaçuzeiro pode possuir de 12 a 25 cm de comprimento, 10 a 12 cm de largura e pesar de 1,2 a 4,0 kg. A polpa de cor amarela ou esbranquiçada, possui sabor ácido e aroma agradável, com 30 a 40 sementes que facilmente se desprendem da planta, e é utilizada como ingredientes para geléias, sorvetes, doces, compotas, sucos e bebidas, além da produção da própria polpa congelada (CALZAVARA *et al.*, 1984). A partir das amêndoas gordurosas do cupuaçu é possível extrair subprodutos semelhantes à manteiga de cacau e ao chocolate, conhecidos como “manteiga de cupuaçu” e “cupulate®”. Para cada 100 kg de sementes frescas, são obtidos 45,5 kg de sementes secas ou 42,8 kg de sementes torradas e 31,2 kg de amêndoas. Destas, pode-se obter 13,5 kg de manteiga de cupuaçu (VILLACHICA, 1996). O cupulate®, produto correspondente ao chocolate só que obtido a partir das sementes do cupuaçu, foi patenteado há mais de dez anos pela Embrapa. O fruto da Amazônia traz a vantagem de ser um produto nativo brasileiro, com custo de produção muito reduzido. Mais recentemente, cientistas da Universidade de São Paulo (USP), coordenados pela Prof. Dr. Suzana Lannes, obtiveram patente sobre uma tecnologia para fabricação de alimentos similares ao chocolate, mas à base do fruto amazônico, em lugar do cacau. Seis produtos foram desenvolvidos: três “chocolates” - ao leite, branco e meio amargo - e três “achocolatados” em pó- tradicional, dietético e enriquecido com cálcio, com sabor e aroma quase idênticos aos produtos obtidos a partir do cacau. Segundo a responsável pelo projeto, trata-se de um aprimoramento do cupulate®, já que os produtos teriam propriedades reológicas superiores. Estes produtos, no entanto, não

podem ser chamados de chocolate (porque não levam cacau) nem de cupulate® (nome já registrado pela Embrapa). A nova patente refere-se simplesmente ao "processo de formulação de produtos alimentícios à base de cupuaçu".

Conforme descrito por Mororó (2007) a formulação do chocolate e do cupulate® meio amargos consiste em:

- 20 Kg de amêndoas de cupuaçu/cacau
- 3 Kg de manteiga de cupuaçu/cacau
- 13 Kg de açúcar
- 2,3 Kg de leite em pó
- 0,19 Kg de lecitina

A Figura 1 esquematiza o processo produtivo do chocolate/cupulate® e a obtenção do líquido de cacau e cupuaçu.

Figura 1. Fluxograma da fabricação do chocolate/cupulate® baseado em Mororó (2007).

O cupuaçu, assim como o cacau, sofre diversos processos físico-químicos na conversão da semente para o derivado final, o cupulate[®]. O processamento do cacau consiste nas seguintes etapas: colheita, retirada da polpa junto com as sementes (a polpa é drenada durante a fermentação, ou antes, com uma despulpadora), fermentação em recipientes sob aquecimento natural da fermentação (até o máximo de 50 °C), secagem por aquecimento artificial ou sob o sol, forneamento a 120-150 °C (para desenvolvimento do flavor e, por vezes, usado previamente para liberar a casca que envolve a semente), moagem (obtenção de uma pasta denominada “líquor”, cuja fluidez se deve à quebra das paredes celulares e liberação da manteiga de cacau), alcalinização (eventualmente usado para alteração do flavor), adição de demais ingredientes, mixagem, refinamento a 25-50 °C (a pressão de rolos aprimora a textura), armazenamento a 45-50 °C (maturação), concheamento (diminui a umidade e demais ingredientes são adicionados, as temperaturas podem ser de 49 até 82 °C), resfriamento a 10 °C e reaquecimentos sucessivos a 29-31 °C (para uma boa cristalização) (WOLLGAST *et al.*, 2000). O processamento das sementes de cupuaçu constitui-se das mesmas etapas que o das sementes do cacau na produção do chocolate (MORORÓ, 2007).

Grandes alterações no conteúdo de compostos fenólicos podem ser percebidas logo durante a fermentação: microorganismos, em condições anaeróbicas, produzem ácido acético e etanol, que contribuem para a desestruturação das membranas celulares. Os polifenóis, difundidos com os demais líquidos celulares, oxidam-se e formam taninos condensados de alto peso molecular. Estas reações ocorrem na tanto na ausência quanto na presença da enzima polifenoloxidase (HANSEN *et al.*, 1998).

Mais alterações no conteúdo e na composição de compostos fenólicos ocorrem no processamento do chocolate, especialmente no forneamento, moagem, refinamento e concheamento. Estas etapas utilizam altas temperaturas, o que, somado à presença do oxigênio, provoca oxidação adicional dos compostos fenólicos (WOLLGAST *et al.*, 2000).

De modo geral, para evitar a redução do conteúdo de compostos fenólicos nas sementes de cacau, devem-se usar baixas temperaturas e curto tempo de exposição a elas. A etapa de alcalinização, quando realizada, também leva a consideráveis decréscimos nos teores de compostos fenólicos. A utilização de

sementes de alta qualidade e pouco fermentadas contribui para um chocolate com maior teor de flavonóides (KEALEY *et al.*, 1998).

1.2. Compostos fenólicos das sementes de cupuaçu e de cacau

Através da alimentação obtemos macro e micronutrientes e, ainda, compostos bioativos com atividades promotoras da saúde, tais como os compostos fenólicos. Alimentos ditos funcionais, como o chá verde, vinho, soja, frutas vermelhas e chocolate, são ricos nestes compostos e possuem atividades como antioxidante, antiinflamatória e/ou hipocolesterolêmica (SEIFRIED *et al.*, 2007; RICE-EVANS *et al.*, 1996; GERMAN; DILLARD, 1998).

Dentre os compostos fenólicos, os flavonóides são uma subclasse caracterizada por sua estrutura de difenilpropano (C₆-C₃-C₆) (Figura 2) (HERTOG; HOLLMAN; KATAN, 1992). Estes compostos geralmente ocorrem glicosilados, tendo como carboidratos, principalmente, D-glicose, L-ramnose, glicoramnose, galactose e arabinose.

Figura 2 - Estrutura básica dos flavonóides.

Os flavonóides podem ser subdivididos em diversas classes incluindo antocianinas, flavonas, flavanóis, flavanonas, isoflavonas e flavonóis (Figura 3). Eles são encontrados nos alimentos geralmente como O-glicosídeos, com o açúcar normalmente ligado na posição C3, ou na C7, como é o caso das isoflavonas (KING; YOUNG, 1999).

Figura 3 - Estruturas das principais classes de flavonóides

As informações sobre a composição dos flavonóides do cupuaçu são escassas. Yang *et al.* (2003) e identificaram através de RMN nove flavonóides antioxidantes na semente de cupuaçu: (+)-catequina, (-)-epicatequina, isoscutelarina 8-O-b-D-glicuronídeo, hipolaetina 8-O-b-glicuronídeo, quercetina 3-O-b-D-glicuronídeo, quercetina 3-O-b-D-glicuronídeo 6"-metil éster, quercetina, caempferol e isoscutelarina 8-O-b-D-glicuronídeo 6"-metil éster e dois novos flavonóides sulfatados glicosídicos, teograndina I e teograndina II.

Pugliese (2010) identificou através de CLAE/EM do líquido de cupuaçu os flavonóides: dímero de flavanóis, quercetina glucuronídeo, luteolina glucuronídeo, isorhamnetina glucuronídeo e as teograndinas descritas por Yang *et al.* (2003).

Quanto ao cacau Wollgast e Anklam (2000) relatam a predominância de três grupos de polifenóis:

1. Catequinas ou flavan-3-óis (37%);
2. Antocianinas (4%); e
3. Proantocianidinas (58%)

Os flavanóis da semente do cacau podem ser monoméricos, como a (-)-epicatequina e a (+)-catequina, diméricos como a procianidina B2 e B5, e demais procianidinas poliméricas, os taninos condensados (Figura 4) (WOLLGAST; ANKLAM, 2000).

Figura 4 - Procianidina C, um tanino condensado.

Os flavanóis como a catequina, epicatequina e seus oligômeros, as proantocianidinas correlacionam-se com a diminuição do risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares devido a ações na pressão arterial, resistência a insulina, diminuição da agregação plaquetária e aumento da resposta imune e antioxidante do organismo (SCHROETER *et al.*, 2006).

As catequinas possuem assimetria nos carbonos C2 e C3 resultando em quatro isômeros ou epímeros: (+), (-)-catequina e (+), (-)-epicatequina. Nos isômeros (+)-catequina e (+)-epicatequina o grupo 3,4-diidrofênica ligado ao carbono C2 e o grupo hidroxila do carbono C3 surgem em posição trans (2*R*, 3*S*) e nos isômeros restantes posição cis (2*R*, 3*S*). Na natureza os isômeros mais abundantes são a (+)-catequina e a (-)-epicatequina (PORTO, 2002).

1.3. Compostos fenólicos e DCNT

A pressão arterial elevada, os elevados níveis de colesterol, a falta de atividade física e a baixa ou ausência de ingestão de frutas e hortaliças são os principais fatores de risco para o desenvolvimento de doenças crônicas, dentre elas o câncer, doenças cardiovasculares, diabetes, hipertensão e obesidade (WHO, 2002). Estudos epidemiológicos relacionam o consumo regular de alimentos e bebidas ricos em antioxidantes, vitaminas e flavonóides com a diminuição do risco de mortalidade das doenças cardiovasculares (RENAUD, 1999; YOCHUM, 1999).

Na procura por alimentos saudáveis e com propriedades benéficas à saúde, diversos trabalhos têm sido realizados para identificar a atividade antioxidante de extratos obtidos de especiarias, leguminosas, cereais e frutas, tanto em estudos epidemiológicos quanto em experimentos laboratoriais realizados nas últimas décadas (NATELLA *et al.*, 2002; SOTERO, 2002; GIADA, 2005). Dentre os alimentos identificados com altos teores de flavonóides estão frutas como maçã e cebola, os chás (verde e preto), vinhos e o chocolate (BRAVO, 1998; HAMMERSTONE, 2000). Estudos epidemiológicos mostraram reduzido risco de doenças coronarianas devido à alta ingestão de flavonóides, como as flavonas apigenina e luteolina e os flavonóis caempferol, miricetina e quercetina (HERTOG *et al.*, 1992; 1993).

Os produtos derivados do cacau são uma importante fonte de compostos fenólicos como as procianidinas e flavan-3-óis. Verifica-se que o consumo regular de alimentos com agentes protetores, como por exemplo, os antioxidantes, reduzem consideravelmente o risco de diversas patologias principalmente as DCNT (doenças crônicas não transmissíveis) (DAGLIA *et al.*, 2000; DUTHIE *et al.*, 2005; HUANG, OU, PRIOR, 2005). Nesse contexto, se apresenta o cacau e seus derivados. O consumo do chocolate em pó com altos teores de procianidinas e epicatequinas resultou em elevada capacidade antioxidante e diminuição da oxidação de lipídeos no plasma de humanos e de ratos (WANG *et al.*, 2000; BABA *et al.*, 2000).

Apesar de mecanismos não esclarecidos e poucos estudos relatados, as hipóteses salientam que a alta capacidade antioxidante de compostos fenólicos, principalmente dos flavonóides, também pode ser efetiva na redução do estresse oxidativo, progressão da diabetes mellitus, hipertensão e dislipidemias associadas à ingestão excessiva de ácidos graxos saturados (SONG *et al.*, 2005; MATSUI *et al.*, 2001; KWON *et al.*, 2008; APOSTOLIDIS *et al.*, 2006). No metabolismo lipídico os flavonóides aumentam a excreção de sais biliares nas fezes e são capazes de elevar a atividade do sistema microssomal hepático, conseqüentemente aumentando o metabolismo lipídico (MACDONALD *et al.*, 1983). O aumento da expressão e atividade dos receptores de LDL, provocado pelos flavonóides, é um dos responsáveis pela redução dos níveis de colesterol (KIRK *et al.*, 1998; PAL *et al.*, 2003).

Os oligômeros de flavanóis, em diferentes níveis de condensação, podem modular os mecanismos de peroxidação lipídica, diminuir a oxidação do colesterol

LDL com conseqüente proteção vascular (SCHEWE *et al.*, 2001). Steinberg *et al.* (2002) afirma que a extensão da cadeia das proantocianidinas do cacau não interfere na ação destas na proteção do LDL contra a oxidação. Essa afirmação foi atribuída ao fato de que os oligômeros são hidrolizados pelo ácido gástrico liberando epicatequina e catequina (SPENCER *et al.*, 2000).

1.4 Atividade inibitória de α -glicosidase e α -amilase

A maior fonte de glicose sanguínea provém de dietas ricas em carboidratos como o amido, que são hidrolisados pelas enzimas α -glicosidase e α -amilase. Estas são enzimas fundamentais na digestão dos carboidratos e a inibição delas implica diretamente na absorção de glicose. A α -glicosidase, situada na membrana ciliada do intestino delgado, promove a quebra do amido e da sacarose (clivagem de ligação α -1,4 e α -1,6), liberando moléculas de glicose para serem absorvidas. Já a α -amilase, presente na saliva e suco pancreático, é responsável por clivar ligações glicosídicas α -1,4 de amilose, liberando dextrina, maltose e maltodextrose (BISCHOFF, 1994; MCCARTER e WITHERS, 1994; HANHINEVA *et al.*, 2010).

Os compostos fenólicos de frutas atuam no metabolismo de carboidratos pela inibição das enzimas digestivas α -glicosidase e α -amilase. Dentre os vegetais destacam-se as frutas vermelhas (morango, framboesa, mirtilo e groselha), os chás verde e preto e o vinho tinto (HANHINEVA *et al.*, 2010; PINTO *et al.*, 2010). Os compostos fenólicos de frutas brasileiras como o cambuci e a cagaita apresentaram alta inibição das enzimas digestivas e essa propriedade foi atribuída à presença dos flavonóides quercetina e caempferol (GONÇALVES; GENOVESE; LAJOLO, 2010).

1.5 Ácidos graxos dos líquores de cupuaçu e cacau

A composição dos ácidos graxos do líquido de cupuaçu e cacau descrita por Pugliese (2010) e Minin e Cechi (1998) estão abaixo apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1. Composição de ácidos graxos (% do total de lipídios) dos líquores de cupuaçu e cacau.

Fórmula	Nome	*Líquor de cupuaçu	**Líquor de cacau
		%	%
16:0	Palmítico	6,86 ± 0,05	26,4 ± 0,49
17:0	Margárico	0,18 ± 0,01	0,2 ± 0,000
18:0	Esteárico	31,4 ± 0,2	32,9 ± 0,82
18:1 (n-9)	Oléico	43,5 ± 0,1	35,2 ± 0,83
18:1 (n-7)	Vacênico	0,46 ± 0,01	0,30 ± 0,045
18:2 (n-6)	Linoleico	5,04 ± 0,01	3,30 ± 0,045
18:3 (n-3)	α-Linolênico	0,13 ± 0,00	0,20 ± 0,045
20:0	Eicosanóico	10,23 ± 0,09	0,90 ± 0,055
20:1 (n-9)	Eicosenóico	0,37 ± 0,01	tr ± 0,000
22:0	Docosanóico	1,70 ± 0,05	0,2 ± 0,000
24:0	Tetracosanóico	0,17 ± 0,01	tr ± 0,000
Saturados		50,5 ± 0,4	60,6
Totais	Monoinsaturados	44,4 ± 0,1	35,5
	Polinsaturados	5,17 ± 0,01	3,5

* de acordo com Pugliese (2010).

** de acordo com Minin e Cecchi (1998).

Cohen *et al.* (2005) relataram semelhante composição de ácidos graxos do líquido de cupuaçu, em comparação com a Tabela 1, exceto pelo maior percentual de gordura saturada descrito pelos autores.

De acordo com Luccas (2001) a manteiga de cupuaçu possui alto ponto de fusão (33,9 °C) devido principalmente ao alto teor de ácidos graxos monoinsaturados, principalmente o ácido oléico. Ainda conforme este mesmo autor,

a manteiga de cupuaçu pode ser uma alternativa à manteiga de cacau na produção de chocolate e a matéria prima oriunda do cupuaçu pode ser usada em até 5% no peso bruto do chocolate sem alterar características sensoriais.

Pela análise da Tabela 1 pode-se observar que o líquido de cacau possui aproximadamente 10% mais ácidos graxos saturados quando comparado ao líquido de cupuaçu. O líquido de cacau, de acordo com Minin e Cecchi (1998), apresentou 26,4% de ácido palmítico, sendo aproximadamente 3,8 vezes maior ao encontrado para o líquido de cupuaçu por Pugliese (2010). Este ácido graxo é conhecidamente indutor de aterogênese e obesidade. Ainda, conforme Coll *et al.* (2006), Duval *et al.* (2007), Lambertucci *et al.* (2008) e Pimenta *et al.* (2008) contribui para o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio.

Cooper *et al.* (2008) e Steinberg *et al.* (2003) ainda, inferiram que os ácidos oléico e esteárico, predominantes no líquido de cupuaçu, não colaboram no aumento do colesterol sanguíneo. De acordo com Hunter *et al.*, (2010), o ácido esteárico quando comparado a outros ácidos graxos saturados, diminui colesterol LDL e é neutro quanto aos níveis de colesterol HDL. Conforme descrito por Salla-Villa *et al.*, (2011), a ingestão de ácido oléico se relaciona inversamente com o desenvolvimento de resistência à insulina em indivíduos dislipidêmicos.

1.6 Modelos animais de DCNT

Modelos experimentais desenvolvidos com ratos diabéticos demonstram que o estresse oxidativo, decorrente da persistente hiperglicemia, compromete a atividade do sistema de defesa antioxidante e provoca o aumento das espécies reativas de oxigênio. Para a indução de diabetes nesse modelo é necessária a administração de um agente diabetogênico, podendo ser a estreptozotocina ou aloxano. Nos ensaios com diabetes induzido por estreptozotocina, tanto a hiperglicemia quanto o estresse oxidativo estão envolvidos na etiologia e patologia das complicações relacionadas à doença (BAYNES, 1991). Desde que foi descoberta, a estreptozotocina é reconhecida como um agente tóxico às células beta pancreáticas sendo usada em modelos animais para a indução da diabetes com concomitante deficiência de insulina (BOLZAN e BIANCHI, 2002).

Assim como o modelo de diabetes induzida por estreptozotocina, o protocolo experimental de ratos alimentados com dieta hiperlipídica é muito utilizado

atualmente. Os ácidos graxos saturados contidos na ração, vindos da adição de banha de porco a mesma, são conhecidamente indutores de alterações metabólicas associadas à inflamação, dislipidemias, resistência à insulina, esteatose e peroxidação lipídica (VIAL *et al.*, 2011; WANG *et al.*, 2009; WOODS *et al.*, 2002).

1.7 Estresse oxidativo associado à diabetes e obesidade

O estresse oxidativo é descrito por Halliwell e Gutteridge (1984) como uma complicação das DCNT devido ao descontrole entre os sistemas de geração e captura dos radicais livres. Na diabetes, por exemplo, a auto-oxidação da glicose e a glicação protéica podem gerar espécies reativas elevando a peroxidação lipídica (BAYNES, 1991; MULLARKEY *et al.*, 1990). Estudos mostram elevação da lipoperoxidação em animais diabéticos e/ou alimentados com ração hiperlipídica. (FEILLET-COUDRAY *et al.*, 1999; SEKEROGLU *et al.*, 2000; GUPTA *et al.*, 2008; VIAL *et al.*, 2011).

Evidências científicas sugerem que polifenóis provenientes da alimentação podem modular a absorção e metabolismo de glicose principalmente pela atuação em GLUT2 (*glucose transporter 2*) (KWON *et al.*, 2007). Lin *et al.* (2009) comprovaram a ação anti-hiperglicêmica do ácido protocatecúico, um ácido fenólico encontrado em uvas, carambola, goiaba, manga dentre outros frutos. Rao e Subramaniam (2009) relataram redução da glicemia e proteção antioxidante em ratos com diabetes induzida por estreptozotocina tratados com extrato de noni (*Morinda citrifolia*).

A ingestão de ração hiperlipídica por ratos promove o aumento dos níveis das espécies reativas de oxigênio e altera o metabolismo energético de hepatócitos (VIAL *et al.*, 2011).

1.8 Peroxidação lipídica e enzimas antioxidantes

A peroxidação lipídica está associada com o dano oxidativo às membranas celulares. Fisiologicamente baixas concentrações de lipoperóxidos são encontradas nos tecidos (GUPTA *et al.*, 2008). No desenvolvimento da diabetes o aumento do estresse oxidativo nos tecidos é o principal fator desencadeador da peroxidação lipídica (SHANMUGAM *et al.*, 2011).

Um dos principais produtos formados na peroxidação lipídica é o malonaldeído (MDA). Este se apresenta elevado em várias doenças relacionadas ao estresse oxidativo sendo muito usado como biomarcador na avaliação da lipoperoxidação (SOBOTKOVÁ *et al.*, 2009; BIRD; DRAPER, 1984).

A elevação da peroxidação lipídica ocasionada pela exacerbação do diabetes e ingestão excessiva de ácidos graxos saturados pode ser contraposta pelo aumento das defesas antioxidantes enzimáticas. Loven *et al.* (1986) sugeriram que a deficiência de insulina altera a atividade das enzimas antioxidantes SOD (superóxido dismutase), GPx (glutathiona peroxidase) e catalase de cérebro, rins e eritrócitos de animais diabéticos.

