



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
INSTITUTO DE TECNOLOGIA  
CURSO DE MESTRADO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**

**CAMILA TRAVASSOS DA ROSA MOREIRA BASTOS**

**AVALIAÇÃO DAS TAXAS DE ABSORÇÃO E EXCREÇÃO DE  
COMPOSTOS FENÓLICOS DO AÇAÍ (*Euterpe oleracea*) EM  
HUMANOS**

Belém-PA

2009



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ**  
**INSTITUTO DE TECNOLOGIA**  
**CURSO DE MESTRADO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**

**CAMILA TRAVASSOS DA ROSA MOREIRA BASTOS**

**AVALIAÇÃO DAS TAXAS DE ABSORÇÃO E EXCREÇÃO DE  
COMPOSTOS FENÓLICOS DO AÇAÍ (*Euterpe oleracea*) EM  
HUMANOS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Pará, para obtenção do grau de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Yvan Larondelle

Co-orientador: Prof. Dr. Hervé Rogez

Belém-PA

2009



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
INSTITUTO DE TECNOLOGIA  
CURSO DE MESTRADO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**

**CAMILA TRAVASSOS DA ROSA MOREIRA BASTOS**

**AVALIAÇÃO DAS TAXAS DE ABSORÇÃO E EXCREÇÃO DE COMPOSTOS  
FENÓLICOS DO AÇAÍ (*Euterpe oleracea*) EM HUMANOS**

BANCA EXAMINADORA

---

**Prof. Dr. Yvan Larondelle**  
(BNUT/ISV/UCL – Orientador)

---

**Prof. Dr. Hervé Louis Ghislain Rogez**  
(FEA/ITEC/UFPA – Co-orientador)

---

**Prof. Dr. José Guilherme Maia**  
(FEA/ITEC/UFPA – Membro)

---

**Prof. Dr. Luiz Carlos Santana da Silva**  
(ICB/UFPA – Membro)

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por estar sempre presente em minha vida, iluminando meu caminho e me dando forças nos momentos de dificuldades.

Aos meus orientadores Profs. Yvan Larondelle e Hervé Rogez, por todos esses anos de orientação, por todo conhecimento que me foi repassado e por todas as oportunidades que me foram dadas, que permitiram meu crescimento científico.

Aos Profs. José Guilherme Maia e Luiz Carlos da Silva, pelas valiosas contribuições a este trabalho.

À Fapespa pelo auxílio financeiro.

Ao Dr. Paulo Azevedo por me conceder o espaço físico de um de seus laboratórios para a realização do meu experimento.

Aos Drs. Jesus Souza e Evaldo Silva, agradeço por sempre estarem dispostos a ajudar, a tirar dúvidas e a compartilhar seus conhecimentos.

Aos meus amigos Anne Suellen, Evelyn Damasceno, Fábio Moura, Lorena Maciel e Thais Franco, que tornaram esses anos de mestrado muito mais prazerosos.

Ao Adriano Calandrini, Antônio Alves, Fagner Aguiar, Jesus Souza, Jonas Mangabeira, Leandro Marinho, Maurício Castro, Rogério Migdon, Rosinelson Pena e Stéphan Leão, pela preciosa ajuda para a realização deste trabalho. Muito obrigada!

Aos colegas de laboratório Braz Sarubi, Caroline Santos, Fabrício Silva, Ingrid Martins, Ivonete Quarema, Livia Miyagawa, Marcelo Rodrigues, Marília Cavalcante, Priscila Alamar, Priscylla Barbosa, Rebeca de Souza, Socorro Bezerra, Taiana Ladeira e Tatiana Tolosa, por sempre estarem dispostos a ajudar.

Aos meus pais Antonio Claudio e Ana Regina, agradeço por tudo que sou, tudo que conquistei, por sempre me apoiarem e acreditarem em mim. Vocês são os responsáveis pelos meus sonhos transformarem-se em realidade. Amo vocês!

