



PATRÍCIA BRITO SAMPAIO

**“AVALIAÇÃO BIOQUÍMICA DE COMPOSTOS FENÓLICOS
IN VITRO E BIOLÓGICA DO EXTRATO PURIFICADO DE
AÇAÍ (*Euterpe oleracea*) EM MODELO *IN VIVO* DE
CARCINOGENESE DE CÓLON INDUZIDA”**

CAMPINAS

2014



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINA
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

PATRICIA BRITO SAMPAIO

**“AVALIAÇÃO BIOQUÍMICA DE COMPOSTOS FENÓLICOS
IN VITRO E BIOLÓGICA DO EXTRATO PURIFICADO DE
AÇAÍ (*Euterpe oleracea*) EM MODELO *IN VIVO* DE
CARCINOGÊNESE DE CÓLON INDUZIDA”**

Orientadora: Profa. Dra. Gláucia Maria Pastore

Coorientador: Prof. Dr. Hervé Louis Ghislain Rogez

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Doutora em Ciência de Alimentos.

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA PELA ALUNA PATRICIA BRITO SAMPAIO E ORIENTADA PELA PROFA. DRA. GLAÚCIA MARIA PASTORE

Assinatura da Orientadora

CAMPINAS

2014

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Engenharia de Alimentos
Claudia Aparecida Romano de Souza - CRB 8/5816

Sampaio, Patrícia Brito, 1980-
Sa47a Avaliação bioquímica de compostos fenólicos in vitro e biológica do extrato purificado de açaí (*Euterpe oleracea*) em modelo in vivo de carcinogênese de cólon induzida / Patrícia Brito Sampaio. – Campinas, SP : [s.n.], 2014.

Orientador: Gláucia Maria Pastore.

Coorientador: Hervé Louis Ghislain Rogez.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Açaí. 2. Antioxidantes. 3. Intestino grosso. 4. Ácidos graxos de cadeia curta. 5. Voltametria. I. Pastore, Gláucia Maria. II. Rogez, Hervé Louis Ghislain. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Biochemistry evaluation of phenolics in vitro and biologic of açaí (*Euterpe oleracea*) purified extract in model in vivo of induced colon carcinogenesis

Palavras-chave em inglês:

Açaí

Antioxidants

Large bowel

Short chain fatty acids

Voltammetry

Área de concentração: Ciência de Alimentos

Titulação: Doutora em Ciência de Alimentos

Banca examinadora:

Gláucia Maria Pastore [Orientador]

Ana Lúcia Tasca Gois Ruiz

Ana Paula Dionísio

João Ernesto de Carvalho

Marlene Maria Amaral Scheid

Data de defesa: 16-04-2014

Programa de Pós-Graduação: Ciência de Alimentos

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Gláucia Maria Pastore
Universidade Estadual de Campinas (FEA / UNICAMP)
Orientadora

Profa. Dra. Ana Lúcia Tasca Gois Ruiz
CPQBA/Unicamp

Dra. Ana Paula Dionísio
Embrapa Agroindústria Tropical (CNPAT/CE)

Prof. Dr. Mario Roberto Marostica Junior
Universidade Estadual de Campinas (FEA / UNICAMP)

Profa. Dra. Marlene Maria Amaral Scheid
Universidade do Vale do Paraíba (UNIVAP)

Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho
CPQBA/Unicamp

Dr. Marcelo Sady Plácido Ladeira
Multigene

Prof. Dr. Yong Kun Park
Universidade Estadual de Campinas (FEA / UNICAMP)

RESUMO

O açaí (*Euterpe oleracea*) é um fruto amazônico com elevado teor de compostos fenólicos, principalmente antocianinas, e alta capacidade antioxidante. O consumo médio diário de fenóis, polifenóis e taninos pode variar de menos de 100 mg a mais de 2 g. Mais de 95% deste consumo consegue atingir o cólon e é fermentado pela microflora intestinal, portanto após sua captação através da dieta, grande parte desses compostos sofre transformações pelas bactérias intestinais. Para avaliar a ação bioquímica “*in vitro*” foram testados 11 (onze) padrões de compostos fenólicos presentes e não presentes no açaí mais o ácido ascórbico como antioxidante de referência, além do extrato purificado de polifenóis do açaí (Amazon Dreams Ltda) contendo 16.000 mg/100g de antocianinas e 47.478 mg de equivalentes de ácido gálico/100g de fenólicos totais. Na análise de potencial redox por voltametria cíclica e capacidade antioxidante ORAC não foi encontrada relação dos valores mais altos com os compostos que apresentaram efeito inibitório nos testes em microplacas com bactérias enteropatogênicas, os quais foram os ácidos fenólicos (cafeico e gálico) e ácido ascórbico. Porém a delfinidina que teve os maiores valores de MIC encontrados coincidiu também com um alto valor ORAC. Os compostos e extrato estudados não tiveram influência negativa no crescimento dos micro-organismos probióticos (*Bifidobacterium animalis subsp. Lactis Bb12*® e *Lactobacillus rhamnosus*). A fim de verificar a influência do extrato de açaí em parâmetros biológicos e de prevenção do câncer colorretal, foi utilizado modelo de ratos *wistar* com câncer de colón induzido por DMH (80 mg/Kg) e tratamento combinado com diferentes concentrações do extrato purificado de açaí (30 mg; 50 mg e 180 mg/Kg de peso animal) por 28 dias. Dentre os parâmetros hematológicos e eletrólitos (Na, Ca e K) não houve alterações importantes. As enzimas hepáticas ALT e GGT apresentaram valores mais baixos nos grupos que consumiram o extrato, mesmo com o uso da droga, em comparação com o controle positivo mostrando que o extrato é bem tolerado e não tóxico. Não foi observado aumento de genotoxicidade através do ensaio cometa (normal e com enzimas Endo III e FPG), em linfócitos e células do colón nos animais tratados e não tratados com o extrato. Houve menor formação de Focos de Criptas Aberrantes no colón dos grupos que consumiram as doses baixa e intermediária do extrato. Porém a dosagem de 180 mg/kg pode

ter tido ação sinérgica com a droga aumentando o número de lesões. Houve significância estatística no aumento da produção dos AGCC (acético, propiônico e capróico) quantificados por GC-FID, em todos os grupos que se alimentaram com o extrato de açaí ($p < 0.001$). A produção de isobutírico foi detectada apenas nesses grupos. Isto demonstra que o consumo de extrato de açaí favoreceu a produção de AGCC, até mesmo nos grupos que utilizaram o DMH.

Palavras-Chave: *Euterpe oleracea*, antioxidantes, cólon, ácidos graxos de cadeia curta, ensaio cometa.

ABSTRACT

Açaí (*Euterpe oleracea*) is an Amazonian fruit with a high content of phenolic compounds , especially anthocyanins , and high antioxidant capacity . The average daily consumption of phenols, polyphenols and tannins can range from less than 100 mg to more than 2 g .Over 95% of this consumption can reach the colon and is fermented by the intestinal microflora, therefore, after its capture by diet , most of these compounds undergoes transformations by intestinal bacteria. To assess the biochemical action "*in vitro*" were tested eleven standards of phenolic compounds present and not present in acai more the ascorbic acid standard as antioxidant reference , in addition to the purified extract of açaí polyphenols (Amazon Dreams Inc.) containing 16,000 mg / 100g of anthocyanins and 47,478 mg equivalents of gallic acid/100g of total phenolic . In the analysis of redox potential by cyclic voltammetry and ORAC antioxidant capacity was not found ratio of higher values of compounds and with the inhibitory effect under test in microplate with enteropathogenic bacteria, which was the phenolic acids (gallic acid and caffeic) and ascorbic acid. But the delphinidin had the highest MIC values found also coincided with a high ORAC value . The compounds studied had no negative influence on the growth of probiotic micro-organisms (*Bifidobacterium animalis subsp. Lactis Bb12*®. and *Lactobacillus rhamnosus*) . In order to verify the influence of acai extract in biology and prevention of colorectal cancer , we used *Wistar* rat model with colon cancer induced by DMH (80 mg / kg) and combined treatment with different concentrations of purified extract of açaí (30 mg, 50 mg and 180 mg / kg body weight) for 28 days. Among the hematological parameters and electrolytes (Na, Ca and K) showed no significant changes . The liver enzymes ALT and GGT exhibited lower values in the groups that consumed the extract, even with the use of the drug , compared with the positive control showed that the extract is well tolerated and not toxic. No increase in genotoxicity was observed by comet assay (normal, Endo III and FPG enzymes) in lymphocytes and colon cells in the animals treated and not treated with the extract . There was less formation of Aberrant Crypt Foci in the colon of the groups that consumed the low and intermediate doses of the extract. However the dose of 180 mg / kg may have been synergistic action with drugs increasing the number of lesions. There was statistical

significance in the increased production of SCFA (acetic,propionic and caproic) quantified by GC- FID in all groups were fed the extract of acai ($p < 0.001$) . The production of isobutyric acid was detected only in those groups. This demonstrates that consuming açai extract favored the production of SCFA, even in groups that used the DMH .

Keywords: *Euterpe oleracea*, antioxidants, colon, short chain fatty acids, comet assay.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 Compostos fenólicos	3
2.1.1 Introdução	3
2.1.2 Estrutura e classificação	4
2.1.3 O Açaí (<i>Euterpe Oleracea</i>).....	9
2.2 Trato Gastrointestinal	11
2.2.1 Considerações Gerais	11
2.2.2 Microbiota intestinal	12
2.2.3 Benefícios dos ácidos graxos de cadeia curta para a saúde	13
2.2.4 Fontes de produção de AGCC.....	15
2.2.5 Metabolismo dos flavonoides no trato gastrointestinal.....	16
2.2.6 Interação flavonóides- microbiota	19
2.2.7 Câncer de Colón	23
2.3 Propriedades antioxidantes.....	26
2.3.1 Métodos de avaliação da capacidade antioxidante.....	29
2.4 Ensaio Cometa.....	32
2.4.1 Características Gerais.....	32
2.4.2 Aplicações e versatilidade do ensaio do cometa	34
2.4.3 As enzimas usadas para detectar os danos da oxidação do DNA.....	35
3 OBJETIVOS	37
3.1 Objetivo Geral	37
3.2 Objetivos Específicos	37
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	39
4.1 Obtenção do extrato de açaí (<i>Euterpe oleracea</i>)	39
4.1.1 Identificação e coleta das matrizes	39
4.1.2 Obtenção do extrato e purificação parcial.....	39
4.2 Definição de padrões	40
4.3 Métodos de avaliação da atividade antioxidante	42

4.3.1	Método ORAC	42
4.3.2	Voltametria Cíclica	43
4.4	Teste de atividade antimicrobiana em microplacas.....	44
4.5	Modelo de carcinogênese de cólon induzida por DMH em ratos	46
4.5.1	Animais e tratamento	46
4.5.2	Cálculo da dosagem do extrato	46
4.5.3	Planejamento experimental.....	47
4.5.4	Análises Histológicas	48
4.5.5	Ensaio Cometa	49
4.5.6	Análise de AGCC por cromatografia gasosa	52
4.5.7	Análises Bioquímicas e Hemograma	53
4.6	Análises Estatísticas	54
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	55
5.1	Capacidade antioxidante ORAC	55
5.2	Voltametria Cíclica	56
5.3	Concentração Inibitória Mínima.....	65
5.4	Experimento Animal	67
5.4.1	Peso dos animais, intestino e conteúdo cecal.	67
5.4.2	Análise de Parâmetros Hematológicos (hemograma).....	68
5.4.3	Parâmetros Bioquímicos	73
5.4.4	Análise de Ácidos Graxos de Cadeia Curta	80
5.4.5	Análise histológica de Focos de Criptas Aberrantes.....	83
5.4.6	Resultado do Ensaio Cometa (TCS) no sangue e cólon sem tratamento e com tratamento com ENDO III e FPG.....	84
6	CONCLUSÕES	89
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	91
	ANEXOS	104

Dedico este trabalho aos meus pais Sampaio e Graça, por todo o incentivo, amor e dedicação em minha trajetória de vida e aos irmãos Marco e Kátia pela amizade, amor e apoio em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

Á Deus por nunca ter me desamparado em todos os momentos de minha vida.

A minha orientadora Prof. Gláucia Pastore, não só por ter confiado em mim para fazer parte de sua equipe, mas por ter me dado a confiança e força necessárias para seguir em frente sempre.

Ao meu co - orientador Prof. Hervé Rogez exemplo em minha vida de trabalho, dedicação e acima de tudo amor à ciência e a valorização dos produtos amazônicos, especialmente ao açaí.

Aos membros, titulares e suplentes, da banca da minha tese de doutorado pelas valiosas contribuições, críticas e sugestões que elevaram a qualidade do trabalho.

Aos amigos que fiz em Campinas e aos de Belém que em todas as oportunidades possíveis demonstraram o seu carinho e fizeram meus momentos mais felizes.

Aos colegas do Laboratório de Bioaromas e Compostos Bioativos vocês serão sempre para mim referências em suas áreas de estudo. Sem a colaboração de vocês esse trabalho não teria sido realizado, pois sozinhos não somos ninguém. Michele, Simiqueli, Ana Paula, Cristiano, Karoline, Adriane, Renata, Maysa e Gustavo Molina e em especial a Angélica que sempre foi generosa em compartilhar seu conhecimento e experiência acadêmica. Minha eterna gratidão a essa equipe!!

A equipe dos laboratórios por onde passei durante a realização desse trabalho pela acolhida e apoio nas análises: Laboratório de Eletroquímica IQ/Unicamp (Prof. Lauro Kubota e Rubia); Laboratório de Citoquímica e Imunocitoquímica IB/Unicamp (Prof. Aureo Yamada e Stephanie); LEB/ FEA (Susana); Divisões de Microbiologia (Marta e Renata) e Divisão de Farmacologia e Toxicologia/ CPQBA (Ana Possenti, Sirlene e Karin).

Por fim, agradeço ao CNPq, FAPESPA, CUD-PIQ e Amazon Dreams pelo apoio e suporte financeiro.

Muito obrigada!

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AAPH- 2,2'-azobis-2-amidinopropano

Ag - Prata

AGCC - Ácido Graxo de Cadeia Curta

AgCl- Cloreto de prata

ALP- Fosfatase Alcalina

ANOVA- Análise de Variância

ATCC- “*American Type Culture Collection*”

ATP- *Adenosina* Trifosfato

CG- Cromatógrafo Gasoso

CLSI- “Clinical and Laboratory Standards Institute”

Δ EP- Diferença de Potencial

DMH- 1,2 dimetil-*hidrazina*

DMSO- Dimetilsulfóxido

EA - Eletrodo Auxiliar

Ea – Potencial Anódico

Ec – Potencial Catódico

EDTA- Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético

ENDO III- Endouclease III

E° - Potencial Redox Padrão

Ep1- Potencial de Oxidação do Pico 1

ER- Eletrodo de Referência

ET- Eletrodo de Trabalho

FCA - Focos de Criptas Aberrantes

fL- Fentolitro

FPG- Formamidopirimidina DNA-glicosilase

HDL-C- Colesterol Lipoproteína de alta densidade

GC-FID- Gas Chromatography (*GC*) / Flame Ionization Detector (*FID*)

GGT- Gama Glutamil Transferase

GTE- “Green Tea Extracts”

HDL-C- Colesterol Lipoproteína de alta densidade

IgA- Imunoglobulina A

INCA- Instituto Nacional do Câncer

MRS - Ágar segundo DE MAN, ROGOSA e SHARPE

MIC- “Minimum Inhibitory Concentration”

MPV- volume plaquetário médio

ND – Não Detectado

ORAC- “Oxygen Radical Absorbance Capacity”

Pa- Pico Anódico

PA- Proantocianidinas

P-AM- Amilase pancreática

Pc- Pico Catódico

PDW – largura da curva de distribuição de plaquetas

pH- Potencial de Hidrogênio

P-LCR- índice de macrotrombócitos

RDW-CV Largura da curva de distribuição de eritrócitos, coeficiente de variação

RDW-SD- Largura da curva de distribuição de eritrócitos, desvio-padrão

TCS- “Total Comet Score”

TG- Triglicerídeos

TGO- Transaminase Glutâmico-Oxalacética

TGP- Transaminase Glutâmico-Pirúvica

UFC- Unidade Formadora de Colônia

UV- Radiação Ultravioleta

W-LCC- Contagem de Leucócitos Grandes

W-LCR- Índice de Leucócitos Grandes

W-SCC- Contagem de Leucócitos Pequenos

W-SCR- Índice de Leucócitos Pequenos

1 INTRODUÇÃO GERAL

As antocianinas são os flavonoides mais abundantes constituintes de frutas e vegetais. O açaí (*Euterpe oleracea*) é um fruto encontrado na região amazônica e que vem ganhando destaque, principalmente por apresentar capacidade antioxidante elevada devido ao seu índice considerável de antocianinas e tocoferóis (Bichara e Rogez, 2011). O mesmo tem recebido atenção nos últimos anos como alimento funcional ou ingrediente alimentar (Kang *et al.*, 2010) (Kang *et al.*, 2011).

Os efeitos de fenólicos sobre a microflora é um campo emergente e é possível que uma mudança flavanol induzida na rica população bacteriana do cólon pode ter uma influência sobre a saúde geral do indivíduo, o conceito chamado de prebióticos. Há também uma necessidade de avaliar o papel da microflora colônica na biodisponibilidade global e potencial bioatividade dos flavonóides da dieta. (Spencer, 2003).

Existe uma relação, mais estabelecida *in vitro* a partir de amostras e de parâmetros biológicos (ex. utilização de m.o isolados de fezes humanas), da influência dos compostos fenólicos no crescimento bacteriano e na conversão desses compostos através do metabolismo bacteriano levando a formação de novas moléculas (China *et al.*, 2012) (Ankolekar *et al.*, 2011) (Kutschera *et al.*, 2011) (Jaganath *et al.*, 2011).

A estrutura de polifenóis tem um impacto importante na absorção intestinal. Os parâmetros estruturais mais debatidos são o peso molecular, glicosilação e esterificação. As propriedades biológicas dos metabólitos microbianos de polifenóis têm sido raramente exploradas. Devido à sua natureza fenólica, eles devem contribuir para a proteção contra o estresse oxidativo. (Scalbert, 2002)

O câncer colorretal (CRC) é uma das principais causas de mortalidade relacionada ao câncer em homens e mulheres, na maioria dos países desenvolvidos e está entre os cinco mais frequentes na população brasileira, como apontam dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA, 2012).

Na gênese do câncer de cólon células inflamatórias contribuem para a colite por gerar citocinas e diversas espécies reativas de oxigênio. O estresse oxidativo tem o papel potencial de afetar uma grande variedade de vias cancerígenas, porque seus alvos incluem o DNA, RNA, além de lipídeos e proteínas, moléculas envolvidas na transformação em malignidade e proliferação de células de iniciação (Pan *et al.*, 2011).

Durante a progressão do tumor de cólon, processos moleculares específicos tem sido alvo de intervenção quimiopreventiva, incluindo a inflamação crônica, a proliferação e diferenciação, sinalização, apoptose, receptores do fator de crescimento da superfície celular, angiogênese e metástases. Apesar do entendimento do processo e mecanismo de carcinogênese do cólon, terapias atuais, incluindo cirurgia, quimioterapia, radioterapia, e terapia de alvo molecular ainda são limitadas para tumores avançados. Assim, uma quantidade crescente de informação científica tem se focado em investigar o potencial de substâncias dietéticas para prevenção e controle de câncer de cólon através de estratégias quimiopreventivas (Mathew *et al.*, 2004).

Estudos epidemiológicos e laboratoriais sugerem que o consumo de frutas e vegetais está correlacionado com a diminuição do risco de câncer de cólon (Michels *et al.*, 2006) (Kune *et al.*, 2006).

Muitos compostos alimentares naturais em frutas e vegetais foram isolados e a suas propriedades de promoção a saúde foram demonstradas. Esses estudos são fundamentais para que novos alimentos tenha ação quimioprotetora comprovada, principalmente contra doenças como o câncer, para que aja valorização dos mesmos e aumento do seu consumo pela população.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Compostos fenólicos

2.1.1 Introdução

Os polifenóis constituem o maior e mais distribuído grupo de metabólitos do reino vegetal e faz parte da alimentação humana e animal (Teissedre *et al.*, 1996).

Os polifenóis constituem um grupo muito complexo de moléculas presentes na maioria das plantas. Milhares de moléculas têm sido identificadas em várias espécies vegetais, com várias funções importantes: inibem o desenvolvimento de micro-organismos patogênicos, além de oferecer proteção contra a radiação UV e estresse oxidativo (Scalbert, 1991) (Parr e Bowell, 2000).

Dentre as milhares de estruturas fenólicas atualmente conhecidas, que vão desde simples moléculas a moléculas altamente polimerizadas, destacam-se os flavonóides e os ácidos fenólicos, que são os antioxidantes fenólicos naturais mais comuns (Madhavi *et al.*, 1995) (Scalbert e Williamson, 2000).

Flavonoídes são difenilpropanos que consistem em dois anéis fenólicos A e B, ligados por uma unidade de três carbonos, que junto com um átomo de oxigênio, forma o anel C heterocíclico. Os flavonoídes são sistematicamente classificados em subgrupos, incluindo flavonas, isoflavonas, flavonóis e flavononas, que são caracterizadas por diferenças na sua estrutura do anel C. Diferenças dentro destes subgrupos flavonoídes são caracterizadas por substituições de metila, hidroxila metoxilação, e grupos glicosídicos nos anéis A, B e C (Harborne, 1986).

Os polifenóis de alto peso molecular por possuírem alto grau de polimerização, são os taninos condensados (proantocianidinas) e os taninos hidrolisáveis, que estão presentes em grãos, legumes, frutas, ervas e bebidas derivadas de plantas (Hagerman *et al.*, 1998).

Os polifenóis com dois grupos hidroxila vicinais em um resíduo aromático são melhores varredores de radicais livres do que os polifenóis com um único grupo hidroxila por resíduo aromático (Rice-Evans, 1996).

Todos os polifenóis são agentes redutores. Como tal, eles podem sequestrar os radicais livres, participar na regeneração de outros antioxidantes como vitamina E e proteger os componentes celulares contra danos oxidativos. Suas estruturas químicas influenciam seu potencial redox, e diferentes testes *in vitro* têm sido desenvolvidos para comparar a sua capacidade antioxidante. Todo micro-organismo tem um potencial redox ótimo de crescimento, sendo que os polifenóis presentes no trato intestinal podem alterar o potencial redox desse meio.

Os compostos fenólicos são aqueles que apresentam em sua estrutura pelo menos um anel benzênico com uma ou mais hidroxilas e, em geral, possuem propriedade antioxidante (Mello e Guerra, 2002).

A importância que apresenta o estudo de substâncias fenólicas é considerável no que se refere às áreas da saúde e agro-alimentar. Essas substâncias intervêm nas reações de escurecimento, possuem propriedades antioxidantes e desempenham papel importante no crescimento e no metabolismo das plantas (Robards *et al.*, 1999).

2.1.2 Estrutura e classificação

Os compostos fenólicos se caracterizam pela enorme diversidade de formas encontradas nas suas estruturas, tanto no nível dos esqueletos carbônicos quanto dos grupos funcionais. Estes critérios têm logicamente sido a base de uma subdivisão dos compostos fenólicos em vários subgrupos, os quais englobam conjuntos de moléculas semelhantes (Silva, 2002).

Dentre as milhares de estruturas fenólicas atualmente conhecidas, que vão desde moléculas simples a moléculas altamente polimerizadas, destacam-se os flavonóides e os ácidos fenólicos, que são os antioxidantes fenólicos naturais mais

comuns (Madhavi, Singhai e Kulkarni, 1995) (Scalbert e Williamson, 2000). Os polifenóis de alto peso molecular, por possuírem alto grau de polimerização, são os taninos condensados (proantocianidinas) e os taninos hidrolisáveis, que estão presentes em grãos, legumes, frutas, ervas e bebidas derivadas de plantas (Hagerman *et al.*, 1998).

2.1.2.1 Os ácidos fenólicos

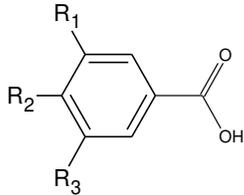
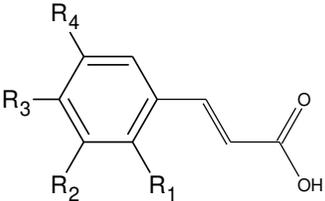
Os ácidos fenólicos podem ser subdivididos em dois grupos: os derivados do ácido cinâmico e derivados do ácido benzóico (Heller, 1986).

Os ácidos benzóicos apresentam uma estrutura C_6-C_1 . Eles são amplamente distribuídos na natureza, possivelmente por sua simplicidade estrutural química e por estarem no início da síntese dos compostos fenólicos (Robards *et al.*, 1999).

Os ácidos cinâmicos apresentam estrutura química C_6-C_3 . Assim como os ácidos benzóicos, eles são largamente distribuídos (Robards *et al.*, 1999), sendo o ácido caféico e o ferrúlico, os mais encontrados (Yang *et al.*, 2001).

O Quadro 1 apresenta as estruturas básicas, os principais exemplos e algumas fontes alimentares dos ácidos fenólicos.

QUADRO 1. Estrutura e principais exemplos e fontes alimentares dos ácidos fenólicos.

Estrutura	Exemplos	Fontes alimentares
<p><i>Derivados do ácido benzóico</i></p> 	<p>Ácido gálico $R_1 = R_2 = R_3 = OH$</p> <p>Ácido Protocatecúico $R_1 = H, R_2 = R_3 = OH$</p> <p>Ácido Vanílico $R_1 = H, R_2 = OH, R_3 = OCH_3$</p>	<p>Chocolate, vinho, soja</p>
<p><i>Derivados do ácido cinâmico</i></p> 	<p>Ácido caféico $R_1 = R_4 = H, R_2 = R_3 = OH$</p> <p>Ácido ferrúlico $R_1 = R_2 = H, R_3 = OH, R_4 = OCH_3$</p> <p>Ácido <i>p</i>-cumárico $R_1 = R_2 = R_4 = H, R_3 = OH$</p>	<p>Tomate, espinafre, aspargos, milho, arroz, vinho branco, maçã, azeitona, café.</p>

FONTE: PENNINGTON, 2002; RICE-EVANS; MILLER E PAGANGA, 1997.

2.1.2.2 Os flavonoides

Os flavonóides representam um vasto grupo de substâncias fenólicas de baixo peso molecular com estruturas químicas e características diversas (Heim, Tagliaferro e Bobilya, 2002). A estrutura dos flavonóides é a C₆-C₃-C₆ que consiste em dois anéis benzênicos, A e B e um anel C com um átomo de oxigênio substituindo o carbono, como se pode visualizar na Figura 1.

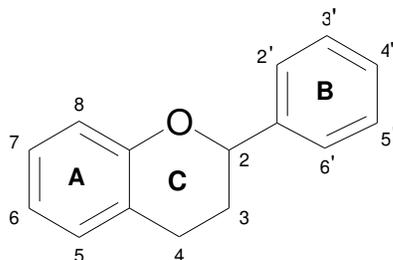


FIGURA 1. Estrutura geral dos flavonóides.

Essa estrutura permite diversas substituições nos anéis A, B e C, resultando numa grande série de compostos. Os flavonóides são divididos em classes de acordo com seu nível de oxidação no anel C: antocianidinas, flavanóis, flavanonas, flavonóis, entre outros, conforme mostra a Figura 2 (MADHAVI; SINGHAI e KULKARNI, 1995).

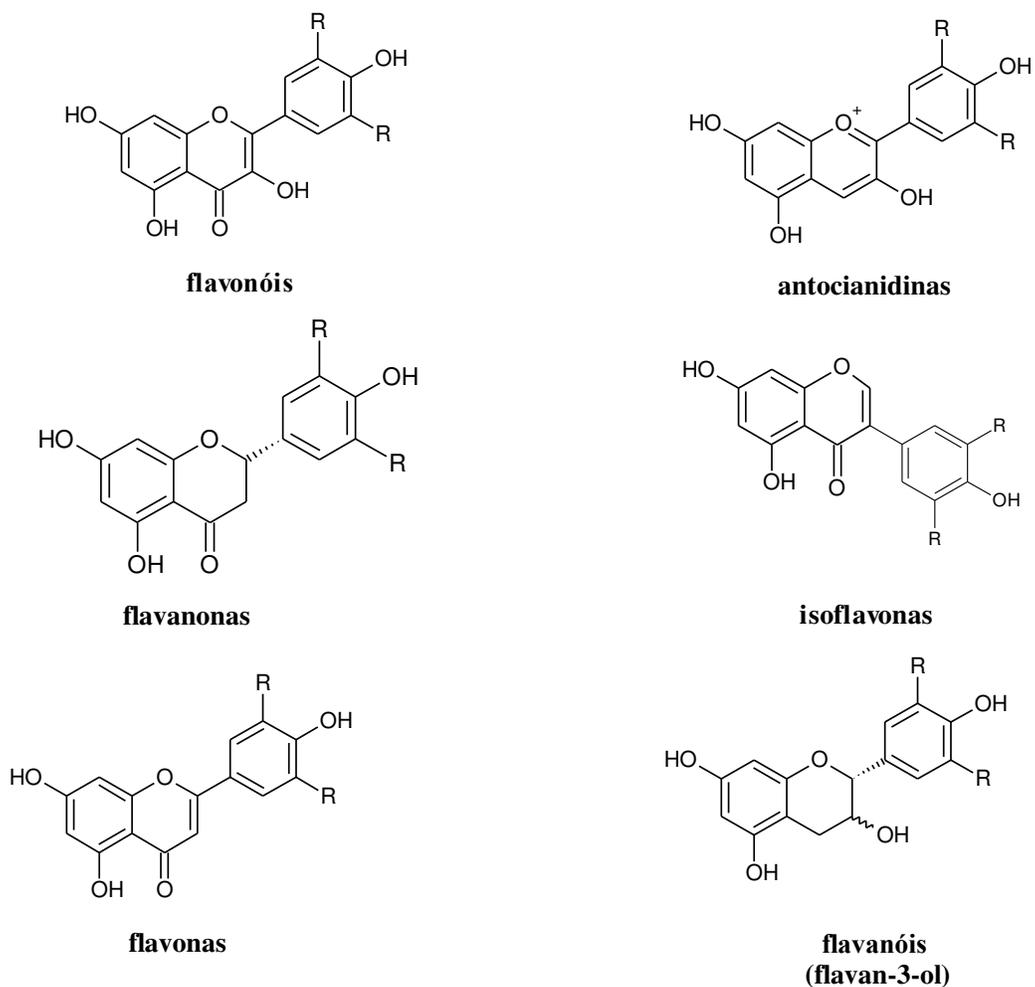


FIGURA 2. Principais classes de flavonóides.

