



UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
ESCOLA DE NUTRIÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E
NUTRIÇÃO



ALICE HELENA DE SOUZA PAULINO

**EFEITO DA FARINHA DO FRUTO ARAÇÁ (*Psidium cattleianum* Sabine) SOBRE O
PERFIL LIPÍDICO E O ESTRESSE OXIDATIVO NA ESTEATOSE HEPÁTICA
INDUZIDA POR DIETA HIPERCOLESTEROLÊMICA EM RATAS**

Ouro Preto/ MG

2015

ALICE HELENA DE SOUZA PAULINO

**EFEITO DA FARINHA DO FRUTO ARAÇÁ (*Psidium cattleianum* Sabine) SOBRE O
PERFIL LIPÍDICO E O ESTRESSE OXIDATIVO NA ESTEATOSE HEPÁTICA
INDUZIDA POR DIETA HIPERCOLESTEROLÊMICA EM RATAS**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Saúde e Nutrição da Universidade Federal de Ouro Preto, como parte integrante dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Saúde e Nutrição, área de concentração: Bioquímica e Fisiopatologia da Nutrição.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Eustáquio Silva.

Coorientadoras: Prof^a. Dr^a. Maria Lúcia Pedrosa.

Prof^a. Dr^a. Larissa de Freitas Bonomo.

Ouro Preto/ MG

2015

P328e Paulino, Alice Helena de Souza.
Efeito da farinha do fruto araçá (*Psidium cattleianum* Sabine) sobre o perfil lipídico e o estresse oxidativo na esteatose hepática induzida por dieta hipercolesterolêmica em ratas [manuscrito] / Alice Helena de Souza Paulino. - 2015.
104f.: il.: color; grafs; tabs.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Eustáquio Silva.
Coorientadora: Profa. Dra. Maria Lúcia Pedrosa.
Coorientadora: Profa. Dra. Larissa de Freitas Bonomo.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Ouro Preto. Escola de Nutrição. Programa de Pós-Graduação em Saúde e Nutrição.

1. Insuficiencia hepatica. 2. Stress (Fisiologia). 3. Araçá. 4. Reação de oxidação. I. Silva, Marcelo Eustáquio. II. Pedrosa, Maria Lúcia. III. Bonomo, Larissa de Freitas. IV. Universidade Federal de Ouro Preto. V. Título.

CDU: 577.152.1:613.2

Catálogo: www.sisbin.ufop.br



UFOP

Universidade Federal
de Ouro Preto



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Universidade Federal de Ouro Preto – UFOP
Escola de Nutrição – ENUT
Programa de Pós-Graduação em Saúde e Nutrição



SAPIENTIA ALIMENTUM ANIMAE

ATA DE DEFESA PÚBLICA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Aos vinte dias do mês de março de dois mil e quinze, às catorze horas, no Auditório da Escola de Nutrição da Universidade Federal de Ouro Preto, realizou-se a Defesa da Dissertação de Mestrado da aluna **Alice Helena de Souza Paulino**. A Banca Examinadora, definida anteriormente, foi composta pelos Professores Lenice Kappes Becker Oliveira (UFOP), Heberth de Paula (UFES), Marcelo Eustáquio Silva (UFOP), Maria Lucia Pedrosa (UFOP) e Larissa de Freitas Bonomo (UFOP). Dando início ao exame, a aluna apresentou sua dissertação de mestrado intitulada: **“Efeito da farinha do fruto do araçá (*Psidium Cattleianum* Sabine) sobre o perfil lipídico e o estresse oxidativo na esteatose hepática induzida por dieta hipercolesterolêmica em ratas”**. Após a apresentação, a candidata foi arguida pela Banca que avaliou o domínio do conteúdo metodológico e teórico relacionado à dissertação. Após julgamento, os membros da Banca decidiram por:



APROVAR



REPROVAR

Profa. Dra. Lenice Kappes Becker Oliveira (UFOP),
Examinadora Interna.

Prof. Dr. Heberth de Paula (UFES),
Examinador Externo.

Prof. Dr. Marcelo Eustáquio Silva (UFOP),
Orientador.

Profa. Dra. Maria Lucia Pedrosa (UFOP),
Coorientadora.

Profa. Dra. Larissa de Freitas Bonomo (UFOP),
Coorientadora.

Alice Helena de Souza Paulino (UFOP),
Mestranda.

Dedico esta dissertação à Deus, por me guiar e me manter perseverante durante esta caminhada, e à minha família, pelo apoio, incentivo e carinho.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Marcelo Eustáquio Silva, e às minhas coorientadoras, Maria Lúcia Pedrosa e Larissa de Freitas Bonomo, pelos valiosos ensinamentos, dedicação, confiança e paciência que me auxiliaram no decorrer desta trajetória e na construção do que hoje conquisto. Agradeço imensamente pela oportunidade de trabalhar com vocês e pelos exemplos que me acompanharão durante a minha vida profissional.

Ao professor Wanderson Geraldo, pela colaboração, competência, disponibilidade e sugestões em parte da elaboração deste trabalho.

À minha companheira e amiga Ana Maria, pela paciência, dedicação e suporte em todas as horas.

Aos amigos do laboratório, Juliana, Nara, Joyce, Renata, Aline, Larissa, Mayara e Filipe, pelo auxílio e conhecimento compartilhado.

À Maísa Silva, que apesar do pouco tempo de convivência, me ensinou muito.

Às minhas amigas, Bruna e Brígida, por fazerem parte desta trajetória e tornarem os momentos mais agradáveis.

Ao senhor Jair pelo constante apoio e contribuição na realização deste trabalho.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À Deus, que sempre será a base de tudo.

Aos meus queridos pais, Geraldo e Leila, pelo amor incondicional e por não terem medido esforços para que eu chegasse até aqui.

Às minhas irmãs, Ana Laura e Maria Clara, pela amizade e cumplicidade nos momentos difíceis.

À minha querida madrinha, Maria Antonieta, que sempre acreditou em mim e esteve ao meu lado.

À todos os meus familiares, pelo apoio e carinho.

RESUMO

A esteatose hepática não alcoólica é caracterizada pelo acúmulo anormal de gordura nos hepatócitos e pode progredir para danos mais severos. A progressão da doença ocorre principalmente mediante cofatores secundários, como o aumento do estresse oxidativo. Compostos bioativos, com ampla ação antioxidante, que aparecem naturalmente em alguns alimentos, atuam reforçando o sistema antioxidante endógeno e são propostos como uma estratégia eficaz na prevenção das alterações induzidas pelos radicais livres. Sendo assim, o objetivo do estudo foi avaliar o efeito da farinha do fruto araçá (*Psidium cattleianum* Sabine) sobre o perfil lipídico e o dano oxidativo no soro e no tecido hepático de ratas com esteatose hepática induzida por dieta hipercolesterolêmica. Foram utilizadas 40 ratas, divididas em 4 grupos (n=10): controle (C), recebendo dieta padrão (AIN-93M); hipercolesterolêmico (H), com dieta hipercolesterolêmica (2% de colesterol e 25% de óleo de soja); e grupos tratados com farinha de araçá (CAr e HAr), recebendo dieta acrescida de 2% da farinha. Todos os grupos receberam dieta e água “ad libitum”. O experimento teve duração de 8 semanas, ocorrendo no último dia a eutanásia dos animais. A eutanásia foi realizada a partir da anestesia com isoflurano e posterior exsanguinação. O sangue e os órgãos foram recolhidos para posteriores análises. As dosagens bioquímicas de colesterol total, triacilgliceróis, colesterol-HDL, proteínas totais, albumina, glicose, aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), fosfatase alcalina (FA), ureia, creatinina e lipase, foram feitas utilizando-se kits comerciais. As dosagens dos marcadores do dano oxidativo (PON, peroxidação lipídica, proteína carbonilada e sulfidrilas totais) e das enzimas antioxidantes (catalase e glutatona) foram determinadas de acordo com protocolos específicos, adaptados no laboratório de nutrição experimental. O tratamento com a farinha de araçá aumentou a atividade das enzimas antioxidantes (glutatona total e reduzida) bem como melhorou alguns biomarcadores do dano oxidativo (PON e sulfidrilas totais). Além disso, o tratamento também mostrou ser eficaz em relação ao parâmetro de ALT, diminuindo a atividade da enzima. Sendo assim, é possível sugerir que a farinha de araçá proporcionou melhora das alterações induzidas pelas esteatose hepática.

Palavras-chave: esteatose hepática não alcoólica, estresse oxidativo, araçá.

ABSTRACT

The nonalcoholic liver steatosis is characterized by abnormal accumulation of fat in hepatocytes, and can progress to more severe damage. The progression of the disease occurs mainly through secondary cofactors, such as increased oxidative stress. Bioactive compounds with broad antioxidant, which appear naturally in some foods, act enhancing the endogenous antioxidant system and are proposed as an effective strategy in preventing the changes induced by free radicals. In this context, the objective of the study was to evaluate the effect of flour araçá fruit (*Psidium cattleianum* Sabine) on the lipid profile and oxidative damage in serum and liver tissue of rats with hepatic steatosis induced by hypercholesterolemic diet. 40 rats were used, and they were divided into 4 groups (n = 10): control (C), receiving standard diet (AIN-93M); hypercholesterolemic (H) with hypercholesterolemic diet (2% cholesterol and 25% soybean oil); and groups treated with araçá flour (CAr is HAr), receiving diet plus 2% of the flour. All groups received diet and water "ad libitum". The experiment time was 8 weeks long, and in the last day occurred the euthanasia of the animals. The euthanasia was performed from isoflurane anesthesia and subsequent exsanguination. Blood and organs were collected for further analysis. Biochemical measurements of total cholesterol, triglycerides, HDL cholesterol, total protein, albumin, glucose, aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), alkaline phosphatase (ALP), urea, creatinine and lipase, were made using commercial kits. The concentrations of markers of oxidative damage (PON, lipid peroxidation, protein carbonyl and sulfhydryl) and antioxidant enzymes (catalase and glutathione) were determined according to specific protocols, adapted in the Experimental Nutrition Laboratory. The treatment with araçá flour increased the activity of antioxidant enzyme (total glutathione and reduced glutathione) and improvement of some biomarkers of oxidative damage (PON and sulfhydryl). Moreover, the treatment also proved to be effective compared to ALT parameter, decreasing the activity of the enzyme. Therefore, it is possible to suggest that the araçá flour provided improvement of the changes induced by hepatic steatosis.

Keywords: nonalcoholic hepatic steatosis, oxidative stress, araçá.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Progressão de esteatose hepática não alcoólica à esteatohepatite não alcoólica (EHNA) mediante cofatores secundários	16
Figura 2. Biópsias hepáticas pós-reperfusão, coradas com hematoxilina-eosina. (a) nenhuma esteatose, (b) 5% esteatose macrovesicular, 95% esteatose microvesicular, e (c) 70% esteatose macrovesicular, 5% esteatose microvesicular	18
Figura 3. A) Oxidantes do metabolismo normal. Formação de radicais superóxido (O_2^{\cdot}), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e íons hidroxila (OH^{\cdot}) pela redução do O_2 . B) Reação de Haber-Weiss com formação de íons hidroxila	21
Figura 4. <i>Psidium cattleianum</i> Sabine (araçá amarelo)	26
Figura 5. A) araçazeiro B) flores solitárias, axilares; C) frutos plurisseminados; D) fruto amarelado, maduro	27
Figura 6. Perfil lipídico sérico: colesterol total (A), colesterol-HDL (B), triacilgliceróis (C), outras frações do colesterol (VLDL+LDL) (D)	52
Figura 7. Perfil lipídico hepático: porcentagem de lipídios (A), colesterol (B) e triacilgliceróis (C)	53
Figura 8. Perfil lipídico fecal: porcentagem de lipídios (A) e colesterol (B)	53
Figura 9. Atividade das enzimas AST (A), ALT (B), relação ALT/AST (C) e FA (D)	54
Figura 10. Concentrações de PON-arilesterásica (A) e PON-paeroxonásica (B)	56
Figura 11. Atividade antioxidante: catalase (A), glutatona total (B), glutatona reduzida (C), glutatona oxidada (D)	57
Figura 12. Fotomicrografias de cortes histológicos de fígado de ratas alimentadas com diferentes dietas experimentais, corados pela técnica da Hematoxilina e Eosina	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição química do araçá amarelo, da família Myrtaceae nativa do sul do Brasil	29
Tabela 2. Composição das dietas experimentais (g/1000g de dieta)	36
Tabela 3. Composição centesimal da farinha de araçá	47
Tabela 4. Polifenóis totais e capacidade antioxidante (TEAC)	47
Tabela 5. Massa corporal inicial, massa corporal final, ganho de massa, ingestão alimentar e excreção fecal de grupos de animais alimentados com dieta controle (C) ou dieta hipercolesterolêmica (H) ou farinha de araçá (Ar)	48
Tabela 6. Gordura abdominal e gordura mesentérica de grupos de animais alimentados com dieta controle (C) ou dieta hipercolesterolêmica (H) ou farinha de araçá (Ar).....	49
Tabela 7. Peso do rins e níveis de creatinina e ureia de grupos de animais alimentados com dieta controle (C) ou dieta hipercolesterolêmica (H) ou farinha de araçá (Ar)	49
Tabela 8. Peso do fígado e níveis de proteínas totais, albumina, globulinas e glicose de grupos de animais alimentados com dieta controle (C) ou dieta hipercolesterolêmica (H) ou farinha de araçá (Ar)	50
Tabela 9. Peso do pâncreas e atividade de lipase de grupos de animais alimentados com dieta controle (C) ou dieta hipercolesterolêmica (H) ou farinha de araçá (Ar)	51
Tabela 10. Marcadores do estresse oxidativo em animais alimentados com dieta controle (C) ou dieta hipercolesterolêmica (H) ou farinha de araçá (Ar)	55
Tabela 11. Efeito das dietas experimentais na histologia hepática dos animais, após oito semanas	58
Tabela 12. Classificação da esteatose (micro e macrovesicular) e da inflamação hepática presente nos animais após oito semanas	58

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DHGNA	Doenças hepáticas gordurosas não alcoólicas
EROs	Espécies reativas de oxigênio
GPx	Glutathione peroxidase
CAT	Catalase
SOD	Superóxido dismutase
VLDL	Lipoproteína de muito baixa densidade
EHNA	Esteatohepatite não alcoólica
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
IL-6	Interleucina 6
IL-1β	Interleucina 1 beta
AGNE	Ácidos graxos não esterificados
TAG	Triacilgliceróis
AGs	Ácidos graxos
DAG	Diacilglicerol
ALT	Alanina aminotransferase
AST	Aspartato aminotransferase
FA	Fosfatase alcalina
GGT	γ -glutamyltransferase
NASH CRN	<i>NASH Clinical Research Network</i>
PPAR-α	Proliferador de peroxissomo alfa
GSH	Glutathione reduzida
GSSG	Glutathione oxidada
FOSHU	Foods for specified health use
ADA	American Dietetic Association
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
PON	Paraoxonase
AOAC	Association of analytical communities
FDN	Fibra em detergente neutro
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazil
GAE	Equivalentes de ácido gálico
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
HDL	Lipoproteína de alta densidade

LDL	Lipoproteína de baixa densidade
TBA	Ácido tiobarbitúrico
BHT	Butilhidroxitolueno
TCA	Ácido tricloroacético
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
MDA	Malondialdeído
DNPH	2,4-dinitrofenilhidrazina
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
TEA	Trietanolamina
H&E	Hematoxilina & Eosina
X²	Qui-quadrado
TEAC	Trolox equivalent antioxidant capacity

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1 Esteatose hepática não alcoólica	15
2.2 Esteatose hepática não alcoólica – Modelo animal	19
2.3 Estresse oxidativo e esteatose hepática não alcoólica	20
2.4 Alimentos funcionais	23
2.5 O fruto araçá (<i>Psidium cattleianum</i> Sabine)	25
3 OBJETIVOS	31
3.1. Objetivo Geral	31
3.2. Objetivos Específicos	31
4 MATERIAIS E MÉTODOS	32
4.1 Coleta dos frutos e obtenção da farinha	32
4.2 Confeção das excisas e depósito de material testemunho no acervo OUPR, no herbário Professor José Badini	32
4.3 Composição centesimal	32
4.4 Capacidade antioxidante do araçá	33
4.5 Conteúdo de polifenóis totais da farinha de araçá	34
4.6 Animais	34
4.7 Delineamento experimental	35
4.8 Dietas	35
4.9 Obtenção do soro e do plasma	36
4.10 Análises bioquímicas	36
4.11 Protocolos de análise das defesas antioxidantes e da concentração de marcadores do estresse oxidativo	37
4.11.1 Paraoxonase - Atividade arilesterásica	37
4.11.2 Paraoxonase - Atividade paraoxonásica	38
4.11.3 Sulfidrilas Totais	39

4.11.4 Catalase	40
4.11.5 Peroxidação lipídica no tecido hepático - Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)	41
4.11.6 Proteína Carbonilada	41
4.11.7 Glutathiona total	43
4.11.8 Glutathiona Oxidada	44
4.11.9 Glutathiona Reduzida	44
4.12 Determinação de gordura nas fezes	44
4.13 Determinação de gordura no fígado	45
4.14 Análises histológicas	45
4.15 Análise estatística	45
5 RESULTADOS	47
5.1 Capacidade antioxidante e conteúdo de polifenóis totais da farinha de araçá	47
5.2 Parâmetros bioquímicos e nutricionais	47
5.3 Histologia	57
6 DISCUSSÃO	60
7 CONCLUSÃO	70
REFERÊNCIAS	71
ANEXO A	86
ANEXO B	87

1 INTRODUÇÃO

O hábito alimentar inadequado com o consumo elevado de comidas hipercalóricas ou gorduras saturadas, resulta em aumento do peso corporal bem como aumento dos níveis de lipídios séricos e acúmulo de lipídios nos hepatócitos. O acúmulo anormal de gordura no tecido hepático caracteriza a esteatose hepática não alcoólica, inclusa no espectro de doenças hepáticas gordurosas não alcoólicas (DHGNA) (CHANG et al, 2011).

É uma doença emergente, tendo uma prevalência estimada de 20-30% na população geral dos países ocidentais. Nos Estados Unidos, por exemplo, a doença ocorre em até um terço dos adultos, sendo responsável pelo aumento da mortalidade por doenças cardiovasculares e outras doenças hepáticas mais severas como o carcinoma hepático (DIEHL, 2010; CHANG et al., 2011).

A esteatose hepática não alcoólica se assemelha à esteatose induzida pelo álcool, porém, está presente em indivíduos que consomem nenhuma ou pouca quantidade de bebida alcoólica. Se associa com diversos fatores clínicos como idade, sexo e doenças crônicas como a obesidade, o diabetes e a hipertensão. Também está ligada com a resistência à insulina e a dislipidemia, porém, ainda não está elucidado se ela é causa ou consequência dessas condições (CLARK; BRANCATI; DIEHL, 2002; MILLS; HARRISON, 2005; CONG et al., 2008).

Estudos indicam que a resistência à insulina provoca estresse oxidativo via aumento da oxidação no fígado, consequente formação de espécies reativas de oxigênio (EROs), elevação da peroxidação hepática, oxidação de proteínas e produção de citocinas pró-inflamatórias (BRAVO et al., 2011).

A fim de impedir ou diminuir essas consequências causadas pela ação das EROs e do estresse oxidativo, existe um sistema antioxidante endógeno composto por enzimas. Estas são capazes de estabilizar ou desativar os radicais livres antes que se liguem às células. São elas: GPx (glutathiona peroxidase), CAT (catalase) e SOD (superóxido dismutase) (VALKO et al., 2006; NOORI, 2012; POLJSK; MILISAV, 2013).

Além desse sistema de defesa biológico que combate os efeitos provocados pelos radicais livres, vários constituintes antioxidantes que aparecem naturalmente em alguns alimentos auxiliam amplamente no reforço de tal sistema como, por exemplo, compostos fenólicos, vitamina E, vitamina C e carotenoides, retardando a oxidação celular.

Nos últimos anos, tem-se verificado um aumento do número de estudos realizados com o intuito de se encontrar compostos antioxidantes naturais presentes em frutos, inclusive

os do cerrado, por conterem um elevado conteúdo de compostos bioativos (ROESLER et al, 2007, YAHIA, 2010). Neste contexto, o araçá, fruto nativo do Brasil, da família Myrtaceae e do gênero *Psidium*, possui quantidade considerável de vitamina C e carotenoides e é rico em polifenóis, que também desempenham papel importante por meio de propriedades antiproliferativas e antitumorais (MEDINA et al., 2011).

Sendo assim, o objetivo do presente estudo é de avaliar o efeito da farinha do fruto araçá (*Psidium cattleianum* Sabine), sobre o perfil lipídico e o estresse oxidativo no soro e no tecido hepático de ratas com esteatose hepática induzida por dieta hipercolesterolêmica.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Esteatose hepática não alcoólica

A esteatose hepática não alcoólica é uma das lesões incluídas no espectro de doenças hepáticas gordurosas não alcoólicas (DHGNA). Se forma a partir do acúmulo anormal de gordura nos hepatócitos (> 5%), principalmente triacilgliceróis, formando grandes vesículas (ANDRADE; GARCÍA-ESCAÑO, 2000). O quadro de esteatose, que torna os hepatócitos mais suscetíveis a ataques, pode progredir para danos mais severos como esteatohepatite, fibrose avançada, cirrose e, esporadicamente, carcinoma hepático (BRAVO et al., 2011; CHHABRA et al., 2013)

A DHGNA possui características histológicas análogas à doença hepática alcoólica, porém, está presente em pacientes que consomem pouca ou, até mesmo, nenhuma quantidade de álcool. Sabe-se que a esteatose hepática não alcoólica pode se desenvolver devido a fatores genéticos e/ou ambientais, que alteram a modulação do metabolismo de lipídios (CLARK, BRANCATI; DIEHL, 2002; DIEHL, 2010). Corroborando com tal fato, dados mostram que a DHGNA está fortemente associada a doenças como obesidade, diabetes mellitus tipo 2, hipertensão e dislipidemia, podendo ser considerada uma manifestação hepática da síndrome metabólica (MAKADIA et al., 2013; PATELL et al., 2014).

O acúmulo de gordura no tecido hepático pode ocorrer por diferentes processos, como o excesso de lipídios oriundos da dieta, aumento da distribuição de ácidos graxos extra-hepáticos para o fígado, diminuição da secreção de VLDL, reduzida oxidação de ácidos graxos e lipogênese (BYRNE, 2012; ZHANG et al., 2014). Na esteatose hepática não alcoólica, apesar dos mecanismos de acúmulo de lipídios ainda não estarem completamente elucidados em relação à resistência à insulina, diversas evidências apontam a mesma como principal e determinante fator para o desenvolvimento da doença (ALBA; LINDOR, 2002; PAGE; HARRISON, 2010).

A progressão de esteatose hepática não alcoólica à esteatohepatite não alcoólica (EHNA) pode ser ocasionada por uma sequência de eventos, mediante cofatores secundários, como o aumento do estresse oxidativo e de citocinas, ou ainda com o uso de certas drogas terapêuticas esteatogênicas (DAY; JAMES, 1998; AMIR; CZAJA, 2011;). Nesse contexto, a esteatose isolada, com apenas o acúmulo de gordura nos hepatócitos, pode ser denominada como um primeiro *hit* e, agregada às reações necroinflamatórias, lesão hepatocelular e fibrose,

evolui para o segundo *hit*, que representa a esteatohepatite (WANG; WEI; PAGLIASSOTTI, 2006; RAHMAN, 2007).

Entretanto, a teoria dos dois *hits* vem sendo contestada, uma vez que a esteatose hepática se instala por meio de mecanismos patogênicos distintos. Podendo, por esta razão, ser melhor definida pela teoria dos múltiplos *hits*. Neste modelo, a resistência à insulina conduz ao aumento da lipogênese e aumento da absorção de ácidos graxos livres no fígado. A lipotoxicidade ocasiona sensibilidade do fígado que se torna passível à ação de vários *hits*, como ativação de células estreladas hepáticas, expressão alterada de adipocinas, ativação de vias fibrogênicas e dano oxidativo, que levam à EHNA e fibrose (YLMAZ, 2012; ZHANG et al., 2014; NASSIR; IBDAH, 2014) (FIGURA 1).

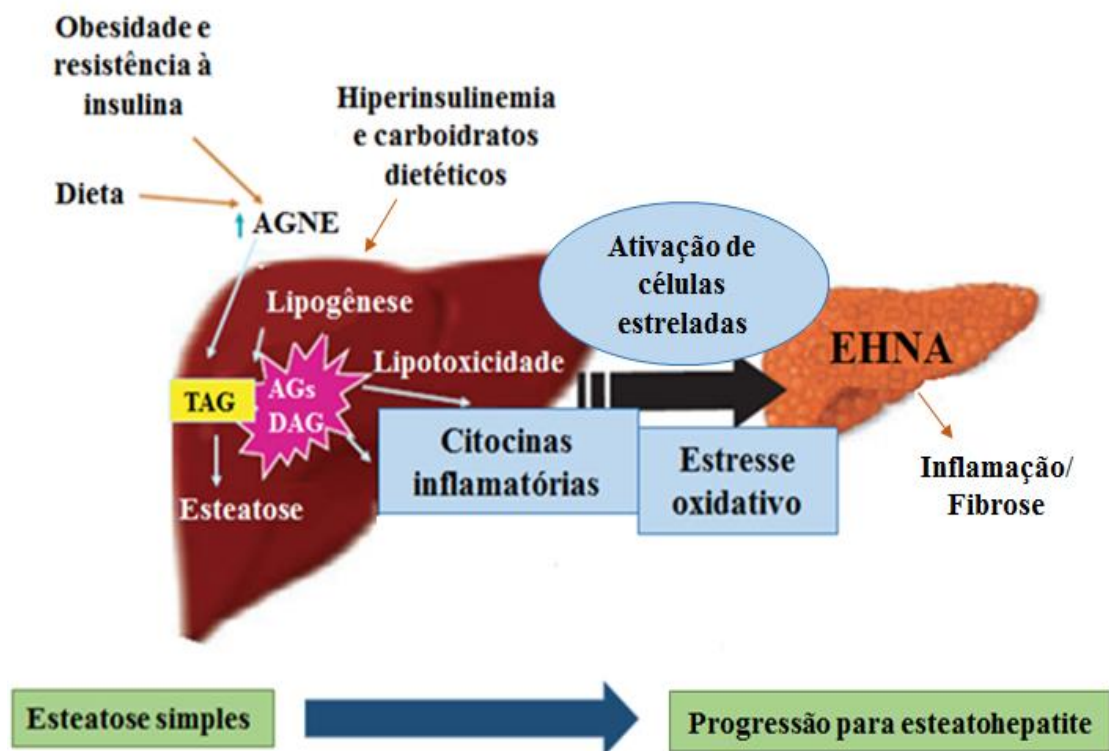


Figura 1. Progressão de esteatose hepática não alcoólica à esteatohepatite não alcoólica (EHNA) mediante cofatores secundários. AGNE: ácidos graxos não esterificados. TAG: triacilgliceróis. AGs: ácidos graxos. DAG: diacilglicerol. *Fonte:* Adaptado de BYRNE, 2012.

As adipocinas (adiponectina, leptina e resistina), sintetizadas pelos adipócitos, e as citocinas (tais como TNF- α , IL-6 e IL-1 β), presentes em células inflamatórias de infiltração do tecido adiposo, são secretadas em estados de resistência à insulina. Na DHGNA, os níveis séricos de adiponectina estão diminuídos, correlacionando-se inversamente com o conteúdo

de gordura e a resistência insulina hepática, bem como com a extensão da fibrose. Por conseguinte, níveis elevados de TNF- α e baixos níveis de adiponectina têm sido propostos como preditores independentes de DHGNA em pacientes, uma vez que baixos níveis de adiponectina no soro são associados à necroinflamação mais extensa. Quanto aos níveis séricos de resistina, estes encontram-se aumentados em pacientes com DHGNA e uma diminuição pode ser correspondente à melhora da sensibilidade à insulina hepática e diminuição do teor de gordura no fígado. Em contrapartida, a leptina tem sido ligada positivamente com o conteúdo de gordura hepática, porém, não com a inflamação ou a fibrose em pacientes com EHNA. As células de Kupffer e células estreladas hepáticas são recrutadas por citocinas, que contribuem para a progressão da DHGNA de esteatose para EHNA, aumentando a inflamação e fibrose. As citocinas podem afetar também a via de sinalização da insulina, desempenhando um papel importante no desenvolvimento da resistência à insulina. (LONDON; GEORGE, 2007; FERREIRA et al. 2013; RODRIGUES et al., 2014).

Além das mudanças características que estão vinculadas ao quadro de esteatose hepática, pode ocorrer também a elevação das transaminases séricas ALT, AST e γ -glutamilttransferase (GGT) (SASS; CHANG; CHOPRA, 2005). O aumento normalmente é leve e pode ser restrito a uma ou às três enzimas. O quociente AST/ALT é geralmente inferior a 1, sendo válido ressaltar que as concentrações dessas enzimas hepáticas não se correlacionam com o grau de atividade histológica e podem ser normais, mesmo na presença de doença avançada (NARCISO-SCHIAVON et al., 2010; BYRNE, 2012).