A enzima superóxido dismutase é responsável pela catálise através da redução e da oxidação univalente do íon superóxido a peróxido de hidrogênio e oxigênio molecular. Existe em humanos três isoformas dessa enzima: a Cu/Zn SOD encontrada no citoplasma, a forma mitocondrial Mn/SOD e uma forma extracelular descoberta mais recentemente, a SOD3 também Cu/Zn SOD (WASSMANN *et al.*, 2004; MATÉS, 2000).

As catalases atuam na conversão do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1998).

A glutathiona peroxidase reduz os hidroperóxidos lipídicos em seus alcoóis correspondentes, bem como o peróxido de hidrogênio livre em água e glutathiona oxidada (GSSG) (WASSMANN *et al.*, 2004).

O mecanismo de atuação dessas enzimas, conjuntamente, está mostrado na Figura 5.

Figura 5. (A) Formação dos intermediários reativos a partir do oxigênio molecular. (B) Ações de enzimas antioxidantes. G-SH = glutathiona reduzida; G-S-S-G = glutathiona oxidada. (CHAMPE, 2009).

2. OBJETIVOS

O objetivo geral deste projeto é estudar os possíveis efeitos da ingestão diária do líquido de cupuaçu em modelos animais de doenças, tendo como parâmetro de comparação o líquido de cacau.

Os objetivos específicos são:

1. Comparar os teores de compostos fenólicos e proantocianidinas totais, composição e teores de flavonóides, e capacidade antioxidante *in vitro* dos líquidos de cupuaçu e cacau precursores do cupulate[®] e chocolate respectivamente;
2. Avaliar o efeito da administração crônica dos líquidos de cupuaçu e cacau, na forma de suspensão aquosa dos líquidos de cupuaçu e cacau, sobre o perfil lipídico, enzimas marcadoras da função renal e status antioxidante de ratos no modelo de diabetes induzida por estreptozotocina;
3. Avaliar o efeito da administração crônica das frações fenólicas dos líquidos de cupuaçu e cacau sobre o perfil lipídico, atividade de enzimas marcadoras de função hepática, tolerância à glicose, resistência à insulina e status antioxidante de ratos alimentados com ração hiperlipídica.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Materiais

As amostras de líquido de cupuaçu e cacau deste trabalho foram obtidas junto à CEPLAC (Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira) em colaboração com a Fazenda Riachuelo em Ilhéus – BA e produzidas em escala piloto no mês de novembro de 2009 exclusivamente para este trabalho

Todos os reagentes foram de grau analítico ou grau CLAE.

3.2. Equipamentos

3.2.1 Equipamentos utilizados na produção de cupulate®/chocolate

- Torradora Circular, Jafinox.
- Descascador de 5 plataformas, Jafinox.
- Moinho de Facas, Jafinox.
- Refinador de 5 rolos, Jafinox.
- Concha de chocolate automática, Jafinox.
- Temperadeira seca de três estágios, Jafinox

3.2.2. Equipamentos utilizados nas análises

- Estufa (Fanem, 315 SE).
- Mufla (Quimis).
- Aparelho digestor (Gerhardt, Kjeldahltherm).
- Espectrofotômetro (Ultrospec 2000, Pharmacia Biotech).
- Ultra-Turrax (Polytron®- Kinematica GnbH, Kriens-Luzern).
- Rota-evaporador (RE 120 – Büchi).
- Cromatógrafo líquido de alta eficiência Hewlett Packard série 1100, equipado com detector com arranjo de diodo (DAD). Coluna prodigy 5 µ ODS(3) 250 x 4,60 mm (Phenomenex Ltd, Reino Unido) – Quantificação de flavonóides.
- Espectrofotômetro de fluorescência Synergy H1 hybrid Biotek.
- Manifold Visiprep 24DL da Supelco.

- Glicosímetro Accu-Chek Advantage II (Roche®).

3.3. Métodos

3.3.1. Produção do cupulate® e chocolate

A produção do cupulate® e do chocolate foi realizada com o auxílio da Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira (CEPLAC) nas dependências da planta piloto da Fazenda Riachuelo. A metodologia usada foi a de MORORÓ (2007).

Vinte quilos de sementes de cupuaçu, para o cupulate®, e de cacau, para o chocolate, foram postas para fermentar em cochos de madeira recobertos por folhagens diversas. Por dois dias as sementes foram deixadas em descanso, permitindo fermentação em condições anaeróbicas. A partir do terceiro dia até o sétimo, transferiu-se o produto de cocho em cocho, uma vez ao dia, revolvendo-o para permitir aeração e uniformidade de aquecimento. Após a fermentação, as sementes de cupuaçu/cacau foram submetidas à secagem ao sol em terraços apropriados, até reduzirem sua umidade para cerca de 5-10%.

Fez-se uma seleção das sementes de cupuaçu/cacau, procurando retirar as que estavam murchas e germinadas. As sementes de cupuaçu selecionadas foram, então, forneadas por volta de 1 hora e 40 minutos a 120 °C em uma torradora com pás de agitação. A torrefação foi por tempo suficiente para atingir de 1 - 2 % de umidade.

As sementes, após serem resfriadas até aproximadamente 50 °C foram descascadas (Descascador de 5 platafomas, Jafinox). As amêndoas obtidas passaram por um novo processo de seleção, visando à retirada de cascas que ainda estavam presentes.

As amêndoas foram trituradas por um moinho de facas por dois minutos, formando uma pasta denominada líquor.

3.3.2. Composição centesimal

3.3.2.1. Determinação de umidade

Pesou-se 3 g de amostra, que foram secas em estufa a 105 °C até o seu peso permanecer constante. O percentual de umidade foi calculado pela diferença do peso final em relação ao inicial (AOAC, 2005).

3.3.2.2. Determinação de cinzas

Aqueceram-se cadinhos de porcelana em mufla a 600°C por uma hora. Registrou-se o peso inicial dos cadinhos secos. Dois gramas da amostra foram adicionados a este recipiente e colocados por duas horas na mufla, em mesmas condições. Os cadinhos foram retirados da mufla e postos para resfriar em dessecador. As amostras foram umedecidas álcool absoluto. Os cadinhos voltaram à mufla por mais duas horas. Novamente, as amostras foram retiradas da mufla e resfriadas em dessecador. O peso final foi registrado e a quantidade de cinzas foi calculada pela diferença entre a massa inicial e a final. O percentual se deu pela razão desta diferença com o peso inicial da amostra, multiplicado por 100 (AOAC, 2005).

3.3.2.3. Determinação de proteínas

A determinação de proteína foi feita pelo método de Kjeldahl (CHANG, 1998; AOAC, 2005).

3.3.2.4. Determinação de lipídios

Esta determinação foi feita segundo o método de Soxhlet (AOAC, 2005). Dois gramas de amostra foram postas dentro de cartuchos feitos de papel filtro e algodão. Uma vez fechado os cartuchos, eles foram colocados dentro do vidro intermediário do Soxhlet. O balão do Soxhlet foi previamente secado em estufa a 105 °C por 1 hora e seu peso, anotado. Este, foi encaixado no intermediário. Éter etílico foi adicionado em quantidade suficiente para permitir o sifonamento do mesmo. Os

balões foram aquecidos em manta de aquecimento e a parte superior do intermediário foi conectada a um destilador. O gotejamento foi uniforme e ocorreu por 8 horas. Os cartuchos foram retirados do intermediário para então permitir mais um sifonamento, este último para limpar o intermediário. Secaram-se as amostras até resultar somente os lipídios, mas antes que estes começassem a escurecer. Os balões foram postos para secar em estufa a 105 °C por uma hora, e então pesados. A quantidade de lipídios foi calculada pela diferença entre a massa final e a massa do balão; o percentual se deu pela razão desta diferença com o peso inicial da amostra, multiplicado por 100 (AOAC, 2005).

3.3.2.5. Determinação de carboidratos

Esta determinação foi feita segundo o método colorimétrico de fenol-sulfúrico (DUBOIS *et al.*, 1956). Adicionou-se 1 mL de fenol e 5 mL de ácido sulfúrico concentrado a 1 mL da suspensão em água da amostra. Foi efetuada a leitura da absorbância a 490 nm e o valor comparado com uma curva padrão de glicose (0,1 mg/mL). Calculou-se o percentual de açúcares (com grupos redutores ou potencialmente redutores) em relação à massa total adicionada à suspensão.

3.3.2.6. Determinação de fibras

Esta determinação foi realizada baseando-se no método descrito por Lee, *et al.* (1992).

3.3.2.7. Composição mineral

Baseada na metodologia descrita por Malavolta, Vitti e Oliveira (1997).

3.3.3. Análise de flavonóides

3.3.3.1. Extração de flavonóides

A extração foi realizada segundo ARABBI *et al.* (2004) com adaptações. As amostras foram extraídas com metanol:água (70:30) na proporção de 1:50 (m/v),

através de agitador magnético, por duas horas a 25 °C. Os extratos obtidos foram filtrados em papel-filtro Whatman nº 6. Para concentração dos extratos foi utilizado rotaevaporador em temperaturas de banho de 40 °C (até aproximadamente 20 mL). As amostras concentradas, já sem metanol, tiveram o seu volume ajustado com adição de água em um balão volumétrico de 25 mL. Uma alíquota de 10 mL foi passada em coluna de 1 g de Poliamida/C18. As colunas foram pré-condicionadas pela passagem de 20 mL de metanol e 60 mL de água. Após a passagem dos extratos aquosos, as colunas foram lavadas com 20 mL de água e a eluição dos flavonóides foi feita com 40 mL de metanol seguido de 40 mL de metanol:amônia (99,5:0,5). Foi utilizado manifold Visiprep 24DL da Supelco. Após secagem completa através de rotaevaporação, as amostras foram ressuspendidas em 1 mL de metanol (grau cromatográfico) e filtradas utilizando-se filtros de polietileno com membrana PTFE (Millipore) de 0,22 µm de poro. As extrações foram realizadas em triplicata e a quantificação dos flavonóides foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

3.3.3.2. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Para a quantificação dos flavonóides, estes foram separados por uma coluna prodigy 5 µ ODS(3) 250 x 4,60 mm, de acordo com ARABBI *et al.* (2004). Foi utilizado um gradiente de solventes constituído por: (A) Água : Tetraidrofurano : Ácido trifluoroacético (97,9 : 2 : 0,1) e (B) Acetonitrila. A proporção do solvente B foi alterando nas seguintes proporções: 15 % do início até 2 minutos, ascensão a 25 % em 5 minutos, a 35 % em 8 minutos, a 50 % em 5 minutos, a 90 % em 5 minutos, manteve-se esta concentração por mais 5 minutos e retorno às condições iniciais (15 %) em 5 minutos. O fluxo usado foi de 1 mL/ minuto a 25 °C. Para limpeza da coluna, foi alterada a porcentagem inicial do solvente B para 90 % e, a seguir, re-equilibrada nas condições iniciais por 10 minutos. A identificação foi feita a partir dos tempos de retenção, dos espectros de absorção do UV e de adição de padrões às amostras (*spiking*): Catequina, Epicatequina, Orientina, Homorientina, Vitexina, Isovitexina, Rutina, Quercetina, Caempferol, Scutelarina, Cianidina, Ácido Protocatecuico e Caféico. As curvas de calibração foram feitas com os compostos acima no mesmo método usado para a análise das amostras. Os resultados foram expressos em mg por 100 g de amostra, em base seca. A procianidina dimérica e a

trimérica foram quantificadas como equivalentes de catequina; a quercetina glucuronídeo e a isorhamnetina foram quantificadas como quercetina rutinosídeo (rutina); a luteolina glucuronídeo e as theograndina I e II foram quantificadas como equivalentes de homorientina (PUGLIESE, 2010).

3.3.4. Determinação de compostos fenólicos totais e capacidade antioxidante *in vitro*

3.3.4.1. Extração

Antes da definição do melhor mecanismo de extração foram testados o agitador magnético por duas horas a 25 °C e o homogeneizador do tipo Ultra-Turrax, por um minuto em velocidade 4 e banho de gelo.

Assim como o mecanismo de extração foram testados os solventes metanol, acetona, metanol : água (70 : 30), etanol : água (80 : 20), acetona : água (80 : 20), metanol : ácido clorídrico (99 : 1), metanol : ácido clorídrico (99,5 : 0,5), acetona : água : ácido clorídrico (70 : 29,5 : 0,5), acetona : água : ácido acético (70 : 29,5 : 0,5) e acetona : água : ácido acético (80 : 19 : 1).

A extração foi realizada em triplicata homogeneizando-se cerca de 0,5 g de amostra em 20 mL de solvente extrator. Os extratos foram filtrados utilizando-se papel de filtro Whatman nº 6 e armazenados em frascos de vidro âmbar.

3.3.4.2. Redução do reagente de Folin-Ciocalteu (Compostos fenólicos Totais)

Este ensaio foi realizado de acordo com SINGLETON *et al.* (1999), modificado por GENOVESE *et al.* (2003). Utilizou-se 0,25 mL dos extratos obtidos em 3.3.4.1., adicionou-se a 2 mL de água destilada e 0,25 mL do reagente de Folin-Ciocalteu. Após 3 minutos em temperatura ambiente, foram adicionados 0,25 mL de solução saturada de carbonato de sódio, e os tubos foram colocados em banho a 37 °C durante 30 minutos para desenvolvimento de cor e posterior medição da absorbância.

A absorção da luz a 750 nm foi determinada em espectrofotômetro e o conteúdo de compostos fenólicos totais calculado utilizando-se curva-padrão de

catequina (Sigma chemical Co., St. Louis, EUA). Os resultados obtidos foram expressos como mg equivalente de catequina / g de amostra, em base seca.

3.3.4.3. Quantificação das proantocianidinas totais

3.3.4.3.1. Extração

A extração foi realizada em triplicata homogeneizando-se cerca de 0,5 g de amostra em 20 mL dos solventes e mecanismos extratores descritos no item 3.3.4.1. Os extratos foram filtrados utilizando-se papel de filtro Whatman nº 6 e armazenados em frascos de vidro âmbar.

3.3.4.3.2 Método do butanol acidificado

Este ensaio foi adaptado do método cromogênico descrito por PORTER *et al.* (1986), e quantifica as proantocianidinas através do butanol acidificado. As análises foram feitas em extrato metanol:ácido acético (99:1), conforme empregado por COELHO (1987).

Preparou-se uma solução de n-butanol e ácido clorídrico concentrado na proporção de 3 para 2. Foi adicionado 77 mg de sulfato de ferro hidratado ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) a meio litro do butanol acidificado. Adicionou-se 2,5 mL desta solução a 250 µL do extrato devidamente diluído em um tubo de ensaio. De mesmo modo, foi preparada uma curva padrão, variando de 0 a 2,4 mg/mL de tanino quebracho. Os tubos foram tampados e deixados em banho 95°C por 15 minutos; então, após leve agitação, tiveram sua absorbância medida em espectrofotômetro a 540 nm em cubeta de vidro de caminho óptico de 1 cm.

A quantidade de proantocianidinas foi calculada com base na curva padrão e foi expressa em miligramas equivalentes de tanino quebracho por 100 gramas de amostra em base seca.

3.3.4.3.3 Método de 4-dimetilaminocinamaldeído (DMAC)

As proantocianidinas das amostras dos líquores de cupuaçu e cacau foram quantificadas pela metodologia DMAC conforme Prior *et al.* (2010).

3.3.4.4. Seqüestro de radicais livres (DPPH)

A capacidade antioxidante foi determinada através da redução do DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) pelos antioxidantes presentes no extrato metanol:água (70:30), método proposto por BRAND-WILLIAMS et al. (1995) com algumas modificações (DUARTE-ALMEIDA et al., 2006). Foi preparada uma solução metanólica de DPPH• (0,05 mM) de forma a apresentar aproximadamente 0,4 de absorbância em 517 nm de comprimento de onda. As determinações foram realizadas em microplaca de poliestireno com 96 cavidades (Costar, Cambridge, MA) para uso em comprimento de onda entre 340 e 800 nm. Em cada cavidade foram adicionados 250 µL da solução de DPPH•, 50 µL de metanol para o grupo controle, o mesmo volume para a solução-padrão de Trolox e para os extratos obtidos das amostras, adequadamente diluídos quando necessário. Foram efetuadas leituras de absorbância a 517 nm no tempo zero e após 20 minutos, utilizando-se espectrofotômetro de microplaca a 25 °C. O cálculo foi efetuado com o auxílio da seguinte fórmula:

$$\% \text{ descoramento do DPPH} = \frac{A_{517(C)} - A_{517(A)}}{A_{517(C)}} \times 100$$

na qual, $A_{517(C)}$ refere-se à absorbância do controle a 517 nm e $A_{517(A)}$ refere-se à absorbância da amostra a 517 nm. A curva padrão foi preparada com uma solução de Trolox em diferentes concentrações para a determinação de suas respectivas porcentagens de descoramento. Os resultados foram expressos em µmoles equivalentes de Trolox/g amostra, em base seca.

3.3.4.5. Capacidade de absorção do radical oxigênio (ORAC)

Utilizou-se a metodologia descrita por D'ÁVALOS e colaboradores (2004).

Todas as análises foram feitas em triplicata de extrato metanol:água (70:30), e os valores foram expressos em µmoles equivalentes de Trolox/g de amostra em base seca.

3.3.5. Determinação da atividade inibitória da α -glicosidase

3.3.5.1. Extração

Os extratos obtidos em metanol : água (70:30) do item 3.3.5.1 foram rotaevaporados até secagem completa. Em seguida, o resíduo obtido foi ressuspensionado em água destilada e seu volume foi ajustado para 10 mL em balão volumétrico. Uma alíquota de 5 mL deste extrato aquoso foi passada em coluna de 1 g de Poliamida (CC 6, Macherey-Nagel). A coluna foi então lavada com 20 mL de água e a eluição dos compostos fenólicos foi feita com 20 mL de metanol e 20 mL metanol:amônia (99,5:0,5). Novamente, as frações eluídas de metanol e metanol:amônia foram unidas e rotaevaporadas até secagem completa, e ressuspensionadas em 10 mL de metanol.

3.3.5.2. Inibição de α -glicosidase

Este ensaio foi baseado no método cromogênico descrito por WATANABE *et al.* (1997), com algumas modificações realizadas por KIM *et al.* (2000), e verifica a capacidade de uma amostra em inibir a produção de glicose, liberada na quebra do substrato pela enzima. A enzima α -glicosidase (EC 3.2.1.20, tipo I, Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA) - 0.7 U / 10 μ g/mL - isolada de fungo, foi dissolvida em tampão fosfato 0,1 M (pH 7,0) contendo 2 g/L de albumina bovina sérica (Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA) e 0,2 g/L de azida sódica (NaN_3). O substrato utilizado na reação foi o p-nitrofenil- α -D-glicosídeo, também dissolvido em tampão fosfato pH 7,0. Para o ensaio a 100 μ L da solução enzimática foram adicionados 20 μ L de extrato em microplaca de poliestireno com 96 cavidades (Costar, Cambridge, MA), e incubados por 5 minutos a 37 °C. Após incubação, foram adicionados 100 μ L de substrato e, novamente, incubou-se por mais 5 minutos a 37 °C. Foram efetuadas leituras de absorbância a 405 nm no tempo 0 e após 10 minutos, utilizando-se espectrofotômetro de microplaca a 37 °C. Os extratos foram diluídos em várias proporções (1/2, 1/3, 1/5, 1/10, 1/20 e 1/40) em cada análise realizada, de modo a obter-se linearidade em relação à porcentagem de inibição da amostra.

Os cálculos foram efetuados com o auxílio da seguinte fórmula:

$$\% \text{ inibição} = \frac{A_{405(C)} - A_{405(A)}}{A_{405(C)}} \times 100$$

na qual, $A_{405(C)}$ refere-se à absorbância do controle a 405 nm e $A_{405(A)}$ refere-se à absorbância da amostra a 405 nm.

Os resultados obtidos foram expressos em μg de amostra em base seca / mL do meio de reação necessário para inibir 50 % da produção de glicose, ou IC 50.

3.3.6. Determinação da atividade inibitória de α -amilase

3.3.6.1. Extração

Os extratos obtidos com metanol : água (70:30) do item 3.3.4.1 foram rotaevaporados até secagem completa. Em seguida, o resíduo obtido foi ressuspenso em água destilada e seu volume foi ajustado para 10 mL em balão volumétrico. Uma alíquota de 5 mL deste extrato aquoso (pipetada sob agitação lenta) foi passada em coluna de 1 g de Poliamida (CC 6, Macherey-Nagel). A coluna foi então lavada com 20 mL de água, e a eluição dos compostos fenólicos foi feita com 20 mL de metanol e 20 mL metanol:amônia (99,5:0,5). Novamente, as frações eluídas de metanol e metanol:amônia foram unidas e rotaevaporadas até secagem completa, e ressuspendidas em 10 mL de metanol.

3.3.6.2. Inibição da α -amilase

Este ensaio foi baseado no método cromogênico descrito por ALI *et al.* (2006), e verifica a capacidade de uma amostra em inibir a produção de maltose pela ação da enzima α -amilase sobre o amido. Para tanto, foi preparada uma solução 0,5 mg/mL da enzima α -amilase pancreática suína (EC 3.2.1.1, tipo VI-A, Sigma Chemical Co., Saint Louis, EUA) dissolvida em tampão fosfato 0,2 M (pH 6,9). O substrato utilizado na reação foi amido de batata 0,5 % (m/v), também dissolvido em tampão fosfato 0,2 M após breve aquecimento. Neste ensaio, 40 μL do extrato, 160 μL de água destilada e 200 μL de solução enzimática foram adicionados a um tubo de ensaio e incubados a 25 °C por 3 minutos. A reação foi iniciada com a adição de 400 μL da solução de amido 0,5 %. Uma alíquota de 200 μL da solução foi

retirada em intervalos de tempo diferentes (0, 1, 2 e 3 minutos) e adicionada a outro tubo de ensaio, contendo 100 μL de solução de DNS (96 mM - ácido 3,5-dinitrosalicílico) e levada diretamente para o banho a 85 °C. Após 15 minutos, a mistura foi retirada do banho e diluída com 900 μL de água destilada. A atividade de α -amilase foi determinada pela leitura a 540 nm em microplaca de poliestireno com 96 cavidades (Costar, Cambridge, MA), utilizando-se espectrofotômetro de microplaca. O controle positivo da reação representa 100 % da atividade enzimática e foi conduzido da mesma forma, usando 40 μL de metanol ao invés de extrato. Para o branco da reação, a solução enzimática foi substituída por água destilada, e o procedimento foi realizado da mesma forma como descrito acima. No tempo 0, as amostras foram adicionadas à solução de DNS imediatamente após a adição de enzimas.

