UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

ANY ELISA DE SOUZA SCHMIDT GONÇALVES

**COMPOSTOS BIOATIVOS DO CAMU-CAMU (*Myrciaria dubia*
McVaugh): CARACTERIZAÇÃO E ATIVIDADE BIOLÓGICA**

São Paulo

2012

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

**Compostos bioativos do camu-camu (*Myrciaria dubia* McVaugh):
caracterização e atividade biológica**

Any Elisa de Souza Schmidt Gonçalves

Tese apresentada à Faculdade de
Ciências Farmacêuticas da Universidade
de São Paulo para obtenção do título de
DOUTOR

Orientador: Prof. Dr. MARIA INÉS GENOVESE

São Paulo

2012

Any Elisa de Souza Schmidt Gonçalves

**Compostos bioativos do camu-camu (*Myrciaria dubia* McVaugh):
caracterização e atividade biológica**

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Profa. Dra. Maria Inés Genovese
orientador/presidente

1º. examinador

2º. examinador

3º. examinador

4º. examinador

São Paulo, _____ de _____.

DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho aos meus pais, César e Maria,
e aos meus irmãos Talita e Gustavo, por estarem
sempre ao meu lado, em todos os momentos.*

*Ao meu companheiro querido André Ricardo e
ao meu pequeno, Caio, minha motivação e minha vida.*

Meu amor por vocês é eterno!

Os verdadeiros são poucos, mas são suficientes para mim!

AGRADECIMENTOS

A Jeová Deus, em primeiro lugar, sempre, por me proporcionar uma ótima vida, me dar forças em todos os momentos e viver ao lado de pessoas que amo e que me amam também.

Ao meu filho Caio, por ter me feito ver quais são as verdadeiras prioridades da minha vida. Agradeço pelo seu sorriso, por ter mudado minha vida, pela felicidade que me proporciona, pelo carinho e pela compreensão nos momentos em que a dedicação aos estudos foi exclusiva.

Aos meus pais, César e Maria, que são meus maiores exemplos de amor, profissionalismo, abnegação, carinho, dedicação e respeito ao próximo. Agradeço pelas horas em que ficaram ao meu lado não me deixando desistir e me mostrando que sou capaz de chegar onde desejo, sem dúvida, vocês foram quem me deram o maior incentivo para conseguir concluir esse trabalho. Aos meus irmãos, Talita e Gustavo, por estarem presentes (mesmo distante), no coração, pois nada eu seria sem amizade, força, apoio, motivação, carinho de vocês, mas principalmente amor, que sempre nos uniu.

Ao meu companheiro, André Ricardo de Lima Damásio, pelo apoio, confiança, amizade, amor e por estar ao meu lado nos momentos que precisei, juntamente com sua família.

A professora Maria Inés Genovese pela oportunidade de adquirir conhecimento, por acreditar no meu trabalho, pela paciência e dedicação durante esses quatro anos.

Aos professores Andre Marette, Yves Desjardins pelo período de bolsa sanduiche no INAF (Institut des Nutraceutiques et des Aliments Fonctionnels) Quebec, Canadá. Foi a melhor experiência profissional que obtive. Um país extremamente organizado, uma língua diferente e pessoas sempre dispostas a ajudar e fazer dar certo. Tive a oportunidade de trabalhar com pessoas de bom coração, além de ótimos pesquisadores, que sempre me respeitaram, acreditaram no meu trabalho e servirão como exemplo.

A professora Marília Seelaender, por ter colaborado neste trabalho, e disponibilizado seu laboratório quando precisamos assim como sua aluna Renata Silvério por ter sido prestativa.

Ao professor Rui Curi por ter me permitido “invadir” seu laboratório e realizar novos experimentos. Durante esse período, tive oportunidade de conhecer dois excelentes pesquisadores, Camilo Lellis e William Festuccia, que me ensinaram, dividiram o conhecimento e me ajudaram na conclusão deste trabalho.

Aos professores do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental que em algum momento auxiliaram e contribuíram para minha formação.

Aos meus amigos especiais que enriqueceram minha experiência e foram meus companheiros de laboratório, dividindo alegrias, tristezas, conversas e almoços durante esses anos: Marcela Roquim, Thiago Belchior, Gabriela Vieira, Diully Mata, Maria Cecília Azevedo, Rafaela Rossi, Santiago Suarez, Ismael Rockenbach e Helena Barros por terem me apoiado e me ajudado neste trabalho.

A Lucia Justinos, Márcia Moraes, Tania Shiga, pelo auxílio na execução deste projeto. Aos secretários do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental e de Pós Graduação Edilson, Mônica, Cléo, Jorge e Elaine.

Ao CNPq pela bolsa no período de doutorado e ao programa ELAP pela bolsa-sanduiche no Canadá.

A todos, muito obrigado!!!!

“Tell me and I'll forget; show me and I may remember; involve me and I'll understand.”

"Change your opinions, keep to your principles;
Change your leaves, keep intact your roots."

Victor Hugo

RESUMO

GONÇALVES, A.E.S.S. **Compostos bioativos do camu-camu (*Myrciaria dubia* McVaugh): caracterização e atividade biológica.** Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

O camu-camu é considerado uma excelente fonte de vitamina C, e com capacidade antioxidante *in vitro* cerca de 120 vezes maior em relação às outras frutas, além do alto teor de ácido elágico. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi caracterizar fruta e polpa comercial de camu-camu em relação ao conteúdo de fenólicos totais, flavonóides, ácido elágico livre e total, proantocianidinas e capacidade antioxidante *in vitro*, e verificar o efeito da ingestão de extrato bruto e frações purificadas da polpa comercial de camu-camu sobre o perfil bioquímico de ratos diabéticos e caquéticos, capacidade antioxidante do plasma, e a atividade das enzimas catalase, superóxido dismutase e glutathione peroxidase em plasma e eritrócitos. Também foi avaliado o efeito de extrato bruto e frações purificadas da polpa comercial em diferentes linhagens celulares. A polpa comercial de camu-camu apresentou maior teor de compostos bioativos que o fruto e por isso foi escolhida para continuar os estudos *in vivo*. Os teores de flavonóides variaram de 10 a 47 mg/ 100 g para quercetina, 4,8 a 5,0 mg/100 g para miricetina e 23 a 37 mg/100 g para rutina; os teores de ácido elágico livre variaram de 25 a 50 mg/100 g e 620 a 740 mg/100 g para ácido elágico total. Também foram identificados elagitaninos e oligômeros de proantocianidinas. Os extratos bruto e frações purificadas também foram testados em culturas celulares de miócitos (L6), macrófagos (J774), hepatócitos (FaO), beta pancreáticas (INS) e adipócitos (3T3). Os animais diabéticos e caquéticos tratados tanto com o extrato bruto quanto com a fração purificada de compostos fenólicos da polpa comercial de camu-camu apresentaram alterações do perfil lipídico plasmático, com reversão do alto colesterol total e triacilgliceróis, e ainda aumento nos níveis de HDL-colesterol. Outros efeitos como a redução da peroxidação lipídica e aumento da capacidade antioxidante plasmática também foram observados. Em linhagens celulares, os extratos bruto e purificado foram eficientes em estimular a captação de glicose em L6, reduzir a produção de óxido nítrico em macrófagos e L6 e ainda diminuir a expressão de citocinas pro-inflamatórias em 3T3. Juntos, estes resultados demonstraram que o camu-camu pode ser considerado uma excelente fonte de compostos bioativos e o seu consumo pode ser associado à prevenção de alterações metabólicas causadas pelo diabetes e caquexia, como a dislipidemia.

Palavras-chave: camu-camu, compostos fenólicos, estresse oxidativo, capacidade antioxidante, caquexia, diabetes.

ABSTRACT

GONÇALVES, A.E.S.S. **Bioactive compounds of camu-camu (*Myrciaria dubia* McVaugh): chemical characterization and biological activity.** PhD Thesis – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Camu-camu fruit is considered as an excellent source of vitamin C and presented antioxidant capacity *in vitro* 120 times higher when compared to others fruits, in addition the high content of ellagic acid. Thus, the aim of this work was to characterize camu-camu commercial frozen pulp and fruit in relation to total phenolics, flavonoids, free and total ellagic acid content, proanthocyanidins and *in vitro* antioxidant capacity; besides to investigate the effect of the administration of crude and purified fractions of camu-camu commercial frozen pulp on biochemical profile of diabetic and cachectic rats, plasma antioxidant capacity and antioxidant enzymes activity of catalase, superoxide dismutase and glutathione peroxidase in plasma and erythrocytes. The effects of crude and purified fractions of camu-camu commercial frozen pulp were also evaluated. Commercial frozen pulp of camu-camu showed a higher content of bioactive compound when compared to the fruit and so was chosen for further studies *in vivo*. Flavonoids content varied from 10 to 47 mg/ 100 g of quercetin, 4.8 to 5.0 mg/100 g of myricetin and 23 to 37 mg/100 g of rutin; free ellagic acid content varied from 25 to 50 mg/100 g and 620 to 740 mg/100 total ellagic acid. Ellagitannins and proanthocyanidins oligomers have also been identified. The effects of camu-camu crude and purified fractions was also tested in culture cells of myocytes (L6), macrophages (J774), hepatocytes (FaO), pancreatic-beta cell (INS) and adipocytes (3T3). Animals treated with crude and purified fractions of phenolic compounds of camu-camu commercial frozen pulp showed changes in plasma lipid profile, reversing high level of total cholesterol and triacylglycerol and increase of HDL-cholesterol in diabetic and cachectic rats. Reduction on lipid peroxidation and increase on plasma antioxidant capacity was also observed. In cell line culture, crude and purified extracts of camu-camu were effective to stimulate glucose uptake in L6 cells, reduce the production of nitric oxide (NO) in macrophages and L6, as well as decrease the expression of pro-inflammatory cytokines in adipocytes. Taken together, these results demonstrated that camu-camu may be considered an excellent source of bioactive compounds and its consumption can be associated with prevention of metabolic disorders caused by diabetes and cachexia, such as dyslipidemia.

Keywords: camu-camu, phenolic compounds, oxidative stress, antioxidant capacity, cachexia, diabetes.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura química dos flavonóides.....	5
Figura 2. Ácido elágico e derivados.....	8
Figura 3. Estrutura das procianidinas do tipo B (A) e tipo A (B).	9
Figura 4. Esquema geral da biodisponibilidade de compostos fenólicos.....	11
Fluxograma 1. Obtenção do extrato bruto a partir da polpa comercial de camu-camu.....	28
Fluxograma 2. Obtenção do extrato purificado a partir da polpa comercial de camu-camu.....	29
Figura 5. Perfil cromatográfico dos flavonóides da polpa comercial de camu-camu, detectados a 270 nm; (A) eluato de flavonóides neutros e (B) eluato de flavonóides ácidos.....	46
Figura 6. Perfil cromatográfico dos flavonóides da fruta camu-camu, detectados a 270 nm; (A) eluato de flavonóides neutros e (B) eluato de flavonóides ácidos.	47
Figura 7. Perfil cromatográfico das proantocianidinas da fruta (A) e polpa comercial de camu-camu (B), detectados a 276 nm de excitação e 316 nm de emissão.....	49
Figura 8. Perfil cromatográfico de elagitaninos da polpa comercial (A) e fruta camu-camu (B), detectados a 260 nm.	52
Figura 9. Teor de compostos fenólicos e vitamina C presentes nas duas doses utilizadas nos estudos <i>in vivo</i>	53
Figura 10. Efeito dos extratos de camu-camu sobre consumo diário de água (A), ração (B), glicemia (C) e o peso corpóreo (D).....	55
Figura 11. Efeito dos extratos de camu-camu sobre glicose plasmática (A), insulina plasmática (B), glicosúria (C) e teste de tolerância à insulina (1,5 U/kg, i.p.) (D).	56
Figura 12. Efeito dos extratos de camu-camu sobre colesterol total (A), triacilgliceróis (B), colesterol HDL (C) e teste de tolerância oral ao triacilglicerol (D)..	57
Figura 13. Efeito dos extratos de camu-camu sobre peso do fígado (A), tecido adiposo marrom (B) e tecido adiposo branco (C).	59
Figura 14. Efeito dos extratos de camu-camu sobre hemoglobina glicada (A), ácido úrico (B), capacidade antioxidante plasmática - ORAC (C) e peroxidação lipídica - TBARS (D).	60
Figura 15. Efeito dos extratos de camu-camu sobre a atividade das enzimas antioxidantes em plasma GPx (A) e SOD (B), e em eritrócitos, CAT (C), GPx (D) e SOD (E).	62
Figura 16. Efeito dos extratos de camu-camu sobre capacidade antioxidante do plasma - ORAC (A), ácido úrico (B), peroxidação lipídica em plasma - TBARS (C) e peroxidação lipídica em fígado - TBARS (D).....	66

Figura 17. Efeito dos extratos de camu-camu sobre a atividade das enzimas antioxidantes em plasma CAT (A), GPx (B) e SOD (C), e em eritrócitos, CAT (D), GPx (E) e SOD (F).	68
Figura 18. Efeito do tratamento com camu-camu sobre a expressão gênica das enzimas antioxidantes glutathiona peroxidase (A), catalase (B) e superóxido dismutase (C) no fígado.....	69
Figura 19. Efeito do tratamento com camu-camu sobre a expressão gênica de IL-10 (A), TNF- α (B) e a razão IL-10/TNF- α (C) no fígado.....	69
Figura 20. Efeitos dos extratos de camu-camu sobre a captação de glicose em miócitos (L6).	71
Figura 21. Efeito dos extratos de camu-camu sobre a atividade de iNOS em macrófagos J774.1 (A e B) e miócitos L6 (C).....	74
Figura 22. Efeito dos extratos de camu-camu sobre a produção hepática de glicose em FaO.	76
Figura 23. Efeito dos extratos de camu-camu sobre a expressão gênica de citocinas em adipócitos (3T3.1).....	78

LISTA DE TABELAS

Quadro 1. Principais metabólitos formados pela ação da microbiota intestinal.	13
Tabela 2. Composição centesimal e teor de vitamina C da fruta e polpa comercial de camu-camu.	41
Tabela 3. Teores de elementos minerais e valores de ingestão diária recomendada (IDR) de minerais (mg/dia ou µg/dia) para adultos e contribuição mineral para IDR (%) em relação a 100 g de amostra.	42
Tabela 4. Capacidade antioxidante da polpa comercial de camu-camu e da fruta determinada através do método de capacidade redutora do Folin-Ciocalteu (mg equivalentes de catequina/g amostra b.s.), DPPH (µmoles equivalentes de trolox/g amostra b.s.), ORAC (µmoles equivalentes de trolox/g amostra b.s.) e FRAP (µmoles equivalentes de trolox/g de amostra b.s.).	43
Tabela 5. Composição e teor de flavonóides, ácido elágico livre e total (mg/100 g de amostra b.s.). e proantocianidinas (mg equivalente de procianidina B2/100 g de amostra b.s.) da polpa comercial e fruta camu-camu.	44
Tabela 6. Identificação dos elagitaninos encontrados na fruta e polpa comercial de camu-camu.	50
Tabela 7. Ganho de peso corpóreo durante o período experimental e peso relativo dos tecidos (% de peso corpóreo total) após sacrifício.	64
Tabela 8. Perfil lipídico, glicose e insulina plasmáticos determinados após o período experimental.	65

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

®: marca registrada	L: litros
%: por cento	M: molar
° C: grau Celsius	mg: miligrama
μ: micro	mg Hb: miligrama de hemoglobina
μg: micrograma	mL: mililitro
μL: microlitro	mM: milimolar
μM: micromolar	m/v: massa por volume
nM: nanomolar	nm: nanômetro
B.s.: base seca	ORAC: Capacidade de absorção do radical oxigênio
B.u.: base úmida	FRAP: Ferric reducing antioxidant power
CEAGESP: Companhia de entrepostos e armazéns gerais de São Paulo	pH: potencial hidrogeniônico
CLAE: Cromatografia líquida de alta eficiência	TROLOX: Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromana-2-carboxílico
SPE: Solid-phase extraction	TBARS: espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico
PTFE: Politetrafluoroetileno	HCl: ácido clorídrico
LDL: Lipoproteína de baixa densidade	U: unidade de atividade enzimática
HDL: Lipoproteína de alta densidade	mg/dL: miligrama por decilitro.
GLUT: transportador de glicose	PAC: proantocinidinas
MDA: malonaldeído	IDR: Ingestão diária recomendada
SOD: superóxido dismutase	ERO: Espécies reativas de oxigênio
GPx: glutathione peroxidase	ERN: Espécies reativas de nitrogênio
CAT: catalase	DNA: Deoxyribonucleic acid
UV: ultravioleta	RNA: ribonucleic acid
NO: óxido nítrico	iNOS: inducible nitric oxide synthase
min: minuto	IL-1: Interleucina 1
H: hora	NF-κB: Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
cm: centímetro	COX: ciclooxigenase
DPPH: 2,2-difenil-1-picrilhidrazil	TNF-α: Tumor necrosis factor alpha
EC: código enzimático	
<i>et al.</i> : e colaboradores	
g: grama	
Kg: quilograma	

Sumário

RESUMO	viii
ABSTRACT	ix
Sumário	1
1. INTRODUÇÃO	3
1.1 Compostos bioativos de alimentos	3
1.1.1 Flavonóides	4
1.1.2 Ácidos Fenólicos.....	6
1.1.3 Taninos.....	7
1.2 Biodisponibilidade: interação entre compostos fenólicos e microbiota intestinal	10
1.3 Atividade biológica de compostos fenólicos: efeito sobre o estresse oxidativo.....	14
2. OBJETIVOS.....	18
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	19
3.1 Material.....	19
3.2 Métodos	19
3.2.1. Composição centesimal	19
3.2.2 Obtenção dos extratos para análises <i>in vitro</i>	21
3.2.3 Determinação da capacidade redutora do Folin Ciocalteu e teor de fenólicos totais ...	21
3.2.4 Determinação colorimétrica de proantocianidinas pelo método DMAC.....	22
3.2.5 Sequestro de radicais livres (DPPH [•]).....	22
3.2.6 Método ORAC (Capacidade de Absorção de Radicais de Oxigênio)	23
3.2.7 Método FRAP (Capacidade Antioxidante por redução do ferro)	23
3.2.8. Determinação do teor de ácido ascórbico (Vitamina C).....	24
3.2.9 Identificação e caracterização dos compostos fenólicos do camu-camu	24
3.3 Preparo das frações enriquecidas em compostos fenólicos do camu-camu	27
3.3.1 Obtenção do extrato bruto para experimento com animais	27
3.3.2 Obtenção das frações purificadas para experimento com animais	28
3.3.4 Extratos bruto e purificado para experimento em cultura de células.....	30
3.4 Atividade biológica do camu-camu	30
3.4.1 Determinação do efeito do camu-camu em modelo animal de diabetes induzido pela estreptozotocina	30
3.4.2 Determinação do efeito do camu-camu em modelo animal de caquexia.....	31
3.4.3 Capacidade antioxidante do plasma.....	32

3.4.4 Determinação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).....	33
3.4.5. Atividade das enzimas antioxidantes	33
3.4.6 Extração de RNAm	34
3.4.7 Real-time PCR das enzimas antioxidantes	34
3.5 Determinação do efeito do camu-camu em modelos <i>in vitro</i> : cultura de células.....	35
3.5.1 Cultura de células e tratamentos	35
3.5.2 Transporte de glicose em miócitos (L6)	36
3.5.3 Determinação da concentração de NO em miócitos (L6) e macrófagos (J774.1)	36
3.5.4 Determinação da produção hepática de glicose (FaO)	37
3.5.5 Determinação da expressão gênica de citocinas em adipócitos (3T3.1).....	37
4. ANÁLISE DOS RESULTADOS.....	39
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
5.1. Caracterização química do camu-camu	40
5.2 Atividade biológica do camu-camu	54
5.2.1 Efeito do camu-camu em modelo animal de diabetes induzido pela estreptozotocina.	54
5.2.2 Efeito do camu-camu em modelo animal de caquexia	63
5.3 Efeito dos extratos de camu-camu em modelos <i>in vitro</i> : cultura de célula.....	70
5.3.1 Efeito dos extratos de camu-camu sobre o transporte de glicose em miócitos (L6).....	70
5.3.2 Efeito dos extratos de camu-camu sobre a concentração de NO em macrófagos (J774.1) e miócitos (L6).....	72
5.3.3 Efeito dos extratos de camu-camu sobre a produção hepática de glicose (FaO)	75
5.3.4 Efeito dos extratos de camu-camu na expressão gênica de citocinas em adipócitos (3T3.1)	76
6. CONCLUSÕES	80
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	81
APÊNDICE A - Chemical characterization and comparison of Brazilian <i>Myrciaria dubia</i> Mc. Vaugh (Camu-camu) fruit and commercial frozen pulp, submetido ao Food Chemistry.....	101
APÊNDICE B - Camu-camu (<i>Myrciaria dubia</i> Mc. Vaugh) phenolic-rich extracts restore plasma lipid profile in cachectic rats, submetido ao Nutrition Research.	126
APÊNDICE C - Camu-camu extracts inhibit glucose production and induce glucose uptake in L6 myocytes cells, but only improve biomarkers of oxidative stress and plasmatic lipid profile in streptozotocin-induced diabetic rats, a ser submetido ao Molecular Nutrition and Food Research.	15101

1. INTRODUÇÃO

1.1 Compostos bioativos de alimentos

Inúmeros fatores afetam a qualidade da vida moderna, de forma que a população deve ter consciência da importância de alimentos contendo componentes que auxiliam a promoção da saúde, trazendo com isso uma melhora no estado nutricional. A incidência de morte devido a acidentes cardiovasculares, câncer, acidente vascular cerebral, arteriosclerose, enfermidades hepáticas, dentre outros, pode ser minimizada através de bons hábitos alimentares. As recomendações nutricionais sugerem que o consumo de cinco porções (80 gramas cada porção) diárias de frutas e verduras é ideal e necessário para obtenção de uma alimentação saudável (HEIMENDINGER et al., 1996).

Os vegetais sintetizam dois tipos de metabólitos: primários e secundários. Enquanto os metabólitos primários respondem pela sobrevivência do vegetal, exercendo função ativa nos processos de fotossíntese, respiração e assimilação de nutrientes; os metabólitos secundários estão intimamente associados ao processo de defesa das plantas (SIMÕES et al., 2001).

Já foram reportados em torno de 8000 compostos fenólicos, ou polifenóis, e estes representam uma ampla classe de metabólitos secundários de plantas e a maior categoria de agentes fitoquímicos (CROZIER; CLIFFORD; ASHIHARA, 2006). Estes se encontram amplamente distribuídos no reino vegetal e são derivados da via fenilpropanoídica (WINKEL-SHIRLEY, 2001). Os três maiores grupos de fenólicos da dieta são os flavonóides, os ácidos fenólicos e os taninos, e são conhecidos por apresentarem atividades biológicas ditas promotoras da saúde, tais como atividades antioxidante, anti-inflamatória, hipocolesterolêmica e/ou anticarcinogênica. Entre estes podemos citar os compostos polifenólicos, tais como as catequinas do chá verde e do vinho, as antocianinas dos frutos vermelhos, os flavonóis em destaque na cebola e folhas verdes e as isoflavonas da soja (SAURA-CALIXTO; GOÑI, 2009).

O Brasil é o terceiro maior produtor de frutas do mundo, atrás apenas da China e da Índia. A produção brasileira de frutas é de 41,1 milhões de toneladas (IBRAF, 2007). As exportações brasileiras de frutas, polpas e sucos tiveram uma evolução no valor das exportações, entre 2002 e 2009, de 16,16% ao ano. Entre as frutas nativas da Amazônia que apresentam maior dinâmica da produção, comercialização e inserção nos mercados nacional e internacional estão o açaí (*Euterpe oleracea* Mart) e o cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*) (NOGUEIRA; SANTANA, 2009). Ainda, as condições climáticas brasileiras favorecem uma grande diversidade de espécies frutíferas tropicais nativas, como o camu-camu, que cresce próximo aos rios e lagos na região

Amazônica, e o buriti, uma fruta típica do cerrado (SOUZA FILHO et al., 2002; FRANCO; SHIBAMOTO, 2000).

O camu-camu (*Myrciaria dubia* McVaugh) é considerado uma fruta nativa da bacia Amazônica sendo cultivado no Brasil, Peru, Colômbia, Equador e Bolívia. O fruto é uma baga de 2-3 cm de diâmetro, pertencente à família Myrtaceae, e seu habitat varia desde solos férteis da várzea do Peru, onde há influência direta dos Andes, até solos paupérrimos da praia de areia branca do Rio Negro. As plantas conseguem adaptar-se conforme seu habitat; em solos férteis, as raízes são curtas e ficam próximas ao caule principal; por outro lado, em solo pobre como areia branca, o sistema radicular pode estender-se três vezes ou mais sua altura. Este fato pode influenciar diretamente na produção de fruto, onde a planta bem nutrida produz todos os anos, e as plantas em solos pobres produzem cada dois ou três anos (YUYAMA, 2011). A árvore frutifica entre os meses de novembro a março, e é considerada a fruta com maior teor de vitamina C (1-3 g/100 g) (PENN, 2006). Apesar disso, seu consumo no Brasil é restrito, com exceção da região Norte, onde há comercialização de polpa da fruta e suco (RODRIGUES et al., 2001). Na região Amazônica, já existe a tecnologia de produção. Os materiais melhorados geneticamente com alto teor de ácido ascórbico e alta produtividade podem chegar de 10 a 23 kg de fruto/planta/safra, e por meio de técnicas de clonagem podem multiplicar-se vegetativamente (YUYAMA, 2011). No Peru, o consumo da fruta já é popular, principalmente na produção de sucos e sorvetes, e a demanda internacional do camu-camu também cresce entre os mercados japoneses, europeus e norte-americanos (PENN, 2006).

Os trabalhos desenvolvidos em nosso laboratório demonstraram que algumas frutas nativas brasileiras podem ser consideradas excelentes fontes de compostos bioativos. Dentre elas, o camu-camu se destacou por ser uma fonte excelente de vitamina C, rico em antocianinas e com capacidade antioxidante *in vitro* cerca de 120 vezes maior em relação às outras frutas, além do alto teor de ácido elágico (GONÇALVES et al., 2010; GENOVESE et al., 2008).

1.1.1 Flavonóides

Os flavonóides são caracterizados estruturalmente como difenilpropanos (C6-C3-C6) com 15 átomos de carbono arranjados em três anéis, identificados como A, B e C, e ocorrem naturalmente nos alimentos vegetais, sendo, portanto, componentes usuais da dieta humana (KARAKAYA, 2004; HERTOOG et al., 1992). A sua estrutura química permite sua classificação em flavanonas, flavonas, flavonóis, flavanóis (catequinas), dihidroflavonóis, isoflavonas e antocianinas (**Figura 1**). As diferenças individuais presentes em cada grupo são resultado da

variação no número e no arranjo dos grupos hidroxilas, assim como a natureza e a quantidade de alquilações e/ou glicosilações destes grupos. Muitos deles se apresentam na forma glicosilada, sendo D-glicose, L-ramnose, glicoramnose, galactose e arabinose os carboidratos mais encontrados; o sítio mais comum de glicosilação é a posição 3, e o menos frequente, a posição 7 (SCALBERT et al., 2005; RICE-EVANS et al., 1996).

Figura 1: Estrutura química dos flavonóides (adaptado de CROZIER et al., 2009).

A capacidade antioxidante dos flavonóides está diretamente associada a um aumento dos grupos hidroxilas e diminuição das glicosilações. Eles são encontrados nos alimentos geralmente como *O*-glicosídeos com o açúcar normalmente ligado na posição C3, ou, no caso das isoflavonas, C7 (KING; YOUNG, 1999). São levemente ácidos e por serem compostos polares ou moderadamente polares, são solúveis em etanol, metanol e butanol, e combinações de

solventes com água. Apresentam intensa absorção no UV, exibindo duas bandas: banda I (320-385 nm) representando à absorção do anel B e banda II (250-285 nm), correspondente a absorção do anel A (YAO et al., 2004; HARBORNE, 1997).

Os flavonóides estão associados com o comportamento ecológico de algumas plantas. Por exemplo, devido às cores vibrantes apresentadas por alguns flavonóides (flavonas e antocianinas), estes podem agir como atrativos para insetos polinizadores; além disso, a característica adstringente das catequinas e outros flavanóis representam um sistema de defesa contra alguns insetos. Os flavonóides também podem agir como protetores de células vegetais por sequestrar espécies reativas de oxigênio (ERO) produzidas pela radiação UV necessária à fotossíntese (WINKEL-SHIRLEY, 2001).