A fim de investigar com maior precisão a esteatose hepática foram desenvolvidos alguns sistemas de classificação patológica. Em 1999, Matteoni et al. desenvolveram um método de classificação para a DHGNA, dividindo-a em quatro categorias: (1) esteatose, (2) esteatose mais inflamação lobular, (3) esteatose mais balonização dos hepatócitos, e (4) esteatose mais degeneração hialina dos corpúsculos de Mallory ou fibrose. No mesmo ano, Brunt et al. criaram um sistema específico para a EHNA com o intuito de classificar e definir o estadiamento das alterações morfológicas ocasionadas, elaborando, desta forma, uma descrição mais padronizada do grau das lesões.

Já em 2002, foi desenvolvido pela *NASH Clinical Research Network* (NASH CRN) um sistema de pontuação baseado na construção de um banco de dados com observações de pacientes com esteatose; coleta de amostras clínicas para estudos genéticos, metabólicos e imunológicos da DHGNA, com foco na etiologia da doença; e avaliação de terapias promissoras para EHNA em pacientes adultos e pediátricos (KLEINER et al., 2005).

Além dos sistemas de classificação da doença, é possível realizar também a biópsia hepática. Apesar de invasivo e possuir opiniões controversas de pesquisadores, tal método possui indicações para a realização em pacientes com suspeita de esteatose hepática, para confirmar ou excluir o diagnóstico, diagnosticar outras possíveis doenças hepáticas, e para determinar o grau da lesão ao fígado para prognóstico e tratamento. Em parte, é apoiado justamente por conseguir um diagnóstico preciso e em fases mais iniciais que possibilitam uma intervenção precoce (NALBANTOGLU; BRUNT, 2014).

Histologicamente há dois tipos de esteatose: macro e microvesicular (FIGURA 2). A esteatose macrovesicular é descrita como um grande vacúolo de lipídio, que desloca o núcleo do hepatócito para a periferia, e é mais a mais comum na DHGNA. Já a esteatose microvesicular, é caracteristicamente definida por pequenos vacúolos lipídicos no citoplasma do hepatócito, não ocasionando o deslocamento periférico do núcleo (LEE et al, 2013). Clinicamente, a esteatose macrovesicular é considerada uma condição benigna e reversível, enquanto que a microvesicular é mais severa e possui um prognóstico menos favorável (SHIN et al., 2012).

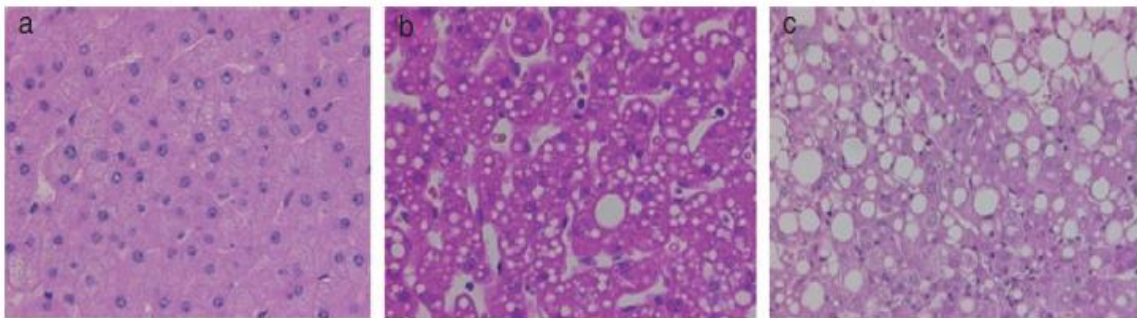


Figura 2. Biópsias hepáticas pós-reperfusão, coradas com hematoxilina-eosina. (a) Nenhuma esteatose, (b) 5% esteatose macrovesicular, 95% esteatose microvesicular, e (c) 70% esteatose macrovesicular, 5% esteatose microvesicular. *Fonte:* GRAAF et. al., 2012.

O estágio de esteatose é normalmente avaliado e relatado semi-quantitativamente. O método mais reprodutível segue a arquitetura acinar, dividindo o parênquima hepático e avaliando a porcentagem de hepatócitos envolvidos: 5% - 29%, leve; 30% - 59% moderada ou $\geq 60\%$, esteatose severa (GRAAF et al., 2012).

A DHGNA é a etiologia mais comum de doença hepática crônica nos Estados Unidos e em outros países desenvolvidos (STARLEY; CALCAGNO; HARRISON, 2010). Pode afetar qualquer faixa etária e acomete a maioria das raças, porém, a maior prevalência está presente na população hispânica, seguida por brancos não-hispânicos, asiáticos e afro-americanos. Esta prevalência ainda é consideravelmente superior em adultos obesos (80% a

90%), em pacientes com hiperlipidemia (60%) e em pacientes com diabetes (30% a 50%) (NALBANTOGLU; BRUNT, 2014). Alguns trabalhos também relataram recentemente que o sexo masculino é mais predisposto à doença do que o sexo feminino, como foi visto em um estudo com 26.527 pacientes submetidos a exames médicos, onde a prevalência de DHGNA foi de 31% em homens e 16% nas mulheres (CHALASANI et al., 2012).

Até o momento, o melhor tratamento estabelecido para a DHGNA implica na mudança do estilo de vida dos pacientes por meio da prática regular de atividade física e alimentação saudável e equilibrada. O objetivo final é principalmente a perda de peso, bem como melhora da sensibilidade à insulina, do controle glicêmico, da dislipidemia e das outras alterações comumente associadas à doença (RYAN et al., 2013; NSEIR; HELLOU; ASSY, 2014).

2.2 Esteatose hepática não alcoólica – Modelo animal

Dados com modelos animais de esteatose hepática e esteatohepatite têm fornecido uma base primordial para a investigação clínica destas doenças. O contínuo estudo em animais viabiliza o maior esclarecimento sobre a patogênese das mesmas e, conseqüentemente, pode proporcionar maior eficácia no diagnóstico e tratamento da DHGNA em humanos (KOTEISH; DIEHL, 2002; TAKAHASHI; SOEJIMA; FUKUSATO, 2012).

Assim como ocorre em pessoas, em animais experimentais a esteatose hepática é contundentemente relacionada com obesidade, diabetes e dislipidemia. Existem alguns modelos que são mais amplamente estudados como animais com alterações genéticas (camundongos ob/ob e camundongos db/db) e dietas com deficiência de nutrientes (deficiência de colina e metionina). Porém, estes não conseguem representar a situação humana, uma vez que o modelo ideal de DHGNA/EHNA deve refletir tanto a histopatologia quanto a fisiopatologia da DHGNA (LONDON; GEORGE, 2007; BRAVO et al., 2011).

Diferentes ensaios já foram descritos por induzir esteatose hepática em ratos por alimentação de uma dieta rica em gorduras, o que exibe um exemplo real e mais equivalente para os fatores que se acredita desencadear a doença na população humana.

Svegliati-Baroni et al. (2006) utilizaram uma dieta com alto teor de gordura (58% das calorias totais) em ratos não modificados geneticamente. Os autores verificaram que os ratos alimentados com essa dieta desenvolveram resistência à insulina, obesidade, aumento do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), diminuição de receptor ativado por proliferador de peroxissomo alfa (PPAR- α) e adiponectina, bem como outras modificações características da

doença em questão. Lieber et al. (2004) e Safwat et al. (2009) obtiveram efeitos semelhantes quando alimentaram ratos com uma dieta com 71% e 57%, respectivamente, de energia a partir de gordura, concluindo também que este experimento pode proporcionar um bom modelo para as fases iniciais da esteatose hepática.

Kitamori et al. (2012) demonstraram o desenvolvimento de esteatohepatite e progressão à fibrose severa em ratos espontaneamente hipertensos induzida por dieta rica em gordura/colesterol. Outra experiência verificou ainda que uma dieta modificada com níveis mais elevados de gordura aliada à uma dieta deficiente em colina e metionina é capaz de induzir não só o desenvolvimento de obesidade e resistência à insulina, visto na esteatose hepática, mas também de reproduzir a maioria das características histológicas de esteatohepatite humana (CONG et al., 2008).

Trabalhos realizados na Universidade Federal de Ouro Preto, no Laboratório de Nutrição Experimental (LABNEX) da Escola de Nutrição, por Turbino-Ribeiro et al. (2003) e Matos et al. (2005) mostraram que uma dieta hipercolesterolêmica, com 25% de óleo de soja e 1% de colesterol, é eficaz em promover alteração no perfil lipídico e na atividade sérica das transaminases, indicando possível lesão hepática. Souza et al. (2010) observaram aumento do estresse oxidativo e dos níveis de colesterol, além de dano hepático caracterizado por hepatomegalia e aumento da atividade de ALT, AST e FA. Em adição, Abreu et al (2014) verificaram que a mesma dieta é igualmente eficaz para o estudo da DHGNA, visto que os ratos alimentados com a dieta hipercolesterolêmica apresentaram além de alterações no perfil lipídico, estresse oxidativo e atividade das enzimas séricas, degeneração hepática indicada por esteatose macro e microvesicular.

Conforme descrito acima, é possível afirmar que a dieta hipercolesterolêmica (rica em gordura e colesterol) em modelo animal é propícia para o desenvolvimento do conhecimento sobre a esteatose hepática.

2.3 Estresse oxidativo e esteatose hepática não alcoólica

Os radicais livres constituem espécies que possuem um ou mais elétrons desemparelhados em seu orbital mais externo, sendo caracterizados pela sua instabilidade química e alta reatividade. Podem ser produzidos nas células e tecidos do organismo por inúmeros processos e reações. As espécies reativas do oxigênio (EROs), um tipo de radicais, são consequência natural do metabolismo aeróbico e fundamentais para manter a homeostase

do oxigênio nos tecidos (SLATER et al., 1985; DIZDAROGLU et. al, 2002; NARANG et al., 2011; FERREIRA; FERREIRA; DUARTE, 2007).

Essas espécies podem ser produzidas a partir de fontes endógenas, tal como mitocôndrias, peroxissomos e por ativação de células inflamatórias, ou de fontes exógenas, incluindo agentes ambientais, produtos farmacêuticos, e produtos químicos industriais. Em face da redução univalente do O_2 são gerados radicais superóxido ($O_2^{\cdot-}$), íons hidroxila (OH^{\cdot}), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e peróxidos lipídicos (LOOH) (KLAUNIG; KAMENDULIS; HOCEVAR 2010; AFANAS'EV, 2010). Esse processo se dá mediante reações específicas, catalisadas por enzimas (lipoxigenases, peroxidases, NADPH oxidase e xantina oxidase) e com a participação dos íons ferro e cobre (Reação de Haber-Weiss) (FIGURA 3) (KAMATA; HIRATA, 1999; BLOKHINA; VIROLAINEN; FAGERSTEDT 2003).

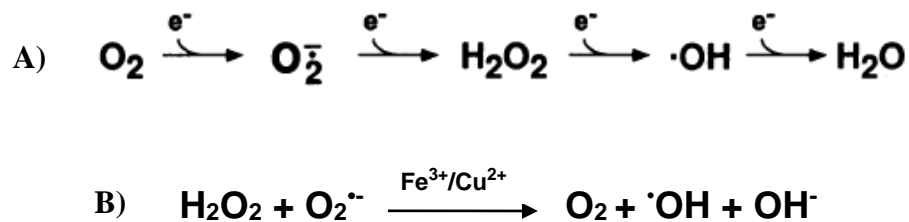


Figura 3. A) Oxidantes do metabolismo normal. Formação de radicais superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e íons hidroxila (OH^{\cdot}) pela redução do O_2 . B) Reação de Haber-Weiss com formação de íons hidroxila. *Fonte:* AMES; SHIGENAGA; HAGEN, 1993. KLAUNIG; KAMENDULIS; HOCEVAR 2010; FERREIRA; FERREIRA; DUARTE, 2007.

Quando produzidas em concentrações que não podem ser adequadamente neutralizadas por sistemas antioxidantes endógenos, as EROs podem levar à oxidação de biomoléculas como lipídios, proteínas e ácidos nucleicos. A modificação oxidativa destas moléculas leva a uma ruptura da sinalização e do controle redox, causando perda da funcionalidade celular por meio de um estado denominado estresse oxidativo (CERUTTI; TRUMP, 1991; MANEA et al., 2012; LIOCHEV, 2013). A cronicidade desse processo possui relevantes implicações sobre o fator etiológico de várias patologias, dentre elas, a esteatose hepática.

A patogênese da DHGNA é multifatorial e inclui alterações no metabolismo lipídico, disfunção mitocondrial, estresse do retículo endoplasmático, inflamação e estresse oxidativo, por desequilíbrio do controle redox. Sabe-se que os radicais livres exercem determinante função na ativação ou inibição de vias de sinalização que modulam o metabolismo dos lipídios celulares. Além disso, dados da literatura sugerem que o aumento dos níveis das

EROs pode induzir também vias de sinalização específicas que desencadeiam a resistência à insulina (a qual está intimamente relacionada ao acúmulo de lipídios) implicando, dessa forma, no desenvolvimento precoce da esteatose hepática (SERVIDDIO; BELLANTI; VENDEMIALE, 2013).

Com o objetivo de combater o excesso de lipídios, os hepatócitos aumentam a β -oxidação tentando neutralizar e evitar o acúmulo no fígado. Porém, este aumento envolve maior produção de radicais livres, com conseqüente peroxidação lipídica e estresse oxidativo, gerando também maior probabilidade de inflamação hepática e esteatose (CHANG et al., 2011). A oxidação microsossomal também participa da resposta adaptativa induzida pelo acúmulo de lipídios e na desordem do equilíbrio redox. Em particular, os citocromos P4502E1 e P4504A (enzimas microsossômicas hepáticas) são as principais fontes microsossomais de estresse oxidativo na DHGNA. Ambos estão relacionados com o aumento da peroxidação lipídica e geração de substâncias pró-oxidantes como o peróxido de hidrogênio, radical hidroxil e ânions superóxido, causando citotoxicidade. Ainda, a alta atividade destas enzimas está comumente associada com obesidade, diabetes e hiperlipidemia. (ROBERTSON; LECLERCQ; FARRELL, 2001; FULDA et al., 2010).

Dentre outros fatores, a progressão da esteatose simples à EHNA pode ser conseqüência da lipotoxicidade hepática causada pelo excesso de ácidos graxos que estimulam uma produção excessiva de EROs. De certa forma, os mesmos agem ativando uma variedade de respostas intracelulares, resultantes do estresse lipotóxico, tanto na mitocôndria quanto no retículo endoplasmático, conduzindo à disfunção e morte celular por apoptose (NANJI, 2004; TRAUNER; ARRESE; WAGNER, 2010; FUCHS; SANYAL, 2012).

A fim de impedir ou diminuir essas conseqüências causadas pela ação das EROs e do estresse oxidativo, existe um sistema antioxidante endógeno composto por enzimas. Estas são capazes de estabilizar ou desativar os radicais livres antes que se liguem às células. Os antioxidantes enzimáticos envolvem a GPx (glutathiona peroxidase), a CAT (catalase) e a SOD (superóxido dismutase) (VALKO et al., 2006; NOORI, 2012; POLJSKAK; MILISAV, 2013).

Existem três isoformas da SOD: SOD-Cu/Zn citosólica (SOD1), SOD-Mn (SOD2) mitocondrial e SOD-extracelular (SOD3). Independentemente de sua isoforma, a SOD é responsável por catalisar a dismutação do $O_2^{\cdot-}$ em H_2O_2 . Proteínas GPx consomem glutathiona (GSH) para converter H_2O_2 em água e oxigênio molecular. Nesta redução, duas moléculas de GSH são oxidadas formando a glutathiona oxidada (GSSG). A enzima glutathiona redutase volta a reduzir uma molécula de GSSG para duas moléculas de GSH, permitindo, assim, a ação contínua da enzima glutathiona peroxidase. E a catalase, uma enzima intracelular que está

localizada principalmente nos peroxissomos celulares e em menor quantidade no citosol, catalisa a reação de H_2O_2 em H_2O e O_2 (DAVIES, 2000; LIMÓN-PACHECO; GONSEBATT, 2009; CHEN et al., 2012; RAHAL et al., 2014).

2.4 Alimentos funcionais

Além dos antioxidantes enzimáticos, endógenos, existem também os antioxidantes não-enzimáticos, obtidos de fonte exógena. Estes são derivados principalmente de alimentos, os quais podem ser chamados de funcionais.

O conceito de alimentos funcionais foi proposto inicialmente no Japão a partir dos anos 80. Conhecidos como FOSHU (*foods for specified health use* – alimentos para uso específico da saúde), tiveram produção e comercialização pioneira no país como parte de um programa de ações que visavam reduzir a incidência de doenças e os seus respectivos custos, considerando a faixa etária cada vez mais avançada na população. Com isso, foi criada também a primeira regulamentação específica para os alimentos funcionais, sendo que, atualmente, cada país possui sua própria legislação bem como critérios para a aprovação e denominações das alegações para esses alimentos (ARAI et al., 1996; HASLER, 1998; STRINGHETA et al., 2007).

Como exemplo, alguns países adotam como definição de alimentos funcionais ingredientes naturais que atuam melhorando vias metabólicas específicas. Em contrapartida, a American Dietetic Association (ADA) designa os alimentos fortificados e modificados como alimentos funcionais, justificando seus efeitos benéficos à saúde, quando consumidos como parte de uma dieta variada, em níveis efetivos (ADA REPORTS, 2004).

No Brasil, desde a década de 90 já haviam pedidos de análise de diversos produtos até então não reconhecidos como alimentos. Porém, a regulamentação técnica para análise de novos alimentos e ingredientes, inclusive os alimentos com alegações de propriedades funcionais e/ou saúde, foi formulada somente em 1998. Em 1999, quando a análise de alimentos passou a examinar critérios de riscos, a Anvisa (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) constituiu a Comissão Técnico-Científica de Assessoramento em Alimentos Funcionais e Novos Alimentos (CTCAF), a fim de subsidiar a Diretoria de Alimentos e Toxicologia nas decisões relacionadas com esse tema (ANVISA, 1999; COSTA; ROSA, 2010).

Ficando clara a necessidade de as alegações estarem de acordo com as políticas do Ministério da Saúde e serem de fácil compreensão pelos consumidores quanto às propriedades

funcionais dos alimentos ou de seus componentes, a regulamentação até então estabelecida foi revisada em 2005. Embasados em atualizações científicas sobre o assunto, ficaram definidos dois conceitos: alegação de propriedade funcional e alegação de propriedade de saúde. A alegação de propriedade funcional corresponde ao papel metabólico ou fisiológico que o nutriente ou não nutriente desempenha no crescimento, no desenvolvimento, na manutenção e em outras funções normais do organismo humano. E a alegação de propriedade de saúde afirma, sugere ou implica a existência de relação entre o alimento ou ingrediente e a doença ou condição relacionadas à saúde (ANVISA, 1999; ANVISA, 2004; LAJOLO, 2002).

É possível observar que a legislação brasileira não especifica o que é um alimento funcional, apenas define o que é uma alegação de propriedade funcional. Porém, ficam proibidas indicações de propriedades medicinais ou terapêuticas e referências à cura e/ou prevenção de doenças. Torna-se importante destacar que a resposta aos alimentos funcionais pode variar de acordo com fatores genéticos, estado fisiológico e a composição total da dieta. O benefício de um alimento funcional será limitado se o alimento não fizer parte da dieta (MILNER, 1999; TORRES, 2002).

O interesse pelos alimentos funcionais tornou-se uma tendência global e têm atraído a atenção dos consumidores e das indústrias de alimentos. Da mesma forma, tem-se verificado um aumento do número de estudos realizados com o intuito de se identificar mais alimentos, principalmente frutos, que possam ser caracterizados como funcionais. Esta atração é particularmente atribuída ao fato de existir uma relação inversa entre a gravidade do estresse oxidativo induzido em algumas doenças e os níveis de antioxidantes, indicando que a capacidade antioxidante seja altamente benéfica ao organismo (AMES; SHIGENAGA; HAGEN, 1993; LOBO; PATIL; CHANDRA, 2010).

Nesse contexto, os alimentos funcionais, ricos em compostos antioxidantes, atuam reforçando a ação do sistema enzimático endógeno inibindo ou interrompendo a propagação das reações oxidativas promovidas pelos radicais livres. Dentre esses compostos destacam-se o ácido ascórbico (vitamina C), o tocoferol (vitamina E), os compostos fenólicos e os carotenoides (BIANCHI & ANTUNES, 1999; NETO *et al.*, 2012; HARIRI *et al.*, 2013).

O ácido ascórbico (vitamina C) é um dos antioxidantes mais estudados. Desempenha um importante papel no organismo humano, auxiliando na formação de tecido conjuntivo, no transporte de íons e proteção celular. Sua capacidade de doar elétrons, atuando como cofator, numa grande variedade de reações o torna o principal composto antioxidante na fase aquosa. Pode eliminar diretamente radical superóxido e íons hidroxila por meio da atividade da ascorbato peroxidase. E, a proteção completa contra a oxidação lipídica e os danos causados

por este processo parece envolver também a vitamina E (NOCTOR; FOYER, 1998; RONSEIN *et al.*, 2004; BARATA-SOARES *et al.*, 2004).

A vitamina E é um antioxidante de quebra de cadeia, ou seja, é capaz de reparar diretamente os radicais livres evitando o passo de propagação da cadeia durante a oxidação de lipídios. A reação entre a vitamina E e os radicais lipídicos ocorre na interfase membrana-água, onde a vitamina E doa um íon hidrogênio para radical lipídico com conseqüente formação do radical tocoferoxil (TOH[•]). Após esta reação o tocoferol pode ser regenerado pela ação do ascorbato, da glutatona ou da coenzima Q. Além disso, atuam como agentes tocoferóis de limpeza de radicais oxigênio, especialmente o oxigênio singlete (com oxidação irreversível de tocoferol) (BUETTNER, 1993; BURDON, 1995; BLOKHINA; VIROLAINEN; FAGERSTEDT 2003).

Os compostos fenólicos são encontrados em uma ampla variedade de alimentos vegetais comumente consumidos, tais como frutas, legumes, cereais e leguminosas, e em bebidas de origem vegetal, como o vinho, chá e café. Estes estão relacionados com a atividade antioxidante, atuando na captura de radicais livres e na inibição da peroxidação de lipídios, (COUTINHO *et al.*, 2008). Além da propriedade antioxidante, os compostos fenólicos têm capacidade de inibir a síntese de colesterol endógeno e diminuir a atividade da lipase pancreática (REHRAH *et al.*, 2007).

Também de grande importância, os carotenoides são alguns dos mais potentes antioxidantes à base de lipídios presentes na dieta. Estão presentes em muitos alimentos, principalmente frutas, vegetais e peixes. Atuam neutralizando radicais livres e eliminando danos oxidativos em compartimentos lipofílicos. Sua eficácia está diretamente relacionada com a quantidade de duplas ligações conjugadas presente na molécula. Além disso, possuem impacto fundamental na ação imunomoduladora, consistindo em um dos principais mecanismos da defesa endógena do organismo. Fazem parte deste grupo o licopeno, o β -caroteno e as xantofilas (RAHMAN, 2007; VASCONCELOS *et al.*, 2007; JR & RENZI, 2013).

2.5 O fruto araçá (*Psidium cattleianum* Sabine)

O Brasil apresenta um dos principais centros de diversidade genética do planeta, com mais de 55.000 espécies distribuídas em cinco principais biomas: Amazônia, Cerrado, Mata Atlântica, Pantanal e Planícies do Pampa. No Bioma Cerrado já foram registradas mais de 12 mil espécies de plantas vasculares, das quais possuem utilização regional e muitas se

enquadram em mais de um tipo (MEDINA et al., 2011). De maneira geral, as plantas nativas do Cerrado possuem utilidades importantes para a propriedade rural e várias espécies destacam-se pela importância alimentar, madeireira, tintorial, ornamental, corticeira, melífera e outros usos (EMBRAPA, 2009).

Atualmente, são mais de 58 espécies de frutas nativas conhecidas e utilizadas pela população tradicional que vive no Cerrado, com as quais é possível garantir a diversificação e o enriquecimento da alimentação humana. Apesar da ampla distribuição e importância das suas espécies, são escassos os estudos taxonômicos e que avaliam o potencial destes como alimentos funcionais. (ROCHA et al., 2008).

Segundo HAAS (2011), dentre as espécies frutíferas nativas, a família Myrtaceae é uma das mais conhecidas devido ao grande potencial tecnológico que a ela é atribuído. Atinge em torno de 100 gêneros e 3.500 espécies de árvores e arbustos disseminados por quase todos os continentes. No Brasil, a família Myrtaceae é representada por cerca de 1000 espécies, sendo uma das mais importantes. Nessa família está incluído o gênero *Psidium*, ao qual pertencem, além das goiabeiras, os araçazeiros, que apresentam ampla distribuição no território brasileiro, ocorrendo desde o Rio Grande do Sul até a Amazônia, bem como em outras partes do mundo.

O nome araçá vem do tupi ara'sa, ou do guarani ara (céu) e aza (olho), que significa fruta com olhos ou olhos do céu. Apresenta pelo menos 3 diferentes tipos: araçá comum, araçá boi e araçá pera, sendo ainda pouco conhecido e utilizado para o consumo humano. Entretanto, as espécies que merecem destaque, atualmente, são *Psidium cattleianum* Sabine (figura 4) e *Psidium guineense*, principalmente pelas características de seus frutos, como o sabor exótico e boa aceitação. (GIACOBBO et al., 2008; EMBRAPA,2009). A polpa é suculenta e possui sabor doce-ácido, agradável, podendo ser consumida *in natura* ou na forma de doces, geleias, sucos e sorvetes (SILVA; PEREZ; PAULA; 2010).



Figura 4: *Psidium cattleianum* Sabine (araçá amarelo). Fonte: próprio autor.

O araçá comum é popularmente conhecido como araçá-do-mato, araçá-do-campo e araçá-amarelo (FETTER et al., 2010). Essa espécie pode ser dividida em dois fenótipos diferentes, araçá-amarelo, utilizado no presente estudo, e araçá-vermelho, de acordo com a coloração dos seus respectivos frutos. E, sua safra, ocorre entre os meses de fevereiro a abril (CRIZEL et al., 2012). De forma geral, o arbusto varia de 1 a 10 m com córtex amarelado ou castanho - avermelhado, com manchas claras; folhas glabras, pecioladas; flores solitárias, axilares ou às vezes abaixo das folhas; botões florais piriformes ou obovados e frutos pluri-seminados, elíptico-globosos ou obovados, amarelos ou vermelhos quando maduros (FIGURA 5). (PEDROSA-MACEDO et al., 2007).

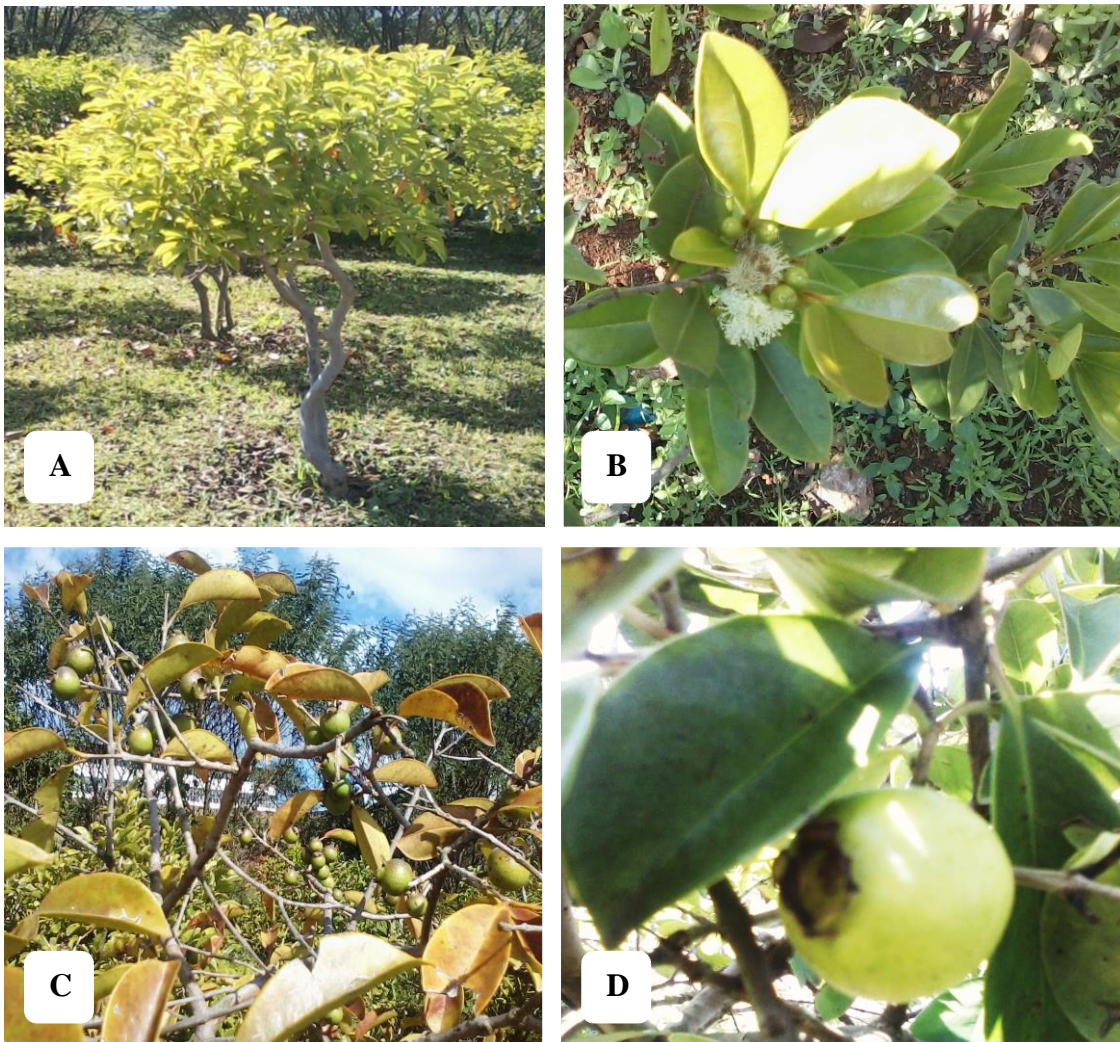


Figura 5: A) araçazeiro B) flores solitárias, axilares; C) frutos pluri-seminados; D) fruto amarelado, maduro. *Fonte:* próprio autor.