A produção de maltose foi calculada de acordo com a seguinte fórmula:

$$\text{Produção de maltose} = A_{540} \text{ extrato ou controle} - A_{540} \text{ branco}$$

Onde A_{540} representa a absorbância referente à produção de maltose do controle ou do extrato. Através da absorbância de maltose produzida, pode-se calcular a porcentagem de maltose (massa/volume) gerada pela equação da reta obtida na curva padrão de glicose (0 - 1 mg/mL).

A porcentagem de inibição de formação de maltose foi calculada através da seguinte fórmula:

$$\% \text{ de inibição} = 100 - [(\% \text{ maltose produzida pelo extrato no tempo 3 minutos} / \% \text{ maltose produzida pelo controle no tempo 3 minutos}) \times 100]$$

Os resultados obtidos foram expressos em μg de amostra em base seca / mL do meio de reação necessário para inibir em 50 % a formação de maltose.

3.3.7 Determinação dos efeitos da ingestão de líquido de cupuaçu e cacau em dois protocolos experimentais com ratos *Wistar*

3.3.7.1. Modelos experimentais com ratos

3.3.7.1.1 Diabetes induzida por estreptozotocina

O efeito da administração diária dos líquidos de cupuaçu e cacau, precursores respectivamente do cupulate[®] e chocolate, sobre o estresse oxidativo foi avaliado em ratos *Wistar* com diabetes induzido por estreptozotocina. Os ratos foram mantidos em caixas de polipropileno, com temperatura entre 23 ± 2 °C e ciclo claro/escuro de 12/12h. Para a indução do diabetes, os animais com aproximadamente 200 g foram mantidos em jejum de oito horas, durante o qual receberam apenas água. Após esse período, uma dose intraperitoneal de estreptozotocina (65 mg/kg peso animal) foi administrada. Em seguida, os ratos permaneceram sem alimentação por mais oito horas, recebendo apenas uma solução aquosa de glicose a 10%. Após sete dias, foi verificado o desenvolvimento de diabetes por meio da aferição da glicemia de jejum de sangue coletado da veia caudal. Os animais com glicemia superior a 200 mg/dL foram considerados diabéticos (OLIVEIRA *et al.*, 2008).

Os animais foram divididos em cinco grupos com 12 animais cada: (controle) controle diabéticos; (cup 1) ratos diabéticos com tratamento de 3,6 g de líquido de cupuaçu/kg de peso corpóreo, (cup 2) ratos diabéticos com tratamento 7,2 g de líquido de cupuaçu/kg de peso corpóreo; (cac 1) ratos diabéticos com tratamento de 3,6 g de líquido de cacau/kg de peso corpóreo e (cac 2) ratos diabéticos com tratamento de 7,2 g de líquido de cacau/kg de peso corpóreo. O tratamento tanto do líquido de cupuaçu quanto de cacau constava da amostra triturada, passada em tamis 1 mm e suspensa em água, enquanto o controle recebia apenas água por gavagem. O volume administrado aos animais nunca excedia 1 mL / 100 g de peso corpóreo. Os animais foram assim tratados por 40 dias consecutivos. Durante esse período foram verificados diariamente o consumo de ração e água referente a cada caixa. A cada sete dias era realizado controle glicêmico de todos os animais e a cada três dias os animais eram pesados.

Após 40 dias de tratamento os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal da mistura cetamina/xilazina (3:1). O sangue foi coletado por punção cardíaca em tubos com EDTA. Para a obtenção de plasma, as amostras foram imediatamente centrifugadas por 10 min a 1000 g (4 °C); o plasma separado foi armazenado a -80°C até o momento da análise. A seguir foram coletados cérebro, fígado e rins, os quais foram pesados e imediatamente congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -80°C. No momento da análise os homogenatos foram preparados com tampão PBS pH 7,4 na proporção 1 g de tecido / 4 mL de tampão. Estes homogenatos foram centrifugados a 3500 rpm / 20 min a 4 °C. Uma alíquota do sobrenadante foi separada (alíquota peroxidação). O restante do sobrenadante foi centrifugado novamente, no entanto, a 11200 rpm / 20 min a 4 °C (alíquota enzimas)

3.3.7.1.2 Modelo experimental de ratos tratados com dieta hiperlipídica

Ratos *Wistar* tratados com rações controle AIN-93M e hiperlipídica, conforme a Tabela 2, foram avaliados quanto ao efeito da administração diária dos extratos fenólicos dos líquidos de cupuaçu e cacau, precursores respectivamente do cupulate® e chocolate sobre o perfil lipídico, atividade de enzimas marcadoras da função hepática, tolerância oral à glicose, resistência à insulina e estresse oxidativo. O tratamento foi baseado no consumo humano de 150 e 500g de líquido de cupuaçu ou cacau por dia, considerando uma pessoa de 70 kg. Desse modo os dados foram extrapolados para a definição das doses administradas aos ratos neste protocolo experimental.

O protocolo experimental durou 16 semanas sendo dividido em dois períodos denominados *baseline* e tratamento, conforme a Figura 6.

Figura 6. Divisão dos animais em grupos e determinação dos períodos *baseline* e tratamento.

O protocolo experimental foi iniciado com 56 ratos *Wistar* pesando $200 \text{ g} \pm 20$, mantidos em caixas de polipropileno, com temperatura entre $23 \pm 2^\circ\text{C}$, ciclo claro/escuro de 12/12h e dividido em dois períodos:

Período *Baseline*: por 12 semanas os 56 animais foram divididos nos grupos controle - ração AIN-93M (n=14) e ração HL (n=42). Ao fim da 12ª semana sete animais de cada grupo foram eutanasiados.

Período Tratamento: da 13ª a 16ª semanas os animais restantes foram novamente divididos em seis grupos de sete animais conforme a descrição abaixo.

- controle: ratos alimentados com ração controle AIN-93M da primeira a 16ª semana.

- HL: ratos alimentados com ração hiperlipídica da primeira a 16ª semana.

- Cac 1: ratos alimentados com ração hiperlipídica da primeira a 16ª semana e tratados com extrato fenólico do líquido de cacau correspondente a ingestão diária de 2,1 g/ kg do líquido de cacau da 13ª a 16ª semanas.

- Cac 3: ratos alimentados com ração hiperlipídica da primeira a 16ª semana e tratados com extrato fenólico do líquido de cacau correspondente a ingestão diária de 7,2 g/ kg do líquido de cacau da 13ª a 16ª semanas.

- Cup 1: ratos alimentados com ração hiperlipídica da primeira a 16^a semana e tratados com extrato fenólico do líquido de cupuaçu correspondente a ingestão diária de 2,1 g/ kg do líquido de cupuaçu da 13^a a 16^a semanas.

- Cup 3: ratos alimentados com ração hiperlipídica da primeira a 16^a semana e tratados com extrato fenólico do líquido de cupuaçu correspondente a ingestão diária de 7,2 g/ kg do líquido de cupuaçu da 13^a a 16^a semanas.

Nos dias estabelecidos para a eutanásia, os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal da mistura cetamina/xilazina (3:1). O sangue foi coletado por punção cardíaca em tubos com EDTA. Para a obtenção de plasma, as amostras foram imediatamente centrifugadas por 10 min a 1000 g (4 °C); o plasma separado foi aliquoteado e armazenado a -80°C até o momento da análise. A seguir foram coletados cérebro, fígado e os coxins adiposos periepídidimo e retroperitoneal, os quais foram fracionados, pesados e imediatamente congelados em nitrogênio líquido com posterior armazenamento a -80°C. No momento da análise os homogenatos foram preparados com tampão PBS pH 7,4 na proporção 1 g de tecido / 4 mL de tampão. Estes homogenatos foram centrifugados a 3500 rpm / 20 min a 4 °C. Uma alíquota do sobrenadante foi separada (alíquota peroxidação). O restante do sobrenadante foi centrifugado novamente, no entanto, a 11200 rpm / 20 min a 4 °C (alíquota enzimas).

3.3.7.2.2 Produção das rações controle e hiperlipídica

Em um experimento piloto determinou-se a quantidade diária de ração consumida por cada animal. Desse modo foi realizado o ajuste de macro e micronutrientes entre as duas rações, AIN – 93M e AIN – 93M acrescida de banha.

Os animais foram alimentados *ad libitum* com água e ração elaborada para ratos adultos, segundo o *American Institute of Nutrition* (AIN – 93M) (REEVES *et al.*, 1993). A ração hiperlipídica (HL) foi baseada no AIN-93M, sendo acrescida de banha de porco em substituição ao amido de milho, o que visa a aumentar o teor de lipídios da dieta e, conseqüentemente, favorecer a indução de ganho de peso em ratos. A composição das rações está expressa na Tabela 2.

Tabela 2. Composição das rações controle e hiperlipídica em gramas/1000 kcal.

Ingredientes	Ração Controle	Ração Hiperlipídica
	gramas por 1.000 kcal de ração	
Amido	155,40	36,25
Sacarose	25,04	25,04
Caseína	35,05	35,05
Óleo de soja	10,01	10,01
Banha de porco	-----	56,24
Celulose	12,52	12,52
Mistura salina	8,76	8,76
Mistura vitamínica	2,50	2,50
L-cistina	0,45	0,45
Bitartarato de colina	0,63	0,63
Tertbutil hidroquinona	0,002	0,007

3.3.7.2.3 Purificação das amostras para obtenção dos extratos fenólicos

O procedimento foi baseado na extração de flavonóides por ARABBI *et al.* (2004). As proporções entre amostra e solvente foi alterada para 1:10 (m/v) tendo em vista a grande quantidade de amostra a ser purificada.

A purificação dos extratos para a obtenção dos compostos fenólicos foi feita pelo processo de separação descrito como extração em fase sólida. Para tanto o extrato foi passado em colunas com 20 g da fase estacionária C18. As colunas foram pré-condicionadas pela passagem de 200 mL de metanol e 600 mL de água. Após a passagem dos extratos aquosos, as colunas foram lavadas com 200 mL de água e a eluição dos flavonóides foi feita com 400 mL de metanol seguido de 400 mL de metanol:amônia (99,5:0,5). Foi utilizado Manifold Visiprep 24DL da Supelco. As duas frações de solventes recolhidas foram misturadas e evaporadas em rotaevaporador até a secagem. Então o resíduo contido no balão de evaporação foi totalmente solubilizado em água e congelado até a sua utilização.

3.3.7.2 Análises

3.3.7.2.1 Capacidade antioxidante do plasma

A capacidade antioxidante total do plasma, eritrócitos e homogenato de tecidos (alíquota peroxidação) do item 3.3.8.1 foi avaliada pelos métodos ORAC, descrito por Cao *et al.* (1993) e FRAP descrito por Benzie e Strain (1996).

3.3.7.2.2 Determinação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

A determinação de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) do plasma e tecidos (alíquota peroxidação do item 3.3.8.1) foi feita de acordo com o método de OHKAWA *et al.* (1979). A quantidade de TBARS produzida foi calculada a partir da absorbância a 532 nm, usando-se 1,1,3,3 tetraetoxipropano para construção da curva padrão.

3.3.7.2.3 Atividade das enzimas antioxidantes

A atividade das enzimas CAT, GPx e SOD foram analisadas em plasma, eritrócitos e homogenato de tecidos (alíquota enzimas) do item 3.3.8.1.

A atividade da catalase (CAT) (EC 1.11.1.6) foi determinada espectrofotometricamente segundo AEBI (1984), baseando-se no decaimento da absorbância a 230 nm ($\epsilon_{230}=0,071 \text{ mM}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) devido à decomposição do H_2O_2 . A reação é iniciada pela adição de 1 mL de H_2O_2 30 mM preparada no momento de uso. A taxa de decomposição de H_2O_2 foi determinada espectrofotometricamente a 230 nm. A atividade da CAT é dada pela variação na absorbância (ΔA_{230}) por unidade de tempo por mg de proteína ou mg de Hb.

A atividade da glutathione peroxidase (GPx) (EC 1.11.1.9) foi determinada conforme Wendel (1984). A mistura de reação consistirá de tampão fosfato 75 mM com EDTA e NaN_3 (pH 7,0), amostra diluída, NADPH 0,1 mM, GSH 4,0 mM, e 1,5 U de glutathione reductase (GR) em um volume final de 500 μL a 37 °C. A reação foi iniciada pela adição de H_2O_2 3,0 mM. A mudança de absorbância durante a conversão de NADPH a NADP^+ foi determinada espectrofotometricamente a 340 nm por 3 min. A atividade da GPx foi expressa como μmol de NADPH oxidado a NADP^+ $\text{min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ proteína mg de Hb.

A atividade da superóxido dismutase (SOD) (EC 1.15.1.1) foi determinada espectrofotometricamente a 560 nm utilizando-se o método de DURAK et al. (1993). A mistura de reação (tampão fosfato 50 mM, pH 7,8) consistiu da inibição induzida por SOD da redução de nitro blue tetrazolium, usando um sistema gerador de radical livre de 0,1 mM de xantina e uma quantidade de xantina oxidase suficiente para produzir uma mudança de absorbância de 0,025/min. A atividade de SOD foi expressa como unidades/mL ou mg de proteína, sendo que 1 unidade corresponde à quantidade de enzima requerida para inibir 50% da formação de nitrito em 1 mL de reação em 1 min a 37 °C.

As concentrações protéicas foram determinadas com o método de Lowry usando albumina de soro bovino (Sigma Chemicals Co.) como padrão. A concentração de hemoglobina foi determinada utilizando o reagente de Drabkin.

3.3.7.2.4 Parâmetros bioquímicos

Os teores de colesterol total, triacilgliceróis, HDL colesterol, glicose, uréia, creatinina, AST, ALT e GamaGT foram determinados usando-se os kits comerciais LABTEST (Lagoa Santa, MG).

A determinação da concentração de glicose do sangue coletado da veia caudal foi realizada utilizando-se o glicosímetro Accu-Chek Advantage II (Roche®).

3.3.7.2.5 Teste oral de tolerância à glicose (oGTT) e teste intraperitoneal de tolerância à insulina (ipITT)

Estes testes foram realizados somente no modelo descrito em 3.3.7.1.2.

Na décima segunda e décima sexta semanas após o início do protocolo experimental foram realizados o oGTT e o ipITT. Em ambos os testes os animais foram deixados 10 a 12 horas em jejum. No oGTT, uma amostra de sangue foi retirada da veia caudal de cada rato (tempo 0), os quais receberam, imediatamente após, via gavagem, uma solução de glicose (20%) na concentração de 2 g/kg/ p. c. (WADA et al., 2010; WANG et al., 2010). Após esse procedimento, amostras de sangue foram coletadas nos tempos de 30, 60, 90 e 120 minutos.

Para o ipITT, foi injetado uma dose de insulina regular (Novo Nordisk, Montes Claros, M. G., Brasil, 75 mU/100 g p.c.) intraperitonealmente. A glicemia foi determinada em amostras de sangue retiradas da cauda nos tempos 0 (basal), 5, 10, 15, 20, 25, 30 e 40 min após a administração de insulina. Os valores obtidos entre os tempos de 5 a 30 min foram usados para calcular a constante da taxa de desaparecimento da glicose plasmática (K_{ITT}), mediante análise da curva de decaimento (pelo programa GraphPad Prism versão 5.0 para Windows) de acordo com método proposto por Bonora et al. (1989). A determinação da concentração de glicose foi realizada utilizando-se o glicosímetro Accu-Chek Advantage II (Roche®).

3.3.8. Análise estatística

As análises foram realizadas em triplicata e os resultados expressos como média $\pm$ desvio-padrão. Primeiramente os resultados foram avaliados pelo teste de Hartley para testar a homogeneidade das variâncias. One-way ANOVA foi utilizado

para a identificação das discrepâncias entre as amostras e as diferenças entre as médias foram analisadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tendo em vista os modelos de experimentação animal desta pesquisa, escolheu-se trabalhar com os líquidos de cupuaçu e cacau, etapa imediatamente anterior ao produto final cupulate® e chocolate respectivamente. Portanto, as amostras utilizadas neste trabalho foram as amêndoas após passagem pelo moinho de facas, sem a adição dos ingredientes finais (leite, açúcar, lecitina e manteiga), ou seja, o produto conhecido como líquido.

4.1. Composição centesimal do líquido de cupuaçu e cacau.

A composição centesimal das amostras de líquido de cupuaçu e cacau está expressa na Tabela 3.

Tabela 3. Composição centesimal do líquido de cupuaçu e cacau (%).

	Líquor de cupuaçu	Líquor de cacau
Umidade	2,64 ± 0,03	2,26 ± 0,02
Cinzas	3,0 ± 0,2	0,73 ± 0,01
Lipídeos	54 ± 2	52 ± 3
Proteínas	10,5 ± 0,3	15,2 ± 0,8
Carboidratos*	27 ± 2	32 ± 2
Fibras	22,5 ± 0,7	20,1 ± 0,8

* o valor de carboidratos expressa o teor de carboidratos totais da amostra.

Devido à proximidade filogenética entre as amostras, ambas apresentaram composição centesimal semelhante, sendo importante constatar o alto teor lipídico do líquido de cacau e cupuaçu haja vista que são sementes e, portanto, tecidos de reserva energética do vegetal.

A determinação de carboidratos foi realizada conforme Dubois *et al.* (1956). Este ensaio determina os carboidratos totais da amostra, portanto as fibras estão inclusas. Foi realizado o ensaio enzimático para a determinação de fibras totais e

detectou-se 22,5% no líquido de cupuaçu e 20,1% no líquido de cacau. Portanto subtraindo fibras dos carboidratos totais obtém-se 4,5 e 11,2% de carboidrato disponível nos líquidos de cupuaçu e cacau respectivamente.

O líquido de cacau apresentou aproximadamente 50% mais proteínas que o líquido de cupuaçu. Genovese e Lannes (2009) relataram superioridade em torno de 70% de proteínas do cacau frente ao pó de cupuaçu. No entanto Lopes *et al* (2008) concluíram que as proteínas do cupuaçu apresentaram considerável potencial nutricional, pois possuem valor biológico e composição aminoacídica superiores às do cacau.

4.1.1 Análises de minerais

A composição mineral de frutas é dependente não somente da espécie e variedade. As condições de crescimento como o solo e as condições climáticas influenciam grandemente. Determinou-se nesse trabalho a composição dos minerais N, P, K, Ca, Mg, S, B, Zn Fe, Mn, Cu, Na e Se nos líquidos de cupuaçu e cacau (Tabela 4).

Tabela 4. Composição mineral dos líquidos de cupuaçu e cacau em mg/100g de amostra.

	Cupuaçu	Cacau
N	2330	2590
P	200	360
K	750	680
Ca	30	50
Mg	200	200
S	110	20
B	1,0	1,2
Zn	3,1	3,4
Fe	3,2	7,0
Mn	1,8	8,4
Cu	2,0	1,9
Na	0,88	1,63
Se	<LQ*	<LQ*

LQ = 0,002 mg/kg

Houve similaridade entre as amostras na quantificação da maioria dos minerais. No entanto o líquido de cacau tem 79% mais ferro, 54% mais manganês e 46% mais sódio que o líquido de cupuaçu.

Steinberg *et al.* (2003) determinaram a composição mineral do líquido de cacau, sendo as quantidades semelhantes às encontradas neste trabalho. No entanto, as quantidades de ferro e magnésio encontradas por estes, foram aproximadamente 3 vezes superior.

Em relação ao cupuaçu, são escassos os estudos especialmente em relação à composição mineral. Yuyama *et al.* (1997) quantificaram o teor de minerais em polpa de cupuaçu sendo estes, inferiores aos valores encontrados no presente trabalho. A única exceção foi a quantificação de Selênio com concentração de 0,7 µg/100g de polpa.

4.2 Teores de compostos fenólicos e capacidade antioxidante

4.2.1 Eficiência de extração

A extração de polifenóis é influenciada grandemente por fatores extrínsecos à amostra vegetal. A característica do solvente, o mecanismo utilizado, o tamanho de partícula, o tempo de exposição, a temperatura e o pH são alguns dos interferentes na eficiência da extração destes compostos.

A fim de determinar o mecanismo mais eficiente para a extração dos compostos fenólicos do líquido de cupuaçu foram comparados a barra agitadora magnética por duas horas a 25 °C e o homogeneizador do tipo Ultra-Turrax, utilizando metanol : água (70:30) a 25 °C. Os métodos de Folin-Ciocalteu descrito por Singleton *et al.* (1999), com modificações (GENOVESE *et al.*, 2003) e butanol acidificado conforme Porter *et al.* (1986) foram utilizados para monitorar os teores de compostos fenólicos totais e proantocianidinas respectivamente. Os resultados são apresentados na Tabela 4.

Tabela 4. Influência das condições de extração nos teores de compostos fenólicos totais e proantocianidinas totais dos líquidos de cupuaçu e cacau.