Uma diversidade de estudos *in vitro* e *in vivo* tem mostrado que os flavonóides podem inibir e, às vezes, induzir uma grande variedade de enzimas, envolvidas em importantes processos reguladores como a divisão e proliferação celular, agregação plaquetária, detoxificação, e resposta inflamatória e imune do organismo humano (KIM et al., 2011; DAÍ; MUMPER, 2010; SEINFRIED et al., 2007; WILLIAMS et al., 2004). Além disso, a atividade antioxidante dos flavonóides é devida a sua habilidade de sequestrar radicais livres, atuando como doadores de hidrogênio, e quelar metais, reduzindo o potencial de ocorrência de doenças crônico-degenerativas (GONZALO; ALONSO, 2002; RICE-EVANS et al., 1996).

1.1.2 Ácidos Fenólicos

Os ácidos fenólicos compreendem os ácidos benzóicos e derivados e os ácidos cinâmicos e derivados. Ambos consistem de um anel aromático com grupos ligados à sua estrutura, sendo o grupo hidroxila o mais comum (MANACH et al., 2005).

Os ácidos hidróxibenzóicos estão presentes em concentrações muito baixa nas frutas e vegetais, e são encontrados principalmente nas frutas vermelhas, cebola e casca de batata. Os principais representantes desta classe são: gálico, elágico, vanílico, protocatecuico e 4-hidrobenzóico (CLIFFORD; SCALBERT, 2000). O ácido elágico, um dos focos deste trabalho, é um dos precursores dos taninos hidrolisáveis. Pode ser encontrado na forma livre ou glicosilada (glicose, ramnose e arabinose), mas em baixas quantidades (ESPÍN et al., 2007). O ácido elágico é comumente encontrado em morango, romã, uvas muscadine, castanhas, amora silvestre e framboesa. Trabalhos com ácido elágico reportaram que o composto se destaca por apresentar atividade antioxidante e quimioprotetora (HEBER, 2008; ADAMS et al., 2006; LOSSO et al., 2004).

Os principais representantes dos ácidos cinâmicos e derivados são: cumárico, cafeico, ferulico, clorogênico e sináptico, sendo que o ácido cafeico corresponde a 70% dos ácidos hidroxicinâmicos presentes em frutas (CLIFFORD; SCALBERT, 2000).

1.1.3 Taninos

Os taninos são compostos hidrossolúveis de alto peso molecular e tem como característica principal a capacidade de precipitação de proteínas e alcalóides. Esta capacidade de precipitar proteínas faz dos taninos substâncias adstringentes, propriedade vital em plantas na sobrevivência contra patógenos (ARON; KENNEDY, 2008).

Os taninos são divididos em duas classes: taninos hidrolisáveis, que compreendem polímeros de ácido gálico (galotaninos) ou elágico (elagitaninos), encontrados em frutas como o morango, romã, amora e nas nozes; e os taninos condensados (proantocianidinas), polímeros de catequina ou epicatequina, universais em Angiospermas (RIEDL; HAGERMAN, 2001; TOMÁS-BARBERÁN; CLIFFORD, 2000).

Os taninos hidrolisáveis estão, atualmente, divididos em três subclasses: galotaninos, elagitaninos e taninos *C*-glicosídicos (**Figura 2**). Os elagitaninos são compostos fenólicos hidrossolúveis de alto peso molecular, ésteres do ácido hexahidroxidifênico (HHDP) e um açúcar, geralmente uma D-glicopirranose (POUYSGÉGU et al., 2011; YOSHIDA et al., 2008).

Os monômeros de elagitaninos podem ser oxidados nas plantas e formar dímeros, trímeros e tetrâmeros com pesos moleculares de até 4000 Da. Quando expostos a ácidos ou bases, a porção éster é hidrolisada e o ácido hexahidroxidifênico se rearranja espontaneamente originando o ácido elágico, que é insolúvel em água. Essa reação é a base para a detecção e quantificação indireta de elagitaninos (DANIEL et al., 1989). A proporção de ácido elágico livre é altamente variável podendo chegar a até 50% do valor total, comparando-se valores antes e após a hidrólise, porém, esta proporção depende principalmente do tipo de alimento (*in natura* ou processado) analisado (SHARMA et al., 2010; PINTO et al., 2008).

Proantocianidinas, também conhecidas como taninos condensados, são polímeros constituídos por duas ou mais unidades monoméricas de flavan-3-óis (+)- catequina e (-)-epicatequina. As estruturas das proantocianidinas podem variar de acordo com o grau de polimerização (tamanho da cadeia), os diferentes padrões de hidroxilação, a estequiometria dos três centros quirais e os tipos de ligações interflavonóides (BLADÉ et al., 2010).

Ácido elágico

Ácido elágico pentose

Vesicalagina

Punicalagina

Sanguína H-6

Castalagina

Telimagrandina II

Figura 2. Ácido elágico e derivados (adaptado de LANDETE, 2011).

As estruturas diméricas destes compostos são do **tipo B** ($C_{30}H_{26}O_{12}$), se a ligação entre as unidades monoméricas (ligação interflavonóide) é estabelecida entre o carbono C4 da unidade superior e o carbono C8 ou C6 da unidade inferior (C4-C8 ou C4-C6), ou do **tipo A** ($C_{30}H_{24}O_{12}$) se, para além da ligação entre átomos de carbono, apresentam uma ligação éter C2-O-C7 adicional entre as duas unidades monoméricas (**Figuras 3**). (ARON; KENNEDY, 2008).

Figura 3. Estrutura das procianidinas do tipo B (A) e tipo A (B).

1.2 Biodisponibilidade: interação entre compostos fenólicos e microbiota intestinal

Há algum tempo os compostos fenólicos tem sido reconhecidos como componentes promotores de saúde principalmente por serem descritos como agentes antioxidantes. Entretanto, acredita-se atualmente que os mesmos estão envolvidos em mecanismos fisiológicos mais complexos relacionados com a prevenção de diferentes patologias (CROZIER; JAGANATH; CLIFFORD, 2009; SCALBERT et al., 2005).

Os estudos de biodisponibilidade em humanos relatam que a quantidade de polifenóis intactos encontrados na urina pode variar de um composto para outro. Cerca de 75 a 99 % dos polifenóis ingeridos não são detectados na urina. O nível de excreção urinária indica que quantidades substanciais de metabólitos colônicos são absorvidas e distribuídas pelo sistema circulatório antes de serem excretados (SCALBERT; WILLIAMSON, 2000).

Já se sabe que a maior parte dos polifenóis da dieta é metabolizada no cólon pela microbiota intestinal antes da absorção, e esta conversão é essencial na modulação do efeito biológico dos mesmos. Está claro que estes efeitos observados não são atribuídos aos compostos nativos, mas sim aos metabólitos formados (DEL RIO et al., 2010; SETCHELL et al., 2002; XU et al., 1995).

Por muitos anos acreditou-se que a principal função do intestino era apenas de reabsorção de água e sais minerais e uma rota simples de excreção. O intestino humano, considerado um ecossistema microbiano altamente complexo, abriga uma concentração de 10^{12} microrganismos por grama de fezes, dentre bactérias e fungos, e é um sítio ativo no processo de metabolização. Embora seja um número alto, a diversidade microbiana é limitada em oito classes bacterianas, sendo duas delas mais predominantes, Firmicutes e Bacteroides, que juntos somam 90% da flora intestinal, presentes principalmente no cólon (POSSEMIERS et al., 2011).

Em contraste à natureza oxidativa e conjugativa do metabolismo no fígado, o qual gera produtos hidrofílicos de alto peso molecular, a natureza metabólica da microbiota intestinal, em meio anaeróbico, é basicamente hidrolítico e de redução, dando origem a bioprodutos apolares de baixo peso molecular (SOUSA et al., 2008).

O primeiro passo após a ingestão de compostos fenólicos presentes na dieta é a liberação dos mesmos de sua matriz (**Figura 4**). A desglicosilação de flavonóides, a clivagem de proantocianidinas poliméricas e a hidrólise de ácidos fenólicos esterificados são consideradas pré-requisitos para absorção dos mesmos através da barreira intestinal (MANACH; DONAVAN, 2004).

Apenas uma pequena parte de compostos fenólicos ingeridos é absorvida pelo intestino delgado. Este processo ocorre através de difusão passiva e está associada com hidrólise e liberação da aglicona pela ação da lactase phloridzina hidrolase (LPH) presente nas microvilosidades das células epiteliais do intestino (DONOVAN et al., 2006). Depois de absorvida, a aglicona sofre metabolização no fígado, formando metabólitos sulfatados, glicurônicos e/ou metilados através da ação respectiva das enzimas de fase II sulfotransferase (SULT), uridina-50-difosfato glicuronosiltransferase (UGT) e catecol-O-metiltransferase (COMT) (CROZIER; DEL RIO; CLIFFORD, 2010).

Figura 4. Esquema geral da biodisponibilidade de compostos fenólicos. Absorção parcial dos polifenóis ocorre no intestino delgado, seguido da ação de enzimas de fase I e II e excreção através da bile de volta para o intestino delgado. Em seguida, ocorre desconjugação pelas enzimas microbianas e transformação dos polifenóis pela microbiota no cólon (adaptado de KEMPERMAN et al., 2010).

Os produtos desta metabolização podem entrar na corrente sanguínea e serem excretados através da urina, ou ainda, pela circulação enterohepática, uma fração considerável pode ser excretada pelo fígado como componente da bile de volta para o intestino (MCBAIN; MACFARLANE, 1998). Uma vez liberados no lúmen intestinal, estes conjugados podem ser hidrolisados por enzimas bacterianas como as β -glicuronidases, sulfatases e glicosidases (CROZIER; DEL RIO; CLIFFORD, 2010; SELMA; ESPÍN; TOMÁS-BARBERÁN, 2009). Os compostos que não são absorvidos no intestino delgado vão diretamente para o intestino grosso, onde são degradados pela microflora colônica a compostos mais simples, como ácidos fenólicos, e assim serem absorvidos pelo sistema circulatório (**Quadro 1**). Uma vez no intestino grosso, os flavonóides e seus metabólitos podem apresentar benefícios a microbiota colônica por selecionar bactérias probióticas ou inibir a proliferação de células cancerígenas (DEL RIO et al., 2010).

Estudos mais recentes já investigam a atividade biológica dos metabólitos colônicos de compostos fenólicos. Verzelloni et al. (2011) demonstraram que metabólitos formados a partir dos elagitaninos (urolitinas e pirogalol) foram capazes de inibir a formação de AGEs (*Advanced Glycation End-products*), comumente chamados de produtos de glicação avançada, os quais estão associados com a progressão de complicações cardiovasculares associadas ao diabetes.

Já foi relatado que o ácido hidrocafeico apresentou potente atividade antioxidante em células endoteliais, atividade antiproliferativa em linhagens celulares de câncer de cólon e efeito protetor em células da epiderme contra radiação UV, reduzindo a expressão de citocinas IL-6 e IL-8 (POQUET; CLIFFORD; WILLIAMSON, 2008; HUANG; DE PAULIS; MAY, 2004).

Larrosa et al. (2009) demonstraram que os ácidos hidrocafeico, hidroferulico e 3,4-dihidroxifenilacético, formados pela ação da microbiota no cólon, foram capazes de inibir a inflamação em modelo de colite induzida, reduzir a peroxidação lipídica e reduzir a expressão de citocinas envolvidas no processo inflamatório (TNF- α , IL-1b e IL-8).

Embora se saiba que a microflora intestinal tenha participação no metabolismo de flavonoides, há falta de informação sobre os mecanismos envolvidos neste processo.

Quadro 1. Principais metabólitos formados pela ação da microbiota intestinal.

Composto Fenólico		Metabólito
<i>Isoflavona</i>	Daidzeína	Equol O-demetilangolensina
<i>Flavonol</i>	Quercetina	Ácido 2-(3,4-dihidroxifenil) acético Ácido fenilacético Ácido p-hidroxibenzóico Ácido 2-(3-hidroxifenil) acético Ácido 3,4-dihidroxibenzoico Floroglucinol Ácido 3-(3,4-dihidroxifenil) propionico Ácido 3-(3-hidroxifenil) propionico Ácido homovanílico
	Caempferol	Ácido 2-(4-hidroxifenil) acético
<i>Flavanona</i>	Naringenina	Ácido 3-(4-hidroxifenil) propionico Floroglucinol
<i>Flavan-3-ol</i>	Catequina e Epicatequina	Ácido 3-(3-hidroxifenil) propionico 5-(3',4'-dihidroxifenil)- γ -valerolactona 5-(3'-hidroxifenil)- γ -valerolactone Ácido 5-(3,4-dihidroxifenil) valérico Ácido 5-(3-metoxifenil) valérico Ácido 3-(3,4-dihidroxifenil) propionico
<i>Ácidos fenólicos</i>	Ácido gálico	Pirogalol
	Ácido protocatecuico	Catecol
	Ácido Vanílico	Metil-catecol
	Ácidos cinâmicos	Ácido ferulico-4-O-sulfato Ácido dihidroferulico-4-O-sulfate Ácido dihidroferulico-4-O-glicuronideo Ácido cafeico-3-O-sulfato Ácido ferulico-4-O-sulfato Ácido dihidrocafeico-3-O-sulfato Ácido hidrocafeico
	Ácido elágico	Ver elagitaninos
<i>Taninos</i>	Elagitaninos	Ácido elágico Urolitina A (3,8-dihidroxi-6H-dibenzopiran-6-ona) Urolitina B (3-hidroxi-6H-dibenzopiran-6-ona) Isourolitina A Urolitina C (3,7,8-trihidroxi-6H- dibenzopiran-6-ona)
	Proantocianidinas	Ácido 2-(3,4-dihidroxifenil) acético Ácido 3-(3-hidroxifenil) propionico 4-hidroxifenil- γ -valerolactona Ácido fenilvalerico 3,4-dihidroxilado Ácido hidrocafeico

Adaptado de SERRA et al., (2012); GONZÁLEZ-BARRIO; EDWARDS; CROZIER (2011); SELMA; ESPÍN; TOMÁS-BARBERÁN (2009).

1.3 Atividade biológica de compostos fenólicos: efeito sobre o estresse oxidativo

Os radicais livres e as espécies reativas de oxigênio (ERO), tais como ânion superóxido, radical hidroxila e peróxido de hidrogênio, são produtos do metabolismo celular liberados durante o processo de redução do oxigênio e utilizados para converter em energia os nutrientes absorvidos dos alimentos (DRÖGE, 2002). Apesar da similaridade entre as terminologias, é importante distinguir que as EROs incluem as espécies derivadas do oxigênio, tanto radicalares quanto não radicalares; já os radicais livres são caracterizados por possuírem um elétron desemparelhado em seu último orbital (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1998).

O principal local de produção dos radicais livres e EROs é a mitocôndria. Nesta organela, o O_2 sofre redução tetravalente, com aceitação de quatro elétrons, e forma água. A enzima catalisadora dessa reação é a citocromo oxidase. Na parte terminal da cadeia transportadora de elétrons, a referida enzima oxida quatro moléculas de citocromo *c* removendo um elétron de cada uma delas. Esses elétrons são adicionados ao O_2 para formar água. A ação da citocromo oxidase controla a geração de radicais livres, impedindo sua geração excessiva na mitocôndria. No entanto, cerca de 2% a 5% do oxigênio metabolizado nas mitocôndrias são desviados para outra via metabólica, e reduzidos de forma univalente, dando origem aos radicais livres (KOWALTOWSKI et al., 2009; VALKO et al., 2007).

As espécies reativas, quando em excesso no organismo, levam a formação do quadro de estresse oxidativo, o qual atinge as células, os tecidos e os órgãos, e como consequência a instalação de processos inflamatórios, alguns tipos de câncer e a progressão de doenças. As EROs possuem baixo peso molecular, curta meia vida e alta reatividade com compostos orgânicos. Quando uma molécula de oxigênio sofre redução incompleta na cadeia respiratória mitocondrial, ela se torna um ânion superóxido (O_2^-). O peróxido de hidrogênio (H_2O_2), molécula que não conta com um elétron desemparelhado, é menos reativo que o superóxido, e se difunde mais facilmente, podendo atravessar a membrana plasmática. O radical hidroxila ($OH^\bullet$), produzido a partir de peróxido de hidrogênio na presença de íons metálicos, é altamente reativo, capaz de se ligar ao DNA, lipídios e proteínas, oxidando-os (VALKO et al., 2006; GATÉ et al., 1999).

Além das EROs, outras espécies reativas, as de nitrogênio, também são responsáveis por danos aos tecidos, tendo o óxido nítrico (NO) como principal agente. O NO é sintetizado a partir da L-arginina, pela enzima NO sintase, e age como modulador endógeno regulando vários processos como transporte de glicose, respiração mitocondrial, além de controlar a produção de hormônios, dentre eles a vasopressina e somostatina (MACCANN et al., 2005; PATTWELL et al., 2004).

A homeostase do organismo também sofre influência do equilíbrio entre oxidantes e antioxidantes. Por isso, os organismos aeróbicos, durante a evolução, não apenas se adaptaram à existência de radicais livres, mas também desenvolveram mecanismos que permitiam o uso vantajoso destes radicais em vários processos fisiológicos nas células (VALKO et al., 2007). Dentre estes mecanismos, pode-se destacar um sistema antioxidante complexo, presente nas células, para a detoxificação das EROs. As enzimas antioxidantes, componentes essenciais deste sistema, atuam seqüestrando os radicais livres. O ânion superóxido, altamente reativo, é rapidamente convertido a H_2O_2 pela superóxido dismutase (SOD), enzima que pode ser encontrada no meio citosólico, na mitocôndria e no meio extracelular. A catalase (CAT), umas das enzimas mais eficientes, está presente principalmente nos peroxissomos e é responsável pela conversão do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio. A glutathione peroxidase (GPx) é a principal fonte de proteção da célula contra os efeitos danosos do peróxido, convertendo-o a H_2O e oxigênio. Fitoquímicos provenientes da dieta apresentam a propriedade de modular a atividade destas enzimas bem como sua expressão gênica (SIMÕES et al., 2005; RODRIGUEZ et al., 2004; HALLIWELL, 1999).

O grande interesse nos compostos fenólicos da dieta se deve à atividade antioxidante destas substâncias e suas possíveis implicações benéficas à saúde humana. Estes fitoquímicos, tradicionalmente considerados como não-nutrientes, por não estar estabelecido estado de deficiência para os mesmos, vêm sendo vistos mais recentemente como um grupo de micronutrientes presentes no reino vegetal que é parte importante da dieta humana e animal (SÁNCHEZ-MORENO, 2002). A capacidade antioxidante pode ser considerada um marcador sensível e confiável para detectar mudanças no estresse oxidativo *in vivo*, fornecendo ajuda na elucidação de fatores fisiológicos e nutricionais importantes, e ainda, suprimindo informações sobre absorção e biodisponibilidade de compostos antioxidantes (BURTON-FREEMAN, 2010; CROZIER; JAGANATH; CLIFFORD, 2009).

Nos últimos anos, os estudos envolvendo compostos polifenólicos têm focado na atividade biológica associada à ingestão de compostos puros ou extraídos de uma matriz alimentar em doses maiores do que as comumente consumidas. Vários estudos já demonstraram que a ingestão de polifenóis está diretamente associada a um aumento do potencial antioxidante no plasma e proteção cardiovascular. Acredita-se que o que realmente gera efeito na saúde humana é a ação sinergista e cumulativa destes compostos presentes na dieta (PÉREZ-JIMENEZ et al., 2010; SAURA-CALIXTO; GOÑI, 2009; MULLEN et al., 2007). Ainda, os estudos envolvendo mecanismos de ação identificaram o estresse oxidativo, a inflamação e funções endoteliais como alvos importantes onde os polifenóis podem exercer efeitos biológicos em potencial.

O Diabetes mellitus é uma desordem metabólica de etiologia múltipla caracterizada por hiperglicemia crônica e distúrbios no metabolismo de proteínas, carboidratos e lipídios, resultado de deficiência na secreção de insulina, característico do tipo 1, insensibilidade do receptor à produção endógena deste hormônio ou ambos, definido como tipo 2 (WHO, 1999). De acordo com o IDF *Diabetes Atlas (International Diabetes Federation)*, em 2010, esta doença afetava cerca de 285 milhões de pessoas com idades entre 20 e 79 anos, e já se calcula que este valor se elevará para, no mínimo, 438 milhões em 2030. Estima-se que os gastos mundiais com a prevenção e tratamento do diabetes e suas complicações foram de, pelo menos, 375 bilhões de dólares (USD) em 2010. É considerada a doença crônica mais comum dos últimos 5 anos, e a forma clínica predominante é o Diabetes mellitus tipo 2, correspondente a 90% dos casos. A insulina é responsável pela diminuição dos níveis de glicose, facilitando a captação de glicose principalmente pelo músculo esquelético e tecido adiposo, e por inibir a gliconeogênese no fígado. Em indivíduos resistentes à insulina, estes órgãos não respondem adequadamente à insulina, o que leva a hiperglicemia e aumento da secreção da mesma pelas células beta-pancreáticas (SCHINNER et al., 2005).

O estresse oxidativo gerado pela hiperglicemia e o quadro crônico de inflamação no Diabetes mellitus é responsável pela progressão da doença e, conseqüentemente, pelo desbalanço entre o sistema antioxidante de defesa (CHUANG; MCINTOSH, 2011; RAINS; JAIN, 2011). Os principais fatores que contribuem para o desenvolvimento do diabetes tipo 2 como predisposição genética, sedentarismo, alimentação desregrada e obesidade, auxiliam no estímulo do estresse oxidativo, o que pode acarretar em alterações na sensibilidade à insulina e tolerância a glicose. Os mecanismos pelos quais isto ocorre ainda são desconhecidos e complexos, mas acredita-se que quadros hiperglicêmicos causam alterações na mitocôndria levando à produção desregulada de oxidantes (RAINS; JAIN, 2011; FINKEL, 2011).

O efeito benéfico dos compostos fenólicos em modelos de ratos diabéticos já vem sendo estudado. Tanto a administração de alimentos ricos em flavonóides quanto a destes compostos isolados foram responsáveis por reduzir as concentrações séricas de glicose, diminuir a peroxidação lipídica, além de aumentar os níveis de insulina, de peptídeo-C e a expressão de enzimas antioxidantes (JALIL et al., 2008; KAMALAKKANNAN; PRINCE 2006; QUINE; RAGHU, 2005).

Trabalhos com cultura de células mostraram que compostos como quercetina, caempferol, catequina e resveratrol foram eficientes em reduzir a expressão gênica de enzimas como a COX-2 e iNOS, principais responsáveis na mediação da resposta inflamatória. Estes modelos experimentais têm sido amplamente utilizados na tentativa de identificar quais as

principais vias de sinalização em que os compostos fenólicos atuam (PARK et al., 2009; RAHMAN et al., 2006; AGGARWAL; SHISHODIA, 2006).

O envolvimento de ERO e também ERN nos mecanismos patogênicos da carcinogênese tem sido amplamente documentado. As espécies reativas de oxigênio exercem um importante papel no processo de iniciação, promoção e progressão do câncer, afetando assim, o ciclo celular, a expressão gênica e causando dano ao DNA (HALIWELL, 2007; DREHER; JUNOD, 1996). Ainda, as ERO/ERN podem estar relacionadas com a ativação crônica não-específica de citocinas pró-inflamatórias, particularmente, TNF- α e IL-1, que atuam como mediadores dos mecanismos de lesões celulares e teciduais, de modificações de vias metabólicas e de mensageiros secundários. A relação entre aquelas citocinas e as espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ROS/RNS), aparentemente está na propriedade que ambas têm de ativar uma proteína reguladora de transcrição chamada NF- κ B, responsável pela transcrição de mais de 50 proteínas envolvidas na regulação da resposta imune e inflamatória (MANTOVANI, 2005; TISDALE, 2001).

Os efeitos do uso e administração dos flavonóides em modelos de câncer são amplamente estudados. Trabalhos com foco nos efeitos antimutagênicos da quercetina mostraram uma redução dos danos ao DNA causados pelo *terc*-butil-hidroperóxido em culturas de células HepG2, e ainda uma significativa redução na formação de cometa, diminuição das alterações do estado redox celular, induzidos pela exposição a nicotina em cultura de linfócitos de ratos (RAMOS et al., 2008; MUTHUKUMARAN et al., 2008).

2. OBJETIVOS

O camu-camu, fruta típica da floresta amazônica, ainda é pouco conhecido no Brasil e tem seu consumo restrito à região norte do país. Já é exportada para países como Japão, Holanda e Estados Unidos com forte apelo funcional devido ao seu alto teor de vitamina C. Trabalhos desenvolvidos anteriormente em nosso laboratório mostraram que o camu-camu se destacou pelo seu alto teor de vitamina C, além de apresentar polifenóis com relevante potencial funcional.

Com o intuito de explorar os efeitos dos compostos presentes nesta fruta, os objetivos deste projeto foram:

- Caracterizar fruta e polpa comercial de camu-camu em relação ao conteúdo de fenólicos totais, flavonóides, ácido elágico livre e total, proantocianidinas e capacidade antioxidante *in vitro*, e identificar taninos hidrolisáveis e condensados da fruta e polpa comercial de camu-camu;
- Verificar o efeito da ingestão de extrato bruto e frações purificadas de compostos fenólicos obtidos a partir da polpa comercial de camu-camu sobre o perfil bioquímico, capacidade antioxidante do plasma, e a atividade das enzimas antioxidantes catalase, superóxido dismutase e glutathione peroxidase em plasma e eritrócitos de ratos diabéticos;
- Determinar o efeito da administração do extrato bruto e frações purificadas de compostos fenólicos obtidos a partir da polpa comercial de camu-camu sobre o perfil bioquímico, expressão gênica de citocinas, enzimas antioxidantes (catalase, glutathione peroxidase e superóxido dismutase), capacidade antioxidante do plasma, e a atividade dessas enzimas em plasma e eritrócitos de ratos caquéticos.
- Verificar o efeito do extrato bruto e frações purificadas da polpa comercial de camu-camu em ensaios que mimetizam condições fisiopatológicas do diabetes e obesidade em diferentes tipos de linhagens celulares: transporte de glicose em miócitos (L6), produção de óxido nítrico (NO) em macrófagos (J774.1) e em miócitos (L6), produção hepática de glicose em hepatócitos (FaO) e expressão de citocinas em adipócitos (3T3).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material

A polpa comercial de Camu-camu foi obtida diretamente do produtor no estado do Amazonas (CUPUAMA®). Segundo dados do produtor, para a obtenção da polpa comercial, foi utilizado uma despoldadeira convencional, com uma peneira adequada (malha de aproximadamente 1 mm), a fim de se obter o "suco concentrado" do camu-camu. A fruta "in natura", proveniente de um produtor do estado de São Paulo, foi obtida no CEAGESP (Companhia de Entrepósitos e Armazéns Gerais de São Paulo), de acordo com o período de colheita. As amostras foram cortadas em pedaços, imediatamente congeladas em nitrogênio líquido, trituradas em graal com pistilo e liofilizadas. Após liofilização, foi retirada a semente da fruta, restando apenas polpa e casca. A polpa comercial e fruta foram homogeneizadas em moinho analítico (modelo A10 S2, IKA Works Inc., Wilmington, NC) sob refrigeração e posteriormente armazenadas a -20 °C (freezer) até o momento da análise.

3.2 Métodos

3.2.1. Composição centesimal

3.2.1.1. Determinação de umidade

A determinação de umidade foi feita pesando-se cerca de 3 gramas de amostra, em liofilizador à vácuo (Dura-Top MP, Bulk Tray Dryer, FST Systems®) durante 96 horas (AOAC, 2005). A determinação foi realizada em triplicata.

3.2.1.2. Determinação de cinzas

Os cadinhos de porcelana foram aquecidos em mufla a 600 °C por uma hora. Dois gramas da amostra foram adicionados a este recipiente e então deixados por duas horas na mufla nas mesmas condições. Os cadinhos foram retirados da mufla e colocados para resfriar em dessecador. As amostras foram umedecidas com álcool absoluto. Os cadinhos retornaram 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; os resultados foram expressos em porcentagem de cinzas em base seca (AOAC, 2005).