À minha irmã Renata, pela companhia insubstituível, pelas palavras certas na hora certa e pelo carinho. Minha admiração por você cresce a cada dia!

Às minhas amadas avós Maria de Nazaré (*in memoriam*) e Helena Bastos, por serem mulheres fortes, lutadoras e com um coração precioso, que me repassaram ensinamentos da vida.

À minha segunda mãe, Ivone Bastos, por estar sempre presente na minha vida, pela companhia, pelo apoio e pelo carinho incondicionais.

À todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

...

*E tua fruta vai rolando  
Para os nossos alguidares  
Tu te entregas ao sacrifício  
Fruta santa, fruta mártir  
Tens o dom de seres muito  
Onde muitos não têm nada  
Uns te chamam açazeiro  
Outros te chamam juçara*

...

Sabor Açai

Nilson Chaves e João Gomes

*Ao meu pai Antonio Claudio,  
minha mãe Ana Regina e  
minha irmã Renata, por serem  
as pessoas que dão sentido à  
minha vida.*

## RESUMO

*Euterpe oleracea* Martius (açazeiro) é uma palmeira abundante na Região Amazônica. O açaí ou bebida açaí, preparada de seus frutos, tem sido recentemente reconhecida pela sua alta capacidade antioxidante, principalmente devido à alta concentração em compostos fenólicos. Altas concentrações de antocianinas (cianidina-3-glicosídeo, C3G e cianidina-3-rutinosídeo, C3R) são responsáveis pela coloração roxa do açaí. Com o objetivo de avaliar a absorção e excreção dos compostos fenólicos do açaí e evolução na capacidade antioxidante em humanos, foi realizado um experimento em dois finais de semana consecutivos. No primeiro final de semana os voluntários foram submetidos a uma dieta sem o consumo de açaí e no segundo final de semana eles receberam a mesma dieta com 500 mL de açaí contendo 354,5 mg de antocianinas (41,9±1,4 mg C3G e 312,6±2,0 mg C3R). Amostras de plasma e urina foram coletadas antes e após (30 min, 1, 2, 3, 4 e 6h para o plasma e nos intervalos de 0-2, 2-4, 4-6, 6-8, 8-12, 12-24h para a urina) a tomada de açaí. Foram coletadas duas amostras de fezes em cada final de semana, antes e após o consumo de açaí. Não foram encontradas antocianinas no plasma dos voluntários e a capacidade antioxidante plasmática não apresentou diferença significativa antes e após o consumo de açaí. Na urina, não foram encontradas antocianinas no primeiro final de semana. No segundo fim de semana, a massa total média excretada de antocianinas foi de 6.688 ± 2.884 ng C3G e 47.299 ± 16.559 ng C3R, o que corresponde a 0,016% e 0,015%, respectivamente, do total ingerido. A excreção urinária máxima ocorreu no intervalo de 2-4h após o consumo de açaí, que foi estatisticamente diferente dos intervalos de 8-12h e 12-24h ( $p < 0,1$ ) para C3G e 0-2h ( $p < 0,1$ ) 8-12h ( $p < 0,1$ ) e 12-24h ( $p < 0,05$ ) para C3R. As análises de ORAC, TEAC, PT e DPPH mostraram que houve um aumento significativo na capacidade antioxidante das fezes após o consumo de açaí ( $p < 0,1$ ). Na análise de colorimetria tristímulo das fezes,  $\Delta b$  foi o parâmetro que apresentou maior variação após o consumo de açaí ( $p < 0,05$ ), indicando que a amostra se afasta da região do amarelo, adquirindo uma coloração que tende para o azul. Os valores de  $\Delta L$  diminuíram significativamente ( $p < 0,1$ ), indicando o escurecimento das fezes.