Os flavonóides estão presentes em um grande número de alimentos de origem vegetal tais como legumes, frutas, cereais, além de bebidas como vinho, cerveja e chá verde (Martin e Andriantsitohaina, 2002).

O principal flavanol é a catequina, o qual é abundante em folhas, chá verde, vinho tinto, chocolate, maçã. A quercetina é o principal flavanol da dieta humana e

está presente em vários legumes, particularmente em cebolas, verduras e frutas (Quadro 2) (Ross e Kassum, 2002) (Yang *et al.*, 2001).

QUADRO 2. Principais grupos de flavonóides, componentes individuais e fonte alimentícia.

Grupo	Exemplo de composto	Fonte
Flavonas	Apigenina	Casca de maçã, aipo
	Luteolína	Morango, pimenta
	Tricetina	Brócolis
Flavonóis	Campferol	Aipo, maçã, pêssego, pêra, ameixa
	Miricetina	Cascas de frutas, vinho tinto
	Rutina	Uvas, cebola
	Quercetina	Alface, azeitonas, cebola, maçã, salsa, brócolis, ameixa
Flavanonas	Hesperidina	Frutos cítricos
	Narigina	Casca de cítricos
Flavanóis	Epicatequina	Vinho tinto, maçã
	Catequina	Chá verde, vinho, maçã, chocolate
	Galocatequina	Chá verde
Antocianinas	Cianidina	Amora, acai
	Delfinidina	Cerejas
	Malvidina	Uvas
	Perlagonoidina	Framboesa
	Peonidina	Vinho tinto
	Petunidina	Morango, cascas de frutas com pigmentos escuros

FONTE: NIJVELDT *ET AL.*, 2001; PENNINGTON, 2002; RICE-EVANS; MILLER E PAGANGA, 1997.

2.1.3 O Açaí (*Euterpe Oleracea*)

A Amazônia, com sua biodiversidade enorme, tem um grande potencial a ser explorado de maneira sustentável como fornecedora de biocompostos com alta atividade antioxidante, em particular de compostos fenólicos.

Tem-se, por exemplo, o açaí (*Euterpe oleracea*), um fruto nativo da floresta que vem ganhando destaque nacional e internacional, principalmente por apresentar capacidade antioxidante elevada devido ao seu índice considerável de antocianinas e tocoferóis (Rogez, 2000). A Tabela 1 apresenta a composição em compostos fenólicos do açaí, bem como a concentração dos mesmos, segundo Pacheco-Palencia, Hawken e Talcott (2007).

TABELA 1. Composição e concentração dos compostos fenólicos da polpa fresca do açaí.

Composto fenólico	Concentração (mg/L de polpa fresca)
Ácido protocatechuico	1,06 ± 0,108
Ácido <i>p</i> -hidroxi benzóico	1,51 ± 0,112
(+)-catequina	9,70 ± 0,579
Ácido vanílico	2,97 ± 0,840
(-)-epicatequina	3,14 ± 0,761
Procianidina-1	6,42 ± 0,804
Ácido <i>p</i> -coumárico	1,62 ± 0,157
Procianidina-2	55,7 ± 2,25
Ácido ferrúlico	2,13 ± 0,139
Polímero procianidina-1	9,98 ± 0,901
Polímero procianidina-2	6,63 ± 1,19
Cianidina-3-rutinosídeo	202,3 ± 5,77
Cianidina-3-glicosídeo	75,1 ± 4,76

Pode-se afirmar que a cianidina-3-rutinosídeo é o composto encontrado em maior concentração, sendo ele pertencente ao grupo das antocianinas. A cianidina-3-glicosídeo é o segundo composto em maior quantidade. Dentre os flavanóis, a (+)-catequina aparece em quantidade aproximadamente três vezes superior a (-)-epicatequina, resultado confirmado por outros diversos autores (Gallori *et al.*, 2004; Pacheco-Palencia *et al.*, 2009).

Pompeu *et al.*, (2009) mostraram que os extratos à base de solvente de compostos fenólicos e antocianinas podem atingir 4300 mg equivalentes de ácido gálico / kg de frutos e de 2500 mg / kg de antocianinas frutos, respectivamente.

A classificação brasileira da polpa de açaí está dividida em três categorias, pela quantidade de matéria seca presente na bebida final: fino (8% a 11% de MS), médio (11% a 14% de MS) e grosso (>14% de MS) (Brasil, 2000) .

O epicarpo é uma camada fina, e o mesocarpo tem uma espessura de apenas 1 a 2 mm; o caroço representa cerca de 85-95% do volume do fruto (Figura 3). O suco de açaí, ou simplesmente açaí, é preparado através da maceração dos frutos em água morna após trituração para esmagar a polpa amolecida e no final a adição de água e filtragem do suco (Pompeu e Rogez, 2009).

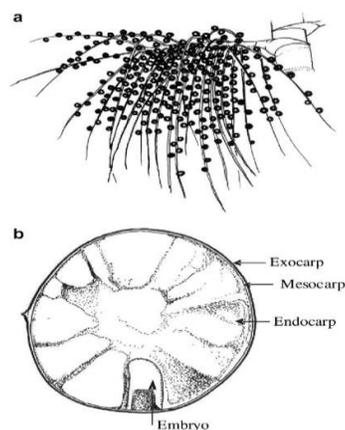


FIGURA 3. a) Cachos do açaizeiro b) Secção transversal do fruto de açaí.

Fonte: Pompeu e Rogez, 2009.

2.2 Trato Gastrointestinal

2.2.1 Considerações Gerais

O trato gastrointestinal (GI) em mamíferos contém uma série de órgãos que são responsáveis pela digestão dos alimentos e absorção de nutrientes no corpo. As substâncias restantes que não são absorvidas são então processadas e removidas através das fezes. O sistema GI é comumente dividido em trato gastrointestinal superior e inferior. A porção superior do trato GI começa na boca e se prolonga para além do estômago para o duodeno do intestino delgado. O trato GI inferior consiste em sua maioria pelo intestino delgado, intestino grosso e o ânus. O próprio intestino grosso é constituído por ceco, cólon e reto.

Dado o comprimento e diversidade de tecidos do trato gastrointestinal no interior do corpo humano, não é de surpreender que as condições fisiológicas dos vários órgãos variem grandemente com as condições tais como o pH e os níveis de oxigênio.

O sistema GI é conhecido por abrigar uma vasta variedade de micro-organismos, população referida como a microbiota. Junto com as variáveis condições do trato gastrointestinal, há uma grande variação na concentração e identidade de organismos que residem em partes específicas do trato gastrointestinal.

Verificou-se que alguns organismos podem sobreviver ao baixo pH do estômago e, portanto, uma baixa concentração de células bacterianas é observada neste meio ácido. Mais abaixo do trato GI a concentração de micro-organismos aumenta, com a maior concentração localizada no cólon. Bactérias anaeróbias são encontradas no trato gastrointestinal, devido aos níveis muito baixos de oxigênio disponíveis nos tecidos orgânicos (Martin, 2008).

2.2.2 Microbiota intestinal

Uma população altamente diversificada de micro-organismos se encontra especificamente no trato GI inferior. Um grande nível de diversidade na microbiota existe também de humano para humano, com adultos exibindo um elevado grau de complexidade da microbiota GI. Um fator que afeta a composição bacteriana no trato GI é a dieta humana (Wollowski, 2001).

A razão para isto é que o alimento ingestão fornece nutrientes para o hospedeiro, mas também para os micro-organismos que residem nele. Nutrientes de alimentos que não são digeridos podem servir como uma fonte de energia para os organismos que vivem no intestino delgado e cólon. Uma mudança na dieta pode, conseqüentemente, eliminar a fonte de energia preferida de um organismo particular, e esses micro-organismos podem não ser capazes de sobreviver dentro do trato GI. Por exemplo, os carboidratos não digeridos e proteínas podem entrar no intestino delgado ou cólon e ser parcialmente digeridos por determinados micro-organismos. O material residual pode, então, servir como uma fonte de energia para um conjunto de micro-organismos diferentes, que podem, em seguida, transformar os subprodutos em ácidos graxos de cadeia curta (AGCC). Esses AGCC são conhecidos por ter benefícios para a saúde do hospedeiro (Pomare, 2005).

O número de substratos fermentáveis disponíveis para as bactérias no trato gastrointestinal é a principal razão para a complexidade da comunidade microbiana no intestino. Não apenas os substratos provenientes da dieta ou do hospedeiro, mas também, o grande número de intermediários formados durante a degradação bacteriana e os componentes não digeríveis da dieta contribuem para a grande variedade de substratos (Blaut *et al.*, 2007).

Estima-se que o complexo ecossistema da microflora intestinal de adultos chega a abrigar 500 diferentes espécies de bactérias. Algumas destas espécies são consideradas potencialmente nocivas devido à sua capacidade de produção de toxinas, invasão da mucosa, ativação de carcinógenos e respostas inflamatórias (Salminen *et al.*, 1998). As cepas com propriedades promotoras de saúde incluem,

principalmente as bifidobactérias e os lactobacilos, os chamados micro-organismos probióticos (Isolauri, 2009).

A probiótico-terapia é baseada no conceito de uma microflora saudável. Probióticos podem ajudar a estabilizar o ambiente microbiano intestinal e barreira de permeabilidade do intestino e melhorar a resposta sistêmica e mucosa IgA, promovendo assim a barreira imunológica da mucosa intestinal. A abordagem de probióticos, ou seja, consumir terapêuticamente culturas de micro-organismos benéficos da microflora saudável de humanos representa uma grande promessa para a prevenção e tratamento de condições clínicas associadas com um comprometimento das funções de barreira da mucosa intestinal e manutenção de respostas inflamatórias (Isolauri, 2009).

2.2.3 Benefícios dos ácidos graxos de cadeia curta para a saúde

Reconhece-se que muitas doenças relacionadas com a saúde do GI são causadas por um desequilíbrio na microbiota no intestino grosso (Cumings e Macfarlane, 1997). As doenças relacionadas com esse desequilíbrio incluem a doença de Crohn, a colite, a síndrome do intestino irritável e o câncer de cólon. Tem sido relatado que o intestino grosso pode conter um volume de até 200 g de material cecal, dos quais cerca de metade dessa massa pode ser biomassa microbiana (Tappenden e Deutsch, 2007).

Em indivíduos saudáveis, esses organismos não são patogênicos e fornecem benefícios a saúde positivos (Topping e Clifton, 2001). Não só esses organismos fornecem a concorrência inibindo a colonização por micro-organismos patogênicos, mas também tem como sua principal função a de decomposição de materiais não digeridos dos alimentos para AGCC.

Isso é benéfico porque os amidos e fibras que eles processam seriam removidos através das fezes sem deixar nenhum benefício para o sistema do hospedeiro. Ao contrário, esses organismos produzem materiais úteis que o hospedeiro pode usar. A presença de AGCC no sistema GI foi relacionada com vários benefícios positivos para a saúde. A produção média de AGCC diária no

intestino grosso tem sido relatada como 400 mMol (Ratajczak *et al.*, 2007). OS AGCC mais benéficos acreditam- se serem o butirato e o lactato (Figura 4).

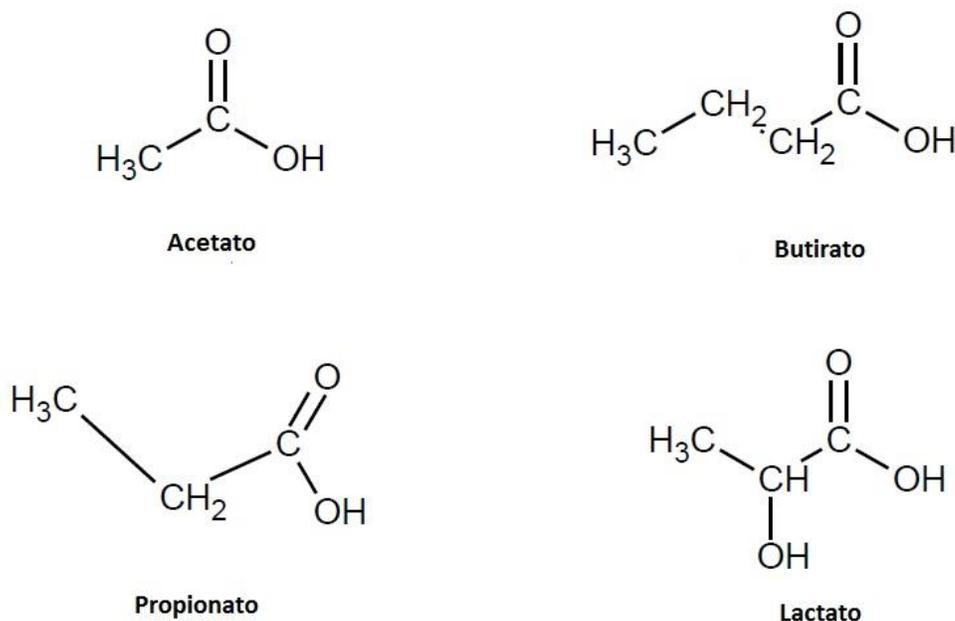


FIGURA 4. Principais AGCC produzidos no trato GI.

Experiências *in vivo* com células epiteliais e bactérias GI produtoras de lactato têm demonstrado uma resposta imune de células T modificadas regulando a resposta imunitária alérgica (Blaut, 2007). Os resultados dos estudos forneceram provas de que o lactato é comumente metabolizado a butirato (Archer, 1998). Portanto, a produção de lactato pode ser necessária para a formação de butirato.

O butirato foi relacionado com a diminuição do risco de câncer de cólon em humanos (Hague, 1996). Uma possível explicação para isto é que o butirato é a fonte de energia preferida de células epiteliais do cólon. Tem sido relatado que estas células produzem cerca de 70% da sua energia através da oxidação do butirato (Cummings e Macfarlane, 1997). O butirato e o lactato são usados pelas células do organismo hospedeiro para gerar a função celular saudável. Também tem sido mostrado que o butirato pode induzir apoptose em linhagens celulares de

tumor de cólon humano (Moreau, 2003). A teoria da etiologia da colite ulcerosa é uma ligação com a falha do metabolismo do butirato de metila (Hanada, 2002).

2.2.4 Fontes de produção de AGCC

Existem várias fontes alimentares que levam à formação de AGCC no intestino grosso. Comumente estas fontes alimentares entram no sistema GI como carboidratos indigeríveis, polissacarídeos, amidos, fibras e proteínas. Ao entrar no intestino grosso, os mesmos são utilizados como fonte de energia para os micro-organismos que residem no trato GI. Em certos casos, podem ser diretamente quebrados para produzir AGCC, ou talvez convertidos em um elemento intermediário, o qual pode então ser convertido por um outro micro-organismo para finalmente produzir AGCC.

A Figura 5 mostra como os micro-organismos específicos são capazes de produzir o butirato a partir de qualquer uma das variedade de nutrientes. Curiosamente, apesar da diversidade das fontes de nutrientes utilizadas para formar o butirato, todas as vias bioquímicas contém crotonil-CoA como um intermediário comum. O Acetil-CoA, os polifenóis e os aminoácidos lisina e glutamato são capazes de formar diretamente este composto.

Os carboidratos e proteínas têm que primeiro produzir succinato, que passa através do ciclo de Krebs para originar o crotonil-CoA. Esta via conduz finalmente, através da ação de várias enzimas, a produção de butirato e um equivalente do acetil-CoA. O acetil-CoA depois reentra na via e conduz à formação de mais ácido butírico. Uma vez que a via se inicia em um ciclo alternativo que certos micro-organismos possuem. Para estes micro-organismos, as enzimas catalisam a reação da acetil -CoA com o fosfato para formar butiril-fosfato , que entra para originar o butirato. (Harrison, 2010)

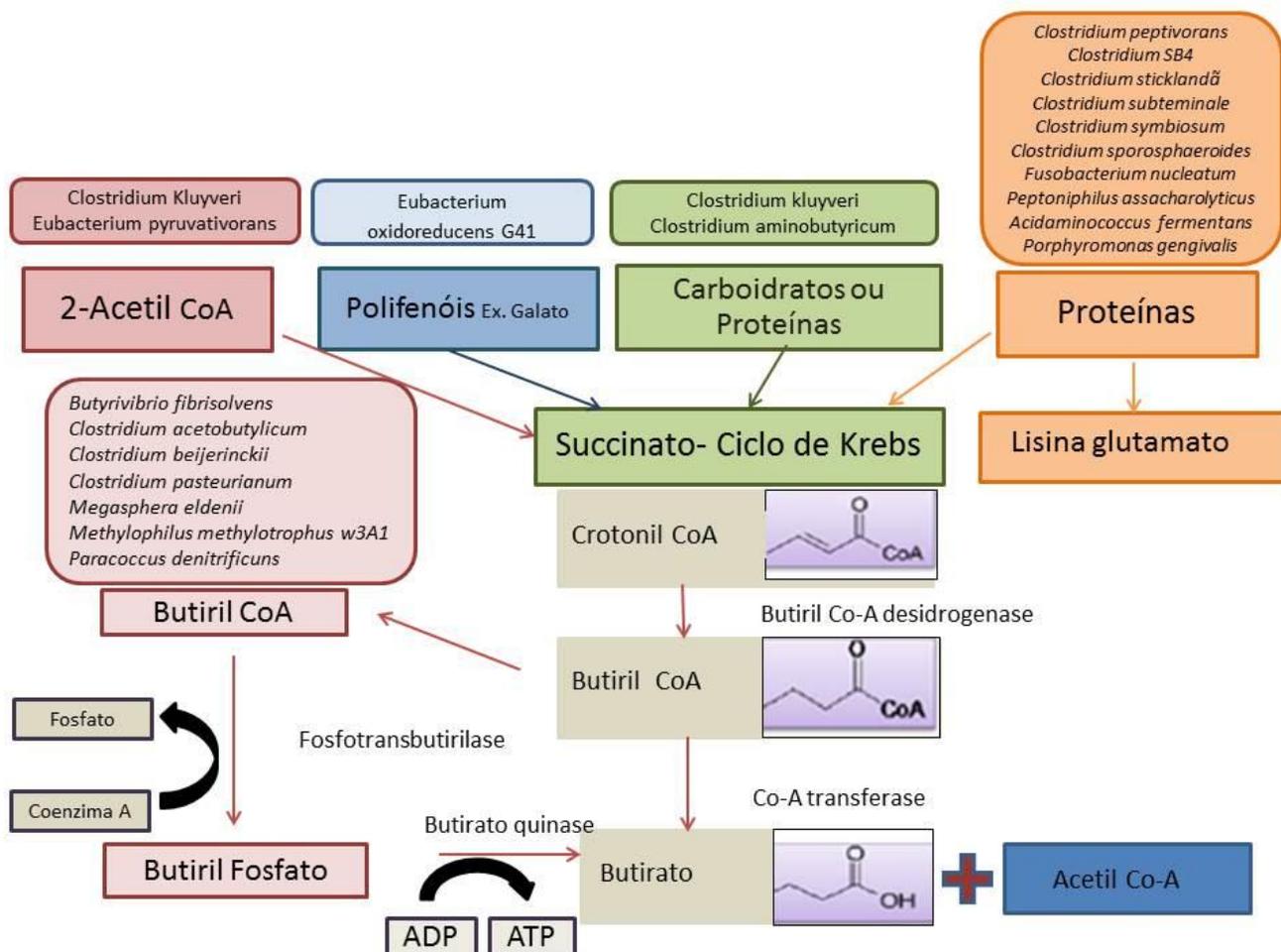


FIGURA 5. Vias Bioquímicas da produção de butirato associada a várias fontes, nutrientes e micro-organismos.

Fonte: Harrison, 2010.

2.2.5 Metabolismo dos flavonoides no trato gastrointestinal

A dieta humana contém uma grande variedade de substâncias não nutritivas derivadas de plantas, incluindo lignanas e flavonóides, que pertencem ao grande grupo de polifenóis. Após a sua captação através da dieta, esses compostos podem ser absorvidos em certa quantidade, mas também podem sofrer transformação pelas bactérias intestinais. As propriedades biológicas dos produtos resultantes de

transformação podem ser consideravelmente diferentes daqueles do composto original (Blaut *et al.*, 2007).

Portanto o cólon deve ser considerado como um local de grande atividade metabólica e não como uma simples via de excreção e maior atenção deve ser dada pela comunidade científica. As bactérias intestinais afetam a maturação e a manutenção do sistema imunológico, influenciam a proliferação celular, e contribuem para a produção de energia. Além disso, a microbiota intestinal tem um grande potencial catalisador, o que pode levar à formação de metabólitos com efeitos benéficos ou adversos (Blaut *et al.*, 2007).

O consumo médio diário de fenóis, polifenóis e taninos pode variar de menos de 100mg a mais de 2 g. Mais de 95% deste consumo consegue atingir o cólon e é fermentado pela microflora intestinal (Clifford, 2004). Pode-se estimar um intervalo aproximado de concentração de polifenóis no cólon de 5-10 mg / ml, dependendo da ingestão alimentar. (Parkar *et al.*, 2008).

Isso é consistente com a evidência epidemiológica que sugere que dietas ricas em frutas e vegetais são associadas com diminuição dos riscos de câncer de cólon, gástrico e retal. O que é reforçado pela associação da ingestão dietética de fenólicos em indivíduos saudáveis com um aumento da capacidade antioxidante nas fezes (Garsetti *et al.*, 2000).

É agora claro que o seu potencial antioxidante final, e até mesmo a sua bioatividade que resulta em seu potencial *in vivo*, depende da absorção, metabolismo, distribuição e excreção destes compostos no organismo após a ingestão e as propriedades de redução dos metabólitos resultantes (Spencer *et al.*, 2003).

A transformação bacteriana de um composto bioativo pode resultar na formação de um composto inativo. Alternativamente, a atividade pode ser melhorada, como resultado da transformação bacteriana, e compostos

originalmente inativos podem ser ativados através da conversão bacteriana. (Blaut, 2007).

O cólon contém $\pm 10^{12}$ micro-organismos/cm³, os quais têm um enorme potencial catalítico e hidrolítico, e esta degradação enzimática de flavonóides pela microflora colônica resulta em uma enorme variedade de novos metabólitos (Spencer, 2003).

Por exemplo, as enzimas bacterianas podem catalisar muitas reações, incluindo a hidrólise, desidroxilação, demetilação, clivagem do anel e descarboxilação, bem como uma rápida desconjugação (Scheline, 1999).

No estudo de Kim *et al.*, (1998) não foi encontrada relação evidente entre estrutura e atividade, além de glicosilação correlacionando com baixa atividade. Essa correlação é provavelmente de importância limitada *in vivo*, porque a microbiota intestinal humana tem capacidade suficiente para deglicosilar flavonóides glicosídicos, ativando-os.

Os compostos fenólicos também são antimicrobianos e pode interagir com a microbiota intestinal, produzindo a modulação da população microbiana do trato gastrointestinal (GI). Isso tem efeitos sobre a saúde do trato GI e também no metabolismo dos compostos fenólicos da dieta (Lee *et al.*, 2006).

O estado redox (redução e oxidação) do intestino depende do equilíbrio entre agentes oxidantes (radicais livres e ERO), e mecanismos antioxidantes (enzimas glutathione S-transferase e glutathione peroxidase, GSH-Px). Este estado redox afeta muitas vias de transdução de sinal, como a sinalização do NF- κ B (Schroeder *et al.*, 2011).

Apesar de flavonóides e de seus glicosídeos poderem ser absorvidos através do trato gastrointestinal (Manach e Donovan, 2004) (Scalbert e Williamson, 2000) (Scalbert *et al.*, 2002), a sua absorção é incompleta e os níveis circulantes são baixos (Halliwell *et al.*, 2005) (Manach e Donovan, 2004) (Rechner *et al.*, 2002 (a)), (Rechner *et al.*, 2002 (b)) (Scalbert *et al.*, 2002). Conseqüentemente, os níveis de

compostos fenólicos não absorvidos que permanecem no intestino são consideráveis, de forma que eles e seus metabólitos podem desempenhar um papel fundamental na manutenção da saúde intestinal (Halliwell *et al.*, 2005).

Avanços ocorreram na compreensão das mudanças estruturais que ocorrem na absorção de flavonóides, os fatores que influenciam a absorção de flavonóides em todo o intestino delgado, e na medida em que são metabolizados no trato gastrointestinal e que sofrem conjugação no fígado pós-absorção (Rechner, 2004).

O metabolismo do ácido clorogênico, naringina e rutina, polifenóis na dieta (membros representantes de três famílias comuns de polifenóis, os hidroxicinamatos, flavanonas e flavonóis a) foi estudada por Rechner (2004) em um modelo de cultura *in vitro* da microflora colônica humana.

Os produtos de degradação fenólicos podem ser classificados como não-específicos, ou seja, os hidroxilados de ácido 3 - fenilpropiónico e específicos, os ácidos fenilacéticos hidroxilados, para os flavonóides glicosilados, devido às suas propriedades estruturais específicas. A estrutura dos produtos de degradação não é dependente de moléculas de açúcar ou ácidos orgânicos naturalmente ligados à maioria dos polifenóis, mas sim das características estruturais dos polifenóis. A consequência é que um número relativamente pequeno de produtos de degradação fenólicos é formado no cólon do diversificado grupo de polifenóis naturais (Rechner, 2004).

2.2.6 Interação flavonóides- microbiota

A relação entre estrutura química e as taxas de degradação microbiana intestinal de diferentes flavonóides foi investigada por Simons *et al.* (2005) através de fermentação anaeróbica, utilizando amostras de fezes de indivíduos. Esse estudo demonstrou que os flavonóides genisteína, apigenina, kaempferol, e naringenina foram os mais rapidamente degradados em comparação a todos os outros flavonóides analisados. Todos eles têm uma estrutura comum que são

grupos hidroxila nas posições 5, 7, e 4'. Esta observação sugere que estas três hidroxilas foram importantes para a degradação ideal dos flavonóides.

O uso de (2)-epicatequina (150 mg/L) em estudo *in vitro* (Tzounis, 2008) promoveu um aumento significativo no crescimento do grupo de bactérias benéficas, *C. coccoides* - *Eubacterium rectale*, grupo que tem sido associado a efeitos benéficos em nível celular e sistêmico, devido à sua capacidade de gerar AGCC (ácidos graxos de cadeia curta) pelo metabolismo sacarolítico, como revelado pelo aumento do número deste grupo de bactérias nos recipientes que contenham (2)-epicatequina, em comparação com o número encontrado em frascos de controle, no mesmo tempo de estudo. Além disso, houve aumento em ambos *Lactobacillus spp.* e *Bifidobacterium spp.*

O aumento flavanol induzido deste grupo de bactérias visto nesse estudo pode resultar em um aumento potencial do metabolismo sacarolítico no intestino grosso, um evento que se acredita ser benéfico principalmente devido à produção de AGC: acetato, propionato e butirato. A produção de AGCC no intestino grosso é considerada positiva para a saúde do intestino por ter sido associada a uma inibição d proliferações pré-neoplásicas e uma aceleração da conversão de colesterol em ácidos biliares (Wilson, 2005).

Estudos têm sugerido que a extensão da absorção de polifenóis da dieta no intestino delgado é relativamente pequena (10-20%) (Spencer *et al.*, 1999; Kuhle *et al.*, 2000 (a) ; Kuhle *et al.*, 2000 (b)). As implicações desta baixa absorção no intestino delgado é que a maioria dos polifenóis ingeridos, incluindo aqueles absorvidos e conjugados nos enterócitos e / ou o fígado antes do transporte, voltam para a luz, quer diretamente quer por via biliar e chegam ao intestino grosso, onde encontram a microflora do cólon (Crespy *et al.*, 1999).

No estudo de Lee *et al.* (2006) com compostos fenólicos do chá, *Clostridium sp.* patogênicos foram em geral inibidos, enquanto *Clostridium sp.* comensais tiveram crescimento reforçado. A diminuição dos níveis de Bacteroides e *Clostridium* que são conhecidos marcadores de maior risco para câncer de cólon

(Duffy *et al.*, 2002), sugere que o consumo de compostos fenólicos podem diminuir o risco desse câncer.

Em estudo de Molan *et al.*, (2009) descobriu-se que a água preparada a partir de extratos de chá verde que contém altas concentrações de selênio orgânico são mais eficazes na promoção do crescimento de culturas puras de *Lactobacillus rhamnosus* e *Bifidobacterium breve* do que o chá verde contendo níveis normais de selênio.

Embora o mecanismo pelo qual o chá dos extratos vegetais aumentou o crescimento de *L. rhamnosus* e *B. breve* neste estudo não foi encontrado, uma possível explicação parcial para este efeito é o reforço da capacidade dos polifenóis do chá verde de atuar como agentes antioxidantes e anti-radicalares e de modular o estresse oxidativo gerados pelas atividades metabólicas no meio e, conseqüentemente, proporcionar um melhor ambiente para o crescimento e multiplicação dessas bactérias. Os resultados mostraram alta atividade antioxidante para ambos os extratos o chá verde chinês (CGT “China green tea”) e o com selênio (SGT “ selenium containing green tea”), mas o SGT apresentou potencial antioxidante significativamente superior (Molan *et al.*, 2009).

O aumento de probióticos como bifidobactérias e lactobacilos levava uma diminuição na formação de amônia, escatol e aminas procarcinogênicas no intestino grosso, a redução na produção de ácidos que elevam o pH fecal (Yamamoto *et al.*, 1997), sendo que outros estudos com chá verde também demonstraram esse efeito de crescimento seletivo (Goto *et al.*, 1998 e Goto *et al.*, 1999).