3.2.1.3. Determinação de proteínas

A determinação de proteína foi feita pelo método de micro Kjeldahl, em triplicata, determinando-se o nitrogênio da amostra seca, com o valor 6,25 como fator de conversão nitrogênio/proteína. (AOAC, 2005). Os resultados foram expressos em porcentagem de proteína bruta (b.s.).

3.2.1.4. Determinação de lipídios

Esta determinação foi feita segundo o método de Soxhlet (AOAC, 2005). Dois gramas de amostra foram pesados, em triplicata, dentro de cartuchos feitos de papel filtro e algodão. O balão do Soxhlet foi previamente secado em estufa a 105 °C por 1 hora e seu peso, anotado. Éter etílico foi adicionado em quantidade suficiente para permitir o sifonamento do mesmo. O gotejamento foi uniforme e ocorreu por 8 horas. Secaram-se as amostras até resultar somente os lipídios, mas antes que estes começassem a escurecer. Os balões foram colocados 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; os resultados foram expressos em porcentagem de lipídeo (b.s.).

3.2.1.5. Determinação de fibras

Os teores de fibra alimentar solúvel (FAS) e fibra alimentar insolúvel (FAI) foram determinados através do método enzimático-gravimétrico da AOAC (2005). As amostras liofilizadas foram gelatinizadas pela alfa-amilase termorresistente e em seguida digeridas enzimaticamente com protease e amiloglicosidase para remoção de proteína e amido presentes. Etanol foi utilizado para precipitar a fibra solúvel. O resíduo foi então lavado com etanol e acetona. Após a secagem, o mesmo foi pesado. O teor de fibra total foi calculado pela diferença do peso do resíduo menos proteína e cinzas.

3.2.1.6. Composição mineral

A composição mineral da fruta e polpa comercial de camu-camu foi avaliada através da determinação de sódio, nitrogênio, fósforo, potássio, cálcio, magnésio, enxofre, boro, zinco, ferro, manganês, cobre e selênio. Para a quantificação destes minerais, inicialmente as amostras foram submetidas a um processo de digestão ácida por 24 horas. A quantificação de sódio e potássio foi realizada por fotometria de emissão de chamas, e os demais minerais por espectrofotometria de absorção atômica (MALAVOLTA; VITTI; OLIVEIRA, 1997).

3.2.2 Obtenção dos extratos para análises *in vitro*

As amostras foram previamente pulverizadas com a ajuda de graal e pistilo, sob nitrogênio líquido. As amostras foram extraídas, na razão 1:25 (m/v), com metanol:água 70%, utilizando-se Ultra-turrax® (IKA® Labortechnik, T25 basic, Wilmington, EUA), por 1 minuto em velocidade 5, em banho de gelo. O resíduo foi re-extraído mais duas vezes. Os extratos obtidos foram filtrados utilizando-se papel de filtro Whatman n° 1.

3.2.3 Determinação da capacidade redutora do Folin Ciocalteu e teor de fenólicos totais

Foi feita de acordo com Genovese et al. (2003), utilizando-se 0,25 mL dos extratos hidrometanólicos obtidos como em 3.2.2, ou diluição adequada dos mesmos, adicionados a 2 ml de água destilada e 0,25 mL do reagente de Folin-Ciocalteu. Após 3 minutos à 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 min para desenvolvimento de cor. A absorbância a 750 nm foi determinada em espectrofotômetro (Ultrospec 2000, Pharmacia Biotech) e a capacidade redutora do Folin Ciocalteu foi expressa como equivalente de catequina. O teor de fenólicos totais foi determinado descontando a participação de vitamina C pela capacidade redutora do Folin Ciocalteu. Os resultados obtidos foram expressos como mg de catequina/g de amostra (b.s.).

3.2.4 Determinação colorimétrica de proantocianidinas pelo método DMAC

As amostras foram extraídas, na razão 1:25 (m/v), com acetona:água:ácido acético 70:29,5:0,5%, utilizando-se Ultra-turrax® (IKA® Labortechnik, T25 basic, Wilmington, EUA), por 1 minuto em velocidade 5, em banho de gelo. As proantocianidinas dos extratos de camu-camu foram quantificadas pela metodologia DMAC (*4-dimethylaminocinnamaldehyde*, Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA) de acordo com Prior et al. (2010). O conteúdo de proantocianidinas foi calculado utilizando-se uma curva padrão de procianidina B2 (HPLC, purity > 99%, Extrasynthèse) com concentrações de 5 a 50 µg/mL. Os resultados foram expressos como mg equivalente de procianidina B2/g de amostra (b.s).

3.2.5 Sequestro de radicais livres (DPPH•)

A atividade antioxidante foi determinada através da redução do radical estável DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila, Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA) do meio de reação pelos antioxidantes presentes na amostra (BRAND-WILLIAMS et al., 1995). 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 em 3.2.2, adequadamente diluídos, quando necessário. Foram efetuadas leituras de absorbância a 517 nm no tempo zero e após 20 minutos, utilizando-se espectrofotômetro de microplaca Benchmark Plus (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) a 25 °C.

Os cálculos foram efetuados com o auxílio da seguinte fórmula:

$$\% \text{ descoloração do DPPH} = \frac{[1 - (A_{\text{amostra}} - A_{\text{branco da amostra}}) \times 100]}{A_{\text{branco do ensaio DPPH}}}$$

Onde:

A amostra = absorbância da amostra a 517 nm;

A branco da amostra = absorbância do branco da amostra a 517 nm;

A branco do ensaio DPPH = absorbância do branco do ensaio DPPH a 517 nm.

A curva padrão foi preparada com uma solução de Trolox em diferentes concentrações e suas respectivas porcentagens de descolorimento. Os resultados foram expressos em μ moles equivalentes de Trolox/g amostra (b.s.).

3.2.6 Método ORAC (Capacidade de Absorção de Radicais de Oxigênio)

A Capacidade de absorção de radicais de oxigênio foi determinada de acordo com Dávalos et al. (2004), com as modificações a seguir. O extrato hidrometanólico das amostras (25 μ L), obtido em 3.2.2, com as devidas diluições em tampão fosfato 75 mM, pH 7,4, o controle e uma curva padrão de Trolox (0,002 M) foram misturados com 150 μ L de uma solução de fluoresceína (40 nM) e incubados a uma temperatura de 37°C por 15 min antes da adição de 25 μ L da solução do radical peroxila 2,2'-azobis (2-amidinopropano) dihidrocloreto (APPH) (153 mM), que dá início à reação. A intensidade de fluorescência (485 nm_{ex}/520 nm_{em}) foi verificada a cada 1 minuto até o tempo final de 80 min, em espectrofotômetro de fluorescência, marca Biotek modelo Synergy H1. A capacidade antioxidante foi determinada pela curva resultante da perda de fluorescência da fluoresceína versus a concentração de antioxidante. Uma curva padrão de trolox foi feita a cada ensaio, nas concentrações de 6,25 μ M a 100 μ M, e os resultados foram expressos em μ moles equivalentes de Trolox/g de amostra (b.s.).

3.2.7 Método FRAP (Capacidade Antioxidante por redução do ferro)

A metodologia de FRAP, (poder antioxidante de redução do ferro) descrita por Benzie e Strain (1996), adaptado para uso em microplaca, também foi utilizada para determinar a atividade antioxidante dos extratos hidrometanólicos de camu-camu obtidos em 3.2.2. O reagente de FRAP foi preparado na concentração de 10:1:1 com as seguintes soluções: (a) tampão acetato de sódio 300 mM a pH 3,6; (b) solução de 2,4,6-tripiridil-s-triazine (TPTZ) 10 mM em ácido clorídrico 40 mM e (c) solução de cloreto férrico 20 mM. Este reagente foi preparado no momento da análise. Uma curva padrão de Trolox foi feita a cada ensaio, nas concentrações de 50 μ M a 400 μ M. A leitura da absorbância foi feita após 4 minutos em 593 nm. Os resultados foram expressos em μ moles equivalentes de Trolox/g amostra (b.s.).

3.2.8. Determinação do teor de ácido ascórbico (Vitamina C)

As análises do ácido ascórbico foram realizadas segundo Daood et al. (1994), com algumas modificações. As amostras previamente pulverizadas com nitrogênio líquido foram homogeneizadas com solução de ácido metafosfórico a 2% (m/v), em proporção 1:2 ou 1:5, por 1 minuto em homogeneizador ultra-turrax (IKA® Labortechnik, T25 basic, Wilmington, EUA). Em seguida, as amostras ficaram em agitação por 15 minutos a 4°C com barra magnética. O homogenato foi transferido para tubo e centrifugado por 5 minutos a 7500 g, sob refrigeração. Após centrifugação, o sobrenadante foi filtrado em membrana Millipore® de 0,45 µm e analisado. As amostras foram analisadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) utilizando coluna S3C8 de 150 mm x 4.6 mm i.d., Waters, em gradiente isocrático, fase móvel composta por tampão fosfato de potássio 0,1 M, metanol e hidróxido de tetrabutilamônio 40% (97: 3: 0,05 v/v/v) e fluxo de 1 mL/minuto. A curva padrão foi feita com padrões de AA de concentrações entre 10 e 100 µg/mL. A detecção foi realizada por UV a 265 nm. Os resultados foram expressos em mg/ 100 g de amostra (b.s.).

3.2.9 Identificação e caracterização dos compostos fenólicos do camu-camu

3.2.9.1 Determinação de flavonóides e ácido elágico livre

A identificação e quantificação de flavonóides e ácido elágico livre foi feita de acordo com Arabbi et al. (2004). As amostras foram extraídas com metanol aquoso 70%. Os extratos obtidos foram filtrados utilizando-se papel de filtro Whatman nº 6. O resíduo foi re-extraído mais 2 vezes. Para concentração dos extratos foi utilizado Rotaevaporador (RE 120 - Büchi), em temperaturas de banho de 40°C (até ~ 20 mL). O volume foi então ajustado com água para balão volumétrico de 25 mL e uma alíquota de 10 mL (pipetada sob agitação lenta) passada em coluna de 1 g de Poliamida (CC 6, Macherey-Nagel), preparada em seringa própria de 6 mL (HPLC Technology). 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 50 mL de metanol seguido de 50 mL de metanol:amônia (99,5:0,5), ocorrendo a eluição do ácido elágico livre nesta última. Foi utilizado manifold Visiprep 24 DL (Supelco, Bellefonte, PA). Após secagem completa através de rotaevaporação, as amostras foram ressuspensas em 1 mL de metanol grau HPLC e filtradas em filtros de polietileno com membrana PTFE (Millipore Ltd., Bedford, MA) de 0,22 µ de poro.

3.2.9.2 Determinação de ácido elágico total

A determinação de ácido elágico total foi realizada de acordo com as condições otimizadas por Pinto et al. (2008). As amostras foram extraídas com acetona aquosa 80%, o extrato foi colocado em banho de 37°C sob N₂ até secar (Evaporador Analítico Organomation, Berlin, MA) e hidrolisado em ácido trifluoroacético 2N em metanol, a 120°C durante 90 minutos. Após a hidrólise, o extrato foi novamente seco sob N₂, ressuspensionado em metanol grau CLAE e filtrado com filtros de polietileno com membrana PTFE (Millipore Ltd., Bedford, MA) de 0,22 µ de poro para posterior análise por CLAE.

3.2.9.3 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

A identificação e quantificação de flavonóides e do ácido elágico e derivados foram realizadas em coluna Prodigy 5µ ODS(3) 250 x 4,60 mm (Phenomenex Ltd, Reino Unido). Foi utilizado gradiente de solventes constituído por A. Água : Tetrahydrofurano : Ácido trifluoroacético 98 : 2: 0,1 e B. Acetonitrila, na proporção de 17% de B por 2 min aumentando para 25% B após 5 min, 35% B após mais 8 min e 50% B após mais 5 minutos. Para limpeza da coluna foi aumentada então para 100 % B e a seguir re-equilibrada nas condições iniciais por 10 minutos. O cromatógrafo utilizado foi o do sistema Hewlett-Packard 1100, constituído por injetor automático de amostras, bomba quaternária e detector de arranjo de diodo (DAD), controlados pelo software ChemStation. As amostras foram injetadas em duplicata e os compostos fenólicos foram identificados através da comparação do tempo de retenção e espectro com o dos padrões. A quantificação foi baseada em calibração externa, e os padrões foram obtidos da Sigma Chemicals Co. (St. Louis, U.S.A.) e da Extrasynthèse (Genay, França).

3.2.9.4 Caracterização estrutural e identificação dos elagitaninos

A extração dos elagitaninos da fruta e polpa comercial de camu-camu foi realizada segundo Hager et al. (2008) em homogeneizador ultra turrax (IKA® Labortechnik, T25 basic, Wilmington, EUA) a 12000 g por 2 minutos. As amostras foram extraídas com acetona:água:ácido acético (70:29,5:0,5 v/v/v). Os extratos obtidos foram filtrados utilizando-se papel de filtro Whatman nº 6. O resíduo foi re-extraído mais 2 vezes. Para concentração dos extratos foi utilizado Rotaevaporador (RE 120 - Büchi), em temperaturas de banho de 40 °C (até

~10 mL). Cerca de 3 g de Sephadex LH-20, preparada em seringa própria de 60 mL, foi embebida e equilibrada com água por 4 horas. A coluna de LH-20 foi acondicionada com 25 mL de acetona aquosa 50 %, seguido de 25 mL de metanol e, finalmente, 50 mL de metanol aquoso 30 %. O volume de 10 mL de extrato foi passado em coluna Sephadex LH-20, previamente acondicionada. Após a passagem dos extratos aquosos, as colunas foram lavadas com 40 mL de metanol aquoso 30 %. A eluição dos elagitaninos foi feita com 80 mL de acetona aquosa 70%. Foi utilizado manifold Visiprep 24 DL (Supelco, Bellefonte, PA). Após secagem completa através de rotaevaporação, as amostras foram ressuspensas em 5 mL de acetona:água:ácido acético (70:29,5:0,5 v/v/v) e filtradas em filtros de polivinilideno (PVDF) (Chromspec, Ontario, CA) de 0,45 µm de poro. O processo de purificação em Sephadex LH-20 é essencial na remoção de compostos fenólicos e evitar possíveis interferências.

A identificação dos elagitaninos (ETs) da fruta e polpa comercial de camu-camu foi realizada segundo metodologia descrita por Gasperotti et al. (2010). A separação dos elagitaninos foi realizada em cromatógrafo UPLC Waters Aquity equipado com espectrômetro de massa acoplado ao sistema de ionização por eletronebulização (ESI) e software MassLynx (Waters Corp.) A coluna cromatográfica analítica utilizada foi AcquityTM UPLC BEH C18 (50 mm x 2,1 mm d.i., 1,7 µm de diâmetro de partícula), Waters. No cromatógrafo líquido foram utilizados ácido fórmico 1% e acetonitrila como fase móvel. O espectrômetro de massa foi operado em modo negativo sob as seguintes condições: voltagem do capilar 3 kV, temperatura da fonte 100 °C, temperatura de dessolvatação 350 °C e vazão do gás de dessolvatação (N₂) 650 L/h. O comprimento de onda 260 nm foi utilizado para apresentação dos cromatogramas.

3.2.9.5 Caracterização estrutural e identificação das proantocianidinas

A extração das proantocianidinas da fruta e polpa comercial de camu-camu foi realizada segundo Robbins et al. (2009). As amostras foram extraídas com acetona:água:ácido acético (70:29,5:0,5 v/v/v) em banho/ultrasom (UC-3200TA, Ningbo HaiShu Sklon E- Instruments Co, China) a 37 °C por 1 hora. Os extratos obtidos foram deixados em repouso por 30 minutos e em seguida centrifugados por 5 minutos a 3200 g. O resíduo foi re-extraído mais 1 vez. Para concentração dos extratos foi utilizado Rotaevaporador (RE 120 - Büchi), em temperaturas de banho de 40 °C (até ~ 6 mL). Cerca de 3 g de Sephadex LH-20, preparada em seringa própria de 60 mL, foi embebida e equilibrada com água por 4 horas. A coluna de LH-20 foi acondicionada com 25 mL de acetona aquosa 50 %, seguido de 25 mL de metanol e, finalmente, 50 mL de

metanol aquoso 30 %. O volume de 6 mL de extrato foi passado em coluna Sephadex LH-20, previamente acondicionada. Após a passagem dos extratos aquosos, as colunas foram lavadas com 30 mL de metanol aquoso 30 %. A eluição das proantocianidinas foi feita com 70 mL de acetona. Foi utilizado manifold Visiprep 24 DL (Supelco, Bellefonte, PA). Após secagem completa através de rotaevaporação, as amostras foram ressuspensas em 1 mL de acetona:água:ácido acético (70:29,5:0,5 v/v/v) e filtradas em filtros de polivinilideno (PVDF) (Chromspec, Ontario, CA) de 0,45 µm de poro.

A identificação das proantocianidinas foi determinada de acordo com Robbins et al. (2009). A separação das proantocianidinas (PACs) também foi realizada em cromatógrafo UPLC Waters Aquity acoplado ao detector de fluorescência. Como fase móvel, foram utilizados diclorometano/ácido acético e metanol/ácido acético. A detecção da fluorescência foi conduzida em 276 nm de comprimento de excitação e 316 nm de comprimento de emissão. A coluna cromatográfica analítica utilizada foi Develosil (100 Diol-5, 250 × 4,6 mm, 5 µm de diâmetro de partícula, Phenomenex).

3.3 Preparo das frações enriquecidas em compostos fenólicos do camu-camu

O extrato bruto e frações purificadas de compostos fenólicos foram obtidos a partir da polpa comercial congelada, como descrito a seguir, e administrados por gavagem aos animais nos estudos *in vivo*.

3.3.1 Obtenção do extrato bruto para experimento com animais

O extrato bruto foi obtido a partir da extração hidrometanólica da polpa comercial de camu-camu. O **Fluxograma 1** descreve como foi o processo de obtenção do extrato bruto administrado aos animais por gavagem. Partiu-se de 20 e 60 gramas de polpa comercial de camu-camu. As amostras foram extraídas com metanol aquoso 70%, em seguida filtradas utilizando-se papel de filtro Whatman nº 6. O resíduo foi re-extraído mais 2 vezes. Finalmente, o extrato foi rotaevaporado até secagem e em seguida ressuspensado em água, de acordo com a dosagem estabelecida (1 ou 3 g/kg).

Fluxograma 1. Obtenção do extrato bruto a partir da polpa comercial de camu-camu.

3.3.2 Obtenção das frações purificadas para experimento com animais

O extrato purificado foi obtido a partir da extração hidrometanólica da polpa comercial de camu-camu. O **Fluxograma 2** descreve como foi realizado o processo de obtenção e purificação do extrato purificado administrado aos animais por gavagem.

Fluxograma 2. Obtenção do extrato purificado a partir da polpa comercial de camu-camu.

Partiu-se de 60 gramas de polpa comercial de camu-camu. Esta foi extraída com metanol aquoso 70%, em seguida filtrada utilizando-se papel de filtro Whatman nº 6. O resíduo foi re-extraído mais 2 vezes. O extrato foi rotaevaporado até secagem e em seguida ressuspensão em 10 mL água destilada. Esta alíquota de 10 mL foi passada em coluna contendo 10 g de resina C18 SPE (Solid-Phase Extraction - Supelco®) preparada em seringa de 60 mL. Após a passagem do extrato, a coluna foi lavada com 60 mL de água e a eluição dos compostos fenólicos foi feita com 100 mL de metanol seguido de 100 mL de metanol:amônia (99,5:0,5). Após secagem

completa através de rotaevaporação, as amostras foram ressuspensas em água de acordo com a dosagem estabelecida (3 g/kg).

3.3.4 Extratos bruto e purificado para experimento em cultura de células

O extrato bruto e frações purificadas em poliamida e coluna de C18, para extração em fase sólida, de compostos fenólicos foram obtidos a partir da polpa comercial congelada e utilizados nas doses de 100 µg/mL, 500 µg/mL e 1000 µg/mL para os estudos em cultura de células. A obtenção dos extratos foi realizada como descrita nos itens 3.3.1 e 3.3.2.

3.4 Atividade biológica do camu-camu

3.4.1 Determinação do efeito do camu-camu em modelo animal de diabetes induzido pela estreptozotocina

Foram utilizados ratos machos jovens da linhagem Wistar de peso aproximado entre 200 a 300 g. Os animais foram mantidos a $25 \pm 2^\circ \text{C}$ e 75% umidade relativa em ciclos alternados de 12 h luz/12 h escuro, com ração padrão (NUVILAB CR 1) e água *ad libitum*. O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (Protocolo CEUA/FCF/280). Os animais foram aleatoriamente divididos em 2 grupos: não-diabéticos ou **Controle** ($n = 10$) e grupo diabético ($n = 27$). O diabetes foi induzido por uma única dose de estreptozotocina (45 mg/Kg; Sigma, EUA) dissolvida em tampão citrato 0,1 M (pH = 4,5) pela via peniana. Os ratos não-diabéticos controle receberam a mesma dose de tampão citrato. O Diabetes foi confirmado através da determinação da glicose sanguínea 48 horas após a aplicação de estreptozotocina. Os ratos com os níveis de glicose acima de 300 mg/dL foram considerados diabéticos e usados no experimento. Os ratos diabéticos ($n = 30$) foram divididos aleatoriamente em três grupos:

- **Grupo Diabético** ($n = 10$): animais diabéticos controle com dieta normal; este grupo recebeu somente água, administrada por gavagem, durante 30 dias.
- **Grupo Extrato I (E I)** ($n = 10$): animais diabéticos com dieta normal receberam extrato bruto (descrito em 3.3.1) na dose correspondente a 1 g de polpa comercial liofilizada/kg de peso corpóreo, por gavagem, durante 30 dias.

- **Grupo Extrato II (E II) ($n = 10$):** animais diabéticos com dieta normal receberam extrato bruto (descrito em 3.3.1) na dose correspondente a 3 g de polpa comercial liofilizada /kg de peso corpóreo, por gavagem, durante 30 dias.

O consumo de ração e água e o peso corpóreo foram determinados diariamente. Anterior ao sacrifício, os animais foram mantidos em jejum de 8 h com acesso a água *ad libitum*. Os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal da mistura cetamina/xilazina (3:1; Imalgene e Rompun, respectivamente) e foi realizada punção cardíaca para coleta de sangue em tubos heparinizados. Para a obtenção de plasma, as amostras foram imediatamente centrifugadas por 10 minutos a 1000 g (4 °C); o plasma separado foi armazenado a -80 °C até o momento da análise. Em seguida foram coletados fígado e rins, os quais foram pesados e imediatamente congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -80 °C. Este protocolo foi repetido para obtenção de dados adicionais em relação às alterações metabólicas nos animais e confirmação de dados pré-existentes.

Com o intuito de verificar a eficiência da polpa de camu-camu sob os efeitos fisiopatológicos do diabetes, alguns parâmetros bioquímicos (kits bioquímicos LABTEST®) foram avaliados, sendo eles hemoglobina glicada, ácido úrico, triacilgliceróis, colesterol HDL e colesterol total. Além dos parâmetros bioquímicos analisados em plasma, fígado, tecido adiposo branco e marrom foram retirados e pesados. Para o teste de tolerância à insulina (iTT), realizado no vigésimo dia do experimento, 1,5 UI/Kg de insulina foi injetada intraperitonealmente nos animais. Amostras de sangue da cauda foram coletadas nos tempos 0, 15, 30, 45, 60 e 90 minutos após a injeção e a concentração de glicose determinada através de glicosímetro. Para o teste de tolerância ao triacilglicerol (tTT), os animais receberam, por gavagem, 0,3 mL/kg de ácido graxos. Alíquotas de 30 µL de sangue da cauda foram coletadas nos tempos 0, 2 e 4 horas após a administração. As amostras foram centrifugadas e o triacilglicerol foi dosado no soro através de kit bioquímico (LABTEST®).

3.4.2 Determinação do efeito do camu-camu em modelo animal de caquexia

Foram utilizados ratos machos jovens da linhagem Wistar de peso aproximado entre 160 a 180 g. Os animais foram mantidos a 25 ± 2 °C e 75% umidade relativa em ciclos alternados de 12 h luz/12 h escuro, com ração padrão (NUVILAB CR 1) e água *ad libitum*. O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (Protocolo CEUA/FCF/280). Células do tumor de Walker 256 (2×10^7 células)

foram injetadas subcutaneamente, no flanco direito traseiro dos animais (SEELAENDER et al., 1996). Os animais foram aleatoriamente divididos em 4 grupos de ratos caquéticos, sendo um grupo controle não tratado ($n = 12$) ou **Grupo I** e 3 grupos de ratos caquéticos tratados ($n = 36$). Estes foram divididos aleatoriamente em três grupos:

- **Grupo I ou controle** ($n = 12$): animais caquéticos controle com dieta normal; este grupo recebeu somente água, administrados por gavagem, durante 44 dias.
- **Grupo Extrato I (E I)** ($n = 12$): animais caquéticos com dieta normal receberam extrato bruto (descrito em 3.3.1) na dose correspondente a 1 g de polpa comercial liofilizada /kg de peso corpóreo, por gavagem, durante 44 dias.
- **Grupo Extrato II (E II)** ($n = 12$): animais caquéticos com dieta normal receberam extrato bruto (descrito em 3.3.1) na dose correspondente a 3 g de polpa comercial liofilizada / kg de peso corpóreo, por gavagem, durante 44 dias.
- **Grupo Extrato Purificado (EP)** ($n = 12$): animais caquéticos com dieta normal receberam o extrato purificado (descrito em 3.3.2) na dose equivalente a 3 g de polpa comercial /kg de peso corpóreo, por gavagem, durante 44 dias.

O consumo de ração e o peso corpóreo foram determinados diariamente. Anterior ao sacrifício, os animais foram mantidos em jejum de 8 h com acesso a água *ad libitum*. Os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal da mistura cetamina/xilazina (3:1; Imalgene e Rompun, respectivamente) e foi realizada punção cardíaca para coleta de sangue em tubos heparinizados. 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. Em seguida foram coletados fígado, tecidos adiposos retroperitoneal, epididimal e mesentérico, os quais foram pesados e imediatamente congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -80°C.

Com o intuito de verificar o efeito da administração do extrato bruto e fração purificada da polpa de camu-camu sob a disfunção metabólica gerada pela caquexia induzida pelo tumor de Walker 256, alguns parâmetros bioquímicos (kits bioquímicos LABTEST®) foram avaliados, sendo eles, triacilgliceróis, colesterol HDL, colesterol LDL e colesterol total.

3.4.3 Capacidade antioxidante do plasma

A capacidade antioxidante total do plasma dos animais controle e tratados foi avaliada através do método ORAC (*oxygen radical absorbance capacity*), conforme descrito no item 3.2.2.5, utilizando-se 100 µL de plasma diluído quando necessário.

3.4.4 Determinação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

A determinação de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) do plasma foi feita de acordo com o método de Ohkawa et al. (1979), com algumas modificações. Foram tomados 0,1 mL de plasma e, adicionados 0,1 mL de dodecil sulfato de sódio (SDS) 8,1%, 0,75 mL de solução de ácido acético 20% pH 3,5 (ajustado com hidróxido de sódio), 0,75 mL de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,8% e 0,3 mL de água deionizada. A mistura reativa foi agitada e então, aquecida em banho-maria a 95 °C por 1 h. Após resfriamento em água corrente, 1,4 mL de n-butanol foi adicionado e agitado vigorosamente em vortex. Em seguida, o material foi centrifugado a 2000 g por 10 minutos, a camada orgânica (superior) foi removida e sua absorbância foi medida a 532 nm em espectrofotômetro (Ultrospec 2000, Pharmacia Biotech). O malonaldeído (MDA) foi usado como padrão externo, e os níveis de peróxidos lipídicos foram expressos como nmol de MDA/mL de plasma ou mg de proteína.