**Palavras-chave:** *Euterpe oleracea*, absorção, excreção, compostos fenólicos.

## ABSTRACT

*Euterpe oleracea* Martius (açazeiro) is a palm tree widespread in the Amazonian region. Açai juice, prepared from its fruits, has been recently recognized for its high antioxidant capacity, mainly due to a high concentration in phenolic compounds. High concentrations in anthocyanins (cyanidin-3-glucoside, C-3-G and cyanidin-3-rutinoside, C-3-R) are responsible of the black purple color of açai juice. In order to evaluate the absorption and excretion of phenolic compounds of açai and the evolution of the antioxidant capacity in humans, an experiment with six healthy male volunteers was carried out in two consecutive weekends. In the first weekend, the volunteers received a diet without açai and in the second weekend they received the same diet with 500 mL of açai containing 354.5 mg anthocyanins (41.9±1.4 mg C-3-G and 312.6±2.0 mg C-3-R). Plasma and urine samples were collected before and after (30 min, 1, 2, 3, 4 e 6h for plasma and in intervals of 0-2, 2-4, 4-6, 6-8, 8-12, 12-24h for urine) they took açai. Samples feces were collected in each weekend, before and after açai consumption. Anthocyanins were not found in plasma of any volunteer and the plasma antioxidant capacity did not show a significant difference before and after açai consumption. In urine, anthocyanins were not found in the first weekend. In the second weekend, the anthocyanins average total mass excreted was 6,688 ng C-3-G and 47,299 ng C-3-R, wich corresponds to 0.016% and 0.015%, respectively, of the total ingested. The maximum urinary excretion occurred in the interval of 2-4h after açai consumption, that was statistically different from the intervals of 8-12h and 12-24h ( $p<0.1$ ) for C3G and 0-2h ( $p<0.1$ ) 8-12h ( $p<0.1$ ) and 12-24h ( $p<0.05$ ) for C3R. ORAC, TEAC, PT and DPPH analysis showed a significant increase in feces antioxidant capacity after açai consumption ( $p<0.1$ ). In tristimulus colorimetry feces analysis,  $\Delta b$  was the parameter that showed greater variation after açai consumption ( $p<0.05$ ), indicating that the samples moves away from the yellow region, taking a color that tends towards blue. The values of  $\Delta L$  had diminished significantly ( $p<0.1$ ), indicating the darkening of feces.

**Key words:** *Euterpe oleracea*, absorption, excretion, phenolic compounds.



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> O açazeiro.....	17
<b>Figura 2.</b> Frutos do açazeiro.....	18
<b>Figura 3.</b> A bebida açai.....	19
<b>Figura 4.</b> Fórmula química dos flavonóides.....	26
<b>Figura 5.</b> Sistema digestivo.....	32
<b>Figura 6.</b> Transporte da glicose nas células epiteliais do intestino. ....	34
<b>Figura 7.</b> Resumo do mecanismo de absorção dos lipídeos no organismo humano. ....	39
<b>Figura 8.</b> Estrutura química do galotanino 2-O-digaloil-1,3,4,6-tetra-O-galoil- $\beta$ -D-glicopirranose. .....	47
<b>Figura 9.</b> Resumo da formação dos metabólitos e conjugados dos flavonóides em humanos. ....	53
<b>Figura 10.</b> Estrutura molecular das antocianinas.....	57
<b>Figura 11.</b> Coleta de sangue.....	61
<b>Figura 12.</b> Esquema dos tempos de coleta de sangue.....	62
<b>Figura 13.</b> Esquema dos tempos de coleta de urina.....	62
<b>Figura 14.</b> Centrifugação do sangue (A); obtenção do plasma humano (B). ....	65
<b>Figura 15.</b> Amostras de urina sendo saturadas com nitrogênio gasoso (A) e amostras biológicas congeladas em gelo seco (B). ....	65
<b>Figura 16.</b> Cálculo para o método ORAC: Capacidade antioxidante da amostra testada expressa como área sob a curva (AUC).....	68
<b>Figura 17.</b> Fluxograma das etapas de extração em fase sólida das amostras biológicas.....	71
<b>Figura 18.</b> Estrutura química das duas antocianinas encontradas no açai: (A) cianidina-3- glicosídeo e (B) cianidina-3-rutinosídeo. ....	75
<b>Figura 19.</b> Cromatograma do açai grosso consumido pelos voluntários participantes da pesquisa no segundo fim de semana após o almoço ( $\lambda=515$ nm). ....	76
<b>Figura 20.</b> Valores médios ORAC do plasma dos 6 voluntários antes e 6 horas após o consumo de açai grosso no segundo fim de semana do experimento.....	78
<b>Figura 21.</b> Gráfico dos valores médios de ORAC da urina dos 6 voluntários no decorrer dos intervalos de tempo indicados antes e após o consumo de açai grosso.. ....	81
<b>Figura 22.</b> Cromatograma obtido a 515 nm da amostra de urina de um dos voluntários da pesquisa no segundo fim de semana, no intervalo de 2-4 horas após o consumo de açai grosso.....	85