No estudo de Goto *et al.* (1998) o qual foi mais aprofundado, foi administrado 300 mg de catequina por dia em 15 indivíduos durante um período de 3 semanas. Eles descobriram níveis significativamente aumentados nas fezes de lactobacilos e bifidobactérias, enquanto os níveis de Enterobacteriaceas, Bacteroidaceas e Eubactérias diminuíram significativamente.

No estudo de Ishihara *et al.* (2001) foram avaliadas rações suplementadas com extratos de dois chás verdes (o GTE-1 com > de 60% de Polifenóis Totais e

GTE-2 com com > de 80%)para verificar os seus efeitos na microbiota intestinal. Com o uso da ração suplementada ocorreu diminuição da presença de *Clostridium perfringens* e melhora do equilíbrio da microflora intestinal em bezerros, mantendo nas fezes altas contagens das espécies de Bifidobacterium e Lactobacillus. Essa melhora no balanço da microflora levou a diminuição da frequência de diarreia nos animais transportados

Hara (1997) conduziu um teste em seres humanos mostrando que a administração de 100 mg de catequinas do chá, três vezes por dia juntamente com as refeições por três semanas diminuiu a produção de produtos de putrefação e aumentou a de ácidos orgânicos, diminuindo o pH. Foi relatado que, embora as catequinas tivessem sido bactericidas, não houve efeito sobre as bactérias lácticas.

Bazzocco *et al.* (2008) estudaram a habilidade da microbiota humana em fermentar PAs (proantocianidinas) de maçã. As PAs de cadeia longa foram capazes de inibir *in vitro* o metabolismo microbiano de PAs mostrado como máxima de baixa em momentos iniciais. A presença de PAs isoladas também suprimiu a formação de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) e de hidratos de carbono em comparação com a parede celular da maçã ou suspensão fecal, sem substratos. Os resultados sugeriram que há uma competição entre o efeito inibitório das PAs na atividade microbiana, bem como a capacidade de converter PAs em ácidos fenólicos pela microbiota. O tamanho da cadeia é um fator importante que afeta a conversão microbiana de PAs. PAs de cadeia longa foram capazes de suprimir tanto ácidos fenólicos e formação de AGCC *in vitro* pela microbiota fecal, sugerindo efeitos inibitórios sobre enzimas do lúmen.

No estudo de Su *et al.* (2008), também com chá verde não houve interferência no crescimento das cepas probióticas *L. acidophilus* L10, *B. animalis* B94 ou *L. casei* L26 pela presença do extrato de chá verde ou pela presença de *Staphilococcus. aureus* e *Streptococcus pyogenes*. Em contraste com as cepas probióticas, o extrato de chá verde levou a uma diminuição significativa de UFC de ambos os *S. Aureus* e *S. pyogenes* e isto foi observado em uma fase inicial (4 h).

Dado que a adição do extrato de chá verde ao meio de cultura não afetou o crescimento de cepas probióticas *L. acidophilus* L10, *B. animalis* B94 ou *L. casei* L26, foi levantada a possibilidade de que essas cepas de probióticos podem ser utilizadas em combinação com o extrato do chá verde como um terapêutico para reduzir o crescimento de patógenos microbianos em infecções humanas. (Su *et al.*, 2008).

A importância das bactérias intestinais para o metabolismo de polifenóis é realçada pelo fato de que animais estéreis ou tratados com antibióticos não formam esses metabolitos de ácidos fenólicos (Schneider *et al.*, 1999) (Schneider *et al.*, 2000). No entanto, apenas algumas espécies de bactérias intestinais responsáveis pelo metabolismo dos fenólicos foram identificadas e há pouco conhecimento dos mecanismos envolvidos (Schneider *et al.*, 1999; Braune *et al.*, 2001; Shofer *et al.*, 2002; Shofer *et al.*, 2003; Simons *et al.*, 2005), porém muitos trabalhos realizados já indicam descobertas em relação a biodisponibilidade pós conversão microbiana desses compostos fenólicos ingeridos (Kutschera *et al.*, 2011) (Pianpumepong *et al.*, 2012).

2.2.7 Câncer de Colón

2.2.7.1 Incidência e desenvolvimento do câncer de colón

Em termos de incidência, a neoplasia de cólon e de reto é a terceira causa mais comum de câncer no mundo em ambos os sexos e a segunda causa em países desenvolvidos (INCA, 2012). Possui índice de sobrevida de 5 anos em 63% dos casos, reduzindo a 10% naqueles com diagnóstico de metástases (Goldberg, 2005). Esse tipo de neoplasia abrange tumores que atingem o cólon e o reto.

De acordo com o INCA (Instituto Nacional de Câncer), tanto homens como mulheres são igualmente afetados, sendo doença tratável e frequentemente curável, quando apenas localizada no intestino. O número de casos novos de câncer de cólon e reto estimado para o Brasil no ano de 2012 foi de 14.180 casos

em homens e de 15.960 em mulheres. Estes valores correspondem a um risco aumentado de 13 casos novos a cada 100 mil homens e 15 para cada 100 mil mulheres (INCA, 2012).

O fator de risco mais importante para este tipo de neoplasia é a história familiar de câncer de cólon e reto e predisposição genética ao desenvolvimento de doenças crônicas do intestino (como as poliposes adenomatosas), além de dieta com base em gorduras animais, baixa ingestão de frutas, vegetais e cereais, assim como consumo excessivo de álcool e tabagismo. A idade também é considerada fator de risco, uma vez que tanto a incidência como a mortalidade é maior com o aumento da idade. A prática de atividade física regular está associada a baixo risco de desenvolvimento do câncer de cólon e reto (INCA, 2012).

O desenvolvimento do câncer de cólon é um processo de múltiplos passos que envolvem uma série de alterações patológicas que variam desde lesões microscópicas das mucosas e FCA aos tumores malignos (Takayama *et al.* , 1998). Os FCA são especificamente induzidos por cancerígenos que predominantemente provocam tumores do cólon, e são consideradas lesões precursoras de câncer do cólon (Wargovich *et al.* , 1995).

Multiplicidade de ACF aumenta com o tempo e parece ser um bom indicador de resultado de tumor. Assim, o modelo de câncer de cólon DMH - induzido em ratos é uma boa ferramenta para investigar a relação entre FCA e câncer de cólon, e também para avaliar agentes com potenciais propriedades quimiopreventivas antes de estudos pré-clínicos (Wargovich *et al.* , 1995).

2.2.7.2 Compostos Fenólicos X Câncer de Colón

Para o câncer colorretal, a segundo principal causa de morte por câncer no mundo, existe evidência estabelecida para a prevenção por uma dieta rica em frutas e legumes. Isto poderia ser devido ao potencial quimiopreventivo de produtos vegetais secundários, como os flavonóides e hidroxicinamatos. Só uma quantidade limitada de compostos polifenólicos ingeridos são absorvidos no intestino delgado e

submetidos a específicos metabolismos da fase II, ou seja, metilação e conjugação com sulfato e glucuronídeos (Scalbert, 2000).

Mais de 95% dos polifenóis totais ingeridos passa para o cólon (Clifford, 2004). No entanto, estudos com pacientes ileostomizados têm apontado que, depois de ingestão de suco de maçã, 0-33% da dose administrada de polifenóis atingiu o fim do intestino delgado alcançando também o colón (Kahle, 2005). Depois de entrar no cólon, os polifenóis sofrem metabolismo extenso pelas enzimas da microbiota intestinal humana (Blaut, 2003) (Janner, 2005).

Alguns mecanismos explicam como as bactérias contribuem para sua patogenicidade, sendo um deles a presença de alterações na microflora intestinal que facilitam o desenvolvimento de processos inflamatórios (Guarner e Malagelada, 2003). Outro fator contribuinte é a promoção da ativação de componentes carcinogênicos e a produção de compostos mutagênicos, como os radicais livres (Huycke, 2004).

2.2.7.3 Carcinógeno 1,2-dimetilhidrazina (DMH)

O DMH é um agente alquilante que é metabolizado no fígado, com a formação de intermediários ativos os azoximetanos (AOM) e metilazoximetanol (MAM), que são, conseqüentemente, transportados para o cólon por via biliar (Oraevic *et al.*, 1986) que é conhecido por provocar o estresse oxidativo, a alquilação de DNA e assim, danos ao DNA e mutações (Fiala, 1977) (Rogers e Pegg, 1977) os quais conseqüentemente prosseguem na indução da carcinogênese do cólon.

Esta substância cancerígena genotóxica é freqüentemente usado para induzir a carcinogênese de cólon experimental em roedores. O DMH é um agente alquilante que tem como alvo o DNA, e induz a formação de aductos metilados com as bases de DNA, mutações pontuais, micronúcleos e trocas de cromátides irmãs (Choudhary e Hansen, 1998), obtendo-se, assim, as neoplasias visíveis macroscopicamente de forma dose-dependente (Sequeira *et al.*, 2000). O DMH induz tumores colorretais em animais experimentais e foi escolhido como indutor por ser um poluente ambiental tóxico (Chugunov *et al.*, 2000) e um pró-

cancerígeno bem estabelecido, com seletividade para o cólon (Halline, 1989; Ohno *et al.*, 2001).

O câncer de cólon é também conhecido por ser uma consequência patológica do estresse oxidativo persistente resultando em danos ao DNA e mutações em câncer associados aos genes em que a superprodução celular de espécies reativas de oxigênio (ROS) têm sido implicados (Newell e Heddle, 2004) (Kinjo *et al.*, 2006). ROS são pequenas, altamente reativas; moléculas contendo oxigênio, que são geradas em quantidade elevada durante o metabolismo. O DMH pode reagir com moléculas de gorduras, proteínas e DNA em várias células incluindo as células sanguíneas (Arutiunian *et al.*, 1997).

No câncer colorretal, a fase de iniciação pode ser reconhecida pela formação de lesões no intestino chamado focos de criptas aberrantes (FCA), que podem se desenvolver em tecido canceroso (Bird e Good, 2000). Estas lesões têm sido frequentemente utilizadas como biomarcadores para a fase inicial do câncer colorretal em ratos induzidos com 1,2 -dimetilhidrazina (DMH) (Demarzo e Garcia, 2004).

Dessa forma, o modelo que utiliza o carcinógeno DMH induz mudanças histológicas e moleculares na mucosa intestinal de roedores que se assemelham a sequencia adenoma-adenocarcinoma encontrada em humanos (Gustin e Brenner, 2002), onde a primeira, menor e mais precoce evidência histopatológica reconhecida em ambos os casos é a presença de FCAs.

2.3 Propriedades antioxidantes

Hoje em dia, os antioxidantes têm um papel importante na saúde humana sendo levados em conta nas recomendações alimentares, no desenvolvimento de alimentos funcionais e na extração de novos compostos potencialmente terapêuticos de plantas medicinais. Frutas, vegetais, cereais e certas bebidas são ricos em flavonóides, compostos da família polifenólica de fotoquímicos antioxidantes.

A capacidade dos flavonoides de atuarem como antioxidantes em sistemas biológicos já foi há muito tempo reconhecida. Os flavonóides exibem atividades biológicas, incluindo ações anti-alérgicas, anti-virais, anti-inflamatórias e vasodilatadoras nos vegetais e em animais quando são ingeridos (Middleton e Kandaswami, 1996) (Evers *et al.*, 2005) (Connors e Grisham., 1996) (Padilla *et al.*, 2005).

Os flavonóides possuem estrutura ideal para a redução da formação de radicais livres sendo antioxidantes mais eficazes que as vitaminas C e E. Na oxidação ocorre a transferência de elétrons de um átomo para outro e representa uma parte essencial da vida aeróbia e do metabolismo humano. A respiração é um processo oxidativo importante na vida, onde a glicose e os ácidos graxos são transformados em energia. Esta transformação ocorre no interior da célula, na mitocôndria, onde é produzido ATP. Durante a respiração é consumido oxigênio e gerado ATP, ficando como resíduos dióxido de carbono e água. Neste processo são também produzidas espécies reativas de oxigênio denominadas radicais livres.

O potencial dos compostos fenólicos para atuarem como antioxidantes é determinado pelas suas atividades químicas em termos das suas propriedades redutoras como agentes doadores de H ou de elétrons e de exercerem ação antioxidante (como dador de H ou elétrons, ou como receptor de radicais livres).

Em estudos *in vitro*, muitos compostos fenólicos naturais são melhores antioxidantes que as vitaminas E ou C. A sua capacidade de quelar metais, especialmente cobre e ferro, faz com que atuem indiretamente como antioxidantes já que inibem a ação catalisadora dos metais na formação de radicais livres (Conner e Grisham, 1996).

A atividade antioxidante dos flavonóides depende da sua estrutura e pode ser determinada por alguns fatores, tais como (Pietta, 2000):

- Reatividade como agente doador de H e elétrons;
- Estabilidade do radical flavanoil formado;
- Reatividade frente a outros antioxidantes;

- Capacidade de quelar metais de transição;
- Solubilidade e interação com as membranas.

De um modo geral, quanto maior o número de hidroxilas, maior a atividade como agente doador de H e elétrons. Flavonóides monohidroxilados apresentam atividade muito baixa. Dentre os flavonóides dihidroxilados, destacam-se aqueles que possuem o grupo catecol (3',4'- dihidroxi) no anel B que confere maior estabilidade à forma radical e participa na deslocalização dos elétrons.

Os flavonóides com múltiplas hidroxilas como a quercetina, miricetina e luteolina possuem forte atividade antioxidante quando comparados ao α -tocoferol, ácido ascórbico e β -caroteno. O comportamento eletroquímico dos flavonóides foi estudado por vários autores (Hodnick *et al.*, 1986) (Kilmartin, 2001) (Blasco *et al.*, 2004) (Blasco *et al.*, 2005).

Os flavonóides podem ser eletroquimicamente oxidados e a maioria mostra reações de oxidação. O mecanismo de ação predominante é provavelmente através da doação de um elétron a um radical cátion resultando na formação de uma semi-quinona que pode doar mais elétrons para formar a quinona, (Figura 6).

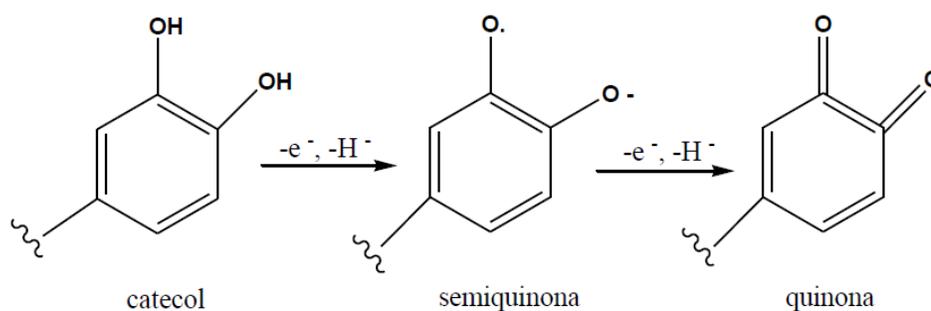


FIGURA 6. Mecanismo de oxidação do anel B dos flavonóides.

Tendo em conta a informação encontrada na literatura sobre a relação entre o potencial de oxidação e o poder antioxidante dos flavonóides, quanto mais baixo for o potencial de oxidação maior é o seu poder antioxidante, verificou-se que os flavonóides exibem diferentes potenciais de oxidação e conseqüentemente, dependendo da subclasse a que pertencem e dos grupos substituintes que possuem, apresentam diferente poder antioxidante.

2.3.1 Métodos de avaliação da capacidade antioxidante

2.3.1.1 Voltametria cíclica

Os métodos eletroquímicos são muito importantes na caracterização destes antioxidantes. A capacidade dos antioxidantes para serem oxidados em elétrodos inertes permite a sua monitorização usando técnicas eletroquímicas em conjunto com as técnicas de separação por cromatografia.

Os diversos métodos envolvendo radicais propostos para testar as propriedades antioxidantes não informam quantitativamente a facilidade relativa de oxidação, um fator importante na atividade antioxidante (Kilmartin *et al.*, 2001).

Os compostos são antioxidantes em virtude de sua habilidade de se comportar como redutores em solução, tendendo serem oxidados na presença de elétrodos inertes (Kilmartin *et al.*, 2001).

Técnicas eletroanalíticas são vantajosas na análise de compostos fenólicos. Propriedades antioxidantes dos compostos fenólicos estão relacionadas com a sua capacidade de doar elétrons. Portanto, a detecção de polifenóis baseada na oxidação eletroquímica é realizada a baixos potenciais (Arribas *et al.*, 2012) (Medvidovic-Kosanovic *et al.*, 2011) (Chevion, Roberts e Chevion, 2000).

A voltametria cíclica é um método eletroanalítico usado extensamente para determinar as propriedades redox de moléculas em solução e vem sendo utilizado para avaliar a capacidade antioxidante de amostras biológicas em alimentos. As

informações geradas por este método indicam quantitativamente a habilidade do composto em doar elétrons (Chevion; Roberts e Chevion, 2000).

A capacidade antioxidante total da amostra é uma função da combinação de dois parâmetros analíticos, o primeiro é o potencial de oxidação (anódico E_a e catódico E_c), que reflete especificamente o poder redutor do composto. O segundo é a intensidade da corrente gerada (I), refletindo a concentração do(s) componente(s) (Chevion; Roberts e Chevion, 2000).

Experimentalmente, inicia-se a aplicação do potencial de um valor no qual nenhuma redução ocorre. Com o aumento do potencial para regiões mais negativas (catódica) ocorre a redução do composto em solução, gerando um pico de corrente proporcional à concentração deste composto. Quando o potencial já tiver atingido um valor no qual nenhuma reação de redução ocorre, o potencial é varrido no sentido inverso, até o valor inicial, e no caso de uma reação reversível, os produtos que tiverem sido gerados no sentido direto (e se localizam ainda próximos à superfície do eletrodo) serão oxidados, gerando um pico simétrico ao pico da redução (Chevion; Roberts e Chevion, 2000).

Em reações eletroquímicas reversíveis as espécies são estáveis e trocam elétrons rapidamente com o eletrodo de trabalho. Neste caso, o potencial redox padrão (E^0) é a média entre o potencial anódico e catódico, como mostra a Equação 1 (Chevion, Roberts e Chevion, 2000).

$$E^0 = \frac{(E_a + E_c)}{2} \quad (1)$$

A voltametria cíclica utilizando eletrodo de carbono parece ser uma ferramenta adequada em ensaios antioxidante, devido à sua simplicidade, rapidez, e ausência de necessidade de pré-tratamento de amostras (Diopan *et al.*, 2008). Infelizmente a VC não permite identificar os antioxidantes presentes na amostra. A técnica proporciona a soma do total de antioxidantes na amostra e, desta forma, uma interpretação mais simples dos dados experimentais. Os

compostos que são oxidados mais facilmente parecem estar em maior quantidade já que sua capacidade antioxidante é mais extensa (Hrbac e Kohen, 2000).

O uso da voltametria cíclica para detecção de compostos fenólicos em amostras de alimentos já foi realizada principalmente em chá verde (Roginsky e Barsukova, 2003), suco de laranja (Sousa *et al.*, 2004) e vinhos branco e tinto (Kilmartin *et al.*, 2002) (Makhotkina e Kilmartin, 2002).

2.3.1.2 ORAC

A análise ORAC tem sido frequentemente utilizada para avaliar a atividade antioxidante relativa de diferentes amostras biológicas e de alimentos. Baseia-se na medida da diminuição da concentração de um substrato oxidável durante o tempo, por fluorescência e o seu mecanismo de reação consiste na transferência de um átomo de hidrogênio. Diferenças na velocidade de decaimento relativo da fluorescência em relação aos controles são indicativos de atividades anti ou pró-oxidantes do material testado (Cao e Prior, 1999) (Caldwell, 2003) (Prior *et al.*, 2003).

A fluorescência do substrato diminui na presença de radicais peróxil produzidos pela decomposição térmica do 2,2'-azinobis (-amidinopropano) dihidroclorato (AAPH) em fase aquosa. O período de proteção do substrato contra o AAPH é diretamente ligado à concentração de antioxidante. Mais recentemente, a fluoresceína (FL), um substrato não protéico, substituiu progressivamente a β -ficoeritrina (Cao e Prior, 1999; Caldwell, 2003; Prior *et al.*, 2003).

O método utiliza uma técnica de medida da área sob a curva (*Area Under the Curve-AUC*) para a quantificação, o que permite combinar ao mesmo tempo a percentagem de inibição e a medida do tempo de inibição da ação dos radicais livres pelos antioxidantes, em só um valor (Figura 7). Esse é um dos fatores que torna este um método de referência (Cao *et al.*, 1995; Prior; Wu e Schaich, 2005).

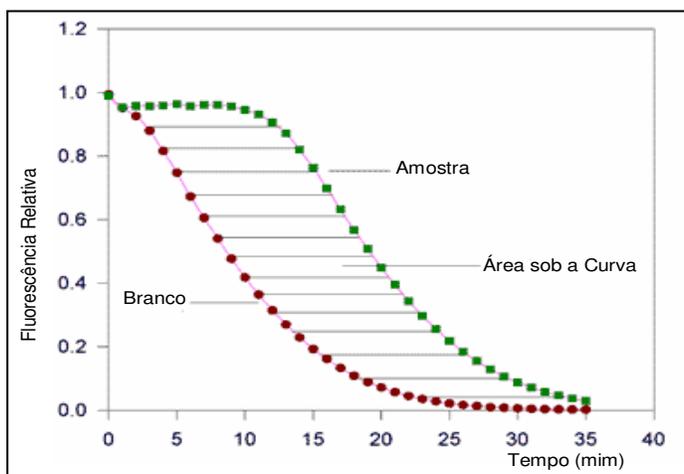
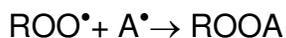
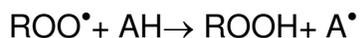
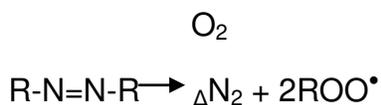


FIGURA 7. Gráfico da Área Sob a Curva.

Enfim, o método ORAC permite estudar a atividade antioxidante em condições particulares de temperatura (37°C), pH (7,4), substrato oxidável e na presença de uma substância que provoque a oxidação (AAPH).

A formação dos radicais a partir do AAPH e o mecanismo reacional podem ser observados segundo esquema a seguir:



2.4 Ensaio Cometa

2.4.1 Características Gerais

O nome mais comum para o ensaio é “Eletroforese em gel de uma única célula”, e embora seja verdade que cada cometa individual é contabilizado para dar

uma medida de danos no DNA , é muitas vezes necessário reunir os resultados de 100 cometas para se obter o nível global de danos de uma população de células. Em suma, uma suspensão de células é misturada com agarose para formar uma fina camada de gel sobre uma lâmina de microscópio. As células são lisadas com detergente (Triton X-100, às vezes com sarcosinato de sódio, embora esta adição não é necessária) para remover membranas celulares e nucleares, ou seja, a liberação de todos os componentes celulares solúveis. A solução de NaCl > 2 M está também presente na solução de lise para remover as histonas do DNA.

Os corpos imersos no gel assemelham-se á núcleos em tamanho e forma e são conhecidos como nucleoides. A organização nucleossomal do DNA é interrompida pela extração das histonas, mas o superespiralamento negativo do DNA (imposta pelas voltas superhelicoidais do DNA em torno do núcleo de histona) sobrevive enquanto o DNA esteja intacto (Azqueta e Collins, 2013).

O modelo da estrutura do nucleóide desenvolvido por Cook e colaboradores (Cook *et al.* 1976) supõe que cada molécula de DNA é ligada em intervalos a matriz nuclear ou armação, de modo que ele pode ser visto como uma série de ciclos, cada um como uma unidade estrutural. Se esse superenrolamento é relaxado em um circuito, por uma quebra da cadeia de DNA então, quando é imposto um campo de eletroforese, este circuito é capaz de prolongar-se para o ânodo. Quanto mais quebras estão presentes, mais circuitos de DNA estão relaxados, e mais DNA aparece na cauda do cometa. Após a coloração com o corante apropriado, a intensidade relativa da fluorescência do DNA da cauda é medida como um índice de frequência da quebra do DNA.

O primeiro relato de um ensaio cometa (embora não referido por esse termo) foi por dois pesquisadores suecos, Östling e Johanson, em 1984 (Ostling e Johanson, 1984) e a lise foi realizada empregando a eletroforese a pH 9.5. Eles estavam bem cientes da formação dos nucleoides e descreveram a migração do DNA para o ânodo como resultante do relaxamento do superespiralamento quando as células foram γ - irradiadas. Alguns anos mais tarde, o método foi modificado

através do aumento do pH de eletroforese para acima de 13 (com NaOH 0.3 M), e este é o ensaio cometa mais amplamente utilizado hoje em dia (Singh *et al.* 1988).

2.4.2 Aplicações e versatilidade do ensaio do cometa

O ensaio cometa foi aplicado a células em cultura, sangue, células retiradas de animais ou de seres humanos, células de hemolinfa de moluscos e insetos, espermatozoides, tecidos animais desagregados, levedura, núcleos liberado de tecidos vegetais, na verdade, qualquer tipo de célula eucariótica que pode ser obtido na forma de uma única célula ou suspensão nuclear parecem ser passíveis de análise através do ensaio cometa. É ainda possível produzir cometas a partir de cromossomos isolados (Cortés - Gutiérrez *et al.* 2011). Assim como quebras de DNA como medida, foram feitas modificações no método para detectar bases danificadas, digerindo o DNA após a lise com um enzima de lesão específica que produz uma quebra de DNA no local do dano. Bases oxidadas e alquiladas foram estudadas neste modo, bem como dímeros de pirimidinae ciclobutanos induzidos por irradiação UV.

Muito rapidamente se percebeu que o teste do cometa poderia ser utilizados para monitorar a reparação do DNA, bem como danos no DNA; de fato , tanto Ostling e Johanson (1984) e Singh *et al.* (1988) seguira a recombinação de quebras de DNA induzida por radiação ionizante. Outra aplicação comum é avaliar a capacidade antioxidante das células, devido à sua resistência às danos causados por espécies reativas de oxigênio (por exemplo, H₂O₂).

Existem quatro principais áreas de investigação em que o ensaio cometa tem sido adotado. Ele é usado em testes de genotoxicidade, para examinar novos medicamentos, cosméticos ou outros químicos com potenciais propriedades carcinogênicas; Os testes pode ser realizados *in vivo* (com análise de vários tecidos do animal experimental) ou *in vitro* utilizando adequada cultura de linhagens celulares. Igualmente popular é a aplicação da biomonitorização humana: para examinar os efeitos no nível de exposição ocupacional ou ambiental a agentes nocivos, para estudar o efeito dos fatores que contribuem para a doença, para investigar as variações individuais, por exemplo, a capacidade de reparação ou

resistência antioxidante do DNA, ou para monitorar as mudanças trazidas pela intervenção dietética como, por exemplo, micronutrientes antioxidantes.

A Ecogenotoxicologia é a terceira área de aplicação usando uma variedade de organismos (mexilhões, vermes, caracóis, plantas e etc.) como indicadores de dano genético por poluentes, quer seja na natureza como em laboratório. Por fim, o ensaio cometa é uma ferramenta valiosa na pesquisa básica em mecanismos de dano e reparo do DNA.

2.4.3 As enzimas usadas para detectar os danos da oxidação do DNA

As informações sobre os danos do DNA determinada pelo ensaio cometa refletem o número de quebras de cadeias simples ou duplas formadas no DNA celular, antes ou durante o processo de eletroforese. Combinar o teste cometa com enzimas de reparo bacterianas para reconhecer o dano específico do DNA, é um passo necessário para permitir a detecção de lesões que não são realmente quebras.

A utilização de enzimas aumenta tanto a sensibilidade do ensaio (em termos de capacidade de detectar uma gama mais ampla de danos no total), e mais importante a sua especificidade. A enzima FPG atua na base 8-oxoGua, e também em anel aberto de purina e derivados, ou formamidopirimidinas, tais como 2,6-diamino -4- hidroxí -5- formamidopirimidina e 4,6- diamino -5- formamidopirimidina. Pirimidinas oxidadas, incluindo timina glicol e uracil glicol, são reconhecidas com a enzima Endo III.

As glicosilases têm um papel associado na atividade de AP liases ou na de AP endonucleases, ou seja, clivar o DNA nos locais - apurínicos/apirimidínicos- (AP) ou as bases deglicosiladas deixadas como reparo de excisão de bases intermediárias após a remoção da base danificada. Mas outros sítios AP, sem relação com danos da oxidação, poderão estar presentes no DNA, e estes, também, são detectados e clivados por FPG ou Endo III. Assim, a especificidade da enzima não é absoluta. Sítios AP - são sítios álcali-lábeis, por isso, em princípio, espera-se que apareça entre as quebras de cadeias, sendo detectados no ensaio

padrão de cometa (alcalino). Mas não foi convincentemente demonstrado que todos os sítios AP são convertidos sob estas condições (Azqueta *et al.*, 2009).

Recentemente, o análogo de mamífero de FPG, OGG1, foi aplicado no ensaio cometa. A especificidade de substrato das três enzimas foi comparada por Smith *et al.* (2006) . As células humanas foram tratadas com metanossulfonato de metila (MMS) ou etilnitrosoureia (ENU), para induzir o dano por alquilação no DNA. Após incubação com MMS, a FPG revelou sítios de enzimas sensíveis no DNA destas células, enquanto que a Endo III produziu cerca de um quarto do número de quebras vistas com a FPG, e a OGG1 foi ineficaz.