3.4.5. Atividade das enzimas antioxidantes

A atividade das enzimas antioxidantes foi determinada em plasma e eritrócitos. Após centrifugação das amostras sanguíneas, os eritrócitos foram lavados três vezes com solução de cloreto de sódio (NaCl) 0,9%. Em seguida, os eritrócitos foram diluídos em NaCl 0,9% obtendo-se um hematócrito de 50% (1:1). 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 . Para a reação foi utilizada uma alíquota de 15 uL de amostra, diluída quando necessária, e iniciada pela adição de 985 uL de meio de reação contendo tampão Tris HCl 1 M, água miliQ e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) 30 mM preparado no momento de uso. A atividade CAT foi dada pela variação na absorbância (ΔA_{230}) por unidade de tempo por mL ou mg de proteína. A atividade da glutathione peroxidase (GPx) (EC 1.11.1.9) foi determinada segundo a técnica de Lawrence e Burk (1976). A mistura de reação consistia de tampão fosfato 75 mM com ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) e ázida sódica (NaN_3) pH 7,0, 10 uL de amostra diluída quando necessário, nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) 0,1 mM, glutathione (GSH) 4,0 mM, e 1,5 U de glutathione redutase (GR) em um volume final de 1 mL a 37 °C. A reação foi iniciada pela adição de hidróxido de terc-butil 0,5 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 unidade de tempo/mL ou mg de proteína.

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). Para o meio de reação foi utilizado tampão fosfato 50 mM, pH 7,8, cianeto de potássio 200 μ M, EDTA 1mM, xantina 500 μ M, citocromo C e 15 μ L de amostra, diluída quando necessário, em um volume final de 1 mL. A mistura de reação consistiu em inibição induzida por SOD da redução de nitro blue tetrazolium, usando um sistema gerador de radical livre de 0,5 nM 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 em 50% a formação de nitrito em 1 mL de reação em 1 min a 37 °C .

As concentrações protéicas foram determinadas com o método de Lowry (1976) usando albumina de soro bovino (Sigma Chemicals Co.) como padrão. A concentração de hemoglobina foi determinada utilizando o reagente de Drabkin.

3.4.6 Extração de RNAm

O RNA total do fígado foi extraído utilizando-se TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), baseado no método de Chomczynski e Sacchi (1987), de acordo com o protocolo do fabricante.

3.4.7 Real-time PCR das enzimas antioxidantes

O cDNA fita simples foi sintetizado a partir do RNA total com os iniciadores oligonucleotídeos dT15 utilizando-se o kit cDNA synthesis kit (Transcriptor Reverse Transcriptase, Roche). A análise dos níveis de RNAm para CAT, SOD e GPx foi realizada com iniciadores desenhados para detectar os produtos dos genes previamente descritos (JONES et al., 1995; KIM et al., 1993; HO; HOWARD, 1992; NAKASHIMA et al., 1989). Os oligonucleotídeos para MnSOD foram 5'- CGTGACTTTGGGTCTTTTGAG-3' e 5'- GCGTGCTCCCACACATCAAT-3' (195 pb); para CuZnSOD foram 5'- AAGGCCGTGTGCGCGCTG AA-3' e 5'-GTACAGCCT TGTGTATTGTC-3' (167 pb); para GPx1, 5'-GAATGGCAAGAATGAAGAGATAG-3' e 5'-ACAGCAGGGCTTCTATATCG-3' (333 pb); e para CAT 5'-AATGGCTATGGCTCACCA CA-3' e 5'- TCTTCCTGTGCAAGTCTTCC-3' (135 pb). O PCR em tempo real foi feito utilizando-se o kit

comercial LightCycler FastStart DNA Master PLUS SYBR Green I da Roche, em equipamento ROTOR GENE 3000 (Corbett Research, Mortlake, Austrália). As quantidades relativas dos RNAm foram calculadas usando-se o método comparativo C_T ("Cycle time") e β -actina (5'-CCTCTATGCCAACACAGT-3' e 5'-AGCCACCAATCCACACAG-3', 155 pb) foi utilizada como controle.

3.5 Determinação do efeito do camu-camu em modelos *in vitro*: cultura de células

3.5.1 Cultura de células e tratamentos

Linhagens celulares de músculo esquelético (L6) foram cultivadas em meio *Minimum Essential Medium Eagle* (α -MEM) com 10% de soro fetal bovino (SFB) a 37 °C em incubadoras umidificadas com 5% de CO₂ até alcançarem 80% de confluência. Para induzir a diferenciação de mioblastos para miotúbulos, as células foram cultivadas em α -MEM contendo 2% de SFB por 7 dias. Os tratamentos com o extrato bruto e frações purificadas em poliamida e resina de C18 obtidos da polpa comercial de camu-camu foram realizados utilizando as doses de 100, 500 e 1000 μ g/mL por 2 horas em células estimuladas e não-estimuladas com insulina; também foi utilizando apenas a dose de 500 μ g/mL do extrato bruto e frações purificadas em poliamida e resina de C18 obtidos da polpa comercial de camu-camu 24 horas em células estimuladas com citocinas (IFN- γ 1 μ g/ μ L e TNF- α 10 ng/mL) e lipopolissacarídeo (LPS) em concentração de 10 μ g/mL (KAPUR et al., 1997). Uma solução de vitamina C foi preparada e utilizada em todos os experimentos para determinar se haveria ou não interferência por parte deste composto, já que o camu-camu apresenta altas concentrações do mesmo.

Macrófagos J774.1 foram cultivados e mantidos em meio *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) com 10 % de SFB a 37 °C em incubadoras umidificadas com 5% de CO₂ até alcançarem 80 % de confluência. Os tratamentos com o extrato bruto e frações purificadas em poliamida e resina de C18 obtidos da polpa comercial de camu-camu foram realizados utilizando apenas a dose de 500 μ g/mL por 6 e 24 horas em células estimuladas com lipopolissacarídeo (LPS) em concentração de 10 μ g/mL.

Hepatócitos (FaO) foram plaqueados em placas de 12 poços e mantidos em meio RPMI 1640 com 10 % de SFB a 37 °C em incubadoras umidificadas com 5% de CO₂ até alcançarem 80 % de confluência. Os tratamentos com o extrato bruto e frações purificadas em poliamida e

resina de C18 obtidos da polpa comercial de camu-camu foram realizados utilizando apenas a dose de 500 µg/mL por 5 horas em células estimuladas ou não com insulina (100 nM).

Fibroblastos embrionários de camundongo (3T3-L1) foram plaqueados em placas de 6 poços e mantidos com meio DMEM adicionado de 10% de SFB e 100 unidades/mL de penicilina/estreptomicina a 37 °C em incubadoras umidificadas com 5% de CO₂ até alcançarem 80 % de confluência. A diferenciação foi induzida por agentes adipogênicos adicionados ao meio: dexametasona 1 µM, IBMX (3-isobutil-1-metilxantina) 0,5 mM e rosiglitazona 5 µM e as células incubadas por 2 dias. O meio foi trocado a cada 2 dias, adicionando meio DMEM mais insulina por 10 dias (final do protocolo). Os tratamentos com o extrato bruto e frações purificadas em poliamida e resina de C18 obtidos da polpa comercial de camu-camu foram realizados utilizando apenas a dose de 500 µg/mL por 6 horas em células estimuladas com lipopolissacarídeo (LPS) em concentração de 10 µg/mL.

3.5.2 Transporte de glicose em miócitos (L6)

Após os tratamentos com os extratos obtidos da polpa comercial de camu-camu, as células L6 foram lavadas vez com solução salina tamponada com Hepes livre de glicose, pH 7,4 (140 mM NaCl, 20 mM Hepes/Na, 5 mM KCl, 2±5 mM MgSO₄ e 1 mM CaCl₂), e foram incubadas por 8 minutos com 10 µM de 2-deoxi-D-glicose, contendo 0.3 µCi/mL de 2-deoxi-d-[3H] glicose no mesmo tampão. Imediatamente após a incubação, o meio utilizado no ensaio de transporte foi descartado, as células foram lavadas com solução salina gelada, e então rompidas através da adição da solução de lise (NaOH 0,05N). A radioatividade associada às células foi determinada por contador de cintilação beta. A concentração de proteínas foi determinada pelo método do ácido bicinonínico (Kit Pierce) e os resultados expressos em pmol/min/mg de proteína.

3.5.3 Determinação da concentração de NO em miócitos (L6) e macrófagos (J774.1)

Após os tratamentos com os extratos obtidos da polpa comercial de camu-camu, o nitrito acumulado no meio foi usado como índice na produção de óxido nítrico (NO). O nitrito foi determinado espectrofotometricamente pela adição do reagente de Griess ao meio de incubação: 1 % (m/v) sulfanilamida, 0,1 % (m/v) *N*-(1-naphthyl) ethylenediamine dihydrochloride. A

concentração de proteínas foi determinada pelo método do ácido bicinonínico (Kit Pierce). A leitura das amostras foi realizada a 540 nm e os resultados expressos em $\mu\text{mol/g}$ de proteína.

3.5.4 Determinação da produção hepática de glicose (FaO)

As células foram semeadas em placas de 12 poços (4×10^6 /por placa). Após dois dias de crescimento, foi adicionado meio sem SFB com ou sem insulina (100 nM) e mantido overnight. Para o ensaio de glicose, foi utilizado meio HGP (meio DMEM sem glicose, 3,7 g de bicarbonato de sódio, 20 mL de piruvato de sódio 100 mM, 2,24 g de L-lactato de sódio e pH ajustado para 7,3). No dia seguinte, as células foram lavadas 3 vezes com meio HGP. Em seguida, foram adicionados 300 μL de meio HGP em cada poço, juntamente com a insulina e os extratos de camu-camu. As placas foram incubadas por 5 horas em atmosfera de 5% CO_2 , a 37 °C. Após 5 horas, o meio foi coletado para dosagem de glicose. A concentração de proteínas foi determinada pelo método do ácido bicinonínico (Kit Pierce) e os resultados expressos em μM de glicose/ mg de proteína.

3.5.5 Determinação da expressão gênica de citocinas em adipócitos (3T3.1)

Após os tratamentos com os extratos obtidos da polpa comercial de camu-camu, as células foram removidas pela adição de tampão de lise. O RNA total das células foi extraído utilizando-se kit RNeasy® (QIAgen), de acordo com o protocolo do fabricante. O cDNA fita simples foi sintetizado a partir do RNA total utilizando-se o kit cDNA synthesis kit (Invitrogen®). A quantificação do mRNA foi feita por absorbância a 260 nm (NanoDrop 2000, Thermo Scientific). Os oligonucleotídeos utilizados foram leptina (5'-CCAGGATGACACCAAACCC-3' sense; 5'-TCCAAGTGTGAAGAATGTCC-3' antisense), adiponectina (5'-CATGACCAGGAAACCACGACT-3' sense; 5'-TGAATGCTGAGCGGTAT-3' antisense), IL-6 (5'-AACGATGATGCACTTGCAGA-3' sense; 5'-GAGCATTGGAAATTGGGGTA-3' antisense), iNOS (5'-TGGAACCACTCGTACTTGGGA-3' sense; 5'-CAAGAGTTTGACCAGAGGACC-3' antisense), IL-10 (5'-GGTGAAGAATGCCTTTAATAAGCTCC-3' sense; 5'-TTTCGTATCTTCATTGTCATGTAGGC-3' antisense) e IL-1 β (5'-ATGGCCCTAAACAGATGAAGTGC-3' sense; 5'-GAAGGGAAAGAAGGTGCTCAGG-3' antisense). O PCR em tempo real foi feito utilizando-se o kit comercial SYBR Green

Quantitative RT-PCR (Sigma-Aldrich) em equipamento ROTOR-GENE 6000 (QIAgen/Corbett Research, Mortlake, Austrália). As quantidades relativas dos RNAm foram calculadas usando-se o método comparativo C_T ("Cycle time") e 36b4 (5'- GCGACCTGGAAGTCCAACTAC-3' sense; 5'- ATCTGCTGCATCTGCTTGG-3' antisense) foi utilizada como controle.

4. ANÁLISE DOS RESULTADOS

Os resultados referentes aos conteúdos de ácido elágico, fenólicos totais, flavonóides e vitamina C foram analisados através da comparação das médias e desvios-padrões dos valores obtidos para as triplicatas de extração e duplicatas de injeção no CLAE de cada uma delas.

Para a análise estatística dos resultados, tanto dos experimentos *in vivo* como *in vitro*, foi utilizado o programa GraphPad Prism v.5.00.288 para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, E.U.A). A comparação das médias foi realizada por análise de variância (ANOVA) seguido pelo teste Newman-Keuls ($p < 0,05$).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Caracterização química do camu-camu

Um estudo recente avaliou a capacidade antioxidante de 10 frutas tropicais não tradicionais encontradas na flora brasileira, sendo cinco destas frutas da família Myrtaceae, incluindo o camu-camu. Os autores demonstraram que frutas nativas inexploradas do Brasil podem apresentar nutrientes capazes de prevenir doenças degenerativas e são de interesse para a agroindústria como possível fonte de renda para populações locais (RUFINO et al., 2010).

O camu-camu, em função do seu alto conteúdo de vitamina C, é um fruto com potencial econômico na forma de produto exportável para o mercado de produtos naturais. A região amazônica já é considerada grande produtora e exportadora de camu-camu, dada sua importância econômica, além de outras frutas típicas da região. A demanda mundial é atendida pelo Peru, que exportou 160 toneladas em 2004-2005 (BARDALES et al., 2008), onde incentivos do governo resultaram em aumento significativo na produção da fruta (RODRIGUES et al., 2001).

O consumo e comércio de camu-camu no Brasil ainda são restritos. A fruta é encontrada apenas em época de colheita, entre novembro e maio, e a polpa de fruta comercial congelada é produzida na região norte do país. Por esta razão, fruta e polpa comercial foram analisadas e comparadas em relação à composição química, e para a continuação dos estudos *in vivo* buscou-se um produto comercialmente disponível e homogêneo. A polpa comercial de camu-camu foi fornecida por um produtor da região amazônica (CUPUAMA®) e a fruta *in natura*, cultivada no Estado de São Paulo, foi adquirida no CEAGESP (**Figura 4**).

Figura 4. Polpa comercial de camu-camu (A) e fruta *in natura* (B).

A **Tabela 2** apresenta a composição centesimal tanto para fruta quanto para polpa comercial. Os teores de lipídios e fibras totais foram relativamente maiores para a fruta do que para a polpa comercial, já que a fruta foi analisada por inteiro, sem a separação da casca. A importância das fibras na saúde está bem estabelecida e relacionada a uma melhora das funções gastrointestinais como motilidade, síndrome do intestino irritável, doença de Crôhn, além de saciedade e efeitos prebióticos. É importante ressaltar que alguns compostos fenólicos podem estar associados à parede celular, principalmente os taninos, sendo estes liberados da matriz através da ação fisiológica de enzimas bacterianas presentes no cólon (SAURA-CALIXTO, 2011).

Tabela 2. Composição centesimal e teor de vitamina C da fruta e polpa comercial de camu-camu.

Composição %	Polpa comercial	Fruta
Umidade	92 ± 2 ^a	89 ± 1 ^a
Cinzas	0,19 ± 0,01 ^a	0,25 ± 0,05 ^b
Proteína	0,45 ± 0,01 ^a	0,53 ± 0,01 ^b
Lipídeos	0,66 ± 0,01 ^a	2,6 ± 0,1 ^b
Fibras		
Solúveis	0,43 ± 0,01 ^a	1,04 ± 0,06 ^b
Insolúveis	0,97 ± 0,02 ^a	2,05 ± 0,15 ^a
Carboidratos totais*	6,7 ± 0,8 ^a	7,6 ± 0,4 ^a
Vitamina C (mg/ 100 g b.s.)	1889 ± 68 ^a	2322 ± 59 ^b

*calculado por diferença; Resultados expressos como média ± desvio-padrão (triplicata). Médias das amostras com letras diferentes são significativamente diferentes (p < 0,05).

O conteúdo de vitamina C da fruta camu-camu foi maior do que o da polpa comercial. É importante ressaltar que o processamento de frutas para obtenção de polpas comerciais pode acarretar em degradação deste composto. Ainda assim, os teores de vitamina C relatados neste estudo são similares a outros estudos, que reportaram teores de ácido ascórbico em camu-camu, variando desde 1,4 g/100 g a 6,1g/100 g de fruta (MAEDA et al., 2007; YUYAMA et al., 2002).

No que se refere aos teores de elementos minerais da fruta e polpa comercial de camu-camu, poucas informações são disponíveis. As condições de crescimento como o tipo de solo, local de origem e as condições climáticas como abundância de chuva e sol, podem influenciar a composição mineral de frutas e vegetais. Neste trabalho, foram determinados os minerais N, P, K, Ca, Mg, S, B, Zn Fe, Mn, Cu, Na e Se nas amostras de fruta e polpa comercial (**Tabela 3**). Os minerais detectados em maior quantidade foram potássio na polpa comercial e nitrogênio na fruta. As diferenças encontradas nos teores de minerais podem estar relacionadas com a origem das amostras. Contudo, ambas apresentaram quantidades similares de fósforo, cálcio, magnésio e enxofre.

Com os resultados obtidos, foi possível calcular as contribuições percentuais dos minerais mais importantes da dieta nas amostras de camu-camu analisadas em relação à Ingestão Diária Recomendada (IDR) para um adulto (BRASIL, 2005). Para Na e K foram usados os valores de *Recommended Dietary Allowance* (RDA) de 500 e 2000 mg para Na e K, respectivamente (BERDANIER, 1998). As amostras foram classificadas de acordo com a definição da FDA (*Food and Drug Administration*) em “excelentes” ou “boas” fontes de nutrientes quando uma porção ingerida da fruta pode suprir pelo menos 20 e 10-20% da IDR, respectivamente (MILLER-IHLI, 1996).

Tabela 3. Teores de elementos minerais e valores de ingestão diária recomendada (IDR) de minerais (mg/dia ou µg/dia) para adultos e contribuição mineral para IDR (%) em relação a 100 g de amostra.

<i>Minerais (mg/100 g) b.u.</i>	Polpa comercial	IDR (%) em relação a uma porção de 100 g de amostra	Fruta	IDR (%) em relação a uma porção de 100 g de amostra	IDR
N	68,8	-	146,3	-	-
P	12	1,7	15,4	2,2	700 mg
K	151,2	7,6	123,2	6,1	2000 mg
Ca	4	0,4	5,5	0,5	1000 mg
Mg	7,2	2,7	8,8	3,4	260 mg
S	8,8	-	12,1	-	-
B	0,03	-	0,01	-	-
Zn	0,28	4	0,23	3,3	7 mg
Fe	0,71	5	0,47	3,3	14 mg
Mn	0,35	15,2	0,39	16,9	2,3 mg
Cu	0,11	12,2	0,09	10	900 µg
Na	0,70	0,14	0,01	0,002	500 mg
Se	< LQ	-	<LQ	-	34 µg

LQ – Limite de quantificação: Se – 0,002 mg/kg

De modo geral, as amostras de camu-camu mostraram baixas concentrações dos macrominerais Na e Ca. Dentre os macrominerais analisados, K foi o mais abundante tanto para polpa comercial quanto para fruta. Entretanto, nenhum macromineral foi suficiente para suprir o mínimo de 10% da IDR em 100 g de porção comestível.

Os micronutrientes Mn e Cu foram encontrados em maior teor tanto para polpa comercial quanto para fruta e as concentrações encontradas suprem mais de 10 % da IDR, sendo, portanto, essa uma boa fonte destes minerais. Os teores de B, Fe e Zn foram considerados baixos e não foi detectado Se em ambas as amostras.

Akter et al. (2011) compilaram dados sobre a composição centesimal de camu-camu de diferentes regiões. Apenas os teores de Fe, Zn e Cu foram semelhantes aos relatados neste trabalho, mostrando que os diferentes tipos de solo, época de colheita e condições geográficas podem alterar a composição química da fruta.

Os resultados da capacidade antioxidante das amostras de camu-camu estão expostos na **Tabela 4**. A polpa comercial de camu-camu apresentou maior capacidade antioxidante quando comparada com a fruta. Em trabalhos anteriores realizados em nosso laboratório, a fruta camu-camu já havia se destacado em relação a outras frutas também da família Myrtaceae e apresentou resultados semelhantes aos aqui obtidos (GONÇALVES et al., 2010; GENOVESE et al., 2008).

Chirinos et al. (2010) avaliaram a capacidade antioxidante do camu-camu peruano em 3 diferentes estágios de maturação. Os autores concluíram que o teor de fenólicos bem como a capacidade antioxidante aumentam com o amadurecimento. O camu-camu em estágio maduro apresentou valor de fenólicos totais duas vezes maior ao encontrados neste trabalho e valores de DPPH semelhantes.

Tabela 4. Capacidade antioxidante da polpa comercial de camu-camu e da fruta determinada através do método de capacidade redutora do Folin-Ciocalteu (mg equivalentes de catequina/g amostra b.s.), sequestro de radicais livres DPPH (µmoles equivalentes de trolox/g amostra b.s.), capacidade de absorção de radicais de oxigênio - ORAC (µmoles equivalentes de trolox/g amostra b.s.) e capacidade antioxidante por redução do ferro- FRAP (µmoles equivalentes de trolox/g de amostra b.s.).

	Polpa comercial	Fruta
FC	317 ± 12 ^a	199 ± 19 ^b
FT	249 ± 14 ^a	156 ± 8 ^b
DPPH	1679 ± 75 ^a	1159 ± 38 ^b
ORAC	1002 ± 27 ^a	811 ± 12 ^b
FRAP	69 ± 2 ^a	60 ± 5 ^a

FC = Capacidade redutora do Folin-Ciocalteu; FT = Teor de fenólicos totais. O teor de fenólicos totais foi determinado descontando a participação da vitamina C. Resultados expressos como média ± desvio-padrão (triplicata). Médias na mesma coluna com letras diferentes são significativamente diferentes (p<0,05).

O método de capacidade redutora do Folin-Ciocalteu não fornece valores exatos do teor de fenólicos, já que compostos com ação redutora, como o ácido ascórbico, são considerados interferentes (HUANG et al., 2005). Esse fato foi também observado em outro estudo realizado por GENOVESE et al. (2003), que verificaram que concentrações de ácido ascórbico acima de 5 µM em extratos vegetais interferem na quantificação de fenólicos totais. Por isso, através de uma curva padrão de ácido ascórbico foi possível estimar apenas a o teor de fenólicos (**FT**), desconsiderando a vitamina C (**FC**).

Frutas da família Myrtaceae também foram analisadas em relação ao conteúdo de compostos fenólicos através do método de Folin Ciocalteu e sua relação com a capacidade antioxidante. Além do camu-camu, outras seis frutas foram consideradas ricas em compostos fenólicos e apresentaram alta capacidade antioxidante (REYNERTSON et al., 2008).

Myoda et al. (2010) mostraram que a semente e a casca de camu-camu apresentaram teores de compostos fenólicos muito maiores do que os resíduos de acerola, abacaxi e algumas espécies de maracujá.

Ou et al. (2001) determinaram a capacidade antioxidante de 927 amostras de vegetais e correlacionaram os métodos de ORAC e FRAP. Em resumo, foi concluído que os resultados obtidos pelo método de ORAC são mais representativos, pois este método reflete o sequestro do radical peroxil pelas amostras analisadas. Em contraste, o método do FRAP estima apenas atividade redutora do Fe (III), o que não seria relevante em modelos fisiológicos.

Muitos estudos têm mostrado a capacidade antioxidante de compostos fenólicos *in vitro*, a qual já está bem estabelecida. Contudo, deve-se enfatizar que a eficiência de um composto antioxidante *in vivo* não deve ser estimada somente pela capacidade antioxidante plasmática. Espera-se que os efeitos dos compostos fenólicos *in vivo* sejam menores devido às baixas concentrações plasmáticas e a extensiva biotransformação (LOTITO; FREI, 2006).

As duas amostras de camu-camu também foram analisadas em relação aos teores de flavonóides e ácido elágico livre e total por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), e os resultados estão representados na **Tabela 5**.

Tabela 5. Composição e teor de flavonóides, ácido elágico livre e total (mg/100 g de amostra b.s.) e proantocianidinas (mg equivalente de procianidina B2/100 g de amostra b.s.) da polpa comercial e fruta camu-camu.

	Polpa comercial	Fruta
Ácido elágico livre	50 ± 9	25 ± 1
Ácido elágico total	737 ± 18	624 ± 14
<i>Flavonóis</i>		
Derivados de quercetina*	51 ± 3	10 ± 1
Rutina	37 ± 8	23 ± 2
<i>Antocianinas</i>		
Cianidina	n.d.	283 ± 13
<i>Proantocianidinas</i>	324 ± 6	1150 ± 30

n.d. não detectado. * outros que não a rutina

Os flavonóides são normalmente encontrados como derivados glicosilados. Neste estudo, os teores de ácido elágico e quercetina foram expressos em concentração equivalente à das

respectivas agliconas. Os flavonóides identificados foram derivados de quercetina incluindo a rutina. Apenas a fruta apresentou cianidina, presente na casca. O perfil de compostos fenólicos de ambas as amostras foi similar, contudo a polpa comercial de camu-camu apresentou teores maiores de ácido elágico e flavonóides (**Figura 5 e 6**).

Pinto et al. (2008) analisaram seis cultivares de morango consumidos no Brasil quanto ao teor de flavonóides e ácido elágico total. O ácido elágico está presente nas plantas juntamente com os elagitaninos (ETs). A polpa comercial de camu-camu apresentou teores de flavonóides e ácido elágico total duas vezes maiores do que os encontrados para o cultivar de morango Dover. A fruta camu-camu apresentou teores de flavonóides e ácido elágico total similares aos dos outros cultivares de morango. O ácido elágico total é determinado através da hidrólise ácida dos ETs, e quantificado por CLAE.

Com o intuito de determinar o teor de proantocianidinas (PACs), foi utilizado o método do DMAC, um método colorimétrico aparentemente mais sensível do que os comumente utilizados, desenvolvido por Prior et al. (2010). As possibilidades de interferências com componentes das amostras, como as antocianinas, também são menores, já que as leituras são feitas em 640 nm. A fruta camu-camu apresentou maior teor de PACs quando comparada com a polpa comercial. Isto se deve principalmente devido à grande quantidade de taninos presentes na casca. Wang et al. (2011) analisaram 6 tipos de frutas vermelhas, comumente consumidas na América do Norte, e reconhecidas pelo alto conteúdo de antocianinas. Os teores de PACs determinados para morango, *blueberry* e *cranberry* foram de 5 a 6 vezes maiores do que os valores encontrados para a fruta camu-camu. As uvas apresentaram teores 10 vezes maiores de proantocianidinas, já que a casca e a semente são ricas nestes compostos.

A

B

Figura 5. Perfil cromatográfico dos flavonóides da polpa comercial de camu-camu, detectados a 270 nm; (A) eluato de flavonóides neutros e (B) eluato de flavonóides ácidos e derivados de ácido elágico.

A

B

Figura 6. Perfil cromatográfico dos flavonóides da fruta camu-camu, detectados a 270 nm; (A) eluato de flavonóides neutros e derivados de ácido elágico (B) eluato de flavonóides ácidos e derivados de ácido elágico.

Tanto a fruta quanto a polpa comercial de camu-camu também foram caracterizadas em relação às PACs e os cromatogramas estão apresentados na **Figura 7**. Os perfis de PACs para as duas amostras foram similares, e foram identificados dímeros, trímeros, tetrâmeros, e grande quantidade de polímeros. Estes dados são relevantes, já que até dímeros são absorvidos.

As PACs são polímeros de flavan-3 óis e são mais abundantemente encontradas em vinho tinto, semente de cacau, sementes de uva e chá verde. Assim como os ETs, as PAC também não são absorvidas e sofrem metabolização pela microbiota intestinal. Por isso, são capazes de neutralizar oxidantes, se complexarem com proteínas e amido e formarem complexos menos digeríveis e ainda inibir a atividade da lipase gastrointestinal (SERRANO et al., 2009).

Serra et al. (2009) analisaram, por espectrometria de massa, plasma de ratos obtidos duas horas após a ingestão de 1 g/kg procianidina de semente. Os principais metabólitos detectados foram catequina e epicatequina glicuronídeo, catequina e epicatequina metilglicuronídeo e catequina e epicatequina metilsulfato, todos em níveis de micromolar.

Os estudos epidemiológicos mostram que alimentos ricos em PACs apresentam efeitos benéficos contra doenças cardiovasculares. Estudos *in vivo* e *in vitro* demonstraram que a absorção intestinal de lipídeos, secreção de quilomícrons pelo intestino e secreção de VLDL no fígado são reprimidos pela ação das PACs, levando à redução da hiperlipidemia (QUESADA et al., 2011; BLADÉ et al., 2010, SCHROETER et al., 2006).

A

B

Figura 7. Perfil cromatográfico das proantocianidinas da fruta (A) e polpa comercial de camu-camu (B), detectados a 276 nm de excitação e 316 nm de emissão.