Amostras	Agitador magnético	homogeneizador	Agitador magnético	homogeneizador
	Compostos fenólicos totais*		Proantocianidinas totais**	
Líquor de Cupuaçu	784 ± 33	383 ± 18	1950 ± 56	1196 ± 26
Líquor de Cacau	2845 ± 245	1199 ± 121	7059 ± 246	4209 ± 178

*valores de compostos fenólicos totais expressos em mg eq. catequina/100 g de amostra (b.s)

**valores de proantocianidinas totais expressos em mg eq tanino quebracho/100 g de amostra (b.s)

Conclui-se que a agitação magnética por duas horas a 25 °C foi o mecanismo de extração mais eficiente tanto para compostos fenólicos totais quanto para proantocianidinas totais. Tal constatação pode ser explicada pelo maior tempo de exposição das amostras ao solvente extrator o que garantiu uma maior penetração do líquido extrator na amostra.

Para verificar a mistura de solventes mais eficiente na extração dos compostos fenólicos foram utilizadas diferentes soluções extratoras em agitação magnética por duas horas a 25 °C e os resultados expressos na Figura 5.

Figura 7. Teor de compostos fenólicos totais (Folin-Ciocalteu) e proantocianidinas totais do líquido de cupuaçu e cacau em diferentes misturas de solventes extratores. Letras diferentes sobre as colunas indicam diferença estatística ($p < 0,05$).

Solventes como metanol, acetona, etanol e água ou a mistura desses são usados na extração de polifenóis. Estes, geralmente são encontrados na forma glicosilada. As agliconas (polifenóis sem açúcar) são menos polares em relação aos glicosídeos e, portanto mais solúveis em solventes menos polares.

Verificou-se que a mistura de solventes acetona : água : HCl (70 : 29,5 : 0,5) apresentou uma eficiência de extração estatisticamente maior. No entanto, ao evaporar o solvente extrator e solubilizar o material extraído em água houve formação de precipitado impossibilitando a posterior administração deste extrato aos ratos. Tal constatação ocorreu em todas as extrações com acetona e misturas extratoras de solventes acidificados.

De acordo com Kim *et al.* (2003) o rendimento de extração de polifenóis com mistura aquosa de acetona foi mais eficiente que a mistura aquosa com metanol para sementes de uva. Soluções aquosas com solvente orgânico extraem mais compostos fenólicos, pois a semente quando saturada com água permite que o solvente orgânico penetre mais profundamente no tecido vegetal aumentando assim o rendimento da extração (PEKIC *et al.*, 1997). O mesmo princípio de utilização de soluções aquosas com metanol ou acetona foi citado por Wollgast e Anklam (2000) e Hammerstone *et al.* (1999) para a extração de polifenóis das sementes de cacau.

Portanto a mistura de solventes escolhida para as extrações de líquido de cupuaçu para os ensaios *in vivo* foi metanol : água (70 : 30) tendo em vista principalmente a pequena formação de compostos insolúveis.

4.2.2 Compostos fenólicos totais, capacidade de seqüestro do DPPH e ORAC.

Após a definição do mecanismo e mistura de solventes extratores, as amostras de líquido de cupuaçu e cacau foram avaliadas quanto ao teor de compostos fenólicos, proantocianidinas totais por dois métodos e capacidade antioxidante pelas metodologias de capacidade de seqüestro do DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) proposto por BRAND-WILLIAMS *et al.* (1995) com algumas modificações (DUARTE-ALMEIDA *et al.*, 2006) e ORAC (Capacidade de Absorção do Radical Oxigênio) metodologia descrita por D'ávalos e colaboradores (2004) (Tabela 5).

Tabela 5. Compostos fenólicos totais, proantocianidinas totais (PAC) pelos métodos de butanol acidificado e pelo método DMAC e capacidade antioxidante pelos métodos DPPH e ORAC dos extratos dos líquidos de cupuaçu e cacau.

Amostra	Compostos fenólicos totais*	PAC – butanol acidificado**	PAC - DMAC***	DPPH ^{\$}	ORAC ^{\$}
Cupuaçu	784 ± 54	1950 ± 86	870 ± 75	1913 ± 228	13628 ± 184
Cacau	2845 ± 245	7059 ± 246	2200 ± 185	7957 ± 589	45193 ± 272

* mg equivalente de catequina/100 g de amostra b.s.

** mg eq tanino quebracho/100 g de amostra b.s.

*** mg eq procianidina A2/100 g de amostra b.s.

^{\$} µmoles equivalentes de trolox/100g de amostra b.s.

Assim como os resultados apresentados por Jonfia-Essien *et al.* (2008), o valor de compostos fenólicos totais, proantocianidinas totais e de atividade antioxidante do líquido de cupuaçu foi aproximadamente 3 vezes inferior ao líquido de cacau. Comparativamente é evidente o maior teor de compostos fenólicos na amostra de cacau, devido principalmente ao alto teor de proantocianidinas das sementes de cacau. No entanto tal característica atribui a este fruto e seus derivados uma maior adstringência (SARNI-MACHADO, 1999). Queiroz *et al.* (2000)

descreveram o chocolate como um produto mais amargo, ácido e característico. Em contrapartida o cupulate[®] foi percebido como mais doce e de sabor mais suave.

Os compostos fenólicos são substâncias oriundas do metabolismo secundário vegetal com função de proteção contra agentes agressores como herbívoros, bactérias, vírus além de servir para a atração de polinizadores. Os taninos, uma classe de compostos fenólicos, possuem a característica de redução da palatabilidade e digestibilidade (WINK, 2003; HARBORNE, 1993; KESSLER, 2006). Tendo em vista este conhecimento espera-se que estes compostos estejam presentes em folhas e cascas, mas não em sementes.

A alta concentração de compostos fenólicos em sementes seria, portanto um mecanismo de defesa contra doenças e pestes. Uma possível resposta para a presença de compostos fenólicos em sementes, de acordo com Martín *et al.* (1991), Islam *et al.* (2003) e Latanzio *et al.* (2005), derivaria da cobertura externa desta estrutura, o tegumento ou testa, garantindo proteção da semente contra parasitas.

4.3 Purificação em C18 e poliamida

Para comparar a atividade biológica das frações fenólicas de cupuaçu e cacau, foram realizados dois métodos para sua obtenção baseados em extração em fase sólida. Dessa forma após a purificação dos extratos de líquido de cupuaçu e cacau em duas fases estacionárias, C18 e poliamida, foram realizadas as análises dos teores de compostos fenólicos totais e proantocianidinas para fins de comparação.

4.3.1 Compostos fenólicos totais

O objetivo desse teste era determinar o meio mais eficiente de separar os compostos fenólicos das matrizes estudadas obtendo frações representativas e com o maior rendimento possível.

Os teores de compostos fenólicos totais foram monitorados pelo método de Folin-Ciocalteu (SINGLETON, 1999).

4.3.1.1 Compostos fenólicos totais do líquido de cupuaçu

Na purificação em poliamida, 28,6 e 20,6 % dos compostos fenólicos foram eluídos com metanol e metanol:amônia (99,5:0,5) respectivamente em relação ao extrato bruto.

Na purificação em C18, 70% dos compostos fenólicos foram eluídos com metanol em relação ao extrato bruto e menos de 1% foi eluído metanol:amônia.

4.3.1.2 Compostos fenólicos totais do líquido de cacau

Na purificação em poliamida, 23,7 e 16,6 % dos compostos fenólicos são eluídos com metanol e metanol:amônia (99,5:0,5) respectivamente em relação ao extrato bruto.

Na purificação em C18, 58% dos compostos fenólicos foram eluídos com metanol em relação ao extrato bruto e menos de 1% foi eluído com metanol:amônia.

4.3.2 Proantocianidinas totais

Os teores de proantocianidinas totais foram monitorados pelo método do butanol acidificado descrito por Porter *et al.* (1986)

4.3.2.1 Líquido de cupuaçu

Na purificação em poliamida, 6,8 e 4,2 % das proantocianidinas são eluídas com metanol e metanol:amônia (99,5:0,5), respectivamente, em relação ao extrato bruto.

Na purificação em C18, 77 % são eluídos em metanol em relação ao extrato bruto e menos de 1% foi eluído com metanol:amônia (99,5:0,5).

Na água de lavagem não houve eluição de proantocianidinas.

4.3.2.2 Líquor de cacau

Na purificação em poliamida, 12,3 e 11,9 % das proantocianidinas são eluídas com metanol e metanol:amônia (99,5:0,5) respectivamente em relação ao extrato bruto.

Na purificação em C18, 85,9 e 4,3 % são eluídos com metanol e metanol:amônia (99,5:0,5), respectivamente, em relação ao extrato bruto.

Na água de lavagem não houve eluição de proantocianidinas.

Os resultados apresentados evidenciam que a purificação em poliamida não é apropriada para as amostras estudadas, já que ambas as amostras possuem teores consideráveis de proantocianidinas que se ligam irreversivelmente a essa fase estacionária.

4.4 Identificação e quantificação dos flavonóides

Para a identificação e quantificação dos flavonóides, as amostras de líquido de cupuaçu e cacau foram extraídas com metanol 70 %, rotaevaporada e purificada em poliamida e C18. Os flavonóides foram eluídos, primeiramente, com metanol puro e em seguida metanol : amônia (99,5 : 0,5). Estas duas frações foram analisadas por CLAE.

A identificação dos flavonóides do líquido de cupuaçu foi realizada de acordo com Pugliese (2010). Os cromatogramas monitorados em 270 nm do extrato bruto e frações eluídas das purificações em poliamida e C18 estão apresentados no Anexo 1. Não foi observada a presença de flavonóides nas águas de lavagem de ambas as amostras.

Absorção no espectro UV

Na fração metanol, identificou-se catequina em 6,8 min (com 98,6% de semelhança com o padrão), epicatequina em 7,7 min (com 99,9% de semelhança com o padrão) e um derivado de quercetina em 12 min (com 99,7% de semelhança com um padrão de quercetina rutinosídeo). Três compostos foram detectados, mas não definitivamente identificados: em 7,1 min (com semelhança de 95,0% com o padrão de catequina), em 9,0 min (com semelhança de 97,5% com o padrão de catequina) e em 9,5 min (substância pura com baixa semelhança com os compostos da biblioteca).

Já na fração metanol:amônia (99,5:0,5), pelos espectros de absorção no UV, identificou-se em 7,7 min a epicatequina (com 99,9% de semelhança com o padrão). Novamente, encontraram-se as bandas em 7,1 min (98,8% de semelhança com o padrão de catequina), em 9,0 min (com semelhança de 97,5% com o padrão de catequina) e em 9,5 min (substância pura com baixa semelhança com os compostos da biblioteca). Quatro bandas foram detectadas em 13,0 min, 14,5 min, 14,7 min e 16,2 min (todos com 99,5% de semelhança com o padrão de homorientina); e dois em 15,0 min e 16,7 min (com semelhança de 99,6% e 99,7% com o padrão de isovitexina).

As frações de eluição em metanol e metanol:amônia (99,5:0,5) em poliamida apresentam diferenças na composição dos flavonóides. Na fração metanólica estão presentes os flavanóis (catequina, dímero e epicatequina). Na eluição com metanol:amônia (99,5:0,5) há a predominância dos flavonóides glicosilados rutina, luteolina glicuronídeo, isorhamnetina glicuronídeo e as theograndinas.

A purificação em C18 apresentou uma eluição mais eficiente na fração metanólica, sendo a fração metanol:amônia (99,5:0,5) pouco expressiva e por isso não mostrada no Anexo 1. A utilização do metanol foi eficiente na eluição de todos os flavonóides identificados neste trabalho. Além disso, o rendimento da purificação foi em torno de duas vezes maior que a poliamida. A quantificação dos flavonóides do líquido de cupuaçu está expressa na Tabela 6.

Tabela 6. Flavonóides (mg/100 g de amostra b.s.) do líquido de cupuaçu.

mg/100 g de amostra b.s.			
Flavonóides	Extrato bruto	Poliamida*	C18*
Catequina	49 ± 1	11 ± 2	Nd
Epicatequina	11 ± 1	10 ± 2	9 ± 1
Dímero	93 ± 1	52 ± 3	67 ± 4
Quercetina glucuronídeo	70 ± 3	31 ± 4	59 ± 5
Luteolina glucuronídeo	43 ± 1	11 ± 1	37 ± 2
Isorhamnetina glucuronídeo	24 ± 1	10 ± 2	19 ± 1
Theograndina II	39 ± 2	1,0 ± 0,2	31 ± 3
Theograndina I	62 ± 4	3,0 ± 0,4	51 ± 4
Total	391	129	273

*os valores expressos correspondem à somatória da quantificação das frações de eluição Metanol e Metanol:amônia (99,5:0,5).

No extrato bruto do líquido de cacau foram identificadas cafeína, ácido protocatecúico e as agliconas catequina, epicatequina e quercetina. Na purificação em poliamida houve diferenças nos perfis de eluição das duas frações. Este fato não ocorreu na purificação em C18, pois somente a eluição com metanol foi significativa e apresentou um cromatograma muito semelhante ao obtido no extrato bruto.

Hatano *et al.* (2002) descreveram o chocolate e o cacau como ricas fontes de polifenóis como catequina e seus oligômeros ligados por C4 e C8 formando as proantocianidinas. Devido a essa característica do cacau os cromatogramas apresentados no Anexo 2 são pouco expressivos, pois para identificação e quantificação das proantocianidinas é necessária a utilização de outras fases

estacionárias na extração em fase sólida. Como visto anteriormente as proantocianidinas ligam-se irreversivelmente à poliamida enquanto a C18 exerce baixa interação com esses compostos.

Para a purificação das proantocinidinas Khanal *et al.* (2009) utilizaram a resina Sephadex LH-20. Esta fase estacionária separa os compostos por tamanho molecular, retendo por mais tempo os compostos menores, que se infiltram por entre os poros da dextrana sendo possível identificar diferentes graus de polimerização.

Conclui-se, portanto que as semelhanças encontradas entre as duas amostras estudadas limitaram-se à composição centesimal e perfil de ácidos graxos. Os teores de compostos fenólicos, proantocianidinas e composição de flavonóides foram bem distintos evidenciando particularidades das amostras de cupuaçu e cacau, o que garante a validade da execução dos ensaios biológicos.

4.5 Determinação do potencial biológico

4.5.1 Determinação da atividade inibitória *in vitro* de α -amilase e α -glicosidase

Uma das estratégias terapêuticas para o tratamento da diabetes é a inibição das enzimas responsáveis pela digestão de carboidratos, a alfa-amilase e glicosidase.

A α -amilase está presente na saliva e no suco pancreático sendo responsável por clivar ligações glicosídicas α -1,4 de amilose, liberando dextrina, maltose e maltodextrose (BISCHOFF, 1994; MCCARTER e WITHERS, 1994). Conforme descrito por Stuart *et al.* (2004), a enzima alfa glicosidase cliva as ligações glicosídicas dos carboidratos oferecendo ao organismo monossacarídeos passíveis de absorção. Desse modo a inibição dessas enzimas produziria efeitos anti-hiperglicêmicos.

A possibilidade de uso clínico dos inibidores de α -glicosidase para pacientes diabéticos ou obesos tem sido testada com uso efetivo de duas classes de antihiperglicemiantes orais: acarbose e miglitol. Ambos auxiliam na redução da hiperglicemia pós-prandial por retardar a degradação enzimática de carboidratos no intestino delgado, através da inibição da α -glicosidase, com conseqüente redução da absorção intestinal de glicose (KIM *et al.*, 2000).

Alguns autores propõem que a alta capacidade antioxidante dos compostos fenólicos, especialmente os flavonóides, pode ter efeito na redução do estresse oxidativo e progressão da diabetes mellitus (SONG *et al.*, 2005; MATSUI *et al.*, 2001; KWON *et al.*, 2006; APOSTOLIDIS *et al.* 2006). Soma-se a esses benefícios a atuação dos flavonóides na inibição direta das enzimas envolvidas na digestão de carboidratos (GONÇALVES, GENOVESE, LAJOLO, 2010), com posterior diminuição da glicemia pós-prandial. Neste sentido, é de extremo interesse verificar se os compostos fenólicos presentes nos líquidos de cupuaçu e cacau apresentam capacidade inibitória das enzimas digestivas α -amilase e α -glicosidase.

Comparativamente ao estudo de Gonçalves *et al.* (2010) realizado com 16 diferentes frutos, os líquidos de cupuaçu e cacau apresentaram (Tabela 7) relevante inibição enzimática. No trabalho anteriormente citado a fruta cupuaçu foi destacada como um potente inibidor da α -amilase.

Tabela 7. Atividade inibitória de α -amilase e α -glicosidase por extratos purificados em C18 obtidos dos líquidos de cupuaçu e cacau.

Amostra	Atividade inibitória de α-amilase		Atividade inibitória de α-glicosidase	
	Extrato purificado em C18			
	IC50 (ug amostra b.s / uL reação)	IC50 (ug eq. catequina/ uL reação)	IC50 (ug amostra b.s / uL reação)	IC50 (ug eq. catequina/ uL reação)
Líquor de cupuaçu	8,85	0,046	3,79	0,022
Líquor de cacau	4,55	0,055	3,31	0,044

A α -amilase foi avaliada através da formação de maltose resultante da ação dessa enzima sobre o amido presente no meio. A maltose, um dissacarídeo formado por duas moléculas de glicose (ligação α -1,4) reduz o DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico) formando um produto de cor característica cuja absorbância máxima é determinada a 540 nm. Dessa forma, os açúcares, vitaminas e minerais eventualmente presentes nos extratos brutos foram eliminados e uma fração metanólica rica em flavonóides foi obtida através da purificação em coluna de C18. A α -glicosidase foi avaliada pela ação desta sobre um substrato sintético p-nitrofenil- α -d-glicosídeo que ao ser hidrolisado libera um agente cromóforo (p-nitrofenil).

4.5.2 Determinação do efeito *in vivo* em modelo animal de estresse oxidativo (Experimento *in vivo* 1)

Foi realizado um ensaio *in vivo* a fim de avaliar o efeito da administração diária dos líquidos de cupuaçu e cacau, precursores respectivamente do cupulate® e chocolate sobre o estresse oxidativo em ratos Wistar com diabetes induzido por estreptozotocina. O tratamento foi baseado no consumo humano de 250g e 500g de líquido por dia considerando uma pessoa de 70 kg. Desse modo os dados foram extrapolados para a definição das doses desse trabalho, que corresponderam a 3,6 e 7,2 g/kg peso corpóreo.

Pela análise da Figura 8 observa-se que todos os grupos tiveram aumento de peso com o decorrer do tratamento.

Figura 8. Curva de peso dos grupos experimentais (n=12/grupo) durante 40 dias de tratamento.

Ao fim dos 40 dias de tratamento os animais pertencentes aos grupos tratados apresentaram maior incremento de peso em relação ao grupo controle. O ganho de peso dos animais de todos os grupos tratados foi estatisticamente superior ao controle.

Esta constatação se deve ao fato de que os animais dos grupos tratados receberam diariamente, por gavagem, o líquido de cupuaçu e cacau, compostos por aproximadamente 50% de lipídeos, aumentando consideravelmente o consumo energético durante o experimento. Diariamente cada rato dos grupos Cac1 e Cup1 ingeriram por gavagem cerca de 6 kcal a mais que o grupo controle. Para os grupos Cac2 e Cup2 esse valor foi de 12 kcal. Assim sendo esperava-se que os animais tratados com essas amostras tivessem consumo menor que o grupo controle. Essa

constatação pode ser feita pela análise da Figura 9B. Em 9A observa-se também que o consumo de água foi diminuído nos grupos tratados.

Figura 9. Consumo diário de água (A) e ração (B) dos grupos experimentais. Os valores são expressos como média $\pm$ desvio-padrão ($n=12$ /grupo). Colunas com letras distintas diferem estatisticamente ($p<0,05$).

Os consumos de ração e água foram calculados levando em consideração a evolução do peso dos animais a fim de estimar a elevação do consumo com o aumento de massa corporal.

Possivelmente a diminuição de consumo de água e ração nos grupos tratados se deve aos compostos fenólicos dos líquidos de cupuaçu e cacau. Tendo em vista que Fernandes *et al.* (2010) relataram que o tratamento de animais diabéticos com rutina promoveu a diminuição de ambos os consumos retornando aos níveis dos animais controle.

Ong *et al.* (2000) detectaram 73 e 17% de aumento, respectivamente nos consumos de água e ração de ratos diabéticos comparados a ratos normais. Estes autores detectaram ainda que, um extrato vegetal rico em polifenóis administrado a ratos diabéticos diminuiu o consumo de água em 44% comparado a um controle também diabético.

A figura 10 apresenta a porcentagem dos órgãos em relação ao peso corpóreo. Os líquidos de cupuaçu e cacau diminuíram o peso dos fígados em relação ao controle. Semelhante resultado foi descrito por Fernandes *et al.* 2010 após o tratamento de ratos diabéticos com rutina. Esse aumento de peso pode ser melhor compreendido após a análise conjunto da diminuição dos triacilglicerídeos plasmáticos (Figura 12A). Sendo possivelmente os compostos fenólicos, responsáveis pela diminuição da hipertrofia hepática (Juskiewicz *et al.* 2008).

Figura 10. Porcentagem do peso corpóreo do fígado (A), cérebro (B) e rins (C) após 40 dias de tratamento. Os valores são expressos como média $\pm$ desvio-padrão ($n=12$ / grupo). Colunas com letras distintas diferem estatisticamente entre si. * indica diferença ($p<0,05$) em relação ao controle. ***indica diferença ($p<0,0001$) em relação ao controle.

Durante o tratamento foram feitas sete aferições da glicemia com intervalo médio de sete dias entre elas e o perfil glicêmico está exposto na Figura 11.

Figura 11. Dosagem glicêmica dos grupos experimentais durante o período de tratamento. Os valores são expressos como média $\pm$ desvio-padrão ($n=12$ /grupo). Não houve diferença estatística ($p<0,05$).