Tratar as células com ENU resultou num aumento similar nas quebras de cadeias com ambos FPG e Endo III, mas nenhum aumento em locais de ruptura reconhecidos com a OGG1. Assim OGG1 tem uma especificidade de lesão maior do que qualquer FPG ou Endo III, e é preciso ter cuidado na interpretação dos resultados obtidos com as últimas enzimas. OGG1 pode ser mais específico e pode dar estimativas mais confiáveis de danos da oxidação, mas uma comparação sistemática de OGG1 e FPG aplicada na avaliação dos danos basais causados em, por exemplo, amostras de linfócitos de um ensaio de biomonitoração, ainda tem de ser realizada (Azqueta *et al.*, 2009).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

- Avaliar a eficiência do extrato purificado de fenólicos do açaí (*Euterpe oleracea*) como agente quimiopreventivo do câncer de cólon.

3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a capacidade antioxidante dos padrões fenólicos e do extrato de antocianinas do açaí através dos métodos de ORAC e potencial redox por voltametria cíclica em pH do colón.
- Estudar *in vitro* a influência de padrões de polifenóis sobre bactérias enteropatogênicas e probióticas em teste de micro-diluição com posterior cálculo das concentrações mínimas de inibição (MIC).
- Atividade biológica *in vivo* de diferentes doses do extrato purificado de fenólicos do açaí (*Euterpe oleracea*) em ratos Wistar com carcinogênese de cólon induzida com o uso de 1,2-dimetilhidrazina (DMH), através das seguintes avaliações:
 - ✓ Avaliação bioquímica através das análises de Fosfatase alcalina, Bilirrubina, Colesterol, Creatinina, Gama GT, Transaminase Glutâmico-oxalacética (TGO), Transaminase Glutâmico-pirúvica (TGP), Triglicérides, HDL-Colesterol, Ureia, Ácido Úrico e Amilase Pancreática e dos eletrólitos: sódio, potássio e cálcio em plasma.
 - ✓ Avaliação dos parâmetros hematológicos tais como: hemácias, hemoglobina, plaquetas e linfócitos.
 - ✓ Avaliação histológica do colón: Criptas foci aberrantes (ACF).

- ✓ Avaliação de genotoxicidade pelo uso do ensaio cometa em linfócitos isolados e células do colón, sem tratamento e com o uso de enzimas FPG e Endo III.
- ✓ Funcionalidade da microbiota a partir de análises dos AGCC produzidos no conteúdo cecal por CG-FID.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Obtenção do extrato de açai (*Euterpe oleracea*)

4.1.1 Identificação e coleta das matrizes

O extrato purificado de *Euterpe oleracea* foi gentilmente cedido pela empresa Amazon Dreams S.A., localizada em Belém –PA, incubada na UFPA.

Frutos de palmeiras adultas de *Euterpe oleracea* foram colhidos em Abaetetuba (Pará, Brasil) e identificados de acordo com sua exsicata por um profissional qualificado do Museu Emílio Golgi, fiel depositor para estes vegetais.

4.1.2 Obtenção do extrato e purificação parcial

O processo tecnológico de obtenção do extrato de açai como um todo, foi patenteado em regime de co-titularidade pela UFPA e Amazon Dreams sob o nome “Processo de extração, fracionamento e purificação parcial de compostos bioativos hidrofílicos e lipofílicos de frutos de palmeiras do gênero *Euterpe*.” (PI0906328-7 de 10/09/2009) e não pode, por motivos óbvios de propriedade intelectual, ser detalhado além daquilo que foi repassado.

Após serem transportados até a empresa, os frutos foram selecionados (eliminando aquelas que eram verdes ou que apresentavam qualquer forma de praga), lavados três vezes com água corrente para remoção de poeira e material estranho, sendo a segunda lavagem na presença de 50 ppm de cloro. Os frutos foram então submetidos a um processo de extração hidráulica das camadas mais externas dos frutos utilizando máquinas convencionais para despulpamento do fruto (Rogez *et al.*, 2011).

Em seguida, ocorreu uma etapa de filtração e outra de microfiltração, onde foi separada a borra e minimizados alguns compostos indesejáveis como fibras, lipídios e proteínas. O filtrado foi encaminhado para um processo de purificação

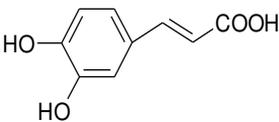
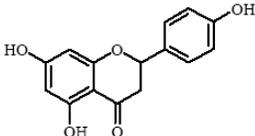
parcial empregando resinas macroporosas sintéticas do tipo SDVB (Estireno Di-Vinil Benzeno) (Silva *et al.*, 2007) e adsorvendo o extrato aquoso em condições específicas de vazão a temperatura ambiente, e desorvendo o extrato com bioetanol e concentrando o dessorbato sob vácuo em concentrador industrial.

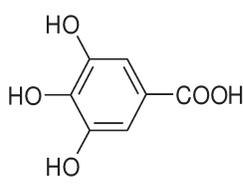
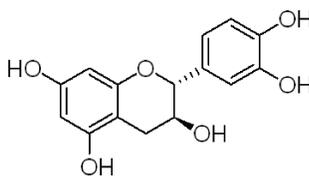
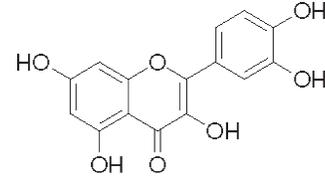
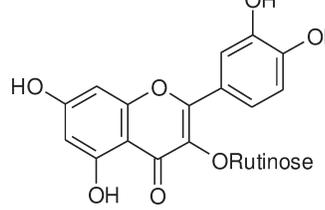
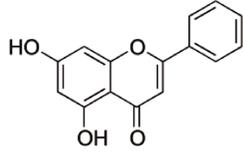
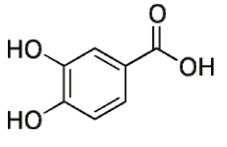
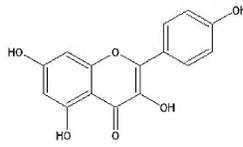
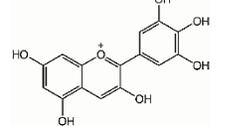
O extrato aquoso purificado foi finalmente congelado a -40 °C por uma noite e liofilizado por 48 horas em liofilizador semi-industrial até secagem quase completa (<2% de umidade residual) e acondicionamento em saco plástico sob vácuo. A liofilização foi feita para minimizar a degradação dos compostos fenólicos até seu uso nas instalações da Universidade Estadual de Campinas/UNICAMP.

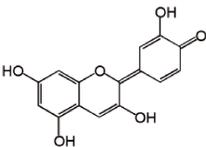
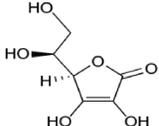
4.2 Definição de padrões

Para que pudesse ser feito um quadro comparativo entre os compostos, foram definidos padrões de fenólicos, presentes e não presentes no açaí. Foram utilizados 12 (doze) padrões de compostos (11 (onze) fenólicos mais o ácido ascórbico como antioxidante de referência), conforme demonstra o Quadro 3, além do extrato purificado de fenólicos do açaí (Amazon Dreams Ltda).

QUADRO 3. Descrição dos padrões de compostos fenólicos utilizados

Composto	Estrutura	Classe	Massa molar (g/mol)	Fabricante
Ácido caféico		Ácido cinâmico	180,16	Sigma-Aldrich
Naringina		Flavanonas	580,53	Sigma-Aldrich
				Continuação

Ácido gálico		Ácido benzóico	170,10	Sigma-Aldrich
Catequina		Flavanóis	290,28	Sigma-Aldrich
Quercetina		Flavonóis	338,2	Sigma-Aldrich
Rutina		Flavonóis	664,60	Sigma-Aldrich
Crisina		Flavona	254,24	Sigma-Aldrich
Ácido Protocatecúico		Ácido hidroxibenzoico	182,17	Sigma-Aldrich
Campferol		Flavonol	286,24	Sigma-Aldrich
Delfinidina		Antocianidina	338,7	Extrasynthese Continuação

Cianidina		Antocianidina	322,7	Extrasynthese
Ácidascórbico		Vitamina C	176,12	Merck

Fonte: Sigma-Adrich Company, disponível em www.sigma-aldrich.com.

4.3 Métodos de avaliação da atividade antioxidante

4.3.1 Método ORAC

O procedimento de ORAC hidrofílico realizado teve como referência o protocolo otimizado por Dávalos e Gómez (2004).

As seguintes soluções foram preparadas:

- Tampão Fosfato de Potássio: pH 7,4;
- Fluoresceína: A concentração estoque de 3,87 mg/mL;
- AAPH: A concentração mãe do radical foi de 108 mg/mL;
- Trolox: Ele foi lido nas concentrações finais de: 0.5, 1.0, 10, 25, 50, 80 e 100 uM a partir do Trolox mais concentrado (1000uM).

Após a adição de todos reagentes na placa, fez-se à leitura da fluorescência a cada 1 minuto, durante 80 minutos. Foram utilizados os seguintes filtros: emissão 520nm e excitação 485 nm. A temperatura no equipamento era de 37°C.

As leituras da fluorescência a cada minuto foram utilizadas no cálculo da AUC, que é a área abaixo da curva, formada no gráfico, onde x corresponde ao

tempo e y ao decaimento da fluorescência. A fórmula utilizada para o cálculo da AUC foi a seguinte:

$$AUC = 1 + f_2/f_1 + f_3/f_1 + f_4/f_1 + f_n/f_1$$

Onde:

f_1 = leitura da fluorescência no tempo 1 minuto

f_2 = leitura da fluorescência no tempo 2 minutos

f_n = leitura da fluorescência no tempo 80 minutos

Foi calculado o AUC para todas as amostras, diferentes concentrações do Trolox e para o Branco. Foi subtraído do AUC do padrão e das amostras, o AUC do branco.

Fez-se um gráfico do padrão Trolox onde o eixo X refere-se ao AUC e o eixo Y à concentração (uM) do padrão na placa. Pela equação da reta, utilizou-se a AUC de cada amostra para que fosse encontrada a concentração de Trolox. O resultado final foi expresso mmol eqTrolox/mg do padrão.

4.3.2 Voltametria Cíclica

A técnica eletroquímica utilizada neste trabalho foi a voltametria cíclica, que fornece importantes informações tanto qualitativas como quantitativas sobre as velocidades e os mecanismos de processos de oxidação/redução. Os voltamogramas obtidos foram diretamente medidos através das curvas da corrente obtida (I) versus potencial (E).

O protocolo utilizado por Kilmartin *et al.* (2001) foi utilizado para avaliar o potencial redox por voltametria cíclica. Esta análise foi realizada com as soluções de padrões dos compostos fenólicos (concentração de 1mM) diluídos em dois diferentes meios: tampão fosfato de potássio pH 7,4 e tampão pH 5,5 (concentração de 75 mM). Essa faixa foi escolhida, pois o cólon permite essa variação de pH (Nugent *et al.*, 2001). Os sais utilizados para o preparo dos tampões

desempenharam o papel de eletrólitos não sendo necessária adição de outra solução.

As soluções dos padrões de: campferol, cianidina, delfinidina, naringina e crisina precisaram ser diluídas em 10% de metanol.

Os eletrodos utilizados foram: carbono vítreo (disco de 3 mm) como eletrodo de trabalho sendo polido com alumina 0,3 μ m antes de cada leitura; Ag/AgCl como eletrodo de referência e de platina como eletrodo auxiliar. Foi usado o ferrocianeto de potássio e ferricianeto de potássio (Ferri-ferroso) antes do início da leitura para observar se o eletrodo estava ativo.

Para verificar se o eletrodo estava ativo foi usada a solução de ferricianeto/ferricianato de potássio (5mM) com o cálculo do E^0 (0,7) antes do início das leituras.

Os voltamogramas cíclicos foram obtidos através de um Potenciostato/Galvanostato PGSTAT 128 (Metrohm Autolab, Holanda) a uma taxa de varredura de 100 mV/s e a varredura foi feita de -100 mV a 1200 mV e repetida 10 vezes em sequência, sendo escolhidas 3 varreduras (“scans”) para ilustrar os gráficos.

O software utilizado foi o GPES manager 4.9. Posteriormente os valores de potenciais obtidos foram tratados no software Origin 9.1 32 bits, a fim de obter os gráficos.

4.4 Teste de atividade antimicrobiana em microplacas

Os compostos fenólicos foram testados *in vitro* contra as cepas bacterianas de referência para avaliar a sua atividade inibitória, utilizando-se o método de caldo de micro-diluição adaptado de Gabrielson *et al.* (2002). Essa metodologia em microplacas permite que grandes quantidades de dados sejam gerados rapidamente em um único procedimento de ensaio.

Foi calculada a concentração inibitória mínima (“Minimum inhibitory concentration” - MIC) onde a mesma foi definida como a menor concentração que inibe o crescimento das bactérias por N 90% que é comprovado visualmente com a utilização do corante. Foi utilizado o DMSO (dimetilsulfóxido) na diluição dos padrões de compostos fenólicos, pois se sabe que o mesmo não afeta o crescimento ou a viabilidade dos organismos testados na concentração que foi utilizado (2,5%) (Parkar *et al.*, 2008).

A concentração máxima utilizada foi de 1000 µg/ml. A concentração de 50 a 1000 µg/ml é a aproximada que se encontra no cólon (Parkar *et al.*, 2008) e o meio escolhido para diluição foi o próprio meio de cultura, o caldo Mueller- Hinton (Oxoid®), mais o DMSO na seguinte proporção: 48,75ml de + 1,25 ml (2,5%) DMSO (CLSI, 2005).

Os micro-organismos testados foram os Enteropatógenos: *Escherichia coli* (11775ATTCC); *Staphylococcus aureus* (6538 ATTCC); *Salmonella tiphimurium* (14028 ATTCC); *Pseudomonas aeruginosa* (13388 ATTCC) e *Enterococcus faecium* (CCT 5079) e os probióticos: *Lactobacillus rhamnosus* (ATCC 7469) e *Bifidobacterium animalis subsp. Lactis Bb12®*.

Os meios de cultura utilizados foram para o *L. Rhamonosus*: MRS (24h/ 37°C) pois o mesmo cresce em ambiente de aerobiose. Para a bifidobactéria BB12 : MRS + 0,3% L-cisteína (48h/37°C) em sistema de anaerobiose e para as outras cepas o meio utilizado foi o caldo de Mueller Hinton (24h/ 37°C) em aerobiose

A leitura foi realizada a 625 nm UV- visível absorbância entre 0,08-0,1 para 108UFC/ml e a diluição na placa foi de 10⁵ UFC/ml. O corante utilizado foi o cloreto 2,3,5 trifenil-tetrazólio (Merck).

4.5 Modelo de carcinogênese de cólon induzida por DMH em ratos

4.5.1 Animais e tratamento

Foram utilizados ratos machos da linhagem Wistar SPF, provenientes do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB/UNICAMP), aclimatados às condições do biotério por pelo menos sete dias antes da manipulação experimental. Os animais pesavam em média $340\text{g} \pm 33\text{g}$ e tinham 12 semanas. Os ratos foram mantidos em gaiolas de policarbonato, sendo fornecida ração comercial (Nuvilab) e água ad libitum, temperatura controlada de $22 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$, umidade de 55 ± 10 e ciclos claro/ escuro (12 h/ 12h) controlados. Os animais foram pesados e distribuídos aleatoriamente em 8 grupos de 6 animais cada e posteriormente pesados a cada semana. O experimento teve duração de 4 semanas (28 dias).

Ao fim do experimento os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal de cloridrato de ketamina (0,1 mg/g) e de xilazina (0,1 mg/g) e o sangue colhido através de punção cardíaca, exceto para o hemograma que colheu-se por punção orbital a fim de diminuir o risco de coagulação.

A manipulação dos animais ocorreu em conformidade com as normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e os procedimentos experimentais adotados neste trabalho foram aprovados pela Comissão de Ética no uso de animais (CEUA) do Instituto de Biologia da UNICAMP, sob o número de protocolo 2655-1.

4.5.2 Cálculo da dosagem do extrato

Foi utilizado o extrato de açaí (*Euterpe oleracea*) purificado, cedido pela Amazon Dreams® contendo 16.413 mg de antocianinas/100g de extrato e a quantidade de polifenóis totais foi de 47.473 mg Eq. ácido gálico/100g (48% MS) (laudo analítico em anexo). Segundo Clifford (2004) a ingestão de compostos

fenólicos pelo homem de acordo com os diferentes tipos de dieta pode variar de 0,1-2g/dia.

Levando-se em consideração que um homem médio possui 70Kg, as concentrações utilizadas foram de 30 e 50 mg/kg, valores dentro da ingestão média (1g e 1,5g de polifenóis /dia que equivaleria também a cerca de 300 ml e 500 ml de açaí médio) e ainda extrapolando essa concentração na intenção de um possível uso nutracêutico desse extrato (6g de polifenóis/dia), usou-se a concentração de 180 mg/kg e de peso.

4.5.3 Planejamento experimental

Foi administrado diariamente o extrato de açaí sob gavagem nas diferentes concentrações de estudo e administrada apenas solução fisiológica (NaCl 0,9%) nos grupos controle a fim de promover o mesmo estresse ao qual os animais foram submetidos ao longo de todo o experimento.

Também foi realizada administração subcutânea do agente indutor de carcinogênese de colón 1,2-Dimetilhidrazina (DMH) (Sigma-Aldrich®) na concentração de 20mg/Kg, totalizando 80 mg/Kg em 4 doses (2 vezes/semana). Foi utilizado 1mM de EDTA como veículo e ajustado o pH a 7.4 antes da administração (Sengotuvelan *et al.*, 2010).

A distribuição dos grupos experimentais foi realizada de acordo com o Quadro 4.

QUADRO 4. Distribuição dos Grupos experimentais

	Tratamento aplicado	
	Oral (gavagem)	Subcutâneo
Grupo 1 Controle Negativo	Solução fisiológica	EDTA
Grupo 2 Controle Positivo	Solução fisiológica	DMH/EDTA
Grupo 3	Extrato 30mg/Kg	EDTA
Grupo 4	Extrato 50 mg/Kg	EDTA
Grupo 5	Extrato 180 mg/Kg	EDTA
Grupo 6	Extrato 30mg/Kg	DMH/EDTA
Grupo 7	Extrato 50 mg/Kg	DMH/EDTA
Grupo 8	Extrato 180 mg/Kg	DMH/EDTA

4.5.4 Análises Histológicas

4.5.4.1 Preparação das amostras de tecido do colón

Foi feita no momento da necropsia a retirada do intestino grosso e posteriormente corte longitudinal contrário aos ligamentos mesentéricos (Figura 8) e lavagem com solução fisiológica para retirada dos resíduos fecais. Cortou-se um segmento de cerca de 2 cm (porção média) para avaliação de criptas foci.



FIGURA 8. Fotografia do corte longitudinal da porção média do colón para realização de análise de focos de criptas aberrantes.

4.5.4.2 Análise de Focos de Criptas Aberrantes

A identificação das criptas aberrantes seguiu o método proposto por Bird (1987), que consiste da análise microscópica (40x) da mucosa do cólon de rato, corada com azul de metileno. A observação foi feita diretamente no tecido distendido sobre uma lâmina de vidro, do segmento que foi retirado e fixado com formol a 10% durante 24 horas, não havendo necessidade de processamento do material e inclusão em parafina. A coloração foi feita com 0,5% Azul de Metileno diluído em PBS por 1 min.

As criptas aberrantes foram identificadas por seu tamanho aumentado, aspecto mais escuro, abertura luminal variando desde circular até alongada ou tortuosa, e pela camada de células epiteliais mais espessas em relação às normais circunvizinhas (Fenoglio-Preiser e Noffsinger, 1999).

4.5.5 Ensaio Cometa

4.5.5.1 Separação Linfócitos para o Ensaio Cometa

Utilizou-se o sangue colhido em tubo com o He-Li (cerca de 2ml).depois passou-se para o tubo Falcon já contendo 2ml da solução Histopaque® - 1083. Adicionou-se osangue heparinizado (1:1) e centrifugou-se por 30 min (400g/20 C) 1700 rpm. Após Retirou-se a camada de linfócitos e passou-se para outro tubo

Falcon e adicionou-se a solução de HBSS (1X). Posteriormente efetuou-se outra centrifugação afim de retirar o resíduo do Ficoll (Histopaque®) 400g/ 15min. Descartou-se o sobrenadante e depois transferiu-se o pellet de linfócitos para um tubo do tipo eppendorf®.

4.5.5.2 Separação de Células do Colón para o Ensaio Cometa

As amostras de colón foram coletadas no momento da necropsia no final do experimento. Uma parte do colón mediano cerca de 2cm, foi retirada e submetida a lavagem com solução fisiológica para retirada dos resíduos fecais. Posteriormente foi adicionada em uma solução gelada para separação de células utilizando um bisturi cirúrgico. Esta solução era composta de: 20mM de EDTA em HBSS (livres de Ca⁺² e Mg⁺²) pH 7.5, 10% de DMSO (adicionada imediatamente antes do uso) para que formasse uma camada de suspensão celular. Os tecidos foram processados o mais rápido possível após o início da necrópsia para não prejudicar a viabilidade celular (Cammerer *et al.*, 2011).

4.5.5.3 Teste de viabilidade celular com tripan blue

Á suspensão de células (0,9 ml) foi acrescido azul tripan (0,1 ml a 0,2%). Em seguida, uma gota da suspensão foi colocada entre lâmina e lamínula e realizada a contagem percentual na leitura foram consideradas mortas (inviáveis) as células que incorporavam o corante e, vivas as que excluíram o azul tripan. Foram utilizadas apenas suspensões com viabilidade celular superior a 80%.

4.5.5.4 Avaliação dos danos ao DNA

Para visualização dos danos ao DNA, as lâminas foram observadas em microscópio de fluorescência (filtro de 516-560nm, barreira de filtro 590nm e aumento total de 400x). As células (nucleóides) foram classificadas de acordo com o tamanho da cauda em cinco classes (Figura 9):

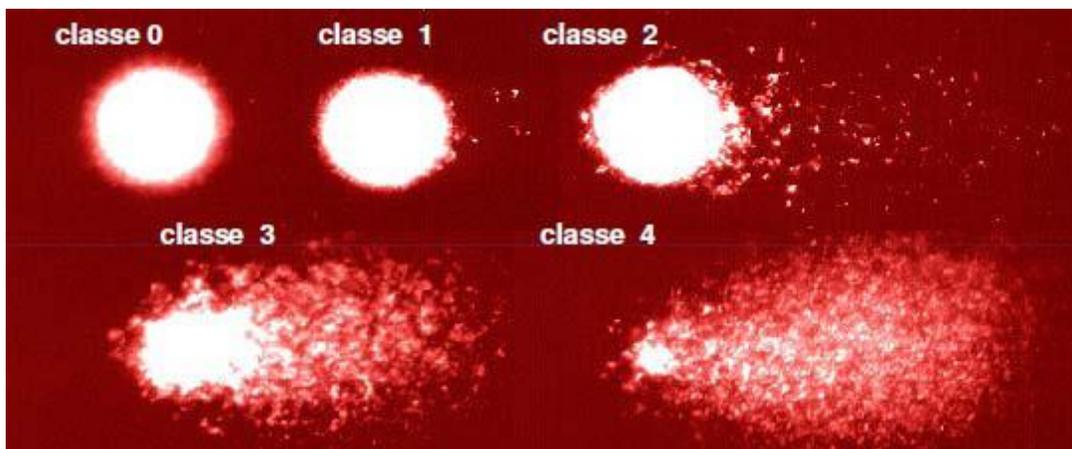


FIGURA 9. Classificação das classes de danos ao DNA pelo ensaio cometa *in vivo*, onde: classe 0: sem dano; classe 1: dano pequeno; classe 2: dano médio; classe 3: dano significativo; classe 4: dano máximo.

FONTE: COLINS *et al.*, 1994

Cometas sem cabeças foram excluídos da avaliação, pela probabilidade de representarem células apoptóticas, ou seja, células mortas (Hartmann e Speit, 1997). Após a leitura, realizou-se o escore de cada tratamento multiplicando-se o número de núcleos observados em cada classe pelo valor da classe (0, 1, 2, 3 ou 4), somando-se os resultados e obtendo-se o escore total de cada tratamento (Speit e Hartmann, 1999).

O escore foi calculado de acordo com a seguinte equação (Collins *et al.*, 1996) (Miyamae *et al.*, 1998).

Escore total do cometa "Total Comet Score (TCS)":
 $(\% \text{ células na classe 0}) \times 0 + (\% \text{ células na classe 1}) \times 1 + (\% \text{ células na classe 2}) \times 2 + (\% \text{ células na classe 3}) \times 3 + (\% \text{ células na classe 4}) \times 4$

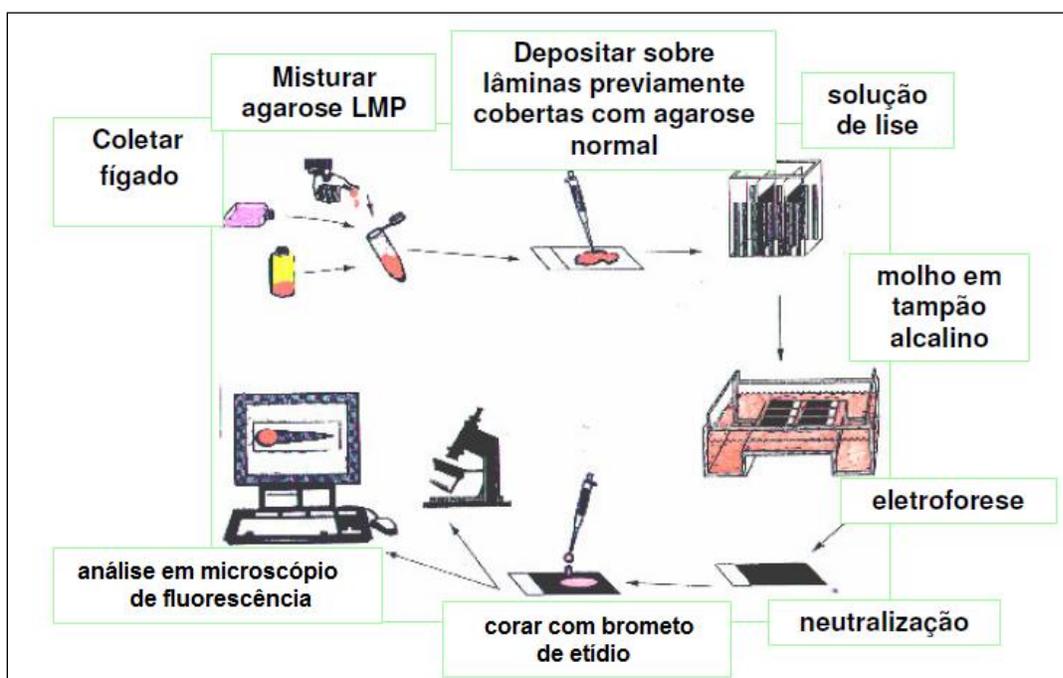


FIGURA 10. Representação esquemática das etapas experimentais do ensaio cometa da coleta de material até a leitura ao microscópio de fluorescência.

4.5.6 Análise de AGCC por cromatografia gasosa

4.5.6.1 A preparação das amostras

A metodologia utilizada foi adaptada de Campbell, Fahey e Wolf (1997). Para a análise de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) foi retirado 0,4 grama de conteúdo cecal imediatamente após o sacrifício do animal. Essa amostra foi acidificada com 0,8 ml de solução de ácido m- fosfórico a 40% (Sigma- Aldrich®) e 2,8 ml de água destilada. Esta mistura foi centrifugada a 3.500 rpm, durante 20 minutos e depois o sobrenadante foi retirado e congelado a -80 °C. Em seguida, as amostras foram descongeladas, brevemente centrifugada e filtradas (0,2 um). O sobrenadante foi utilizado na análise por GC / FID.

4.5.6.2 Condições do GC/ FID

O composto volátil foi analisada utilizando um GC Agilent (modelo 7890A) equipado com um detector de ionização de chama (FID) e Nukol [™] coluna capilar GC (30m x 0,25 mm id , x 0.25µm de espessura de filme). A injeção foi realizada no modo split (1:50) a 220 ° C. A temperatura do forno foi programada para se manter a 100 ° C durante 5 min, em seguida aumentar para 200 ° C a taxa de 8 ° C.min⁻¹, e mantida durante 4 minutos à temperatura final (tempo total de corrida de 19,5 minutos). O gás Hélio foi utilizado como gás transportador com a velocidade de 30 mL.min⁻¹. Injetor e do detector foram mantidos a 220 °C.

Uma mistura de ácidos graxos livres (Supelco, EUA) foi injetada sob o as condições de programação acima de temperatura, e foi calculado o índice de retenção (I) dos AGCC.

4.5.7 Análises Bioquímicas e Hemograma

Foram realizadas as análises bioquímicas de Fosfatase alcalina, Bilirrubina, Colesterol, Creatinina, Gama GT, Transaminase Glutâmico-oxalacética (TGO), Transaminase Glutâmico-pirúvica (TGP), Triglicérides, HDL- Colesterol, Ureia, Ácido Úrico e Amilase Pancreática. Em analisador químico Reflotron Plus (Roche) em soro ou plasma de acordo com as instruções do fabricante.

Além disso, foram analisados os eletrólitos sódio, potássio e cálcio no soro em o analisador de eletrólitos Electrolyte Analyzer (Roche) utilizando kits de ensaio.

Finalmente o sangue total heparinizado foi submetido à análise de hemograma completo em analisador hematológico PochH-100iV Diff.

4.6 Análises Estatísticas

Para descrever o perfil da amostra segundo as variáveis em estudo foram realizadas análises estatísticas descritivas das variáveis contínuas (peso, bioquímica, cromatografia, cometa e hemograma), com valores de média, desvio padrão, valores mínimo e máximo, mediana e quartis.

Para comparar as variáveis contínuas entre os 8 grupos foi utilizada a análise de variância simples (One Way ANOVA), seguida do teste post-hoc de Tukey de comparações múltiplas, com as variáveis transformadas em postos (ranks) devido à ausência de distribuição Normal das variáveis.

Para comparação das variáveis numéricas entre os 8 grupos, entre os 2 locais (sangue e cólon) e entre os 3 tratamentos, foi utilizada a análise de variância para medidas repetidas (ANOVA for repeated measures), seguida do teste de comparação múltipla de Tukey para comparar os grupos em cada local e tratamento, e do teste de perfil por contrastes para comparar os parâmetros entre os locais e tratamentos, em cada grupo. Devido à ausência de distribuição Normal, as variáveis foram transformadas em postos (ranks). A mesma análise foi utilizada para a avaliação dos pesos longitudinais.