A detecção de derivados de ácido elágico na fruta e polpa comercial de camu-camu indicou a presença de ETs nas amostras. Isto foi confirmado através de hidrólise ácida das amostras, resultando em aumento dos teores de ácido elágico livre, este quantificado como ácido elágico total. Até então, não há relatos sobre a identificação de ETs em camu-camu. Por isso, na tentativa de elucidar estruturalmente os ETs, a determinação destes compostos foi realizada a 260 nm por CLAE associada à espectrometria de massas e os cromatogramas estão apresentados em seguida (**Figura 8**). O extrato de camu-camu, extraído com acetona aquosa 80%, foi purificado em coluna Sephadex® LH-20. A **Tabela 6** apresenta o perfil de ETs encontrados na fruta e polpa comercial de camu-camu.

Tabela 6. Identificação dos elagitaninos encontrados na fruta e polpa comercial de camu-camu.

Fruta			
Pico	TR	Íons característicos (MS)	Composto
1	4,05	1401; 1065; 934; 532; 466	Elagitanino desconhecido
2	4,38	783	Ácido hidroxidifênico glicose /Sanguína H-10/ pedunculagina
3	4,77	1401; 1245; 980; 933 ; 539; 466	Lambertianina C
4	5,26	1086; 915; 542 ; 457	Elagitanino desconhecido
x'	5,30	1069; 783 ; 610; 479; 391	Composto desconhecido
5	6,08	935 ; 691; 511; 493; 467; 447; 335	Casuarictina
6	7,25	1235; 935 ; 469	Sanguina H-6
7	8,12	603; 449; 301	Derivado de ácido elágico
8	8,21	899; 449	Derivado de ácido elágico
9	8,90	433	Ácido elágico pentose
Polpa comercial			
Pico	TR	Íons característicos (MS)	Composto
x	2,86	969; 619; 339	Composto desconhecido
1	4,05	1401; 1065; 934; 532; 466	Elagitanino desconhecido
2	4,39	783	Ácido hidroxidifênico glicose /Sanguína H-10/ pedunculagina
3	4,77	1401; 1245; 980; 933 ; 539; 466	Lambertianina C
4	5,26	1086; 915; 542 ; 457	Elagitanino desconhecido
x'	5,30	1069; 783 ; 610; 479; 391	Composto desconhecido
y	5,39	1205; 835; 417	Composto desconhecido
5	6,04	935 ; 691; 511; 493; 467; 447; 335	Casuarictina
6	7,24	1235; 935 ; 469	Sanguina H-6
w	7,47	960; 479	Composto desconhecido
z	7,71	896; 447	Composto desconhecido
7	8,12	603; 449; 301	Derivado de ácido elágico
8	8,21	899; 449	Derivado de ácido elágico
9	8,89	433	Ácido elágico pentose
10	11,28	781; 735; 301	Ácido hexahidroxidifênico digalactoglicose

TR, tempo de retenção; MS – espectro de massas. Massas em negrito representam o íon mais abundante

Uma vez que os padrões destes compostos ainda não estão disponíveis comercialmente, os ETs foram tentativamente elucidados através da comparação entre massas já identificadas para frutas como morango, uva, framboesa, romã e *blueberry*, fontes conhecidas de ETs.

Pode-se observar que a fruta e polpa comercial de camu-camu apresentaram perfil de elagitaninos muito semelhantes, com exceção de alguns compostos desconhecidos presentes na polpa comercial. O pico 1 (TR: 4,05; [M-H]⁻ 466) apresentou massa similar ao descrito previamente por Hanhineva et al. (2008) como elagitanino desconhecido, presente em flor de morango. O pico 2 (TR: 4,38; [M-H]⁻ 783) não foi totalmente esclarecido por falta de dados nas análises, já que a massa obtida pode ser tentativamente identificada como isômero de sanguina H-10 (GASPEROTTI et al., 2010), isômero de pedunculagina e isômeros de ácido hexahidroxidifênico glicose (HAGER et al., 2008). O pico 3 (TR: 4,77; [M-H]⁻ 933) foi tentativamente identificado como lambertianina C, já identificado em amoras por Gasperotti et al.(2010) e Hager et al.(2008). O pico 4 (TR: 5,26; [M-H]⁻ 542) apresentou massa similar ao descrito previamente por Hanhineva et al. (2008) como elagitanino desconhecido, presente em flores de morango. O pico 5 (TR: 6,04; [M-H]⁻ 935) foi tentativamente identificado como casuarictina, já identificado por Hanhineva et al. (2008) em flores de morango e por Kähkönen et al. (2012), em *cloudberry*, uma fruta da família Rubus. O pico 6 (TR: 7,25; [M-H]⁻ 935) foi tentativamente identificado como sanguina H-6, assim como descrito por Hager et al.(2008), em amostras de amora. Os picos 7 e 8 (TR: 8,12 e 8,21; [M-H]⁻ 301 e 449) foram tentativamente identificados como derivados de ácido elágico (HANHINEVA et al., 2008; AABY et al., 2012). O pico 9 foi tentativamente identificado como ácido elágico pentose, assim como identificado em suco de romã (FISCHER et al., 2011) e uva (SANDHU; GU, 2010). Os picos x, x', y, z e w não puderam ser identificados, já que ainda não foram descritos compostos com as massas observadas.

Os ETs são polifenóis abundantes e foram reportados principalmente em frutas da família Rosaceae como morangos, *cranberry*, *blueberry* e amora silvestres, além de nozes e amêndoas e algumas sementes (KÄHKÖNEN et al., 2001). Kähkönen et al. (2012) reportaram que elagitaninos de frutas da família Rubus, incluindo sanguina H-6, sanguina H-10 e lambertianina C também apresentaram atividade como sequestrante de radicais e como antioxidantes na oxidação lipídica em emulsões.

A hidrólise dos ETs com ácido ou base gera o ácido hexahidroxidifênico (HHDP), o qual espontaneamente se lactoniza a ácido elágico (DANIEL et al., 1989). Os ETs e o ácido elágico são metabolizados pela microbiota intestinal de diferentes mamíferos, incluindo ratos, porcos e humanos. Em todos estes organismos, tanto o ácido elágico quanto os ETs produzem dibenzopiranoas conhecidas como urolitina A (3,8-dihidroxi-6H-dibenzopiran-6-ona) e seu

análogo monohidroxilado conhecido como urolitina B (3-hidroxi-6H-dibenzopirano-6-ona) (CERDÁ et al., 2005).

Figura 8. Perfil cromatográfico de elagitaninos da polpa comercial (A) e fruta camu-camu (B), detectados a 260 nm.

Glicuronídeos e metil glicuronídeos de ácido elágico e particularmente derivados de urolitinas A e C foram detectados na bile, confirmando a participação da circulação enterohepática no processo de metabolização. As urolitinas A, B e ácido elágico dimetilglicuronídeo também foram detectados em plasma (ESPÍN et al., 2007).

Gonzáles-Sarriás et al. (2010) encontraram recentemente que as urolitinas alcançam a próstata após consumo de alimentos ricos em ETs. O principal metabólito detectado foi a urolitina A glicuronídeo (até 2 ng/g de tecido), além de traços de urolitina B glicuronídeo e ácido elágico metiléter.

Embora a presença de ETs e ácido elágico na circulação sanguínea seja quase inexistente, as urolitinas podem alcançar concentrações em nível de micromolar. Tecidos de camundongos tratados com elagitaninos revelaram que os principais locais de deposição tecidual das urolitinas são próstata, intestino e cólon (SEERAM et al., 2007).

Em relação à atividade biológica, as urolitinas se mostraram com menor poder antioxidante quando comparadas com os ETs. Contudo, em estudos com células cancerígenas, as urolitinas foram capazes de inibir a proliferação celular e modular processos celulares importantes associados ao desenvolvimento de câncer como a sinalização MAPK *in vitro* (GONZÁLEZ-SARRÍAS et al., 2009; LARROSA et al., 2006).

Em resumo, fruta e polpa comercial de camu-camu se mostraram fontes de flavonóides, proantocianidinas e elagitaninos, compostos com atividade biológica já conhecida. A polpa comercial congelada de camu-camu, por apresentar capacidade antioxidante maior do que a da fruta e alto teor de vitamina C e ser uma excelente fonte de flavonóides e de ácido elágico e seus derivados, foi selecionada para dar continuidade em nossos estudos sobre o status antioxidante *in vivo* e em ensaios *in vitro*. Além disso, por ser proveniente diretamente da região amazônica a polpa de fruta já está disponível comercialmente. As doses utilizadas neste estudo foram baseadas na quantidade de vitamina C e compostos fenólicos ingeridos por uma pessoa de 70 kg ao tomar um copo de suco de camu-camu. A **Figura 9** mostra a quantidade de compostos fenólicos e vitamina C presentes nas doses de 1 g/Kg e 3 g/Kg de peso corpóreo.

Figura 9. Teor de compostos fenólicos e vitamina C presentes nas duas doses utilizadas nos estudos *in vivo*.

5.2 Atividade biológica do camu-camu

5.2.1 Efeito do camu-camu em modelo animal de diabetes induzido pela estreptozotocina

O uso de agentes químicos para induzir o diabetes permite realizar estudos detalhados de eventos bioquímicos e morfológicos que ocorrem durante a manifestação da doença. Estes agentes químicos são substâncias com citotoxicidade específica, que destroem as células beta-pancreáticas causando a deficiência primária de insulina; outras substâncias podem ainda atuar sobre as células beta-pancreáticas sem destruí-las (RERUP, 1970).

Os dois agentes mais utilizados são aloxano e estreptozotocina. Ambos são considerados diabetogênicos e específicos para as células beta-pancreáticas, embora apresentem diferentes vias de ação (LENZEN, 2008).

A estreptozotocina é um agente antimicrobiano e também usado como quimioterápico alquilante. Ela é transportada para dentro da célula beta-pancreática através do GLUT2, um transportador de glicose presente na membrana celular, levando à morte da célula por fragmentação do DNA. Além disso, existe um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio, resultando em dano tecidual e peroxidação lipídica (SZKUDELSKI, 2001).

Neste estudo, foi utilizada uma única dose de estreptozotocina (45 mg/Kg) para indução do diabetes e posteriormente os animais foram tratados com os extratos de camu-camu para verificar possíveis efeitos protetores sobre alterações fisiológicas causadas pelo diabetes.

Foram administrados a ratos machos Wistar, por um período de 30 dias, 1 e 3 g/kg/dia de extrato correspondente a polpa comercial de camu-camu liofilizada, cujas doses forneceram a cada animal, com peso médio de 250 gramas, 2,19 mg e 6,57 mg, respectivamente, de compostos fenólicos por dia. A média diária de ingestão de polifenóis na dieta humana pode variar de 1,4 mg a 28,5 mg/kg (CLIFFORD, 2004; ARABBI et al., 2004). As doses aqui utilizadas (8,7 e 26,2 mg de fenólicos/kg/dia) estariam, portanto, nessa faixa. Além disso, as doses forneciam 4,72 mg e 14,17 mg de vitamina C por dia, respectivamente. Em relação à vitamina C, já foi constatado que o organismo humano saudável é capaz de absorver entre 60 e 100 mg/dia e o excesso é excretado através da urina (PADAYATTY et al., 2003).

A **Figura 10** mostra o efeito da administração das duas doses de extratos de camu-camu sobre o peso corpóreo, consumo diário de água e ração durante 30 dias de tratamento. O diabetes acarreta em drásticas mudanças no peso corpóreo possivelmente devido a uma degradação excessiva de proteínas estruturais e hidrólise de triacilgliceróis causados pela falta de insulina (SEKAR et al., 2005; AL-SHAMANOY et al., 1994). Os extratos de camu-camu foram

eficientes em reduzir significativamente o consumo de água e ração dos grupos tratados, sendo estes mais proeminentes na dose de 3 g/kg de peso corpóreo, quando comparados com o grupo diabético.

Não houve diferença significativa no ganho de peso entre os animais diabéticos e tratados com camu-camu. O extrato de camu-camu não foi capaz de reduzir a glicemia plasmática nos animais diabéticos (**Figura 10 C-D**).

Figura 10. Efeito dos extratos de camu-camu sobre consumo diário de água (A), ração (B), glicemia (C) e o peso corpóreo (D). Os valores são expressos como média $\pm$ desvio-padrão (n=10/grupo). Colunas com letras distintas diferem estatisticamente (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$). Grupos Controle, D (diabéticos), E I (1 g/kg peso corpóreo) e E II (3 g/kg peso corpóreo).

Outras características notáveis do diabetes são poliúria, compreendida como aumento do volume urinário eliminado por dia, gerada devido ao excesso de glicose circulante e consequente diurese osmótica; polidipsia, compreendida como aumento da atividade do centro da sede devido à hiperosmolaridade extracelular; e polifagia, à hiperativação dos centros da fome e ausência da ação da insulina sobre os centros da saciedade (GUYNTON; HALL, 2006).

Os modelos animais de diabetes são caracterizados pelo alto estresse oxidativo e hiperglicemia crônica e persistente, o qual acarreta em dano no sistema antioxidante de defesa promovendo a geração de radicais livres (LENZEN, 2008). A **Figura 11** mostra o efeito dos extratos de camu-camu sobre a glicose plasmática, a insulina plasmática, a glicosúria e teste de tolerância à insulina.

Figura 11. Efeito dos extratos de camu-camu sobre glicose plasmática (A), insulina plasmática (B), glicosúria (C) e teste de tolerância à insulina (1,5 U/kg, i.p.) (D). Os valores são expressos como média $\pm$ desvio-padrão (n=10/grupo). Colunas com letras distintas diferem estatisticamente (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$). Grupos Controle, D (diabéticos), E I (1 g/kg peso corpóreo) e E II (3 g/kg peso corpóreo).

Os níveis diários de glicemia, obtidos durante o tratamento, não apresentaram diferenças significativas, já que a mesma foi dosada com os animais alimentados; contudo, a glicose plasmática, determinada em jejum após a eutanásia dos animais, foi significativamente diferente para o grupo tratado com a dose de 3 g/kg (**Figura 11A**). Os níveis de insulina plasmática e glicosúria também não apresentaram diferenças significativas (**Figura 11 B-C**). No 20º dia de tratamento foi conduzido o teste de tolerância à insulina. Alíquotas de 30 µL de sangue foram obtidas da cauda do animal, a cada 15 minutos, durante 90 minutos. A curva glicêmica obtida mostra que os níveis de glicose dos grupos tratados não foram significativamente diferentes quando comparados ao grupo diabético (**Figura 11 D**).

A indução do diabetes pela estreptozotocina causou alteração no perfil lipídico dos animais (LENZEN, 2008). Com isso, neste experimento, foram realizadas dosagens de colesterol total, colesterol-HDL, triacilgliceróis (TAGs) e ainda teste de tolerância oral ao triacilglicerol (tTT), apresentados na **Figura 12**.

Figura 12. Efeito dos extratos de camu-camu sobre colesterol total (A), triacilgliceróis (B), colesterol HDL (C) e teste de tolerância oral ao triacilglicerol (D). Os valores são expressos como média $\pm$ desvio-padrão (n=10/grupo). Colunas com letras distintas diferem estatisticamente (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$). Grupos Controle, D (diabéticos), E I (1 g/kg peso corpóreo) e E II (3 g/kg peso corpóreo).

Altos níveis de colesterol e TAGs indicam desregulação do metabolismo de lipídios e, consequentemente, aumento da incidência de disfunção cardíaca (ECKEL, 2008). Os TAGs não são sintetizados apenas a partir de esterificação de glicerídeos, mas também pela transformação de substâncias que estão em excesso em nosso organismo, como a glicose circulante, que de forma fisiológica é transformada em reserva energética no tecido adiposo, indicando uma possível relação entre o diabetes e o aumento dos níveis de TAG (SALTIEL; KAHN, 2001).

Os níveis de colesterol total e TAGs estavam significativamente mais elevados no grupo diabético. Entretanto, pode-se observar que houve uma redução significativa tanto do colesterol total quanto de TAGs nos grupos tratados com as duas doses de extrato de camu-camu. Os compostos presentes no camu-camu também foram capazes de impedir um aumento no TAGs plasmáticos 4 horas após a administração oral de lipídeos (**Figura 12D**). Já foi descrito que os principais polifenóis presentes em chás e cacau, como catequinas e procianidinas, são capazes de inibir a atividade da enzima lipase, responsável pela degradação de gorduras no intestino, e reduzir a absorção de lipídeos. A redução dos níveis de lipídeos plasmáticos é considerada um dos principais efeitos biológicos das procianidinas (IKARASHI et al., 2011; BLADÉ et al., 2010).

Quesada et al. (2011) também mostraram que a ingestão oral de procianidinas presentes nas sementes de uva reduziu significativamente o aumento dos níveis de TAG plasmático após o teste de tolerância oral aos lipídios. Eles concluíram que um dos mecanismos pelo qual os extratos contendo procianidinas bloqueiam a secreção hepática de VLDL-TAG seria devido à indisponibilidade de ácidos graxos na síntese hepática de TAG, ou seja, há um aumento da oxidação de ácidos graxos logo após a administração e redução dos níveis plasmáticos de ácidos graxos não-esterificados (NEFA) algum tempo depois.

Outros estudos também relataram redução dos níveis de colesterol e TAG em ratos diabéticos com uso de flavonóides, e sugeriram que estes compostos são capazes de inibir a 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A redutase (HMGCoA redutase), enzima responsável pelo controle da velocidade de síntese do colesterol (FERNANDES et al., 2010; BOK et al., 1999). Chao et al. (2009) mostraram que ratos diabéticos tratados com ácido elágico também apresentaram redução nos níveis de TAG plasmáticos.

Na **Figura 12C** também se encontram os valores de colesterol-HDL. O colesterol-HDL representa a fração de colesterol que circula na corrente sanguínea ligada às lipoproteínas plasmáticas de alta densidade (HDL- High Density Lipoprotein). Valores elevados de colesterol HDL estão diretamente relacionados com a redução do risco de doenças cardiovasculares (NAVAB et al., 2011). As lipoproteínas de alta densidade (HDL) são responsáveis pelo

transporte do colesterol em excesso da corrente sanguínea para o fígado, onde é catabolizado. Observou-se um aumento significativo nos níveis de colesterol HDL dos grupos tratados com os extratos de camu-camu em relação ao grupo diabético.

A **Figura 13** mostra o efeito dos extratos de camu-camu sobre o peso do fígado e tecidos adiposos. Nos mamíferos, existem dois tipos de tecido adiposo: o branco (TAB) e o marrom (TAM). As células do tecido adiposo branco armazenam TAGs em uma única e grande gota lipídica que ocupa de 85-90% do citoplasma. O TAM é especializado na produção de calor (termogênese) e, portanto, participa ativamente na regulação da temperatura corporal. Os depósitos de TAM estão praticamente ausentes em humanos adultos, mas são encontrados em fetos e recém-nascidos (FONSECA-ALANIZ et al., 2006).

O peso do fígado dos animais tratados não foi significativamente diferente quando comparados ao grupo diabético, mostrado na **Figura 13**. O índice de adiposidade, representado pela soma dos tecidos adiposos retroperitoneal, epididimal e inguinal, também não demonstrou diferenças.

Figura 13. Efeito dos extratos de camu-camu sobre peso do fígado (A), tecido adiposo marrom (B) e tecido adiposo branco (C). Os valores são expressos como média $\pm$ desvio-padrão (n=10/grupo). Colunas com letras distintas diferem estatisticamente (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$). Grupos Controle, D (diabéticos), E I (1 g/kg peso corpóreo) e E II (3 g/kg peso corpóreo).

A insulina promove o transporte da glicose em excesso para as células adiposas, estimulando o armazenamento de gordura no tecido adiposo. Na ausência de insulina ou em situações onde sua ação está comprometida, ocorre um aumento na lipólise do tecido adiposo, resultando em altos níveis de ácidos graxos livres (DEFRONZO; FERRANNINI, 1991; JENSEN et al., 1989). Os baixos níveis de insulina, apresentados na **Figura 11**, podem explicar a redução da adiposidade e não-reversão do quadro mesmo com o uso dos extratos de camu-camu.

O teste de hemoglobina glicada permite identificar a concentração média de glicose plasmática nos segundo e terceiro meses que antecedem o teste, complementando as medições mais tradicionais de controle glicêmico como medição da glicose em plasma ou urina. Devido à permeabilidade à glicose, a hemoglobina glicada é formada a uma velocidade dependente e proporcional à concentração da glicose no plasma (KENNEDY; BAYNES, 1984). A **Figura 14** mostra os resultados de hemoglobina glicada para os grupos avaliados. Não foi observada diferença significativa entre os grupos diabético e tratados. Isto pode indicar que o tempo de tratamento não foi suficiente para uma redução efetiva da glicose plasmática.

Figura 14. Efeito dos extratos de camu-camu sobre hemoglobina glicada (A), ácido úrico (B), capacidade antioxidante plasmática - ORAC (C) e peroxidação lipídica - TBARS (D). Os valores são expressos como média $\pm$ desvio-padrão (n=10/grupo). Colunas com letras distintas diferem estatisticamente (* p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001). Grupos Controle, D (diabéticos), E I (1 g/kg peso corpóreo) e E II (3 g/kg peso corpóreo).

Outro parâmetro avaliado foi o ácido úrico no plasma. O ácido úrico é um produto do metabolismo das purinas e sua forma ionizada, o urato monossódico, é a forma encontrada no plasma. Sabe-se que a ausência ou pouca quantidade de insulina leva à desregulação do metabolismo de proteínas/aminoácidos, atribuída a um aumento de proteólise muscular e redução na síntese de proteínas (ABDUL-GHANI; DEFRONZO, 2010). Na **Figura 14** encontram-se os valores de ácido úrico determinados neste experimento. O grupo diabético apresentou nível significativamente maior quando comparados com os grupos tratados. Observou-se que os níveis de ácido úrico dos grupos E I e E II foram semelhantes ao encontrado para o grupo controle, indicando um possível efeito dos extratos de camu-camu no tratamento destes animais.

A capacidade antioxidante do plasma também foi avaliada, indicada na **Figura 14C**. Devido ao estresse oxidativo gerado pelo diabetes, é possível observar uma redução da capacidade antioxidante plasmática do grupo diabético, sendo este efeito revertido com a administração dos extratos de camu-camu, cuja dose de 3g/kg se mostrou mais eficiente.

A produção de radicais livres induz a peroxidação lipídica através da deterioração oxidativa de ácidos graxos poliinsaturados, e pode ser minimizada enzimaticamente ou por antioxidantes. Já foi relatado que elevados níveis de lipoperóxidos em plasma de ratos diabéticos podem acarretar em dano tecidual (FERRALI et al., 1997). A peroxidação lipídica foi avaliada através do método de TBARS, indicada na **Figura 14D**. Os níveis de TBARS no grupo diabético estavam significativamente mais elevados. A administração oral dos extratos de camu-camu reduziu a peroxidação lipídica a níveis próximos aos do controle, o que pode indicar uma melhora do status antioxidante.

Em alguns processos patológicos, como o diabetes, os antioxidantes exógenos podem ser rapidamente depletados em função da alta produção de espécies reativas de oxigênio. Muitos estudos evidenciam a influência do consumo de compostos fenólicos sobre a atividade e expressão gênica das enzimas antioxidantes, CAT, SOD e GPX, consideradas as principais defesas antioxidantes endógenas (ANNAPURNA et al., 2009; FERNÁNDEZ-PACHÓN et al., 2009; PEREZ-JIMENEZ et al., 2009). A hiperglicemia decorrente do diabetes mellitus pode levar à inativação das enzimas antioxidantes SOD, CAT e GPx, pela glicação destas proteínas (BAGRI et al., 2009; SEKEROGLU et al. 2000). Neste trabalho, foi avaliada a atividade das enzimas antioxidantes CAT, SOD e GPx em plasma e em eritrócitos, descrita na **Figura 15**. Não foi possível avaliar a atividade de CAT em plasma. Contudo, em relação à atividade das outras enzimas, observou-se que não houve diferença entre todos os grupos para GPx e houve aumento

da atividade de SOD dos grupos diabéticos, mas também sem apresentar diferenças significativas quando comparados entre si.

Figura 15. Efeito dos extratos de camu-camu sobre a atividade das enzimas antioxidantes em plasma GPx (A) e SOD (B), e em eritrócitos, CAT (C), GPx (D) e SOD (E). Os valores são expressos como média $\pm$ desvio-padrão (n=10/grupo). Colunas com letras distintas diferem estatisticamente (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$). Grupos Controle, D (diabéticos), E I (1 g/kg peso corpóreo) e E II (3 g/kg peso corpóreo).

A atividade tanto de CAT quanto de SOD foi significativamente maior nos grupos diabéticos, indicando uma possível resposta metabólica, através destas enzimas, em diminuir os níveis de radicais livres em excesso. A diminuição da atividade de CAT e SOD nos grupos tratados E I e E II sugere que os antioxidantes presentes nos extratos de camu-camu seriam suficientes para causar redução do estresse oxidativo, fato também comprovado pelo aumento da capacidade antioxidante do plasma. Pelo fato de alguns flavonóides reduzirem a formação de superóxidos e dado ao mecanismo de “*feedback*” das enzimas antioxidantes desencadeado pelos flavonóides, a diminuição da concentração de substrato pode contribuir na redução da expressão de SOD (CRESPO et al., 2008; BREINHOLT et al., 1999).

Neste modelo de diabetes apenas o extrato bruto, contendo flavonóides, taninos, vitaminas e minerais, foi utilizado no tratamento. As principais alterações observadas foram no perfil lipídico e capacidade antioxidante plasmática dos animais tratados. Não se pode afirmar

quais compostos foram responsáveis pela redução dos níveis de TAG e colesterol plasmáticos. Entretanto, como foram identificados taninos condensados na polpa comercial, os resultados obtidos sugerem que grande parte deste efeito pode ser atribuído as proantocianidinas como já reportado por outros autores (IKARASHI et al., 2011; BLADÉ et al., 2010). O aumento da capacidade antioxidante plasmática e a redução da peroxidação lipídica estão diretamente associados aos compostos antioxidantes presentes no camu-camu, como a vitamina C.

5.2.2 Efeito do camu-camu em modelo animal de caquexia

O Tumor de Walker surgiu em 1928 em uma rata albina grávida no Laboratório de G. Walker (John Hopkins University Medical School – U.S.A.) e graças às suas características de transplantabilidade, bem como às técnicas de criopreservação e de cultura de tecidos esta linhagem foi preservada até a atualidade, sendo descritas variantes morfológicas como sarcoma, carcinosarcoma e carcinoma designadas genericamente como Tumor de Walker (HARD, 1986). O Tumor de Walker 256 tem comportamento biológico agressivo, sendo localmente invasivo e com alto poder de metástase por via linfática e hematogênica. Sua implantação em ratos tem sido considerada um modelo adequado para estudar a síndrome da caquexia e tratamentos antineoplásicos, por ser espécie-específica e facilmente transplantado (MUND, 2004; GUAITANI et al. 1982). Em curto espaço de tempo após sua implantação verificam-se redução no peso do animal, dificuldade de ingestão adequada de alimento (anorexia), catabolismo de proteínas, lipídeos e carboidratos e inflamação (ARGILÉS et al., 2008; ARGILÉS et al., 1997). Aos 14 dias após o implante a massa tumoral pode representar uma fração considerável do peso do animal e a morte ocorre após este período (VICENTINO et al., 2002). Devido aos resultados positivos obtidos no perfil lipídico de ratos diabéticos, os extratos de camu-camu foram usados no modelo animal de caquexia, onde as alterações no perfil lipídico eram proeminentes.

Alguns estudos já mostram efeitos relevantes da administração de compostos antioxidantes presentes na dieta, como a vitamina C e os flavonóides do mel, sob a migração e inibição do crescimento celular do Tumor de Walker (TOMASIN; GOMES-MARCONDES, 2011; WYBIERALSKA et al., 2008). Estes trabalhos reportaram que tanto a metástase quanto a migração celular estavam diretamente relacionadas com os níveis de EROs, e por isso, compostos antioxidantes foram mais eficientes em reduzir os níveis destas espécies radiculares, levando a inibição da motilidade celular (TOMASIN; GOMES-MARCONDES, 2011; WYBIERALSKA et al., 2008).