<b>Figura 23.</b> Massa de C3G na urina antes e em intervalos de tempo de até 24 horas após a ingestão de açaí grosso no segundo fim de semana do experimento. ....	86
<b>Figura 24.</b> Massa de C3R na urina antes e em intervalos de tempo de até 24 horas após a ingestão de açaí grosso no segundo fim de semana do experimento. ....	87
<b>Figura 25.</b> Valores médios ORAC das fezes dos 6 voluntários sem e com o consumo de açaí grosso. ....	92
<b>Figura 26.</b> Valores médios TEAC das fezes dos 6 voluntários sem e com o consumo de açaí grosso. ....	93
<b>Figura 27.</b> Valores médios de polifenóis totais (PT) das fezes dos 6 voluntários sem e com o consumo de açaí grosso. ....	94
<b>Figura 28.</b> Valores médios DPPH das fezes dos 6 voluntários sem e com o consumo de açaí grosso. ....	95
<b>Figura 29.</b> Diagrama de cromaticidade $a^*$ , $b^*$ . ....	97

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Composição e concentração dos compostos fenólicos da polpa fresca do açaí segundo Pacheco-palencia e colaboradores (2007).....	23
<b>Tabela 2.</b> Identificação e quantificação das antocianinas e outros flavonóides de açaí liofilizado segundo Schauss e colaboradores (2006).....	23
<b>Tabela 3.</b> Perfil dos participantes da pesquisa.....	60
<b>Tabela 4.</b> Gradiente utilizado para a identificação e quantificação dos compostos fenólicos presentes no açaí e nas amostras biológicas.....	72
<b>Tabela 5.</b> Caracterização do açaí grosso ministrado aos voluntários no segundo fim de semana. ....	74
<b>Tabela 6.</b> Média e desvio padrão dos valores de ORAC do plasma dos 6 voluntários pelo intervalo de tempo no segundo fim de semana (com o consumo de açaí) e resultados do teste de Tukey. ....	79
<b>Tabela 7.</b> Média e desvio padrão dos valores de ORAC da urina dos 6 voluntários pelo intervalo de tempo no segundo fim de semana (com o consumo de açaí) e resultados do teste de Tukey.....	82
<b>Tabela 8.</b> Média e desvio padrão dos valores de C3G e C3R da urina dos 6 voluntários pelo intervalo de tempo no segundo fim de semana (com o consumo de açaí) e resultados do teste de Tukey. ....	88
<b>Tabela 9.</b> Média e desvio padrão dos valores de ORAC, PT, TEAC e DPPH das fezes dos 6 voluntários pelo tempo nos dois fins de semana (sem e com o consumo de açaí) e resultados do teste de Tukey. ....	91
<b>Tabela 10.</b> Média e desvio padrão das coordenadas de cor das fezes dos 6 voluntários pelo tempo nos dois fins de semana (sem e com o consumo de açaí) e resultados do teste de Tukey.....	96