O nível de significância adotado para os testes estatísticos foi de 5%, ou seja, $p < 0.05$.

Para a realização das análises foi utilizado o programa computacional The SAS System for Windows (Statistical Analysis System), versão 9.2.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Capacidade antioxidante ORAC

A Tabela 2 mostra que o ácido gálico obteve o menor valor de capacidade antioxidante pelo método ORAC ($2,54 \pm 0,34$ mmol eq.Trolox/mg) em geral os flavonóides têm predominância no topo da classificação, indicando que essa classe tem maior potencial antioxidante que os ácidos fenólicos. Esse fato é explicado pela estrutura química dos flavonóides, nos quais: 1) a presença de mais grupos hidroxilas leva a uma maior possibilidade de doar átomos de hidrogênio, e 2) o maior número de ligações duplas, é responsável por um maior deslocamento de elétrons (Rice-Evans; Miller e Paganga, 1996).

TABELA 2. Resultados de capacidade antioxidante pelo método ORAC dos padrões de compostos fenólicos e extrato purificado de açaí.

ORAC	mmol eqTrolox/mg
Delfinidina	$168,02 \pm 5,40$
Cianidina	$98,04 \pm 2,52$
Campferol	$83,84 \pm 6,22$
Ác. Ascórbico	$56,63 \pm 0,56$
Ác. Cafeíco	$45,64 \pm 2,45$
Catequina	$43,33 \pm 0,62$
Quercetina	$39,35 \pm 2,71$
Rutina	$23,72 \pm 1,34$
Ác. Protocatecúico	$10,19 \pm 0,55$
Crisina	$8,14 \pm 0,03$
Extrato Purificado de açaí	$8,35 \pm 1,34$
Naringina	$4,87 \pm 0,02$
Ác. Gálico	$2,54 \pm 0,34$

As antocianidinas encontram-se no topo da tabela, pois as antocianinas possuem uma estrutura química adequada para a ação antioxidante, sendo capaz de doar elétrons ou átomos de hidrogênio para radicais livres (Prior, 2003), essa ótima atividade antioxidante está relacionada com a presença de grupos hidroxilas na posição 3 e 4 do anel B, os quais conferem uma elevada estabilidade ao radical formado. Os grupos hidroxilas livres na posição 3 do anel C e 5 do anel A, junto com o grupo carbonila na posição 4 são doadores de elétrons. Além disso, a presença de açúcares na molécula reduz a atividade oxidante, por isso o valor mais alto das moléculas não-glicosiladas (Kuskoski *et al.*, 2004). Isso é observado quando se faz a comparação da cianidina com o extrato purificado de açaí que é rico em antocianinas.

O extrato purificado de açaí obteve valor de aproximadamente onze vezes menor que o do composto padrão de cianidina, sendo que as cianidinas 3 e 5 glicosídeos são as antocianinas majoritárias encontradas no açaí (Rogez, 2000) e 20 vezes menor que o padrão de definidina.

O método ORAC apresentou uma larga gama de variação entre compostos, devido as variedades estruturais entre os compostos fenólicos e pequenos desvios.

5.2 Voltametria Cíclica

Como já dito anteriormente constata-se que, no geral, os flavonóides têm predominância nos valores de classificação, indicando que essa classe tem maior potencial antioxidante que os ácidos fenólicos. Os processos de oxidação são complexos e dependentes do pH devido a forte influência do meio reacional da técnica analítica na reatividade dos compostos.

A fim de esclarecer os mecanismos de oxidação foi realizada análise de voltametria cíclica e como se pode observar na tabela 2 os valores dos potenciais anódicos (oxidação) são sempre maiores em pH 5,5 do que em pH 7,4.

A relação entre o potencial de oxidação e o poder antioxidante dos flavonoides é de quanto mais baixo for o potencial de oxidação maior é o seu poder antioxidante, ou seja. Quanto menor o valor de E_p de uma amostra, maior é sua capacidade de doar elétrons (sofrer oxidação). No meio básico, todos os ácidos fenólicos apresentaram as maiores atividades antioxidantes, que é o pH mais comumente encontrado no intestino grosso.

Dessa forma, Galato *et al.* (2001) determinaram a capacidade antioxidante de compostos fenólicos e outros compostos relacionados, em comparação com a espectroscopia e potenciometria. Os autores observaram que quanto maior o número de hidroxilas ligadas ao anel aromático dos compostos analisados, maior era sua atividade antioxidante.

O ácido gálico ainda obteve um segundo pico de oxidação (adicional) no valor de 845 mV, este pico correspondendo à oxidação do grupo 3' hidroxilo do anel.

A estrutura química dos compostos fenólicos é especialmente adequada para que ocorra com facilidade a oxidação dos compostos fenólicos (doação de e^-) que é de grande importância para a sua eficiência como antioxidante daí o estudo dos seus potenciais redox.

TABELA 3. Resultados obtidos na análise de voltametria cíclica de compostos fenólicos e do extrato purificado de polifenóis do açaí em Tampão fosfato de potássio pH 7,4 e tampão pH 5,5 (75mM). ET- Carbono vítreo; EA- platina e ER- Ag/AgCl . Taxa de varredura de 100 mV/s.

COMPOSTO	pH	Tipo de Pico	Ep1 (mV)	I (μ A)	Epa+Epc/2 (mV)	Δ Ep (Epa-Epc) (mV)
Ácido ascórbico	pH 5	Pa	366	0,010		
		Pc				
	pH7,4	Pa	367	0,010		
		Pc				
Ác. Cafeíco	pH5	Pa	458	0,027	306	304
		Pc	154	-0,017		
	pH7,4	Pa	374	0,013		
		Pc				
Ác Gálico	pH 5	Pa	461	0,015	403	117
		Pc	344	-0,001		
	pH7,4	Pa				
		Pc				
Ácido Protocatecuico	pH 5	Pa	545	0,025	344	403
		Pc	143	-0,017		
	pH7,4	Pa	500	0,016	270	460
		Pc	40	-0,016		
Campferol	pH 5	Pa	379	0,001	354	50
		Pc	329	-0,001		
	pH7,4	Pa	262	0,001	221	81
		Pc	181	-0,001		
Catequina	pH 5	Pa	443	0,002	292	302
		Pc	141	-0,003		
	pH7,4	Pa	265	0,001	157	217
		Pc	49	-0,002		

Delfinidina	pH 5	Pa	ND			
		Pc				
	pH7,4	Pa	555	0,002		555
		Pc				
Quercetina	pH 5	Pa	312	0,002		312
		Pc				
	pH7,4	Pa	206	0,003		206
		Pc				
Cianidina	pH 5	Pa	421	0,002	342	158
		Pc	263	-0,001		
	pH7,4	Pa	309	0,003	209	200
		Pc	109	-0,001		
Rutina	pH 5	Pa	414	0,002	379	70
		Pc	344	-0,001		
	pH7,4	Pa	292	0,002	263	57
		Pc	235	-0,001		
Crisina	ND					
Naringina	ND					
Extrato purificado de fenólicos do acai	pH 5	Pa	568	0,002	455	228
		Pc	340	-0,002		
	pH7,4	Pa	479	0,002	392	176
		Pc	303	-0,002		

Legenda: ND: Não detectado; Pa: Pico anódico; Pc: Pico catódico; Ep1 (V) Potencial Oxidação do pico 1; I (Y/0.001) (µA) intensidade da corrente; Epa+Epc/2 potencial de meia-onda; ΔEp - Diferença de Potencial;

O grau de reversibilidade evidenciado por cada uma das curvas apresentadas na Figura 11, seleccionadas de entre as obtidas para cada composto, pode ser avaliado pelaos picos catódico e anódico, ΔEp. Quanto menor é este valor, mais reversível é o processo. No caso em que ocorre a transferência de apenas um elétron o valor de Delta é de: $\Delta E_p = E_{pa} - E_{pc} \approx 59 \text{ mV}$, sendo o mais próximo desse valor o encontrado para a Rutina que foi de 57 mV.

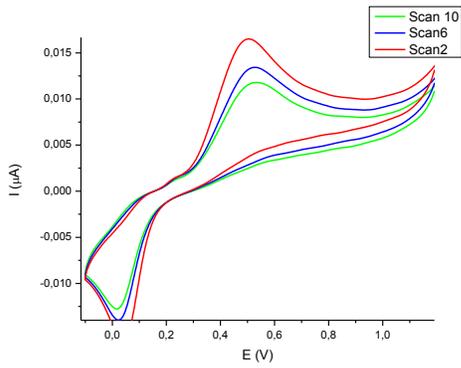
Pode ver-se que o ácido ascórbico reagiu mais cedo do que o grupo de compostos fenólicos. Estes ácidos fenólicos e flavonóides contém grupo orto - difenol facilmente oxidável, e incluem o ácido caféico , o ácido gálico , catequina e epicatequina , com a rutina aparecendo em cerca de 414 mV. Os valores indicados na Tabela 1 são consistentes com estudos anteriores da literatura, tendo em conta os esperados 59 mV de mudança nos potenciais por unidade de pH diminuída (Kilmartin *et al.*, 2001)

Existe uma dificuldade em medir a transferência química de elétrons em alimentos, que tem em geral composição complexa. Os produtos vegetais em geral possuem valores de potenciais redox positivos (+ 300mV a + 400mV) (Bernadete e Landgraf, 1996) valores esses próximos da faixa encontrada para os padrões fenólicos dentro dos parâmetros estudados que foi de 157 a 455 mV (Tabela 3) .

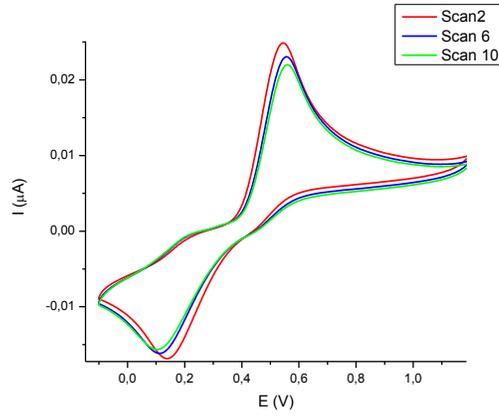
Devido à alta tensão de oxigênio e mais a presença de diversos compostos encontramos no colón um ambiente com oxigênio restrito (não totalmente anaeróbico) e nesse ambiente que crescem muitas classes de bactérias. As bactérias microaerófilas necessitam de um meio ligeiramente reduzido, temos como exemplo de classe desses micro-organismos os Lactobacilos e já para as anaeróbias facultativas como as do gênero *enterobacteriaceae* o ambiente é mais abrangente, podendo ser tanto reduzido como também oxidado. Ocorre uma grande competição nesse ambiente entre as bactérias benéficas, os probióticos, e os enteropatógenos (Bernadete e Landgraf, 1996).

Nesse sentido que os compostos fenólicos podem atuar na mudança de potencial redox, coma a doação de elétrons, reduzindo o meio intestinal e portanto favorecendo o crescimento de micro- organismos probióticos como os lactobacilos e bifidobactérias que em sua maioria são organismos microaerófilos.

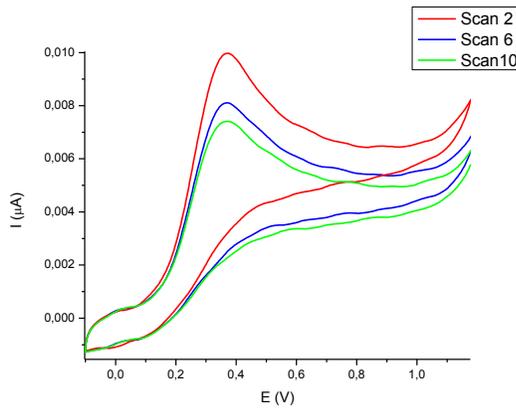
A.1) Ácido Protocatecuico pH 7.4



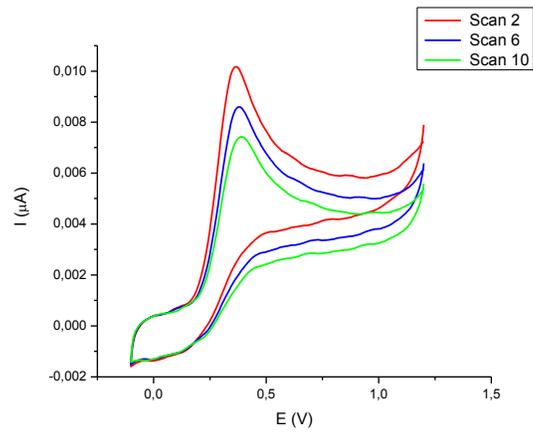
A.2) Ácido Protocatecuico pH 5.5



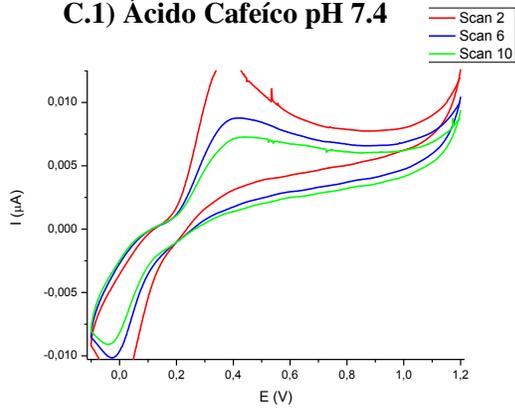
B.1) Ácido ascórbico pH 7.4



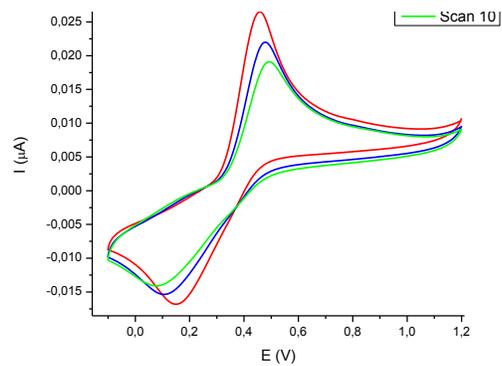
B.2) Ácido ascórbico pH 5.5



C.1) Ácido Cafeico pH 7.4



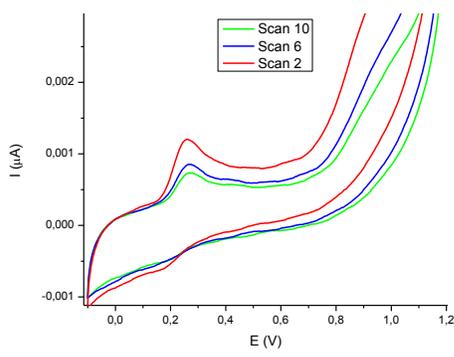
C.2) Ácido Cafeico pH 5.5



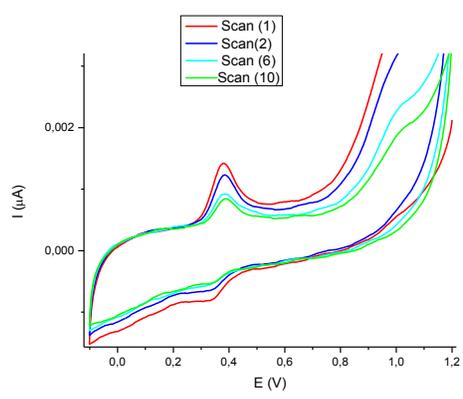
D.1) Campferol pH 7,4

D.2) Campferol pH 5,5

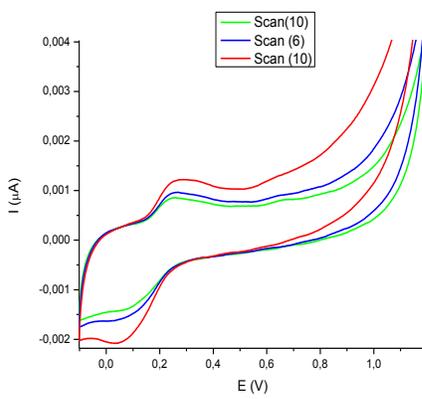
Cont.



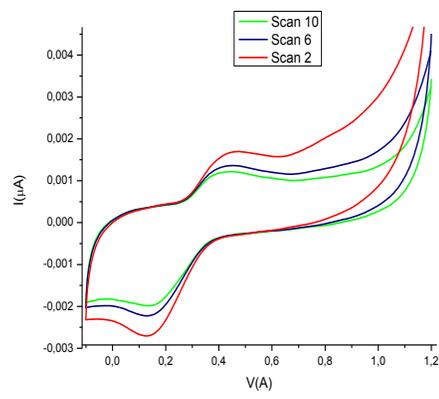
E.1) Catequina pH 7,4



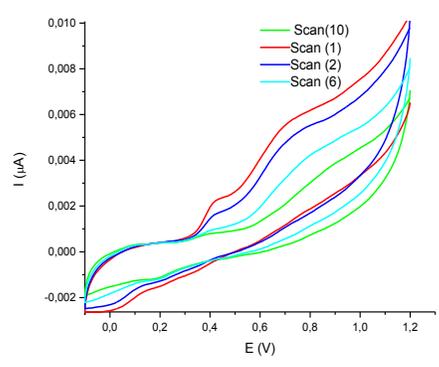
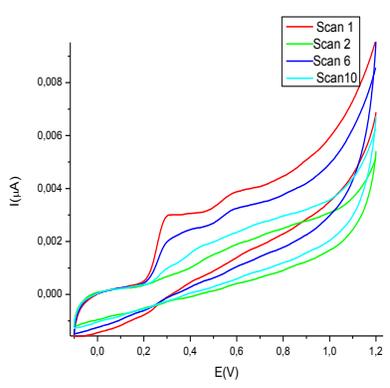
E.2) Catequina pH 5,5



F.1) Cianidina pH 7,4

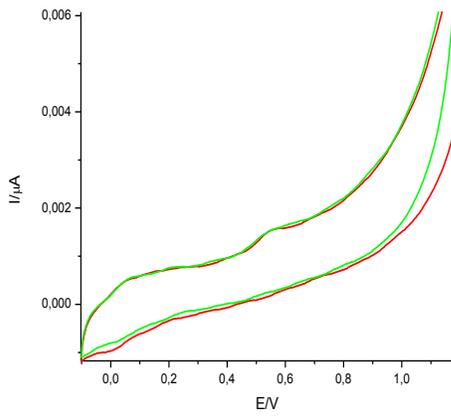


F.2) Cianidina pH 5,5

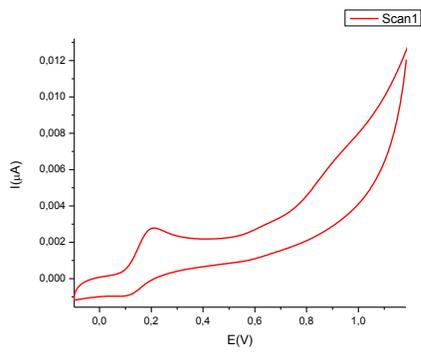


Cont

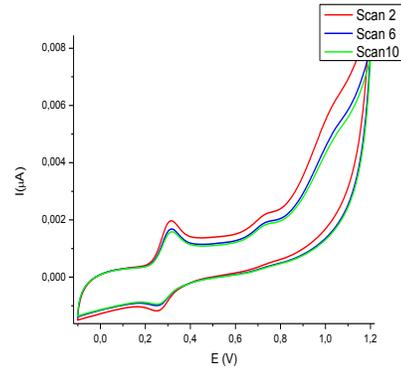
G.1) Delfinidia pH 7,4



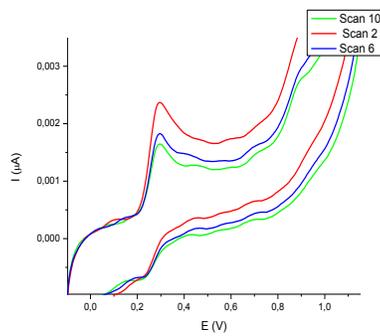
H.1) Quercetina pH 7,4



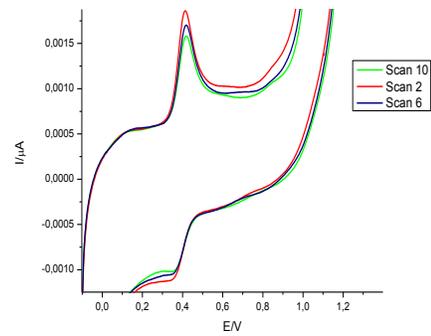
H.2) Quercetina pH 5,5



I.1) Rutina pH 7,4

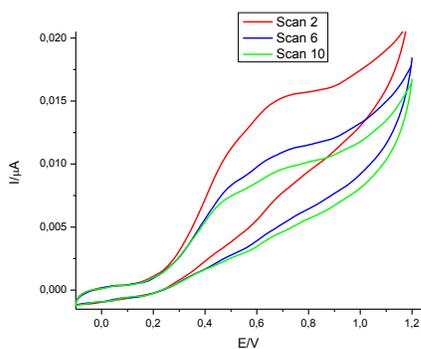


I.2) Rutina pH 5,5

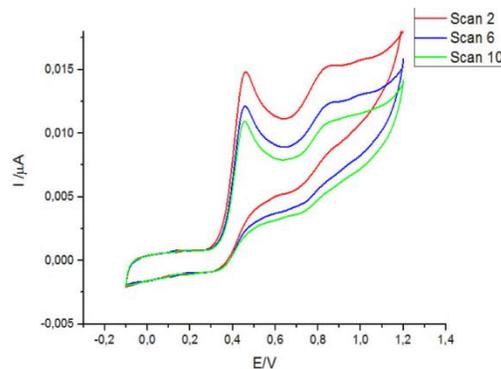


Cont

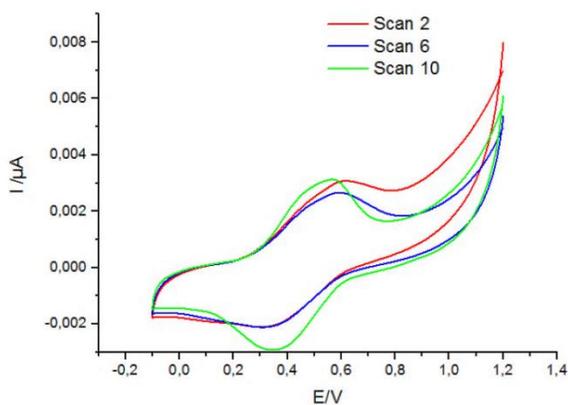
J.1) Ácido Gálico pH 7,4



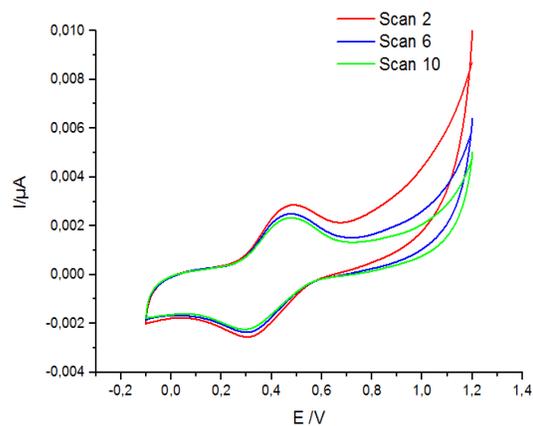
J.2) Ácido Gálico pH 5,5



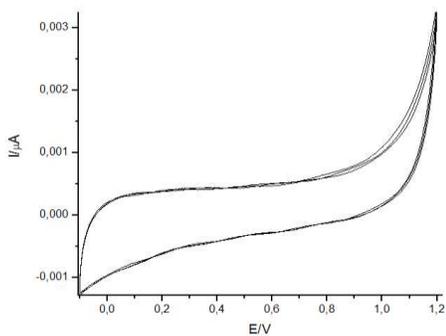
K.1) Extrato purificado de açaí pH 7.4



K.2) Extrato purificado de açaí pH 5,5



L.1) Tampão pH 7.4



L.2) Tampão pH 5.5

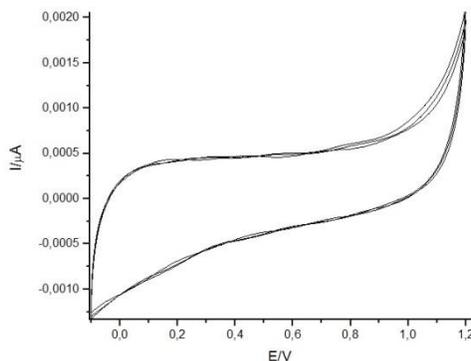


FIGURA 11. Voltamogramas obtidos através de voltametria cíclica em Tampão fosfato de potássio pH 7,4 e tampão pH 5,5 (75mM). ET- Carbono vítreo, EA-platina e ER-Ag/AgCl . Taxa de varredura de 100 mV/s.

5.3 Concentração Inibitória Mínima

Foi observado efeito inibitório para as cepas de *E. coli* e *S. aureus*. No entanto para as cepas de *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterococcus faecium*, não houve MIC dentro da faixa estudada para todos os compostos. Se expressa esse resultado como > 1000 µg/ml, ou seja, se há algum efeito no crescimento o mesmo está acima dos valores estudados e não é considerado como substância com atividade inibitória.

Para as cepas probióticas BB12 e *L. rhamnosus* foi observado crescimento através concentração de biomassa no fundo do poço em todas as concentrações testadas, não observado através da cor, pois o corante utilizado não era específico para essas cepas. Não houve MIC dentro da faixa estudada. Efeito esse positivo, pois não é interessante o consumo de compostos que inibam o crescimento das bactérias benéficas, chamadas probióticos, já que as mesmas atuam competindo e evitando a adesão e invasão intestinal por micro-organismos patogênicos.

Houve cálculo de valores de MIC apenas para os ácidos fenólicos (gálico e cafeíco), ácido ascórbico, possível interferência no pH do meio e também para a delphinidina como pode ser observado na Tabela 4.

O enteropatógeno gram-positivo *S. aureus* foi o mais sensível aos polifenóis seguido do patógeno e também comensal Gram-negativo *E. coli*, resultado esse que está de acordo com Parkar *et al.* (2008). Uma tendência semelhante também foi observada num estudo anterior em que as diferentes espécies de *Staphylococcus* foram testadas e foram 8-16 vezes mais sensíveis para epigallocatequina galato (EGCG), a maior catequina constituinte do chá, do que bacilos Gram-negativos, tais como *E. coli* e *Salmonella typhi* (Yoda *et al.*, 2004).

TABELA 4. Resultados da Análise de efeito inibitório de crescimento bacteriano por microdiluição.

Compostos	E. coli		S. Aureus	
	µg/ml			
	Série	Faixa	Série	Faixa
Ácido ascórbico	1000	>1000	>1000	>1000
Ácido Gálico	125 a 250	125 * (feito até 500)	125 a 250	75 (feito até 500)
Ácido Cafeíco	1000	>1000	1000	>1000
Delfinidina	125	ND	125	125

ND: Não determinado

5.4 Experimento Animal

5.4.1 Peso dos animais, intestino e conteúdo cecal.

Não houve diferença significativa entre os pesos dos animais durante o período de estudo. Apenas no tempo 0, mostrando que houve a tentativa de distribuição homogênea entre os grupos, porém a mesma não ocorreu. Entretanto no decorrer do experimento houve uniformização dos pesos e essa diferença não mais se apresentou significativa. Não afetando, portanto, a interpretação dos demais resultados em função da distribuição dos animais (Tabela 4).

Não foi observado estatisticamente influência da ingestão do extrato com compostos fenólicos no metabolismo lipídico. Diversos estudos já relacionaram o consumo de antocianinas com a prevenção da obesidade tais como os de Wu *et al.*(2013); Prior *et al.*(2010) e Prior *et al.* (2009).

Dentre as teorias descritas para esse mecanismo é de que as antocianinas podem suprimir o acúmulo de lipídios nos adipócitos devido à ampla inibição de fatores de transcrição que regulam a lipogênese. Isto pode explicar em parte o mecanismo pelo qual as antocianinas podem exercer o efeito anti-obesidade (Lee *et al.*, 2014).

Os demais parâmetros de pesos (intestino grosso e conteúdo cecal) não tiveram diferença significativa (Tabela 5).

TABELA 5. Valores médios em gramas dos pesos do intestino grosso e do conteúdo cecal de ratos Wistar tratados com extrato purificado de fenólicos do açaí e DMH.

	Pesos				Intestino grosso	Conteúdo cecal
	0 dias	8 dias	18 dias	28 dias		
Grupo controle -	369 ^a ±25,7	418 ^a ±28,5	433 ^a ±40,9	445 ^a ±45,9	12,5 ^a ±2,1	3,3 ^a ±1,1
Grupo controle +	401 ^{a,b} ±21,8	436 ^a ±27,3	424 ^a ±28,3	460 ^a ±32,4	13,5 ^a ±1,6	4,1 ^a ±1,1
Extrato 1 30 mg/Kg	399 ^{a,b} ±34,3	420 ^a ±34,0	418 ^a ±39,4	432 ^a ±41,4	11,8 ^a ±3,7	3,9 ^a ±1,2
Extrato 2 30 mg/Kg	421 ^c ±28,8	440 ^a ±34,6	448 ^a ±40,8	452 ^a ±39,5	13,3 ^a ±1,9	5,1 ^a ±0,8
Extrato 3 30 mg/Kg	418 ^c ± 23,7	414 ^a ±40,8	430 ^a ±44,7	436 ^a ±46,1	12,7 ^a ±3,9	4,1 ^a ±1,3
Extrato 1 + DMH	355 ^{a,b} ±15,3	408 ^a ±28,0	402 ^a ±36,0	433 ^a ±39,6	13,3 ^a ±2,1	3,6 ^a ±1,4
Extrato 2 + DMH	376 ^{a,b} ±33,3	391 ^a ±17,7	390 ^a ±22,6	414 ^a ±23,3	11,2 ^a ±2,0	4,0 ^a ±0,6
Extrato 3 + DMH	385 ^{a,b} ±33,6	437 ^a ±33,4	422 ^a ±30,0	443 ^a ±34,3	13,6 ^a ±4,1	4,0 ^a ±1,4

Legenda: Controle – (negativo) - administração apenas de solução fisiológica; Controle + (positivo) - uso apenas da droga DMH (80 mg/kg).