Foram administradas aos animais, por um período de 44 dias, doses de 1 e 3 g/kg/dia de extrato correspondente a polpa comercial de camu-camu liofilizada, fornecendo a um rato macho Wistar adulto, com peso médio de 250 gramas, 2,19 mg e 6,57 mg, respectivamente, de compostos fenólicos por dia, além de 4,72 mg e 14,17 mg, respectivamente, de vitamina C por dia. Neste experimento, com o objetivo de comprovar se os efeitos observados são devido apenas aos compostos fenólicos, incluiu-se um grupo de animais que recebeu a dose equivalente a 3 g/kg/dia de extrato purificado de camu-camu, contendo apenas 26,2 mg de compostos fenólicos/kg.

Após um mês de experimento, os animais foram inoculados com células de carcinossarcoma Walker 256 e, após duas semanas, foram sacrificados. Os resultados da **Tabela 7** mostram que não houve diferença de ganho de peso durante o período experimental entre os ratos que receberam os extratos de camu-camu e o grupo controle. A administração oral destes extratos não apresentou efeito no peso relativo do fígado e depósitos de tecidos adiposos brancos (epididimal e retroperitoneal) nos grupos tratados em relação aos animais controle. É importante ressaltar que os grupos E I e E II apresentaram redução do peso do tumor quando comparados ao controle (92 a 94,5 %, respectivamente), e o grupo EP apresentou apenas 1 rato com desenvolvimento de tumor.

Tabela 7. Ganho de peso corpóreo durante o período experimental e peso relativo dos tecidos (% de peso corpóreo total) após sacrifício.

	Controle	E I	E II	EP
Ganho de peso (g)	104,00 ± 3,09	109,00 ± 3,13	110,00 ± 3,55	98,00 ± 2,43
Fígado (%)	4,54 ± 0,33	4,09 ± 0,33	3,93 ± 0,34	3,90 ± 0,22
TAE (%)	1,19 ± 0,08	1,15 ± 0,13	1,11 ± 0,10	0,99 ± 0,35
TARP (%)	1,25 ± 0,12	1,08 ± 0,16	1,26 ± 0,12	0,79 ± 0,09
<i>Gastrocnemius</i> (%)	0,36 ± 0,02	0,27 ± 0,02*	0,29 ± 0,01	0,29 ± 0,01
Tumour (%)	3,11 ± 0,91	0,25 ± 0,16*	0,17 ± 0,08*	n.d.

Os valores são expressos como média ± desvio-padrão (n=9/grupo). Grupos Controle, E I (1 g/kg peso corpóreo), E II (3 g/kg peso corpóreo) e EP (extrato purificado 3g/kg de peso corpóreo). * p < 0,05.

Hipertrigliceridemia é um ponto chave na caquexia cancerosa (ARGILÉS et al., 1997) e pode ser consequência da desregulação de diferentes vias metabólicas no fígado, como por exemplo, uma diminuição da oxidação do ácido graxo (KAZANTZIS; SEELAENDER, 2005; SILVÉRIO et al., 2011) e dano na formação e secreção de lipoproteína de densidade muito baixa (VLDL) (LIRA et al., 2008). Os extratos de camu-camu foram capazes de reduzir alterações no metabolismo lipídico encontradas nos ratos do grupo controle (**Tabela 8**). Os resultados mostram

um aumento dos níveis de TAG plasmáticos dos ratos caquéticos, já descrito na literatura (SILVÉRIO et al., 2011; LIRA et al., 2008).

Os animais dos grupos E I, E II e EP apresentaram uma redução significativa nos níveis de TAG em 27%, 39% e 53%, respectivamente, quando comparados ao grupo controle. Os grupos E I e E II também apresentaram redução dos níveis de colesterol plasmático. Além disso, o grupo EP também mostrou melhora no colesterol HDL (aumento de 25%) quando comparado ao controle. Não houve alterações nos níveis de colesterol LDL, glicose e insulina plasmáticas. Assim como observado no modelo de ratos diabéticos, os extratos de camu-camu não apresentaram efeitos sobre o colesterol LDL e HDL, mas foram eficazes em reduzir o colesterol total e TAG, confirmando, assim, o potencial destes fenólicos sob o metabolismo lipídico.

Tabela 8. Perfil lipídico, glicose e insulina plasmáticos determinados após o período experimental.

	Controle	E I	E II	EP
Triacilglicerol (mg/dL)	126,2 ± 18,1	92,1 ± 14,4	76,9 ± 14,7	58,1 ± 5,4*
Colesterol total (mg/dL)	145,4 ± 11,6	108,9 ± 5,9*	106,3 ± 4,8*	138,0 ± 11,8
Colesterol HDL (mg/dL)	24,2 ± 4,4	22,1 ± 3,4	26,7 ± 2,5	30,3 ± 3,0
Colesterol LDL (mg/dL)	151,5 ± 14,7	161,5 ± 13,0	155,3 ± 15,2	158,7 ± 14,5
Glicose (mg/dL)	130,1 ± 5,6	121,7 ± 6,6	120,3 ± 8,1	115,1 ± 6,5
Insulina (ng/mL)	0,41 ± 0,19	0,92 ± 0,30	0,92 ± 0,20	0,76 ± 0,25

Os valores são expressos como média ± desvio-padrão (n=9/grupo). Grupos Controle, E I (1 g/kg peso corpóreo), E II (3 g/kg peso corpóreo) e EP (extrato purificado 3g/kg de peso corpóreo). * p < 0,05.

Dentre os compostos fenólicos presentes no camu-camu, estão ácido elágico e quercetina. Alguns estudos têm mostrado que a quercetina é capaz de modular lipidemia, além de apresentar alta capacidade antioxidante (KOBORI et al., 2010; GNONI et al., 2009). Kobori et al. (2010) recentemente demonstraram que ratos alimentados com dieta ocidental e ingestão crônica de quercetina reduziram o acúmulo de gordura no fígado. Outro estudo mostrou que a administração do ácido elágico em combinação com a coenzima Q 10 em ratos hiperlipidêmicos foi eficiente em reduzir os níveis de TAG e colesterol (RATNAM et al., 2009). Pelos resultados obtidos neste trabalho estes compostos podem ser responsáveis, pelo menos em parte, pela hipolipidemia apresentada nos animais tratados.

Os grupos tratados com os extratos de camu-camu também apresentaram aumento da capacidade antioxidante do plasma em relação ao controle (**Figura 16**). Uma hipótese sugerida

seria que alimentos ricos em flavonóides contêm outras substâncias que também afetam a capacidade antioxidante plasmática diretamente por fornecer vitamina C, ou indiretamente, por estimular a produção de urato (LOTITO; FREI, 2006). Mais de 90 % de urato é reabsorvido nos rins e pode proteger contra inflamação por sua capacidade de inibir reações de nitratação mediadas por peroxinitrito (HOOPER *et al.*, 1998).

Foi observada redução nos níveis de ácido úrico dos grupos E I e E II, o qual pode estar associado à presença de vitamina C (**Figura 16**), assim como observado no modelo de ratos diabéticos. Já foi relatado que a vitamina C pode proteger os lipídios plasmáticos contra o dano induzido por radicais livres (FREI *et al.*, 1989). Além disso, o urato pode agir como um antioxidante e regenerar o ascorbato em sistemas biológicos (NYSSÖNEN *et al.*, 1997).

Figura 16. Efeito dos extratos de camu-camu sobre capacidade antioxidante do plasma - ORAC (A), ácido úrico (B), peroxidação lipídica em plasma - TBARS (C) e peroxidação lipídica em fígado - TBARS (D). Os valores são expressos como média ± desvio-padrão (n=9/grupo). Colunas com letras distintas diferem estatisticamente (* p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001). Grupos Controle, E I (1 g/kg peso corpóreo), E II (3 g/kg peso corpóreo) e EP (extrato purificado 3g/kg de peso corpóreo).

A peroxidação lipídica pode ser definida como uma cascata de eventos bioquímicos resultante da ação das espécies reativas de oxigênio sobre os lipídios insaturados das membranas celulares, levando à destruição de sua estrutura, falência dos mecanismos de troca de metabólitos, danos ao DNA, carbonilação de proteínas e, numa condição extrema, à morte celular (BENZIE, 1996). Guarnier et al. (2010) reportaram níveis elevados de peroxidação lipídica durante a perda muscular e desenvolvimento de câncer em fases iniciais. Neste experimento, a peroxidação lipídica do plasma e fígado foi determinada através da formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e está descrita na **Figura 16**. Houve uma diminuição significativa nos níveis de peroxidação lipídica em todos os grupos que receberam os extratos de camu-camu, sendo esta mais efetiva em plasma. Novamente, esse efeito foi similar ao observado em ratos diabéticos, mostrando a consistência da ação dos compostos fenólicos do camu-camu em situações patológicas.

A **Figura 17** mostra o efeito dos extratos de camu-camu sobre a atividade das enzimas antioxidantes no plasma e em eritrócitos. A atividade de CAT, GPx e SOD foi significativamente reduzida para todos os grupos tratados com camu-camu. Crespo et al. (2008) também observaram redução da atividade de glutathione em células de fígado inflamadas por citocinas e tratadas com diferentes concentrações de quercetina. A hipótese sustentada por estes autores seria que os flavonóides agem sobre a formação/eliminação de peróxido de hidrogênio e outros peróxidos, considerados os principais substratos da GPx.

Em eritrócitos, também foi observada significante redução na atividade destas enzimas, principalmente para o grupo EP. Em condições normais, os efeitos dos flavonóides podem ser diferentes dos observados em situações patológicas. Barbosa et al. (2011) reportaram aumento de todas as enzimas antioxidantes em eritrócitos de animais saudáveis tratados com isoflavonas. Ainda, em ratos diabéticos, o efeito dos extratos sobre as enzimas antioxidantes não foi similar ao efeito observado em ratos caquéticos.

Figura 17. Efeito dos extratos de camu-camu sobre a atividade das enzimas antioxidantes em plasma CAT (A), GPx (B) e SOD (C), e em eritrócitos, CAT (D), GPx (E) e SOD (F). Os valores são expressos como média $\pm$ desvio-padrão ($n=9$ /grupo). Colunas com letras distintas diferem estatisticamente (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$). Grupos Controle, E I (1 g/kg peso corpóreo), E II (3 g/kg peso corpóreo) e EP (extrato purificado 3g/kg de peso corpóreo).

A **Figura 18** mostra o efeito do tratamento com os extratos de camu-camu na expressão gênica das enzimas antioxidantes em fígado. Houve significativo aumento da expressão gênica apenas da GPx. Não foi observado o mesmo efeito para SOD e CAT. Um padrão similar com aumento dos níveis de RNAm e redução de proteína e atividade enzimática de GPx foi observado em animais expostos ao etanol. Uma possível explicação seria a inativação da enzima após a exposição a oxidantes e produtos da peroxidação lipídica (POLAVARAPU et al., 1998).

Alguns mecanismos podem explicar a atividade antiinflamatória dos flavonóides como o poder antioxidante/sequestro de radicais, modulação da atividade de enzimas ligadas ao metabolismo do ácido aracdônico (fosfolipase A2, ciclooxigenase, lipoxigenase) e óxido nítrico sintase, modulação da produção de moléculas pró-inflamatórias e modulação da expressão de genes proinflamatórios (GARCÍA-LAFUENTE et al., 2009).

Figura 18. Efeito do tratamento com camu-camu sobre a expressão gênica das enzimas antioxidantes glutatona peroxidase (A), catalase (B) e superóxido dismutase (C) no fígado. Os valores estão expressos os valores expressos como média $\pm$ desvio-padrão (n=6 / grupo). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

O efeito dos extratos de camu-camu sobre a expressão gênica de TNF- α e IL-10 está descrito na **Figura 19**. O Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- α) é uma das citocinas secretadas pelos macrófagos em resposta ao crescimento celular tumoral ou infecções bacterianas. O TNF- α , também responsável por induzir outros mediadores inflamatórios, pode estar relacionado com alguns fatores ligados ao desenvolvimento de câncer incluindo promoção, proliferação e metástase, além dos efeitos metabólicos observados na caquexia (ARGILÉS et al., 2006). A IL-10 caracteriza-se por apresentar atividade antiinflamatória e inibir a produção de várias citocinas inflamatórias como IL-6 e TNF- α (BOLGER et al., 2002). Ainda, estudos têm demonstrado que, em processos inflamatórios, há um aumento da produção de IL-10, e a mesma exerce função imunomoduladora (LIRA et al., 2009; JUNG et al., 2008).

Figura 19. Efeito do tratamento com camu-camu sobre a expressão gênica de IL-10 (A), TNF- α (B) e a razão IL-10/TNF- α (C) no fígado. Os valores estão expressos os valores expressos como média $\pm$ desvio-padrão (n=6 / grupo). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Por não ter sido observado diferenças na expressão de IL-10 e um aumento na expressão de TNF- α apenas no grupo EP, a razão IL-10/ TNF- α foi adotada como ferramenta para avaliar o

real efeito dos tratamentos na inflamação crônica (KAUR et al., 2006). O aumento na razão IL-10/ TNF- α indica que os níveis de IL-10 são consideravelmente maiores que os níveis de TNF- α , sugerindo efeito antiinflamatório do tratamento (BATISTA JR. et al., 2010). A administração com camu-camu também não alterou a razão IL-10/ TNF- α .

Em resumo, a suplementação com extrato de camu-camu em modelos animais de patologias mostra consistência nos efeitos relacionados à melhora do perfil lipídico e status antioxidante. Neste modelo, além das duas doses do extrato bruto, foi utilizada uma dose de extrato purificado. A hipótese sugerida era avaliar apenas os efeitos dos compostos fenólicos presentes no camu-camu, sem a interferência de vitaminas e minerais. O extrato purificado, contendo apenas flavonóides e taninos, foi eficiente em reduzir os níveis de TAG plasmáticos, sustentando a hipótese de que este efeito pode ser atribuído às proantocianidinas como já reportado por outros autores (IKARASHI et al., 2011; BLADÉ et al., 2010).

5.3 Efeito dos extratos de camu-camu em modelos *in vitro*: cultura de célula

Com intuito de avaliar os efeitos dos compostos presentes nos extratos de camu-camu sob o transporte de glicose, inflamação e produção hepática de glicose, os mesmos foram fracionados em bruto e purificados em poliamida e coluna C18. Este fracionamento permite avaliar quais compostos responsáveis pelos efeitos obtidos, e sugerir possíveis mecanismos destes compostos em modelos animais.

5.3.1 Efeito dos extratos de camu-camu sobre o transporte de glicose em miócitos (L6)

O principal mecanismo relacionado à manutenção da homeostase de glicose é a rápida ação da insulina em estimular a captação e metabolismo de glicose em tecidos periféricos (CHOI; KIM, 2010). O músculo esquelético representa aproximadamente 40% da massa corporal total e é responsável por aproximadamente 30% do consumo energético, além de ser um dos principais tecidos responsáveis pela captação, liberação e estocagem de glicose (ABDULGHANI; DEFRONZO, 2010). A captação de glicose pode ser ativada por duas vias distintas: a primeira estimulada por insulina através da ativação da fosfatidilinositol-3quinase (PI3K) e Akt resultando em aumento da translocação do transportador de glicose (GLUT4) intracelular para a membrana; a segunda estimulada pela contração muscular através da proteína quinase ativada por AMP (AMPK) (SALTIEL; KAHN, 2001).

As células L6 foram incubadas por 2 horas com doses de 100, 500 e 1000 mg/L de três diferentes extratos de camu-camu: bruto e extratos purificados em resina de poliamida e C18. Uma solução de vitamina C foi utilizada em todos os experimentos para determinar uma possível ação deste composto e comparar com os efeitos do extrato bruto do fruto, já que o camu-camu apresenta altas concentrações da mesma. Avaliação microscópica visual foi realizada em todos os grupos experimentais e foi observado que a morfologia celular não foi afetada pelos tratamentos.

A **Figura 20** mostra os efeitos dos extratos de camu-camu sobre a captação de glicose. Em células não estimuladas com insulina (basal), o extrato C18 na dose de 500 mg/L foi capaz de aumentar em 92 % a captação de glicose quando comparado ao controle. Os extratos bruto e purificado em PA foram capazes de aumentar esta captação em 43 e 45 %, respectivamente. Em células estimuladas com insulina, o extrato C18 na dose de 500 mg/L novamente foi mais eficiente e aumentou a captação em 87 %, seguido do extrato bruto, que com a mesma dose aumentou a captação em 58 %.

Figura 20. Efeitos dos extratos de camu-camu sobre a captação de glicose em miócitos (L6). As células foram tratadas com extrato bruto, frações purificadas (C18 e PA) e vitamina C por 2 horas. Os resultados foram expressos como % relativa ao grupo basal e os valores expressos como média $\pm$ desvio-padrão ($n = 8$).

Apesar do extrato C18 na dose de 500 mg/L ter sido mais eficiente no transporte de glicose, na ausência e presença de insulina, o extrato bruto demonstrou um efeito mais significativo. A dose de 500 mg/L deste extrato foi capaz de aumentar 1,6 vezes a captação de glicose na presença de insulina quando comparada aos estado basal. A vitamina C não apresentou efeito significativo sobre a captação de glicose.

Pelo fato dos extratos de camu-camu terem apresentado efeitos similares aos da insulina, foi avaliado o efeito dos mesmos extratos, apenas na dose de 500 mg/L, sobre a fosforilação de Akt, uma proteína envolvida na captação de glicose estimulada por insulina em células musculares. Entretanto, após 2 horas de tratamento, na ausência e presença de insulina, não foi observado nenhum efeito (dados não apresentados).

Alguns trabalhos já mostraram o efeito de compostos fenólicos no aumento da captação de glicose através da ativação da AMPK (ZYGMUNT et al., 2010; HWANG; KWON; YOON, 2009; BREEN et al., 2008). Por isso, também foi hipotetizado se os extratos de camu-camu poderiam estar atuando sobre a ativação da AMPK. Entretanto, após 30 minutos e 1 hora de tratamento, não foi observado nenhum efeito (dados não apresentados).

5.3.2 Efeito dos extratos de camu-camu sobre a concentração de NO em macrófagos (J774.1) e miócitos (L6)

Os macrófagos são considerados peças fundamentais na resposta inflamatória, já que são responsáveis pelo recrutamento de células inflamatórias e produção citocinas proinflamatórias como TNF- α , além de mediadores inflamatórios como ERO e NO. O NO, um gás de pouca duração e ERN altamente reativa, é produzido pelos macrófagos quando estimulados com LPS e citocinas inflamatórias como interferon, interleucina-1 e TNF- α . O NO é sintetizado fisiologicamente em baixas concentrações, a partir da L-arginina, pela enzima óxido nítrico sintase (iNOS), como mecanismo de defesa do organismo por ter ação antimicrobiana (MEDZHITOV, 2008). A estimulação de macrófagos pelo LPS ativa a via de sinalização do Fator de Transcrição Nuclear kappa B (NF- κ B), esta responsável pela indução da expressão de vários mediadores inflamatórios, incluindo o NO (MONCADA et al., 1991). O NO também pode reagir com EROs como ânion superóxido e produzir peroxinitrito. Os metabólitos formados podem interromper muitos processos celulares por ações oxidativas e implicar em condições patológicas como a sepse bacteriana e inflamação crônica (XIA; ZWEIER, 1997).

Com o intuito de avaliar o efeito dos extratos de camu-camu sobre a inflamação, os macrófagos (J774.1) foram estimulados com LPS (10 μ g/mL) por 6 e 24 horas. Apenas a dose de

500 mg/L foi utilizada no tratamento, por ter sido mais eficiente nos tratamentos em L6 (item **5.3.1**). Células L6 também foram estimuladas por 24 horas com mix de LPS (10 µg/mL) e citocinas (IFN γ 1 µg/µL, TNF α 10 ng/mL) para estimular a produção de NO através da iNOS, e os resultados podem ser observados na **Figura 21**.

Pode-se observar que o extrato bruto foi responsável por reduzir completamente a produção de NO em 6 horas de exposição ao LPS. Os extratos de C18 e vitamina C não apresentaram diferenças significativas neste ensaio e foram capazes de reduzir a produção de NO em até 75 % quando comparados ao grupo LPS.

Após 24 horas de exposição ao LPS, novamente o extrato bruto foi capaz de inibir a produção de NO em 62 %. O tratamento com o extrato PA foi menos eficaz em ambos os tempos. Em células L6, o extrato bruto reduziu em até 65 % a produção de NO no meio, mas foi observada diferença significativa entre os tratamentos.

Pelo fato dos extratos de camu-camu terem apresentado efeitos significativos, foi avaliado o efeitos dos mesmos, apenas na dose de 500 mg/L, sobre ativação da iNOS, enzima envolvida na produção de NO, pelos macrófagos. Entretanto, em macrófagos, após 6 horas de tratamento, apenas um resultado foi observado, não sendo considerado significativo; após 24 horas de tratamento, em macrófagos e L6, não foi observado nenhum efeito (dados não apresentados). Isto pode indicar que os extratos bruto e purificado em C18 de camu-camu foram capazes de inibir a produção de NO por atuarem como sequestradores de radicais no meio e não pela inibição da atividade iNOS.

Schmid et al. (2012) avaliaram o efeito de um elagitanino presente em flores em macrófagos estimulados com LPS por 24 horas. Os autores constataram que, apesar deste composto reduzir a produção de NO e a expressão gênica de iNOS, não houve inibição da atividade da enzima. Estes relatos podem sustentar a hipótese de que os extratos bruto e purificado em C18 de camu-camu não interferiram na atividade desta enzima.

Figura 21. Efeito dos extratos de camu-camu sobre a atividade de iNOS em macrófagos J774.1 (A e B) e miócitos L6 (C). As células foram tratadas com os extratos de camu-camu (500 mg/L) e incubadas na presença de LPS ou mix de citocina/LPS (IFN γ 1 μ g/ μ L, TNF α 10 ng/mL e LPS 10 μ g/mL) por 6 e 24 horas. A produção de nitrito foi determinada no meio e os resultados foram expressos como % relativa ao grupo LPS ou Cito/LPS em média $\pm$ desvio-padrão (n = 6). Colunas com letras distintas diferem estatisticamente (* p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001).

5.3.3 Efeito dos extratos de camu-camu sobre a produção hepática de glicose (FaO)

A homeostase da glicose é mantida pelo equilíbrio entre absorção da mesma pelo intestino, produção pelo fígado e rins e captação e utilização pelos tecidos. Sinais hormonais e nutricionais provenientes do sistema nervoso central (SNC), pâncreas (insulina e glucagon) e tecido adiposo (ácidos graxos e adipocinas) que agem sobre o fígado, assim como músculo e tecido adiposo, para regular o metabolismo de glicose. Durante o jejum, o fígado é o principal fornecedor de glicose para o cérebro e contribui para manter níveis constantes de glicose plasmática (NORDLIE et al., 1999)

A produção hepática de glicose (PHG) surge a partir de duas fontes: degradação de glicogênio (glicogenólise) e gliconeogênese a partir de lactato, piruvato, glicerol e aminoácidos. Em contraste, durante a ingestão alimentar, a PHG é inibida e o fígado capta glicose plasmática devido a um aumento na liberação de insulina e absorção de glicose pelo intestino (CHERRINGTON, 1999). As enzimas-chave responsáveis pela regulação da glicogênese são glicoquinase (GK) e glicogênio sintase (GS). A piruvato carboxilase, fosfoenolpiruvatoquinase (PEPCK), frutose 1,6-bifosfato e glicose-6-fosfato (G6P) são responsáveis pela regulação da gliconeogênese (PILKIS; CLAUS, 1991).

A insulina é o principal supressor hormonal e por isso, a manifestação de resistência à insulina ou a absoluta deficiência da mesma pode levar a desregulação na atividade de enzimas responsáveis pela glicólise e gliconeogênese. No diabetes, onde a PHG excessiva se manifesta, o aumento da atividade das enzimas responsáveis pela gliconólise e gliconeogênese, bem como a diminuição relativa da atividade de enzimas responsáveis pela glicólise e glicogênese ocorrem simultaneamente (CHAODONG et al., 2005).

Com o intuito de avaliar o efeito dos extratos de camu-camu sobre a produção hepática de glicose, os hepatócitos foram tratados com os extratos na ausência e presença de insulina por 5 horas (**Figura 22**). Os extratos de PA, C18 e vitamina C foram capazes de inibir a produção hepática de glicose na ausência e presença de insulina. Não foi possível determinar o mecanismo pelo qual os extratos reduziram a PHG. O extrato bruto, a nível basal, mostrou um aumento na produção de glicose. A presença de açúcares no extrato pode ter interferido nas análises.

Figura 22. Efeito dos extratos de camu-camu sobre a produção hepática de glicose em FaO. As células foram tratadas com os extratos de camu-camu (500 mg/L) e vitamina C (10 µg/mL) incubados na ausência e presença de insulina (100 nM) por 5 horas. A produção de glicose foi determinada no meio e os resultados foram expressos como µM de glicose / mg de proteína em média ± desvio-padrão (n = 3).

Alguns estudos já mostraram o efeito de compostos fenólicos na produção hepática de glicose. A epigallocatequina galato (EGCG) reduziu a produção hepática de glicose através da inibição da expressão das enzimas PEPCK e glicose-6-fosfato, responsáveis pela gliconeogênese, de modo similar à insulina (WALTNER-LAW et al., 2002). Doses entre 25-100 µM de naringenina, a forma aglicona da naringina, também inibiram a produção hepática de glicose em células de hepatoma, mas não afetaram a gliconeogênese (PURUSHOTHAM; TIAN; BELURY, 2009).

5.3.4 Efeito dos extratos de camu-camu na expressão gênica de citocinas em adipócitos (3T3.1)

Até recentemente, o papel da gordura no desenvolvimento da obesidade foi considerado passivo, e os adipócitos eram apenas as células de armazenamento. Entretanto, o que se sabe agora é que o tecido adiposo é um órgão endócrino ativo responsável pela secreção de um grande número de proteínas denominadas adipocinas, sendo adiponectina e leptina as mais estudadas (GREENBERG; OBIN, 2006). A adiponectina aumenta a sensibilidade à insulina no músculo e fígado e estimula a oxidação de ácidos graxos livres em alguns tecidos. A redução da adiponectina plasmática está diretamente correlacionada com o aumento da obesidade e resistência à insulina. A leptina age diretamente no hipotálamo e desempenha papel chave na regulação da ingestão calórica e gasto energético, além do apetite e metabolismo. Este hormônio

também é considerado um marcador da inflamação em resposta às citocinas produzidas pelo tecido adiposo (MYERS et al., 2008; HOTTA et al., 2001).

Na obesidade, a inflamação sistêmica está marcadamente evidente, já que existe um aumento da expressão de proteínas inflamatórias como TNF- α , interleucina 6 (IL-6), proteína quimiotática de monócitos (MCP-1) e iNOS. De fato, grande parte das citocinas presentes no tecido adiposo é produzida pelos macrófagos infiltrados (FAIN et al., 2004). Já foi reportado que o LPS induz a expressão de citocinas próinflamatórias, pela via sinalização do NF κ B, através de receptores Toll-like presentes em macrófagos e adipócitos e este evento está diretamente ligado à resistência insulínica (LIN et al., 2000).

A **Figura 23** mostra o efeito dos extratos de camu-camu sobre a expressão gênica de marcadores da inflamação como leptina, adiponectina, iNOS, IL-10, IL-6 e IL-1 β em adipócitos diferenciados (3T3) após estimulação com LPS (10 ug/mL) por 6 horas. Com exceção da leptina, os extratos de camu-camu não afetaram a expressão gênica destes marcadores. Entretanto, o extrato bruto de camu-camu atenuou a expressão de IL-6 e iNOS, responsáveis pela inflamação. Também foi observada uma tendência a aumentar a expressão da IL-10, uma citocina anti-inflamatória e inibidora de macrófagos.

Muitos trabalhos já relatam que os polifenóis reduzem a inflamação por agirem como (a) antioxidantes ou ativarem enzimas/proteínas antioxidantes, (b) bloqueando citocinas próinflamatórias, (c) suprimindo a expressão de genes responsáveis pela inflamação e (d) ativando fatores de transcrição antagônicos a inflamação crônica (CHUANG; MCINTOSH, 2011; GUO et al., 2008; RAHMAN et al., 2006; SURH et al., 2001).