Análises prévias indicaram que ocorrem diferenças na anatomia do lenho e na morfologia foliar dos dois grupos de *Psidium cattleianum*. Segundo alguns estudos já

realizados, há essa diferença nas denominações taxonômicas devido ao fato de não haver consenso entre os especialistas, além de as categorizações não serem utilizadas no momento das determinações (FETTER et al., 2010).

Ainda, são encontradas na literatura duas formas ortográficas em relação ao nome da espécie, *Psidium cattleianum* ou *Psidium cattleyanum*. A segunda forma faz referência ao nome do horticultor inglês que cultivou essas sementes, William Cattley. Porém, a primeira, é a maneira correta de se escrever devido à latinização implícita do nome “Cattley” para “Cattleius”, segundo o Código Internacional de Nomenclatura Botânica, onde as latinizações intencionais devem ser mantidas (PEDROSA-MACEDO et al., 2007).

Sabe-se que as espécies de frutas nativas contêm, além dos nutrientes essenciais e de micronutrientes, diversos compostos secundários, como os pigmentos naturais, que atuam como antioxidantes. E ainda, que os teores de minerais e desses compostos bioativos são significativamente maiores em frutas silvestres do que em plantas domesticadas (SOUSA et al., 2012). Essas substâncias bioativas ou metabólitos secundários são também conhecidos como fitonutrientes ou fitoquímicos. Devido as suas importantes propriedades, efeitos biológicos e seus atributos sensoriais, vêm ocupando uma área de grande investigação, pela a enorme variedade de alimentos que os contêm (PEREIRA, 2011; DANTAS, 2011).

Diversos estudos sugerem que o estresse oxidativo e a inflamação são importantes desencadeadores dos efeitos deletérios do envelhecimento e do desenvolvimento de doenças neurodegenerativas relacionadas à idade. E que, os fitoquímicos de plantas alimentares podem exercer efeitos benéficos através de sua capacidade de atenuar esse estresse oxidativo gerado e suas principais consequências (RAMIREZ et al., 2012).

Estudos anteriores comprovaram que as plantas pertencentes ao gênero *Psidium* possuem propriedades anti-inflamatórias, analgésicas e anti-mutagênicas. Mais especificamente, experimentos com o araçá identificaram alta atividade antioxidante e alto conteúdo fenólico, sugerindo que, apesar das poucas investigações sobre o fruto, este possui grande potencial nutricional e funcional (MEDINA et al., 2011). Há também alguns estudos farmacológicos e *in vivo* com o extrato das folhas de *P. cattleianum*, que corroboram que as mesmas possuem ação antimicrobiana, antidiarreica e analgésica (SOUZA et al., 2003; ALVARENGA et al., 2013). Além disso, análises químicas do óleo essencial das folhas de *P. cattleianum* verificaram a presença de 21 componentes, 92,6% do óleo total, dos quais se destacaram α -tujeno (25,2%), 1,8-cineol (16,4%), (Z)-cariofileno (10,2%), valence (8,0%), mirceno (5,0%), dentre outros (JR. GUERRERO et al.).

A determinação dos componentes orgânicos e inorgânicos do fruto, ao longo do seu desenvolvimento, também é amplamente válido para o entendimento de processos metabólicos e nutricionais do próprio vegetal. Considerando os elementos minerais, é possível verificar que há um acúmulo maior nas fases iniciais de desenvolvimento do araçá, ocorrendo uma queda desses constituintes ao longo do grau de maturação. GALHO et al. (2007) observaram que quando o fruto já está completamente maduro, em torno de 122 dias, há um maior teor do elemento nitrogênio, seguido de potássio, cálcio, magnésio e fósforo. Por outro lado, em outro estudo realizado, o araçá amarelo se destacou pelo elevado teor de Na (828,78 µg/g) e o vermelho de Co (3,27 µg/g) (PEREIRA, 2011).

Em relação à composição química do araçá, foi encontrado um alto teor de umidade, carboidratos e fibras totais e insolúveis (TABELA 1) (PEREIRA et al., 2012). GALHO et al. (2007), também verificaram alta concentração de carboidratos nos frutos, sendo os maiores componentes orgânicos. Além disso, foi constatado que os conteúdos de amido, carboidratos solúveis totais, açúcares redutores, lipídeos e ácidos orgânicos aumentaram com a idade do fruto de araçá, principalmente na fase de maturação, enquanto os teores de proteína e os componentes da parede celular diminuíram.

Tabela 1. Composição química do araçá amarelo, da família Myrtaceae nativa do sul do Brasil

Composição (g/100g)	Araçá amarelo
Umidade ¹	83.31 ± 0.01
Cinzas ¹	0.63 ± 0.01
Proteína ²	4.24 ± 0.13
Lipídios ²	1.53 ± 0.01
TDF ²	11.95 ± 0.17
IDF ²	11.55 ± 0.06
Carboidratos ²	15.08 ± 0.04
Açúcares totais ²	22.74 ± 0.39
Açúcar reduzido ²	18.6 ± 0.03

Os valores são expressos como média ± desvio padrão. As letras nas linhas indicam que não há diferença significativa a nível de 5%. ¹: matéria fresca. ²: matéria seca. TDF: fibra dietética total. IDF: fibra dietética insolúvel. *Fonte:* PEREIRA, 2011.

O araçá também se destaca devido à presença de luteína, representando cerca de 63,9% do conteúdo total, que está entre os carotenoides considerados de grande importância

para a saúde (PEREIRA *et al.*, 2012). A luteína, juntamente com a zeaxantina, possui efeito protetor contra a degeneração macular, sendo constituinte do pigmento de cor amarela da mácula da retina humana (RODRIGUES-AMAYA, KIMURA, AMAYA-FARFAN, 2008).

RASEIRA & RASEIRA (1996), além de descrever sobre a planta em si, o sistema de reprodução, formas de colheita e utilização, constataram em seu estudo que os frutos de araçá possuem um alto teor de vitamina C (326mg/ 100g da parte comestível dos frutos), sendo este valor maior até mesmo do que a laranja e o limão, que são consideradas boas fontes da vitamina.

Alguns estudos consideram o araçá rico em compostos fenólicos, pois demonstra teores consideravelmente mais elevados do que os observados em outros frutos consumidos tradicionalmente. Análises individuais de polifenóis mostraram que o conteúdo de maior destaque é a (-)-epicatequina, seguida do ácido gálico, representando 69,2% e 29,5%, respectivamente, dos compostos fenólicos totais. Apresenta também, porém em menor quantidade, ácido cumárico, ácido ferúlico, miricetina e quercetina. É válido ressaltar que a (-)-epicatequina presente em alimentos contribui para a redução dos riscos de desenvolvimento de doenças cardiovasculares, devido ao seu potencial antioxidante, desempenhando também papel na vasodilatação e redução da pressão sanguínea, além de forte potencial antimicrobiano (HAAS, 2011).

Contudo, embora os estudos se concentrem na quantificação de substâncias responsáveis pelas propriedades funcionais do araçá, as informações são pontuais e incipientes e, não se encontra disponível qualquer avaliação biológica sobre o efeito do fruto na esteatose hepática. Além disso, conhecendo os benefícios do araçá, a médio e longo prazo, este pode ser inserido em sistemas produtivos, com grande potencial a ser explorado. Ainda, o uso de espécies nativas pode ser uma alternativa para a exploração sustentada nas diversas regiões do país, constituindo-se em uma espécie de importância principalmente para o pequeno produtor rural.

3 OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Avaliar o efeito da farinha do fruto araçá (*Psidium cattleianum* Sabine) sobre o perfil lipídico e o estresse oxidativo no soro e no tecido hepático de ratas com esteatose hepática induzida por dieta hipercolesterolêmica.

3.2. Objetivos Específicos

I – Obtenção da farinha de araçá.

II – Avaliar a qualidade nutricional do fruto realizando a composição centesimal e a atividade antioxidante “in vitro” da farinha do fruto araçá.

III– Avaliar características físicas dos animais e ingestão da dieta.

IV – Realizar avaliação bioquímica nutricional através de metabólitos e enzimas séricas.

V – Avaliar marcadores de dano oxidativo.

VI - Avaliar a esteatose hepática por meio da análise histológica do tecido e da quantidade de gordura no fígado dos animais.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Coleta dos frutos e obtenção da farinha

Os frutos analisados, araçá amarelo, foram provenientes de árvores presentes na Universidade Federal de Ouro Preto, em Ouro Preto – MG, colhidos nos meses de maio e junho. Os frutos foram pré-selecionados, sendo descartados aqueles que apresentavam qualquer tipo de lesão. Para a obtenção da farinha foi aguardada a completa maturação dos mesmos (uma semana após a colheita), pois alguns ainda apresentavam epicarpo de coloração verde amarelada. Após o ponto de maturação esperado (cor amarelada), os frutos foram lavados em água filtrada, secos em estufa a 40°C (durante três dias) e pulverizados. A farinha foi armazenada em saco plástico específico para alimentos e armazenada em geladeira a 4°C. Foi utilizada toda a parte comestível do fruto, ou seja, casca, polpa e sementes.

4.2 Confeção das exsiccatas e depósito de material testemunho no acervo do Herbário Professor José Badini (OUPR)

Para a confecção das exsiccatas foram coletadas três amostras de material fértil (com flores adultas) com tesoura de poda manual. Para o processamento (herborização das amostras) foram utilizadas folhas de jornal, papelão e prensas de madeira. Em seguida, o material foi colocado em estufa à 37°C durante uma semana, até apresentar-se completamente seco. As exsiccatas prontas foram entregues à curadoria do herbário. Foi realizado o preenchimento de uma planilha com os dados da planta coletados em campo, de acordo com as instruções recebidas, e enviada para o endereço de e-mail do herbário. Após esses procedimentos foram recebidos uma ficha e o registro de depósito da planta para fins de arquivamento. O número de registro do araçá depositado foi: OUPR 28376.

4.3 Composição centesimal

Uma amostra da farinha de araçá foi separada para a determinação de umidade, proteínas, lipídios totais, cinzas, fibras e carboidratos. As análises foram realizadas no Laboratório de Nutrição Experimental da Escola de Nutrição, Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP).

A umidade foi determinada utilizando-se o método de secagem em estufa à 105°C, até peso constante, conforme descrito pela AOAC (1998). Para a determinação de proteínas, a partir da obtenção do teor de nitrogênio total, foi usado o método de Kjeldahl (AOAC, 1998). O teor de cinzas foi obtido por meio da calcinação da amostra em mufla com temperatura entre 550 e 600° por 20 a 30 min, como preconizados pela AOAC (1998). Os lipídios totais foram extraídos com éter de petróleo, onde o extrator utilizado foi do tipo Soxhlet, conforme procedimento descrito nas Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz (2008). Para as fibras utilizou-se o método de determinação de fibra em detergente neutro - aparelho digestor para fibra Tecnal/TE-149. Este método consiste em um processo rápido para a determinação da fibra total em alimentos. A fibra em detergente neutro (FDN) é constituída por celulose, hemicelulose e lignina. Por fim, os teores de carboidratos foram determinados por diferença em relação aos demais componentes.

4.4 Capacidade antioxidante da farinha de araçá

A capacidade antioxidante da farinha de araçá foi determinada através do método do 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH) (BRAND-WILLIAMS *et al*, 1995). Esse método baseia-se na transferência de elétrons de um composto antioxidante para o radical DPPH em solução de metanol.

As determinações foram realizadas adicionando em tubos de ensaio, 3,9 mL de solução de DPPH 60 µM, dissolvidos em metanol 80%, e 100 µL de solução com a farinha em diferentes concentrações e de água destilada (amostra controle).

Utilizou-se Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico) como antioxidante de referência. Do mesmo modo, foram adicionados em tubos de ensaio 3,9 mL de solução de DPPH e 100 µL de solução de Trolox em diferentes concentrações (100 a 1000 µM) em metanol 80%.

Logo após, cada tubo foi homogeneizado e mantido na ausência de luz por 30 minutos à temperatura ambiente. A atividade foi determinada através da redução da absorbância do radical DPPH a 515nm; mais metanol 80% (sem a presença de antioxidantes), obtida a 515nm. Os valores de absorbância versus a concentração de Trolox foram usados para construir um gráfico. Foi realizada uma regressão linear, onde a equação da reta e os valores de absorbância das amostras constituíram o cálculo da capacidade antioxidante (Trolox equivalent antioxidant capacity - TEAC), expressos em µM de equivalente de Trolox/g.

4.5 Conteúdo de polifenóis totais da farinha de araçá

O conteúdo de polifenóis totais foi determinado pelo método de Folin-Ciocalteu como descrito por GEORGÉ *et al* (2005). Neste método o reagente de Folin-Ciocalteu, uma mistura dos ácidos fosfotungstíco ($H_3PW_{12}O_{40}$) e fosfomolibdico ($H_3PMo_{12}O_{40}$), se reduz ao oxidar os compostos fenólicos, produzindo óxidos de tungstíco (W_8O_{23}) e molibidênio (Mo) de cor azul que absorvem no comprimento de onda de 760nm. Inicialmente 100 μ L do extrato da farinha foi diluído em 9,9 mL de água destilada. Em tubos de ensaio, 2,5 mL do reagente de Folin diluído em água destilada (1:10) e adicionado a 500 μ L da amostra diluída ou solução padrão de ácido gálico em diferentes concentrações (5, 10, 15, 20 e 25 mg/L) para obtenção da curva de calibração. Para o branco foi utilizada água destilada. Após 2 minutos em temperatura ambiente, foi adicionado 2 mL de solução de carbonato de sódio (7,5%) e misturado. Após incubação por 15 minutos a 50 °C colocou-se a mistura em banho de gelo. As absorbâncias relativas ao branco foram determinadas a 760nm. Todas as análises foram realizadas em triplicata. Os valores de absorbância versus a concentração de ácido gálico foram usados para construir um gráfico. Após análise de regressão linear a obtenção da equação da reta e os valores de absorbância da amostra constituíram o cálculo da concentração de polifenóis. O conteúdo foi expresso em mg de equivalentes de ácido gálico (GAE) por 100g das farinhas.

4.6 Animais

Foram utilizadas 40 ratas *Fischer*, com aproximadamente 40 dias de idade e peso médio de 140g, adquiridos no Laboratório de Nutrição Experimental (LABNEX) da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP), Ouro Preto – MG. Os animais foram mantidos em gaiolas metabólicas individuais, dispostas em ambiente com controle de temperatura, ventilação e umidade. As dietas e a água foram oferecidas *ad libitum*. Todos os procedimentos como alimentação, contenção, protocolos experimentais, eutanásia, entre outros, foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFOP (Protocolo nº 2013/40) (ANEXO A).

4.7 Delineamento experimental

Os animais foram divididos em 4 grupos, de acordo com o tratamento recebido: grupo controle (C), recebeu dieta AIN-93M padrão (REEVES *et al.*, 1993); hipercolesterolêmico

(H), dieta hipercolesterolêmica com 25% de óleo de soja e 2% de colesterol (MATOS *et al.*, 2005); controle araçá (CAr), dieta AIN-93M padrão acrescida de 2% da farinha dos frutos araçá; hipercolesterolêmico araçá (HAr), dieta hipercolesterolêmica acrescida de 2% da farinha dos frutos araçá. Todos os animais dos grupos foram pesados semanalmente ao longo do experimento, sendo realizada na 4^a e 5^a semana o controle da ingestão alimentar e da excreção de fezes. Após 63 dias de experimento os animais foram mantidos em um período de jejum de 12 horas, pesados e sacrificados. A eutanásia foi realizada a partir da anestesia com isoflurano e posterior exsanguinação. O sangue, recolhido para a obtenção do soro e do plasma, e os órgãos (baço, cérebro, coração, estômago, fígado, gordura abdominal, gordura mesentérica, intestino, pâncreas, rins, tecido adiposo marrom e timo) foram armazenados a -80°C para análises posteriores. Cortes do fígado, foram armazenados em formol 10%, para análises histológicas.

4.8 Dietas

Como citado anteriormente, as dietas oferecidas corresponderam ao tipo de tratamento de cada grupo: C, H, CAr e Har. As composições estão descritas na tabela 2. As quantidades dos componentes são descontadas em relação ao carboidrato para compor 1 Kg de dieta. Todas as dietas foram produzidas no Laboratório de Nutrição Experimental da UFOP, embaladas em sacos plásticos devidamente identificados e armazenadas a 4°C, sendo utilizadas ao longo do experimento.

Tabela 2. Composição das dietas experimentais (g/1000g de dieta)

Componentes	Dietas			
	C	H	CAr	HAr
Colina	2,5	2,5	2,5	2,5
Metionina	3,2	3,2	3,2	3,2
Colesterol	0	20	0	20
Mis. Vitaminas ¹	10	10	10	10
Farinha Araçá	0	0	20	20
Mist. Minerais ²	35	35	35	35
Celulose	50	50	50	50
Sacarose	100	100	100	100
Caseína	140	140	140	140
Óleo de Soja	40	250	40	250
Amido de Milho	619,3	389,3	599,3	369,3

¹ - **Mistura de Vitaminas** (expresso em g/Kg da mistura): Niacina - 3/ Pantotenato de Cálcio - 1,6/Piridoxina HCl - 0,7/Tiamina HCl - 0,6/Riboflavina - 0,6/Ácido Fólico - 0,2/Biotina - 0,02/Cianocobalamina - 2,5/Vitamina E (500 IU/g) - 15/Vitamina A (500.000 IU/g) - 0,8/Vitamina D (400.000 IU/g) - 0,25/Vitamina K - 0,075/Sacarose q.s.p. 1Kg. As vitaminas foram adquiridas da Merk, Darmstadt, Alemanha.

² - **Mistura de Minerais** (expresso em g/Kg da mistura): NaCl - 74/KI - 0,01/Citrato Tripotássico - 28/CaCO₃ - 357/MnCO₃ - 0,63/Citrato de Ferro - 6,06/ MgO - 24/ K₂SO₄ - 46,6/ KH₂PO₄ - 250 / ZnCO₃ - 1,65/CuCO₃ - 0,3/Na₂SeO₄ 0,01/(NH₄)₆MoO₂₄. 4 H₂O - 0,00795. Os sais foram adquiridos do Reagen, Rio de Janeiro, Brasil.

4.9 Obtenção do soro e do plasma

O sangue foi coletado através do plexo braquial e posteriormente foi centrifugado a 10.000 rpm por 10 minutos para obtenção do soro. Para se obter o plasma foram adicionadas previamente aos tubos 15 µL de anticoagulante Glistab®, ambos foram armazenados a -80°C.

4.10 Análises bioquímicas

As dosagens bioquímicas de ureia, colesterol-HDL, proteínas totais, albumina, colesterol total, triacilgliceróis, glicose, aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), fosfatase alcalina, creatinina, foram realizadas utilizando-se kits comerciais Labtest Diagnóstica S.A. de acordo com as instruções do fabricante. As dosagens dos marcadores do dano oxidativo como paraoxonase (PON), catalase, peroxidação lipídica,

proteína carbonilada, glutationa, superóxido dismutase (SOD) e sulfidrilas totais serão realizadas através de seus respectivos protocolos. A concentração de globulinas foi obtida por meio da diferença entre proteínas totais e albumina:

$$\text{Globulinas (g/dL)} = \text{proteínas totais (g/dL)} - \text{albumina ((g/dL)}$$

A concentração do colesterol não-HDL (colesterol VLDL e LDL) foi calculada a partir da diferença do colesterol total pelo colesterol HDL e expressa em mg/dL:

$$\text{VLDL + LDL (mg/dL)} = \text{colesterol total (mg/dL)} - \text{colesterol HDL (mg/dL)}$$

4.11 Protocolos de análise das defesas antioxidantes e da concentração de marcadores do estresse oxidativo

4.11.1 Paraoxonase - Atividade arilesterase

A atividade arilesterase da enzima paraoxonase, é determinada usando o fenilacetato como substrato, tendo como base a velocidade de hidrólise do fenilacetato, conforme descrito por Beltowski et al., (2002).

Procedimento da dosagem:

Foi adicionado em tubo de ensaio, 2mL de tampão Tris-HCl, 9mM; pH 8,0 contendo 0,9 mmol/L de cloreto de cálcio e 5µL de amostra. O conteúdo do tubo foi misturado no vórtex, incubado em banho-maria durante dois minutos, posteriormente adicionado 0,5 mL da solução Tris - fenilacetato (1µL de fenilacetato para cada 1500µL de Tris-HCl 9mM; pH 8,0). Após 3 minutos, a absorbância foi determinada a 270nm. Zerou-se o espectrofotômetro com o branco que continha todos os reagentes acima, exceto a amostra.

Segundo Beltowski et al., (2002), 1U de paraoxonase é equivalente à hidrólise de 1mmol de fenilacetato ($\epsilon = 1310 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) por minuto (usualmente a atividade desta enzima é representada por 1mL de soro). Assim, a atividade arilesterase da enzima é calculada pela seguinte fórmula:

$$U/mL = \frac{\text{Absorbância}}{\varepsilon \times b} \times \frac{1000}{\text{Tempo} \times \text{Volume de soro}}$$

Onde:

ε = coeficiente de extinção molar;

b = caminho óptico, igual a 10 mm.

4.11.2 - Paraoxonase - Atividade paraoxonásica

A atividade paraoxonase da enzima paraoxonase, é determinada usando o paraoxon como substrato, tendo como base a velocidade de hidrólise deste, com a liberação do paranitrofenol, conforme descrito por Beltowski et al., (2002).

Procedimento da dosagem:

Primeiramente, foi preparada uma solução contendo 9 mL de tampão glicina/NaOH a 50mM; pH 10,5 contendo CaCl₂ a 0,9mM e 2μL de paraoxon. Posteriormente, em um tubo de polipropileno adicionou-se 780μL dessa solução e 20μL da amostra. A solução foi homogeneizada e as absorbâncias das amostras lidas no espectrofotômetro a 412nm, a cada minuto, por 3 vezes. O branco (tubo com 780μL da solução preparada inicialmente e 20μL de água) foi utilizado para acertar o aparelho.

Cálculo:

Segundo Beltowski et al., (2002) 1U da enzima paraoxonase é equivalente à hidrólise de 1mmol de paraoxon por minuto (usualmente a atividade dessa enzima é representada em unidade por mL de soro). A formação do paranitrofenol foi calculada segunda a lei de Lambert Beer, cujo coeficiente de extinção molar a 412 nm é 18290 L.mol⁻¹.cm⁻¹. A atividade paraoxonase da enzima paraoxonase é calculada pela seguinte fórmula:

$$U/mL = \frac{\text{Absorbância}}{\varepsilon \times b} \times \frac{1000}{\text{Tempo} \times \text{Volume de soro}}$$

A absorbância utilizada nessa expressão é o delta obtido das três absorbâncias lidas (absorbância final – absorbância inicial / 2).

4.11. 3 Sulfidrilas totais

Objetivo

Determinação de grupos sulfidrilas totais, grupos sulfidrilas ligados à proteínas e grupos sulfidrilas livres em amostras biológicas, usando o reagente de Ellman, conforme proposto por Sedlak e Lindsay (1968).

Reagentes utilizados:

- 1) Tampão Tris-HCl - pH 8,2
- 2) Tampão Tris-HCl - pH 8,9
- 3) Cloreto de Trietanolamina (TEA)
- 4) Ácido Tricloroacético
- 5) Ácido 5,5'-Ditio-bis-(2-nitrobenzóico) (DTNB)
- 6) Cisteína

Curva-padrão:

O padrão de GSH foi preparado dissolvendo-se 49,5 µL da GSH estoque em 950,5 µL de TEA. Foram identificados 5 tubos de polipropileno de 1,5 mL e foi procedido como descrito no quadro a seguir:

CONC (µmol/L)	0	50	100	250	500	1000
Cisteína (µL)	0	25	50	125	250	500
TEA (µL)	500	475	450	375	250	0

Procedimento:

Para cada amostra, serão adicionados 800 µL de metanol, 150 µL de Tris-HCl pH 8,2, 50 µL de DTNB e 40 µL de amostra (ou da série de padrões). Centrifugados a 3000g durante 5 minutos à temperatura ambiente. Foi usado o padrão de concentração zero de cisteína,

adicionado dos demais reagentes para zerar o espectrofotômetro. A absorvância foi medida a 412 nm.

Cálculo:

Foi traçado um gráfico com a concentração do padrão (eixo Y) e absorvância do padrão (eixo X). Após uma regressão linear, foi determinada a equação da reta, com a seguinte equação:

$$\text{Concentração} = (a \times \text{Absorvância}) + b$$

Essa equação foi utilizada para determinar a concentração de sulfidrilas totais.

4.11.4 Catalase

A atividade da catalase foi determinada de acordo com Aebi (1984). O método baseia-se na decomposição do H_2O_2 pela enzima observada durante 3 min por espectrofotometria a 240 nm. Resumidamente, 100 mg de tecido hepático foi homogeneizado em 1 mL de tampão fosfato 100 mM (pH 7,2) e em seguida centrifugado a 10.000 g por 10 minutos à 4 °C. O sobrenadante retirado foi usado como amostra biológica. Em um tubo de polipropileno foi colocado 50 μL de tampão fosfato 100 mM, (pH 7,2) e 40 μL de água destilada. Em seguida, foram adicionados 10 μL da amostra e a reação iniciada pela adição de 900 μL de H_2O_2 (10 mM). As absorvâncias foram determinadas exatamente a cada minuto, durante três minutos a 240 nm. Água destilada foi utilizada como branco.

A concentração de H_2O_2 foi calculada segundo a lei de Lambert Beer:

$$A = b \times \epsilon \times c$$

Onde:

A = absorvância,

ϵ = coeficiente de extinção molar em unidades de $\text{mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$

b = caminho óptico,

c = concentração de H_2O_2 expressa em mol L^{-1}

A absorbância utilizada corresponde ao delta de absorbância por minuto. Utilizou-se o coeficiente de extinção molar do peróxido de hidrogênio ($39,4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). A atividade da catalase foi determinada pela diminuição da absorbância a 240 nm causada pela hidrólise do H_2O_2 (uma unidade de catalase é equivalente a hidrólise de 1 μmol de H_2O_2 por minuto). Os resultados foram expressos em unidade por miligrama de proteína.

4.11.5 Peroxidação lipídica no tecido hepático - Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

A peroxidação lipídica foi determinada através do ensaio de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), pelo método de Buege & Aust (1978). O método baseia-se na capacidade do ácido tiobarbitúrico (TBA) em se ligar a lipídios oxidados. Inicialmente, 100mg de tecido foi homogeneizado em 1 mL de tampão Tris-HCl (20mM) e em seguida centrifugado a 4 °C por 10 minutos a 10.000g. 300 μL do sobrenadante foi misturado com 300 μL de ácido tricloroacético (TCA) (28 % p/v em HCL 0,25 N), passados no vórtex e centrifugados a 13.000g a 25° por 1° minutos. Em seguida, 500 μL do sobrenadante foi misturado a 500 μL de ácido tiobarbitúrico (TBA) (1% de ácido acético 0,25 N) e 125 μL de butilhidroxitolueno (BHT) (5mM em etanol). Esta mistura foi passada no vórtex e posteriormente aquecidas por 15 minutos a 95 °C e colocadas no banho de gelo por 5 minutos. A absorbância foi determinada a 535 nm e a água destilada foi utilizada como branco.