5.4.2 Análise de Parâmetros Hematológicos (hemograma)

Foram analisados diversos parâmetros hematológicos relacionados às hemácias (RBC, HGB, HCT, VCM, MCH-H, MCHC); leucócitos (WBC, W-SCR W-LCR W-SCC W-LCC, RDW-SD RDW-CV) e plaquetas (PDW , MPV P-LCR).

Na Tabela 6A pode-se perceber que os índices de MCH (Concentração média de hemoglobina) e MCHC (Concentração de hemoglobina corpuscular média) apresentaram diferenças significativas ($p < 0.05$) entre os grupos que consumiram apenas o extrato (grupos 3 e 5), porém esse aumento não foi significativo quando comparado ao controle negativo. Essa diferença pode ser

melhor observada no gráfico de dispersão (Figura 12). O valor médio encontrado está de acordo com o esperado para a espécie que é de $18,2 \pm 0,57$ para o MCH (Melo *et al.*, 2012). Os valores de MCHC encontrados em todos os grupos são ligeiramente maiores que a média de $32,8 \pm 1,09$ apresentada pelos mesmos autores.

Os demais parâmetros apresentados na tabela não sofreram variação em função do consumo do extrato de açaí associado ou não a droga (DMH).

TABELA 6A. Parâmetros hematológicos em plasma de ratos Wistar tratados com extrato purificado de fenólicos do açaí e DMH.

	WBC ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	RBC ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	HGB (g/dL)	HCT (%)	MCV (fL)	MCH (pg)	MCHC (g/dL)	PLT ($\times 10^3/\mu\text{L}$)
Grupo controle +	8,1 ^a ±3,0	9,1 ^a ±0,7	16,5 ^a ±1,5	48,0 ^a ±4,1	52,8 ^a ±1,0	18,1 ^a ±0,5	34,3 ^a ±0,7	852,7 ^a ±201,3
Grupo controle -	9,0 ^a ±1,2	9,4 ^a ±0,3	17,0 ^a ±0,6	49,1 ^a ±1,9	52,5 ^a ±0,7	18,2 ^a ±0,2	34,7 ^a ±0,3	822,7 ^a ±76,7
Extrato 1 30 mg/ Kg	7,3 ^a ±3,3	8,8 ^a ±1,3	15,6 ^a ±2,4	46,3 ^a ±6,4	52,6 ^a ±1,3	17,7 ^{a,c} ±0,5	33,8 ^{a,c} ±0,7	720,5 ^a ±374,3
Extrato 2 50 mg/ Kg	9,1 ^a ±2,8	9,5 ^a ±0,4	17,0 ^a ±0,5	49,1 ^a ±1,7	51,7 ^a ±0,8	17,9 ^{a,c} ±0,4	34,6 ^a ±0,4	752,0 ^a ±351,8
Extrato 3 180 mg/ Kg	9,1 ^a ±3,0	9,2 ^a ±0,5	17,0 ^a ±0,7	48,3 ^a ±2,2	52,8 ^a ±0,7	18,6 ^{a,b} ±0,3	35,1 ^{a,b} ±0,2	911,5 ^a ±81,4
Extrato 1 + DMH	8,5 ^a ±1,8	9,5 ^a ±0,7	17,3 ^a ±1,4	49,7 ^a ±3,7	52,5 ^a ±0,5	18,3 ^a ±0,3	34,9 ^a ±0,4	739,7 ^a ±291,3
Extrato 2 + DMH	10,1 ^a ±1,1	9,0 ^a ±0,2	16,5 ^a ±0,5	47,9 ^a ±1,5	53,3 ^a ±0,8	18,4 ^a ±0,3	34,5 ^a ±0,4	736,0 ^a ±244,2
Extrato 3 + DMH	8,7 ^a ±1,4	9,1 ^a ±0,3	16,5 ^a ±0,4	47,7 ^a ±1,2	52,8 ^a ±0,8	18,3 ^a ±0,2	34,7 ^a ±0,5	947,0 ^a ±144,4

Legenda: Controle – (negativo) - administração apenas de solução fisiológica; Controle + (positivo) - uso apenas da droga DMH (80 mg/kg); WBC- contagem de leucócitos; RBC- contagem de eritrócitos; HGB- concentração de hemoglobina; HCT- hematócrito; MCV- volume corpuscular médio; MCH- Hemoglobina corpuscular média; MCHC- concentração da hemoglobina corpuscular média; PLT- Contagem de plaquetas. DL- decilitro; fL- femtolitro, Valores apresentando letras minúsculas diferentes numa mesma coluna são significativamente diferentes entre si (teste de tukey, P<0.05).

Na Tabela 6B observa-se que o índice RDW-SD, que é o índice de anisocitose, o qual representa a alteração do tamanho das hemácias, apresentou diminuição significativa no grupo 4, quando comparado ao controle negativo, mas o valor médio está dentro do encontrado na literatura que é de $28,75 \pm 2,56$ (Melo *et al.*, 2012) e de $30,85 \pm 2,24$ (Devi e Rajukmar, 2012).

O índice RDW % acompanhou a tendência (Figura 1), de diminuição de valores dos grupos que consumiram o extrato em relação ao controle negativo (exceto os grupos 3 e 8). Estas são análises complementares de avaliação da diferença de tamanho entre hemácias. Os valores encontrados, inclusive dos grupos controles, se apresentaram menores que a variação encontrada na literatura que é de $15,9 \pm 1,72$ (Melo *et al.*, 2012) e $16,1 \pm 0,83$ (Devi e Rajukmar, 2012).

O grupo que utilizou o extrato 3 + DMH (grupo 8) apresentou o menor valor de P-LCR % ("**platelet large cell ratio**") que é o índice de macrotrombócitos (percentual de macroplaquetas), esse valor foi estatisticamente diferente ($p < 0,05$) dos outros grupos, o mesmo ocorreu com o valor de VPM que é o volume plaquetário (Tabela 2B). No gráfico de dispersão (Figura 12) observa-se bem a diferença do grupo comparado com os controles.

Esta é uma variável biológica que está relacionada com a função e a atividade plaquetária, portanto os aumentos e diminuições do VPM passam a ser importantes porque podem estar relacionados com determinadas patologias (Greisenegger *et al.*, 2004) (Abidi *et al.*, 2007), porém o valor encontrado no grupo 8 que foi de $7,8 \pm 0,3$, apesar de menor não está fora do parâmetro esperado para a espécie que é de $7,52 \pm 0,35$ de acordo com Melo *et al.*(2012).

A microcitose plaquetária quando observada, pode estar relacionada com etiologias como deficiência de folato, anemia ferropriva, trombocitose reativa e na Síndrome de Wiskatt-Aldrich (Zago *et al.*, 2004). Porém não foram encontrados valores menores de hemoglobina e hematócrito para este grupo, não caracterizando quadro de anemia (Tabela 6A).

TABELA 6B. Parâmetros hematológicos em plasma de ratos Wistar tratados com extrato purificado de açai e DMH.

	W-SCR %	W-LCR %	RDW-SD fL	RDW-CV %	PDW fL	VPM fL	P-LCR %
Grupo controle -	74,8 ^a ±4,1	25,2 ^a ±4,1	29,3 ^a ±1,5	14,8 ^{a,c} ±0,8	9,5 ^a ±0,7	8,4 ^a ±0,3	12,7 ^a ±3,3
Grupo controle +	76,3 ^a ±3,6	23,7 ^a ±3,6	28,1 ^{a,b} ±0,9	14,1 ^{a,b,c} ±0,5	9,3 ^a ±0,3	8,3 ^a ±0,2	10,6 ^{a,b} ±1,5
Extrato 1 30 mg/ Kg	78,9 ^a ±4,0	21,1 ^a ±4,0	28,2 ^{a,b} ±1,0	14,6 ^{a,b,c} ±0,7	9,2 ^a ±0,9	8,3 ^a ±0,4	11,8 ^{a,b} ±4,2
Extrato 2 50 mg/ Kg	76,5 ^a ±8,3	21,5 ^a ±3,6	26,7 ^b ±0,6	13,6 ^b ±0,2	9,1 ^a ±0,6	8,3 ^a ±0,2	12,2 ^a ±2,2
Extrato 3 180 mg/ Kg	77,8 ^a ±3,0	22,2 ^a ±3,0	27,8 ^{a,b} ±0,9	13,6 ^b ±0,7	9,1 ^a ±0,3	8,1 ^a ±0,2	9,9 ^{a,b} ±1,7
Extrato 1 + DMH	78,9 ^a ±2,3	21,1 ^a ±2,3	27,2 ^{a,b} ±0,9	13,6 ^{b,c} ±0,5	9,4 ^a ±0,3	8,3 ^a ±0,3	11,1 ^{a,b} ±2,1
Extrato 2 + DMH	78,5 ^a ±4,3	21,5 ^a ±4,3	27,6 ^{a,b} ±0,9	13,3 ^b ±0,4	8,9 ^a ±0,6	8,1 ^a ±0,4	9,4 ^{a,b} ±1,7
Extrato 3 + DMH	81,1 ^a ±1,9	19,0 ^a ±1,9	28,3 ^{a,b} ±1,1	14,1 ^{a,b,c} ±0,8	8,6 ^a ±0,5	7,8 ^b ±0,3	8,1 ^b ±1,9

Legenda: Controle – (negativo) - administração apenas de solução fisiológica; Controle + (positivo) - uso apenas da droga DMH (80 mg/kg); W-SCR- índice de leucócitos pequenos; W-LCR- índice de Leucócitos grandes; RDW-SD- largura da curva de distribuição de eritrócitos desvio-padrão; RDW-CV- largura da curva de distribuição de eritrócitos coeficiente de variação; PDW – largura da curva de distribuição de plaquetas; VPM- volume plaquetário médio; P-LCR- índice de macrotrombócitos; fL- Fentolitro. Valores apresentando letras minúsculas diferentes numa mesma coluna são significativamente diferentes entre si (teste de tukey, p <0.05).

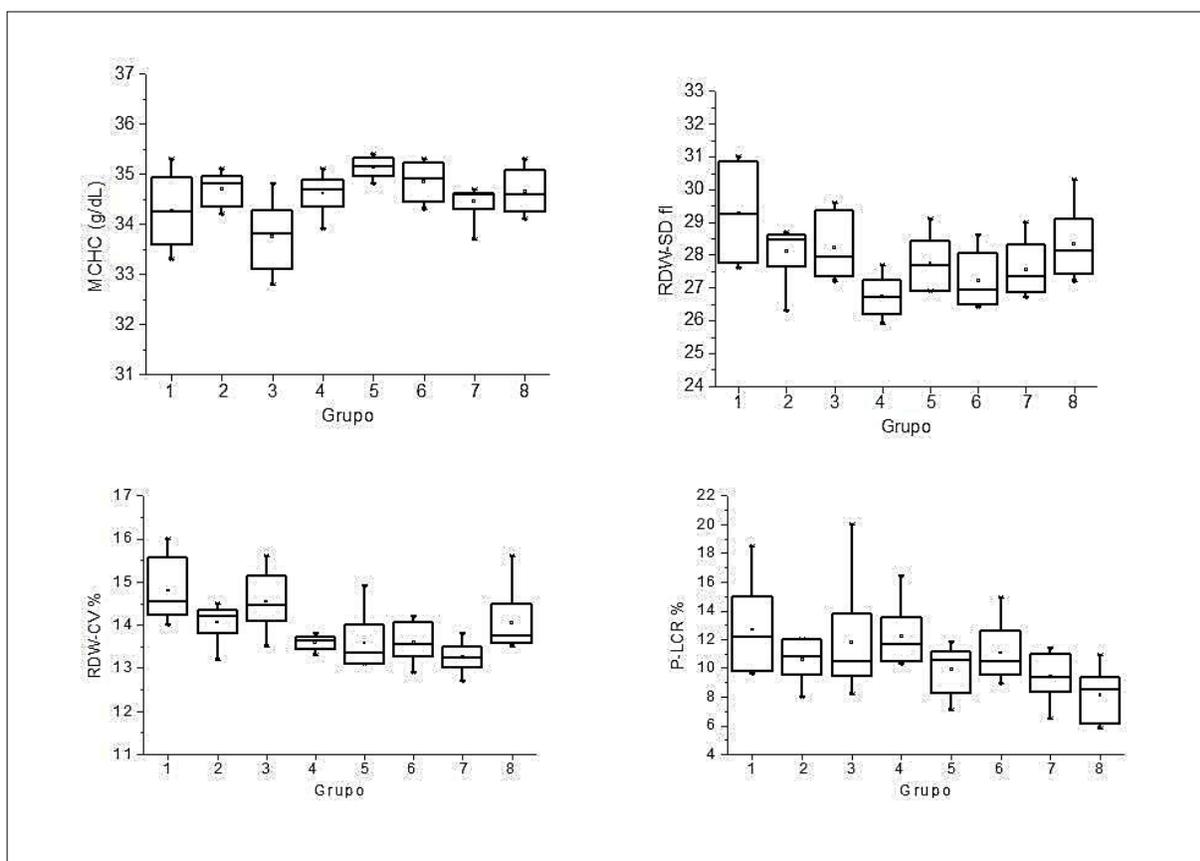


FIGURA 12. Gráficos de distribuição dos parâmetros hematológicos com diferença significativa no teste de Tukey ($p < 0.05$).

5.4.3 Parâmetros Bioquímicos

Ocorreu uma tendência no aumento dos triglicerídeos nos grupos que consumiram apenas o extrato, porém não significativa quando comparada ao grupo controle (Tabela 7A).

Os valores mais baixos de HDL-C puderam ser observados nos grupos 5 e 8 que consumiram a dosagem mais alta do extrato (180mg/Kg) (Figura 13), e ocorreu diminuição significativa ($P = 0,009$) no grupo 8 em relação ao controle positivo (grupo 2) (Tabela 7A). Relação essa não favorável á saúde, pois o HDL é o colesterol chamado “bom”, dentre as propriedades funcionais mais importantes conhecidas, e experimentalmente verificadas, da lipoproteína HDL são: transporte reverso do

colesterol, inibição da oxidação do LDL-C, ação anti-inflamatória na parede vascular e ação no endotélio (Libby, 2002).

Existem diversos estudos que relacionam o consumo de compostos fenólicos e modificações no perfil lipídico e na oxidabilidade das lipoproteínas e esses estudos divergem bastante nos resultados.

Um ensaio clínico controlado randomizado de 3 meses, em pacientes dislipidêmicos mostrou que a ingestão de antocianina melhorou o perfil de lipoproteínas, resultando num aumento dos níveis de colesterol HDL-C e um decréscimo no de baixa densidade (LDL-C), esses efeitos podem ser mediados por meio de transferência de éster de colesterol e inibição da proteína (Qin *et al.*, 2009).

Os valores de colesterol total não sofreram mudanças significativas assim como no estudo de Erlund *et al.* (2008) o onde consumo de quantidades moderadas de “berries”, frutos ricos em antocianinas, resultou em mudanças favoráveis na função das plaquetas, o colesterol HDL e na Pressão arterial. Os resultados indicaram que o consumo regular de berries pode desempenhar um papel na prevenção de doenças cardiovasculares.

Em recente publicação do NHS II (“Nurse health study”), que é um estudo de coorte com cerca de 94 mil mulheres acompanhadas, conclui-se que o consumo de antocianinas mais que de outros flavonoides, está relacionado com diminuição do risco de Infarto do miocárdio (Cassidy *et al.*, 2013).

As enzimas hepáticas amilase pancreática, creatinina e bilirrubina não apresentaram alterações significativas durante o experimento (Tabela 7A).

TABELA 7A. Parâmetros Bioquímicos em plasma de ratos Wistar tratados com extrato purificado de fenólicos do açai e DMH.

	P-AM (U/L)	Bilirrubina (mg/dL)	Colesterol (mg/dL)	Creatinina (mg/dL)	TG (mg/dL)	HDL-C (mg/dL)
Grupo controle -	1288 ^a ±235,5	0,5 ^a ±0,0	98,3 ^a ±0,8	0,5 ^a ± 0,0	70,1 ^a ±1,8	25,8 ^{a,b} ±1,8
Grupo controle +	984 ^a ±150,6	1,6 ^a ±2,2	98,5 ^a ±0,8	0,5 ^a ± 0,0	86,0 ^a ±28,9	31,7 ^a ±3,9
Extrato 1 30 mg/ Kg	1004 ^a ±252,7	0,5 ^a ±0,0	98,5 ^a ± 0,8	0,5 ^a ± 0,0	104,0 ^a ±43,7	25,3 ^{a,b} ±0,9
Extrato 2 50 mg/ Kg	1079 ^a ±160,0	1,0 ^a ±1,3	98,5 ^a ±0,8	0,5 ^a ±0,0	103,4 ^a ±68,6	26,0 ^{a,b} ±5,0
Extrato 3 180 mg/ Kg	862 ^a ±372,3	0,6 ^a ±0,2	98,5 ^a ±0,8	0,5 ^a ± 0,0	107,6 ^a ±37,8	23,8 ^b ±3,2
Extrato 1 + DMH	1007 ^a ±128,1	0,5 ^a ±0,0	98,3 ^a ±0,8	0,5 ^a ± 0,0	82,1 ^a ±22,2	29,4 ^{a,b} ±5,1
Extrato 2 + DMH	1004 ^a ±190,7	0,5 ^a ±0,0	98,3 ^a ±0,8	0,5 ^a ±0,0	90,1 ^a ±43,2	25,8 ^{a,b} ±3,3
Extrato 3 + DMH	1097 ^a ±76,3	0,5 ^a ±0,0	98,3 ^a ±0,8	0,5 ^a ±0,0	78,6 ^a ±11,6	25,0 ^b ±4,8

Legenda: Controle – (negativo) - administração apenas de solução fisiológica; Controle + (positivo) - uso apenas da droga DMH (80 mg/kg); P-AM- Amilase pancreática; TG- Triglicerídeos; HDL-C- Colesterol Lipoproteína de alta densidade. Valores apresentando letras minúsculas diferentes numa mesma coluna são significativamente diferentes entre si (teste de tukey p<0.05).

TABELA 7B. Avaliação dos Parâmetros Bioquímicos em plasma de ratos Wistar tratados com extrato purificado de açaí e DMH

	ALP (U/L)	GGT (U/L)	TGO (U/L)	TGP (U/L)	Ácido Úrico (mg/dL)	Uréia (mg/dL)
Grupo controle -	136,5±44,5	4,9 ^b ±0,1	147,4 ^a ±47,7	25,9 ^a ±3,00	2,5 ^a ± 1,1	41,6 ^a ±11,5
Grupo controle +	141,5 ^a ±48,9	5,8 ^a ±2,0	132,7 ^a ±33,2	34,9 ^a ± 8,6	1,9 ^a ± 0,0	47,3 ^a ± 3,6
Extrato 1 30 mg/ Kg	76,6±12,5	4,9 ^b ±0,0	109,7 ^a ±12,3	22,3 ^a ± 11,0	2,1 ^a ± 0,4	49,5 ^a ±12,0
Extrato 2 50 mg/ Kg	93,9±33,3	4,9 ^b ±0,0	108,5 ^a ±21,9	31,0 ^a ± 6,4	1,9 ^a ± 0,0	46,5 ^a ± 3,7
Extrato 3 180 mg/ Kg	89,1±18,2	4,9 ^b ±0,0	114,0 ^a ±36,1	29,0 ^a ± 5,2	1,9 ^a ± 0,0	44,2 ^a ± 7,4
Extrato 1 + DMH	99,6±9,5	4,9 ^b ±0,0	126,7 ^a ±18,0	34,5 ^a ± 5,4	2,0 ^a ± 0,2	50,8 ^a ± 5,6
Extrato 2 + DMH	87,5 ^b ±39,0	4,9 ^b ±0,0	130,6 ^a ±41,2	33,1 ^a ±6,8	1,9 ^a ±0,0	47,1 ^a ±1,3
Extrato 3 + DMH	84,0 ^c ±20,5	4,9 ^b ±0,0	129,1 ^a ±58,8	30,3 ^a ±8,5	2,0 ^a ±0,2	44,9 ^a ±3,5

Legenda: Controle – (negativo) - administração apenas de solução fisiológica; Controle + (positivo) - uso apenas da droga DMH (80 mg/kg); ALP- Fosfatase alcalina; GGT- Gama Glutamil Transferase; TGO-Transaminase glutâmico-oxalacética; TGP- Transaminase glutâmico-pirúvica. Valores apresentando letras minúsculas diferentes numa mesma coluna são significativamente diferentes entre si (teste de tukey, P<0.05).

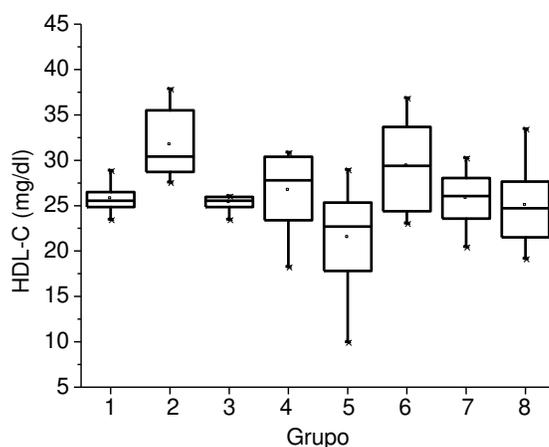


FIGURA 13. Gráfico de distribuição da análise de HDL-C em plasma ratos Wistar tratados com extrato purificado de açaí e DMH.

Como pode - se observar na Tabela 6B acima a enzima hepática ALP (Fosfatase Alcalina) apresentou diminuição significativa ($p < 0,005$) nos grupos 7 e 8 em relação ao controle positivo e de maneira geral ocorreu diminuição nos valores desta enzima nos grupos que consumiram o extrato em relação aos controles, enzima esta que pode estar em níveis muito elevados no câncer de colón (Saif; Alexander e Wicox, 2009).

É sugerido atualmente que há uma associação entre a fosfatase alcalina e sistemas de transporte, como o transporte intestinal de lipídios, renal de fosfato, além da modulação da atividade de glicoproteínas (Negrão *et al.*, 2013).

Em relação à enzima GGT (Gama Glutamil Transferase) ocorreu aumento significativo apenas no grupo controle positivo ($p < 0,001$), valor este normalizado nos grupos de tratamento combinado (Extrato + droga) comparado aos grupos que consumiram apenas o extrato, influência positiva na produção dessa enzima. Ambas as enzimas avaliam a capacidade de excreção do fígado e associam-se a alterações hepatobiliares (Figura 14) (Tabela 7B).

O efeito protetor de antocianinas em dano induzido pelo estresse oxidativo é promissor como mostrado usando modelos *in vivo*. Em um estudo com ratos utilizando lesão de isquemia-reperfusão hepática, como um modelo de estresse oxidativo, a Cianidina-3-glucosídeo, se mostrou eficiente atenuando mudanças de biomarcadores em lesão hepática (Tsuda; Horio e Osawa., 2000).

A não alteração em todas as enzimas hepáticas analisadas através do consumo do extrato evidencia a não toxicidade do produto, mesmo nos grupos que sofreram tratamento combinado com o carcinógeno DMH que possui metabolismo hepático.

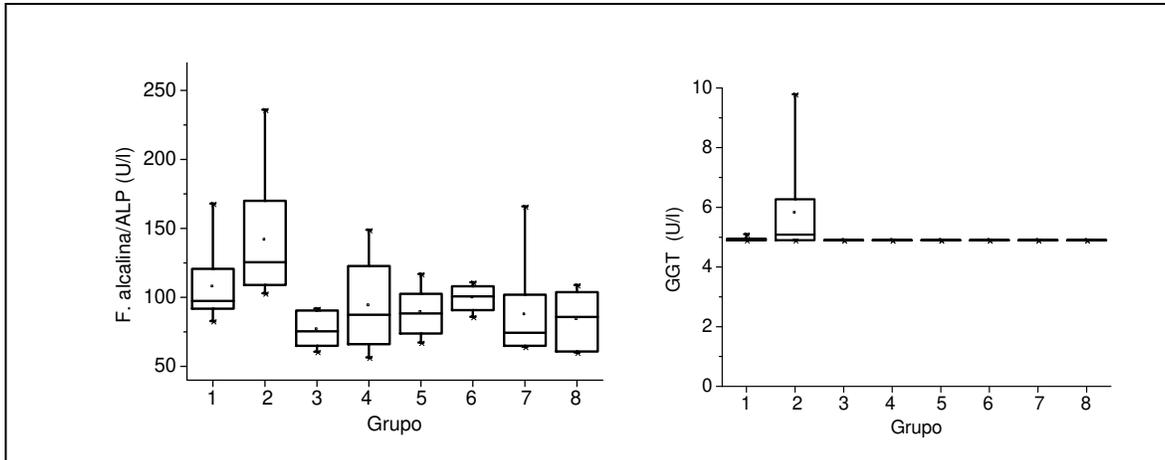


FIGURA 14. Gráficos de distribuição das enzimas hepáticas ALP e GGT.

No que se refere aos eletrólitos verificados (Na^+ , Ca^+ e K^+), apesar de ter havido alterações significativas nos parâmetros de Ca^+ e K^+ , como se observa na Tabela 7C, as mesmas são muito discretas e em pequeno intervalo (Figura 15) e não tendo também relação dose-resposta,

Portanto significa que o consumo do extrato não interfere no balanço eletrolítico e nas concentrações séricas de Na^+ , Ca^+ e K^+ .

TABELA 7C. Análise de eletrólitos em plasma de ratos Wistar tratados com extrato purificado de açai e DMH.

	Sódio (mmol/L)	Potássio * (mmol/L)	Cálcio ** (mmol/L)
Grupo controle-	137,0 ^a ±1,7	4,7 ^a ±0,2	1,3 ^b ±0,06
Grupo controle+	127,4 ^a ±1,2	4,1 ^{a,b} ±0,3	1,2 ^{a,b} ±0,05
Extrato 1 30 mg/ Kg	137,2 ^a ±1,2	4,8 ^a ±0,3	1,3 ^{a,b} ±0,03
Extrato 2 50 mg/ Kg	137,2 ^a ±0,8	4,5 ^a ±0,4	1,2 ^{a,b} ±0,02
Extrato 3 180 mg/ Kg	137,3 ^a ±1,2	4,9 ^a ±0,4	1,3 ^{a,b} ±0,03
Extrato 1 + DMH	137,0 ^a ±2,0	4,9 ^{a,b} ±0,3	1,4 ^a ±0,08
Extrato 2 + DMH	138,0 ^a ±3,8	3,7 ^b ±0,6	1,3 ^b ±0,14
Extrato 3 + DMH	138,2 ^a ±1,3	4,8 ^a ±0,5	1,4 ^a ±0,02

Legenda: Controle – (negativo) - administração apenas de solução fisiológica; Controle + (positivo) - uso apenas da droga DMH (80 mg/kg). Valores apresentando letras minúsculas diferentes numa mesma coluna são significativamente diferentes entre si (teste de tukey, * p<0.001 e ** p=0.002).

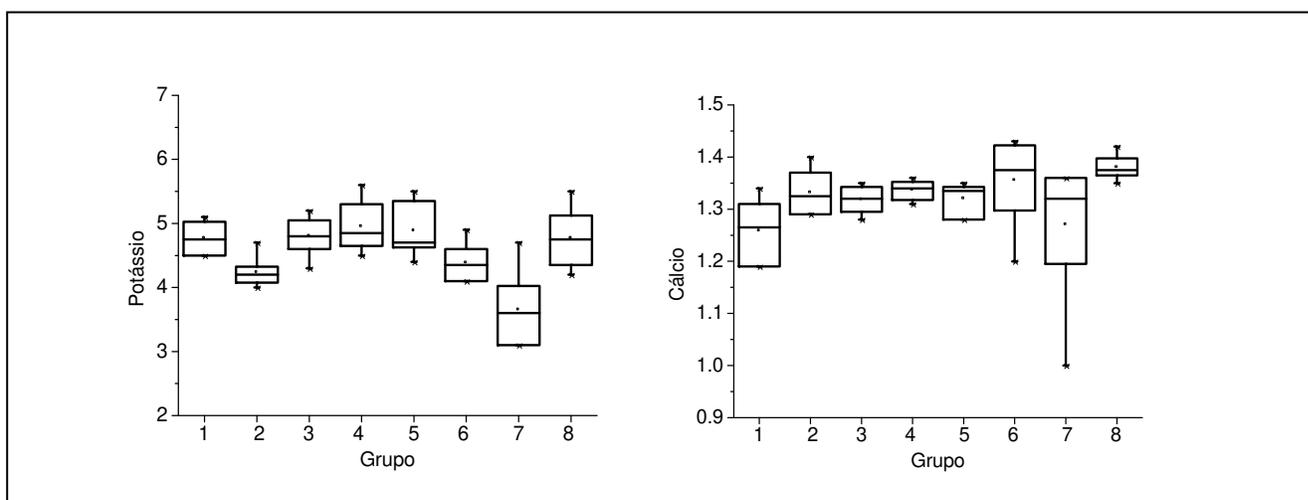


FIGURA 15. Gráfico de distribuição dos eletrólitos plasmáticos Potássio e Cálcio.

5.4.4 Análise de Ácidos Graxos de Cadeia Curta

De acordo com a Tabela 8 pode-se observar que houveram diferenças significativas ($P < 0,001$ e $P=0,003$) na produção de AGCC dentre os diferentes tratamentos realizados. De maneira geral ocorreu aumento na produção desses ácidos entre todos os grupos que consumiram o extrato, independente da utilização da droga (DMH).

Destaque para o ácido isobutírico que só foi detectado nos grupos que consumiram o extrato de açaí. Além dos ácidos butírico, acético e propiônico que tiveram uma dose-resposta muito interessante como fica evidenciado na Figura 16.