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1.</b> Teores em nutrientes do açaí em relação à matéria seca, projeção por litro de açaí médio (a 12,5% de M.S.) e recomendações nutricionais.....	21
<b>Quadro 2.</b> Subclasse dos flavonóides monoméricos, seus principais representantes e exemplos de fontes alimentares.....	44
<b>Quadro 3.</b> Dieta fornecida aos voluntários no primeiro fim de semana (sem açaí).....	63
<b>Quadro 4.</b> Dieta fornecida aos voluntários no segundo fim de semana (com açaí). ....	63

## LISTA DE ABREVIATURAS

$\beta$ -PE:  $\beta$ -Ficoeritrina

AAPH: 2,2'-Azinobis (-amidinopropano) dihidroclorato

ABTS<sup>•+</sup>: (ácido 2'-azinobis (3-etilbenzeno-tiazolina-6-sulfônico)

AUC: Area Under the Curve (Área Sob a Curva)

C3G: Cianidina-3-glicosídeo

C3R: Cianidina-3-rutinosídeo

CLAE: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

DPPH: 2,2-difenil-1-picrilidrazil

EAG: Equivalentes de Ácido Gálico

ET: Equivalente Trolox

FRAP: Ferric Reducing Ability of Plasma (Habilidade Redutora do Ferro Plasmático)

HDL: High Density Lipoprotein (Lipoproteína de Alta Densidade)

LDL: Low Density Lipoprotein (Lipoproteína de Baixa Densidade)

ORAC: Oxygen Radical Absorbance Capacity (Capacidade de Absorbância do Radical Oxigênio)

PT: Polifenóis Totais

RFC: Reagente de Folin-Ciocalteu

TEAC: Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (Capacidade Antioxidante do Equivalente Trolox)

TFA: Ácido Trifluoroacético

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>15</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>17</b>
2.1. O AÇAÍ .....	17
2.1.1. Generalidades .....	17
2.1.2. Composição Nutricional do Açaí.....	20
2.2. ANTIOXIDANTES .....	24
2.2.1. Definição.....	24
2.2.2. Mecanismos de ação .....	24
2.2.3. Compostos fenólicos e a atividade antioxidante .....	25
2.2.4. Medidas da atividade antioxidante .....	27
2.2.4.1. Método DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazil) .....	28
2.2.4.2. Método TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity).....	29
2.2.4.3. Método ORAC (Oxygen Radical absorbance Capacity) .....	29
2.2.4.4. Método dos Polifenóis Totais usando o reagente de Folin-Ciocalteu .....	30
2.3. PROCESSOS DIGESTIVO E ABSORTIVO.....	31
2.3.1. Carboidratos digestíveis e fibras .....	33
2.3.2. Proteínas .....	36
2.3.3. Lipídeos.....	37
2.4. ABSORÇÃO NO INTESTINO GROSSO: FORMAÇÃO DAS FEZES .....	40
2.4.1. Absorção e secreção de eletrólitos e de água .....	41
2.4.2. Composição das fezes.....	41
2.5. OS COMPOSTOS FENÓLICOS .....	42
2.5.1. Classificação.....	42
2.5.1.1. Ácidos fenólicos .....	42
2.5.1.2. Os Flavonóides .....	42
2.5.1.3. Os Taninos.....	46
2.5.1.4. As lignanas .....	48
2.5.1.5. As ligninas.....	48
2.5.2. Efeitos biológicos .....	48
2.5.3. Biodisponibilidade e metabolismo .....	50
2.5.4. Metabólitos microbianos dos compostos fenólicos.....	55
2.5.5. As antocianinas .....	56
2.5.5.1. Generalidades.....	56
2.5.5.2. Biodisponibilidade e possíveis efeitos biológicos.....	57
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>60</b>