Os níveis de TBARS foram determinados por regressão linear, onde a equação da reta da curva de tetrahidroxipropano (utilizado como solução padrão) e os valores das absorbâncias das amostras constituíram o cálculo.

4.11.6 Proteína Carbonilada

Princípio do método:

Proteína carbonilada é um marcador da oxidação de proteína por EROs. A oxidação de proteínas por EROs leva à formação de derivados carbonilados. Estes podem ser mensurados utilizando o 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH). O DNPH reage com grupos carbonilados gerando a hidrazona correspondente, a qual pode ser analisada espectrofotometricamente. A determinação da concentração de proteína carbonilada foi realizada conforme descrito por Levine et al. (1994), utilizando-se o coeficiente de extinção molar da hidrazona formada.

Procedimento da dosagem:

O método se baseia em, primeiramente, homogeneizar 400mg de tecido hepático em 2 mL de tampão fosfato 50 mM e pH 6,7 (contendo 1mM de EDTA), e centrifugar a 10.000g por 10 minutos à 4°C. Em seguida, 500 µL do sobrenadante do homogenato foi transferido para tubos de polipropileno identificados para as amostras e um branco para cada amostra. A cada tubo foi adicionado igual volume de ácido tricloroacético (TCA) 10% e após centrifugação, a 5000g por 10 minutos a 4°C, o sobrenadante foi descartado. Depois, foram adicionados 500 µL de DNPH 10 mM aos tubos com as amostras e 500 µL ácido clorídrico (HCl) 2M nos brancos. Todos os tubos foram mantidos no escuro à temperatura ambiente por um período de 30 minutos e a cada 15 minutos misturados vigorosamente. No passo seguinte foram adicionados 500 µL de TCA 10% em cada tubo. Logo após, os tubos foram centrifugados a 5000g por 10 minutos a 4°C e os sobrenadantes descartados. Os precipitados em ambos os tubos foram lavados com 1 mL da mistura etanol/acetato de etila, na proporção de 1:1, misturando no vórtex e novamente centrifugados, conforme descrito na etapa anterior, e o sobrenadante foi novamente ser descartado. Este último passo foi repetido por duas vezes. Ao final do processo de lavagem, foi adicionado nos tubos 1 mL de SDS 6%, misturados no vórtex e centrifugados à 10000g por 10 minutos à 4°C. Finalmente, as absorbâncias dos sobrenadantes foram determinadas a 370 nm. Os resultados foram expressos em nmol de DNPH incorporado/mg de proteína.

Cálculo:

Para determinar a concentração de proteína carbonilada utilizou-se a equação de *Lambert Beer*:

$$A = C \times b \times \epsilon$$

Onde:

A = Subtração da absorbância do tubo da amostra pela absorbância do tubo do branco.

C = Concentração

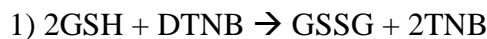
b=Caminho óptico

ϵ =Coeficiente de extinção molar da hidrazona

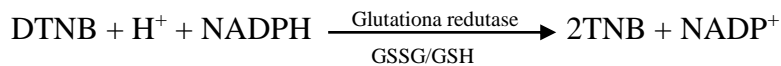
O conteúdo de proteína carbonilada foi calculado usando o coeficiente de extinção molar da hidrazona ($22000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) e expresso por nmol de proteína carbonilada formada por mg de proteína.

4.11.7 Glutathiona total

Utiliza-se o kit Sigma # CS0260. A glutathiona está presente nas células principalmente na sua forma reduzida (GSH), representando em torno de 90%, e o restante aparece na forma de glutathiona oxidada (GSSG). Este kit utiliza um método cinético para mensurar os níveis de glutathiona total (GSH+GSSG) em amostras biológicas, através da redução do DTNB (Ácido 5,5'-Ditio-bis-(2-nitrobenzóico) à TNB.



A combinação das duas reações:



Para o procedimento experimental, 100 mg do tecido hepático foram homogeneizados com 1 mL de ácido sulfosalicílico 5%, e em seguida centrifugado por 10 minutos à 4 °C. O sobrenadante foi retirado e usado como amostra biológica.

Em uma microplaca foram adicionados 10 μL da amostra, em seguida, 150 μL da mistura de trabalho composta por 95 mM de tampão fosfato, pH 7,0, 0,95 mM de EDTA, 48 μM de NADPH, 0,031 mg/mL de DTNB, 0,115 unidades/mL de glutathiona redutase, e 0,24% de ácido sulfosalicílico. As amostras foram então incubadas por 5 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, 50 μL de NADPH 0,16 mg/mL serão adicionados às mesmas e o cronômetro disparado. As absorbâncias das amostras foram lidas durante 5 minutos a cada minuto, no leitor de ELISA à 412 nm.

As absorbâncias de diluições seriadas de uma solução padrão de glutathiona reduzida foram determinadas conforme descrito anteriormente, para obtenção da curva de calibração. Após análise de regressão linear, determinou-se a equação da reta. Esta equação foi utilizada para determinar a concentração em nmoles de glutathiona total em 10 μL de amostra, e este valor convertido para 1 mL de amostra.

4.11.8 Glutationa Oxidada

Para o procedimento experimental, 100 mg do tecido hepático foram homogeneizados com 1 mL de ácido sulfosalicílico 5% e em seguida centrifugado por 10 minutos à 4 °C. O sobrenadante foi retirado e usado como amostra biológica. Em tubos de polipropileno foram pipetados 100 µL do sobrenadante, adicionados 2 µL de vinilpiridina e posteriormente misturados no vórtex. O pH foi ajustado, para ficar entre 6 e 7, com trietanolamina (TEA) (1,5 µL). As amostras foram incubadas a temperatura ambiente durante 60 minutos e em seguida o ensaio foi procedido da mesma maneira que da glutaciona total.

4.11.9 - Glutationa Reduzida

A glutaciona reduzida foi obtida pela subtração entre a glutaciona total e a glutaciona oxidada.

4.12 Determinação de gordura nas fezes

A determinação da gordura nas fezes foi realizada segundo método descrito por FOLCH *et al.* (1957). Inicialmente, 200 mg das amostras (fezes secas e maceradas de cada animal) foram maceradas novamente com 1,9 mL de clorofórmio/metanol (2:1), utilizando-se um bastão de vidro, e passadas no vórtex durante 3 minutos. À mistura foram adicionados 0,4 mL de metanol puro e posteriormente realizada a centrifugação na posição 3 da centrífuga Centribio Modelo 80-2B por 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para tubo de ensaio seco, pesado e identificado. A esta solução foram acrescentados mais 0,8 mL de clorofórmio puro e 0,64mL de solução aquosa de NaCl a 0,73% e esta agitada em vórtex e novamente centrifugada por 10 minutos.

O sobrenadante foi descartado e as paredes internas dos tubos lavadas com 0,3 mL de solução de Folch - clorofórmio/metanol/água/ NaCl 0,2% (3: 48: 47: 2). Este procedimento foi repetido por 3 vezes e após cada lavagem o sobrenadante foi descartado. Os extratos lipídicos foram secos em estufa semi-aberta a 40° C. Os lipídios foram quantificados pela diferença de peso entre o tubo contendo os lipídios e o mesmo tubo vazio, previamente pesado. Em seguida, para a obtenção da porcentagem de lipídios, foi utilizado o seguinte cálculo:

$$\% \text{ Lipídios} = \frac{\text{massa de lipídios (g)}}{\text{massa de amostra (g)}} \times 100$$

4.13 Determinação de gordura no fígado

A determinação da gordura no fígado também foi realizada segundo método descrito por FOLCH *et al.* (1957). Porém, inicialmente, 400 mg das amostras (tecido hepático de cada animal) foram homogeneizadas em tubos de polipropileno com 1mL de solução de clorofórmio/metanol (2:1), utilizando-se o homogeneizador de mão. Foram 4 homogeneizações de 1 mL, sendo que a cada homogeneização o volume foi transferido para o tubo de vidro. Ao final, foram adicionados mais 4 mL da solução ao tubo, totalizando 8 mL. Em seguida as amostras foram passadas no vórtex por 3 minutos e os próximos passos foram realizados como descrito anteriormente, para a extração nas fezes.

4.14 Análises histológicas

O menor lobo do fígado dos animais foi removido ao fim do experimento e fixados em formol a 10%.

Para efetuar a análise histológica, inicialmente, os fígados foram cortados transversalmente e processados em série crescente de álcoois e, posteriormente, molhados em parafina. Secções parafinadas de aproximadamente quatro micrômetros de espessura foram obtidas em micrótomo, semi-automático, montados em lâminas de vidro previamente limpas e desengorduradas. A técnicas de coloração utilizada foi Hematoxilina & Eosina (H&E).

As quantificações morfométricas foram realizadas no Laboratório Multiusuários do NUPEB. As fotomicrografias foram obtidas em microscópio Leica DM5000 acoplado à câmera digital.

4.15 Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando-se o software Prism® GraphPad versão 5. Todos os dados foram submetidos inicialmente ao teste de normalidade de *Kolmogorov-Smirnov*. Os dados que seguiram uma distribuição paramétrica foram analisados por análise de variância bivariada (Two-way ANOVA), com valores expressos como média \pm desvio-

padrão. Para os dados que não seguiram uma distribuição normal foram utilizados o teste não paramétrico Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunns. As diferenças foram consideradas significativas para $p < 0,05$. Para as análises dos dados histológicos do tecido hepático, foi realizado o teste do qui-quadrado.

5 RESULTADOS

5.1 Composição centesimal da farinha de araçá

Na tabela 3 estão representados os dados da composição centesimal realizada com a farinha de araçá.

Tabela 3. Composição centesimal da farinha de araçá.

Composição (g/100g)	Araçá amarelo
Umidade	6,80 ± 0,12
Cinzas	2,65 ± 0,05
Proteína	0,99 ± 0,09
Extrato Etéreo	11,51 ± 0,51
Fibras	37,20 ± 0,01
Carboidratos	40,85

Os valores são expressos como média ± desvio padrão. Carboidratos obtidos por diferença em relação aos demais componentes.

5.2 Capacidade antioxidante e conteúdo de polifenóis totais da farinha de araçá

Na tabela 4 estão descritos os valores referentes às análises do conteúdo de polifenóis totais e da capacidade antioxidante da farinha de araçá.

Tabela 4. Polifenóis totais e capacidade antioxidante (TEAC)

	Polifenóis Totais (mg GAE/100 g)	TEAC (µM/g)
Araçá	697,10 ± 10,68	88,77 ± 2,22

GAE: Equivalentes de Ácido Gálico.

TEAC: Capacidade antioxidante (µM de equivalents de Trolox/g) (Trolox equivalent antioxidant capacity).

5.3 Parâmetros bioquímicos e nutricionais

Na tabela 5 estão representados a massa corporal inicial, a massa corporal final, o ganho de massa, a ingestão alimentar e a excreção fecal dos animais. Em relação à massa

inicial não houve diferença significativa entre os grupos. Quanto à massa final, os animais que receberam a dieta hipercolesterolêmica, recebendo ou não a farinha de araçá, tiveram ganho de peso significativamente maior comparado aos animais com dieta controle. Já para a ingestão alimentar foi verificado que os grupos H e HAr, ingeriram uma quantidade de dieta significativamente menor que os grupos C e CAr. E quanto à excreção foi observado influência da dieta e do tratamento, onde os grupos tratados (CAr e HAr) e o grupo H apresentaram maior excreção em relação ao grupo C.

Tabela 5. Massa corporal inicial, massa corporal final, ganho de massa, ingestão alimentar e excreção fecal de grupos de animais alimentados com dieta controle (C) ou dieta hipercolesterolêmica (H) ou farinha de araçá (Ar).

	MI (g)	MF (g)	GM (g)	IA (g)	EF (g)
C	143,60 ± 6,60	200,20 ± 12,07	56,60 ± 11,95	119,50 ± 8,13	5,14 ± 0,34
CAr	142,40 ± 12,61	202,70 ± 12,50	60,30 ± 6,65	127,10 ± 5,34	7,44 ± 0,41
H	143,00 ± 13,20	217,30 ± 17,08	74,30 ± 12,33	98,18 ± 9,91	6,70 ± 0,66
HAr	143,50 ± 12,62	224,90 ± 15,52	81,40 ± 9,93	96,89 ± 7,16	8,27 ± 0,81
Valor de p					
Interação	NS	NS	NS	NS	NS
Dieta	NS	0,0001	P<0,0001	P<0,0001	P<0,0001
Araçá	NS	NS	NS	NS	P<0,0001

Os dados são apresentados como média ± desvio padrão. MI: Massa inicial. MF: Massa Final. GM: Ganho de massa. IA: Ingestão alimentar. EF: excreção fecal. NS: não significativo. C: Controle. CAr: Controle + Araçá. H: Hipercolesterolêmico. HAr: Hipercolesterolêmico + Araçá.

Na tabela 6 estão demonstrados os pesos das gorduras abdominal e mesentérica dos animais. Em ambas, foi observado um efeito somente da dieta, onde os grupos hipercolesterolêmicos apresentaram maior peso destas gorduras.

Tabela 6. Gordura abdominal e gordura mesentérica de grupos de animais alimentados com dieta controle (C) ou dieta hipercolesterolêmica (H) ou farinha de araçá (Ar).

	Gordura abdominal (g)	Gordura mesentérica (g)
C	9,41 ± 2,73	2,16 ± 0,90
CAr	8,18 ± 1,76	1,90 ± 0,46
H	11,59 ± 3,27	2,54 ± 0,63
HAr	10,29 ± 2,10	2,33 ± 0,43
Valor de p		
Interação	NS	NS
Dieta	0,0111	0,0493
Araçá	NS	NS

Os dados são apresentados como média ± desvio padrão. NS: não significativo. C: Controle. CAr: Controle + Araçá. H: Hipercolesterolêmico. HAr: Hipercolesterolêmico + Araçá.

Na tabela 7 estão representados o peso dos rins e os valores de creatinina e ureia. Foi observado que o peso dos rins dos animais não foi alterado por nenhuma das variáveis estudadas. Nos parâmetros de creatinina, pode-se notar uma interação entre a dieta e o tratamento, onde o grupo HAr demonstrou maiores valores, seguido do grupo CAr. Para ureia, não foi observada nenhuma diferença significativa entre os grupos.

Tabela 7. Peso do rins e níveis de creatinina e ureia de grupos de animais alimentados com dieta controle (C) ou dieta hipercolesterolêmica (H) ou farinha de araçá (Ar).

	Rins (g)	Creatinina (mg/dL)	Ureia (mg/dL)
C	1,17 ± 0,09	0,59 ± 0,18 ^b	25,22 ± 2,65
CAr	1,19 ± 0,10	0,66 ± 0,18 ^{a, b}	21,41 ± 2,93
H	1,24 ± 0,12	0,52 ± 0,24 ^b	22,45 ± 2,94
HAr	1,22 ± 0,11	0,89 ± 0,22 ^a	24,94 ± 4,27
Valor de p			
Interação	NS	< 0,05	NS
Dieta	NS	NS	NS
Araçá	NS	< 0,05	NS

Os dados são apresentados como média ± desvio padrão. Letras diferentes indicam diferenças significativas na mesma coluna, para $p < 0,05$ (ANOVA bivariada). NS: não significativo. C: Controle. CAr: Controle + Araçá. H: Hipercolesterolêmico. HAr: Hipercolesterolêmico + Araçá.

O peso do fígado e a concentração sérica de proteínas totais, albumina, globulinas e glicose estão apresentadas na tabela 8. Em relação ao peso do fígado, nota-se o efeito da dieta uma vez que houve diferença significativa do peso entre os grupos controles (C e CAr) e os grupos hipercolesterolêmicos (H e HAr). Quanto aos níveis de proteínas totais pode-se observar interação da dieta com o tratamento com a farinha de araçá, não havendo diferença significativa somente entre os grupos hipercolesterolêmicos. Para o parâmetro de albumina ficou constatado uma interação entre a dieta e o tratamento com farinha de araçá, ocorrendo uma diminuição significativa nos grupos CAr, H e HAr quando comparados com o grupo C. Em relação às globulinas, foi observado uma influência significativa apenas da dieta, sendo que os grupos hipercolesterolêmicos (H e HAr) mostraram níveis mais elevados que os grupos controles (C e CAr). Na dosagem de glicose, houve interação entre a dieta e o tratamento com a farinha de araçá, porém, ocorreu diferença significativa somente entre os grupos C e H.

Tabela 8. Peso do fígado e níveis de proteínas totais, albumina, globulinas e glicose de grupos de animais alimentados com dieta controle (C) ou dieta hipercolesterolêmica (H) ou farinha de araçá (Ar).

	Fígado (g)	Proteínas Totais (g/dL)	Albumina (g/dL)	Globulinas (g/dL)	Glicose (mg/dL)
C	5,19 ± 0,43	6,81 ± 0,29 ^b	2,89 ± 0,21 ^a	3,90 ± 0,23	160,69 ± 40,34 ^a
CAr	5,32 ± 0,40	6,44 ± 0,19 ^c	2,56 ± 0,11 ^b	3,87 ± 0,19	140,50 ± 17,16 ^{a, b}
H	9,63 ± 0,90	7,25 ± 0,26 ^a	2,63 ± 0,18 ^b	4,62 ± 0,16	117,50 ± 28,89 ^b
HAr	9,62 ± 0,86	7,29 ± 0,40 ^a	2,60 ± 0,19 ^b	4,69 ± 0,24	152,10 ± 42,56 ^{a, b}
Valor de p					
Interação	NS	< 0,05	< 0,05	NS	< 0,05
Dieta	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05	NS
Araçá	NS	NS	< 0,05	NS	NS

Os dados são apresentados como média ± desvio padrão. Letras diferentes indicam diferenças significativas na mesma coluna, para $p < 0,05$ (ANOVA bivariada). NS: não significativo. C: Controle. CAr: Controle + Araçá. H: Hipercolesterolêmico. HAr: Hipercolesterolêmico + Araçá.

O peso do pâncreas e a atividade da lipase são demonstrados na tabela 9. Nota-se que o peso do pâncreas sofreu uma interação entre a dieta e o tratamento, sendo que o grupo CAr apresentou um peso inferior ao grupo controle (C) enquanto que os grupos hipercolesterolêmicos (H e HAr) não apresentaram diferença significativa comparados aos

grupos controles. Quanto à lipase foi observado apenas influência da dieta, uma vez que os valores encontrados foram superiores nos grupos H e HAr em relação aos C e CAr. Os resultados de amilase não apresentaram nenhuma diferença significativa entre os grupos.

Tabela 9. Peso do pâncreas e atividade de lipase de grupos de animais alimentados com dieta controle (C) ou dieta hipercolesterolêmica (H) ou farinha de araquá (Ar).

	Pâncreas (g)	Lipase (U/L)
C	1,17 ± 0,36 ^a	15,95 ± 10,47
CAr	0,81 ± 0,17 ^b	19,43 ± 7,15
H	0,92 ± 0,12 ^{a, b}	33,30 ± 11,59
HAr	1,00 ± 0,17 ^{a, b}	35,22 ± 16,08
Valor de p		
Interação	0,0040	NS
Dieta	NS	0,0002
Araçá	0,0462	NS

Os dados são apresentados como média ± desvio padrão. Letras diferentes indicam diferenças significativas na mesma coluna, para $p < 0,05$ (ANOVA bivariada). NS: não significativo. C: Controle. CAr: Controle + Araçá. H: Hipercolesterolêmico. HAr: Hipercolesterolêmico + Araçá.

O perfil lipídico sério está representado na figura 6. Os níveis de colesterol total e das outras frações de colesterol (VLDL+LDL) sofreram influência significativa apenas da dieta, onde os grupos hipercolesterolêmicos (H e HAr) mostraram níveis mais elevados que os grupos controles (C e CAr). Quanto ao colesterol-HDL, também foi visto efeito apenas da dieta, porém, nos grupos controles (C e CAr) os níveis foram maiores em relação ao H e HAr.

Na figura 7 está demonstrado o perfil lipídico hepático. Em relação à porcentagem de lipídios e à dosagem de colesterol, nota-se influência significativa da dieta, uma vez que os grupos H e HAr apresentaram valores superiores quando comparados aos C e CAr. Já para os níveis de triacilgliceróis foi observada uma interação, onde o grupo HAr foi superior aos demais grupos.

O perfil lipídico fecal está representado na figura 8. Tanto a porcentagem de lipídios quanto os níveis de colesterol sofreram efeito apenas da dieta, sendo os grupos hipercolesterolêmicos (H e HAr) superiores aos grupos controles (C e CAr).

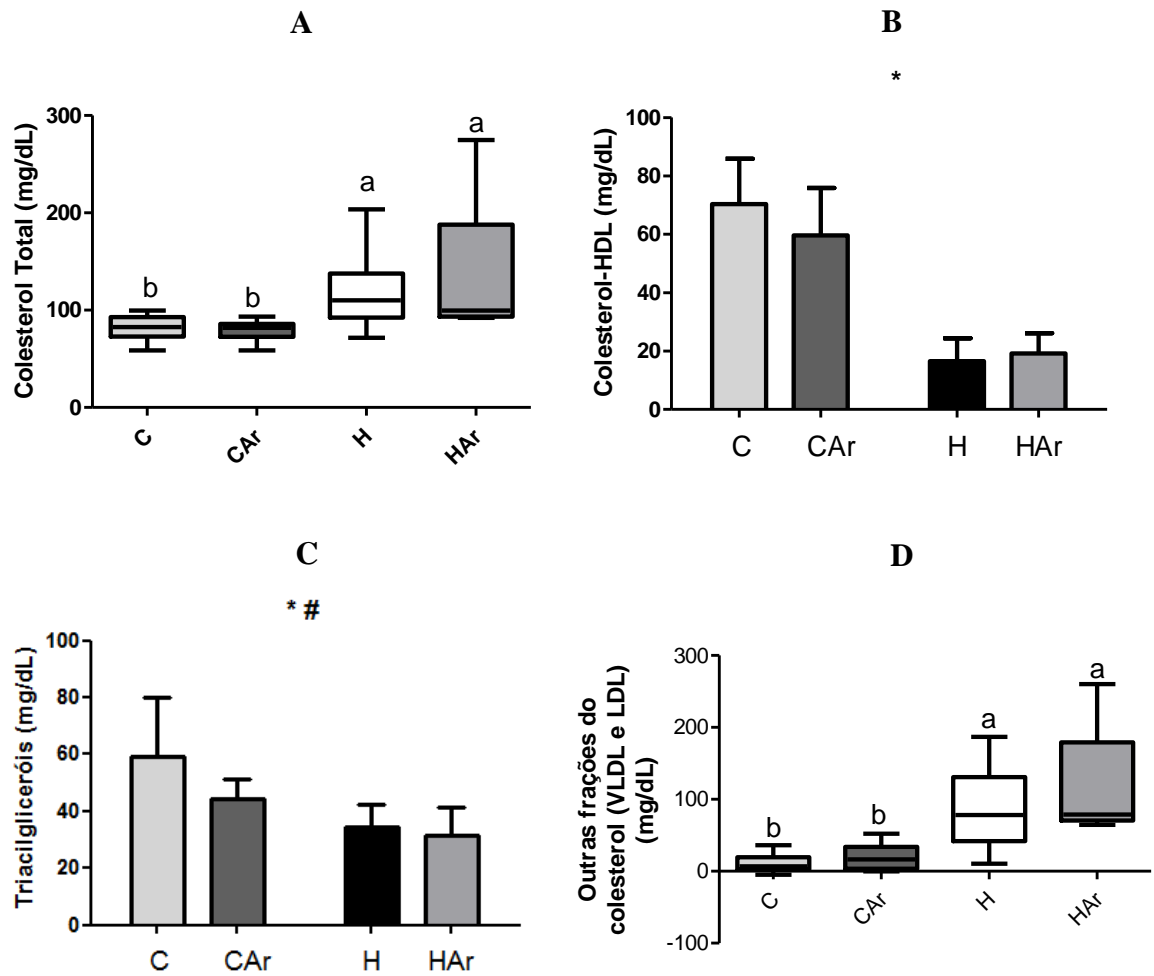


Figura 6. Perfil lipídico sérico: colesterol total (A), colesterol-HDL (B), triacilgliceróis (C), outras frações do colesterol (VLDL+LDL) (D). Em A, B e C os dados são apresentados como média \pm desvio-padrão, em D os resultados são expressos em valores mínimo e máximo. Diferenças significativas ($p < 0,05$) estão representadas por letras diferentes. * Efeito da dieta. # Efeito do tratamento. C: Controle. CAr: Controle + Araçá. H: Hipercolesterolêmico. HAr: Hipercolesterolêmico + Araçá. Grupos com n de 10 animais.

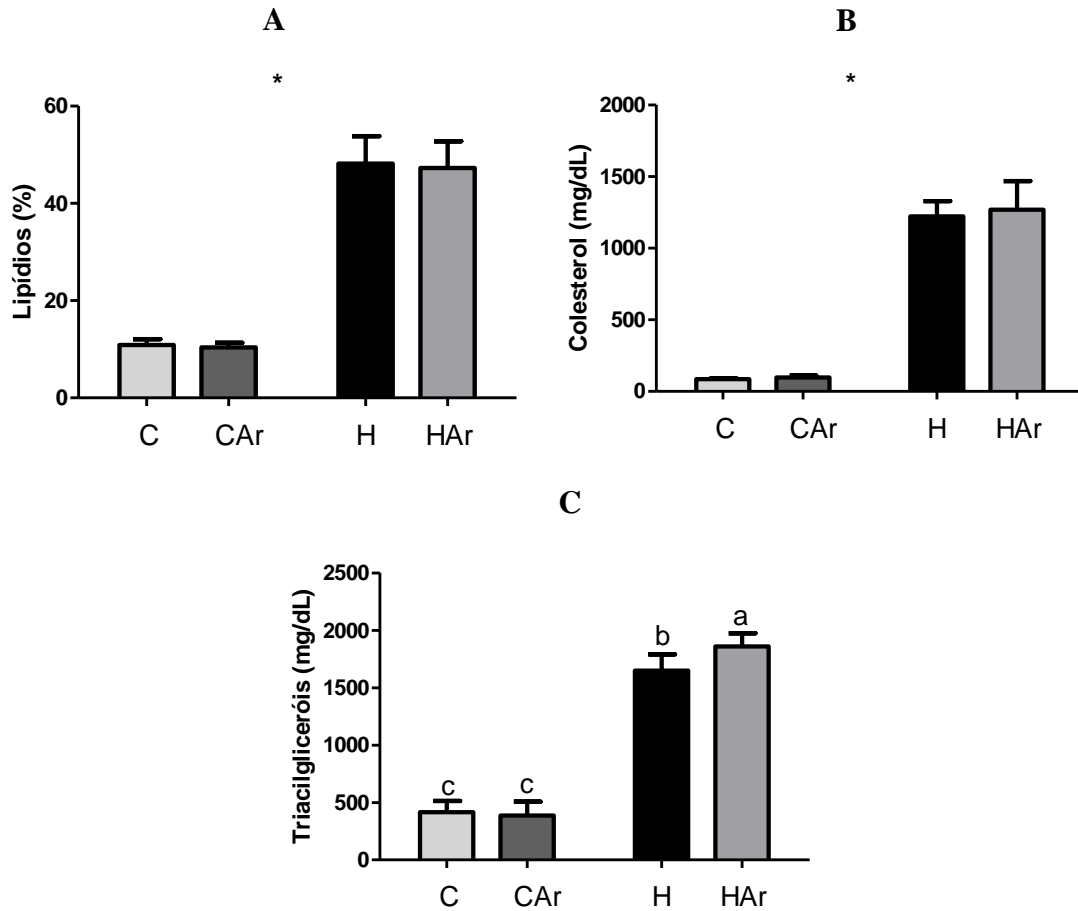


Figura 7. Perfil lipídico hepático: porcentagem de lipídios (A), colesterol (B) e triacilgliceróis (C). Os dados são apresentados como média \pm desvio-padrão. Diferenças significativas ($p < 0,05$) estão representadas por letras diferentes. * Efeito da dieta. C: Controle. CAR: Controle + Araçá. H: Hipercolesterolêmico. HAR: Hipercolesterolêmico + Araçá. Grupos com n de 10 animais.