Pela análise dessa figura é possível observar que a estreptozotocina foi eficiente na indução da diabetes em todos os grupos, no entanto os líquidos de cupuaçu e cacau não foram eficientes na diminuição da glicemia.

Diversos trabalhos na literatura mostram o efeito hipoglicêmico de compostos fenólicos em ratos com diabetes induzida por estreptozotocina. Contudo, a ausência desse efeito no presente trabalho pode ser devida aos altos índices de glicemia atingidos com a administração intraperitoneal de estreptozotocina, que de acordo com Oliveira *et al.* (2008) dificulta a obtenção de qualquer resultado significativo dos grupos tratados. Estes mesmos autores não verificaram alterações nos níveis

plasmáticos de glicose em animais diabéticos tratados com extrato de erva-mate. Osakabe *et al.* (2004) não verificaram alteração nos níveis de glicose plasmática de ratos diabéticos quando tratados com proantocianidinas derivadas do cacau. Soma-se a isso o fato da amostra estudada conter também ácidos graxos, carboidratos, proteínas e outros micronutrientes além dos compostos fenólicos.

A diabetes tipo 2 não controlada promove aumento dos níveis de lipídeos plasmáticos contribuindo para o aumento das complicações secundárias dessa patologia (ARVIND *et al.*, 2002; PALUMBO, 1998). A elevação da concentração plasmática de lipídeos na diabetes deve-se ao aumento da lipólise dos depósitos periféricos de gordura, devido à inibição da lipase lipoprotéica (ELIZA *et al.*, 2009). A quantidade dessa enzima é dependente do nível de insulina no sangue, o que reforça o quadro de hipertrigliceridemia em condição de diabetes mellitus (BRAVO *et al.*, 2007).

Para a avaliação da influência do tratamento sobre o perfil de lipídios plasmáticos foram quantificados triacilgliceróis, colesterol total e colesterol HDL e os resultados expressos na Figura 12.

Figura 12. Dosagens em mg/dL de triacilgliceróis (A), colesterol total (B) e HDL colesterol (C) dos grupos controle e tratados. Os valores são expressos como média $\pm$ desvio-padrão (n=12/grupo). Letras diferentes sobre as colunas indicam diferença estatística ($p < 0,05$).

Neste trabalho não foi observada diferença estatística entre os grupos em relação ao colesterol total. Quanto ao HDL-colesterol observou-se aumento significativo estatisticamente dos grupos tratados cup 2 e cac 2 frente ao controle. Houve redução significativa dos triacilgliceróis dos grupos tratados quando comparados ao controle. Este resultado pode ser explicado tanto pela ação dos compostos fenólicos presentes nas amostras quanto pela influência dos ácidos graxos insaturados linoléico e α -linolênico no metabolismo lipídico dos animais. Quanto aos níveis de LDL-colesterol, estes não puderam ser calculados pela

Fórmula de Friedwald (FRIEDWALD, 1972), pois esta apresenta a limitação de ser aplicável apenas em amostras com concentrações de triacilgliceróis menores que 400 mg/dL, fato não apresentado pelos animais do grupo controle deste estudo.

Os portadores de diabetes podem apresentar uma ou várias complicações decorrentes das alterações metabólicas. A nefropatia diabética, designada como uma complicação microvascular, é a causa mais comum de insuficiência renal crônica terminal (IRCT) entre os indivíduos em tratamento dialítico. A nefropatia diabética é mais freqüente nos portadores de diabetes tipo 1 (30 a 40% dos casos) em relação ao tipo 2 (5 a 20% dos casos) (LOPES *et al.*, 2001). A Figura 13 apresenta os resultados obtidos para as concentrações séricas de creatinina e uréia nos grupos estudados, sendo esses, parâmetros bioquímicos usados na avaliação da função renal dos animais.

Figura 13. Dosagens em mg/dL de uréia (A) e creatinina (B) dos grupos controle e tratados. Os valores são expressos como média $\pm$ desvio-padrão (n=12/grupo). Não houve diferença estatística entre os grupos ($p < 0,05$).

Não houve diferença significativa entre os grupos nas dosagens séricas de creatinina e uréia. Para ratos saudáveis Dantas *et al.* (2006) apresentaram dados de creatinina entre $0,50 \pm 0,07$ mg/dL e uréia entre 48 ± 7 mg/dL. Como esperado a indução da diabetes aumenta os valores desses dois parâmetros devido às injúrias renais. A falta de insulina também pode conduzir a uma exacerbação de processos catabólicos no organismo, envolvendo carboidratos, gorduras e proteínas. Nesse sentido, em condição diabética a síntese protéica encontra-se diminuída em todos os tecidos, aumentando a atividade proteolítica muscular com elevada liberação de aminoácidos para o fígado, os quais estão associados a um acréscimo na concentração de compostos nitrogenados como a uréia e a creatinina (WHELTON *et al.*, 1996).

Os resultados obtidos mostraram, portanto, que os líquidos de cacau e cupuaçu apresentam efeito positivo sobre o ganho de peso, consumo de água e perfil lipídico de ratos diabéticos. No entanto, estes não parecem exercer nenhuma ação sobre a proteólise excessiva resultante da alteração do metabolismo de carboidratos na diabetes induzida por estreptozotocina (Chen e Lanuzzo, 1982). O incremento no ganho de peso e a melhora no controle glicêmico sugerem um possível efeito hipoglicemiante dos líquidos de cacau e cupuaçu.

4.5.2.3 Avaliação da capacidade antioxidante, peroxidação lipídica e enzimas antioxidantes

Os modelos animais de diabetes e resistência a insulina são caracterizados por altos níveis de ROS, sendo esse aumento devido a produção descontrolada de moléculas oxidantes pelas mitocôndrias (HOUSTIS *et al.* 2006; ANDERSON *et al.* 2009). A elevação da glicemia pode ocasionar alterações morfológicas nessas organelas incluindo a fragmentação destas (YU *et al.* 2006).

O modelo de diabetes induzido por estreptozotocina é conhecido por causar estresse oxidativo severo nos animais, levando a um aumento de peróxidos lipídicos e hidroperóxidos em órgãos como fígado e rins (RAJASEKARAM *et al.*, 2005). Dessa forma, avaliou-se o efeito da suplementação com os líquidos de cacau e cupuaçu na capacidade antioxidante de fígado, cérebro, rins, eritrócitos e plasma assim como a concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) nesses órgãos.

A Figura 14 mostra que o tratamento com os líquidos de cupuaçu e cacau resultou, de modo geral, em uma melhora significativa do estresse oxidativo. Observou-se aumento da capacidade antioxidante em fígado e rins, tanto para o tratamento com cacau como com cupulate[®]. A peroxidação lipídica em fígado foi diminuída pelo tratamento com a maior dose de cupuaçu, em cérebro houve diminuição para ambas as doses de cacau, e nos rins todos os tratamentos diminuíram a formação de TBARS.

Figura 14. Capacidade antioxidante e peroxidação lipídica em fígados (A), cérebros (B) e rins (C) de ratos com diabetes induzida por estreptozotocina. Os valores são expressos como média $\pm$ desvio-padrão (n=12/grupo). Letras distintas sobre as colunas indicam diferença estatística. * indica diferença estatística ($p < 0,05$) em relação ao controle. **indica diferença estatística ($p < 0,01$) em relação ao controle. ***indica diferença estatística ($p < 0,0001$) em relação ao controle.

A capacidade antioxidante plasmática dos ratos tratados com líquidos de cupuaçu e cacau, expressa na Figura 15, foi avaliada por duas metodologias, ORAC e FRAP. Houve aumento estatisticamente significativo deste parâmetro em todos os grupos tratados na metodologia de ORAC. Pela metodologia de FRAP somente o grupo Cup1 não teve aumento significativo comparado ao controle. Todos os grupos tratados foram estatisticamente menores que o grupo controle na formação de TBARS sugerindo uma proteção contra os radicais livres formados devido à indução da diabetes.

Figura 15. Atividade antioxidante e peroxidação lipídica plasmática de ratos *Wistar* com diabetes induzida por estreptozotocina. ORAC (A), FRAP (B) e TBARS (C). Os valores são expressos como média $\pm$ desvio-padrão ($n=12$ /grupo). Letras distintas sobre as colunas indicam diferença estatística. * indica diferença estatística ($p<0,05$) em relação ao controle. **indica diferença estatística ($p<0,01$) em relação ao controle.

A formação de peróxidos lipídicos pela ação de radicais livres sobre ácidos graxos insaturados tem sido implicada na patogênese da aterosclerose e doenças vasculares. Desta forma, a maior incidência de problemas vasculares associada à diabetes parece ser decorrente da maior atividade dos radicais livres gerados pela hiperglicemia. Os mecanismos de defesa antioxidantes estão alterados no diabetes, e a ineficiência no sequestro de radicais livres tem um papel crucial na injúria tecidual. Os resultados aqui obtidos indicam que a administração oral dos líquidos de cacau e cupuaçu, devido a seus altos teores de antioxidantes fenólicos, e à absorção destes compostos e/ou de seus metabólitos, aumentaria a quantidade de antioxidantes circulantes. Isso resulta no aumento da capacidade antioxidante plasmática e consequente diminuição da peroxidação lipídica, pela reconhecida ação dos compostos fenólicos como sequestrantes de radicais livres, levando à interrupção das reações em cadeia.

A hiperglicemia decorrente do diabetes mellitus pode levar à inativação das enzimas antioxidantes SOD, CAT e GPx, pela glicação destas proteínas, e produzir estresse oxidativo, que por sua vez causa a peroxidação lipídica (BAGRI *et al.*, 2009). Rajasekaran *et al.*, (2005) observaram diminuição significativa de SOD, CAT e GPx em fígado e rins de animais com diabetes induzido pela estreptozotocina, em relação aos animais saudáveis. O tratamento com extrato da fruta *Diospyros peregrina* elevou a atividade das enzimas CAT, SOD e GPx a valores próximos dos valores normais (DEWANJEE *et al.*, 2009).

Neste trabalho foram avaliadas as atividades de SOD, CAT e GPx não só em fígado e rins, como também em plasma, eritrócitos e cérebro. Os resultados são apresentados na Figura 16.

Figura 16. Atividade das enzimas antioxidantes CAT, SOD e GPx em fígados (A), cérebros (B), rins (C), eritrócitos (D) e plasma (E) de ratos com diabetes induzida por estreptozotocina. Os valores são expressos como média $\pm$ desvio-padrão ($n=12$ /grupo). Letras distintas sobre as colunas indicam diferença estatística. * indica diferença estatística ($p<0,05$) em relação ao controle. **indica diferença estatística ($p<0,01$) em relação ao controle. ***indica diferença estatística ($p<0,0001$) em relação ao controle.

Baseando-se nos trabalhos de Venkateswaran e Pari (2002) e Latha e Pari (2002), esperava-se um aumento nas atividades das enzimas antioxidantes após o tratamento com amostras ricas em polifenóis. De fato, houve aumento estatisticamente significativo da atividade de catalase em fígado e cérebro no grupo Cup 1 e nos rins em todos os grupos tratados. Foi detectado aumento da atividade de SOD em cérebro em ambas as doses de cupuaçu e em plasma nos grupos tratados com cupuaçu e com a menor dose de cacau. A atividade enzimática de GPx mostrou-se aumentada em fígado no grupo Cac 1, nos rins no grupo Cup1, em eritrócitos nos grupos tratados com cupuaçu e no grupo Cac1, e em plasma nos grupos Cac 2 e Cup 1

Sekeroglu *et al.* (2000) relataram decréscimo nas enzimas SOD e GPx em eritrócitos de pacientes diabéticos e aumento da peroxidação lipídica plasmática. Essa diminuição se deve em parte à glicação do sítio ativo dessas enzimas. Arai *et al.* (1987) detectou cerca de 50 % de glicação da SOD em pacientes diabéticos e isso acarretou na diminuição da atividade dessa enzima.

Juskiewicz *et al.* (2008) não encontraram alterações significativas nas atividades de SOD e GPx de ratos diabéticos tratados com extrato de chá verde. Ugochukwu *et al.* (2004) e Armstrong *et al.* (1996) propuseram que esses resultados contraditórios, referentes ao aumento ou diminuição da atividade enzimática, são dependentes da severidade, duração e tratamento da diabetes.

4.5.3. Modelo experimental com ratos tratados com ração hiperlipídica (Experimento *in vivo* 2)

Observou-se, em um experimento piloto, que animais do grupo HL (ração AIN-93M adicionada de banha de porco) comiam menor quantidade que o grupo controle (ração controle AIN-93M). No entanto a quantidade de ração ingerida em quilocalorias de ambos os grupos era semelhante.

Contudo se a ingestão de ração, em gramas, do grupo HL foi menor que o grupo controle, menor também foi a quantidade de micronutrientes (vitaminas e minerais) ingeridos. Desse modo ajustaram-se as quantidades desses micronutrientes no preparo da ração HL.

Ratos *Wistar* tratados com ração hiperlipídica foram avaliados quanto ao efeito da administração diária dos extratos fenólicos dos líquidos de cupuaçu e

cacau, precursores respectivamente do cupulate® e chocolate sobre os perfis lipídico e hepático, tolerância oral à glicose, resistência à insulina e estresse oxidativo. O tratamento foi baseado no consumo humano de 150 e 500g de líquido de cupuaçu ou cacau por dia, considerando uma pessoa de 70 kg. Desse modo os dados foram extrapolados para a definição das doses administradas aos ratos neste protocolo experimental.

A partir de 100 g de líquido de cupuaçu obtêm-se 192 mg de compostos fenólicos totais e 709 mg de proantocianidinas no extrato purificado. No líquido de cacau havia, em 100 g, 413 mg de fenólicos totais e 1103 mg de proantocianidinas no extrato purificado. Assim sendo, um rato com 500 g recebeu diariamente na maior dose cerca de 7 mg de fenólicos e 25 mg de proantocianidinas do cupuaçu. Quanto ao líquido de cacau, ratos com esse mesmo peso receberam diariamente 15 mg de fenólicos e 40 mg de proantocianidinas do cacau.

O protocolo experimental durou 16 semanas sendo dividido em dois períodos denominados *baseline* e tratamento. O primeiro constou de 12 semanas, seguidos, de mais 4 semanas de tratamento com as doses de líquido de cupuaçu e cacau acima citadas.

4.5.3.1. Períodos do protocolo experimental

4.5.3.1.1. *Baseline* (até a 12ª semana)

Após 12 semanas de experimento, correspondentes ao período denominado *baseline*, avaliou-se a evolução de peso dos grupos sendo que não houve diferença estatística neste parâmetro (Figura 17).

Figura 17. Curva de peso (A) de ratos *Wistar* alimentados *ad libitum* com ração controle ou com ração hiperlipídica (HL) até a 12ª semana do protocolo experimental. Os valores são expressos como média $\pm$ desvio-padrão. (grupo controle n=14, grupo HL n=42).

Quanto ao consumo registrado nas 12 semanas do período baseline observa-se pela Figura 18 que houve diferença estatística entre os dois grupos. Yang *et al.* (2006) também encontraram resultados semelhantes em relação a esse parâmetro.

Figura 18. Consumo médio semanal (A) e total de ração em gramas (B) de ratos *Wistar* alimentados *ad libitum* com ração controle ou com ração hiperlipídica (HL) até a 12ª semana do protocolo experimental. Os valores são expressos como média $\pm$ desvio-padrão. (grupo controle n=14, grupo HL n=42). *p<0,05 e ***p<0,0001 em relação ao grupo controle.

Comparando o consumo energético, em kcal, (Figura 19), não houve diferença estatística entre os dois grupos.

Figura 19. Consumo médio (A) e total de ração em calorias (B) de ratos *Wistar* alimentados *ad libitum* com ração controle ou com ração hiperlipídica (HL) até a 12ª semana do protocolo experimental. Os valores são expressos como média $\pm$ desvio-padrão. (grupo controle n=14, grupo HL n=42).

Após o término do período pré-estabelecido para a avaliação do *baseline*, foi realizada a eutanásia dos animais. O fígado, cérebro e os tecidos adiposos

periepídidimal e retroperitoneal foram retirados, pesados e calculados como porcentagem relativa ao peso corpóreo (Figura 20).

Figura 20. Porcentagem do peso corpóreo dos fígados (A), cérebros (B), coxins adiposos periepídidimal (C), coxins adiposos retroperitoneal (D) e soma dos coxins adiposos periepídidimal e retroperitoneal (E) de ratos *Wistar* alimentados *ad libitum* com ração controle ou com ração hiperlipídica (HL) até a 12ª semana do protocolo experimental. Os valores são expressos como média ± desvio-padrão. (grupo controle n=14, grupo HL n=42). *p<0,05 em relação ao grupo controle.

Não houve diferença estatística entre os grupos para esses parâmetros. Assim como detectado por Vial *et al.*, (2011) esperava-se o peso dos fígados dos animais do grupo HL fosse maior que no grupo controle devido ao acúmulo de ácidos graxos no fígado. No entanto isso não foi observado somente pelo peso. O acúmulo de gordura visceral é uma das mais importantes causas da síndrome metabólica. O excesso de tecido adiposo promove a diminuição da sensibilidade

tecidual à insulina. A ingestão de ração hiperlipídica durante 12 semanas promoveu aumento da adiposidade visceral (Figura 20E).

O aumento da adiposidade geralmente é acompanhado de disfunção endotelial, inflamação, dislipidemia e resistência à insulina (Hotamisligil, 2006). A fim de verificar o estabelecimento deste último fato, foram realizados testes de tolerância oral à glicose e o teste de sensibilidade à insulina.

O grupo HL apresentou maiores glicemias em todos os tempos no oGTT, como mostra a Figura 21. Entretanto essa diferença não foi evidenciada na avaliação da área sob a curva (AUC).

Figura 21. Curva glicêmica (A) e área sob a curva (B) do teste de tolerância oral à glicose de ratos *Wistar* alimentados *ad libitum* com ração controle ou com ração hiperlipídica (HL) até a 12ª semana do protocolo experimental. Os valores são expressos como média $\pm$ desvio-padrão. (grupo controle $n=14$, grupo HL $n=42$). * $p<0,05$ em relação ao grupo controle.

No ipITT encontrou-se aumento significativo da glicemia do grupo HL em 10 minutos. Entretanto essa diferença não foi mantida nos outros tempos analisados (Figura 22A). Na Figura 22B foi comparada a taxa de decaimento de glicose entre os grupos, não havendo diferença estatística entre os grupos.

Figura 22. Curva glicêmica (A) e constante de decaimento da glicemia (B) do teste de tolerância intraperitoneal à insulina (ipITT) de ratos *Wistar* alimentados *ad libitum* com ração controle ou com ração hiperlipídica (HL) até a 12ª semana do protocolo experimental. Os valores são expressos como média $\pm$ desvio-padrão. (grupo controle n=14, grupo HL n=42). *p<0,05 em relação ao grupo controle.

Os animais do grupo HL possuíam, ao término da 12ª semana, maior glicemia de jejum (Figura 23).

Figura 23. Glicemia de jejum de ratos *Wistar* alimentados *ad libitum* com ração controle ou com ração hiperlipídica (HL) até a 12ª semana do protocolo experimental. Os valores são expressos com média $\pm$ desvio padrão. (grupo controle n=14, grupo HL n=42). *p<0,05 em relação ao grupo controle.

Não foi encontrada diferença estatística nos parâmetros referentes ao perfil lipídico, exceto para o colesterol não-HDL, em maior concentração no grupo HL (Figura 24).

Figura 24: Perfil lipídico de ratos *Wistar* alimentados *ad libitum* com ração controle ou com ração hiperlipídica (HL) até a 12ª semana do protocolo experimental. Concentrações séricas (mg/dL) de triacilgliceróis (A), colesterol total (B), HDL colesterol (C) e colesterol não HDL (D). Os valores são expressos com média $\pm$ desvio padrão. (grupo controle n=14, grupo HL n=42). *p<0,05 em relação ao grupo controle.

A utilização de ratos no protocolo experimental adotado nesse trabalho limitou uma avaliação fidedigna das alterações metabólicas lipídicas que poderiam ocorrer em humanos com ingestão de alimentação hiperlipídica. Apesar da existência de recentes trabalhos com tratamento de ratos *Wistar* com dieta hiperlipídica, este não é o animal que melhor se adequa à avaliação do perfil lipídico porque conforme Tsutsumi, Hagi and Inoue (2001), em ratos, a atividade de CETP, uma proteína que transfere ésteres de colesterol das partículas de HDL para VLDL e LDL colesterol, é muito baixa ou ausente.

O aumento das enzimas aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT) e gama-glutamilttransferase (GGT) associa-se ao dano hepático em casos de hepatites, cirrose, alcoolismo e em esteatose não-alcoólica, podendo ser, esta última patologia, causada por obesidade, diabetes e hiperglicemia. A alimentação rica em gordura promove o aumento da deposição de gordura no fígado com o estabelecimento de esteatose (WANG *et al.*, 2009). Assim

sendo, a função hepática foi avaliada pelo estudo das atividades dessas enzimas (Figura 25) sendo que a ALT do grupo HL teve aumento significativo frente ao controle.

Figura 25. Função hepática de ratos *Wistar* alimentados *ad libitum* com ração controle ou com ração hiperlipídica (HL) até a 12ª semana do protocolo experimental. Atividade enzimática (U/L) de AST (A), ALT (B) e GamaGT (C). Os valores são expressos com média ± desvio padrão. (grupo controle n=14, grupo HL n=42). *p<0,05 em relação ao grupo controle.

A elevação da atividade dessas enzimas após consumo de dieta hiperlipídica foi detectada por Melo *et al.* (2010) e Park *et al.* (2011). Sass, Chang e Chopra (2005) relataram que o aumento, leve a moderado, da atividade de AST e ALT estava relacionado com esteatose hepática. Demori *et al.* (2006) mostraram que a administração de dieta hiperlipídica a ratos não alterou o perfil lipídico e elevou a atividade de AST e ALT.