3.1. SELEÇÃO E PERFIL DOS VOLUNTÁRIOS.....	60
3.2. AMOSTRAS DE AÇAÍ.....	61
3.3. PLANEJAMENTO DO EXPERIMENTO.....	61
3.4. CONDICIONAMENTO DAS AMOSTRAS DE SANGUE, URINA E FEZES .....	64
3.5. ANÁLISES DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE .....	65
3.5.1. Polifenóis totais.....	66
3.5.2. ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) .....	67
3.5.3. TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) .....	68
3.5.4. DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazil).....	70
3.6. IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS .....	71
3.6.1. Extração em fase sólida.....	71
3.6.2. Análise de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em fase reversa .....	72
3.7. DETERMINAÇÃO DA COR.....	72
3.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	73
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÕES .....</b>	<b>74</b>
4.1. CARACTERIZAÇÃO DO AÇAÍ.....	74
4.2. PLASMA.....	77
4.2.1. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência .....	77
4.2.2. Capacidade Antioxidante .....	78
4.3. URINA .....	81
4.3.1. Capacidade Antioxidante .....	81
4.3.2. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência .....	84
4.4. FEZES.....	90
4.4.1. Capacidade Antioxidante .....	90
4.4.2. Análise de Colorimetria Tristímulo.....	96
<b>5. CONCLUSÕES.....</b>	<b>99</b>
<b>6. PERSPECTIVAS .....</b>	<b>100</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>101</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>114</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Estudos epidemiológicos têm demonstrado que dietas ricas em alimentos de origem vegetal protegem os seres humanos contra doenças degenerativas como o câncer e doenças cardiovasculares. Os alimentos de origem vegetal contêm fibras, vitaminas, fitosteróis, compostos sulfurados, carotenóides e ácidos orgânicos, os quais contribuem para os efeitos benéficos à saúde. Esses alimentos também apresentam em sua composição uma variedade de compostos fenólicos, que são cada vez mais considerados agentes eficazes de proteção (MANACH *et al.*, 2005).

Entre os compostos fenólicos, as antocianinas merecem um lugar de destaque por apresentarem ações funcionais e por serem responsáveis pela coloração da maior parte das frutas e das folhas. Os frutos do açaizeiro constituem um exemplo de alimento rico em antocianinas (ROGEZ, 2000).

Os benefícios do açaí têm sido cada vez mais explorados devido às características da sua composição. Sampaio (2006) avaliou as propriedades funcionais do açaí em plasma humano e seus resultados sugerem que o consumo de açaí possui efeito anti-aterosclerótico por meio da inibição significativa da peroxidação das LDL (Low Density Lipoprotein – Lipoproteína de Baixa Densidade) em homens que poderiam ser qualificados como pessoas com risco para esta doença. Neste mesmo trabalho foi observada uma tendência ao aumento da capacidade antioxidante, analisada por meio da metodologia ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity - Capacidade de Absorbância do Radical Oxigênio) em um grupo composto de voluntários menos expostos aos fatores de risco de doenças cardiovasculares.

Porém, os efeitos dos componentes alimentares são dependentes de seu comportamento no trato digestivo (WILLIAMSON; MANACH, 2005), pois uma vez que estes são metabolizados no organismo, a forma resultante pode apresentar um comportamento fisiológico diferente da forma nativa, presente no alimento ingerido (KROON *et al.*, 2004).

Vários estudos têm demonstrado que as antocianinas intactas são pouco absorvidas e são excretadas somente em pequena quantidade na urina. Esses compostos também sofrem metabolismo, uma vez que parte das antocianinas



absorvidas foram encontradas nas formas metilada, sulfatada ou glucuronidada (AURA *et al.*, 2005).

Neste contexto, este trabalho tem por objetivos gerais:

- Avaliar a absorção e excreção dos compostos fenólicos do açaí em humanos;
- Avaliar a evolução na capacidade antioxidante de material biológico de humanos após consumo de açaí.