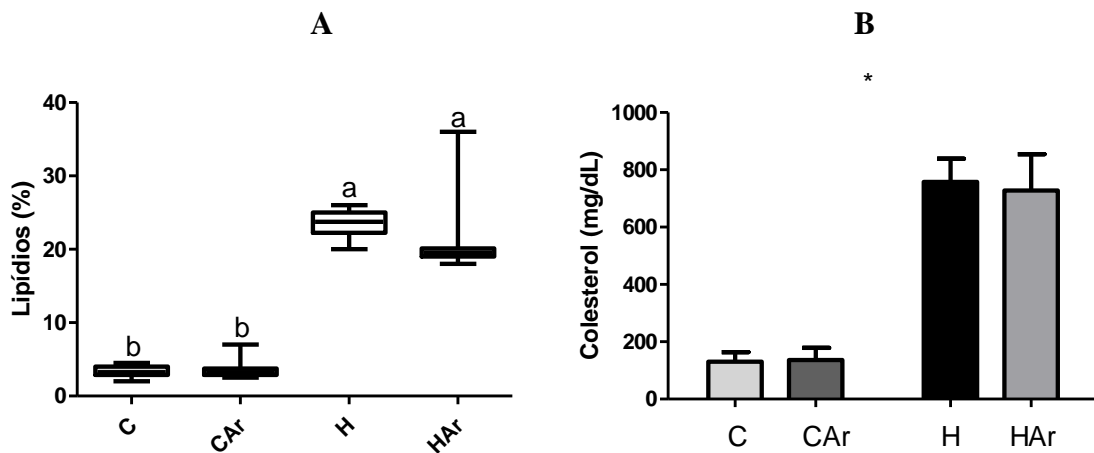


Figura 8. Perfil lipídico fecal: porcentagem de lipídios (A) e colesterol (B). Em A os dados são apresentados como valores mínimo e máximo e em B os resultados são expressos como média \pm desvio-padrão. Diferenças significativas ($p < 0,05$) estão representadas por letras diferentes. * Efeito da dieta. C: Controle. CAR: Controle + Araçá. H: Hipercolesterolêmico. HAR: Hipercolesterolêmico + Araçá. Grupos com n de 10 animais.

A atividade das enzimas séricas AST, ALT e FA estão representados na figura 9. Com relação à aspartato aminotransferase, observa-se apenas efeito da dieta, sendo a atividade dos grupos H e HAr significativamente mais elevadas que os dos grupos C e CAr. No que diz respeito à alanina aminotransferase, ficou evidenciado uma interação significativa entre a dieta e o tratamento, mostrando principalmente que a atividade da enzima foi menor nos grupos tratados (CAr e HAr), assim como no grupo controle (C). A atividade de fosfatase alcalina sofreu efeito somente da dieta, sendo mais elevada nos grupos hipercolesterolêmicos (H e HAr) do que nos grupos controle (C e CAr).

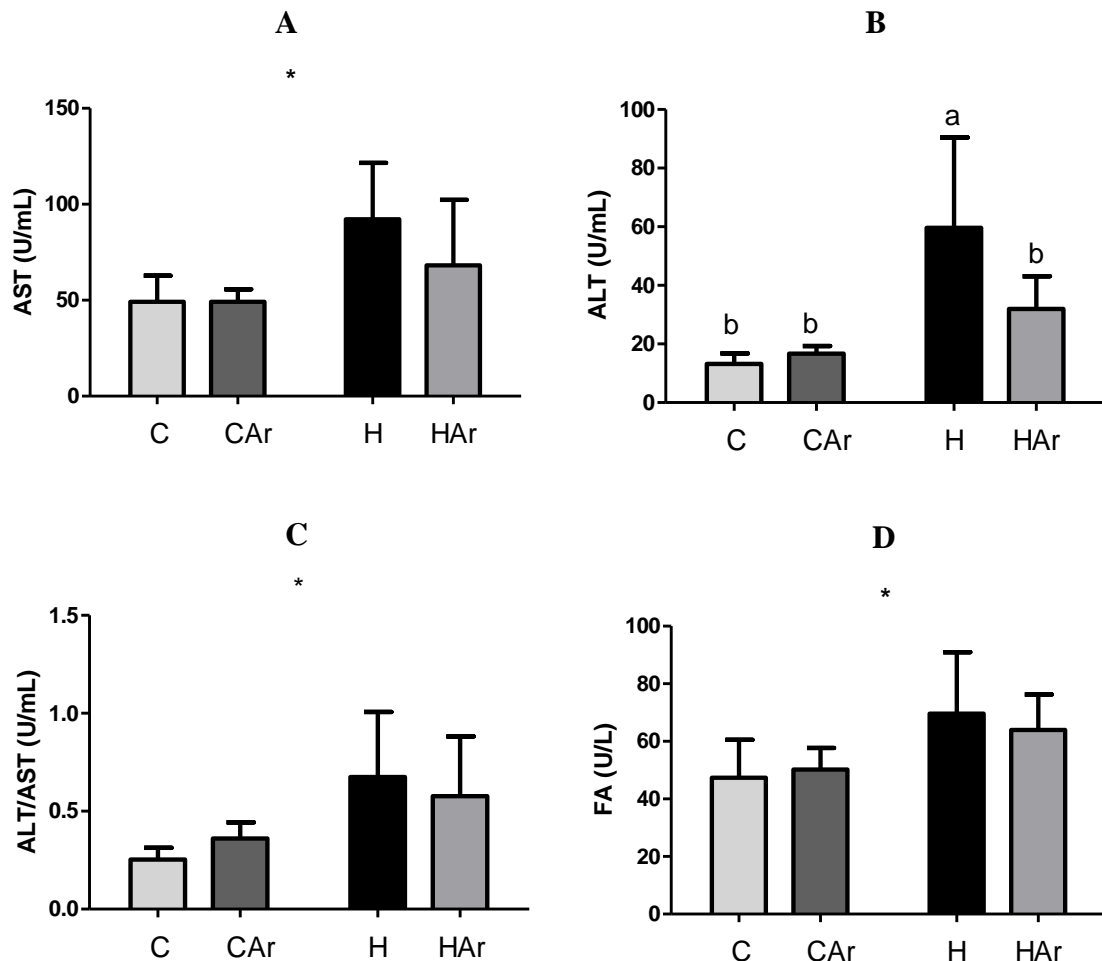


Figura 9. Atividade das enzimas AST (A), ALT (B), relação ALT/AST (C) e FA (D). Os dados são apresentados como média \pm desvio-padrão. Diferenças significativas ($p < 0,05$) estão representadas por letras diferentes. * Efeito da dieta. C: Controle. CAr: Controle + Araçá. H: Hipercolesterolêmico. HAr: Hipercolesterolêmico + Araçá. Grupos com n de 10 animais.

Os marcadores do dano oxidativo são mostrados na tabela 10 (sulfidrilas totais, TBARS e proteína carbonilada) e na figura 10 (PON-paraoxonásica e PON-arilesterásica). As

concentrações séricas de sulfidrilas totais demonstraram uma interação entre a dieta e o tratamento, onde os grupos tratados (CAr e HAr) e o grupo H apresentaram níveis superiores em relação ao grupo C. Os parâmetros de TBARS e proteína carbonilada sofreram efeito apenas da dieta, havendo uma diferença significativamente maior nos grupos hipercolesterolêmicos (H e HAr) comparados aos grupos controles (C e CAr). A atividade de PON, para ambos os substratos, foi influenciada pela dieta, uma vez que os grupos que receberam a dieta hipercolesterolêmica apresentaram uma atividade menor que a dos grupos com dieta controle. Ainda, analisando a atividade arilesterásica, foi visto que o tratamento com a farinha de araquá aumentou as concentrações de PON, em relação aos demais grupos.

Tabela 10. Marcadores do estresse oxidativo em animais alimentados com dieta controle (C) ou dieta hipercolesterolêmica (H) ou farinha de araquá (Ar).

	Sulfidrilas totais ($\mu\text{mol/L}$)	TBARS (nmol/mg)	Proteína Carbonilada (nmol/mg)
C	213,91 \pm 35,25 ^b	0,70 \pm 0,31	1,29 \pm 0,22
CAr	266,37 \pm 21,72 ^a	0,66 \pm 0,15	1,41 \pm 0,19
H	252,72 \pm 19,08 ^a	1,16 \pm 0,52	1,03 \pm 0,33
HAr	257,00 \pm 26,57 ^a	1,09 \pm 0,91	1,12 \pm 0,42
Valor de <i>p</i>			
Interação	< 0,05	NS	NS
Dieta	NS	< 0,05	< 0,05
Araquá	< 0,05	NS	NS

Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão. Letras diferentes indicam diferenças significativas na mesma coluna, para $p < 0,05$ (ANOVA bivariada). NS: não significativo. C: Controle. CAr: Controle + Araquá. H: Hipercolesterolêmico. HAr: Hipercolesterolêmico + Araquá.

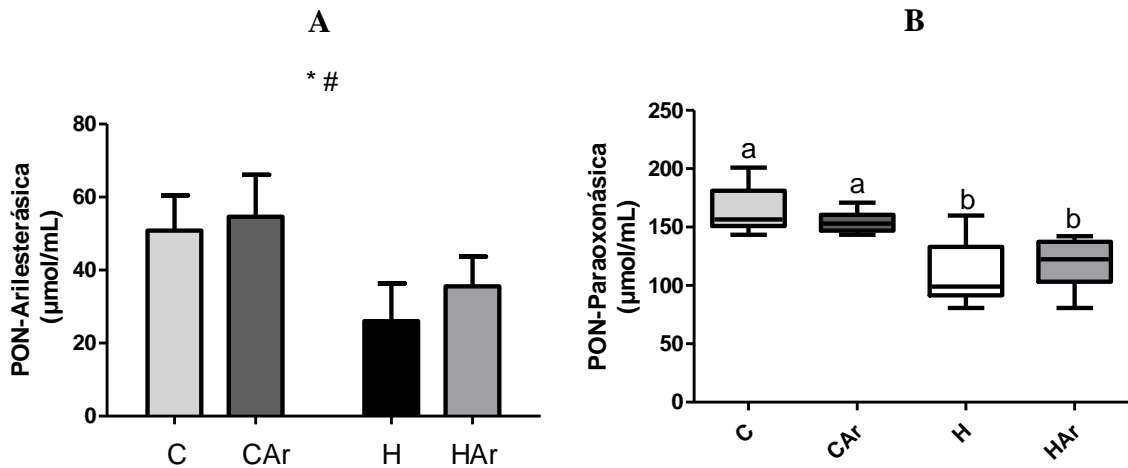


Figura 10. Concentrações de PON-arilesterásica (A) e PON-paraoxonásica (B). Em A os dados são apresentados como média \pm desvio-padrão, em B os resultados são expressos em valores mínimo e máximo. Diferenças significativas ($p < 0,05$) estão representadas por letras diferentes. * Efeito da dieta. # Efeito do tratamento. C: Controle. CAr: Controle + Araçá. H: Hipercolesterolêmico. HAr: Hipercolesterolêmico + Araçá. Grupos com n de 10 animais.

Na figura 11 são expostas as atividades das enzimas antioxidantes catalase e glutaciona. A atividade de catalase não apresentou diferença entre os grupos. Já as atividades de glutaciona total e reduzida foram influenciadas pela dieta e pelo tratamento, sendo que no grupo C e nos grupos CAr e HAr esta foi superior em relação ao grupo H. A atividade de glutaciona oxidada não apresentou diferença significativa entre os grupos.

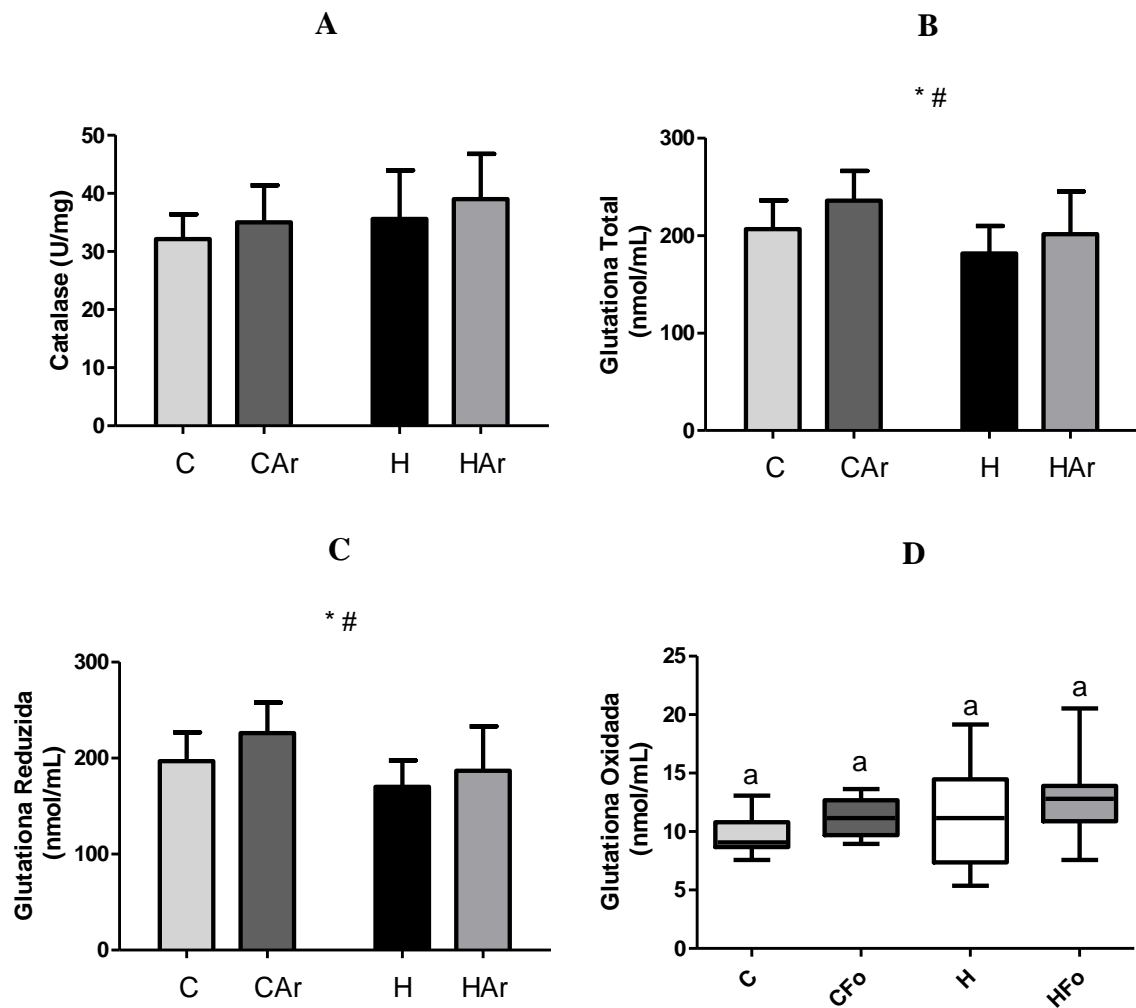


Figura 11. Atividade antioxidante: catalase (A), glutathiona total (B), glutathiona reduzida (C), glutathiona oxidada (D). Em A, B e C os dados são apresentados como média \pm desvio-padrão, em D os resultados são expressos em valores mínimo e máximo. Diferenças significativas ($p < 0,05$) estão representadas por letras diferentes. * Efeito da dieta. # Efeito do tratamento. C: Controle. CAr: Controle + Araçá. H: Hipercolesterolêmico. HAr: Hipercolesterolêmico + Araçá. Grupos com n de 10 animais.

5.4 Histologia

Os dados histológicos do tecido hepático estão representados nas tabelas 11 e 12. Na tabela 11 está descrito a presença ou ausência de degeneração, esteatose microvesicular, esteatose macrovesicular e inflamação nos diferentes grupos. Já na tabela 12, são indicados os graus referentes à presença de esteatose microvesicular, esteatose macrovesicular e inflamação. Em ambas as tabelas, não foi observado nenhuma diminuição significativa do quadro de esteatose hepática ou inflamação quando se adicionou o tratamento com a farinha de araçá. Houve diferença estatística somente dos grupos hipercolesterolêmicos em relação aos seus respectivos controles.

Tabela 11. Efeito das dietas experimentais na histologia hepática dos animais, após oito semanas.

	C n (%)	CAR n (%)	H n (%)	HAR n (%)	p (X²)
Degeneração	2 (20)*	0 (0)	10 (100) ^a	10 (100) ^a	p<0,0001
Esteatose Microvesicular	2 (20)	0 (0)	10 (100) ^a	10 (100) ^a	p <0,0001
Esteatose Macrovesicular	0 (0)	0 (0)	9 (90) ^a	7 (70) ^a	p<0,0001
Infiltrado Inflamatório	1 (10)	1 (10)	6 (60) ^a	4 (40) ^a	p=0,0356

*Os dados são apresentados como valor de *n* e porcentagem. Letra igual (^a) indica diferença dos grupos em relação aos seus respectivos controles pelo teste qui-quadrado. C: Controle. CAR: Controle + Araçá. H: Hipercolesterolêmico. HAR: Hipercolesterolêmico + Araçá.

Tabela 12. Classificação da esteatose (micro e macrovesicular) e da inflamação hepática presente nos animais após oito semanas.

	C n (%)	CAR n (%)	H n (%)	HAR n (%)	p (X²)
Esteatose Microvesicular					
0	8 (80)*	10 (100)	0 (0) ^a	0 (0) ^a	p<0,0001
1	2 (20)	0 (0)	0 (0) ^a	0 (0) ^a	
2	0 (0)	0 (0)	6 (60) ^a	10 (100) ^a	
3	0 (0)	0 (0)	4 (40) ^a	0 (0) ^a	
Esteatose Macrovesicular					
0	10 (100)	10 (100)	1 (10) ^a	3 (30) ^a	p<0,0001
1	0 (0)	0 (0)	5 (50) ^a	4 (40) ^a	
2	0 (0)	0 (0)	4 (40) ^a	3 (30) ^a	
3	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
Inflamação					
0	9 (90)	9 (90)	4 (40) ^a	6 (60) ^a	p=0,0356
1	1 (10)	1 (10)	6 (60) ^a	4 (40) ^a	
2	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
3	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	

*Os dados são apresentados como valor de *n* e porcentagem. Letra igual (^a) indica diferença dos grupos em relação aos seus respectivos controles pelo teste qui-quadrado. C: Controle. CAR: Controle + Araçá. H: Hipercolesterolêmico. HAR: Hipercolesterolêmico + Araçá.

As secções de fígado demonstram as características histológicas dos grupos: C e CAr apresentaram uma histologia normal do fígado e os grupos H e HAr apresentaram esteatose com insignificante infiltrado inflamatório e ausência de fibrose (Figura 12).

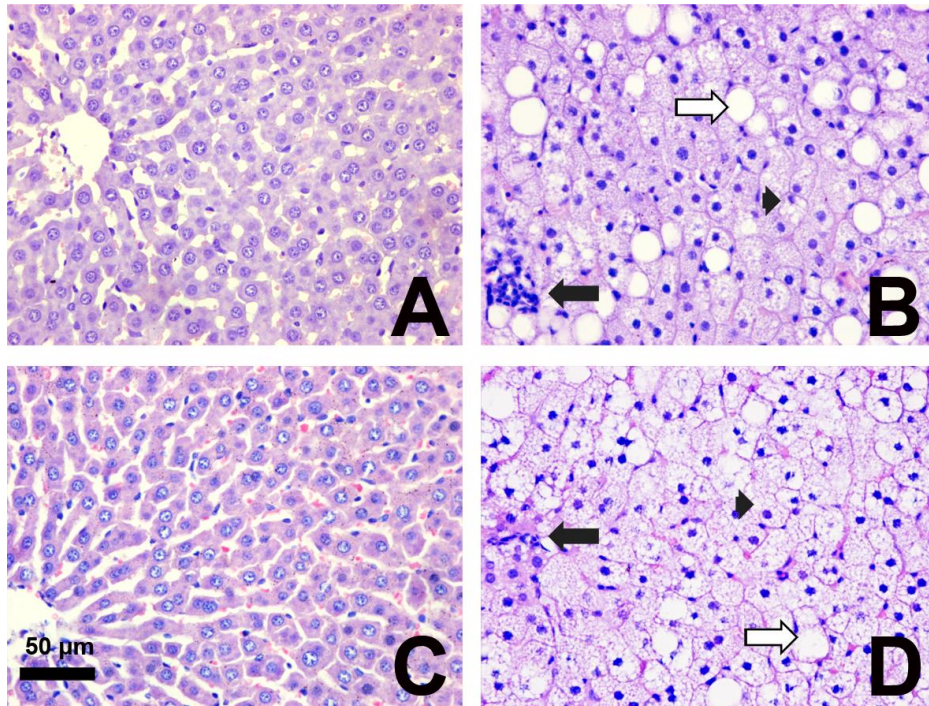


Figura 12. Fotomicrografias de cortes histológicos de fígado de ratas alimentadas com diferentes dietas experimentais, corados pela técnica da Hematoxilina e Eosina. A: grupo que recebeu dieta padrão (C), apresentou aspecto histológico normal. B: grupo que recebeu dieta hipercolesterolêmica (H), mostrou presença de degeneração com esteatose micro e macrovesicular e aumento do número de células inflamatórias. C: grupo que recebeu dieta padrão com farinha de araçá (CAr), apresentou aspecto histológico normal. D: grupo que recebeu dieta hipercolesterolêmica com a farinha de araçá (HAr), demonstrou presença esteatose micro e macrovesicular e pequeno número de células inflamatórias. As setas negras indicam infiltrado inflamatório, as cabeças de seta, hepatócitos com esteatose microvesicular e as setas brancas hepatócitos com esteatose macrovesicular. Barra = 50 micrometros.

6 DISCUSSÃO

Muitos fatores alimentares estão diretamente associados com a doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) e, por isso, além da prática de exercícios físicos, o manejo nutricional deve ser um componente de qualquer plano de tratamento para a doença (McCARTHY; RINELLA, 2012; JIAN-GAO; HAI-XIA, 2013). Sendo assim, a inclusão na dieta de alimentos ricos em compostos antioxidantes, que atuam inibindo ou interrompendo as reações oxidativas, torna-se uma estratégia eficaz na prevenção das alterações induzidas pela esteatose.

Em modelo animal a associação entre a dieta e a esteatose hepática já está bem estabelecida. Diferentes ensaios já foram descritos por induzir a doença em ratos por alimentação de uma dieta rica em gorduras (SVEGLIATI-BARONI ET AL., 2006; LIEBER et al., 2004; SAFWAT et al., 2009). Nesse contexto, este modelo animal foi utilizado para estudar o efeito do consumo da farinha de araçá sobre o perfil lipídico e o estresse oxidativo presente na esteatose hepática.

O araçá, fruto nativo do Cerrado, é considerado rico em compostos fenólicos pois demonstra teores mais elevados do que o observado em outros frutos do Cerrado (gabioba, pitanga-do-cerrado, pera-do-cerrado, cagaita, cambucá, pequi) (LIMA et al., 2007; ROCHA et al., 2011) e àqueles tradicionalmente consumidos (goiaba, acerola, abacaxi, caju, amora, morango, maracujá, banana, laranja, mamão) (KUSKOSKI et al., 2005; VIEIRA et al., 2011; FALLER; FIALHO, 2009). Além disso, possui alta capacidade antioxidante a qual correlaciona-se positivamente com a grande concentração de polifenóis (CANUTO et al., 2010). Nossos resultados identificaram que o fruto apresentou valores de polifenóis totais de $697,10 \pm 10,68$ expressos em mg de equivalentes de ácido gálico (mg/GAE) e uma capacidade antioxidante de $88,77 \pm 2,22$ expressos em μM por grama ($\mu\text{M/g}$).

Crizel et al. (2012), quando analisaram o teor de compostos fenólicos nos frutos araçá amarelo e vermelho identificaram, respectivamente, um valor de $131,21 \pm 3,47$ mg GAE/ 100g de fruto e $142,77 \pm 2,44$ mg GAE/ 100g de fruto, ambos inferiores ao do nosso estudo. A atividade antioxidante identificada foi de $34,4 \mu\text{M/g}$ para o amarelo e $34,3 \mu\text{M/g}$ para o vermelho, igualmente inferiores ao nosso resultado.

Medina et al. (2011), também avaliaram o teor de compostos fenólicos e a atividade antioxidante em diferentes acessos dos dois fenótipos da espécie, comparando o extrato aquoso com o extrato em acetona. De modo geral, a acetona promoveu melhor extração dos compostos em comparação com a extração aquosa. E, considerando os acessos do araçá

amarelo, estes apresentaram, em média, o valor de 503, 89 mg GAE/ 100g para o extrato aquoso e 639, 78 mg GAE/ 100g para o extrato em acetona. Quanto à atividade antioxidante foi encontrado uma porcentagem de inibição referente a 26,47 e 31,56, para os extratos aquoso e em acetona, respectivamente. Os valores de polifenóis detectados são parecidos com os encontrados no nosso trabalho, sendo que os autores também confirmaram que a atividade antioxidante do fruto está diretamente associada ao teor de polifenóis. Fetter et al. (2010) encontraram resultados semelhantes.

O estudo de Medina et al. (2011) corrobora com as concentrações de polifenóis encontradas no nosso fruto e as diferenças observadas em relação aos outros trabalhos podem ser explicadas por fatores como a localização de plantio, condições ambientais, estágio de maturação, entre outros fatores que contribuem para a variação da composição do fruto.

Como era esperado no nosso modelo de estudo, a dieta hipercolesterolêmica promoveu o aumento do ganho de peso corporal ao longo do experimento, bem como aumento do peso da gordura mesentérica, gordura abdominal e hepatomegalia. No entanto, a ingestão dos animais que receberam esta dieta foi menor, o que pode ser justificado pela maior densidade calórica, indicando que apesar da menor quantidade em gramas ingerida o alto teor de calorias foi capaz de induzir o ganho de peso. O tratamento como araquá não influenciou em nenhum desses parâmetros.

Abreu et al. (2014), em seu estudo verificaram que os animais alimentados com dieta hipercolesterolêmica (25% de óleo de soja e 1% de colesterol), durante 56 dias, desenvolveram esteatose hepática e alterações na expressão de mRNA das subunidades da NADPH oxidase e nas defesas antioxidantes. Apesar dessas alterações, diferente do encontrado no nosso trabalho, a dieta hipercolesterolêmica não induziu o aumento do ganho de peso corporal e das gorduras em relação ao grupo que recebeu a dieta padrão, somente o peso do fígado foi significativamente alterado. Ficou constatado ainda que a ingestão alimentar do grupo controle também foi maior, assim como o observado nos nossos resultados.

Souza et al. (2010), tiveram como foco de estudo a suplementação da dieta com a polpa de açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) sobre a melhora de biomarcadores de estresse oxidativo e do perfil lipídico sérico em ratos. Os autores realizaram um experimento com quatro grupos: o primeiro grupo serviu como o controle (C) e recebeu uma dieta AIN-93 padrão; o segundo grupo (H) recebeu uma dieta hipercolesterolêmica (óleo de soja 25% e 1% de colesterol); e o terceiro (CA) e quarto grupo (HA) receberam a dieta padrão e hipercolesterolêmica, respectivamente, suplementadas com 2% açaí. A adição de açaí aumentou significativamente o ganho de peso tanto do grupo controle quanto do

hipercolesterolêmico, diferente do no nosso trabalho onde apenas a dieta influenciou no ganho de peso. Já a ingestão alimentar não foi afetada quanto adicionou-se o açaí no grupo alimentado com a dieta padrão, somente reduziu significativamente o consumo alimentar de animais que foram alimentados com a dieta hipercolesterolêmica, confirmando que a dieta hipercolesterolêmica diminui a ingestão alimentar por possuir alta densidade calórica. Segundo os autores, estes dados mostram que o açaí melhorou o índice de eficiência alimentar ao aumentar o ganho de peso, sem aumentar a ingestão de alimentos, como foi observado nos animais hipercolesterolêmicos. O peso do fígado, assim como no presente estudo, demonstrou sofrer influência apenas da dieta hipercolesterolêmica, pois a adição de açaí não exerceu nenhum efeito significativo.

Avaliando a função renal, vimos que os níveis de creatinina sofreram efeito do tratamento, onde o grupo hipercolesterolêmico tratado apresentou maiores concentrações em relação aos demais grupos. Por outro lado, os níveis de ureia e o peso dos rins não foram influenciados significativamente nem pela dieta hipercolesterolêmica nem pelo tratamento com o araquá. Sendo assim, os resultados apresentados não indicam qualquer efeito biológico negativo sobre a função renal, uma vez que para indicar uma disfunção os parâmetros de creatinina e ureia deveriam estar aumentados (AL-OKBI et al., 2014).

Identificamos que a dieta hipercolesterolêmica promoveu um aumento dos níveis de proteínas totais, com uma diminuição dos níveis de albumina e elevação das globulinas. Na doença hepática é comum ocorrer uma síntese prejudicada de albumina (NETO; CARVALHO, 2009), o que poderia explicar a diminuição destes níveis. Associado a este fato, concentrações aumentadas de globulinas estão relacionadas, principalmente, com processos inflamatórios crônicos e também lesões hepáticas (NETO; CARVALHO, 2009), que neste caso foram desencadeados pela dieta hipercolesterolêmica.