Figura 23. Efeito dos extratos de camu-camu sobre a expressão gênica de citocinas em adipócitos (3T3.1). As células foram tratadas com os extratos de camu-camu (500 mg/L) e incubadas na presença de LPS (10 µg/mL) por 6. A produção de nitrito foi determinada no meio e os resultados foram expressos como % relativa ao grupo LPS ou Cito/LPS em média $\pm$ desvio-padrão (n = 6). Colunas com letras distintas diferem estatisticamente (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

Outros autores também mostraram que alguns compostos fenólicos possuem efeito pró-inflamatórios em macrófagos em adipócitos, e atenuam a inflamação mediada por TNF- α e ativam vias de sinalização envolvidas no processo inflamatório (SAKURAI et al., 2010; OVERMAN et al., 2010).

Até recentemente, acreditava-se que o efeito benéfico dos compostos fenólicos estava associado apenas às suas propriedades antioxidantes. Apesar dos inúmeros relatos sobre os efeitos dos polifenóis *in vitro*, não se pode esperar que eles apresentem os mesmos efeitos *in vivo*, já que estes compostos são metabolizados antes de serem absorvidos. Há agora uma emergente evidência de que os metabólitos dos compostos fenólicos exercem efeitos sobre a sinalização intracelular e modular funções vitais como crescimento, proliferação e apoptose (WILLIAMS; SPENCER; RICE-EVANS, 2004). A identificação dos metabólitos e o mecanismo de ação destes compostos é um passo importante a ser seguido e ajudará a explicar muito dos resultados obtidos.

6. CONCLUSÕES

Fruta e polpa comercial de camu-camu foram analisadas em relação aos teores de minerais, vitamina C e compostos fenólicos. A polpa comercial de camu-camu apresentou maior teor de K e Na, e foi considerada boa fonte de Mn e Cu. Em relação aos compostos fenólicos, apresentou maiores teores de flavonóides, ácido elágico livre e total, e maior capacidade antioxidante *in vitro* que o fruto.

Tanto o extrato bruto quanto a fração purificada de compostos fenólicos da polpa comercial de camu-camu reverteram o alto colesterol total e triacilgliceróis, e ainda aumentaram o HDL-colesterol de ratos caquéticos. Também houve aumento da capacidade antioxidante do plasma e redução da peroxidação lipídica e atividade das enzimas antioxidantes.

Os efeitos observados no perfil lipídico e status antioxidante dos extratos bruto e purificado em C18 de camu-camu foram similares tanto para o modelo de ratos diabéticos quanto ao de ratos caquéticos, mostrando a consistência da ação dos compostos fenólicos do camu-camu em situações patológicas.

Em linhagens celulares, os compostos fenólicos do camu-camu foram eficientes em aumentar a captação de glicose em miócitos, reduzir a produção de óxido nítrico em macrófagos e miócitos, reduzir a captação de glicose em células hepáticas e estimularam a expressão gênica de citocinas antiinflamatórias em tecido adiposo. Os mesmo efeitos não foram observados para a vitamina C, indicando que o alto teor deste composto no camu-camu não interfere nos tratamento das linhagens celulares.

Em resumo, os extratos de camu-camu, por apresentar altos teores de compostos antioxidantes, foram mais efetivos em combater o estresse oxidativo gerado tanto nos modelos animais quanto em células. O consumo da fruta e/ou do suco de camu-camu pode ser considerado mais uma alternativa efetiva e promissora na proteção do organismo contra os danos oxidativos, portanto, o seu consumo deve ser estimulado. Acredita-se que a redução no risco de desenvolvimento de doenças crônico-degenerativas se dá pela combinação de micronutrientes, antioxidantes, fitoquímicos e fibras presentes nos alimentos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AABY, K.; MAZUR, S.; NES, A.; SKREDE, G. Phenolic compounds in strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) fruits: Composition in 27 cultivars and changes during ripening. **Food Chemistry**, v. 132, p. 86-97, 2012.
- ABDUL-GHANI, M. A.; DEFRONZO, R. A. Pathogenesis of insulin resistance in skeletal muscle. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, 2010, 19 p., 2010.
- ADAMS, L. S.; SEERAM, N. P.; AGGARWAL, B. B.; TAKADA, Y.; SAND, D.; HEBER, D. Pomegranate juice, total pomegranate ellagitannins, and punicalagin suppress inflammatory cell signaling in colon cancer cells. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 980-985, 2006.
- AEBI, H. Catalase *in vitro*. *Methods in Enzymology*, v. 105, p. 121-126, 1984.
- AGGARWAL, B. B.; SHISHODIA, S. Molecular targets of dietary agents for prevention and therapy of cancer. **Biochemical Pharmacology**, v. 71(10), p. 1397-1421, 2006.
- AKTER, M. S.; OH, S.; EUN, J.-B.; AHMED, M. Nutritional compositions and health promoting phytochemicals of camu-camu (*Myrciaria dubia*) fruit: A review. **Food Research International**, v. 44(7), p. 1728-1732, 2011.
- AL-SHAMAONY, L.; AL-KHAZRAJI, S. M.; TWAIJ, H. A. A. Hypoglycaemic effect of *Artemisia herba alba*. II. Effect of a valuable extract on some blood parameters in diabetic animals. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 43, p. 167-171, 1994.
- ANNAPURNA, A.; REDDY, C. S.; AKONDI, R. B.; RAO, S. R. C. Cardioprotective actions of two bioflavonoids, quercetin and rutin, in experimental myocardial infarction in both normal and streptozotocin-induced type I diabetic rats. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 61(10), p. 1365-1374, 2009.
- AOAC. **Official Methods of Analysis**, Association of Official Analytical Chemists. 18ed., Washington, DC., 2005.
- ARABBI, P.R.; GENOVESE, M.I.; LAJOLO, F.M. Flavonoids in vegetable foods commonly consumed in Brazil and estimated ingestion by the Brazilian population. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.52, p. 1124-1131, 2004.
- ARGILÉS, J. M.; ALVAREZ, B.; LÓPEZ-SORIANO, F. J. The metabolic basis of cancer cachexia. **Medicinal Research Reviews**, v. 17, p. 477-498, 1997.
- ARGILÉS, J. M.; BUSQUETS, S.; LÓPEZ-SORIANO, F. J.; FIGUERAS, M. Fisiopatología de la caquexia neoplásica. **Nutrición Hospitalaria**, v. 21, p. 4-9, 2006.

- ARGILÉS, J. M.; LÓPEZ-SORIANO, F. J.; BUSQUETS, S. Novel approaches to the treatment of cachexia. **Drug discovery today**, v. 13, p. 73-78, 2008.
- ARON, P.M; KENNEDY, J. A. Flavan-3-ols: nature, occurrence and biological activity. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 52, p. 79-104, 2008.
- BARBOSA, A. C. L.; LAJOLO, F. M.; GENOVESE, M. I., Effect of free or protein-associated soy isoflavones on the antioxidant status in rats. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 91, p. 721-731, 2011.
- BARDALES, X.; CARRILLO, M.; HERNÁNDEZ, M.; FERNÁNDEZ-TRUJILLO, J.; MARTÍNEZ, O. Camu-Camu Fruit (*Myrciaria dubia*), a new option for productive systems in the Colombian Amazonian region. **Acta Horticulturae**, v. 773, p. 173-178, 2008.
- BATISTA JR, M. L.; ROSA, J. C.; LOPES, R. D.; LIRA, F. S.; MARTINS JR, E.; YAMASHITA, A. S.; BRUM, P. C.; LANCHÁ JR, A. H.; LOPES, A. C.; SEELAENDER, M. Exercise training changes IL-10/TNF- α ratio in the skeletal muscle of post-MI rats. **Cytokine**, v. 49, p.102-108, 2010.
- 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.
- BENZIE, I. Lipid peroxidation: a review of causes, consequences, measurement and dietary influences. **International journal of food sciences and nutrition**, v. 47, p. 233-261, 1996.
- BERDANIER, C. D.; FAILLA, M. L. **Advanced Nutrition Micronutrients**. Boca Raton, Flórida: CRC Press LLC, 1998. p. 236.
- BLADÉ, C.; AROLA, L; SALVADÓ, M.-J. Hypolipidemic effects of proanthocyanidins and their underlying biochemical and molecular mechanisms. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 54, p. 37–59, 2010.
- BOK, S.-H.; LEE, S.-H.; PARK, Y.-B.; BAE, K.-H.; SON, K.-H.; JEONG, T.-S.; CHOI, M.-S. Plasma and hepatic cholesterol and hepatic activities of 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-coa reductase and acyl coa: cholesterol transferase are lower in rats fed citrus peel extract or a mixture of citrus bioflavonoids. **The Journal of Nutrition**, v. 129, p. 1182-1185, 1999.
- BOLGER, A. P.; SHARMA, R.; VON HAEHLING, S.; DOEHNER, W.; OLIVER, B.; RAUCHHAUS, M.; COATS, A. J. S.; ADCOCK, I. M.; ANKER, S. D. Effect of interleukin-10 on the production of tumor necrosis factor-alpha by peripheral blood mononuclear cells from patients with chronic heart failure. **The American Journal of Cardiology**, v. 90, p. 384-389, 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.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Ministério da Saúde. RDC nº 269, de 22 de setembro de 2005. Aprova o regulamento técnico sobre a Ingestão Diária Recomendada (IDR) de proteína, vitaminas e minerais. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 23 de setembro de 2005.
- BREEN, D. M.; SANLI, T.; GIACCA, A.; TSIANI, E., Stimulation of muscle cell glucose uptake by resveratrol through sirtuins and AMPK. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 374, p. 117-122, 2008.
- BREINHOLT, V.; LAURIDSEN, S. T.; DRAGSTED, L. O. Differential effects of dietary flavonoids on drug metabolizing and antioxidant enzymes in female rat. **Xenobiotica**, v. 29, p. 1227-1240, 1999.
- BURTON-FREEMAN, B. Postprandial metabolic events and fruit-derived phenolics: a review of the science. **British Journal of Nutrition**, v.104, p. S1-S14, 2010.
- CERDA, B.; PERIAGO, P.; ESPIN, J. C.; TOMAS-BARBERAN, F. A. Identification of Urolithin A as a Metabolite Produced by Human Colon Microflora from Ellagic Acid and Related Compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.53, p. 5571-5576, 2005.
- CHAO, P.-C.; HSU, C.-C.; YIN, M. C. Anti-inflammatory and anti-coagulatory activities of caffeic acid and ellagic acid in cardiac tissue of diabetic mice. **Nutrition & Metabolism**, v. 6 (1), p. 33, 2009.
- CHAODONG, W.; DAVID, A. O.; JOHNTHOMAS, K.; ALEX, J. L. Reduction of hepatic glucose production as a therapeutic target in the treatment of diabetes. **Current Drug Targets - Immune, Endocrine & Metabolic Disorders**, v. 5, p. 51-59, 2005.
- CHERRINGTON, A. D. Banting Lecture 1997. Control of glucose uptake and release by the liver in vivo. **Diabetes**, v. 48, p. 1198-1214, 1999.
- CHIRINOS, R., J.; GALARZA, J.; BETALLELUZ-PALLARDEL, I.; PEDRESCHI, R.; CAMPOS, D. Antioxidant compounds and antioxidant capacity of Peruvian camu camu (*Myrciaria dubia* (H.B.K.) McVaugh) fruit at different maturity stages. **Food Chemistry** v. 120(4), p. 1019-1024, 2010.
- CHOI, K.; KIM, Y. B. Molecular mechanism of insulin resistance in obesity and type 2 diabetes. **The Korean journal of internal medicine**, v. 25, p. 119-129, 2010

- CHOMCZYNSKI, P.; SACCHI, N. The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate–phenol–chloroform extraction: twenty-something years on. **Nature protocols**, v.1, p.581-585, 2006.
- CHUANG, C.C.; MCINTOSH, M.K. Potential mechanisms by which polyphenol-rich grapes prevent obesity-mediated inflammation and metabolic diseases. **Annual Review of Nutrition**, v. 31(1), p. 155-176, 2011.
- CLIFFORD, M.N. Chlorogenic acids and other cinnamates - nature, occurrence and dietary burden. **Planta Medica**, v. 70 (3), p. 1103-1114, 2004.
- CLIFFORD, M.N.; SCALBERT, A. Ellagitannins - nature, occurrence and dietary burden. **Journal of Science of Food and Agriculture**. v. 80, p.1118-1125, 2000.
- CRESPO, I.; VILLA, M. V.G.; GUTIÉRREZ, B.; SÁNCHEZ-CAMPOS, S.; TUÑÓN, M.J.; GONZÁLEZ-GALLEGO, J. A comparison of the effects of kaempferol and quercetin on cytokine-induced pro-inflammatory status of cultured human endothelial cells. **British Journal of Nutrition**, v. 100, p. 968-976, 2008.
- CROZIER A.; CLIFFORD M. N.; ASHIHARA H. Plant secondary metabolites. occurrence, structure and role in the human diet. Oxford: Blackwell, 2006.
- CROZIER, A.; DEL RIO, D.; CLIFFORD, M. N. Bioavailability of dietary flavonoids and phenolic compounds. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 31(6), p. 446-467, 2010.
- CROZIER, A.; JAGANATH, I.B.; CLIFFORD, M.N. Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. **Natural Product Reports**, v. 26, p. 1001-1043, 2009.
- DAI, J.; MUMPER, R. J. Plant Phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. **Molecules**, v. 15, p. 7313-7352, 2010.
- DANIEL, E.M.; KRUPNICK, A.S.; HEUR, Y.H.; BLINZLER, J.A.; NIMS, R.W.; STONER, G.D. Extraction, stability and quantitation of ellagic acid in various fruits and nuts. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 2, p. 338-349, 1989.
- DAOOD, H. G.; BIACS, P. A.; DAKAR, M. A.; HAJDU, F. Ion-Pair chromatography and photodiode-array detection of vitamin c and organic acids. **Journal of Chromatographic Science**, v. 32, p. 481-487, 1994.
- DÁVALOS A, GOMEZ-CORDOVES C, BARTOLOME B. Extending applicability of the oxygen radical absorbance capacity (ORAC-fluorescein) assay. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 48-54, 2004.
- DEFRONZO, R. A.; FERRANNINI, E. Insulin Resistance: A multifaceted syndrome responsible for NIDDM, obesity, hypertension, dyslipidemia, and atherosclerotic cardiovascular disease. **Diabetes Care**, v. 14, p. 173-194, 1991.

- DEL RIO, D.; COSTA, L. G.; LEAN, M. E. J.; CROZIER, A., Polyphenols and health: What compounds are involved? **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases**, v. 20, p. 1-6, 2010.
- DONOVAN, J.L.; MANACH, C.; FAULKS, R.M.; KROON, P.A., Absorption and metabolism of dietary secondary metabolites. In: Crozier, A., Clifford, M.N., Ashihara, H. (Eds.), **Plant Secondary Metabolites**. Occurrence, Structure and Role in the Human Diet. Blackwell Publishing, Oxford, New York, pp. 303–351, 2006.
- DREHER, D.; JUNOD, A.F. Role of oxygen free radicals in cancer development. **European Journal of Cancer**, v. 32, p. 30-38, 1996.
- DRÖGE, W., Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. **Physiological Reviews**, v. 82, p. 47-95, 2002.
- DURAK, I.; YURTARSLAN, Z.; CANBOLAT, O.; AKYOL, O. A methodological approach to superoxide dismutase (SOD) activity assay based on inhibition of nitroblue tetrazolium (NBT) reduction. **Clinica Chimica Acta**. v. 214, p. 103–104, 1993.
- ECKEL, R. Diabetic dyslipidemia and cardiovascular risk. **Current Diabetes Reports**, v. 8, p. 421-423, 2008.
- ESPÍN, J. C.; GONZÁLEZ-BARRIO, R.; CERDÁ, B.; LÓPEZ-BOTE, C.; REY, A. I.; TOMÁS-BARBERÁN, F. A. Iberian pig as a model to clarify obscure points in the bioavailability and metabolism of ellagitannins in humans. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 10476-10485, 2007.
- FAIN, J. N.; MADAN, A. K.; HILER, M. L.; CHEEMA, P.; BAHOUTH, S. W. Comparison of the release of adipokines by adipose tissue, adipose tissue matrix, and adipocytes from visceral and subcutaneous abdominal adipose tissues of obese humans. **Endocrinology**, v. 145, p. 2273-2282, 2004.
- FERNANDES, A. A. H.; NOVELLI, E. L. B.; OKOSHI, K.; OKOSHI, M. P.; MUZIO, B. P. D.; GUIMARAES, J. F. C.; JUNIOR, A. F., Influence of rutin treatment on biochemical alterations in experimental diabetes. **Biomedicine & Pharmacotherapy** v. 64 (3), p. 214-219, 2010.
- FERNÁNDEZ-PACHÓN, M. S.; BERNÁ, G.; OTAOLAURRUCHI, E.; TRONCOSO, A. M.; MARTÍN, F.; GARCÍA-PARRILLA, M. C. Changes in antioxidant endogenous enzymes (activity and gene expression levels) after repeated red wine intake. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 6578-6583, 2009.

- FERRALI, M.; SIGNORINI, C.; CACIOTTI, B.; SUGHERINI, L.; CICCOLI, L.; GIACHETTI, D.; COMPORTI, M. Protection against oxidative damage of erythrocyte membrane by the flavonoid quercetin and its relation to iron chelating activity. **FEBS Letters**, v. 416, p. 123-129, 1997.
- FISCHER, U. A.; CARLE, R.; KAMMERER, D. R. Identification and quantification of phenolic compounds from pomegranate (*Punica granatum* L.) peel, mesocarp, aril and differently produced juices by HPLC-DAD-ESI/MSn. **Food Chemistry**, v.127, p.807-821, 2011.
- FINKEL, T. Signal transduction by reactive oxygen species. **The Journal of Cell Biology**, v. 194(1), p. 7-15, 2011.
- FONSECA-ALANIZ, M. H.; TAKADA, J.; ALONSO-VALE, M. I. C.; LIMA, F. B. O tecido adiposo como centro regulador do metabolismo. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v.50, p. 216-229, 2006.
- FRANCO, M.R.B.; SHIBAMOTO, T. Volatile composition of some Brazilian fruits: Umbu-caja (*Spondias citherea*), Camu-camu (*Myrciaria dubia*), Araçá-boi (*Eugenia stipitata*), and Cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 1263-1265, 2000.
- FREI, B.; ENGLAND, L.; AMES, B. N., Ascorbate is an outstanding antioxidant in human blood plasma. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 86, p. 6377-6381, 1989.
- GARCÍA-LAFUENTE, A.; GUILLAMÓN, E.; VILLARES, A.; ROSTAGNO, M.; MARTÍNEZ, J. Flavonoids as anti-inflammatory agents: implications in cancer and cardiovascular disease. **Inflammation Research**, v. 58, p. 537-552, 2009.
- GASPEROTTI, M.; MASUERO, D.; VRHOVSEK, U.; GUELLA, G.; MATTIVI, F. Profiling and Accurate Quantification of Rubus Ellagitannins and Ellagic Acid Conjugates Using Direct UPLC-Q-TOF HDMS and HPLC-DAD Analysis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 4602-4616, 2010.
- GATÉ, L.; PAUL, J.; BA, G. N.; TEW, K.; TAPIERO, H. Oxidative stress induced in pathologies: the role of antioxidants. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v.53, p.169-180, 1999.
- GENOVESE, M.I.; PINTO, M.S; GONÇALVES, A.E.S.S; LAJOLO, F.M. Bioactive compounds and antioxidant capacity of exotic fruits and commercial frozen pulps from Brazil. **Food Science and Technology International**, v. 14, p.207, 2008.

- GENOVESE, M.I.; SANTOS, R.J.; HASSIMOTTO, N.M.A.; LAJOLO, F.M. Determinação do conteúdo de fenólicos totais em frutas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.39 (3), p. 67-69, 2003.
- GNONI, G. V.; PAGLIALONGA, G.; SICULELLA, L. Quercetin inhibits fatty acid and triacylglycerol synthesis in rat-liver cells. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 39, p.761-768, 2009.
- GONÇALVES, A.E.S.S.; 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**, v. 58, p. 4666-4674, 2010.
- GONZÁLEZ-BARRIO, R.; EDWARDS, C. A.; CROZIER, A. Colonic catabolism of ellagitannins, ellagic acid, and raspberry anthocyanins: in vivo and in vitro studies. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 39, p. 1680-1688, 2011.
- GONZÁLEZ-SARRÍAS, A.; AZORÍN-ORTUÑO, M. A.; YÁÑEZ-GASCÓN, M. A.-J.; TOMÁS-BARBERÁN, F. A.; GARCÍA-CONESA, M. A.-T.; ESPÍN, J.-C. Dissimilar in vitro and in vivo effects of ellagic acid and its microbiota-derived metabolites, urolithins, on the cytochrome P450 1A1. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 5623-5632, 2009.
- GONZALO, J.C.R.; ALONSO, M.G. Flavonoides en alimentos vegetales: estructura y actividad antioxidante. **Alimentación, Nutrición y Salud**, v.9, n.2, p.31-38, 2002.
- GREENBERG, A. S.; OBIN, M. S. Obesity and the role of adipose tissue in inflammation and metabolism. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 83, p. 461S-465S, 2006.
- GUAITANI, A.; RECCHIA, M.; CARLI, M.; ROCCHETTI, M.; BARTOŠEK, I.; GARATTINI, S. Walker carcinoma 256: a model for studies on tumor-induced anorexia and cachexia. **Oncology**, v. 39, p. 173-178, 1982.
- GUARNIER, F. A.; CECCHINI, A. L.; SUZUKAWA, A. A.; MARAGNO, A. L. G. C.; SIMÃO, A. N. C.; GOMES, M. D.; CECCHINI, R. Time course of skeletal muscle loss and oxidative stress in rats with walker 256 solid tumor. **Muscle & Nerve**, v. 42, p. 950-958, 2010.
- GUO, H.; LING, W.; WANG, Q.; LIU, C.; HU, Y.; XIA, M. Cyanidin 3-glucoside protects 3T3-L1 adipocytes against H₂O₂- or TNF- α -induced insulin resistance by inhibiting c-Jun NH₂-terminal kinase activation. **Biochemical Pharmacology**, v. 75, p.1393-1401, 2008.
- GUYTON, A.C.; HALL, J.E. Tratado de Fisiologia Médica. 11^a ed. Rio de Janeiro, Elsevier Ed., 2006.

- HAGER, T. J.; HOWARD, L. R.; LIYANAGE, R.; LAY, J. O.; PRIOR, R. L., Ellagitannin composition of blackberry as determined by HPLC-ESI-MS and MALDI-TOF-MS. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 661-669, 2008.
- HALLIWELL, B., Antioxidant defense mechanisms: From the beginning to the end (of the beginning). **Free radical research**, v. 31, p. 261-272, 1999.
- HALLIWELL, B., Are polyphenols antioxidants or pro-oxidants? What do we learn from cell culture and in vivo studies? **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 476, p. 107-112, 2008.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C .In: **Free Radicals in Biology and Medicine**. Oxford University Press: Oxford, U.K., 1998.
- HANHINEVA, K.; ROGACHEV, I.; KOKKO, H.; MINTZ-ORON, S.; VENGHER, I.; KÄRENLAMPI, S.; AHARONI, A. Non-targeted analysis of spatial metabolite composition in strawberry (*Fragaria× ananassa*) flowers. **Phytochemistry**, v.69, p. 2463-2481, 2008.
- HARBORNE, J.B. Insect feeding preferences. **Introduction to Ecological Biochemistry**, 4^a ed., cap. 5, p. 128-161, 1997.
- HARD, G.C. Experimental models for the sequential analysis of chemically-induced renal carcinogenesis. **Toxicologic Pathology** v. 14(1), p. 112–122, 1986.
- HEBER, D. Multitargeted therapy of cancer by ellagitannins. **Cancer letters**, v. 269, p. 262-268, 2008.
- HEIMENDINGER, J.; VAN DUYN, M. A.;CHAPELSKY, D.; FOERSTER, S; STABLES, G. The national 5 A Day for Better Health Program: a large-scale nutrition intervention. **Journal Public Health Management and Practice**, v. 2 (2), p. 27-35, 1996.
- HERTOG, M. G. L.; HOLLMAN, P. C. H.; KATAN, M. B. Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of 28 vegetables and 9 fruits commonly consumed in the Netherlands. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 40, p. 2379-2383, 1992.
- HO, Y.S.; HOWARD, A.J. Cloning and characterization of the rat glutathione-peroxidase gene. **FEBS Letters** v. 301 (1), p. 5-9, 1992.
- HOOVER, L.; KROON, P. A.; RIMM, E. B.; COHN, J. S.; HARVEY, I.; LE CORNU, K. A.; RYDER, J. J.; HALL, W. L.; CASSIDY, A. Flavonoids, flavonoid-rich foods, and cardiovascular risk: a meta-analysis of randomized controlled trials. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 88, p. 38-50, 2008.
- HOTTA, K.; FUNAHASHI, T.; BODKIN, N. L.; ORTMAYER, H. K.; ARITA, Y.; HANSEN, B. C.; MATSUZAWA, Y. Circulating concentrations of the adipocyte protein adiponectin

- are decreased in parallel with reduced insulin sensitivity during the progression to type 2 diabetes in rhesus monkeys. **Diabetes**, v. 50, p. 1126-1133, 2001.
- HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R.L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 1841-1856, 2005.
- HUANG, J.; DE PAULIS, T.; MAY, J. M. Antioxidant effects of dihydrocaffeic acid in human EA.hy926 endothelial cells. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 15, p. 722-729, 2004.
- HWANG, J. T.; KWON, D. Y.; YOON, S. H. AMP-activated protein kinase: a potential target for the diseases prevention by natural occurring polyphenols. **New Biotechnology**, v. 26, p. 17-22, 2009
- IKARASHI, N.; TAKEDA, R.; ITO, K.; OCHIAI, W.; SUGIYAMA, K. The inhibition of lipase and glucosidase activities by Acacia polyphenol. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2011, 2011.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE FRUTAS. **Produção brasileira de frutas**: http://www.ibraf.org.br/estatisticas/est_frutas.asp . Acessado em 12 de outubro de 2011.
- INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. **Diabetes e-Atlas** Available at: <http://www.eatlas.idf.org> . Acessado em 31 de agosto de 2011.
- JALIL, A. M. M.; ISMAIL, A.; PEI PEI, C.; HAMID, M.; KAMARUDDIN, S. H. S. Effects of cocoa extract on glucometabolism, oxidative stress, and antioxidant enzymes in obese-diabetic (ob-db) rats. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 7877-7884, 2008.
- JENSEN, M. D.; CARUSO, M.; HEILING, V.; MILES, J. M., Insulin Regulation of lipolysis in nondiabetic and IDDM subjects. **Diabetes**, v. 38, p. 1595-1601, 1989.
- JONES, P.L.; KUCERA, G.; GORDON, H.; BOSS J.M. Cloning and characterization of the murine manganous superoxide dismutase-encoding gene. **Gene** v. 153 (2), p. 155-161, 1995.
- JUNG, S. H.; PARK, H. S.; KIM, K.-S.; CHOI, W. H.; AHN, C. W.; KIM, B. T.; KIM, S. M.; LEE, S. Y.; AHN, S. M.; KIM, Y. K.; KIM, H. J.; KIM, D. J.; LEE, K.-W. Effect of weight loss on some serum cytokines in human obesity: increase in IL-10 after weight loss. **The Journal of nutritional biochemistry**, v. 19, p. 371-375, 2008.
- KÄHKÖNEN, M. P.; HOPIA, A. I.; HEINONEN, M., Berry phenolics and their antioxidant activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.49, p. 4076-4082, 2001.