4.5.3.1.1.1. Atividade antioxidante plasmática e tecidual

A síndrome metabólica e a adiposidade visceral estão diretamente correlacionadas com o estresse oxidativo (ROBERTS; SINDHU, 2009).

Fardet *et al.*, (2008) observaram, em um modelo animal, que a alimentação rica em gordura aumentou o estresse oxidativo hepático resultando na produção excessiva de espécies reativas de oxigênio e tornando deficiente a capacidade antioxidante desses animais.

A fim de verificar o estado antioxidante dos animais alimentados com ração hiperlipídica por 12 semanas, mediu-se a capacidade antioxidante e peroxidação lipídica em órgãos e plasma (Figuras 26 e 27)

Comparando os dois grupos pode-se observar diminuição da atividade antioxidante medida pelo método de FRAP e aumento da peroxidação lipídica no grupo HL em fígado (Figura 26A) e em cérebro (Figura 26B).

Figura 26. Atividade antioxidante e peroxidação lipídica em fígados (A) e cérebros (B) de ratos *Wistar* alimentados *ad libitum* com ração controle ou com ração hiperlipídica (HL) até a 12ª semana do protocolo experimental. Os valores são expressos como média $\pm$ desvio padrão. (grupo controle n=14, grupo HL n=42). *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 em relação ao grupo controle.

A análise da Figura 27 possibilita constatar diminuição da atividade antioxidante e aumento da peroxidação lipídica plasmática no grupo HL.

Figura 27. Atividade antioxidante e peroxidação lipídica plasmática de ratos *Wistar* alimentados *ad libitum* com ração controle ou com ração hiperlipídica (HL) até a 12ª semana do protocolo experimental. Os valores são expressos como média $\pm$ desvio padrão. (grupo controle n=14, grupo HL n=42). **p<0,01 em relação ao grupo controle.

A proteção antioxidante enzimática promovida pela SOD, GPx e CAT é usada amplamente na avaliação do estresse oxidativo em modelos animais de hipertensão, diabetes, hiperlipidemia e obesidade (SAIKI *et al.*, 2007). A SOD reduz os radicais superóxido a peróxido de hidrogênio e este é transformado em água e oxigênio pela ação das enzimas GPx e catalase.

O consumo de dieta rica em gordura aumenta o estresse oxidativo e diminui a atividade das enzimas antioxidantes hepáticas e plasmáticas (SLIM *et al.*, 1996).

A atividade dessas três enzimas foi avaliada em órgãos e plasma e expressa na Figura 28. A análise desses dados evidenciam diminuição da atividade das enzimas em fígado, eritrócitos e plasma e tendência de diminuição de GPx ($p=0,06$) em cérebro.

Figura 28. Atividade das enzimas antioxidantes CAT, SOD e GPx em fígados (A), cérebros (B), eritrócitos (C) e plasma (D) de ratos *Wistar* alimentados *ad libitum* com ração controle ou com ração hiperlipídica (HL) até a 12ª semana do protocolo experimental. Os valores são expressos como média $\pm$ desvio padrão. (grupo controle $n=14$, grupo HL $n=42$). * $p<0,05$, ** $p<0,01$ em relação ao grupo controle.

Assim como visto neste trabalho, diversos estudos relatam a diminuição das atividades de SOD, CAT e GPx após o tratamento com dieta hiperlipídica (XIA *et al.*, 2010; CHEN *et al.*, 2010; BANSAL *et al.*, 2011; YANG *et al.*, 2006; FEILLET-COUDRAY *et al.*, 2009).

4.5.3.1.2. Período tratamento (13^a a 16^a semana)

Assim como observado até a 12^a semana de tratamento, não houve diferença significativa no peso dos animais comparando os grupos decorridas 16 semanas do protocolo experimental (Figura 29)

Figura 29. Curva de peso de ratos *Wistar* entre a 13^a e a 16^a semana do protocolo experimental. Os valores são expressos como média $\pm$ desvio-padrão (n=7/ grupo).

Baur *et al.* (2006) também concluíram que o resveratrol não modificou a evolução de peso de camundongos tratados com dieta hipercalórica. Entretanto, estes autores relataram melhoras na saúde dos animais devido principalmente ao aumento da sensibilidade à insulina.

A Figura 30 mostra que o consumo em gramas de ração entre os grupos tratados e o grupo HL não diferiu estatisticamente.

Figura 30. Consumo médio (A) e total de ração em gramas (B) de ratos *Wistar* entre a 13^a e a 16^a semana do protocolo experimental. Os valores são expressos como média $\pm$ desvio-padrão (n=7/ grupo). Barras com letras distintas diferem estatisticamente (p<0,01).

Na Figura 31 vê-se que o consumo calórico de todos os grupos foi igual.

Figura 31. Consumo médio (A) e total de ração em calorias (B) de ratos *Wistar* entre a 13^a e a 16^a semana do protocolo experimental. Os valores são expressos como média $\pm$ desvio-padrão (n=7/ grupo).

Conforme expresso na Figura 32, o tratamento com o extrato fenólico dos líquidos de cacau e cupuaçu não alterou o peso dos órgãos e tecidos analisados quando comparados aos grupos controle e HL. Essa mesma constatação foi feita por Terra *et al.* (2010) em ratas tratadas com procianidinas de semente de uva em um protocolo experimental semelhante ao realizado nesse trabalho.

Figura 32. Porcentagem do peso corpóreo dos fígados (A), cérebros (B), coxins adiposos periepididimal (C), coxins adiposos retroperitoneal (D) e soma dos coxins adiposos periepididimal e retroperitoneal (E) de ratos *Wistar* eutanasiados na 16ª semana do protocolo experimental. Os valores são expressos como média $\pm$ desvio-padrão (n=7/ grupo). Não houve diferença estatística.

Após 16 semanas do início do protocolo experimental e quatro semanas de tratamento, com os compostos fenólicos dos líquidos de cacau e cupuaçu em duas doses, foram analisados parâmetros relativos à sensibilidade à insulina desses animais. Na Figura 33A avaliou-se a curva glicêmica dos grupos. Foi encontrado valor de glicemia estatisticamente menor do grupo controle em zero (glicemia de jejum) e 30 minutos comparado aos HL. Os grupos tratados não diferiram dos grupos controle e HL. Entretanto, na Figura 33B observa-se que os dois grupos tratados com extrato fenólico do líquido de cupuaçu apresentaram menor área sob a curva quando comparados ao grupo HL. Isso evidencia um possível benefício desses extratos no metabolismo de carboidratos alterado pela alimentação com ração hiperlipídica.

Figura 33. Curva glicêmica (A) e área sob a curva (B) do teste de tolerância oral à glicose (oGTT) de ratos *Wistar* na 16ª semana do protocolo experimental. Os valores são expressos como média $\pm$ desvio-padrão ($n=7$ / grupo). Letras distintas sobre as colunas indicam diferença estatística ($p>0,05$). **indica diferença estatística ($p<0,01$) em relação ao grupo HL.

No ipTT (Figura 34) destaca-se o fato do grupo cup 3 ter uma taxa de decaimento de glicose estatisticamente mais alta que o grupo HL e igual ao controle.

Figura 34. Curva glicêmica (A) e constante de decaimento da glicemia (B) do teste de tolerância intraperitoneal à insulina (ipTT) de ratos *Wistar* na 16ª semana do protocolo experimental. Os valores são expressos como média $\pm$ desvio-padrão ($n = 7$ / grupo). Letras distintas sobre as colunas indicam diferença estatística ($p>0,05$). **indica diferença estatística ($p<0,01$) em relação ao grupo HL.

Tomaru *et al.* (2007) administraram proantocianidinas do líquido de cacau a camundongos obesos e relataram diminuição da glicemia de jejum destes.

O aumento da taxa de decaimento de glicose em animais alimentados com dieta hiperlipídica foi observado por Arçari *et al.* (2011) com a administração diária de extrato de erva-mate. Estes autores atribuíram o aumento da sensibilidade à insulina ao ácido clorogênico, um ácido fenólico contido neste extrato.

A catequina, um flavanol presente tanto no líquido de cacau quanto no líquido de cupuaçu, promoveu aumento da secreção de insulina pelas células beta e restaurou a sensibilidade à insulina em camundongos obesos em um protocolo experimental semelhante ao realizado neste trabalho (HUANG *et al.*, 2011).

De acordo com Strobel *et al.* (2005), os flavonóides quercetina, miricetina e catequina-galato inibem o transporte de glicose para o tecido adiposo. Essa ação não se deveu a inibição da ação de IRS1, mas sim pela interação direta dos flavonóides com GLUT4. Ainda com relação aos transportadores de glicose, Manzano e Williamson (2010) mostraram que os flavonóides da maçã e framboesa inibiram a captação de glicose por meio da ação destes sobre GLUT2 em células intestinais Caco-2.

Conforme explicitado na Figura 35, não houve diminuição dos níveis de nenhum parâmetro referente ao perfil lipídico dos grupos tratados com cacau e cupuaçu comparando-os com os grupos controle e HL. Entretanto nem mesmo houve diferença entre os grupos controle e HL.

Figura 35: Perfil lipídico na 16ª semana de protocolo experimental. Concentrações séricas (mg/dL) de triacilgliceróis (A), colesterol total (B), HDL colesterol (C) e colesterol não HDL (D). Os valores são expressos com média $\pm$ desvio padrão ($n=7$ grupo). Não houve diferença estatística.

A observação da Figura 36 permite avaliar a atividade das enzimas marcadoras da função hepática, sendo que as enzimas AST e ALT nos grupos tratados se apresentaram com atividade menor que o grupo HL e semelhantes ao grupo controle.

Essa constatação, associada aos resultados dessas mesmas enzimas estarem com atividade aumentada com 12 semanas de tratamento com dieta hiperlipídica, sugere benefícios dos compostos fenólicos do cacau e do cupuaçu na restauração da função hepática.

Figura 36: Função hepática de ratos *Wistar* alimentados *ad libitum* com ração controle ou com ração hiperlipídica (HL) na 16ª semana do protocolo experimental. Atividade enzimática (U/L) de AST (A), ALT (B) e GamaGT (C). Os valores são expressos com média $\pm$ desvio padrão (n=7/ grupo). Letras diferentes sobre as colunas diferem estatisticamente ($p < 0,05$). *indica diferença estatística ($p < 0,05$) em relação ao grupo HL. **indica diferença estatística ($p < 0,01$) em relação ao grupo HL. ***indica diferença estatística ($p < 0,0001$) em relação ao grupo HL.

Em uma dieta hiperlipídica o fígado recebe grande quantidade de ácidos graxos livres vindos do tecido adiposo. Estes ácidos graxos agem diretamente nos hepatócitos causando inflamação local ou induzindo a produção de citocinas pró-inflamatórias que posteriormente aumentarão as injúrias hepáticas (FIELDING; FRAYN, 2000).

Ratos com injúria hepática, após o tratamento com suco das frutas camu-camu, mirtilo, framboesa, acerola e outras, apresentaram tendência de decréscimo de AST e ALT. Somente o suco de camu-camu, um fruto amazônico rico em vitamina C e compostos fenólicos apresentou diminuição significativa dessas enzimas (AKACHI *et al.*, 2010).

4.5.3.1.2.1. Atividade antioxidante plasmática e tecidual

A Figura 37 apresenta a capacidade antioxidante e peroxidação lipídica tecidual após 4 semanas de tratamento. Os fígados de todos os grupos tratados tiveram atividade antioxidante semelhante ao grupo controle e maior que o grupo HL. Em cérebro não foi possível observar tal efeito.

Figura 37: Atividade antioxidante e peroxidação lipídica tecidual em fígados (A) e cérebros (B) de ratos *Wistar* alimentados *ad libitum* com ração controle ou com ração hiperlipídica (HL) na 16ª semana do protocolo experimental. Os valores são expressos com média $\pm$ desvio padrão ($n=7$ / grupo). Letras diferentes sobre as colunas diferem estatisticamente ($p<0,05$). *indica diferença estatística ($p<0,05$) em relação ao grupo HL. **indica diferença estatística ($p<0,01$) em relação ao grupo HL. ***indica diferença estatística ($p<0,0001$) em relação ao grupo HL.

A diminuição de peroxidação lipídica tecidual e plasmática foi vista por Jalil *et al.*, (2008) em ratos obesos e diabéticos tratados com extrato de cacau. Estes mesmos autores detectaram aumento da atividade de SOD plasmática após o tratamento, assim como pode ser observado nos grupos tratados do presente protocolo experimental (Figura 38).

Figura 38: Atividade antioxidante e peroxidação lipídica plasmática de ratos *Wistar* alimentados *ad libitum* com ração controle ou com ração hiperlipídica (HL) na 16ª semana do protocolo experimental. Os valores são expressos com média $\pm$ desvio padrão (n=7/ grupo). Letras diferentes sobre as colunas diferem estatisticamente (p<0,05). *indica diferença estatística (p<0,05) em relação ao grupo HL. **indica diferença estatística (p<0,01) em relação ao grupo HL. ***indica diferença estatística (p<0,0001) em relação ao grupo HL.

A atividade das enzimas antioxidantes CAT, SOD e GPx em órgãos, eritrócitos e plasma pode ser observada na Figura 39.

Figura 39. Atividade das enzimas antioxidantes CAT, SOD e GPx em fígado (A), cérebro (B), eritrócitos (C) e plasma (D) de ratos *Wistar* alimentados *ad libitum* com ração controle ou com ração hiperlipídica (HL) até a 16ª semana do protocolo experimental. Os valores são expressos como média $\pm$ desvio padrão. Letras diferentes sobre as colunas diferem estatisticamente ($p < 0,05$). *indica diferença estatística ($p < 0,05$) em relação ao grupo HL. **indica diferença estatística ($p < 0,01$) em relação ao grupo HL. ***indica diferença estatística ($p < 0,0001$) em relação ao grupo HL.

A atividade das enzimas catalase em plasma e fígado está aumentada no grupo cup3 em comparação com o grupo HL. Houve aumento também de atividade da SOD e GPx plasmáticas dos grupos Cac3, Cup1 e Cup3 em relação ao HL. Jalil *et al.*, (2008) detectaram aumento da atividade de SOD plasmática após o

tratamento com extrato de cacau, assim como pode ser observado nos grupos tratados do presente protocolo experimental.

Em um estudo com compostos fenólicos da semente de uva, Terra *et al.*, (2009), detectaram diminuição do estresse oxidativo de ratos alimentados com dieta hiperlipídica e sugeriram que as proantocianidinas tenham sido responsáveis por esse efeito.

Da mesma forma os efeitos positivos do extrato fenólico do líquido de cacau podem ser devidos também a esses compostos. As proantocianidinas compõem a maioria dos compostos fenólicos da semente deste fruto e, apresentam efeitos na saúde cardiovascular, efeitos anti-inflamatórios, melhora do metabolismo de carboidratos e atividade antioxidante.

A proteção antioxidante e diminuição da peroxidação lipídica plasmática promovida pelo extrato fenólico do líquido de cupuaçu pode ser atribuída a alta concentração de flavonóides derivados da quercetina como a isorhamnetina glucuronídeo (SILVA, *et al.*, 1998). Pugliese (2010) identificou os flavonóides do líquido de cupuaçu, sendo que a quercetina glucuronídeo, é o flavonóide mais abundante e conforme Moon *et al.* (2001) apresenta atividade antioxidante *in vivo* e diminuiu a oxidação de LDL. Day *et al.* (2000) comprovaram a ação antioxidante da quercetina e derivados, dentre eles a quercetina glucuronídeo pela inibição de xantina oxidase e lipoxigenase.

5. CONCLUSÕES

5.1 Caracterização das amostras

Apesar da proximidade filogenética entre cupuaçu e cacau, os teores e o perfil dos compostos fenólicos diferem grandemente entre os líquidos desses dois frutos. Enquanto o líquido de cacau apresenta a maioria de seus compostos fenólicos sob a forma de proantocianidinas, o líquido de cupuaçu possui como principais compostos fenólicos alguns flavonóides derivados de quercetina. Os extratos fenólicos de ambas as amostras apresentaram alta capacidade antioxidante e inibição significativa das enzimas envolvidas no metabolismo de carboidratos.

5.2 Experimento *in vivo* 1

A ingestão dos líquidos de cupuaçu e cacau por 40 dias não foi eficiente na diminuição da glicemia dos animais. Contudo, houve diminuição nos níveis de triacilgliceróis e aumento de HDL colesterol com relação dose-dependente. O tratamento dos animais com os líquidos de ambas as amostras diminuiu a peroxidação lipídica plasmática, hepática e renal. Além disso, aumentou a capacidade antioxidante nesses mesmos tecidos.

5.3 Experimento *in vivo* 2

Neste trabalho, estudou-se também a influência exclusiva dos compostos fenólicos dos líquidos de cupuaçu e cacau em ratos alimentados com ração hiperlipídica. Pela análise das primeiras 12 semanas (período *baseline*) de experimento observou-se que a ração hiperlipídica tornou deficientes a defesa antioxidante e a atividade de AST dos animais. Além disso, a glicemia de jejum e a soma dos tecidos adiposos estavam aumentadas no grupo HL.

O período de tratamento (13^a a 16^a semanas) reverteu o quadro de peroxidação lipídica e diminuição das defesas antioxidantes, assim como melhorou a sensibilidade à insulina nos ratos tratados com ração hiperlipídica. Os resultados evidenciam que o tratamento com ambas as doses dos extratos fenólicos dos líquidos de cupuaçu e cacau foi eficaz na reversão da deficiência de AST e impedimento do aumento da atividade de ALT provocado pela ração hiperlipídica. Além disso, essa constatação foi mais evidente após o tratamento com as maiores doses de compostos fenólicos dos líquidos de cupuaçu e cacau.

Embora o líquido de cacau possua maior conteúdo de compostos fenólicos e atividade antioxidante *in vitro* comparado ao cupuaçu, este último mostrou-se mais efetivo na redução do dano metabólico causado pela diabetes e dieta hiperlipídica. Essas contradições podem ser explicadas pela diferente composição fenólica entre os dois líquidos. A análise conjunta desses resultados sugere que o líquido de cupuaçu e/ou o cupulate[®], assim como o líquido de cacau e o chocolate, poderia auxiliar no tratamento de distúrbios metabólicos associados com o estresse oxidativo.

REFERÊNCIAS

- AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods Enzymol**, v. 105, p. 121-126, 1984.
- AKACHI, T.; SHIINA, Y.; KAWAGUTI, T.; KAWAGISHI, H.; MORITA, T.; SUGIYAMA, S. 1-Methylmalate from camu-camu (*Myrciaria dubia*) suppressed D-galactosamine-induced liver injury in rats. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, v. 74, n. 3, p. 573-578, 2010.
- ALI, H.; HOUGHTON, P.J.; SOUMYANATH, A. alpha-amylase inhibitory activity of some Malaysian plants used to treat diabetes; with particular reference to *Phyllanthus amarus*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.107, n.3, p.449-455, 2006.
- ANDERSON, E. J.; LUSTIG, M. E.; BOYLE, K. E.; WOODLIEF, T. L.; KANE, D. A.; LIN, C. T.; PRICE III, J. W.; KANG, P. S.; RABINOVITCH, H. H. Mitochondrial H₂O₂ emission and cellular redox state link excess fat intake to insulin resistance in both rodents and humans. **J. Clin. Invest.**, v. 119, p. 573-581, 2009.
- AOAC (ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS). Official methods of analysis of the association analytical chemists. 18.ed. Maryland: AOAC, 2005.
- APOSTOLIDIS, E.; KWON, Y. I.; SHETTY, K. Potential of select yogurts for diabetes and hypertension management, **Journal of Food Biochemistry**, v.30, p.699-717, 2006.
- ARABBI, P. R.; GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M. Flavonoids in Vegetable Foods Commonly Consumed in Brazil and Estimated Ingestion by the Brazilian Population. **J. Agric. Food Chem.**, v. 52, p. 1124-1131, 2004.
- ARAI, K.; LIZUKA, S.; TADA, Y.; OIKAWA, K.; TANAGUCHI, N. Increase in the glucosylated form of erythrocyte superoxide dismutase in diabetes and close association of the non-enzymatic glucosylation with the enzyme activity. **Biochim Biophys Acta**, v. 924, p. 292-296, 1987.
- ARÇARI, D. P.; BARTCHEWSKY JR, W.; SANTOS, T. W.; OLIVEIRA, K. A.; DeOLIVEIRA, C. C.; GOTARDO, E. M.; PEDRAZZOLI JR, J.; GAMBERO, A.; FERRAZ, L. F. C.; CARVALHO, P. O.; RIBEIRO, M. L. Anti-inflammatory effects of yerba mate extract (*Ilex paraguariensis*) ameliorate insulin resistance in mice with high fat diet-induced obesity. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 335, p. 110-115, 2011.
- ARMSTRONG, A. M.; CHESTNUTT, J. E.; GORMEY, M. J.; YOUNG, I. S. The effect of dietary treatment on lipid peroxidation and antioxidant status in newly diagnosed non-insulin dependent diabetes. **Free Radic Biol Med**, v. 21, pp. 719-726, 1996.

ARNAL, E.; MIRANDA, J.; BARCIA, F.; BOSCH-MORREL, F.; ROMERO, F. J. Lutein and docosahexaenoic acid prevent cortex lipid peroxidation in streptozotocin-induced diabetic rat cerebral cortex. **Neuroscience**, v. 166, p. 271-278, 2010.

ARVIND, K.; PRADEEPA, R.; DEEPA, R.; MOHAN, V. Diabetes & coronary artery disease. **Indian J Med Res**, v. 116, p. 163-176, 2002.