Em relação à função pancreática, observamos que o peso do pâncreas sofreu uma interação entre a dieta e o tratamento, onde o grupo controle tratado apresentou um peso menor em relação ao grupo controle com a dieta padrão. Os níveis de lipase ficaram aumentados nos grupos alimentados com a dieta hipercolesterolêmica, não sendo identificado nenhum efeito do tratamento com o araquá. Já os níveis de amilase não apresentaram qualquer diferença significativa. Geralmente, em um diagnóstico de lesão pancreática, ocorre o aumento simultâneo dos níveis de amilase e lipase no soro. Porém, podem ser observados níveis normais de amilase e aumento somente da lipase (SHAH et al, 2010). Sabe-se que esteatose hepática ocorre aumento do estresse oxidativo e da atividade inflamatória, o que

pode interferir na fisiologia de outros tecidos, além do fígado. Sendo assim, o efeito encontrado no pâncreas talvez seja uma consequência destes processos.

A patogênese e a progressão da esteatose hepática envolve diversas anormalidades, incluindo no metabolismo lipídico. No presente estudo, com a oferta de uma dieta hipercolesterolêmica (25% de óleo de soja e 2% de colesterol) a ratas, durante 9 semanas, ficou evidenciado uma piora do perfil lipídico sérico, caracterizado por um aumento nos níveis de colesterol total e colesterol não-HDL bem como uma redução na concentração do colesterol-HDL. Os níveis de triacilgliceróis diminuíram nos animais que receberam esta dieta, fato já observado em outros trabalhos do nosso grupo, como no de Abreu et al. (2014).

Como descrito anteriormente, o araçá é um fruto rico em polifenóis, os quais possuem efeitos antioxidantes, ação anti-inflamatória e antiplaquetária, além de conduzir ao aumento dos níveis de HDL (PANDEY; RIZVI, 2009). De acordo com a literatura, os compostos fenólicos, tais como o ácido ferúlico, hesperidina, e catequina também estão relacionados com a diminuição dos níveis séricos de colesterol total e LDL-colesterol *in vivo*, aumentando sua degradação e excreção fecal (CHAN et al., 1999; PARK et al., 2014).

Apesar desse conhecido potencial hipocolesterolemiantes, o tratamento com o fruto não exerceu nenhum efeito positivo sobre o perfil lipídico. Trabalhos com efeitos biológicos do araçá ainda são inexistentes, portanto, torna-se difícil qualquer comparação ou um conhecimento mais aprofundado sobre mecanismos específicos possivelmente modulados pelos seus compostos. No estudo de Souza et al. (2010), a administração de açai, também um fruto rico em polifenóis, reduziu significativamente os níveis de colesterol (total e não-HDL), obtendo, portanto, um efeito hipocolesterolemiantes. No entanto, além dos polifenóis o açai possui ainda outros compostos como ácidos graxos insaturados, fibra dietética, e fitoesteróis que também podem provocar este efeito.

A epicatequina é um fitonutriente da família dos polifenóis e é a substância mais abundante encontrada no araçá (HAAS, 2011). Estudos apontam a epicatequina como citoprotetor, uma vez que possui intensa atividade antioxidante auxiliando na prevenção da apoptose celular (SPENCER et al., 2001). Em 1999, Chan et al. realizaram um estudo para avaliar o efeito hipolipidêmico da epicatequina isolada do chá verde. De maneira geral, os autores executaram quatro experimentos, cada qual com diferentes dietas associadas a concentrações específicas de epicatequina. Ao final do trabalho, comprovaram que houve redução dos níveis de triacilgliceróis e colesterol total, sendo este efeito hipolipidêmico dose-dependente; a suplementação com a epicatequina não possuiu efeito sobre a atividade da ácido graxo sintase no fígado, porém, os hamsters apresentaram maiores excreções fecais de

ácidos graxos totais, esteróis neutros e esteróis ácidos em comparação com o grupo controle; e não houve diferença na atividade da 3-hidroxi-3-metil-glutaril-coenzima A redutase (HMG-CoA-Red) e da colesterol aciltransferase (ACAT) intestinal. Em conclusão, foi observado que a epicatequina possui o efeito hipolipidêmico, no entanto, esta atividade não ocorre devido à inibição da síntese de colesterol ou ácidos graxos, mas provavelmente pela mediação da sua influência sobre a absorção da gordura dietética e do colesterol.

Em relação aos triacilgliceróis séricos, além do grupo CAr, os animais alimentados com a dieta hipercolesterolêmica apresentaram uma redução desses níveis quando comparados ao alimentado com uma dieta padrão. Corroborando com nossos dados, Turbino-Ribeiro et al. (2003) encontraram uma redução nos níveis séricos de triacilgliceróis em ratos alimentados com uma dieta hipercolesterolêmica. Tal fato pode ser justificado pela maior porcentagem de ácidos graxos insaturados presente na dieta hipercolesterolêmica em relação à dieta padrão. Segundo Nestel et al. (1984) e Chechi et al. (2010), os óleos ricos em ácido linoleico e linolênico possuem efeito sobre o metabolismo de VLDL (lipoproteína responsável pelo maior transporte de triacilgliceróis), sendo responsáveis por reduzir a produção e aumentar a eliminação dessa lipoproteína.

No tecido hepático, observamos maior porcentagem de lipídios nos grupos que receberam a dieta hipercolesterolêmica, com aumento dos níveis de colesterol total e triacilgliceróis. O grupo hipercolesterolêmico tratado apresentou ainda maiores níveis de triacilgliceróis em relação aos demais grupos. De acordo com os resultados no soro, este aumento de gordura no fígado é compreensível. Lee et al. (2012) induziram a esteatose hepática em camundongos C57BL/6 (B6) e C3H/HeN (C3H), por meio de uma dieta rica em gordura (60% das Kcal totais). Como resultados parciais, os autores também verificaram que a dieta rica em gordura provoca o acúmulo de triacilgliceróis no fígado, o qual correlacionou-se positivamente com o aumento do peso do órgão. Svegliati-Baroni et al. (2006) utilizaram uma dieta com alto teor de gordura (58% das calorias totais) em ratos Sprague-Dawley e observaram que a administração desta dieta induzia o depósito aumentado tanto de colesterol total quanto de triacilgliceróis no fígado. Além disso, constataram que a dieta rica em gordura foi capaz de provocar resistência à insulina, obesidade, aumento do estresse oxidativo e inflamação, caracterizando um modelo para esteatohepatite. O tratamento avaliado, com a oferta de ácido graxo poliinsaturado ω -3, conseguiu melhorar a lesão hepática anteriormente estabelecida.

No presente estudo, foi visto que a dieta hipercolesterolêmica e o tratamento com o araçá interferiram na excreção fecal dos animais, sendo que estes excretaram mais em relação

aos do grupo controle. Tal fato pode ser explicado pela alta quantidade de fibras presente no fruto. Sabe-se que as fibras regularizam o trânsito intestinal, reduzem a consistência do bolo fecal, melhoram a fermentação do conteúdo intestinal e o trofismo da mucosa do cólon (FERNANDEZ et al., 2002). Apesar disso, até o momento, não existe qualquer legislação que especifique qual a quantidade ideal para se considerar um fruto (*in natura*) rico ou não em fibras.

A RDC 54 de 2012 dispõe sobre o Regulamento Técnico sobre Informação Nutricional Complementar, que estabelece requisitos que regulem a informação nutricional complementar contida nos rótulos dos alimentos embalados comercializados no MERCOSUL. O regulamento define como informação nutricional complementar ou declaração de propriedades nutricionais qualquer representação que afirme, sugira ou implique que um alimento possui propriedades nutricionais particulares, especialmente, mas não somente, em relação ao seu valor energético e/ou ao seu conteúdo de proteínas, gorduras, carboidratos e fibra alimentar, assim como ao seu conteúdo de vitaminas e minerais.

Neste regulamento, um alimento é considerado com alto conteúdo/rico em fibras quando apresenta no mínimo 6g por 100g do alimento (prato preparado) ou mínimo de 5g por porção (ANVISA, 2012). Portanto, tomando por base esses valores e visando a quantidade de fibras encontradas no araçá, que é de 11,95 g/100g de fruto, de acordo com Pereira et al. (2012), e 37,20 g/100g de farinha, encontrado no nosso estudo, podemos sugerir não só que o fruto é rico em fibras mas também que estas foram capazes de melhorar o trânsito intestinal dos animais, aumentando a excreção.

Esta maior excreção fecal nos grupos tratados foi acompanhada pela maior porcentagem de lipídios e níveis de colesterol nas fezes, porém, a diferença encontrada não foi significativa em relação aos seus respectivos grupos controle. A biossíntese hepática de ácidos biliares a partir do colesterol é a principal via de catabolismo e na remoção de colesterol no organismo. Matsumoto, Yokoyama e Gato (2008), em um estudo com o caqui (*Diospyros kaki*) descobriram efeitos hipolipemiantes e propriedades de ligação aos ácidos biliares. Para o experimento, utilizaram camundongos C57BL/6.Cr machos, alimentados com uma dieta rica em gordura (AIN-76-modificada), suplementada com 2% ou 5% de caqui, durante dez semanas. A ingestão de caqui aumentou a quantidade em gramas de fezes excretadas, melhorou significativamente a excreção fecal de ácidos biliares e baixou a concentração de lipídios hepáticos e de colesterol no plasma. Dentre outros nutrientes, ficou constatado que o caqui é rico em taninos condensados, os quais possuem alta afinidade de

ligação aos ácidos biliares aumentando sua excreção e, portanto, atuaram como um componente funcional garantindo o efeito hipolipidêmico do caqui.

Sembries et al. (2006) estudaram os efeitos fisiológicos de sucos extraídos do bagaço de uva, maçã e beterraba vermelha em ratos. Após quatro semanas de experimento, os autores verificaram que os animais dos grupos testes (que receberam os sucos) continham maiores concentrações fecais de ácidos biliares primários, colesterol, metabólitos de colesterol e esteróis, em relação ao grupo controle. Ou seja, a administração dos sucos, que são ricos em polifenóis e fibras, resultou em efeitos nutricionais benéficos.

A elevação das transaminases séricas (ALT e AST), geralmente de 1 a 4 vezes maior que o limite superior normal, é comumente encontrada em pacientes com DHGNA. No entanto, esta alteração não é específica e níveis normais das transaminases têm sido observados em pacientes com esteatose hepática. A fosfatase alcalina também sofre alterações e pode elevar-se até duas vezes mais que limite superior normal (BAYARD; HOLT; BOROUGHS, 2006). Nossos resultados mostraram que a indução da esteatose hepática aumentou significativamente a atividade de ALT, AST e fosfatase alcalina (FA). Quando adicionado o tratamento com araçá houve uma inibição do efeito provocado pela dieta hipercolesterolêmica e restabelecimento da atividade normal de ALT. As atividades de AST e FA não foram influenciadas.

Kim, Kang e Lee (2010), encontraram, em partes, resultados semelhantes quando avaliaram o efeito da genisteína sobre a esteatose hepática. A dieta “high-fat (HF)” desencadeou alterações nos níveis séricos de ALT, mas não de AST, associando-se positivamente ao acúmulo de lipídios no fígado. Uma elevação de 56% dos níveis de ALT foi observada nos animais alimentados com a dieta HF e a suplementação com 5% de genisteína restaurou o grau exibido pelo grupo controle.

No estudo de Yoshitomi et al. (2012) foi observado o efeito do extrato das folhas de goiaba na melhora da esteatose hepática via expressão de receptores de adiponectina em ratos SHRSP.Z-Leprfa/Izm, um modelo de síndrome metabólica. Dentre outras observações importantes, ficou constatado que o grupo que recebeu o extrato das folhas de goiaba apresentou menor deposição de gordura no fígado aliado a níveis significativamente menores de ALT e AST, em relação ao grupo controle.

Uma outra característica da esteatose hepática é o aumento do estresse oxidativo. Diversos estudos vêm identificando marcadores para a avaliação do mesmo, com o intuito de estruturar sua utilização no diagnóstico e controle dos efeitos provocados. Tais marcadores são decorrentes, principalmente, da oxidação de lipídios, proteínas e DNA (MAYNE, 2003;

HALLIWELL; WHITEMAN, 2004). No presente estudo, observamos que a dieta hipercolesterolêmica provoca um aumento do estresse oxidativo, sendo confirmado pela elevação da oxidação de proteínas e lipídios no tecido hepático dos animais alimentados com esta dieta. O arará não foi capaz de impedir o aumento desses parâmetros.

Analisando os efeitos da dieta hipercolesterolêmica, nos trabalhos de Chiu et al. (2014), Dong et al. (2014) e Martín-Pozuelo et al. (2014) também foi visto que os níveis de malondialdeído aumentaram significativamente no tecido hepático dos animais com esteatose hepática, o que corrobora com os nossos dados obtidos. Carmiel-Haggai, Cederbaum e Nieto (2004), estudaram a progressão da esteatose hepática não alcoólica em ratos obesos por meio de uma dieta rica em gordura. Foi identificado elevados níveis de malondialdeído e de proteína carbonilada no fígado de ratos alimentados com a dieta “high-fat”, sugerindo, portanto, aumento da peroxidação lipídica e da oxidação de proteínas. Tais dados também vão de encontro aos nossos. Considerando ainda os resultados de Chiu et al. (2014), Dong et al. (2014) e Martín-Pozuelo et al. (2014), diferentemente do que foi observado em nosso estudo, os tratamentos propostos (extrato aquoso de *Auricularia polytricha*, saponinas totais isoladas do fruto da *Rosa laevigata* Michx e suco de tomate, respectivamente) apresentaram um efeito positivo no *status* antioxidante, reduzindo a peroxidação lipídica. De forma geral, os tratamentos consistiram da ingestão de alimentos considerados funcionais (ricos em polifenóis, taninos e licopeno) ou compostos bioativos isolados (saponinas), com reconhecidos efeitos biológicos. Do mesmo modo, o arará contém princípios ativos com ação antioxidante e anti-inflamatória e, portanto, esperava-se que a adição da farinha à dieta também fosse capaz de inibir o aumento da oxidação de lipídios e proteínas. Esta diferença no efeito encontrado pode ser devido ao tempo do experimento, a quantidade de cada composto presente no alimento, a forma de administração da dieta, a linhagem do modelo animal utilizado, dentre outros.

O aumento do estresse oxidativo com consequente aumento da peroxidação lipídica e carbonilação de proteínas, pode interferir também na atividade da PON, na concentração dos grupamentos sulfidrilas e na atividade das enzimas antioxidantes. A família de genes da paraoxonase inclui três membros: PON1, PON2 e PON3. A PON1 é uma enzima sintetizada principalmente no fígado e é encontrada na circulação ligada às lipoproteínas de alta densidade (HDL). A sua principal função é a degradação de lipídios oxidados, desempenhando um importante papel no sistema antioxidante do organismo. Alterações nos níveis circulantes da PON1 estão associadas com uma variedade de doenças que envolvem o estresse oxidativo (AVIRAM; ROSENBLAT, 2004). No nosso estudo observamos que a dieta

hipercolesterolêmica diminuiu significativamente a atividade da PON e o tratamento com o araçá foi eficaz em restaurar essa atividade.

É possível sugerir que este efeito observado, com o tratamento no aumento da PON, esteja relacionado ao alto teor de polifenóis totais do fruto. Fuhrman e Aviram (2002) estudaram especificamente a atividade da PON e encontraram resultados semelhantes. No ensaio, foram utilizados camundongos deficientes em apolipoproteína E (camundongos E^o), que possuem mais susceptibilidade à oxidação plasmática, suplementados com vinho tinto, quercetina e catequina. Após seis semanas, foi visto que a suplementação contribuiu para o aumento da atividade sérica da PON (medida pela atividade arilesterásica), sugerindo que o consumo do vinho e de polifenóis isolados pode ser eficiente em diminuir a oxidação da LDL e conseqüentemente reduzir o estresse oxidativo. Em outro estudo com camundongos E^o foi avaliado o efeito do suco de romã, rico em ácido ascórbico e polifenóis. O consumo do suco promoveu o aumento da atividade da PON, também medida pela atividade arilesterásica, além de redução do estresse oxidativo, da modificação aterogênica de LDL e agregação plaquetária (AVIRAM et al., 2000).

No trabalho de García-Heredia et al. (2013) foram utilizados camundongos C57BL/6J, deficientes na expressão de PON1 (geneticamente modificados), alimentados durante 32 semanas com uma dieta rica em gordura (20%) e colesterol (1%). Ao final do experimento, os autores observaram que a deficiência de PON1 estava diretamente relacionada à severidade da esteatose hepática estabelecida nos animais. Constataram alterações histológicas no fígado, aumento do estresse oxidativo hepático, reforçado pela elevação de diversos marcadores bioquímicos de lipídios, bem como peroxidação lipídica e oxidação de proteínas e DNA, além do aumento da relação GSSG/GSH. A deficiência de PON1 e as alterações implicadas demonstram o quão importante a enzima se faz na proteção contra a esteatose hepática, induzida pela dieta.

Os grupamentos sulfidrilas são caracterizados por um átomo de enxofre ligado a um átomo de hidrogênio (-SH). A função química determinada por esse grupo é a função tiol. O estado redox intra e extracelular dos tióis desempenha um papel crítico na determinação da estrutura e função da proteína, regulação da atividade enzimática de fatores de transcrição e proteção antioxidante (COSTA; SANTOS; LIMA, 2006). Diante do exposto, é importante destacar que o tratamento com o araçá influenciou positivamente os grupamentos sulfidrilas totais, aumentando a sua concentração. Em adição, o araçá também induziu o aumento da atividade da glutatona total e reduzida. A glutatona é um tiol de baixa massa molecular e muitas das suas reações envolvem o grupo sulfidrilas (SH), altamente polarizável, tornando-o

um bom nucleófilo para reações com compostos químicos eletrofílicos. Esta habilidade de doar elétrons a outros compostos também faz da glutathione um bom redutor (HUBER; ALMEIDA; FÁTIMA, 2008). Diante do exposto e considerando também o aumento da atividade da PON, é possível sugerir que o tratamento com o araçá proporcionou uma maior proteção antioxidante aos animais, inclusive aos que receberam a dieta hipercolesterolêmica. Em relação à catalase não foi observado qual quer efeito significativo.

No estudo conduzido por Carmiel-Haggai, Cederbaum e Nieto (2004), foi visto que a progressão da esteatose hepática não alcoólica em ratos obesos diminuía os níveis de glutathione reduzida e aumentava os de glutathione oxidada. Além disso, houve uma diminuição da capacidade antioxidante das enzimas catalase, SOD e glutathione peroxidase. Como discussão, os autores colocam que tais enzimas são de extrema importância nas defesas antioxidantes celulares e a diminuição basal das mesmas pode conduzir ao agravamento do estresse oxidativo. Este desequilíbrio constante pode levar à progressão da doença e morte celular. Como descrito anteriormente, diversos compostos (polifenóis, fibras, ácidos graxos poliinsaturados, vitamina C, saponinas, taninos condensados, dentre outros) são eficazes em inibir a deposição excessiva de lipídios no fígado, reduzindo conseqüentemente o estresse oxidativo e potencializando a atividade das enzimas antioxidantes.

Enfim, de acordo com os resultados apresentados e discutidos, sobre a relação da composição química do araçá com seus potenciais efeitos benéficos, como o aumento da concentração de sulfidrilas totais e da atividade da PON e da glutathione, cria-se a perspectiva de aprofundar o conhecimento sobre o fruto e tentar melhor elucidar as respostas metabólicas induzidas pelo mesmo.

7 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos, podemos concluir que o tratamento com o araçá não alterou o perfil lipídico dos animais, mantendo valores iguais aos seus respectivos grupos controle. Ao mesmo tempo, o tratamento promoveu aumento da PON, das sulfidrilas totais e da glutathiona, indicando um efeito positivo sobre o *status* antioxidante e inibindo os efeitos causados pelo estresse oxidativo na esteatose hepática, induzida pela dieta hipercolesterolêmica.

Diante disso, é válido ressaltar que este foi o primeiro trabalho *in vivo* com o araçá no modelo de esteatose hepática não alcoólica, possibilitando ampliar o conhecimento acerca das propriedades bioativas do fruto. Além disso, este estudo pode viabilizar a possível classificação do araçá como um alimento funcional, gerando agregação de valor ao mesmo.

REFERÊNCIAS

- ABREU, I. C. M. E. et al. Hypercholesterolemic Diet Induces Hepatic Steatosis and Alterations in mRNA Expression of NADPH Oxidase in Rat Livers. **Arq. Bras. Endocrinol. Metabol.**, v. 58, n. 3, p. 251-259, 2014.
- ADA REPORTS. Position of the American Dietetic Association: Functional Foods. **J. Am. Diet. Assoc.**, v. 104, n. 4, p. 814-826, 2004.
- AEBI, H. Catalase *in vitro*. **Methods Enzymol**, v.105, p. 121-126, 1984.
- AFANAS'EV, I. Signaling and Damaging Functions of Free Radicals in Aging—Free Radical Theory, Hormesis, and TOR. **Aging and Disease**, v.1, n.2, p. 75-88, 2010.
- ALBA, L. M.; LINDOR, K. Review article: non-alcoholic fatty liver disease. **Aliment. Pharmacol. Ther.**, v. 17, n. 8 , p. 977–986, 2003.
- AL-OKBI, S. Y. Prevention of Renal Dysfunction by Nutraceuticals Prepared from Oil Rich Plant Foods. **Asian Pac J Trop Biomed**, v. 4, n. 8, p. 618-627, 2014.
- ALVARENGA, F. Q. et al. In Vivo Analgesic Activity, Toxicity and Phytochemical Screening of the Hydroalcoholic Extract from the Leaves of *Psidium cattleianum* Sabine. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 150, p. 280–284, 2013.
- AMES, B. N.; SHIGENAGA, M. K.; HAGEN, T. M. Oxidants, Antioxidants, and the Degenerative Diseases of Aging. **PNAS**, v.90, n. 17, p. 7915-7922, 1993.
- AMIR, M.; CZAJA, M. J. Autophagy in Nonalcoholic Steatohepatitis. **Expert. Rev. Gastroenterol. Hepatol.** v.5, n. 2, p. 159-166, 2011.
- ANDRADE, R. J.; GARCÍA-ESCAÑO, M. D. Esteatosis hepática. **Med. Clin.**, Barcelona, v. 114, n. 15, p. 574-576, 2000.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Regulamento Técnico de Procedimentos para Registro de Alimento com Alegação de Propriedades Funcionais e ou de Saúde em sua Rotulagem. **Resolução nº 19**, de 30 de abril de 1999.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada - RDC 54. Regulamento Técnico sobre Informação Nutricional Complementar, 2012.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Orientação para Utilização, em Rótulos de Alimentos, de Alegações de Propriedades Funcionais de Nutrientes com Funções Plenamente Reconhecidas pela Comunidade Científica. **Informe Técnico nº 9**, de 21 de maio de 2004.

ARAI, M. et al. Mitochondrial Phospholipid Hydroperoxide Glutathione Peroxidase Plays a Major Role in Preventing Oxidative Injury to Cells. **J. Biol. Chem.**, v.274, n. 8, p. 4924-4933, 1999.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists, 16th edn, AOAC, Arlington, v. 2, 1998.

AVIRAM, M. et al. Pomegranate Juice Consumption Reduces Oxidative Stress, Atherogenic Modifications to LDL, and Platelet Aggregation: Studies in Humans and in Atherosclerotic Apolipoprotein E-Deficient Mice. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 71, n. 5, p. 1062-1076, 2000.

AVIRAM, M.; ROSENBLAT, M. Paraoxonases 1, 2, and 3, Oxidative Stress, and Macrophage Foam Cell Formation During Atherosclerosis Development. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 37, n. 9, p. 1304-1316, 2004.

BARATA-SOARES, A. D. et al. Ascorbic Acid Biosynthesis: A Precursor Study on Plants. **Braz. J. Plant Physiol**, vol. 16, n. 3, p. 147-154, 2004.

BAYARD, M.; HOLT, J.; BOROUGHS, E. Nonalcoholic Fatty Liver Disease. **Am. Fam. Physician.**, v.73, n. 11, p. 1961-8, 2006.

BELTOWSKI, J; WOJCICKA, G; JAMROZ, A. Differential effect of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors on plasma paraoxonase 1 activity in the rat. **Polish Journal of Pharmacology**. v. 54, n. 6, p. 661-671, 2002.

BIANCHI, M. L. P; ANTUNES, L. M. G. Radicais Livres e os Principais Antioxidantes da Dieta. **Rev Nutr**. v. 12. n.12, p. 123-30, 1999.

BLOKHINA, O.; VIROLAINEN, E.; FAGERSTEDT, K. V. Antioxidants, Oxidative Damage and Oxygen Deprivation Stress: a Review. **Annals of Botany**, n. 91, v. 2, p. 179-194, 2003.

BRAND-WILLIAMS, W; CUVELIER, M. E; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensm. Wiss. Technol.** v. 28, n. 1, p. 25–30, 1995.

BRAVO, E. et al. High Fat Diet-Induced Non Alcoholic Fatty Liver Disease in Rats is Associated with Hyperhomocysteinemia Caused by Down Regulation of the Transsulphuration Pathway. **Lipids in Health and Disease**, v. 10, 2011.

BRUNT, E. M. et al. Nonalcoholic Steatohepatitis: A Proposal for Grading and Staging the Histological Lesions. **Am. J. Gastroenterol.**, v.94, n. 9, p. 2467-74, 1999.

BUEGE, J. A; AUST, S. D. Microsomal lipid peroxidation. **Methods in Enzymology**. v. 52, p. 302-310, 1978.

BUETTNER, G. R. The Pecking Order of Free Radicals and Antioxidants: Lipid Peroxidation, α -Tocopherol, and Ascorbate. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 300, n. 2, p. 535-43, 1993.

BURDON, R. H. Superoxide and Hydrogen Peroxide in Relation to Mammalian Cell Proliferation. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 18, n. 4, p. 775-794, 1995.

BYRNE, C. D. Non-alcoholic Fatty Liver Disease, Insulin Resistance and Ectopic Fat: A New Problem in Diabetes Management. **Diabet. Med.**, v. 29, n. 9, p. 1098–1107, 2012.

CANUTO, G. A. B. Caracterização Físico-Química de Polpas de Frutos da Amazônia e sua Correlação com a Atividade Anti-Radical Livre. **Rev. Bras. Frutic.**, v. 32, n. 4, p. 1196-1205, 2010

CARMIEL-HAGGAI, M.; CEDERBAUM, A. I.; NIETO, N. A High-Fat Diet Leads to the Progression of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease in Obese Rats. **FASEB J.**, v. 19, n. 1, p. 136-138, 2004.

CERUTTI, P. A.; TRUMP, B. F. Oxidant stress and carcinogenesis. **European J. Clin. Investigation**, Epalinges, Lausanne, v.3, n. 1, p. 1-7, 1991.

CHALASANI, N. et al. The Diagnosis and Management of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: Practice Guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases, American College of Gastroenterology, and the American Gastroenterological Association. **Hepatology**., v. 55, n. 6, p. 2005-2023, 2012.

CHAN, P. T. et al. Jasmine Green Tea Epicatechins Are Hypolipidemic in Hamsters (*Mesocricetus auratus*) Fed a High Fat Diet. **J. Nutr.**, v. 129, n. 6, p. 1094-101, 1999.

CHANG, YUAN-YEN et al. Preventive Effects of Taurine on Development of Hepatic Steatosis Induced by a High-Fat/Cholesterol Dietary Habit. **J. Agric. Food Chem.**, v. 59, n. 1, p. 450–457, 2011.

CHECHI, K. et al. Flax Oil-Mediated Activation of PPAR-G Correlates with Reduction of Hepatic Lipid Accumulation in Obese Spontaneously Hypertensive/Ndmc-Cp Rats, a Model of the Metabolic Syndrome. **British Journal of Nutrition**, v. 104, p. 1313–1321, 2010.

CHEN, A. F. et al. Free Radical Biology of the Cardiovascular System. **Clin. Science**, v. 123, n. 2, p. 73-91, 2012.

CHHABRA, R. et al. Association of Coronary Artery Calcification With Hepatic Steatosis in Asymptomatic Individuals. **Mayo Clinic Proceedings**, Orlando, v. 88, n. 11, p. 1259-1265, 2013.

CHIU, WAN-CHUN et al. *Auricularia polytricha* aqueous extract supplementation decreases hepatic lipid accumulation and improves antioxidative status in animal model of nonalcoholic fatty liver. **BioMedicine**, v. 4, n. 2, p. 29-38, 2014.

CLARK. J. M; BRANCATI, F. L.; DIEHL, A. M. Nonalcoholic Fatty Liver Disease. **Gastroenterology**, v. 122, n. 6, p. 1649-1657, 2002.

CONG, WEI-NA et al. The Establishment of a Novel Non-Alcoholic Steatohepatitis Model Accompanied with Obesity and Insulin Resistance in Mice. **Life Sci.**, v. 82, n. 19-20, p. 983-990, 2008.

CONNOR, W. E.; DE FRANCESCO, C. A.; CONNOR, S. L. n-3 fatty acids from fish oil. Effects on plasma lipoproteins and hypertriglyceridemic patients. **Ann NY Acad. Sci.**, v. 14, n. 683, p. 16-34, 1993.