Esse aumento na produção se deve provavelmente a um maior crescimento bacteriano, muito provável pela influência dos compostos fenólicos presentes no extrato de açaí na mudança de potencial redox do meio intestinal, e conseqüentemente favorecendo o crescimento de micro-organismos probióticos que em sua maioria são microaerófilos.

Além disso, os compostos fenólicos podem atuar no fornecimento de substratos utilizados no metabolismo bacteriano, como o crotonil-CoA (Harrison, 2010). Muitos trabalhos mostram a influência do consumo de alimentos ricos em compostos fenólicos e influência positiva com as bactérias chamadas probióticas responsáveis pela produção desses compostos (AGCC) (Molan *et al.*, 2009) (Ankolekar *et al.*, 2011) (Hakansson *et al.*, 2012) (China *et al.*, 2012).

TABELA 8. Quantificação de AGCC por CG-FID no conteúdo cecal de ratos Wistar tratados com extrato purificado de açaí e DMH.

	Acético*	Propiônico*	Isobutírico**	Butírico*	Caproico*
Grupo controle -	3,10 ^b ±0,95	1,25 ^b ±0,41	ND	1,91 ^b ±0,86	0,94 ^b ±0,28
Grupo controle +	3,48 ^{b,c} ±1,51	1,50 ^{b,c} ±0,46	ND	2,52 ^b ±1,53	1,88 ^{b,c} ±0,50
Extrato 1 30 mg/Kg	3,40 ^b ±1,04	1,70 ^{b,c} ±0,67	0,97 ^b ±0,39	2,14 ^b ±0,77	3,57 ^{a,c} ±2,25
Extrato 2 50 mg/Kg	6,03 ^{a,c} ±1,48	2,15 ^{a,b,c} ±0,54	0,98 ^b ±0,32	4,10 ^{a,b} ±1,33	4,54 ^{a,c} ±1,69
Extrato 3 180 mg/Kg	7,63 ^a ±3,30	3,47 ^a ±1,37	1,10 ^{a,b} ±0	8,33 ^a ±5,34	5,28 ^a ±0,41
Extrato 1 + DMH	5,52 ^{a,b,c} ±1,33	2,10 ^{a,b,c} ±0,85	1,37 ^{a,b} ±0,21	3,28 ^{a,b} ±1,01	4,98 ^a ±0,99
Extrato 2 + DMH	5,42 ^{a,c} ±1,14	2,62 ^{a,c} ±0,92	1,65 ^{a,b} ±0,20	3,12 ^{a,b} ±0,89	4,48 ^a ±0,59
Extrato 3 + DMH	8,27 ^a ±3,60	3,80 ^a ±1,38	2,30 ^a ±0,78	5,17 ^{a,b} ±4,04	5,45 ^a ±1,79

Legenda: mMol/ g conteúdo cecal. Controle – (negativo) - administração apenas de solução fisiológica; Controle + (positivo) - uso apenas da droga DMH (80 mg/kg). Valores apresentando letras minúsculas diferentes numa mesma coluna são significativamente diferentes entre si (teste de tukey * p<0.001; * * p=0.003); ND não detectado.

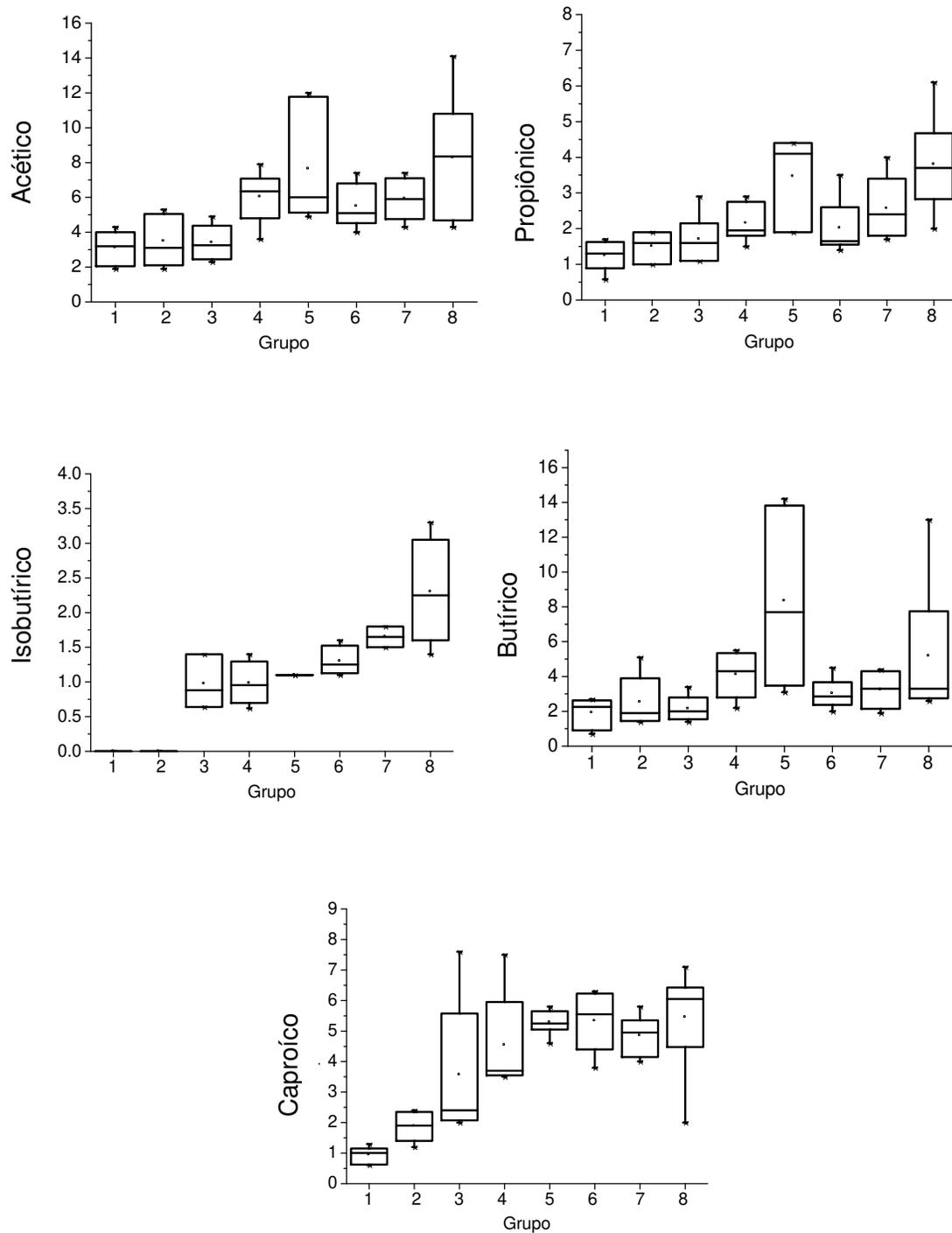


FIGURA 16. Gráficos de dispersão da análise de AGCC no conteúdo cecal de ratos Wistar tratados com extrato purificado de fenólicos do açai e DMH.

5.4.5 Análise histológica de Focos de Criptas Aberrantes

Na leitura dessa análise pode-se observar a formação de Conglomerado de glândulas anormais os chamados focos de criptas aberrantes (FCA), que são formações que podem levar ao câncer, em todos os grupos que utilizaram o carcinógeno DMH, porém também foram encontrados esses focos no grupo que consumiu apenas dosagem mais elevada do extrato (180 mg/kg) (Tabela 9) .

Os grupos que consumiram as doses baixa e intermediária do extrato apresentaram menor número de FCA em comparação ao controle positivo.

Essa atuação pode ser devido à capacidade antioxidante dos flavonóides presentes no extrato, as quais capturam diretamente as espécies reativas de oxigênio, promovendo o aumento da capacidade de absorção de radicais de oxigênio das células, a redução das células proliferativas pela modulação de vias de transdução de sinal, a apoptose e angiogênese (Nema *et al.*, 2012). Os polifenóis podem inibir a carcinogênese, afetando os eventos moleculares na iniciação, promoção e estágios de evolução (Yang, 2001).

Estudos realizados com açaí demonstraram que os polifenóis presentes no fruto reduziram a proliferação de célula leucêmica HL-60 e colón HT-29 (Pozo-Insfran, Percival e Talcott, 2006) (Pacheco-Palencia *et al.*, 2008).

Esse resultado pode demonstrar possível efeito mutagênico ou ainda sinérgico dessa dosagem (180mg/Kg) com droga. A carcinogênese do câncer de colón retal requer a ocorrência de múltiplas alterações genéticas. Os FCA parecem ter um papel importante na transição adenoma-carcinoma (Gustin e Brenner, 2002).

Em doses elevadas pode-se observar efeito pro-oxidante dos compostos fenólicos, portanto o consumo de grandes quantidades de compostos fenólicos, sob a forma de suplementos concentrados não pode ser considerado seguro até seu potencial *in vivo* para o estresse oxidativo ser avaliada (Kyselova, 2011).

TABELA 9. Número de Focos de Criptas aberrantes (FCA) em amostra de corte histológico da porção medial de colón de ratos Wistar tratados com extrato de açai e DMH.

Grupos	Total de FCA			Total de criptas	Multiplicidade das Criptas AC/FCA
	1	2	≤ 3		
Grupo controle-	0	0	0	0	0
Grupo controle+	0	1	3	16	4
Extrato 1 30mg/Kg	0	0	0	0	0
Extrato 50 mg/Kg	0	0	0	0	0
Extrato 3 180 mg	4	1	2	15	3
Extrato 1 + DMH	0	0	1	3	3
Extrato 2 + DMH	0	2	0	4	2
Extrato 3 + DMH	0	10	4	44	3,1

Legenda: Controle – (negativo) - administração apenas de solução fisiológica; Controle + (positivo) - uso apenas da droga DMH (80 mg/kg); FCA- Focos de Criptas Aberrante.

5.4.6 Resultado do Ensaio Cometa (TCS) no sangue e colón sem tratamento e com tratamento com ENDO III e FPG.

No ensaio cometa realizado nos linfócitos isolados do sangue, não foram observadas diferenças significativas no número de quebras tanto nas lâminas sem tratamento enzimático, quanto nas que foram tratadas com as enzimas ENDO III e FPG (Tabela 10), o que indica possivelmente que não houve efeito genotóxico nessas células, mas também não houve uma melhora no sistema de reparos do DNA. Sabe-se que os valores plasmáticos encontrados de compostos fenólicos e principalmente das antocianinas, é pequeno (He e Giusti, 2010).

Já que grande parte das antocianinas alcança o colón e lá são produzidos pelas bactérias intestinais diversos metabólitos intermediários com ação biológica (Halliwell *et al.*, 2005), foi nesse local que se pode observar um maior efeito celular do extrato purificado de açaí quando comparado aos linfócitos. No teste feito com as células isolados do colón intestinal houve tendência de diminuição de quebras no DNA observado nos grupos que consumiram o extrato de açaí (Tabela 9). A diferença local X tratamento é mostrada na análise ANOVA (Tabela 11).

Essa tendência é mais evidente nas lâminas do colón tratadas com ENDO III (Figura 17), que evidencia a oxidação que ocorreu nas bases pirimídicas do DNA. Não apresentando o extrato alteração genotóxica significativa, apresentando tendência de melhora no sistema de reparos do DNA com o consumo apenas do extrato, porém não interferindo na ação da droga DMH.

Esse possível efeito de não genotoxicidade foi encontrado no estudo realizado com polpa de açaí (Ribeiro *et al.*, 2010) em camundongos utilizando tratamento agudo e sub-agudo juntamente com o fármaco doxorubicina.

O grupo controle negativo apresentou alterações no DNA mais elevadas que os demais grupos, incluindo o controle positivo que consumiu apenas a droga DMH. Isso ocorreu tanto nas células do cólon quanto nos linfócitos, esse resultado inviabilizou a confirmação de efeito antigenotóxico (Figura 17).

TABELA 10. Resultado do escore total do Ensaio Cometa (TCS) no sangue e colón sem tratamento e com tratamento com ENDO III e FPG.

	Linfócitos			Colón		
	Sem tratamento	ENDO III	FPG	Sem Tratamento*	ENDO III*	FPG**
Grupo controle-	227 ^a ±68.4	252 ^a ±36.5	244 ^a ±61.0	330 ^{a,c} ±20.9	268 ^{a,c} ±20.5	269 ^a ±50.5
Grupo controle+	168 ^a ±10.4	177 ^a ±64.4	205 ^a ±43.3	252 ^a ±43.2	180 ^b ±69.5	248 ^{a,b} ±20.4
Extrato 1 30 mg/ Kg	163 ^a ±11.5	186 ^a ±26.2	185 ^a ±14.2	165 ^b ±20.0	202 ^b ±6.8	180 ^b ±11.6
Extrato 2 50 mg/ Kg	273 ^a ±71.9	219 ^a ±74.8	223 ^a ±71.3	251 ^c ±23.2	173 ^b ±38.5	210 ^{a,b} ±23.8
Extrato 3 180 mg/ Kg	191 ^a ±42.3	186 ^a ±59.8	188 ^a ±39.2	216 ^b ±96.2	184 ^b ±37.4	246 ^{a,b} ±31.3
Extrato 1 + DMH	195 ^a ±27.8	188 ^a ±8.2	217 ^a ±35.9	230 ^b ±40.8	236 ^{a,b,c} ±36.2	226 ^{a,b} ±55.7
Extrato 2 + DMH	166 ^a ±22.5	169 ^a ±21.3	166 ^a ±29.1	223 ^b ±32.9	249 ^{a,c} ±44.1	254 ^a ±19.3
Extrato 3 + DMH	216 ^a ±85.2	232 ^a ±68.9	217 ^a ±69.5	230 ^b ±64.3	275 ^c ±46.8	262 ^a ±58.3

Legenda: Controle – (negativo) - administração apenas de solução fisiológica; Controle + (positivo) - uso apenas da droga DMH (80 mg/kg). Valores apresentando letras minúsculas diferentes numa mesma coluna são significativamente diferentes entre si (* p<0.001; * *significa p=0.003); ND- não detectado.

TABELA 11. Resultados das ANOVAs para medidas repetidas para comparação do TCS entre grupos, locais e tratamentos.

Efeitos	Estatística F	Valor-P
Comparação entre Grupos (8 grupos)	F(7,40)=5.56	P<0.001 ^a
Comparação entre Locais (sangue e cólon)	F(1,40)=15.23	P<0.001 ^a
Comparação entre Tratamentos (S/trat, Endo, FPG)	F(2,80)=2.27	P=0.110
Interação Grupos vs Locais	F(7,40)=1.72	P=0.133
Interação Grupos vs Tratamentos	F(14,80)=3.93	P<0.001 ^a
Interação Locais vs Tratamentos	F(2,80)=1.02	P=0.365
Interação Grupos vs Locais vs Tratamentos	F(14,80)=1.53	P=0.120

* Variável transformada em postos (*ranks*) devido à ausência de distribuição Normal.

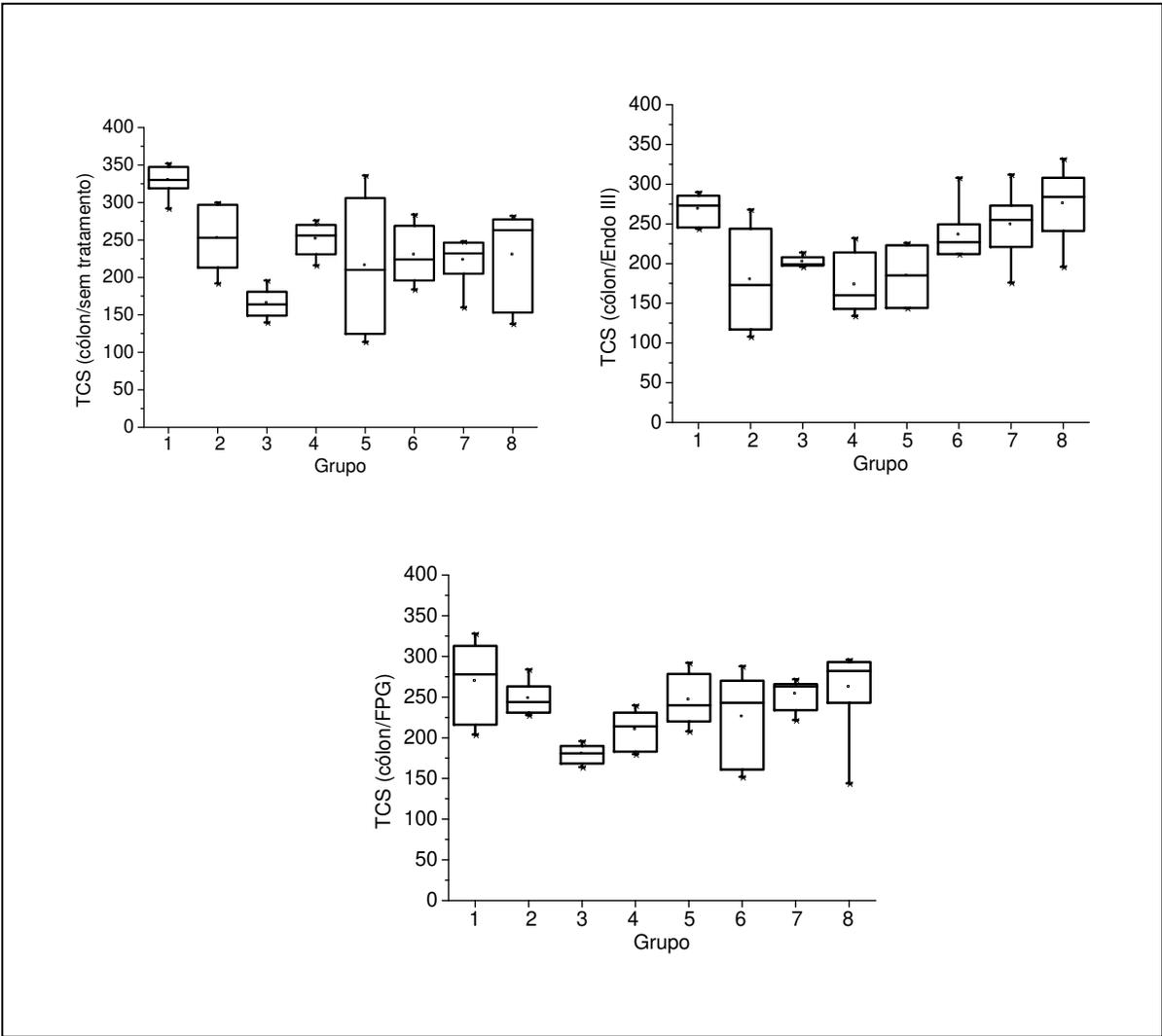


FIGURA 17. Gráficos de distribuição dos resultados do ensaio cometa em células do colón.

6 CONCLUSÕES

Nos testes realizados *in vitro* não foi encontrada uma relação com os maiores valores encontrados nas análises de ORAC e de redox por voltametria cíclica, com os compostos que tiveram efeito nos testes em microplacas com bactérias patogênicas, ácidos fenólicos (cafeíco e gálico).

O ácido ascórbico que tem um alto potencial de oxidação apresentou atividade antimicrobiana talvez essa característica seja responsável pelo efeito encontrado. A delphinidina que teve os maiores valores de MIC encontrados apresentou também com um alto valor de atividade antioxidante ORAC, porém com baixo potencial de oxidação pela voltametria.

Os compostos estudados não apresentaram atividade antimicrobiana com as bactérias probióticas.

Com base nos resultados da influência de diferentes concentrações polifenóis do extrato purificado de compostos fenólicos do açaí (*Euterpe oleracea*) em tratamento combinado com a droga que induz a carcinogênese do colón DMH em ratos Wistar sobre diferentes parâmetros biológicos, pode-se concluir que houve influência na microbiota intestinal quanto a produção dos AGCC (butírico, isobutírico, caproíco, propiônico e acético), a qual foi favorecida em todos os grupos que consumiram o extrato de açaí.

Destaque para o ácido isobutírico que só foi detectado nos grupos que consumiram o extrato e os ácidos butírico, acético e propiônico que apresentaram dose-resposta.

Os resultados mostraram poucas alterações nos animais nos parâmetros hematológicos e nos eletrólitos séricos Na⁺, Ca⁺ e K⁺. Dentre os parâmetros bioquímicos merecem destaque as enzimas hepáticas ALT e GGT que tiveram valores mais baixos nos grupos que consumiram o extrato, mesmo com o uso da droga em comparação com o controle positivo mostrando que o extrato é bem tolerado e não tóxico, podendo até ter revertido a toxicidade da droga.

Os resultados do ensaio cometa que avalia possível efeito antigenotóxico, não foram conclusivos em função do controle negativo ter apresentado alterações

no DNA mais elevadas que os demais grupos, em ambos os tipos de células estudadas (cólon e linfócitos).

Em relação a formação de focos de criptas aberrantes, os grupos que consumiram as doses de 30 e 50mg/Kg do extrato apresentaram menor número de FCA em comparação ao controle positivo. Porém a dosagem de 180mg/kg pode ter tido ação sinérgica com a droga aumentando o número de lesões.

Os resultados apresentados justificam a realização de mais trabalhos com a utilização do extrato purificado de fenólicos do açaí em modelos *in vivo*, inclusive em humanos e *in vitro* para que os micro-organismos influenciados possam ser identificados, além de elucidados os compostos intermediários que são formados , para que se tenha maior compreensão dos mecanismos envolvidos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIDI, P.; FAGHIG, I. E.; TALAEJ, M.; GHANEI, M. Population-based platelet reference values for an Iranian population. **International Journal of Laboratory Hematology**, v. 29, p. 195-199, 2007.

ANKOLEKAR, C.; JOHNSON, D.; PINTO, M. DA S.; JOHNSON, K.; LABBE, R. SHETTY, K. Inhibitory Potential of Tea Polyphenolics and Influence of Extraction Time Against Helicobacter pylori and Lack of Inhibition of Beneficial Lactic Acid Bacteria . **Journal of Medicinal Food**, v. 14, n. 11, p. 1321–1329, 2011.

ANKOLEKAR, C.; PINTO, J. D.; JOHNSON, M. S, K.; LABBE, R; SHETTY, K.. Inhibitory Potential of Tea Polyphenolics and Influence of Extraction Time Against Helicobacter pylori and Lack of Inhibition of Beneficial Lactic Acid Bacteria. **Journal of Medicine and Food**. v. 14, n. 11, p.1321–1329, 2011.

ARCHER, S. Y.; MENG, S.; SHEI, A.; HODIN, R. A. p21(WAF1) is required for butyrate-mediated growth inhibition of human colon cancer cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, n.12, p. 6791-6796, 1998.

ARRIBAS, A. S.; . MARTINEZ-FERNANDEZ, M.; CHICHARRO, M. The role of electroanalytical techniques in analysis of polyphenols in wine. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 34, p. 78-96, 2012.

AZQUETA, A.; COLLINS, A. R . The essential comet assay: a comprehensive guide to measuring DNA damage and repair. **Archives of Toxicology**. v. 87, n. 6, p. 949–968, 2013.

AZQUETA, A.; SHAPOSHNIKOV,S.; COLLINS,A. R. DNA oxidation: Investigating its key role in environmental mutagenesis with the comet assay. **Mutation Research**, v. 674, p. 101–108, 2009.

BAZZOCCO, S.; MATTILA, I.; GUYOT, S.; RENARD, C. M. G. C.; AURA, A-M. Factors affecting the conversion of apple polyphenols to phenolic acids and fruit matrix to short-chain fatty acids by human faecal microbiota in vitro. **European Journal of Nutrition**,v. 47, p. 442–452, 2008.

BICHARA, C. M. G.; ROGEZ, H. Açai (*Euterpe oleracea Mart.*). In: Yahia EM, editor. **Postharvest biology and technology of tropical and subtropical fruits**. Volume 2: Açai to citrus. Cambridge: Woodhead Publishing. p 1–26, 2011.

BIRD, R. P. Observations and quantification of aberrant crypts in the murine colon treated with a colon carcinogen: preliminary findings. **Cancer Letters**. v 37, n. 2, p.147-51,1987.

BIRD, R. P.; GOOD, C. K. The significance of aberrant crypt foci in understanding the pathogenesis of colon cancer. **Toxicology Letters**, v. 112, p. 395-402, 2000.

BLASCO, A.J.; GONZALEZ, M.C.; ESCARPA, A. Electrochemical approach for discriminating and measuring predominant flavonoids and phenolic acids using differential pulse voltammetry: towards an electrochemical index of natural antioxidants. **Analytica Chimica Acta**, v. 511, n.47, p. 71-81, 2004.

BLASCO, A.J.; ROGERIO, M.C.; GONZALEZ, M.C.; ESCARPA, A. "Electrochemical Index" as a screening method to determine "total polyphenolics" in foods: a proposal. **Analytica Chimica Acta**, v.539, p. 237-244, 2005.

BLAUT, M.; CLAVEL T. Metabolic diversity of the intestinal microbiota: Implications for health and disease. **Journal of Nutrition**, v.137, n. 3, p. 751-755, 2007.

BLAUT, M.; CLAVEL, T. Metabolic diversity of the intestinal microbiota: implications for health and disease. **The Journal of Nutrition**, v. 137, p. 751S-755S, 2007.

BLAUT, M.; SCHOEFER, L.; BRAUNE, A. Transformation of flavonoids by intestinal microorganisms. **International Journal for Vitamin and Nutrition Research**, v. 73, p. 79–87, 2003.

BRASIL. Regulamento técnico geral para a fixação dos padrões de identidade e qualidade para polpa de fruta. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, v. 6, p. 54–58, 2000.

CALDWELL, C.R. Alkylperoxyl radical scavenging activity of red leaf lettuce (*Lactuca sativa* L.) phenolics. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 4589-4595, 2003.

CAMMERER, Z.; BHALLI, J. A.; CAO, X.; COFFING, S. L.; DOBO, K. L. Report on Stage III Pig-a Mutation Assays Using N-ethyl-N-nitrosourea - comparison with other in vivo genotoxicity endpoints. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 52, p. 721-730, 2011.

CAMPBELL, J. M.; FAHEY, G. C. JR.; WOLF, B. W. Selected indigestible oligosaccharides affect large bowel mass, cecal and fecal short-chain fatty acids, pH and microflora in rats. **Journal of Nutrition**, v. 127, n.1, p. 130-136, 1997.

CASSIDY, A; MUKAMAL, K. J.; LIU, L. ; FRANZ, M. A.; ELIASSEN, H.; RIMM, E. B. High Anthocyanin Intake Is Associated With a Reduced Risk of Myocardial Infarction in Young and Middle-Aged Women. **Circulation**, v. 127, p. 188-196, 2013.

CHEVION, S.; ROBERTS, M. A.; CHEVION, M. The use of cyclic voltammetry for the evaluation of antioxidant capacity. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 28 p. 860-870, 2000.

CHINA, R.; MUKHERJEE, S.; SEN, SAURADIP.; BOSE, S.; DATTA, S.; KOLEY, H.; GHOSH, S.; DHAR, .P. Antimicrobial activity of Sesbania grandiflora flower polyphenol extracts on some pathogenic bacteria and growth stimulatory effect on the probiotic organism *Lactobacillus acidophilus*. **Microbiological Research**, v. 167, p. 500– 506, 2012.

CHINA, R.; MUKHERJEE, S.; SEN, S.; BOSE, S.; DATTA, S.; KOLEY, H.; GHOSH, S.; DHAR P. Antimicrobial activity of *Sesbania grandiflora* flower polyphenol extracts on some pathogenic bacteria and growth stimulatory effect on the probiotic organism *Lactobacillus acidophilus*. **Microbiological Research**, v. 167, n. 8, p. 500-506, 2012.

CHOUDHARY, G.; HANSEN, H. Human health perspective on environmental exposure to hydrazines: a review. **Chemosphere**, v. 37, p. 801–843, 1998.

CHUGUNOV, V. A.; MARTOVETSKAIA, II.; MIRONOVA, R. I.; FOMCHENKOV V. M.; KHOLODENKO, V. P. Microbiological degradation of asymmetrical dimethylhydrazine – a toxic component of rocket fuel. **Prikladnaia Biohimiia I Mikrobiologiia**, v. 36, p. 631–636, 2000.

CLIFFORD, M.N. Diet-derived phenols in plasma and tissues and their implications for health. **Planta Medica**, v. 70, n. 1103–1114, 2004.

CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). **Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard**—Ninth Edition. Clinical and Laboratory Standards Institute document M2-A9. Wayne, PA USA, 2006.

COLLINS, A. R. The comet assay for DNA damage and repair..Molecular Biotechnology, v. 26, n. 3, p. 249-261, 2004.

COLLINS, A.R.; DUSINSKA, M.; GEDIK, C.M.; STETINA, R. Oxidative damage to DNA: do we have a reliable biomarker? **Environmental health perspectives**, v. 104, p. 465-469,1996

COLLINS, A., DUSINSKÁ, M.; FRANKLIN, M.; SOMOROVSKA M.; PETROVKA H.; DUTHIE S.; *et al.* Comet assay in human biomonitoring studies: reliability, validation, and applications. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 30, p. 139-146, 1997.

CONNER, E. M.; GRISHAM, M. B. Inflammation, Free Radicals, and Antioxidants. **Nutrition**, v.122, p. 74-277, 1996.

CONOVER, W. J.; IMAN, R. L. Rank transformations as a bridge between parametric and nonparametric statistics. **The American Statistician**, v. 35, p 124-129, 1981.

COOK, P. R.; BRAZELL, I. A.; JOST,E. Characterization of nuclear structures containing superhelical DNA. **Journal of Cell Science**, v. 22, p. 303–324, 1976.

CORTÉS-GUTIÉRREZ, E. I.; DÁVILA-RODRÍGUEZ, M. I.; FERNÁNDEZ, J. L.;LÓPEZ-FERNÁNDEZ, C.; GOSÁLBEZ,A.; GOSÁLVEZ, J.New application of the comet assay: chromosome Comet assay. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, .v. 59, p. 655–660, 2011.

CUMMINGS, J.H.; MACFARLANE, G.T. Colonic microflora: nutrition and health. **Nutrition**,v, 13, p. 476-478, 1997.