BABA, N. O.; NATSUME, M.; YASUDA, A.; TAKIZAWA, T.; NAKAMURA, T.; TERAOKA, J. Cocoa powder enhances the level of antioxidative activity in rat plasma. **British Journal of Nutrition**, v. 84, p. 673-678, 2000.

BABA, S.; NATSUME, M.; YASUDA, A.; NAKAMURA, Y.; TAMURA, T.; OSAKABE, N.; KANEGAE, M.; KONDO, K. Plasma LDL and HDL cholesterol and oxidized LDL concentrations are altered in normo- and hypercholesterolemic humans after intake of different levels of cocoa powder. **J. Nutr.**, v. 137, p. 1436-1441, 2007.

BANSAL, P.; PAUL, P.; MUDGAL, J.; NAYAK, P. G.; PANNAKAL, S. T.; PRIYADARSINI, K. I.; UNNIKRISHNAN, M. K. Antidiabetic, antihyperlipidemic and antioxidant effects of the flavonoid rich fraction of *Pilea microphylla* (L.) in high-fat diet/streptozotocin-induced diabetes in mice. **Exp Toxicol Pathol**, 2011.

BAUR, J. A.; PEARSON, K. J.; PRICE, N. L.; JAMIESON, H. A.; LERIN, C.; KALRA, A.; PRABHU, V. V.; ALLARD, J. S.; LOPEZ-LLUCH, G.; LEWIS, K.; PISTELL, P. J.; POOSALA, S.; BECKER, K. G.; BOSS, O.; GWINN, D.; WANG, M.; RAMASWAMY, S.; FISHBEIN, K. W.; SPENCER, R. G.; LAKATTA, E. G.; LE COUTER, D.; SHAW, R. J.; NAVAS, P.; PUIGSERVER, P.; INGRAM, D. K.; DE CABO, R.; SINCLAIR, D. A. Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. **Nature**, v. 444, n. 16, 2006.

BENZIE, I. F. F.; STRAIN, J. J. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of "Antioxidant Power": The FRAP Assay. **ANALYTICAL BIOCHEMISTRY**, v. 239, p. 70-76, 1996.

BAGRI, P.; ALI, M.; AERI, V.; BHOWMIK, M.; SULTANA, S. Antidiabetic effect of *Punica granatum* flowers: Effect on hyperlipidemia, pancreatic cells lipid peroxidation and antioxidant enzymes in experimental diabetes. **Food and Chemical Toxicology**, v. 47, n. 1, p. 50-54, 2009.

BASTOS, D. H. M.; OLIVEIRA, D. M.; MATSUMOTO, R. L. T.; CARVALHO, P. O.; RIBEIRO, M. L. Yerba mate: Pharmacological properties, research and biotechnology. **Medicinal and Aromatic Plant Science and Biotechnology**, v. 1, p. 37-46, 2007.

BIRD, R. P.; DRAPER, H. H. Comparative studies on different methods of malonaldehyde determination. **Methods in Enzymology**, v. 105, p. 299-305, 1984.

BAYNES, J. W. Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. **Diabetes**, v. 40, p. 405-412, 1991.

- BISCHOFF, H.; PULS, W.; KRAUSE, H.P.; SHUTT, H.; THOMAS, G.. Pharmacological properties of the novel glucosidase inhibitors BAY m 1099 (miglitol) and BAY o 1248. **Diabetes Research Clinical Practice**, v.1, p.53-57, 1985.
- BOLZÁN, D. A.; BIANCHI, M. S. Genotoxicity of streptozotocin. **Mutation Research**, v. 512, p. 121-134, 2002.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. LWT, **Food Science and Technology**, v.28(1), p.25-30, 1995.
- BRAVO, L.; GOYA, L.; LECUMBERRI, E. LC/MS characterization of phenolic constituents of mate (*Ilex paraguariensis*, St. Hill) and its antioxidant activity compared to commonly consumed beverages. **Food Research Internacional**, v. 40, p. 393–405, 2007.
- CALDERON, A.I.; WRIGHT, B.J.; HURST, W.J.; BREEMEN, R.B. Screening antioxidants using LC-MS: case study with cocoa. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.57, p.5693-5699, 2009.
- CALZAVARA, B.B.G.; MÜLLER, C.H.; KAHWAGE, O.N.C. **Fruticultura tropical: o cupuaçuzeiro**. Cultivo, beneficiamento e utilização do fruto. EMBRAPA – CPATU. Documentos, 32. 101p., 1984.
- CAO, G; ALESSIO, H. M; CUTLER, R. Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 14, n. 3, p. 303-311, 1993.
- CHANG, S.K.C. Protein Analysis. In: NIELSEN, S.S. Food Analysis, 2. ed. Gaithersburg. Aspen Publishers, 1998. p. 237-269.
- CHEN, H; LIU, L; ZHU, J; BO, X; RUI, L. Effect of soybean oligosaccharides on blood lipid, glucose levels and antioxidant enzymes activity in high fat rats. **Food Chemistry**, v. 119, p. 1633-1636, 2010.
- CHEN, V; LANUZZO, C. D. **Arch. Biochem. Biophys.** v. 217, p. 131-138, 1982.
- COELHO, J. V. **Fenólicos totais e taninos durante o desenvolvimento e o armazenamento do feijão (*Phaseolus vulgaris* L.)**. 118f. Tese (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1987.
- COHEN, K.O.; JACKIX, M.N.H. Estudo do líquido de cupuaçu. **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, v.25(1), p.182-190, 2005. COMCIÊNCIA. **Notícias. Cupuaçu. 2004**. Disponível em. Acesso em 19 mar. 2008.
- COLL, T; JOVE, M; RODRIGUEZ-CALVO, R; EYRE, E; PALOMER, X; SANCHEZ, R. M; MERLOS, M; LAGUNA, J. C; VAZQUEZ-CARRERA, M. Palmitate -mediated downregulation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1alpha in skeletal muscle cells involves MEK1/2 and nuclear factor-kappaB activation. **Diabetes**, v. 55, p. 2779-2787, 2006.

COOPER, K. A; DONOVAN, J. L; WATERHOUSE, A. L; WILLIAMSON, G. Cocoa and health: a decade of research. **British Journal of Nutrition**, v. 99, p. 1-11, 2008.

DAGLIA, M.; PAPETTI, A.; GREGOTTI, C.; BERTE, F.; GAZZANI, G. In vitro antioxidant and ex vivo protective activities of green and roasted coffee. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 1449-1454, 2000.

DANTAS, J. A; AMBIEL, C. R; CUMAN, R. K. N; BARONI, S; BERSANI-AMADO, C. A. Valores de referência de alguns parâmetros fisiológicos de ratos do Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá, Estado do Paraná. **Acta Sci Health Sci**, v. 28, n. 2, p. 165-170, 2006.

DÁVALOS, A.; GÓMEZ-CORDOVÉS, C.; BARTOLOMÉ, B. Extending Applicability of the Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC-Fluorescein) Assay. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.52, p.48-54, 2004.

DAY, A. J; BAO, Y; MORGAN, M. R. A; WILLIAMSON, G. Conjugation position of quercetin glucuronides and effect on biological activity. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 29, n. 12, p. 1234-1243, 2000.

DEMORI, I; VOCI, A; FUGASSA, E; BURLANDO, B. Combined effects of high-fat diet and ethanol induce oxidative stress in rat liver. **Alcohol**, v. 40, p. 185-191, 2006.

DEWANJEE, S; DAS, A. K; SAHU, R; GANGOPADHYAY, M. Antidiabetic activity of Diospyros peregrina fruit: Effect on hyperglycemia, hyperlipidemia and augmented oxidative stress in experimental type 2 diabetes. **Food and Chemical Toxicology**, v. 47, p. 2679-2685, 2009.

DUARTE-ALMEIDA, J.M.; NOVOA, A.V.; LINARES, A.F.; LAJOLO, F.M.; GENOVESE, M.I. Antioxidant activity of phenolics compounds from sugar cane (*Saccharum officinarum* L.) juice. **Plant foods for human nutrition**, v.61, n.4, p.187-192, 2006.

DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v.28, n.3, p. 350-356, 1956.

DURAK, I; YURTARSLANI, Z; CANBOLAT, O; AKYOL, O. A methodological approach to superoxide dismutase (SOD) activity assay based on inhibition of nitroblue tetrazolium (NBT) reduction. **Clin Chim Acta**, v. 214, n. 1, p. 103-104, 1993.

DUTHIE, S.J.; GARDNER, P.T.; MORRICE, P. C.; WOOD, S. G.; PIRIE, L.; BESTWICK, C.C.; MILNE, L.; DUTHIE, G.G. DNA stability and lipid peroxidation in vitamin E-deficient rats in vivo and colon cells in vitro: modulation by the dietary anthocyanin, cyaniding-3-glycoside. **European Journal of Nutrition**, v. 44, p. 195-203, 2005.

DUVAL, C; CAMARA, Y; HONDARES, E; SIBILLE, B; VILLARROYA, F. Overexpression of mitochondrial uncoupling protein-3 does not decrease production of the reactive oxygen species, elevated by palmitate in skeletal muscle cells. **FEBS Lett**, v. 581, p. 955-961, 2007.

ELIZA, J.; DAISY, P.; IGNACIMUTHU, S.; DURAIPANDIYAN, V. Antidiabetic and antilipidemic effect of eremanthin from *Costus speciosus* (Koen.) Sm., in STZ-induced diabetic rats. **Chemico-Biological Interactions**, v. 182, p. 67-72, 2009.

FARDET, A; LLORACH, R; MARTIN, J; BESSON, C; LYAN, B; PUJJOS-GUILLOT, E; SCALBERT, A. A Liquid Chromatography–Quadrupole Time-of-Flight (LC–QTOF)-based Metabolomic Approach Reveals New Metabolic Effects of Catechin in Rats Fed High-Fat Diets. **J. Proteome Res.**, v. 7, n. 6, p. 2388-2398, 2008.

FEILLET-COUDRAY, C.; ROCK, E.; COUDRAY, C.; GRZELKOWSKA, K.; AZAIS-BRAESCO, V.; DARDEVET, D.; MAZUR, A. Lipid peroxidation and antioxidant status in experimental diabetes. **Clin. Chim. Acta**, v. 284, p. 31-43, 1999.

FERNANDES, A. A. H.; NOVELLI, E. L. B.; OKOSHI, K.; OKOSHI, M. P.; DI MUZIO, B. P.; GUIMARÃES, FERNANDES JUNIOR, A. Influence of rutin treatment on biochemical alterations in experimental diabetes. **Biomedicine & pharmacotherapy**, v. 64, p. 214-219, 2010.

FIELDING, B. A; FRAYN, K. N. Lipid metabolism. **Current Opinion Lipidology**, v. 11, n. 6, p. 657-659, 2000.

FILIP, R.; LOPEZ, P.; GILBERTI, G.; COUSSIO, J.; FERRARO, G. Phenolic compounds in seven South American *Ilex* species. **Fitoterapia**, v. 72, p. 774–778, 2001.

FRIEDWALD, W. T.; LEVY, R. I.; FRIEDRICKSON, D. S. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. **Clin Chem.**, v. 18, p. 499-502, 1972.

GENOVESE, M. I.; LANNES, S. C. S.; Comparison of total phenolic content and antiradical capacity of powders and “chocolates” from cocoa and cupuassu. **Ciênc. Tecnol. Aliment.** v. 29, n. 4, p. 810-814, Campinas, out-dez, 2009.

GENOVESE, M.I.; SANTOS, R.J.; HASSIMOTTO, N.M.A.; LAJOLO, F.M. Determinação do conteúdo de compostos fenólicos totais em frutas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.39, n.3, p.67-69, 2003.

GERMAN, J.B.; DILLARD, C.J. Phytochemicals and targets of chronic disease. In: **Phytochemicals – a new paradigm**. BIDLACK, W.R.; OMAJE, S.T.; MESKIN, M.S.; JAHNER, D. Pennsylvania: Technomic Publishing Company Inc, 1998. **Chemistry**, v. 53, p. 1370-1373, 2005.

GIADA, M. L. R. **Avaliacao da capacidade antioxidante dos componentes fenolicos do cotiledone da semente do girassol (*Helianthus annuus*, L.) rajada.** Sao Paulo. 2005, 200p. Tese de Doutorado. Faculdade de Ciencias Farmaceuticas – Universidade de Sao Paulo.

GONÇALVES, A.E.; LAJOLO, F.; GENOVESE, M. I. Chemical Composition and Antioxidant/Antidiabetic Potential of Brazilian Native Fruits and Commercial Frozen Pulps. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2010.

GUPTA, R. K; KESARI, A. N; DIWAKAR, S; TYAGI, A; TANDON, V; CHANDRA, R; WATAL, G. In vivo evaluation of anti-oxidant and anti-lipidimic potential of *Annona squamosa* aqueous extract in type 2 diabetic models. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 118, p. 21-25, 2008.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Oxygen toxicity: oxygen radical, transition metal and disease. **Biochem J.**, v. 219, p. 1-14, 1984.

HAMMERSTONE, J.F.; LAZARUS, S.A.; MITCHELL, A.E.; RUCKER, R.; SCHMITZ, H.H. Identification of Procyanidins in cocoa (*Theobroma cacao*) and chocolate using high-performance liquid chromatography/mass spectrometry, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.47(2), p. 490-496, 1999.

HANHINEVA, K; TORRONEN, R; BONDIA-PONS, I; PEKKINEN, J; KOLEHMAINEN, M; MYKKANEN, H; POUTANEN, K. Impacto f dietary polyphenols on carbohydrate metabolism. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 11, p. 1365-1402, 2010.

HANSEN, C.E.; del OLMO, M.; BURRI, C. Enzyme activities in cocoa beans during fermentation. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 77, 273-281, 1998.

HARBORNE, J.B. Insect feeding preferences. **Introduction to Ecological Biochemistry**, 4^a ed., cap. 5, p. 128-161, 1997.

HATANO, T; MIYATAKE, H; NATSUME, M; OSAKABE, N; TAKIZAWA, T; ITO, H; YOSHIDA, T. Proanthocyanidin glycosides and related polyphenols from cacao liquor and their antioxidant effects. **Phytochemistry**, v. 59, p. 749–758, 2002.

HERTOG, M.G.L.; HOLLAM, P.C.H.; KATAN, M.B. Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of tea infusion, wines and fruits juices. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 41, p. 1242-1246, 1993.

HERTOG, M.G.L.; HOLLAM, P.C.H.; KATAN, M.B. Content of potentially anticarcinogenic of flavonoids of 28 vegetables and 9 fruit commonly consumed in the Netherlands. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.40, p. 2379-2383, 1992.

HOLLMAN, P.C.H.; KATAN, M.B. Absorption, metabolism and health effects of dietary flavonoids in man. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v.51, p.305-310, 1997.

HOLLMAN, P.C.H.; KATAN, M.B. Dietary flavonoids: Intake, health effects and bioavailability. **Food Chemistry and Toxicology**, Oxford, v.37, p. 937-942, 1999.

HOTAMISLIGIL, G. S. Inflammation and metabolic disorders. **Nature**, v. 444, p. 860-867, 2006.

HOUSTIS, N.; ROSEN, E. D.; LANDER, E. S. Reactive oxygen species have a causal role in multiple forms of insulin resistance. **Nature**, v. 440, p. 944-948, 2006.
HUANG, C. F.; CHEN, Y. W.; YANG, C. Y.; LIN, H. Y.; WAY, T. D.; CHIANG, W.; LIU, S. H. Extract of lotus leaf (*Nelumbo nucifera*) and its active constituent catechin with insulin secretagogue activity. **J Agric. Food Chem**, v. 59, p. 1087-1094, 2011.

HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R.L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **J Agric. Food Chem**, v. 53, p. 1841-1856, 2005.

HUNTER, J. E.; ZHANG, J.; KRIS-ETHERTON, P. M. Cardiovascular disease risk of dietary stearic acid compared with trans, other saturated, and unsaturated fatty acids: a systematic review. **Am J Clin Nutr**, v. 91, p. 46-63, 2010.

HUONG, D.T.; LUONG D.V.; THAO, T.T.P.; SUNG, T.V. A new flavone and cytotoxic activity of flavonoid constituents isolated from *Miliusa balansae* (Annonaceae). **Pharmazie**, v.60, p. 627-629, 2005.

ISLAM, F.M.A.; RENGIFO, J.; REDDEN, R.J.; BASFORD, K.E.; BEEBE, S.E. Association between seed coat polyphenolics (tannins) and disease resistance in common bean. **Plant foods for human nutrition**, v.58, p. 285-297, 2003.

JALIL, A. M. M; ISMAIL, A; PEI, C. P; HAMID, M; HASBULLAH, S; KAMARUDDIN, S. Effects of Cocoa Extract on Glucometabolism, Oxidative Stress, and Antioxidant Enzymes in Obese-Diabetic (Ob-db) Rats. **J. Agric. Food Chem.**, v. 56, n. 17, p. 7877–7884, 2008.

JONFIA-ESSIEN, W. A; WEST, G; ALDERSON, P. G; TUCKER, G. Phenolic content and antioxidant capacity of hybrid variety cocoa beans. **Food Chemistry** v. 108, p.1155–1159, 2008.

JUSKIEWICZ, J; ZDUNCZYK, Z; JURGONSKI, A; BRZUZAN, L; GODYCKA-KLOS, I; ZARY-SIKORSKA, E. Extract of green tea leaves partially attenuates streptozotocin-induced changes in antioxidant status and gastrointestinal functioning in rats. **Nutrition Research**, v. 28, n. 5, p. 343-349, 2008.

KEALEY, K.S., SNYDER, R.M., ROMANCZYK, L.J., GEYER, H.M., MYERS, M. E., WITHCARE, E.J., HAMMERSTONE, J.F., e SCHMITZ, H.H. **Cocoa components, edible products having enhanced polyphenol content, methods of making same and medical uses**. *Patent Cooperation Treaty (PCT) WO 98/09533*, Mars Incorporated, USA, 1998.

KESSLER, A. Plant-insect interactions in the era of consolidation in biological sciences: *Nicotiana attenuata* as an ecological expression system. **Chemical Ecology. From gene to Ecosystem**, 19-38, 2006.

KIM, J.S.; KWON, C.S.; SON, K.H. Inhibitors of alpha-glucosidase and amylase by luteolin, a flavonoid. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v.64, n.11, p.2458-2461, 2000.

KING, A.; YOUNG, G. Characteristics and occurrence of phenolic phytochemicals. **Journal of American Dietetic Association**, Chicago, v.99, n.2, p. 213-218, 1999.

KIRK, A. E.; SUTHERLAND, P.; WANG, S. A.; CHAT, A.; LEBOEUF, R. C. Dietary isoflavons reduce plasma cholesterol and atherosclerosis in C57 Bl/6 mice but not LDL receptor deficient mice. **Journal of Nutrition**. v. 128, n.4, p. 954-959, 1998.

KHANAL, R. C.; HOWARD, L. R.; PRIOR, R. L. Procyanidin composition of selected fruits and fruit byproducts is affected by extraction method and variety. **J. Agric. Food. Chem.**, v. 57, n. 19, p. 8839-8843, 2009.

KWON, Y.I.; APOSTOLIDIS, E.; SHETTY, K. Inhibitory potential of wine and tea against α -amylase and α -glucosidase for management of hyperglycemia linked to type 2 diabetes. **Journal of Food Biochemistry**, v.32, p.15-31, 2008.

LAMBERTUCCI, R. H; HIRABARA, S. M; SILVEIRA, L. R; LEVADA-PIRES, A. C; CURI, R; PITHON-CURI, T. C. Palmitate increases superoxide production through mitochondrial electron transport chain and NADPH oxidase activity in skeletal muscle cells. **J Cell Physiol**, v. 216, p. 796–804, 2008.

LATHA, M.; PARI, L. Preventive effects of *Cassia auriculata* L. flowers on brain lipid peroxidation in rats treated with streptozotocin. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 243, p. 23-28, 2002.

LATTANZIO, V.; TERZANO, R.; CICCIO, N.; CARDINALI, A.; DI VENERE, D.; LINSALATA, V. Seed coat tannins and bruchid resistance in stored cowpea seeds. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.85, p. 839-846, 2005.

LEE, S. C; PROSKY, L; DEVRIES, J. W. Determination of total, soluble, and insoluble dietary fiber in foods – enzymatic – gravimetric method, MES-TRIS buffer: Collaborative study. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.**, v. 75, p. 395-416.

LIN, C.; HUANG, C.; HUANG, C.; YIN, M. Anticoagulatory, antiinflammatory and antioxidative effects of protocatechuic acid in diabetic mice. **J. Agric. Food Chem.** v. 57, p. 6661-6667, 2009.

LOPES, A. S.; PEZOA-GARCIA, N. H.; AMAYA-FARFÁN, J. Qualidade nutricional das proteínas de cupuaçu e de cacau. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.28(2), 2008.

LOPES, L. M. V.; PEREIRA, M.; VILAR, L.; MORAIS, M. **Diagnóstico e Tratamento da Nefropatia Diabética**. In: VILAR, L.; CASTELLAR, E.; MOURA, E.; LEAL, E.; MACHADO, A. C.; TEIXEIRA, L.; CAMPOS, R. *Endocrinologia clínica*. 2ed. Rio de Janeiro: Medsi; 2001. p. 625 – 36.

LOVEN, D.; SCHEDL, H.; WILSON, H.; DAABES, T.T.; STENGINK, L.D.; DEIKUS, M.; OBERLEY, L. Effect of insulin and oral glutathione on glutathione levels and superoxide dismutase activities in organs of rats with streptozotocin induced diabetes. **Diabetes**, v. 35, p. 503-507, 1986.

LUCCAS, V. **Fracionamento térmico e obtenção de gorduras de cupuaçu alternativas à manteiga de cacau para uso na fabricação de chocolate**. 195 p. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Faculdade de Engenharia Química, UNICAMP, Campinas, 2001.