COSTA, N. M. B.; ROSA, C. O. B. Alimentos Funcionais - Componentes Bioativos e Efeitos Fisiológicos. 1 Ed. Rio de Janeiro: Rubio, 2010.

COSTA, C. M.; SANTOS, R. C. C.; LIMA, E. S. A Simple Automated Procedure for Thiol Measurement in Human Serum Samples. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, v. 42, n. 5, p. 345-350, 2006.

CRIZEL, R. L. et al. Perdas do Potencial Funcional de Frutos de Araçá Amarelo e Vermelho Durante o Processamento em Sucos e Armazenamento. In: 21º Congresso de Iniciação Científica - 4ª Mostra Científica, 2012, Pelotas. **Anais...** Pelotas: Universidade Federal de Pelotas, 2012.

DANTAS, A. **Qualidade, Compostos Bioativos, Atividade Antioxidante e Enzimática de Frutos de Araçazeiros (*Psidium Sp.*) do Brejo Paraibano.** 2011. 116F. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal da Paraíba, Areia, 2011.

DAVIES, K. J. A. Oxidative Stress, Antioxidant Defenses, and Damage Removal, Repair, and Replacement Systems. **IUBMB Life**, v. 50, n. 4-5, p. 279-89, 2000.

DAY, C. P.; JAMES, O. F. W. Steatohepatitis: A Tale of Two “Hits”? **Gastroenterology**, v. 114, n. 4, p. 842-845, 1998.

DIEHL, A. M. Genetic Susceptibility to Hepatic Steatosis. **N. Engl. J. Med.**, v. 362, p. 1142-1143, 2010.

DIZDAROGLU, M. et al. Free Radical-Induced Damage to Dna: Mechanisms and Measurement. **Free Radical Biology & Medicine**, vol. 32, n. 11, p. 1102–1115, 2002.

EMBRAPA. **Araçás do Gênero *Psidium*: Principais Espécies, Ocorrência, Descrição e Usos:** Documentos 266. Planaltina, 2009.

DONG, D. et al. Total Saponins from *Rosa laevigata* Michx Fruit Attenuates Hepatic Steatosis Induced by High-Fat Diet in Rats. **Food Funct.**, v. 5, n. 12, p. 3029-3330, 2014.

FALLER, A. L. K.; FIALHO. E. Disponibilidade de Polifenóis em Frutas e Hortaliças Consumidas no Brasil. **Rev. Saúde Pública**, v. 43, n. 2, p. 211-8, 2009.

FERNANDEZ, S. A. V. et al. Efeito de Dietas Ricas em Fibras Sobre Ratos em Crescimento: Estudo Experimental. **Pediatria (São Paulo)**, v.24, n. ½, p. 32-37, 2002.

FERREIRA, D. M. S. et al. Revisiting the Metabolic Syndrome and Paving the Way for MicroRNAs in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. **FEBS J.**, v. 281, n. 11, p. 2503-24, 2013.

FERREIRA, F.; FERREIRA, R.; DUARTE, J. A. Stress Oxidativo e Dano Oxidativo Muscular Esquelético: Influência do Exercício Agudo Inabitual e do Treino Físico. **Rev. Port. Cien. Desp.**, v.7, n.2, p. 257-275,2007.

FETTER, M. R. et al., Propriedades Funcionais de Araçá-Amarelo, Araçá-Vermelho (*Psidium cattleianum* Sabine) e Araçá-Pera (*P. acutangulum* D.C.) cultivados em Pelotas/RS. **Braz. J. Food Technol.** Pelotas, n. 15, p. 92-95, 2010.

FOLCH, J.; LEES, M.; SLOAN-STANLEY, G. H. A simple method for isolation and purification of total lipids from animal tissues. **Journal of Biological Chemistry.** v. 226, p. 497-509, 1957.

FUCHS, M.; SANYAL, A. J. Lipotoxicity in NASH. **J. Hepatol.**, v.56, n. 1, p. 291-293, 2011.

FUHRMAN B.; AVIRAM, M. Preservation of Paraoxonase Activity by Wine Flavonoids: Possible Role in Protection of LDL from Lipid Peroxidation. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 957, p. 321-324, 2002.

FULDA, S. et al. Cellular Stress Responses: Cell Survival and Cell Death. **International Journal of Cell Biology**, v. 2010, p. 1-13, 2010.

GALHO, A. S. et al. Composição Química e Respiração de Crescimento em Frutos de *Psidium Cattleianum* Sabine Durante o Ciclo de Desenvolvimento. **Rev. Bras. Frutic.**, v.29, n.1, p.61-66, 2007.

GARCÍA-HEREDIA, A. et al. Paraoxonase-1 Deficiency Is Associated with Severe Liver Steatosis in Mice Fed a High-fat High-cholesterol Diet: A Metabolomic Approach. **J. Proteome Res.**, v. 12, n. 4, p. 1946-55, 2013.

JIAN-GAO, F; HAI-XIA, C. Role of Diet and Nutritional Management in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. **J. Gastroenterol. Hepatol.**, v. 28, n. 4, p. 81-87, 2013.

GEORGÉ, S; BRAT, P; ALTER, P; AMIOT, M. J. Rapid determination of polyphenols and vitamin C in plant-derived products. **J. Agric. Food Chem.** v. 53, n. 5, p. 1370–1373, 2005.

GIACOBBO, C. L. et al. Avaliação do Teor de Vitamina C em Diferentes Grupos de Araçá-Comum. **Rev. Bras. Agrocência.** Pelotas, v.14, n.1, p.155-159, 2008.

GRAAF, E. L. et al. Grade of Deceased Donor Liver Macrovesicular Steatosis Impacts Graft and Recipient Outcomes More Than the Donor Risk Index. **J. Gastroenterol. Hepatol.**, v. 27, n. 3, p.540-546, 2012.

HALLIWELL, B.; WHITEMAN, M. Measuring Reactive Species and Oxidative Damage *In Vivo* and In Cell Culture: How Should You do it And What do the Results Mean? **British Journal of Pharmacology**, v. 142, p. 231–255, 2004.

HARIRI, M. et al. Ingestão de Legumes e Frutas são Negativamente Correlacionados com Risco de AVC no Irã. **Int. J. Prev. Med.**, v. 4, n. 2, p. 300-305, 2013.

HASLER, C, M. Functional Foods: Their Role in Disease Prevention and Health Promotion. **Scientific Status Summary**, v. 52, n. 11, p. 63-70, 1998.

HAAS, L. I. R., **Caracterização Físico-Química, Fitoquímica, Atividade Antioxidante *In Vitro* e *In Vivo*, e Efeitos Antiproliferativos de Extratos dos Frutos do Araçá (*Psidium cattleianum* Sabine) e da Guabiroba (*Campomanesia xanthocarpa* O. Berg)**. 2011. 107f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia Agroindustrial) - Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2011.

HUBER, P. C.; ALMEIDA, W. P.; FÁTIMA, A. Glutathione e Enzimas Relacionadas: Papel Biológico e Importância em Processos Patológicos. **Quim. Nova**, v. 31, n. 5, p. 1170-1179, 2008.

JR, B. R. H.; RENZI, L. M. Carotenoids. **Adv. Nutr**, vol. 4, p. 474-476, 2013.

JR GUERRERO. P. G. et al. Composição Química e Atividades Antiparasitárias do Óleo Essencial de *Psidium cattleianum* (Mirtaceae). **Sociedade Brasileira de Química**.

KAMATA, H.; HIRATA, H. Redox Regulation of Cellular Signalling. **Cell. Signal.**, v.11, n.1, p. 1–14, 1999.

KIM, MI-HYUN; KANG, KYUNG-SUN; LEE, YEON-SOOK. The Inhibitory Effect of Genistein on Hepatic Steatosis is Linked to Visceral Adipocyte Metabolism in Mice with Diet-Induced Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. **British Journal of Nutrition**, v. 104, p. 1333–1342, 2010.

KLAUNIG, J.; KAMENDULIS, L. M.; HOCEVAR, B. A. Oxidative Stress and Oxidative Damage in Carcinogenesis. **Toxicol. Pathol.**, n. 38, v.1, p. 96-109, 2010.

KITAMORI, K. et al. Development of Novel Rat Model for High-Fat and High-Cholesterol Diet-Induced Steatohepatitis and Severe Fibrosis Progression in SHRSP5/Dmcr. **Environ Health Prev. Med.**, v. 17, n. 3, p. 173-182, 2012.

KLEINER, D. E. et al. Design and Validation of a Histological Scoring System for Nonalcoholic Fatty Liver Disease. **Hepatology**, v. 41, n. 6, p. 1313-21, 2005.

KOTEISH, A.; DIEHL, A. M. Animals Models os Steatohepatitis. **Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.**, v. 16, n 5, p. 679-690, 2002.

KUSKOSKI, E. M. et al. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante em pulpa de frutos. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 25, n. 4, p. 726-732, 2005.

LAJOLO, F. M. Functional Foods: Latin American Perspectives. **Br. J. Nutr.**, v.88, suppl. 2, p. 145-50, 2002.

LEE, Y. J. et al. Nuclear Receptor PPAR γ -Regulated Monoacylglycerol O-Acyltransferase 1 (MGAT1) Expression is Responsible for the Lipid Accumulation in Diet-Induced Hepatic Steatosis. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 109, n. 34, p. 13656-61, 2012.

LEE, M. J. Liver Steatosis Assessment: Correlations among Pathology, Radiology, Clinical Data and Automated Image Analysis Software. **Pathol. Res. Pract.**, v. 209, n. 6, p. 371-379, 2013.

LEVINE, R. L; WILLIAMS J. A; STADTMAN E. R; SHACTER E. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. **Methods in Enzymology**. v. 233, p. 346-357, 1994.

LIEBER, C. S. et al. Model of Nonalcoholic Steatohepatitis. **Am J. Clin. Nutr.**, v. 79, n. 3, p.502-509, 2004.

LIOCHEV, S. I. Reactive Oxygen Species and the Free Radical Theory of Aging. **Free Radic. Biol. Med.**, n, 60, p.1-4, 2013.

LIMA, A. et al. Composição Química e Compostos Bioativos Presentes na Polpa e na Amêndoa do Pequi (Caryocar brasiliense, Camb.). **Rev. Bras. Frutic.**, v. 29, n. 3, p. 695-698, 2007.

LIMÓN-PACHECO, J.; GONSEBATT, M. E. The Role of Antioxidants and Antioxidant-Related Enzymes in Protective Responses to Environmentally Induced Oxidative Stress. **Mutat. Res.**, v. 674, n. 1-2, p. 137-47, 2009.

LOBO, V.; PATIL, A.; CHANDRA, N. Free Radicals, Antioxidants and Functional Foods: Impact nn Human Health. **Pharmacognosy Reviews**, v. 4, n. 8, p. 118-126, 2010.

LONDON, R. M.; GEORGE, J. Pathogenesis of NASH: Animal Models. **Clin. Liver. Dis.**, v. 11, n. 1, p. 55–74, 2007.

MCCARTHY, E. M.; RINELLA, M. E. The Role of Diet and Nutrient Composition in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. **Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics**, v. 112, n. 3, p. 401-409, 2012.

MAKADIA, S. S. et al. Relation of Hepatic Steatosis to Atherogenic Dyslipidemia. **Am. J. Cardiol.**, v. 112, n. 10, p. 1599-1604, 2013.

MANEA, A.; FORTUNO, A.; MARTIN-VENTURA, J. L. Oxidative Stress in Cardiovascular Pathologies: Genetics, Cellular, and Molecular Mechanisms and Future Antioxidant Therapies. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**. 2012.

MARTÍN-POZUELO, G. et al. The Effect of Tomato Juice Supplementation on Biomarkers and Gene Expression Related to Lipid Metabolism in Rats with Induced Hepatic Steatosis. **Eur. J. Nutr.** 2014.

MATOS S.L. et al. Dietary Models for Inducing Hypercholesterolemia in Rats. **Braz. Arch. Biol. Technol.** v.48, n. 2, p. 203-209, 2005.

MATSUMOTO K.; YOKOYAMA, S.; GATO, N. Hypolipidemic effect of young persimmon fruit in C57BL/6.KOR-ApoEshl mice. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, v 72, n. 10, p. 2651-2659, 2008.

MATTEONI, C. A. et al. Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A Spectrum of Clinical and Pathological Severity. **Gastroenterology**, v. 116, n. 6, p. 1413-1419, 1999.

MAYNE, S. T. Antioxidant Nutrients and Chronic Disease: Use of Biomarkers of Exposure and Oxidative Stress Status in Epidemiologic Research. **Journal of Nutrition**, v. 133, n. 3, p. 9335-9405, 2003.

MEDINA, A. L. et al. Araçá (*Psidium cattleianum* Sabine) Fruit Extracts with Antioxidant and Antimicrobial Activities and Antiproliferative Effect on Human Cancer Cells. **Food Chemistry**. London, v.128, p. 916-922, 2011.

MILNER, J. A. Functional Foods and Health Promotion. **J. Nutr.**, v. 129, n. 7, p. 1395-1397, 1999.

NALBANTOGLU, I.; BRUNT, E. M. Role of Liver Biopsy in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. **World J. Gastroenterol.**, v. 20, n. 27, p. 9026–9037, 2014.

NANJI, A. A. Animal Models of Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Steatohepatitis. **Clin. Liver Dis.**, v. 8, n. 3, p. 559-574, 2004.

NARANG, S.; ASHOK YADAV, A.; VAIDYA, M. Free Radicals v/s Antioxidants: The Deadly Demons v/s the Friendly Scavengers: A review. **Asian Journal of Pharmacy and life Science**, v. 1, n.1, p. 1-6, 2011.

NARCISO-SCHIAVON, J. L. et al. Clinical Characteristics Associated with Hepatic Steatosis on Ultrasonography in Patients with Elevated Alanine Aminotransferase. **São Paulo Med. J.**, v. 128, n. 6, p. 342-347, 2010.

NASSIR, F.; IBDAH, J. A. Role of Mitochondria in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. **Int. J. Mol. Sci.**, v.15, n. 5, p. 8713-8742, 2014.

NESTEL, P. J. et al. Suppression by Diets Rich in Fish Oil of Very Low Density Lipoprotein Production in Man. **J. Clin. Invest.**, v. 74, n. 1, p. 82–89, 1984.

NETO, J. C. et al. Caracterização agrônômica e potencial antioxidante de frutos de clones de aceroleira. **Rev. Ciênc. Agron.** v. 43, n. 4, p. 713-721, 2012.

NETO, N. S. R.; CARVALHO, J. F. O Uso de Provas de Atividade Inflamatória em Reumatologia. **Rev. Bras. Reumatol.**, v. 49, n. 4, p. 413-430, 2009.

NOCTOR, G.; FOYER, C. H. Ascorbate And Glutathione: Keeping Active Oxygen Under Control. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.**, v. 49, p. 249-279, 1998.

NOORI, S. An Overview of Oxidative Stress and Antioxidant Defensive System. **Open Access Scientific Reports**, v. 1, n. 8, p. 1-9, 2012.

NSEIR, W.; HELLOU, E.; ASSY, N. Role of Diet and Lifestyle Changes in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. **World J. Gastroenterol.**, v. 20, n. 28, p. 9338-9344, 2014.

PAGE, J.; HARRISON, S. A. NASH and HCC. **Clin. Liver. Dis.**, v. 13, n. 4 , p. 631-647, 2009.

PANDEY, K. B.; RIZVI, S. I. Plant Polyphenols as Dietary Antioxidants in Human Health and Disease. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2, n. 5, p. 270-278, 2009.

PARK, Y. et al. Hypocholesterolemic Metabolism of Dietary Red Pericarp Glutinous Rice Rich in Phenolic Compounds in Mice Fed a High Cholesterol Diet. **Nutrition Research and Practice**, v. 8, n. 6, p. 632-637, 2014.

PATELL, R. et al. Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) in Obesity. **J. Clin. Diagn. Res.**, v. 8, n. 1, p. 62-66, 2014.

PEDROSA-MACEDO, J. H. et al. **O Araçazeiro – Ecologia e Controle Biológico**. [s.n]. Curitiba, 2007.

PEREIRA, M. C. **Avaliação de Compostos Bioativos em Frutos Nativos do Rio Grande do Sul**. 2011. 137f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

PEREIRA, M. C. et al. Characterization and Antioxidant Potential of Brazilian Fruits from the Myrtaceae Family. **J. Agric. Food Chem.** Porto Alegre. v. 60, p. 3061-3067, 2012.

POLJSAK, B.; MILISAV, I. Aging, Oxidative Stress and Antioxidants. In: MORALES-GONZÁLEZ, J. A. Oxidative Stress and Chronic Degenerative Diseases - A Role for Antioxidants. **Intech Open Science**. Capítulo 14, p. 331-353, 2013.

RAHAL, A. et al. Oxidative Stress, Prooxidants, and Antioxidants: The Interplay. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 1-19, 2014.

RAHMAN, K. Studies on Free Radicals, Antioxidants, and Co-Factors. **Clinical Interventions in Aging**, v. 2, n. 2, p. 219-236, 2007.

RAMIREZ, M. R. et al. Study of the Effects of *Psidium cattleianum* on Gene Expression from Senescent Mouse Hippocampus. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**. v.11, n.2, p. 127-137, 2012.

RASEIRA, M. C. B.; RASEIRA, A. Contribuição ao Estudo do Araçazeiro, *Psidium cattleianum*. EMBRAPA – CPACT. 1996.

REEVES, P. G; NIELSEN, F. H; FAHEY, G. C. AIN-93 Purified Diets for Laboratory Rodents: Final Report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the Reformulation of the AIN-76A Rodent Diet. **The Journal of Nutrition**. v. 123, n. 11 p. 1939-1951, 1993.

ROBERTSON, G.; LECLERCQ, I.; FARRELL, G. C. Nonalcoholic Steatosis and Steatohepatitis II. Cytochrome P-450 Enzymes and Oxidative Stress. **Am J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.**, v. 281, n. 5, p. 1135-1139, 2001.

ROCHA, L. D. et al, Estudo Anatômico Comparativo da Casca do Caule do Araçá-Amarelo e Araçá-vermelho, *Psidium cattleianum* Sabine, Myrtaceae. **Acta Bot. Bras.** v.22, n.4, p. 1114-1122, 2008.

ROCHA, W. S. et al. Compostos Fenólicos Totais e Taninos Condensados em Frutas Nativas Do Cerrado. **Rev. Bras. Frutic.**, v. 33, n. 4, p. 1215-1221, 2011.

RODRIGUES-AMAYA, D. B. KIMURA, M. AMAYA-FARFAN, J. Fontes Brasileiras de Carotenoides. **Tabela Brasileira de Composição de Carotenoides em Alimentos**. Brasília, 2008.

RODRIGUES, M. H. Evaluation of Clinical and Inflammatory Markers of Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Postmenopausal Women with Metabolic Syndrome. **Metab. Syndr. Relat. Disord.**, v.12, n. 6, p. 330-338, 2014.

ROESLER, R. et al. Atividade Antioxidante de Frutas do Cerrado. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 27, n. 1, p. 53-60, 2007.

RONSEIN, G. E. et al. Influência do Estresse nos Níveis Sanguíneos de Lipídios, Ácido Ascórbico, Zinco e Outros Parâmetros Bioquímicos. **Acta Bioquím. Clín. Latinoam.**, vol. 38, n. 1, p. 39-46, 2004.

RYAN, M. C. et al. The Mediterranean Diet Improves Hepatic Steatosis and Insulin Sensitivity in Individuals With Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. **J. Hepatol.**, v. 59, n. 6, p. 138-143, 2013.

SAFWAT, G. M. et al. Induction of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease and Insulin Resistance by Feeding a High-Fat Diet in Rats: Does Coenzyme Q Monomethyl Ether have a Modulatory Effect? **Nutrition.**, v. 25, n. 11-12, p. 1157-1168, 2009.

SASS, D. A; CHANG, P.; CHOPRA, K. P. Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A Clinical Review. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 50, n. 1, p. 171–180, 2005.

SEDLAK, J; LINDSAY, R. H. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. **Analytical Biochemistry**. v. 25, n. 1, p. 192-205, 1968.

SHAH, A. M. Acute Pancreatitis with Normal Serum Lipase: A Case Series. **J. Pancreas**, v. 11, n. 4, p. 369-372, 2010.

SEMBRIES, S. et al. Physiological Effects of Extraction Juices from Apple, Grape, and Red Beet Pomaces in Rats. **J. Agric. Food Chem.**, v. 54, 10269-10280, 2006.

SERVIDDIO, G.; BELLANTI, F.; VENDEMIALE, G. Free Radical Biology for Medicine: Learning from Nonalcoholic Fatty Liver Disease. **Free Radic. Biol. Med.** v. 65, p. 952-968, 2013.

SHIN, Y. H. et al. Impact of Hepatic Macrovesicular and Microvesicular Steatosis on the Postoperative Liver Functions After Right Hepatectomy in Living Donors. **Transplant. Proc.**, v.44, n.2, p. 512-515, 2012.

SILVA, A.; PEREZ, S. C. J. G. A.; PAULA, R. C. Qualidade Fisiológica de Sementes de *Psidium cattleianum* Sabine Acondicionadas e Armazenadas em Diferentes Condições. **Revista Brasileira de Sementes**, vol. 33, n. 2, p. 197 - 206, 2011.

SLATER, T. F. et al. Free Radical Mechanisms in Relation to Tissue Injury. In: Symposium On 'Nutritional Aspects Of Free Radicals'. **Proceedings Of The Nutrition Society**, vol.46, p. 1-12, 1985.

SPENCER, J. P. E. et al. Epicatechin and its *In Vivo* Metabolite, 3«-O-Methyl Epicatechin, Protect Human Fibroblasts from Oxidative-Stress-Induced Cell Death Involving Caspase-3 Activation. **Biochem. J.**, v. 354, p. 493-500, 2001

SOUSA, P. L. et al. Fenólicos Totais, Carotenoides e Capacidade Antioxidante de Raspas de Buriiti (*Mauritia flexuosa* L.) *in natura* Comercializada em Teresina – Piauí. 2012.

SOUZA M. O. et al. Diet Supplementation with Acai (*Euterpe Oleracea* Mart.) Pulp Improves Biomarkers of Oxidative Stress and the Serum Lipid Profile in Rats. **Nutrition.**, v. 26, n. 6-8, p. 804-810. 2010.

SOUZA, G. C. et al. Ethnopharmacological Studies of Antimicrobial Remedies in the South of Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 90, p. 135-143, 2003.

STARLEY, B. Q; CALCAGNO, C. J.; HARRISON, S. A. Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Hepatocellular Carcinoma: A Weighty Connection. **Hepatology**., v. 51, n. 5, p. 1820-1832, 2010.

STRINGHETA, P. C. et al. Políticas de Saúde e Alegações de Propriedades Funcionais e de Saúde para Alimentos no Brasil. **Rev. Bras. Cienc. Farm.**, v. 43, n. 2, p. 181-194, 2007.

SVEGLIATI-BARONI, G. et al. A Model of Insulin Resistance and Nonalcoholic Steatohepatitis in Rats: Role of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- and n-3 Polyunsaturated Fatty Acid Treatment on Liver Injury. **Am J. Pathol.**, v. 169, n. 3, p. 846-60, 2006.

TAKAHASHI, Y.; SOEJIMA, Y.; FUKUSATO, T. Animal Models of Nonalcoholic Fatty Liver Disease/Nonalcoholic Steatohepatitis. **World J. Gastroenterol.**, v. 18, n.19, p. 2300-2308, 2012.

TORRES, E. A. F. S. Alimentos do Milênio – A Importância dos Transgênicos, Funcionais e Fitoterápicos para a Saúde. 1 Ed. São Paulo: Signus, 2002.

TRAUNER, M.; ARRESE, M.; WAGNER, M. Fatty Liver and Lipotoxicity. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1801, n. 3, p.299-310, 2010.

TURBINO-RIBEIRO, S. M. et al. Iron Overload in Hypercholesterolemic Rats Affects Iron Homeostasis and Serum Lipids but no Blood Pressure. **J. Nutr.**, v. 133, n. 1, p. 15–20, 2003.

VALKO, M. et al. Free Radicals, Metals And Antioxidants in Oxidative Stress-Induced Cancer. **Chem. Biol. Interact.**, v. 160, n. 1, p. 1-40, 2006.

VASCONCELOS, S. M. L. et al. Espécies Reativas de Oxigênio e de Nitrogênio, Antioxidantes e Marcadores de Dano Oxidativo em Sangue Humano: Principais Métodos Analíticos para sua Determinação. **Quim. Nova**, v. 30, n. 5, p. 1323-1338, 2007.

VIEIRA, L. M. et al. Fenólicos Totais e Capacidade Antioxidante *In Vitro* de Polpas de Frutos Tropicais. **Rev. Bras. Frutic.**, v. 33, n. 3, p. 888-897, 2011.

WANG, D.; WEI, Y.; PAGLIASSOTTI, M. J. Saturated Fatty Acids Promote Endoplasmic Reticulum Stress and Liver Injury in Rats with Hepatic Steatosis. **Endocrinology**, v. 147, n. 2, p. 943–951, 2006.

YAHIA, E. M. The Contribution of Fruit and Vegetable Consumption to Human Health. In: ROSA, L.A.; ALVAREZ-PARRILLA, E.; GONZALEZ-AGUILARA; G.A. **Fruit and vegetable phytochemicals: chemistry, nutritional value and stability**. Hoboken: Wiley-Blackwell, p. 3-51, 2010.

YLMAZ, Y. Review Article: Is Non-Alcoholic Fatty Liver Disease a Spectrum, or are Steatosis and Non-Alcoholic Steatohepatitis Distinct Conditions? **Aliment. Pharmacol. Ther.**, v. 36, n. 9, p. 815-23, 2012.

YOSHITOMI, H. et al. Guava Leaf Extracts Alleviate Fatty liver Via Expression of Adiponectin Receptors in SHRSP.ZLeprfa/Izm Rats. **Nutrition & Metabolism**, v. 9, n. 13, p. 1-7, 2012.

ZHANG, XUE-QUN. et al. Role of Endoplasmic Reticulum Stress in the Pathogenesis of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. **World J. Gastroenterol.**, v.20, n.7, p. 1768-1776, 2014.

ZHANG, J. et al. Association Between Serum Free Fatty Acid Levels and Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A Cross-Sectional Study. **Scientific Reports Nature**, v. 5832, n. 4, p. 1-6, 2014.

ANEXO A



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**

Campus Universitário - Morro do Cruzeiro - ICEB-II, Sala 29
35400-000 - Ouro Preto - MG - Brasil
Fone (31) 3550-1388 Fax: (31) 3550-1370
Email: ceua@propo.ufop.br



CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo nº. 2013/40 do projeto, relativo ao uso de animais, do projeto intitulado "*Efeito das Farinhas do Fruto (*Psidium cattleianum*) e das Folhas de Araçá na Alteração do Perfil Lipídico e no Estresse Oxidativo Causado por Dieta Hipercolesterolêmica em Ratas*", que tem como responsável o Prof. Dr. Marcelo Eustáquio Silva, foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFOP (CEUA-UFOP).

Este certificado expira em 30/9/2018.

Ouro Preto, 1 de novembro de 2013.

**Prof. Dr. Wanderson Geraldo de Lima
Coordenador da CEUA-UFOP**

ANEXO B

Análises Bioquímicas

Foram realizadas utilizando-se kits comerciais Labtest Diagnóstica S.A. de acordo com as instruções do fabricante.

Ureia

Finalidade: Sistema enzimático-colorimétrico para a determinação da ureia em amostras de sangue e urina, por reação de ponto final.

Princípio: A ureia é hidrolisada pela urease à íons amônio e CO. Os íons amônio reagem em pH alcalino com salicilato e hipoclorito de sódio, sob a ação catalisadora do nitroprussiato de sódio para formar azul de indofenol. A intensidade da cor formada é proporcional à quantidade de ureia na amostra.

Procedimento: Para a dosagem de ureia na urina, diluir a amostra 1:50 (0,1 mL de urina +4,9 mL de água destilada ou deionizada). Multiplicar o resultado obtido por 50.

Tomar 3 tubos de ensaio e proceder como a seguir:

	Branco	Teste	Padrão
Amostra	-----	0,01 mL	-----
Padrão (nº4)	-----	-----	0,01 mL
Urease Tamponada	1,0 mL	1,0 mL	1,0 mL

Misturar e incubar a 37 °C durante 5 minutos.

	Branco	Teste	Padrão
Oxidante de Uso	1,0 mL	1,0 mL	1,0 mL

Misturar e incubar a 37 °C durante 5 minutos. Determinar as absorvâncias do teste e padrão em 600 nm (580 a 620), acertando o zero com o branco. A cor é estável 2 horas.