- KÄHKÖNEN, M.; KYLLI, P.; OLLILAINEN, V.; SALMINEN, J.-P.; HEINONEN, M. Antioxidant activity of isolated ellagitannins from red raspberries and cloudberries. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.60, p. 1167-1174, 2012.
- KAMALAKKANNAN, N.; PRINCE, P. S. M. Antihyperglycaemic and antioxidant effect of rutin, a polyphenolic flavonoid, in streptozotocin-induced diabetic wistar rats. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 98, p. 97–103, 2006.
- KARAKAYA, S. Bioavailability of phenolic compounds. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.44, p.453-464, 2004.
- KAUR, K.; SHARMA, A. K.; SINGAL, P. K. Significance of changes in TNF- α and IL-10 levels in the progression of heart failure subsequent to myocardial infarction. **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology**, v.291, p. H106-H113, 2006.
- KAZANTZIS, M., SEELAENDER, M. L. C. L. Cancer cachexia modifies the zonal distribution of lipid metabolism-related proteins in rat liver. **Cell and Tissue Research**, v. 321(3), p. 419-427, 2005.
- KEMPERMAN, R. A.; BOLCA, S.; ROGER, L. C.; VAUGHAN, E. E. Novel approaches for analysing gut microbes and dietary polyphenols: challenges and opportunities. **Microbiology**, v. 156, p. 3224-3231, 2010.
- KENNEDY, L.; BAYNES, J. Non-enzymatic glycosylation and the chronic complications of diabetes: an overview. **Diabetologia**, v. 26, p. 93-98, 1984.
- KIM Y.H.; YOO H.Y.; JUNG G.; KIM J.Y.; RHO H.M. Isolation and analysis of the rat genomic sequence encoding Cu Zn superoxide-dismutase. **Gene** v. 133 (2), p. 267-271, 1993.
- KIM, S. M.; KANG, K.; JHO, E. H., JUNG, Y.-J., NHO, C. W., UM, B.-H., PAN, C.-H. Hepatoprotective Effect of Flavonoid Glycosides from *Lespedeza cuneata* against Oxidative Stress Induced by *tert*-Butyl Hydroperoxide. **Phytotherapy Research**, 25:1011–1017, 2011.
- KING, A.; YOUNG, G. Characteristics and occurrence of phenolic phytochemicals. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 99, n. 2, p. 213-218, 1999.
- KOBORI, M.; MASUMOTO, S.; AKIMOTO, Y.; OIKE, H. Chronic dietary intake of quercetin alleviates hepatic fat accumulation associated with consumption of a Western-style diet in C57/BL6J mice. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 55, p. 530-540, 2011.
- KOWALTOWSKI, A. J.; DE SOUZA-PINTO, N. C.; CASTILHO, R. F.; VERCESI, A. E. Mitochondria and reactive oxygen species. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 47(4), p. 333-343, 2009.

- LANDETE, J. M. Ellagitannins, ellagic acid and their derived metabolites: A review about source, metabolism, functions and health. **Food Research International** v. 44(5), p. 1150-1160, 2011.
- LARROSA, M.; LUCERI, C.; VIVOLI, E.; PAGLIUCA, C.; LODOVICI, M.; MONETI, G.; DOLARA, P. Polyphenol metabolites from colonic microbiota exert anti-inflammatory activity on different inflammation models. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 53(8), p. 1044-1054, 2009.
- LARROSA, M.; TOMAS-BARBERAN, F. A.; ESPIN, J. C., The dietary hydrolysable tannin punicalagin releases ellagic acid that induces apoptosis in human colon adenocarcinoma Caco-2 cells by using the mitochondrial pathway. **The Journal of nutritional biochemistry**, v. 17, p. 611-625, 2006.
- LAWRENCE, R. A.; BURK, R. F. Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 71, p. 952–958, 1976.
- LENZEN, S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. **Diabetologia**, v. 51(2), p. 216-226, 2008.
- LIN, Y.; LEE, H.; BERG, A. H.; LISANTI, M. P.; SHAPIRO, L.; SCHERER, P. E. The Lipopolysaccharide-activated toll-like receptor (TLR)-4 induces synthesis of the closely related receptor TLR-2 in adipocytes. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 275, p. 24255-24263, 2000.
- LIRA, F. S.; ROSA, J. C.; YAMASHITA, A. S.; KOYAMA, C. H.; BATISTA JR, M. L.; SEELAENDER, M. Endurance training induces depot-specific changes in IL-10/TNF- α ratio in rat adipose tissue. **Cytokine**, v. 45, p. 80-85, 2009.
- LIRA, F. S.; TAVARES, F. L.; YAMASHITA, A. S.; KOYAMA, C. H.; ALVES, M. J.; CAPERUTO, E. C.; BATISTA, M. L.; SEELAENDER, M. Effect of endurance training upon lipid metabolism in the liver of cachectic tumour-bearing rats. **Cell Biochemistry and Function**, v. 26, p. 701–708, 2008.
- LOSSO, J. N.; BANSODE, R. R.; TRAPPEY, A.; BAWADI, H. A.; TRUAX, R. In vitro anti-proliferative activities of ellagic acid. **The Journal of nutritional biochemistry**, v.15 (11), p. 672-678, 2004.
- LOTITO, S. B; FREI, B. Consumption of flavonoid-rich foods and increased plasma antioxidant capacity in humans: Cause, consequence, or epiphenomenon? **Free Radical Biology and Medicine**, v. 41(12), p. 1727-1746, 2006.

- LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent, **Journal of Biological Chemistry**, v. 193(1), p. 265-275, 1951.
- MAEDA, R.N.; PANTOJA, L.; YUYAMA, L.K.O; CHAAR, J.M. Estabilidade de ácido ascórbico e antocianinas em néctar de camu-camu (*Myrciaria dubia* (H. B. K.) McVaugh). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, p. 313-316, 2007.
- MALAVOLTA, E.; VITTI, G. C.; OLIVEIRA, S. A. **Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações**. Piracicaba; POTAFOS, 2 ed. 1997. 319 p.
- MANACH, C.; DONOVAN, J. L., Pharmacokinetics and metabolism of dietary flavonoids in humans. **Free Radical Research**, v. 38, p.771-785, 2004.
- MANACH, C.; WILLIAMSON, G.; MORAND, C.; SCALBERT, A.; RÉMÉSY, C. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. The **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 81(1 Suppl), p. 230S–242S, 2005.
- MANTOVANI, A., Inflammation by remote control. **Nature**, v. 435, p. 752-753, 2005.
- MCBAIN, A.; MACFARLANE, G. Investigations of bifidobacterial ecology and oligosaccharide metabolism in a three-stage compound continuous culture system. **Scandinavian journal of gastroenterology**. Supplement, v. 222, p. 32, 1997.
- MCCANN, S. M.; MASTRONARDI, C.; DE LAURENTIIS, A.; RETTORI, V. The nitric oxide theory of aging revisited. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1057, p. 64–84, 2005.
- MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. **Nature**, v. 454, p. 428-435, 2008.
- MILLER-IHLI, N. J. Atomic Absorption and Atomic Emission Spectrometry for the determination of the trace element content of selected fruits consumed in the United States. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 9 (4), p. 301-311, 1996.
- MONCADA S.; PALMER R.M.; HIGGS E.A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. **Pharmacological Reviews**, v. 43(2), p. 109–142, 1991.
- MULLEN, W.; MARKS, S. C.; CROZIER, A. Evaluation of phenolic compounds in commercial fruit juices and fruit drinks. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 3148-3157, 2007.
- MUND R.C. Suplementação crônica com óleo de peixe reduz a taxa de crescimento do Tumor de Walker 256 – Identificação dos mediadores participantes desse processo. Dissertação de Mestrado – Biologia Celular. UFPR, 2004

- MUTHUKUMARAN, S.; SUDHEER, A. R.; NALINI, N.; MENON, V. P. Effect of quercetin on nicotine-induced biochemical changes and DNA damage in rat peripheral blood lymphocytes. **Redox Report**, v. 13(5), p. 217-224, 2008.
- MYERS, M. G.; COWLEY, M. A.; MÜNZBERG, H. Mechanisms of leptin action and leptin resistance. **Annual Review of Physiology**, v. 70, p. 537-556, 2008.
- MYODA, T.; FUJIMURA, S.; PARK, B.; NAGASHIMA, T.; NAKAGAWA, T.; NISHIZAWA, M. Antioxidative and antimicrobial potential of residues of camu-camu juice production. **International Journal of Food, Agriculture and Environment**, v. 8, p. 304–307, 2010.
- NAKASHIMA H.; YAMAMOTO M.; GOTO K.; OSUMI T.; HASHIMOTO T.; ENDO, H. Isolation and characterization of the rat catalase-encoding gene. **Gene** v.79 (2), p. 279-288, 1989.
- NAVAB, M.; REDDY, S. T.; VAN LENTEN, B. J.; FOGELMAN, A. M. HDL and cardiovascular disease: atherogenic and atheroprotective mechanisms. **Nature Reviews Cardiology**, v. 8, p. 222-232, 2011.
- NOGUEIRA, A.K.M.; SANTANA, A.C. Análise de sazonalidade de preços de varejo de açaí, cupuaçu e bacaba no estado do Pará. **Revista de Estudos Sociais** - ano 11, v. 21,(1), 2009.
- NORDLIE, R. C.; FOSTER, J. D.; LANGE, A. J. Regulation of glucose production by the liver. **Annual Review of Nutrition**, v. 19, p. 379-406, 1999.
- NYSSÖNEN, K.; PARVIAINEN, M. T.; SALONEN, R.; TUOMILEHTO, J.; SALONEN, J. T. Vitamin C deficiency and risk of myocardial infarction: prospective population study of men from eastern Finland. **BMJ**, v. 314, p. 634-638, 1997.
- OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical Biochemistry** v. 95, p. 351-358, 1979.
- OU, B.; HAMPSCH-WOODILL, M.; PRIOR, R.L. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.49, p. 4619-4626, 2001.
- OVERMAN, A.; BUMRUNGPET, A.; KENNEDY, A.; MARTINEZ, K.; CHUANG, C. C.; WEST, T.; DAWSON, B.; JIA, W.; MCINTOSH, M. Polyphenol-rich grape powder extract (GPE) attenuates inflammation in human macrophages and in human adipocytes exposed to macrophage-conditioned media. **International Journal of Obesity**, v. 34, p. 800-808, 2010.
- PADAYATTY, S. J.; KATZ, A.; WANG, Y.; ECK, P.; KWON, O.; LEE, J. H.; CHEN, S.; CORPE, C.; DUTTA, A.; DUTTA, S. K.; LEVINE, M. Vitamin C as an antioxidant:

- evaluation of its role in disease prevention. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 22(1), p. 18–35, 2003.
- PARK, S.-K.; KIM, K.; PAGE, G. P.; ALLISON, D. B.; WEINDRUCH, R.; PROLLA, T. A. Gene expression profiling of aging in multiple mouse strains: identification of aging biomarkers and impact of dietary antioxidants. **Aging Cell**, v. 8, p. 484–495, 2009.
- PATWELL, D. M.; MCARDLE, A.; MORGAN, J. E.; PATRIDGE, T. A.; JACKSON, M. J. Release of reactive oxygen and nitrogen species from contracting skeletal muscle cells. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 37(7), p. 1064–1072, 2004.
- PENN, J.W. The cultivation of camu camu (*Myrciaria dubia*): a tree planting programme in the Peruvian Amazon. **Forests, Trees and Livelihoods**, v. 16, p. 85–101, 2006.
- PÉREZ-JIMENEZ, J.; HUBERT, J.; HOOPER L.; CASSIDY A.; MANACH C., WILLIAMSON G.; SCALBERT A. Urinary metabolites as biomarkers of polyphenol intake in humans: a systematic review. **The American Journal of Clinical Nutrition** v. 92(4), p. 801–809, 2010.
- PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SERRANO, J.; TABERNERO, M.; ARRANZ, S.; DÍAZ-RUBIO, M.; GARCÍA-DIZ, L.; GOÑI, I.; SAURA-CALIXTO, F. Bioavailability of phenolic antioxidants associated with dietary fiber: plasma antioxidant capacity after acute and long-term intake in humans. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 64, p. 102–107, 2009.
- PILKIS, S. J.; CLAUS, T. H. Hepatic gluconeogenesis/glycolysis: regulation and structure/function relationships of substrate cycle enzymes. **Annual Review of Nutrition**, v. 11, p. 465–515, 1991.
- PINTO, M.S.; LAJOLO, F.M.; GENOVESE, M.I. Bioactive compounds and quantification of total ellagic acid in strawberries (*Fragaria x ananassa* Duch.). **Food Chemistry**, v. 107, p. 1629–1635, 2008.
- POLAVARAPU, R.; SPITZ, D. R.; SIM, J. E.; FOLLANSBEE, M. H.; OBERLEY, L. W.; RAHEMTULLA, A.; NANJI, A. A. Increased lipid peroxidation and impaired antioxidant enzyme function is associated with pathological liver injury in experimental alcoholic liver disease in rats fed diets high in corn oil and fish oil. **Hepatology**, v. 27, p. 1317–1323, 1998.
- POQUET, L.; CLIFFORD, M. N.; WILLIAMSON, G. Investigation of the metabolic fate of dihydrocaffeic acid. **Biochemical Pharmacology**, v. 75, p. 1218–1229, 2008.
- POSSEMIERS, S.; BOLCA, S.; VERSTRAETE, W.; HEYERICK, A. The intestinal microbiome: A separate organ inside the body with the metabolic potential to influence the bioactivity of botanicals. **Fitoterapia**, v. 82, p. 53–66, 2011.

- POUYSÉGU, L.; DEFFIEUX, D.; MALIK, G.; NATANGELO, A.; QUIDEAU, S. Synthesis of ellagitannin natural products. **Natural Product Reports**, v. 28, p. 853-874, 2011.
- PRIOR, R. L.; FAN, E.; JI, H.; HOWELL, A.; NIO, C.; PAYNE, M. J.; REED, J. Multi-laboratory validation of a standard method for quantifying proanthocyanidins in cranberry powders. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 90, p. 1473–1478, 2010.
- PURUSHOTHAM, A.; TIAN, M.; BELURY, M. A. The citrus fruit flavonoid naringenin suppresses hepatic glucose production from Fao hepatoma cells. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 53, p. 300-307, 2009.
- QUESADA, H.; DÍAZ, S.; PAJUELO, D.; FERNÁNDEZ-IGLESIAS, A.; GARCIA-VALLVÉ, S.; PUJADAS, G.; SALVADÓ, M. J.; AROLA, L.; BLADÉ, C. The lipid-lowering effect of dietary proanthocyanidins in rats involves both chylomicron-rich and VLDL-rich fractions. **British Journal of Nutrition**, FirstView, 1-10, 2011.
- QUINE, S. D.; RAGHU, P. S. Effects of (-)-epicatechin, a flavonoid on lipid peroxidation and antioxidants in streptozotocin-induced diabetic liver, kidney and heart. **Pharmacological Reports**, v. 57(5), p. 610–615, 2005.
- RAHMAN, I.; BISWAS, S.; KIRKHAM, P. A. Regulation of inflammation and redox signaling by dietary polyphenols. **Biochemical Pharmacology** v. 72(11), p. 1439-1452, 2006.
- RAINS, J. L.; JAIN S. K. Oxidative stress, insulin signaling, and diabetes. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 50(5), p. 567-575, 2011.
- RAMOS, A. A.; LIMA, C. F.; PEREIRA, M. L.; FERNANDES-FERREIRA, M.; PEREIRA-WILSON, C. Antigenotoxic effects of quercetin, rutin and ursolic acid on HepG2 cells: Evaluation by the comet assay. **Toxicology Letters**, v. 177(1), p. 66-73, 2008.
- RATNAM, D. V.; CHANDRAIAH, G.; MEENA, A. K.; RAMARAO, P.; RAVI KUMAR, M. N. V. The co-encapsulated antioxidant nanoparticles of ellagic acid and coenzyme q10 ameliorates hyperlipidemia in high fat diet fed rats. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 9, p. 6741-6746, 2009.
- RERUP, C. C. Drugs producing diabetes through damage of the insulin secreting cells. **Pharmacological Reviews**, v. 22(4), p. 485-518, 1970.
- REYNERTSON, K.A., YANG, H., JIANG, B., BASILE, M. J., KENNELLY, E. J. Quantitative analysis of antiradical phenolic constituents from fourteen edible Myrtaceae fruits. **Food Chemistry**, v, 109(4), p. 883–890, 2008.
- 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.

- RIEDL, K. M.; HAGERMAN, A. E. Tannin-protein complexes as radical scavengers and radical sinks. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 4917–4923, 2001.
- ROBBINS, R. J.; LEONCZAK, J.; JOHNSON, J. C.; LI, J.; KWIK-URIBE, C.; PRIOR, R. L.; GU, L. Method performance and multi-laboratory assessment of a normal phase high pressure liquid chromatography–fluorescence detection method for the quantitation of flavanols and procyanidins in cocoa and chocolate containing samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, p. 4831–4840, 2009.
- RODRIGUES, R.B.; MENEZES, H.C.; CABRAL, L.M.C.; DORNIER, M.; REYNES, M. An Amazonian fruit with a high potential as a natural source of vitamin C: the camu-camu (*Myrciaria dubia*). **Fruits**, v. 56 (5), p. 345–354, 2001.
- RODRIGUEZ, C.; MAYO, J. C.; SAINZ, R. M.; ANTOLÍN, I.; HERRERA, F.; MARTÍN, V.; REITER, R. J. Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin. **Journal of Pineal Research**, v. 36, p. 1–9, 2004.
- RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; FERNANDES, F. A. N.; BRITO, E. S. Free radical scavenging behavior of ten exotic tropical fruits extracts. **Food Research International**, v. 44, p. 2072–2075, 2011.
- SAKURAI, T.; KITADATE, K.; NISHIOKA, H.; FUJII, H.; KIZAKI, T.; KONDOH, Y.; IZAWA, T.; ISHIDA, H.; RADÁK, Z.; OHNO, H. Oligomerized grape seed polyphenols attenuate inflammatory changes due to antioxidative properties in coculture of adipocytes and macrophages. **The Journal of nutritional biochemistry**, v. 21, p. 47–54, 2010.
- SALTIEL, A. R.; KAHN, C. R. Insulin signaling and the regulation of glucose and lipid metabolism. **Nature**, 414, 799–806, 2001.
- SÁNCHEZ-MORENO, C. Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. **Food Science Technology International**, v. 8, p. 121–137, 2002.
- SAURA-CALIXTO, F. Dietary fiber as a carrier of dietary antioxidants: an essential physiological function. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** v. 59, p. 43–49, 2011.
- SAURA-CALIXTO, F.; GONI, I. Definition of the Mediterranean diet based on bioactive compounds. **Critical Review in Food Science and Nutrition**, v. 49(2), p. 145–52, 2009.
- SCALBERT, A.; MANACH, C.; MORAND, C.; RÉMÉSY, C. Dietary polyphenols and the prevention of diseases. **Critical Review in Food Science and Nutrition**, v. 45, p. 287–306, 2005.

- SCALBERT, A.; WILLIAMSON, G. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. **The Journal of Nutrition**, v. 130(8), p. 2073S-2085S, 2000.
- SCHINNER, S.; BARTHEL, A.; DELLAS, C.; GRZESKOWIAK, R.; SHARMA, S. K.; OETJEN, E.; BLUME, R.; KNEPEL, W. Protein Kinase B activity is sufficient to mimic the effect of insulin on glucagon gene transcription. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280(8), p.7369-7376, 2005.
- SCHMID, D.; GRUBER, M.; PISKATY, C.; WOEHS, F.; RENNER, A.; NAGY, Z.; KALTENBOECK, A.; WASSERSCHIED, T.; BAZYLKO, A.; KISS, A. K.; MOESLINGER, T. Inhibition of NF- κ B-dependent cytokine and inducible nitric oxide synthesis by the macrocyclic ellagitannin oenothin b in TLR-Stimulated RAW 264.7 macrophages. **Journal of Natural Products**, v. 75, p. 870-875, 2012.
- SCHROETER, H.; HEISS, C.; BALZER, J.; 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. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, p. 1024-1029, 2006.
- SEELAENDER, M. C. L.; NASCIMENTO, C. M. O. D.; CURI, R.; WILLIAMS, J. F. Studies on the lipid metabolism of Walker 256 tumour-bearing rats during the development of cancer cachexia. **IUBMB Life**, 39, 1037-1047, 1996.
- SEERAM, N. P.; ARONSON, W. J.; ZHANG, Y.; HENNING, S. M.; MORO, A.; LEE, R.-P.; SARTIPPOUR, M.; HARRIS, D. M.; RETTIG, M.; SUCHARD, M. A.; PANTUCK, A. J.; BELLDEGRUN, A.; HEBER, D., Pomegranate ellagitannin-derived metabolites inhibit prostate cancer growth and localize to the mouse prostate gland. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 7732-7737, 2007.
- 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.
- SEKAR D.S.; SIVAGNANAM K.; SUBRAMANIAN S. Antidiabetic activity of *Momordica charantia* seeds on streptozotocin induced diabetic rats. **Pharmazie**, v. 60(5), p.383-387, 2005.
- SELMA, M. A. V.; ESPÍN, J. C.; TOMÁS-BARBERÁN, F. A. Interaction between phenolics and gut microbiota: role in human health. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 6485-6501, 2009

- SERRA, A.; MACIÀ, A.; ROMERO, M.-P.; REGUANT, J.; ORTEGA, N.; MOTILVA, M.-J. Metabolic pathways of the colonic metabolism of flavonoids (flavonols, flavones and flavanones) and phenolic acids. **Food Chemistry**, v.130 (2), p. 383-393, 2012.
- SERRANO, J.; PUUPPONEN-PIMIÄ, R.; DAUER, A.; AURA, A.-M.; SAURA-CALIXTO, F. Tannins: Current knowledge of food sources, intake, bioavailability and biological effects. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 53, p. S310-S329, 2009.
- SETCHELL, K. D. R.; BROWN, N. M.; LYDEKING-OLSEN, E. The clinical importance of the metabolite equol—a clue to the effectiveness of soy and its isoflavones. **The Journal of Nutrition**, v.132, p. 3577-3584, 2002.
- SHARMA, M.; LI, L.; CELVER, J.; KILLIAN, C.; KOVOOR, A.; SEERAM, N. P. Effects of Fruit Ellagitannin Extracts, Ellagic Acid, and Their Colonic Metabolite, Urolithin A, on Wnt Signaling. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** v. 58, p. 3965-3969, 2010.
- SILVÉRIO, R.; LAVIANO, A.; FANELLI, F. R.; SEELAENDER, M.. L-Carnitine and cancer cachexia: Clinical and experimental aspects. **Journal of Cachexia Sarcopenia and Muscle**, v. 2(1), p. 37–44, 2011.
- SIMÕES, A.; PORAWSKI, M.; ALONSO, M.; COLLADO, P.S.; MARRONI, N.; GONZALEZ-GALLEGO, J. Quercetin prevents oxidative stress and NF-κB activation in liver of type 1 Diabetic rats. **Journal of Nutrition**, v. 135, p. 2299–2304, 2005.
- SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P.R. (org.) **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 3.ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da Universidade UFRGS / Editora da UFSC, 2001.
- SOUSA, T.; PATERSON, R.; MOORE, V.; CARLSSON, A.; ABRAHAMSSON, B.; BASIT, A. W., The gastrointestinal microbiota as a site for the biotransformation of drugs. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 363, p.1-25, 2008.
- SOUZA FILHO, M.S.M.; LIMA, J.R.; NASSU, R.T.; BORGES, M.F.; MOURA, C.F.H. Avaliação físico-química e sensorial de frutas nativas da região Norte e Nordeste do Brasil: estudo exploratório. **Brazilian Journal of Food Technology** v.5, p. 139-143, 2002.
- SURH, Y.-J.; CHUN, K.-S.; CHA, H.-H.; HAN, S. S.; KEUM, Y.-S.; PARK, K.-K.; LEE, S. S. Molecular mechanisms underlying chemopreventive activities of anti-inflammatory phytochemicals: down-regulation of COX-2 and iNOS through suppression of NF-κB activation. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 480–481, p. 243-268, 2001.
- SZKUDELSKI, T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. **Physiol Res.**, v. 50(6), p. 537–546, 2001.

- TISDALE, M. J. Cancer anorexia and cachexia. **Nutrition**, v. 17, p. 438-442, 2001.
- TOMÁS-BARBERÁN, F.A.; CLIFFORD, M.N. Dietary hydroxybenzoic acid derivatives - nature, occurrence and dietary burden. **Journal of Science of Food and Agriculture**. v. 80, p. 1024-1032, 2000.
- TOMASIN, R., GOMES-MARCONDES M. C. C. Oral administration of Aloe vera and honey reduces walker tumour growth by decreasing cell proliferation and increasing apoptosis in tumour tissue. **Phytotherapy Research**, v. 25(4), p. 619-623, 2011.
- VALKO M.; RHODES, C.; MONCOL, J.; IZAKOVIC, M.; MAZUR, M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chemico-Biological Interactions**, v. 160, p. 1–40, 2006.
- VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; CRONIN, M.T.D.; MAZUR, M.; TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 39, p. 44- 84, 2007.
- VERZELLONI, E.; PELLACANI, C.; TAGLIAZUCCHI, D.; TAGLIAFERRI, S.; CALANI, L.; COSTA, L. G.; BRIGHENTI, F.; BORGES, G.; CROZIER, A.; CONTE, A.; DEL RIO, D. Antiglycative and neuroprotective activity of colon-derived polyphenol catabolites. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 55(S1), p. S35-S43. 2011.
- VICENTINO, C.; CONSTANTIN, J.; BRACHT, A.; YAMAMOTO, N. S. Long-chain fatty acid uptake and oxidation in the perfused liver of Walker-256 tumour-bearing rats. **Liver**, v. 22, p. 341-349, 2002.
- WALTNER-LAW, M. E.; WANG, X. L.; LAW, B. K.; HALL, R. K.; NAWANO, M.; GRANNER, D. K. Epigallocatechin Gallate, a constituent of green tea, represses hepatic glucose production. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, p. 34933-34940, 2002.
- WANG, Y.; CHUNG, S.-J.; SONG, W. O.; CHUN, O. K. Estimation of daily proanthocyanidin intake and major food sources in the U.S. Diet. **The Journal of Nutrition**, v.141(3), p. 447-452, 2011.
- WHO – World Health Organization. **Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications**. Part I: diagnosis and classification of diabetes mellitus, 1999.
- WILLIAMS, R.J.; SPENCER, J.P.E.; RICE-EVANS, C. Flavonoids: antioxidants or signalling molecules? **Free Radical Biology & Medicine**, v. 36 (7), p. 838-849, 2004.
- WINKEL-SHIRLEY, B. Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology. **Plant Physiology**, v. 126 (2), p. 485-493, 2001.

- WYBIERALSKA, E.; KOZA, M.; SROKA, J.; CZYŻ, J.; MADEJA, Z., Ascorbic acid inhibits the migration of walker 256 carcinosarcoma cells. **Cellular & molecular biology letters**, v. 13, p. 103-111, 2008.
- XIA, Y.; ZWEIER, J. L. Superoxide and peroxynitrite generation from inducible nitric oxide synthase in macrophages. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 94, p. 6954-6958, 1997.
- XU, X.; HARRIS, K. S.; WANG, H.-J.; MURPHY, P. A.; HENDRICH, S. Bioavailability of soybean isoflavones depends upon gut microflora in women. **The Journal of Nutrition**, v. 125, p. 2307-2315, 1995.
- YAO, L. H.; JIANG, Y. M.; SHI, J.; TOMÁS-BARBERÁN, F. A.; DATTA, N.; SINGANUSONG, R.; CHEN, S. S. Flavonoids in food and their health benefits. **Plant Foods for Human Nutrition**, v.59, p.113-122, 2004.
- YOSHIDA, T.; ITO, H.; YOSHIMURA, M.; MIYASHITA, K.; HATANO, T. C-Glucosidic ellagitannin oligomers from *Melaleuca squarrosa* Donn ex Sm., Myrtaceae. **Phytochemistry** v. 69 (18), p. 3070-3079, 2008.
- YUYAMA, K. A cultura de camu-camu no Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33, p. 335-690, 2011.
- YUYAMA, K.; AGUIAR, J.P.L.; YUYAMA, L.K.O. Camu-camu: um fruto fantástico como fonte de vitamina C. **Acta Amazônica**, v. 32 (1), p. 169-174, 2002.
- ZYGMUNT, K.; FAUBERT, B.; MACNEIL, J.; TSIANI, E., Naringenin, a citrus flavonoid, increases muscle cell glucose uptake via AMPK. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 398, p. 178-183, 2010.

APÊNDICE A - Chemical characterization and comparison of Brazilian *Myrciaria dubia* Mc. Vaugh (Camu-camu) fruit and commercial frozen pulp, submetido ao Food Chemistry.

APÊNDICE B - Camu-camu (*Myrciaria dubia* McVaugh) phenolic-rich extracts restore plasma lipid profile in cachectic rats, submetido ao Nutrition Research.

APÊNDICE C - Camu-camu extracts inhibit glucose production and induce glucose uptake in L6 myocytes cells, but only improve biomarkers of oxidative stress and plasmatic lipid profile in streptozotocin-induced diabetic rats, a ser submetido ao Molecular Nutrition and Food Research.