MACDONALD, I. A; MADER, J. A; BUSSARD, R. G. The role of rutin and quercetin in stimulating flavonol glycosidase by cultured cell-free microbial preparation of human feces and saliva. **Mutation Research**, v.122, n.34, p.95-102, 1983.

MALAVOLTA, E.; VITTI, G. C.; OLIVEIRA, S. A. **Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações**. Piracicaba; POTAFOS, 2 ed., 1997, 319 p.

MANZANO, S ; WILLIAMSON, G. Polyphenols and phenolic acids from strawberry and apple decrease glucose uptake and transport by human intestinal Caco-2 cells. **Mol. Nutr. Food Res.**, v. 54, p. 1773-1780, 2010.

MARTÍN, A.; CABRERA, A.; MEDINA, J.L. Antinutritional factors in faba bean. Tannin content in *Vicia faba*: possibilities for plant breeding. **Options Méditerranéennes**, Série Séminaires, n. 10, p. 105-110, 1991.

MATÉS, J. M. Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. **Toxicology**, v. 153, p. 83-104, 2000.

MATSUI, T.; UEDA, T.; OKI, T.; SUGITA, K.; TERAHARA, N.; MATSUMOTO, K.; α -Glucosidase inhibitory action of natural acylated anthocyanins. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.49, p.1952-1956, 2001.

MCCARTER, J.D.; WITHERS, S.J. Mechanisms of enzymatic glycoside hydrolysis. **Current Opinion in Structural Biology**, v.4 (6), p.885-892, 1994.

MELO, C. L; QUEIROZ, M. G. R; FONSECA, S. G. C; BIZERRA, A. M. C; LEMOS, T. L. G; MELO, T. S; SANTOS, F. A; RAO, V. S. Oleanolic acid, a natural triterpenoid improves blood glucose tolerance in normal mice and ameliorates visceral obesity in mice fed a high-fat diet. **Chemico-Biological Interactions**, v. 185, p. 59-65, 2010.

MININ, V. P. R.; CECCHI, H. M. Avaliação da composição em ácidos graxos de barra de chocolate ao leite. **Ciê. Tecnol. Alim.** v. 18, n. 1, p. 111-113, 1998.

MOON, J; TSUSHIDA, T; NAKAHARA, K; TERAOKA, J. Identification of quercetin 3-O- β -D-glucuronide as an antioxidative metabolite in rat plasma after oral administration of quercetin. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 30, n. 11, p. 1274-1285, 2001.

MORORÓ, R.C. Aproveitamento dos derivados, subprodutos e resíduos do cacau. **Ciência, Tecnologia e Manejo do Cacaueiro**. Itabuna – Bahia. Editora Vital, p. 371-421, 2007.

MULLARKEY, C. J; EDELSTEIN, D; BROWNLEE, M. Free radical generation by early glycation products: a mechanism for accelerated atherogenesis in diabetes. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 173, p. 932-938, 1990.

NATELLA, F.; NARDINI, M.; GIANETTI, I.; DATILLO, C.; SCACCINI, C. Coffee drinking influences plasma antioxidant capacity in humans. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 6211-6216, 2002.

OHKAWA, H; OHISHI, N; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Anal Biochem**, v. 95, p. 351-358, 1979.

OLIVEIRA, D. M.; FREITAS, H. S.; SOUZA, M. F. F.; ARÇARI, D. P.; RIBEIRO, M. L.; CARVALHO, P. O.; BASTOS, D. H. M. Yerba Mate (*Ilex paraguariensis*) Aqueous Extract Decreases Intestinal SGLT1 Gene Expression but Does Not Affect Other Biochemical Parameters in Alloxan-Diabetic Wistar Rats. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 10527–10532, 2008.

ONG, K. C; KHOO, H. Effects of myricetin on glycemia and glycogen metabolism in diabetic rats. **Life Sciences**. v. 67, p. 1695-1705, 2000.

ORTEGA, N.; ROMERO, M.P.; MACIÀ, A.; REGUANT, J.; ANGLÈS, N.; MORELLÓ, J.R.; MOTILVA, M.J. Obtention and characterization of phenolic extracts from different cocoa sources. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.56, p.9621-9627, 2008.

OSAKABE, N.; YAMAGISHI, M.; NATSUME, M.; YASUDA, A.; OSAWA, T. Ingestion of proanthocyanidins derived from cacao inhibits diabetes-induced cataract formation in rats. **Exp Biol Med (Maywood)**, v. 229, n. 1, p. 33-39, 2004.

OU, B.; HAMPSCH-WOODILL, M.; PRIOR, R.L. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.49, p. 4619-4629, 2001.

PAL, S; HO, N; SANTOS, C; DUBOIS, P; MAMO, J; CROFT, K; ALLISTER, E. Red Wine Polyphenolics Increase LDL Receptor Expression and Activity and Suppress the Secretion of ApoB100 from Human HepG2 Cells. **J. Nutr.**, v. 133, n. 3, p. 700-706, 2003.

PALUMBO, P. J. Metformin: Effects on Cardiovascular Risk Factors in Patients with Non–Insulin-Dependent Diabetes Mellitus. **Journal of Diabetes and its Complications**, v. 12, n. 2, p. 110-119, 1998.

PARK, S; CHOI, Y; UM, S; YOON, S. K; PARK, T. Oleuropein attenuates hepatic steatosis induced by high-fat diet in mice. **Journal of Hepatology**, v. 54, p. 984-993, 2011.

PASCAL, G. Functional Foods in the European Union. **Nutrition Revision**, New York, v.54, n.11, p. 29-32, 1996.

PIMENTA, A. S; GAIDHU, M. P; HABIB, S; SO, M; FEDIUC, S; MIRPOURIAN, M; MUSHEEV, M; CURI, R; CEDDIA, R. B. Prolonged exposure to palmitate impairs fatty acid oxidation despite activation of AMP-activated protein kinase in skeletal muscle cells. **J Cell Physiol**, v. 217, p. 478–485, 2008.

PINTO, M. S.; CARVALHO, J. E.; LAJOLO, F. M.; GENOVESE, M. I.; SHETTY, K. Evaluation of antiproliferative, anti-type 2 diabetes, and antihypertension potentials of ellagitannins from strawberries (*Fragaria x ananassa* Duch.) using *in vitro* models. **Journal of Medicine Food**. V. 13, n. 5, p. 1-9, 2010.

PORTER, L.J.; HRSTICH, L.N.; CHAN, B.G. The conversion of procyanidins and prodelphinidins to cyanidin and delphinidin, **Phytochemistry**, v.25. p. 223-230, 1986.

PORTO, P. A. L. S. **Estudo da atividade antioxidante de catequinas e procianidinas oligoméricas**. 151p. Dissertação (Mestrado em Química) – Departamento de Química, Faculdade de Ciências do Porto, Porto, Portugal, 2002.

PRIOR, R.L.; WU, X.; SCHAICH, K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.53, p. 4290-4302, 2005.

PRIOR, R. L; FAN, E; JI, H; HOWELL, A; NIO, C; PAYNE, M. J; REED, J. Multi-laboratory of a standard method for proanthocyanidins in cranberry powders. **J Sci Food Agric.**, v. 90, p. 1473-1478, 2010.

PUGLIESE, A. G. **Compostos fenólicos do cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*) e do cupulate®: Composição e possíveis benefícios**. 137p. Tese (Mestrado em Ciência dos Alimentos – Bromatologia) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, USP, São Paulo, 2010.

QUEIROZ, M. B.; GARCIA, N. H. P. Avaliação sensorial de amêndoas de cupuaçu e cacau torradas utilizando análise descritiva quantitativa. **B. Ceppa**, v.18, n. 2, p.249-266, 2000.

RAJASEKARAN, S; SIVAGNANAM, K; SUBRAMANIAN, S. Antioxidant effect of Aloe vera gel extract in streptozotocin-induced diabetes in rats. **Pharmacological Reports**, v. 57, p. 90-96, 2005.

RAO, U. S. M.; SUBRAMANIAN, S. Biochemical evaluation of antihyperglycemic and antioxidative effects of *Morinda citrifolia* fruit extract studied in streptozotocin-induced diabetic rats. **Med Chem Res**, v. 18, p. 433-446, 2009.

REEVES, P. G; NIELSEN, F. H; FAHEY, G. C. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final rodent of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. **J. Nutr.**, v. 123, p. 1939-1951, 1993.

RENAUD, S. C; GUEGUEN, R; SIEST, G; SALAMON, R. Wine, Beer, and Mortality in Middle-aged Men From Eastern France. **Arch Intern Med.**, v. 159, n. 16, p. 1865-1870, 1999.

RICE-EVANS, C.; MILLER, N.J.; PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free radical Biology & Medicine**, v.20, p. 933-956, 1996.

ROBERTS, C. K; SINDHU, K, K. Oxidative stress and metabolic syndrome. **Life Sciences**, v. 84, p. 705-712, 2009.

SAIKI, R; OKAZAKI, M; IWAI, S; KUMAI, T; KOBAYASHI, S; OGUCHI, K. Effects of Pioglitazone on Increases in Visceral Fat Accumulation and Oxidative Stress in Spontaneously Hypertensive Hyperlipidemic Rats Fed a High-Fat Diet and Sucrose Solution. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 105, n. 2, p. 157-167, 2007.

SANCHEZ-RABANEDA, F.; JAUREGUI, O.; CASALS, I.; ANDRÉS-LACUEVA, C.; IZQUIERDO-PULIDO, M.; LAMUELA-RAVENTOS, R.M. Liquid chromatographic/electrospray ionization tandem mass spectrometric study of the phenolic composition of cocoa (*Theobroma cacao*). **Journal of Mass Spectrometry**, v.38, p. 35–42, 2003.

SARNI-MACHADO, P.; CHEYNIER, V.; MOUTOUNET, M. Interaction of grape seed tannins with salivary proteins, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.47, 42-47, 1999.

SASS, D. A; CHANG, P; CHOPRA, K. P. Nonalcoholic fatty liver disease: a clinical review. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 50, n. 1, p. 171-180, 2005.

SCHEWE, S. C.; KLOTZ, L. O.; YOSHIMOTO, H.; SIES, K. H. Polyphenols of cocoa: Inhibition of mammalian 15-Lipoxygenase. **Biol. Chem.**, v. 382, p. 1687-1696, 2001.

SCHROETER, H.; HEISS, C.; BALZER, P.; KLEINBONGARD, P.; KEEN, C. L.; HOLLENBERG, N. K.; SIES, H.; KWIK-URIBE, C.; SCHMITZ, H. H.; KELM, M. (-) – Epicatechin mediates beneficial effects of flavanol-rich cocoa on vascular function in humans. **PNAS**. v. 103, n. 4, p. 1024-1029, 2006.

SEIFRIED, H.E.; ANDERSON, D.E.; FISHER, E.I.; MILNER, J.A. A review of the interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen species. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 18, p. 567-579, 2007.

SEKEROGLU, M. R.; SAHIN, H.; DULGER, H.; ALGUN, E. The effect of dietary treatment on erythrocyte lipid peroxidation, superoxide dismutase, glutathione peroxidase, and serum lipid peroxidation in patients with type 2 diabetes mellitus. **Clinical Biochemistry**, v. 33, n. 8, p. 669-674, 2000.

SHANMUGAN, K. R; MALLIKARJUNA, K; NISHANTH, K; KUO, C. H; REDDY, K. S. Protective effect of dietary ginger on antioxidant enzymes and oxidative damage in experimental diabetic rat tissues. **Food Chemistry**, v. 124, p. 1436-1442, 2011.

SILVA, E. L; PISKULA, M. K; YAMAMOTO, N; MOON, J; TERAQ, J. Quercetin metabolites inhibit copper ion-induced lipid peroxidation in rat plasma. **FEBS Letters**, v. 430, p. 405-408, 1998.

SINGLETON, V.L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTOS, R.M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. **Methods in Enzymology**, v.299, p.152-178, 1999.

SLIM, R. M; TOBOREK, M; WATKINS, B. A; BOISSONEAULT, G. A; HENNIG, B. Susceptibility to hepatic oxidative stress in rabbits fed different animal and plant fats. **J Am Coll Nutr**, v. 15, p. 289-294, 1996.

SOBOTKOVÁ, A; MÁSOVÁ, C. L; SUTTAR, J; STIKAROVÁ, J; MÁJEK, P; REICHELTOVÁ, Z; KOTLÍN, R; WEISEL, J. W; MALÝ, M; DYR, J. E. Antioxidants change platelet responses to various stimulating events. **Free Radic Biol Med**. v. 47, n. 12, p. 1707-1714, 2009.

SONG, Y.; MANSON, J.E.; BURING, J.E.; SESSO, H.D.; LIU, S. Associations of Dietary Flavonoids with Risk of Type 2 Diabetes, and Markers of Insulin Resistance and Systemic Inflammations in Women: A prospective Study and Cross-Sectional Analysis. **Journal of the American College of Nutrition**, v.24, n. 5, p.376-384, 2005.

SPENCER, J. P. E.; CHAUDRY, A. S.; PANNALA, S. K.; SRAI, E.; DEBNAM, C.; RICE-EVANS, C. Decomposition of cocoa procyanidins in the gastric milieu. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** v. 272, p. 236-241, 2000.

STEINBERG, F.M.; BEARDEN, M.M.; KEEN, C.L. Cocoa and chocolate flavonoids: implication for cardiovascular health. **Journal of the American Dietetic Association**, v.103, n. 2, p.215-223, 2003.

STEINBERG, F. M.; HOLT, R. R.; SCHMITZ, H. H.; KEEN, C. L. Cocoa procyanidin chain length does not determine ability to protect LDL from oxidation when monomer units are controlled. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 13, p. 645-652, 2002.

STROBEL, P; ALLARD, C; PEREZ-ACLE, T; CALDERON, R; ALDUNATE, R; LEIGHTON, F. Myricetin, quercetin and catechin-gallate inhibit glucose uptake in isolated rat adipocytes. **Biochem J.**, v. 386, p. 471-478, 2005.

STUART, A. R.; GULVE, E. A.; WANG, M. Chemistry and biochemistry of type 2 diabetes. **Chemistry Reviews**, v. 104, p. 1255–1282, 2004.

TERRA, X; MONTAGUT, G; BUSTOS, M; LLOPIZ, N; ARDEVOL, A; BLADÉ, C; FERNÁNDEZ-LARREA, J; PUJADAS, G; SALVADÓ, J; AROLA, L; BLAY, M. Grape-seed procyanidins prevent low-grade inflammation by modulating cytokine expression in rats fed a high-fat diet. **Nutritional Biochemistry**, v. 20, p. 210-218, 2009.

TOMARU, M; TAKANO, H; OSAKABE, N; YASUDA, A; INOUE, K; YANAGISAWA, R; OHWATARI, T; UEMATSU, H. Dietary supplementation with cacao liquor proanthocyanidins prevents elevation of blood glucose levels in diabetic obese mice. **Nutrition**, v. 23, p. 351-355, 2007.

UGOCHUKWU, N. H; BAGAYOKO, N. D; ANTWI, M. E. The effects of dietary caloric restriction on antioxidant status and lipid peroxidation in mild and severe streptozotocin-induced diabetic rats. **Clin Chim Acta**, v. 348, p. 121–129, 2004.

VENKATESWARAN, S.; PARI, L. Antioxidant effect of *Phaseolus vulgaris* in streptozotocin-induced diabetes rats. **Asia Pacific J Clin Nutr**, v. 11, n. 3, p. 206-209, 2002.

VIAL, G; DUBOUCAUD, H; COUTURIER, K; COTTET-ROUSSELLE, C; TALEUX, N; ATHIAS, A; GALINIER, A; CASTEILLA, L; LEVEREVE, X. M. Effects of a high-fat diet on energy metabolism and ROS production in rat liver. **Journal of Hepatology**, v. 54, p. 348-356, 2011.

VILLACHICA, H. **Copoasu: *Theobroma grandiflorum*** (Willd. ex. Spreng.) Schum. FAO. **Tratado de cooperacion amazônica: Frutales x hortalizas promisorios de La Amazonia**. Lima, 1996-367. P.104-112.

XIA, W; SUN, C; ZHAO, Y; WU, L. Hypolipidemic and antioxidant activities of Sanchi (*Radix Notoginseng*) in rats fed with a high fat diet. **Phytomedicine**, v. 18, p. 516-520, 2011.

WADA, T; KENMOCHI, H; MYIASHITA, Y; SASAKI, M; OJIMA, M; SASAHAKA, M; KOYA, D; TSUNEKI, H; SASAOKA, T. Spironolactone Improves Glucose and Lipid Metabolism by Ameliorating Hepatic Steatosis and Inflammation and Suppressing Enhanced Gluconeogenesis Induced by High-Fat and High-Fructose Diet. **Endocrine Reviews**, v. 31, n. 2, p. 254-263, 2010.

WANG, J. F.; SCHRAMM, D. D.; HOLT, R. R.; ENSUNSA, J. L.; FRAGA, C. G.; SCHMITZ, H. H.; KEEN, C. L. A dose response effect from chocolate consumption on plasma epicatechin and oxidative damage. **The Journal of Nutrition**, v. 130, p. 2115S-2119S, 2000.

WANG, J; LI, J; ZOU, Y; CHENG, W; LU, C; ZHANG, L; GE, J; HUANG, C; JIN, Y; LV, X; HU, C; LIU, L. Preventive effects of total flavonoids of *Litsea coreana* on hepatic steatosis in rats fed with high fat diet. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 121, p. 54-60, 2009.

WATANABE, J; KAWABATA, J; KURIHARA, H; NIKI, R. Isolation and identification of alpha-glucosidase inhibitors from tochu-cha (*Eucommia ulmoides*). **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v. 61, n. 1, p. 177-178, 1997.

WENDEL, A. Glutathione peroxidase. **Meth Enzymol**, v. 77, p. 325-333, 1981.

WHELTON, A.; WATSON, A. J.; ROCK, R. C. **Metabólitos Nitrogenados e Função Renal**. : In: Burtis CA, Ashwood ER. Fundamentos de química clínica. 4ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1996. p. 553-74.

WHO – World Health Organization, 2002. **The world health report 2002 – Reducing risks, promoting healthy life**. Disponível em: <http://www.who.int/whr/2002/en/>. Acesso em: 25 de julho de 2008.

WINK, M. Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. **Phytochemistry**, v.64, p.3-19, 2003.

WOLLGAST, J; ANKLAM, E. Review on polyphenols in *Theobroma cacao*: changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and quantification. **Food Research International**, v. 33, p. 423-447, 2000.

WOODS, S. C; SEELEY, R. J; RUSHING, P. A; D’ALESSIO, D; TSO, P. A controlled high-fat diet induces an obese syndrome in rats. **J. Nutr.**, v. 133, p. 1081-1087, 2003.

YANG, H.; PROTIVA, P.; CUI, B.; MA, C.; BAGGETT, S.; HEQUET, V.; MORI, S.; WEINSTEIN, I.B.; KENNELLY, E.J. New Bioactive Polyphenols from *Theobroma grandiflorum* (“Cupuaçu”). **Journal of Natural Products**, v. 66, p. 1501-1504, 2003.

YANG, R. L; LE, G; LI, A; ZHENG, J; SHI, Y. Effect of antioxidant capacity on blood lipid metabolism lipase activity of rats fed a high-fat diet. **Nutrition**, v. 22, p. 1185-1191, 2006.

YOCHUM, L; KUSHI, L. H; MEYER, K; FOLSOM, A. R. Dietary Flavonoid Intake and Risk of Cardiovascular Disease in Postmenopausal Women. **Am. J. Epidemiol.**, v. 149, n. 10, p. 943-949, 1999.

YU, T.; ROBOTHAN, J. L.; YOON, Y. Increased production of reactive oxygen species in hyperglycemic conditions requires dynamic change of mitochondrial morphology. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 103, p. 2653-2658, 2006.

YUYAMA, L. K. O.; AGUIAR, J. P. L.; MACEDO, S. H. M.; GIOIA, T.; YUAMA, K.; FÁVARO D. I. T.; AFONSO, C.; VASCONCELLOS, M. B. A.; COZZOLINO, M. F. Determinação dos teores de elementos minerais em alimentos convencionais e não convencionais da região amazônica pela técnica de análise por ativação com nêutrons instrumental. **Acta Amazonica**, v. 27, n. 3, p. 183-196, 1997.

ANEXOS

Anexo 1. Cromatogramas do líquido de cupuaçu. Os algarismos romanos sobrepostos aos cromatogramas expressam a identificação dos flavonóides. I: catequina; II: dímero; III: epicatequina; IV: quercetina glicuronídeo; V: luteolina glicuronídeo; VI: Isorahmnetina glicuronídeo; VII: luteolina glicuronídeo; VIII: teograndina II; IX: teograndina I; X: cafeína.

Figura 21. Cromatogramas em 270 nm do extrato bruto do líquido de cupuaçu.

Figura 22. Fração metanol da purificação do líquido de cupuaçu em poliamida.

Figura 23. Fração metanol/amônia da purificação do líquido de cupuaçu em poliamida.

Figura 24. Fração metanol da purificação do líquido de cupuaçu em C18.

Anexo 2. Cromatogramas do líquido de cacau. Os algarismos romanos sobrepostos aos cromatogramas expressam a identificação dos flavonóides. I: catequina; II: epicatequina; III: quercetina aglicona; V: ácido protocatecúico; VI: cafeína.

Figura 25. Cromatogramas em 270 nm do extrato bruto do líquido de cacau.

Figura 26. Fração metanol da purificação do líquido de cacau em poliamida.

Figura 27. Fração metanol:amônia da purificação do líquido de cacau em poliamida.

Figura 28. Fração metanol da purificação do líquido de cacau em C18.