O procedimento sugerido para a medição é adequado para fotômetros cujo volume mínimo de solução para leitura é igual ou menor que 2,0 mL. Deve ser feita uma verificação da necessidade de ajuste do volume para o fotômetro utilizado. Os volumes de amostra e

reagente podem ser modificados proporcionalmente sem prejuízo para o desempenho do teste e o procedimento de cálculo se mantém inalterado. Em caso de redução dos volumes é fundamental que se observe o volume mínimo necessário para a leitura fotométrica.

$$\text{Cálculos: } \text{mg/dL} = \frac{\text{Absorbância do teste}}{\text{Absorbância do padrão}} \times 70$$

Exemplo: Absorbância do teste = 0,269

Absorbância do padrão = 0,610

$$\text{mg/dL} = \frac{0,269}{0,610} \times 70 = 31$$

Creatinina

Finalidade: Sistema colorimétrico para a determinação de creatinina em amostras de sangue e urina por reação de ponto final.

Princípio: A creatinina e outros componentes da amostra reagem com a solução de picrato em meio alcalino formando complexo de cor vermelha que é medido fotometricamente. A adição de um acidificante abaixa o pH para 5,0, promovendo a decomposição do picrato de creatinina, permanecendo inalterada a cor derivada dos cromogênios, que também é medida fotometricamente. A diferença entre as duas leituras fornece o valor da creatinina (não corrigida).

Procedimento de ensaio direto: Para a dosagem na urina, diluir a amostra 1:25 (0,2 mL de urina + 4,8 mL de água destilada ou deionizada). Multiplicar o resultado obtido por 25.

A água utilizada deve ter resistividade ≥ 1 megaohm ou condutividade ≤ 1 microsiemens e concentração de silicatos $< 0,1$ mg/L.

Tomar 3 tubos de ensaio e proceder como a seguir.

	Branco	Teste	Padrão
Tampão (nº2)	2,0 mL	2,0 mL	2,0 mL
Amostra	-----	0,25 mL	-----
Água destilada ou	0,25 mL	-----	-----

deionizada			
Padrão (nº3)	-----	-----	0,25 mL
Ácido Pícrico (nº1)	0,5 mL	0,5 mL	0,5 mL

Misturar e incubar em banho-maria a 37 °C durante 10 minutos. O nível da água no banho deve ser superior ao nível dos reagentes nos tubos de ensaio. Determinar as absorvâncias do teste e padrão em 510 nm ou filtro verde (500 a 540), acertando o zero com o branco.

A absorvância do teste será A_1 .

Acidificante (nº4)	0,1 mL	0,1 mL	-----
--------------------	--------	--------	-------

Misturar e incubar em banho-maria a 37 °C durante 10 minutos (cronometrados).

Reagente de cor (nº3)	2,0 mL	2,0 mL	2,0 mL
-----------------------	--------	--------	--------

Misturar e deixar a temperatura ambiente durante 5 minutos. Determinar a absorvância do teste em 510 nm ou filtro verde (500 a 540), acertando o zero com o branco.

A absorvância do teste será A_2 .

O procedimento sugerido para a medição é adequado para fotômetros cujo volume mínimo de solução para leitura é igual ou menor que 2,5 mL. Deve ser feita uma verificação da necessidade de ajuste do volume para o fotômetro utilizado. Os volumes de amostra e reagente podem ser modificados proporcionalmente sem prejuízo para o desempenho do teste e o procedimento de cálculo se mantém inalterado. Em caso de redução dos volumes é fundamental que se observe o volume mínimo necessário para a leitura fotométrica. Volumes da amostra menores que 0,01 mL são críticos em aplicações manuais e devem ser usados com cautela porque aumentam a imprecisão da medição.

$$\text{Cálculos: Creatinina (não corrigida)} = \frac{A_1 - A_2}{\text{Absorvância do padrão}} \times 4,00 \text{ mg/dL}$$

Segundo recomendações do NKDEP os resultados devem ser reportados com duas casas decimais para evitar erros sistemáticos provocados por arredondamentos, que podem chegar a $\pm 6,0\%$.

Aplicação do índice de correção: A interferência das proteínas plasmáticas que ocorre na reação de Jaffe introduz um erro constante na medição, que é minimizado pela utilização do índice de correção (0,25 mg/dL).

$$\text{Creatinina (corrigida)} = \text{Creatinina (não corrigida)} - \frac{\text{índice de correção}}{(0,25 \text{ mg/dL})}$$

Exemplo: A_1 teste = 0,106 Absorbância do padrão = 0,264
 A_2 teste = 0,043

$$\text{Creatinina (não corrigida)} = \frac{0,106 - 0,043 \times 4,0}{0,264} = 0,95 \text{ mg/dL}$$

Proteínas Totais

Finalidade: Sistema para a determinação colorimétrica das Proteínas Totais em amostras de sangue e líquidos pleural, sinovial e ascítico por reação de ponto final.

Princípio: Os íons cobre (Cu) em meio alcalino (Reagente de Biureto) reagem com as ligações peptídicas das proteínas séricas formando cor púrpura, que tem absorbância máxima em 545 nm, proporcional à concentração das proteínas na amostra.

Procedimento: Tomar 3 tubos de ensaio e proceder como a seguir:

	Branco	Teste	Padrão
Amostra	-----	0,02 mL	-----
Padrão (n°2)	-----	-----	0,02 mL
Água destilada ou deionizada	0,02 mL	-----	-----
Reagente biureto	1,0 mL	1,0 mL	1,0 mL

Misturar e incubar a 37 °C durante 10 minutos. Determinar as absorbâncias do teste e padrão em 545 nm (530 a 550), acertando o zero com o branco. A cor é estável durante 1 hora.

O procedimento sugerido para a medição é adequado para fotômetros cujo volume mínimo de solução para leitura é igual ou menor que 1,0 mL. Deve ser feita uma verificação da necessidade de ajuste do volume para o fotômetro utilizado. Os volumes de amostra e reagente podem ser modificados proporcionalmente sem prejuízo para o desempenho do teste.

O procedimento de cálculo se mantém inalterado. Em caso de redução dos volumes é fundamental que se observe o volume mínimo necessário para a leitura fotométrica. Volumes da amostra menores que 0,01 mL são críticos em aplicações manuais e devem ser usados com cautela porque aumentam a imprecisão da medição.

$$\text{Cálculos: Proteínas Totais} = \frac{\text{Absorbância do teste}}{\text{Absorbância do padrão}} \times (4\text{g/dL})$$

Exemplo: Absorbância do teste=0,405

Absorbância do padrão=0,238

$$\text{Proteínas Totais} = \frac{0,405}{0,238} \times 4 \text{ g/dL} = 6,80 \text{ g/dL}$$

Albumina

Finalidade: Sistema para a determinação da albumina em amostras de soro por reação e ponto final.

Princípio: albumina tem a propriedade de se ligar à uma grande variedade de ânions orgânicos e moléculas complexas de corantes. O sistema de medição se baseia no desvio do pico de absorvidade máxima de um corante complexo (verde de bromocresol) quando este se liga à albumina. A cor formada é medida colorimetricamente entre 600 e 640 nm, sendo proporcional à quantidade de albumina na amostra até a concentração de 6,0 g/dL.

Procedimento: Tomar 3 tubos de ensaio e proceder como a seguir:

	Branco	Teste	Padrão
Reagente de cor (n°1)	1,0 mL	1,0 mL	1,0 mL
Amostra	-----	0,01 mL	-----
Padrão (n°2)	-----	-----	0,01 mL

Misturar e após 2 minutos, no máximo 10 minutos, determinar as absorbâncias do teste e padrão em 630 nm ou filtro vermelho (600 a 640) acertando o zero com o branco.

O procedimento sugerido para a medição é adequado para fotômetros cujo volume mínimo de solução para leitura é igual ou menor que 1,0 mL. Deve ser feita uma verificação da

necessidade de ajuste do volume para o fotômetro utilizado. Os volumes de amostra e reagente podem ser modificados proporcionalmente sem prejuízo para o desempenho do teste e o procedimento de cálculo se mantém inalterado. Em caso de redução dos volumes é fundamental que se observe o volume mínimo necessário para a leitura fotométrica. Volumes da amostra menores que 0,01 mL são críticos em aplicações manuais e devem ser usados com cautela porque aumentam a imprecisão da medição.

Cálculos: Albumina (g/dL) = $\frac{\text{Absorbância do teste}}{\text{Absorbância do padrão}} \times 3,8$

Exemplo: Absorbância do teste=0,242

Absorbância do padrão=0,302

Albumina (g/dL) = $\frac{0,242}{0,302} \times 3,8 = 3,0$

Colesterol-HDL

Finalidade: Sistema para determinação do Colesterol HDL através da precipitação seletiva das lipoproteínas de baixa e muito baixa densidade (LDL e VLDL), por reação de ponto final.

Princípio: As lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL) e as lipoproteínas de baixa densidade (LDL) são quantitativamente precipitadas e, após centrifugação, o colesterol ligado às lipoproteínas de alta densidade (Colesterol HDL) é determinado no sobrenadante.

Procedimento:

Precipitação das VLDL e LDL.

Em um tubo 12 x 75, adicionar:

Soro: 0,25mL

Precipitante: 0,25mL

Agitar vigorosamente durante 30 segundos. A agitação sugerida é fundamental para obtenção de resultados consistentes. Centrifugar a 3.500 rpm por pelo menos 15 minutos para obter um sobrenadante límpido. Pipetar o sobrenadante límpido imediatamente após a centrifugação,

tomando o cuidado para não ressuspender o precipitado, a fim de evitar resultados falsamente elevados.

Utilizar com o Reagente 1 - Colesterol Liquiform- Labtest (Ref. 76).

Tomar 3 tubos de ensaio e proceder como a seguir:

	Branco	Teste	Padrão
Sobrenadante	-----	0,1 mL	-----
Padrão (n°2)	-----	-----	0,1 mL
Reagente 1	1,0 mL	1,0 mL	1,0 mL

Misturar e incubar em banho-maria a 37 °C durante 10 minutos. O nível da água no banho deve ser superior ao nível do reagente nos tubos de ensaio. Determinar as absorvâncias do teste e padrão em 500 nm ou filtro verde (490 a 540) acertando o zero com o branco. A cor é estável por 60 minutos.

O procedimento sugerido para a medição é adequado para fotômetros cujo volume mínimo de solução para leitura é igual ou menor que 1,0 mL. Deve ser feita uma verificação da necessidade de ajuste do volume para o fotômetro utilizado. Os volumes de amostra e reagente podem ser modificados proporcionalmente sem prejuízo para o desempenho do teste e o procedimento de cálculo se mantém inalterado. Em caso de redução dos volumes é fundamental que se observe o volume mínimo necessário para a leitura fotométrica. Volumes da amostra menores que 0,01 mL são críticos em aplicações manuais e devem ser usados com cautela porque aumentam a imprecisão da medição.

Cálculos: Devido a diluição 1:2 aplicada às amostras durante o procedimento de precipitação das VLDL e LDL, o valor do Padrão para cálculo dos resultados deve ser corrigido para 40 mg/dL.

$$\text{Colesterol HDL (mg/dL)} = \frac{\text{Absorbância do teste}}{\text{Absorbância do padrão}} \times 40$$

Exemplo: Absorbância do teste = 0,290

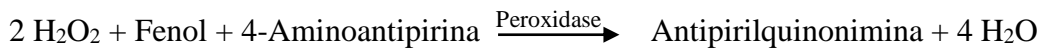
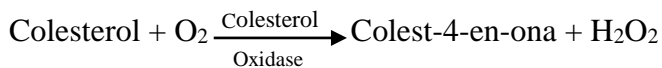
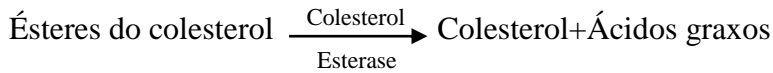
Absorbância do padrão = 0,320

$$\text{Colesterol HDL (mg/dL)} = \frac{0,242}{0,302} \times 40 = 36$$

Colesterol Total

Finalidade: Sistema enzimático para a determinação do colesterol total em amostras de soro, por reação de ponto final.

Princípio: O colesterol total é determinado de acordo com as seguintes reações:



Os ésteres de colesterol são hidrolisados pela colesterol esterase a colesterol livre e ácidos graxos. O colesterol livre é oxidado pela colesterol oxidase a colest-4-en-ona e peróxido de hidrogênio. Na presença de peroxidase e peróxido de hidrogênio, o fenol e a 4-aminoantipirina são oxidados formando a antipirilquinonimina que tem absorvidade máxima em 500 nm. A intensidade da cor vermelha formada na reação final é diretamente proporcional à concentração do colesterol na amostra.

Procedimento: Tomar 3 tubos de ensaio e proceder como a seguir:

	Branco	Teste	Padrão
Amostra	-----	0,01 mL	-----
Padrão (nº2)	-----	-----	0,01 mL
Reagente 1	1,0 mL	1,0 mL	1,0 mL

Misturar e incubar em banho-maria a 37 °C durante 10 minutos. O nível de água no banho deve ser superior ao nível de reagentes nos tubos de ensaio. Determinar as absorbâncias do teste e padrão em 500 nm ou filtro verde (490 a 510), acertando o zero com o branco. A cor é estável por 60 minutos.

O procedimento sugerido para a medição é adequado para fotômetros cujo volume mínimo de solução para leitura é igual ou menor que 1,0 mL. Deve ser feita uma verificação da necessidade de ajuste do volume para o fotômetro utilizado. Os volumes de amostra e reagente podem ser modificados proporcionalmente sem prejuízo para o desempenho do teste e o procedimento de cálculo se mantém inalterado. Em caso de redução dos volumes é

fundamental que se observe o volume mínimo necessário para a leitura fotométrica. Volumes da amostra menores que 0,01 mL são críticos em aplicações manuais e devem ser usados com cautela porque aumentam a imprecisão da medição.

$$\text{Cálculos: Colesterol (mg/dL)} = \frac{\text{Absorbância do teste}}{\text{Absorbância do padrão}} \times 200$$

Exemplo: Absorbância do teste = 0,290

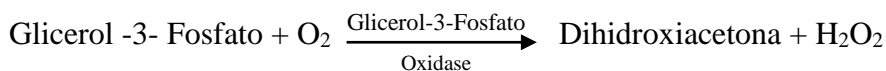
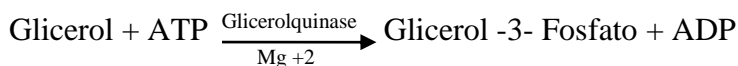
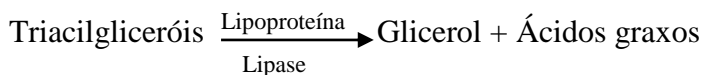
Absorbância do padrão = 0,345

$$\text{Colesterol (mg/dL)} = \frac{0,290}{0,345} \times 200 = 168$$

Triacilgliceróis

Finalidade: Sistema enzimático para determinação dos triacilgliceróis por reação de ponto final em amostras de soro ou plasma (EDTA).

Princípio: Os triacilgliceróis são determinados de acordo com as seguintes reações:



A lipoproteína lipase promove a hidrólise dos triglicérides liberando glicerol, que é convertido, pela ação da glicerolquinase, em glicerol-3-fosfato. Este é oxidado a dihidroxiacetona e peróxido de hidrogênio na presença da glicerolfosfato oxidase. Em seguida, ocorre uma reação de acoplamento entre peróxido de hidrogênio, 4-aminoantipirina e 4-clorofenol, catalisada pela peroxidase, produzindo uma quinoneimina que tem máximo de absorbância em 505 nm. A intensidade da cor vermelha formada é diretamente proporcional à concentração dos triglicérides na amostra.

Procedimento: Tomar 3 tubos de ensaio e proceder como a seguir:

	Branco	Teste	Padrão
Amostra	-----	0,01 mL	-----
Padrão	-----	-----	0,01 mL
Reagente 1	1,0 mL	1,0 mL	1,0 mL

Misturar e colocar em banho maria a 37 °C durante 10 minutos. O nível da água no banho deve ser superior ao nível dos reagentes nos tubos de ensaio. Determinar as absorvâncias do teste e padrão em 505 nm ou filtro verde (490 a 520), acertando o zero com o branco. A cor é estável 60 minutos.

O procedimento sugerido para a medição é adequado para fotômetros cujo volume mínimo de solução para leitura é igual ou menor que 1,0 mL. Deve ser feita uma verificação da necessidade de ajuste do volume para o fotômetro utilizado. Os volumes de amostra e reagente podem ser modificados proporcionalmente, sem prejuízo para o desempenho do teste, mantendo-se inalterado o procedimento de cálculo. Em caso de redução dos volumes, é fundamental que se observe o volume mínimo necessário para a leitura fotométrica. Volumes de amostra menores que 0,01 mL são críticos em aplicações manuais e devem ser usados com cautela porque aumentam a imprecisão da medição.

$$\text{Cálculos: Triacilgliceróis (mg/dL)} = \frac{\text{Absorvância do teste}}{\text{Absorvância do padrão}} \times 200$$

Exemplo: Absorvância do teste = 0,174

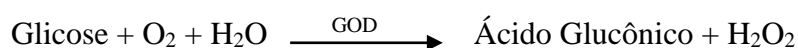
Absorvância do padrão = 0,244

$$\text{Triacilgliceróis (mg/dL)} = \frac{0,174}{0,244} \times 200 = 143$$

Glicose

Finalidade: Sistema enzimático para a determinação da glicose no sangue, líquido e líquidos ascítico, pleural e sinovial por método cinético ou de ponto final.

Princípio: A glicose oxidase catalisa a oxidação da glicose de acordo com a seguinte reação:



O peróxido de hidrogênio formado reage com 4-aminoantipirina e fenol, sob ação catalisadora da peroxidase, através de uma reação oxidativa de acoplamento formando uma antipirilquinonimina vermelha cuja intensidade de cor é proporcional à concentração da glicose na amostra.



Procedimento: Método de ponto final

Tomar 3 tubos de ensaio e proceder como a seguir:

	Branco	Teste	Padrão
Amostra	-----	0,01 mL	-----
Padrão	-----	-----	0,01 mL
Reagente 1	1,0 mL	1,0 mL	1,0 mL

Misturar vigorosamente e incubar em banho-maria a 37 °C durante 10 minutos. O nível da água no banho deve ser superior ao nível dos reagentes nos tubos de ensaio. Determinar as absorvâncias do Teste e Padrão em 505 nm (490 a 520), acertando o zero com o branco. A cor é estável 30 minutos.

O procedimento sugerido para a medição é adequado para fotômetros cujo volume mínimo de solução para medição é igual ou menor que 1,0 mL. Deve ser feita uma verificação da necessidade de ajuste do volume para o fotômetro utilizado. Os volumes de amostra e reagente podem ser modificados proporcionalmente sem prejuízo para o desempenho do teste e o procedimento de cálculo se mantém inalterado. Em caso de redução dos volumes é fundamental que se observe o volume mínimo necessário para a leitura fotométrica. Volumes da amostra menores que 0,01 mL são críticos em aplicações manuais e devem ser usados com cautela porque aumentam a imprecisão da medição.

Cálculos:
$$\text{Glicose (mg/dL)} = \frac{\text{Absorbância do teste}}{\text{Absorbância do padrão}} \times 100$$

Exemplo: Absorbância do teste = 0,362

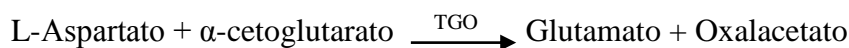
Absorbância do padrão = 0,340

$$\text{Glicose (mg/dL)} = \frac{0,362}{0,340} \times 100 = 106$$

Aspartato aminotransferase (AST/TGO)

Finalidade: Sistema para medida da atividade da Transaminase Oxalacética (TGO) em amostra de sangue por método cinético de tempo fixo e medição de ponto final.

Princípio: A transaminase oxalacética promove a transferência de grupamentos amina de α -aminoácidos para α -cetoácidos.



O oxalacetato formado é medido através da formação de hidrazona, a qual tem intensa cor em meio alcalino.

Preparo do Reagente:

NAOH de uso: Transferir quantitativamente o conteúdo do frasco nº 3 (160 mL) para um balão volumétrico ou proveta, completar para 500 mL com água destilada ou deionizada livre de CO₂ e homogeneizar. Estável 12 meses em recipiente de plástico entre 15 - 25 °C.

A água utilizada deve ter resistividade ≥ 1 megaohm ou condutividade ≤ 1 microsiemens e concentração de silicatos $< 0,1$ mg/L.

Curva de Calibração: Como o sistema de medida Reitman-Frankel (Unidades/mL) não segue a lei de Beer, é impossível utilizar o método do fator para cálculo, sendo necessária a preparação de curva de calibração.

Tomar 5 tubos de ensaio e proceder como a seguir:

	Tubo nº (mL)				
	1	2	3	4	5
Padrão (nº4)	-----	0,05	0,1	0,15	0,2
TGO Substrato (nº1)	0,5	0,45	0,4	0,35	0,3
Água destilada ou deionizada	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Reagente de cor (nº2)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5

Misturar e deixar a temperatura ambiente durante 20 min

NAOH de uso	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
-------------	-----	-----	-----	-----	-----

Misturar e deixar a temperatura ambiente durante 5 minutos. Determinar as absorvâncias ou T% em 505 nm ou filtro verde (490 a 540), acertando o zero com água destilada ou deionizada. A cor é estável por 60 minutos.

Traçado da curva de calibração: Traçar a curva de calibração correlacionando as leituras obtidas com os valores em Unidades/mL expressos na tabela abaixo, utilizando papel linear (para absorvâncias) ou monolog (para T%).

	Tubo n°				
	1	2	3	4	5
TGO (Unidades/ mL)	Zero	24	61	114	190

Procedimento: Tomar 1 tubo de ensaio e proceder como a seguir:

Teste	
TGO Substrato (n°1)	0,25 mL

Incubar em banho-maria a 37 °C durante 2 minutos. O nível da água no banho deve ser superior ao nível dos reagentes nos tubos de ensaio.

Amostra	0,05 mL
---------	---------

Misturar e incubar em banho-maria a 37 °C exatamente 60 minutos.

Reagente de cor (n°2)	0,25 mL
-----------------------	---------

Misturar e deixar a temperatura ambiente 20 minutos.

NaOH de uso	2, 5 mL
-------------	---------

Misturar e esperar 5 minutos. Determinar as absorvâncias ou T% em 505 nm ou filtro verde (490 a 540), acertando o zero com água destilada ou deionizada. A cor é estável 60 minutos. Obter o valor de TGO usando a curva de calibração (ver Desempenho do Sistema).

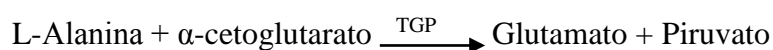
O procedimento sugerido para a medição é adequado para fotômetros cujo volume mínimo de solução para leitura é igual ou menor que 3,0 mL. Deve ser feita uma verificação da necessidade de ajuste do volume para o fotômetro utilizado. Os volumes de amostra e reagente podem ser modificados proporcionalmente sem prejuízo para o desempenho do teste e o procedimento de cálculo se mantém inalterado. Em caso de redução dos volumes é fundamental que se observe o volume mínimo necessário para a leitura fotométrica. Volumes

da amostra menores que 0,01 mL são críticos em aplicações manuais e devem ser usados com cautela porque aumentam a imprecisão da medição.

Alanina aminotransferase (ALT/TGP)

Finalidade: Sistema para medida da atividade da Transaminase Pirúvica (TGP) em amostra de sangue por método cinético de tempo fixo e medição de ponto final.

Princípio: A transaminase oxalacética promove a transferência de grupamentos amina de α -aminoácidos para α -cetoácidos.



O piruvato formado é medido através da formação de hidrazona, a qual tem intensa cor em meio alcalino.

Preparo do Reagente:

NAOH de uso: Transferir quantitativamente o conteúdo do frasco nº 3 (160 mL) para um balão volumétrico ou proveta, completar para 500 mL com água destilada ou deionizada livre de CO₂ e homogeneizar. Estável 12 meses em recipiente de plástico entre 15 - 25 °C.

A água utilizada deve ter resistividade ≥ 1 megaohm ou condutividade ≤ 1 microsiemens e concentração de silicatos $< 0,1$ mg/L.

Curva de Calibração: Como o sistema de medida Reitman-Frankel (Unidades/mL) não segue a lei de Beer, é impossível utilizar o método do fator para cálculo, sendo necessária a preparação de curva de calibração.

Tomar 5 tubos de ensaio e proceder como a seguir:

	Tubo nº (mL)				
	1	2	3	4	5
Padrão (nº4)	-----	0,05	0,1	0,15	0,2
TGO Substrato (nº1)	0,5	0,45	0,4	0,35	0,3
Água destilada ou deionizada	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Reagente de cor (nº2)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5

Misturar e deixar a temperatura ambiente durante 20 min

NAOH de uso	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
-------------	-----	-----	-----	-----	-----

Misturar e deixar a temperatura ambiente durante 5 minutos. Determinar as absorvâncias ou T% em 505 nm ou filtro verde (490 a 540), acertando o zero com água destilada ou deionizada. A cor é estável por 60 minutos.

Traçado da curva de calibração: Traçar a curva de calibração correlacionando as leituras obtidas com os valores em Unidades/mL expressos na tabela abaixo, utilizando papel linear (para absorvâncias) ou monolog (para T%).

	Tubo nº				
	1	2	3	4	5
TGP (Unidades/ mL)	Zero	28	57	97	150

Procedimento: Tomar 1 tubo de ensaio e proceder como a seguir:

	Teste
TGP Substrato (nº1)	0,25 mL

Incubar em banho-maria a 37 °C durante 2 minutos. O nível da água no banho deve ser superior ao nível dos reagentes nos tubos de ensaio.

Amostra	0,05 mL
---------	---------

Misturar e incubar em banho-maria a 37 °C exatamente 60 minutos.

Reagente de cor (nº2)	0,25 mL
-----------------------	---------

Misturar e deixar a temperatura ambiente 20 minutos.

NaOH de uso	2,5 mL
-------------	--------

Misturar e esperar 5 minutos. Determinar as absorvâncias ou T% em 505 nm ou filtro verde (490 a 540), acertando o zero com água destilada ou deionizada. A cor é estável 60 minutos. Obter o valor de TGP usando a curva de calibração (ver Desempenho do Sistema).

O procedimento sugerido para a medição é adequado para fotômetros cujo volume mínimo de solução para leitura é igual ou menor que 3,0 mL. Deve ser feita uma verificação da necessidade de ajuste do volume para o fotômetro utilizado. Os volumes de amostra e

reagente podem ser modificados proporcionalmente sem prejuízo para o desempenho do teste e o procedimento de cálculo se mantém inalterado. Em caso de redução dos volumes é fundamental que se observe o volume mínimo necessário para a leitura fotométrica. Volumes da amostra menores que 0,01 mL são críticos em aplicações manuais e devem ser usados com cautela porque aumentam a imprecisão da medição.

Fosfatase alcalina

Finalidade: Sistema para determinação da Fosfatase Alcalina em amostras de sangue por método cinético de tempo fixo e medição de ponto final.

Princípio: A fosfatase alcalina do soro hidrolisa a timolftaleína monofosfato liberando timolftaleína, que tem cor azul em meio alcalino. A cor formada, diretamente proporcional à atividade enzimática, é medida em 590 nm. O produto final da reação se constitui de uma mistura de cor azul e a cor própria do substrato.

Procedimento: Tomar 3 tubos de ensaio e proceder como a seguir:

	Branco	Teste	Padrão
Substrato (n°1)	0,05 mL	0,05 mL	0,05 mL
Tampão (n°2)	0,5 mL	0,5 mL	0,5 mL
Padrão (n°4)	-----	-----	0,05 mL

Incubar em banho-maria a 37 °C durante 2 minutos. O nível da água no banho deve ser superior ao nível dos reagentes nos tubos de ensaio. Não remover os tubos do banho-maria para adicionar a amostra.

Amostra	-----	0,05 mL	-----
---------	-------	---------	-------

Misturar e incubar em banho-maria a 37 °C durante 10 minutos (cronometrados).

Reagente de cor (n°3)	2,0 mL	2,0 mL	2,0 mL
-----------------------	--------	--------	--------

Misturar e determinar as absorvâncias do teste e padrão em 590 nm ou filtro laranja (580 a 590), acertando o zero com o branco. A cor é estável 120 minutos.

O procedimento sugerido para a medição é adequado para fotômetros cujo volume mínimo de solução para leitura é igual ou menor que 2,5 mL. Deve ser feita uma verificação da necessidade de ajuste do volume para o fotômetro utilizado. Os volumes de amostra e reagente podem ser modificados proporcionalmente, sem prejuízo para o desempenho do teste, e o procedimento de cálculo se mantém inalterado. Em caso de redução dos volumes é fundamental que se observe o volume mínimo necessário para a leitura fotométrica. Volumes da amostra menores que 0,01 mL são críticos em aplicações manuais e devem ser usados com cautela porque aumentam a imprecisão da medição.

Cálculos: Fosfatase Alcalina (U/L) = $\frac{\text{Absorbância do teste}}{\text{Absorbância do padrão}} \times 45$

Exemplo: Absorbância do teste=0,295

Absorbância do padrão=0,360

$$\text{Fosfatase Alcalina (U/L)} = \frac{0,295}{0,360} \times 45 = 37$$