DÁVALOS, A.; GÓMEZ-CORDOVÉS, C.; BARTOLOMÉ, B. Extending applicability of the oxygen radical absorbance capacity (ORAC-fluorescein) assay. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 1, p. 48-54, 2004.

DEMARZO, M. M.; GARCIA, S. B. Exhaustive physical exercise increases the number of colonic preneoplastic lesions in untrained rats treated with a chemical carcinogen. **Cancer Letters**, v. 216, p. 31–34, 2004.

DEVI, J.; RAJKUMAR, J. Effect of Ambrex (A herbal formulation) on hematological variables in hyperlipidemic rats. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v. 17, n. 5, p. 740-743, 2014.

ERLUND, I.; KOLI, R.; ALFTHAN, G.; MARNIEMI, J.; PUUKKA, P.; MUSTONEN, P.; MATTILA, P.; JULA, A. Favorable effects of berry consumption on platelet function, blood pressure, and HDL cholesterol^{1–3}. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 87, p. 323–331, 2008.

EVERS, D.L.; CHAO, C.F.; WANG, X.; ZHANG, Z.; HUONG, S.M.; HUANG, E.S. Human cytomegalovirus-inhibitory flavonoids: Studies on antiviral activity and mechanism of action. **Antiviral Research**, v. 68, p. 124–134, 2005.

FENOGLIO-PREISER, C M.; NOFFSINGER, A. Aberrant crypt foci: a review. **Toxicologic Pathology**, v. 27, p. 632-642, 1999.

FIALA, E. S. Investigations into the metabolism and mode of action of the colon carcinogens 1,2-dimethylhydrazine and azoxymethane. **Cancer**, v. 40, p. 2436 –2445, 1977.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. Ed. Atheneu, 1996. 182 p.

GABRIELSON, J., HART, M., JARELOV, A., KUHN, I., MCKENZIE, D., MOLLBY, R., Evaluation of redox indicators and the use of digital scanners and spectrophotometer for quantification of microbial growth in microplates. **Journal of Microbiological Methods**, v. 50, p. 63–73, 2002.

GALATO, D.; CKLESS, K.; SUSIN, M. F.; GIACOMELLI, C.; RIBEIRO-DO-VALLE, R. M.; SPINELLI, A. Antioxidant capacity of phenolic and related compounds: correlation among electrochemical, visible spectroscopy methods and structure-antioxidant activity. **Redox Report**. v. 6, n. 4, p. 243- 250, 2001.

GALLORI, S.; BILIA, A. R.; BERGONZI, M. C.; BARBOSA, W. L. R.; VINCIERI, F. F. Polyphenolic constituents of fruit pulp of *Euterpe oleracea* Mart. (Açaí palm). **Chromatographia**, v. 59, p. 739–743, 2004.

GOLDBERG, R.M. Advances in the treatment of metastatic colorectal cancer. **Oncologist**, v.10, p. 40-48. 2005.

GREISENEGGER, S.; ENDLER, G.; HSIEH, K.; TENTSCHER, S.; MANNHALTER, C.; LALOUSCHEK, W. Is Elevated Mean Platelet Volume Associated With a Worse Outcome in Patients With Acute Ischemic?. **Cerebrovascular Events Stroke**. v. 35, p. 1688-1691, 2004.

GUARNER, E.; MALAGELADA, J. R. Gut flora in health and disease. **Lancet**. v. 361, p. 512-519, 2003.

GUSTIN, D. M, BRENNER, D.E. Chemoprevention of colon cancer: current status and future prospects. **Cancer Metastasis Reviews**, v. 21, n. 3-4, p. 323-48, 2002.

HANSSON, A.; BRANNING, C.; MOLIN, G.; ADAW, D.; *et al.* Blueberry Husks and Probiotics Attenuate Colorectal Inflammation and Oncogenesis, and Liver Injuries in Rats Exposed to Cycling DSS-Treatment. **PLoS ONE**, v. 7, n. 3, p. e 33510, 2012.

HAGUE, A.; BUTT, A.J.; PARASKEVA, C. The role of butyrate in human colonic epithelial cells: an energy source or inducer of differentiation and apoptosis?. **Proceedings of the Nutritional Society**. v. 55, n.3, p. 937-943, 1996.

HALLINE, A. G.; DUDEJA, P. K.; LASHNER, B. A.; BRASITUS, T. A. Urinary excretion of N1- acetylspermidine and other acetylated and free polyamines in the 1,2-dimethylhydrazine model of experimental rat colon cancer. **Cancer Research**, v. 49, p. 4721– 4723, 1989.

HANADA, Y.; IMAIZUMI, I.; KIDO, K.; TANIZAKI, T.; KOGA, M.; SHIRAISHI, H.; SOMA, M. Application of a pentafluorobenzyl bromide derivatization method in gas chromatography/mass spectrometry of trace levels of halogenated phenols in air, water and sediment samples. **Analytical Sciences**. V. 18, p. 655, 2002.

HARA, Y. Influence of tea catechins on the digestive tract. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 27, p. 52–58, 1997.

HARBORNE, J.B.; WILLIAMS, C.A. Advances in flavonoid research since 1992. **Phytochemistry**, v.55, p.481-504, 2000.

HARRISON, C. "**Quantification of Short-Chain Fatty Acids in Cecal Material by Gas Chromatography-Mass Spectrometry**". Master's Theses and Doctoral Dissertations. Thesis Submitted to the Department of Chemistry Eastern Michigan University, Ypsilanti, MI.USA, 2010.

HARTMANN, A.; SPEIT, G. The contribution of cytotoxicity to DNA-effects in the single cell gel test (comet assay). **Toxicology Letters**, v. 90, p. 183-188, 1997.

HE, J.; GIUSTI, M. Anthocyanins: Natural Colorants with Health-Promoting Properties. **Annual Reviews of Food Science and Technology**, v. 1, p. 163–87, 2010.

HEIM, K.E.; TAGLIAFERRO, A.R.; BOBILYA, D.J. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 13, p. 572-584, 2002.

HELLER, W. Flavonoid biosynthesis: an overview. In.: MIDDLETON, E.; HARBORNE, J.B. **Plant flavonoids in biology and medicine: biochemical, pharmacological, and structure-activity relationships**, New York: Alan R. Liss, 1986, p. 213.

HEO, H.J.; KIM, Y. J.; CHUNG, D.; KIM, D. Antioxidant capacities of individual and combined phenolics in a model system. **Food Chemistry**, v. 104, p. 87-92, 2007.

HODNICK, W.F.; ROETTGER, W.J.; KUNG, F.S.; BOHMONT, C.W.; PARDINI, R.S. **Progress in Clinical and Biological Research**. Edited by Cody V, Middleton E, Harborne JB: Alan R. Liss, 213 p., 1986.

HRBAC, J.; KOHEN, R. Biological redox activity: Its importance, methods for its quantification and implication for health and disease. **Drug Development Research**, v. 50, p. 516-527, 2000.

HUYCKE, M.M.; GASKINS H.R. Commensal bacteria, redox stress, and colorectal cancer: mechanisms and models. **Experimental Biology and Medicine**.v. 229, p. 586-597, 2004.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. Estimativa 2012: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA; 2012.

JAGANATH, I.B.; MULLEN, W.; LEAN, M. E. J.; EDWARDS, C. A.; CROZIER, A. In vitro catabolism of rutin by human fecal bacteria and the antioxidant capacity of its catabolites. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 47, n. 8, p. 1180-1189, 2009.

JENNER, A.M.; RAFTER, J.; HALLIWELL, B. Human fecal water content of phenolics: the extent of colonic exposure to aromatic compounds. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 38, p. 763-772, 2005.

KAHLE, K.; KRAUS, M.; SCHEPPACH, W.; RICHLING, E. Colonic availability of apple polyphenols—a study in ileostomy subjects. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 49, p. 1143-1150, 2005.

KANG, J.; LI, Z.; WU, T.; JENSEN, G.S.; SCHAUSS, A.G.; WU, X. Anti-oxidant capacities of flavonoid compounds isolated from acai pulp (*Euterpeoleracea Mart.*). **Food Chemistry**, v. 122, p. 610-617, 2010.

KANG, J.; XIE, C.; LI, Z.; NAGARAJAN, S.; SCHAUSS, A.G.; WU, T.; WU, X. Flavonoids from acai (*Euterpe oleracea Mart.*) pulp and their antioxidant and anti-inflammatory activities. **Food Chemistry**, v. 128, p. 152-157, 2011.

KILMARTIN, P. A.; ZOU, H. L.; WATERHOUSE, A. L. Correlation of Wine Phenolic Composition versus Cyclic Voltammetry Response. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 53, p. 294-392, 2002.

KILMARTIN, P.A. Electrochemical detection of natural antioxidants: principles and protocols. **Antioxidants & Redox Signaling**, v.3, p. 941-955, 2001.

KILMARTIN, P.A.; HONGLEI ZOU, H.; WATERHOUSE, A.L. A cyclic voltammetry method suitable for characterizing antioxidant properties of wine and wine phenolics. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.49, p.1957-1965, 2001.

KISELOVA, Z. Toxicological aspects of the use of phenolic compounds in disease prevention. **Interdisciplinary Toxicology**, v. 4, n.4, p. 173–183, 2011.

KUNE, G.; WATSON, L. Colorectal cancer protective effects and the dietary micronutrients folate, methionine, vitamins B6, B12, C, E, selenium, and lycopene. **Nutrition and Cancer**, v. 56, p. 11–21, 2006.

KUSKOSKI, E.M.; ASUERO, A.G.; GARCÍA-PARILLA, M.C.; TRONCOSO, A.M.; FETT, R. Atividade antioxidante de pigmentos antociânicos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 24, n. 4, p. 691-3, 2004.

KUTSCHERA, M.; ENGST W.; BLAUT M.; BRAUNE A. Isolation of catechin-converting human intestinal bacteria. **Journal of Applied Microbiology**, v. 111, n.1, p.165-175, 2011.

LEE, B.; LEE, M.; LEFEVRE, M.; KIM, H.R. Anthocyanins Inhibit Lipogenesis During Adipocyte Differentiation of 3T3-L1 Preadipocytes. **Plant Foods and Human Nutrition**, 2014.

LIBBY, P. Inflammation in atherosclerosis. **Nature**, v. 420, p.868-874, 2002.

MADHAVI, D.L.; SINGHAI, R.S.; KULKARNI, P.R. Technology aspects of food antioxidants. In: MADHAVI, D.L.; DESHPANDE, S.S.; SALUNKHE, D.K. **Food antioxidants – technological, toxicological and health perspectives**. New York: Marcel Dekker, Inc., 1995, p. 159-265.

MAKHOTKINA, O; KILMARTIN, P, A. Electrochemical oxidation of wine polyphenols in the presence of sulfur dioxide. **Analytica Chimica Acta**, v. 668, p. 155-165, 2010.

MARTIN, F. J.; WANG, Y.; SPRENGER, N.; YAP, I. K.; LUNDSTEDT, T.; LEK, P.; REZZI, S.; RAMADAN, Z.; *et al.* Probiotic modulation of symbiotic gut microbial-host metabolic interactions in a humanized microbiome mouse model. **Molecular Systems Biology**, v. 4, n. 157, 2008.

MARTIN, S.; ANDRIANTSITOHAINA, R. Mécanismes de la protection cardiaque et vasculaire des polyphénols au niveau de l'endothélium. **Annales de cardiologie et d'angéiologie**, v. 51, p. 304-315, 2002.

MATHEW, A.; PETERS, U.; CHATTERJEE, N.; KULLDORFF, M. *et al.* Fat, fiber, fruits, vegetables, and risk of colorectal adenomas. **International Journal of Cancer**, v. 108, p. 287–292, 2004.

MEDVIDOVIC-KOSANOVIC, M.; SAMARDZIC, M.; MALATESTI, N.; SAK-BOSNAR, M. Electroanalytical Characterization of a Copper(II)-Rutin Complex **International Journal of Electrochemical Science**, v. 6, p. 1075-1084, 2011.

MELO, E.A.; GUERRA, N.B. Ação antioxidante de compostos fenólicos naturalmente presente em alimentos. **Boletim da SBCTA**, v. 36, p. 1-11, 2002.

MELO, M. G. D.; DÓRIA, G. A. A.; SERAFINI, M. R.; ARAÚJO, A. A. S. Valores de referência Hematológicos e Bioquímicos de Ratos (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar) provenientes do biotério central da Universidade Federal de Sergipe. **Scientia Plena**, v. 8, n. 4, 2012.

MICHELS, K. B.; GIOVANNUCCI, E.; CHAN, A. T.; SINGHANIA, R.*et al.* Fruit and vegetable consumption and colorectal adenomas in the Nurses' Health Study. **Cancer Research**, 2006, 66, 3942–3953, 2006.

MIDDLETON, E.; KANDASWAMI, C. **The impact of plant flavonoids on mammalian biology: implications for immunity, inflammation and cancer**. In The flavonoids: advances in research since 1986. Edited by Harborne JB: Chapman and Hall, 1993, p. 619-652.

MILLIKEN, G. A.; JOHNSON, D. E. **Analysis of Messy Data**. Designed Experiments. Volume I: New York: Van Nostrand Reinhold Company, 1984.

MIYAMAE, Y.; YAMAMOTO, M.; SASAKI, Y. F.; KOBAYASHI, H.; IGARASHI SOGA, M.; SHIMOL, K.; HAYASHI, M. Evaluation of a tissue homogenization technique that isolates nuclei for the in vivo single cell gel electrophoresis (comet) assay: a collaborative study by five laboratories. **Mutation Research**, v. 418, p. 131–140. 1998.

MOLAN, A.L.; FLANAGAN, J.; WEI, W.; MOUGHAN, P.J. Selenium-containing green tea has higher antioxidant and prebiotic activities than regular green tea. **Food Chemistry**, v.114, n.3, p. 829-835, 2009.

MONTGOMERY, D. C. **Design and Analysis of Experiments**. 3rd ed. New York: John Wiley e Sons, 1991.

MOREAU, N.M.; GOUPRY, S.M.; ANTIGNAC, J.P.; MONTEAU, F.J.; LE BIZEC, B.J.; CHAMP, M.M.; MARTIN, L.J.; DUMON, H.J. **Journal of Chromatography B**, v. 784, p. 395-403, 2003.

NEGRÃO, M. R.; MARTINS, M. J.; RAMOS, E.; BARROS, H.; HIPÓLITO-REIS, C.; AZEVEDO, I. Fosfatase Alcalina Sérica Humana e Envelhecimento. **ACTA Médica Portuguesa**, v. 16, p. 395-400, 2003.

NEMA, R.; JAIN, P.; KHARE, S.; PRADHAN, A. Flavonoid and cancer prevention – Mini review. **Research in Pharmacy**, v. 2, n. 2, p. 46-50, 2012.

NUGENT, S.G.; KUMAR, D.; RAMPTON, D. S.; EVANS, D. F. Intestinal luminal pH in inflammatory bowel disease: possible determinants and implications for therapy with aminosalicylates and other drugs. **Gut**, v. 48, p.571–577, 2001.

OHNO, K.; NARNSHIMA, S.; TAKEUCHI, S.; ITOH, K.; ITOH, T.; HIOKI, K.; NOMURA, T. Effect of bacterial metabolism in the intestine on colorectal tumors induced by 1,2-dimethylhydrazine in transgenic mice harboring human prototype C-Ha-ras- genes. **Journal of Experimental and Clinical Research**, v. 20, n. 1, p. 51-56, 2001.

ORAEVEC, CT.; JONES, C.A.; HUBERMAN, E. Activation of the colon carcinogen 1,2-dimethylhydrazine in a rat colon cell-mediated mutagenesis assay. **Cancer Research**, v. 46, p. 5068–5071, 1986.

OSTLING, O.; JOHANSON, K. J. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 123, n. 1, p. 291-8, 1984.

PACHECO-PALENCIA, L. A.; DUNCAN, C. E.; TALCOTT, S. T. Phytochemical composition and thermal stability of two commercial açai species, *Euterpe oleracea* and *Euterpe precatoria*. **Food Chemistry**, v. 115, p. 1199–1205, 2009.

PADILLA, E.; RUIZ, E.; REDONDO, S.; GORDILLO-MOSCOSO, A.; SLOWING, K.; TEJERINA, T. Relationship between vasodilation capacity and phenolic content of Spanish wines. **European Journal of Pharmacology**, v. 517, p. 84-91, 2005.

PAN, M-H.; LAI, C-H.; WU, J-C.; CHI-TANG, H. Molecular mechanisms for chemoprevention of colorectal cancer by natural dietary compounds. **Molecular Nutrition and Food Research**. V. 55, p. 32–45, 2011.

PARKAR, S.G.; STEVENSON, D.E.; SKINNER, M.A. The potential influence of fruit polyphenols on colonic microflora and human gut health. **International Journal of Food Microbiology**, v. 124, n. 3, p. 295-2988, 2008.

PARR, A. J.; BOWELL, G. P. Phenols in the plant and in man. The potential for possible nutritional enhancement of the diet by modifying the phenols content or profile. **Journal of Science and Food Agriculture**, v. 80, p. 985–1012, 2000.

PENNINGTON, J.A.T. Food composition databases for bioactive food components. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 15, p. 419-434, 2002.

PIANPUMEPONG, P.; ANAL, A. K.; DOUNGCHAWEE, G.; NOOMHORM, A. Study on enhanced absorption of phenolic compounds of Lactobacillus-fermented turmeric (*Curcuma longa* Linn.) beverages in rats. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 47, n. 11, p. 2380–2387, 2012.

PIETTA, P-G. Flavonoids as Antioxidants. **Journal of Natural Products**, v. 63, n. 7, 1035-1042

POMARE, E. W.; BRANCH, W. J.; CUMMINGS, J. H. Carbohydrate fermentation in the human colon and its relation to acetate concentrations in venous blood. **Journal of Clinical Investigation**, v. 75, n. 5, p. 1448-1454, 1985.

POMPEU, D. R.; SILVA, E. M.; ROGEZ, H. Optimisation of the solvent extraction of phenolic antioxidants from fruits of *Euterpe oleracea* using response surface methodology. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 6076–6082, 2009.

POZO-INSFRAN, D.D.; PERCIVAL, S.S.; TALCOTT, S.T. Açai (*Euterpe oleracea* Mart.) polyphenolics in their glycoside and aglycone forms induce apoptosis of HL-60 leukemia cells. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.54, p.1222-1229, 2006.

PRIOR, R.L. Fruits and vegetables in the prevention of cellular oxidative damage. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.78, n.3, p. 570S-8S, 2003.

PRIOR, R.L.; WILKES, S.; ROGERS, T.; KHANAL, R. C.; WU, X.; HOWARD, L. R. Purified blueberry anthocyanins and blueberry juice alter development of obesity in mice fed an obesogenic high-fat diet. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 7, p. 3970-6, 2010

PRIOR, R.L.; WU, X.; GU, L.; HAGER, T.; HAGER, A.; WILKES, S.; HOWARD, L. Purified berry anthocyanins but not whole berries normalize lipid parameters in mice fed an obesogenic high fat diet. **Molecular Nutrition and Food Research**, 2009.

QIN, Y.; XIA, M.; MA, J.; HAO, Y.; LIU, J.; MOU, H.; CAO, L.; LING, W. Anthocyanin supplementation improves serum LDL- and HDL-cholesterol concentrations associated with the inhibition of cholesteryl ester transfer protein in dyslipidemic subjects. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 90, p. 485–492, 2009.

RATAJCZAK, C.; DUEZ, C.; GRANGETTE, C.; POCHARD, P.; TONNEL, A.; PESTE, J. Impact of lactic Acid bacteria on dendritic cells from allergic patients in an experimental model of intestinal epithelium. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2007, p. 1-9, 2007.

RIBEIRO, J.C.; ANTUNES, L.M.; AISSA, A.F.; DARIN, J.D.; DE ROSSO, V.V.; MERCADANTE, A.Z.; BIANCHI, M. DE L. Evaluation of the genotoxic and antigenotoxic effects after acute and subacute treatments with acai pulp (*Euterpe oleracea* Mart.) on mice using the erythrocytes micronucleus test and the comet assay. **Mutation Research**, v. 695, n. 2, p. 22-8, 2010.

RICE-EVANS, C.A.; MILLER, N.J.; PAGANGA, G. Antioxidant properties of phenolic compounds. **Trends in plant science**, v. 2, p. 152-159, 1997.

ROBARDS, K.; PRENZLER, P.D.; TUCKER, G.; SWATSITANG, P.; GLOVER, W. Phenolic compounds and their roles in oxidative process in fruits. **Food Chemistry**, v. 66, p.401-436, 1999.

ROGINSKY, V.; BARSUKOVA, T.; HSU, C. F.; KILMARTIN, P. A. Chain-breaking antioxidant activity and cyclic voltammetry characterization of polyphenols in a range of green, oolong, and black teas. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 5798-5802, 2003.

ROSS, J.A.; KASSUM, C.M. Dietary flavonoids: Bioavailability, metabolic effects, and safety. **Annual Review of Nutrition**, v. 22, p. 19-34, 2002.

SAIF, M. W.; ALEXANDER, D .; WICOX, C. M. Serum Alkaline Phosphatase Level as a Prognostic Tool in Colorectal Cancer: A Study of 105 patients. **The Journal of Applied Research**, v. 5, n. 1, p. 88–95, 2005 .

SCALBERT, A.; WILLIAMSON, G. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. **Journal of Nutrition**, v. 130, p. 2073S–2085S, 2000.

SCALBERT, A.; WILLIAMSON, G. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. **Journal of Nutrition**, v. 130, p. 2073S-85S, 2000.

SENGOTTUVELAN, M.; DEEPHTHA,K.; NALINI, N. Resveratrol ameliorates DNA damage, prooxidant and antioxidant imbalance in 1,2-dimethylhydrazine induced rat colon carcinogenesis. **Chemico-Biological Interactions**, v. 181, p. 193–201, 2009.

SEQUEIRA, J. L.; KOBAYASI, S. S.; RODRIGUES, M. A. Early and late effects of wound healing on development of colon tumours in a model of colon carcinogenesis by 1,2-dimethylhydrazine in the rat. **Pathology**, v. 32, p. 250–252, 2000.

SHROEDER, B. O.; WU, Z.; NUDING, S.; GROSCURTH, S.; MARCINOWSKI, M.; BEISNER, J.; BUCHNER, J.; SCHALLER, M.; STANGE, E.F.; WEHKAMP, J. Reduction of disulphide bonds unmasks potent antimicrobial activity of human beta-defensin 1. **Nature**, v. 469, p. 419-423, 2011.

SIEGEL, S.; CASTELLAN, J. R. N. J. **Estatística Não-Paramétrica para Ciências do Comportamento**. Porto Alegre: Artmed, 2ª edição, 2006.

SILVA, E.M.; POMPEU,D.R.; LARONDELLE,Y.; ROGEZ,H. Optimisation of the adsorption of polyphenols from *Inga edulis* leaves on macroporous resins using an experimental design methodology. **Separation and Purification Technology**, v. 53, n. 3, p. 274-280, 2007.

SILVA, E.M.; SOUZA, J.N.S.; ROGEZ, H.; REES, J.F.; LARONDELLE, Y. Antioxidant activities and polyphenolic contents of fifteen selected plant species from the Amazonian region. **Food Chemistry**, v. 101, p. 1012-1018, 2007.

SINGH, N.P.; MCCOY, M.T.; TICE, R. R.; SCHNEIDER, E.L.A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**, v. 175, p. 184–191, 1988.

SMITH, C. C.; O'DONOVAN,M. R.; MARTIN,E. A. HOGG1 recognizes oxidative damage using the comet assay with greater specificity than FPG or ENDODIII, **Mutagenesis**, v. 21, p. 185–190, 2006.

SOUSA, W. R.; DA ROCHA C.; CARDOSO, C. L.; SILVA, D. H. S.; ZANONI, M. V. B. Determination of relative contribution of phenolic antioxidant in orange juice by voltammetric methods. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 17, p. 619-633, 2004.

SPEIT, G.; HARTMANN, A. **The comet assay (single-cell gel test)**. In: Henderson DS (ed) *Methods in Molecular Biology*. v. 113, DNA Repair Protocols: Eukaryotic Systems. Humana Press Inc., Totowa, 1999 , 212 páginas.

SU, P.; HENRIKSSON, A.; NILSSON, C.; MITCHELL, H. Synergistic effect of green tea extract and probiotics on the pathogenic bacteria, *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus pyogenes*. **World Journal of Microbiology Biotechnology**; v. 24, p. 1837–1842, 2008.

TAKAYAMA, T.; KATSUKI, S.; TAKAHASHI, Y.; OHI, M.; NOJIRI, S.; SAKAMAKI, S.; KATO, J.; KOGAWA, K.; MIYAKE, H.; NIITSU, Y. Aberrant crypt foci of the colon as precursors of adenoma and cancer. **The New England Journal of Medicine**, v. 339, p. 1277–1284, 1988.

TAPPENDEN, K.A.; DEUTSCH, A.S. The physiological relevance of the intestinal microbiota. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 26, n. 6, p. 679S-683S, 2007.

TEISSEDRE, P.L.; FRANKEL, E.N.; WATERHOUSE, A.L.; PELEG, H.; GERMAN, J.B. Inhibition of in Vitro human LDL oxidation by phenolic antioxidant from grapes and wines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 70, p. 55-61, 1996.

The SAS System for Windows (Statistical Analysis System), versão 9.2 SAS Institute Inc, 2002-2008, Cary, NC, USA.

TOPPING, D.L.; CLIFTON, P.M. Short-chain fatty acids and human colonic function: roles of resistant starch and nonstarch. **Physiological Reviews**, v. 81, p. 1031-64, 2000.

TSUDA, T.; HORIO, F.; OSAWA, T. The role of anthocyanins as an antioxidant under oxidative stress in rats. **Biofactors**, v.13, n. 1-4, p. 133-139, 2000.

WARGOVICH, M. J.; CHEN, C. D.; HARRIS, C.; YANG, E.; VELASCO, M. Inhibition of aberrant crypt growth by non-steroidal anti-inflammatory agents and differentiation agents in the rat colon. **International Journal of Cancer**, v. 60, p. 515–519, 1995.

WOLLOWSKI, I.; RECHKEMMER, G.; POOL-ZOBEL, B.L. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.73, p. 451S-455S, 2001.

WU, T.; TANG, Q.; YU, Z.; GAO, Z.; HU, H.; CHEN, W.; ZHENG, X.; YU, T. Inhibitory effects of sweet cherry anthocyanins on the obesity development in C57BL/6 mice. **International Journal of Food Science Nutrition**, 2013.

YANG, C. S.; LANDAU, J. M.; HUANG, M. T.; NEWMARK, H. L. Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds. **Annual Review of Nutrition**, v. 21, p. 381-406, 2001.

YANG, C.S.; LANDAU, J.M.; HUANG, M.T.; NEWMARK, H.L. Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds. **Annual Review Nutrition**, v.21, p. 381-406, 2001.

YODA, Y.; HU, Z.-Q.; ZHAO, W.-H.; SHIMAMURA, T. Different susceptibilities of Staphylococcus and gram-negative rods to epigallocatechin gallate. **Journal Of Infection And Chemotherapy: Official Journal Of The Japan Society Of Chemotherapy**, v. 10, p. 55–58, 2004.

ZAGO, M.A *et al.* **Hematologia: fundamentos e prática**. Ed. rev. e atual. São Paulo: Atheneu, 2004. 1081p.

ANEXOS



UNICAMP



CEUA/Unicamp

**Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/Unicamp**

CERTIFICADO,

Certificamos que o projeto "Influência dos compostos fenólicos de frutas no desenvolvimento de probióticos e de outros biomarcadores do câncer de colón em ratos Wistar" (protocolo nº 2655-1), sob a responsabilidade de Profa. Dra. Gláucia Maria Pastore / Patrícia Brito Sampaio, está de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotados pela **Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL)** e com a legislação vigente, **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, e o **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP - em 26 de março de 2012.

Campinas, 26 de março de 2012.

Profa. Dra. Ana Maria A. Guinaldo
Presidente

Fátima Alonso
Secretária Executiva

	AMAZON DREAMS IND. E COM. LTDA <i>Antioxidant Technology</i> Rua Augusto Corrêa, 01, UFPA, PIEBT, sala 11 Guamá, Belém, Pará, Brazil. 66075-990 Phone: +55 91 3269 1001 Skype: amazon_dreams E-mail: contato@amazondreams.com.br	PRODUCT SPECIFICATION SHEET PURIFIED AÇAÍ Organic fruits of <i>Euterpe oleracea</i> palm	Number of Pages: 1 Creation Date: December 10, 2010 Revision Date: February 15, 2011 Code: Purified Açaí

OBTENTION MODE:

Purified açai is obtained from fruits of *Euterpe oleracea* through of the processes of aqueous mechanical extraction, concentration onto synthetic resins and freeze-drying.

PRODUCT CHARACTERISTICS

Botanical Name	<i>Euterpe oleracea</i>	Moisture (%)	< 4
Plant Part	Whole fruit	Standard Plate Count	< 100 / g
Origin	Brazilian Amazon	Yeast and Mould	< 50 / g
Flavour	Characteristic	Coliforms	< 10 / g
Colour	Dark purple colour	E. Coli	Negative
Appearance	Powder	Salmonella	Negative
Preservatives	None		
Storage Temperature	room temperature		
Availability	July – December		

TECHNICAL INFORMATION

PPO	(UI)	< 0.01
Anthocyanins	(mg/100g)	> 16,000
Total Phenolics	(mg Eq. gallic acid/100g)	> 45,000
ORAC _{FL}	(µmol Eq. trolox/100g)	> 360,000

PACKAGING

Plastic buckets with inner bags 5-20 kg.

SHELF-LIFE

24 months from shipping date.

APPLICATIONS

Preparation of milk drinks, teas, fruit drinks, energy, nectars, ice cream, dairy desserts, natural dyes, cosmetics, etc.

Recommended in nutrition of diabetics.

Organic product registered by IBD.

Technical Lead: **QUARESMA DA SILVA Ivonete**