Os objetivos específicos do estudo englobam:

- Determinar a concentração dos compostos fenólicos do açaí, com destaque especial às antocianinas, em plasma humano por meio de cromatografia líquida de alta eficiência, avaliando, desta maneira, a taxa de absorção dos mesmos;
- Quantificar os compostos fenólicos na urina dos voluntários humanos por meio de cromatografia líquida de alta eficiência, visando avaliar a taxa de excreção;
- Avaliar possíveis alterações, a curto prazo, na capacidade antioxidante do plasma, urina e fezes humanos após o consumo de açaí grosso, por meio de metodologias distintas;
- Determinar possíveis alterações na cor das fezes após o consumo da bebida açaí.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. O AÇAÍ

#### 2.1.1. Generalidades

A palmeira *Euterpe oleracea* Martius é vulgarmente conhecida no Brasil e na Região Amazônica como açazeiro (Figura 1). É uma das mais típicas do Pará, possuindo seguramente seu indigenato, em razão de sua importância alimentar, especialmente entre as classes sociais média e baixa (CAVALCANTE, 1976).

O açazeiro, originário do estuário do Rio Amazonas, é encontrado nas matas de terra-firme, igapó e, sobretudo, nas áreas de várzea. Cresce em forma de touceira, a qual é constituída por estipes. No açazeiro, exploram-se principalmente dois produtos: o palmito e os frutos (ROGEZ, 2000).



**Figura 1.** O açazeiro.

**Fonte:** ROGEZ (2000).

A frutificação do açazeiro pode ocorrer durante o ano inteiro, porém em períodos distintos que dependem das condições ambientais, da localização geográfica e das práticas de cultivo, sendo que no município de Belém a safra ocorre no verão, entre os meses de agosto e dezembro. Este é o período de maior abundância do fruto tuíra, o qual é de maturação ideal, apresentando máculas brancacentas de cerosidade, proporcionando suco de melhor qualidade (CAVALCANTE, 1976).

Os frutos, mostrados na Figura 2, são de cor verde antes de maduros e permanecem nesta cor no caso das variedades Verde e Tinga. No caso da variedade Preto, os frutos se tornam violeta/púrpura muito escura. As variedades dos frutos se diferenciam de acordo com características fenotípicas e pela presença ou não de antocianinas. A polpa do fruto representa 5% a 15% de seu volume, variando de acordo com tipo e grau de maturidade (ROGEZ, 2000).



**Figura 2.** Frutos do açazeiro.

**Fonte:** ROGEZ (2000).

Os frutos do açazeiro fornecem um subproduto: “o açai” ou “bebida açai”, que está ilustrado na Figura 3. De acordo com Rogez (2000), o preparo desta bebida se faz tradicionalmente em duas etapas: na primeira, com o amolecimento dos frutos na água morna e na segunda, pelo despulpamento dos mesmos mediante máquinas convencionais, com a adição de água.

Segundo a legislação do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2000), de acordo com a adição ou não de água e seus quantitativos, o produto é classificado em:

a) Polpa de açaí: é a polpa extraída do açaí, sem adição de água, por meios mecânicos e sem filtração, podendo ser submetido a processo físico de conservação.

b) Açaí grosso ou especial (tipo A): é a polpa extraída com adição de água e filtração, apresentando acima de 14% de sólidos totais e uma aparência muito densa.

c) Açaí médio ou regular (tipo B): é a polpa extraída com adição de água e filtração, apresentando acima de 11 a 14% de sólidos totais e uma aparência densa.

d) Açaí fino ou popular (tipo C): é a polpa extraída com adição de água e filtração, apresentando de 8 a 11% de sólidos totais e uma aparência pouco densa.



**Figura 3.** A bebida açaí.

**Fonte:** ROGEZ; PENA (2009)<sup>1</sup>.

Para Calzavara (1976), esta bebida faz parte do hábito alimentar da população paraense, principalmente do interior do Estado, nas camadas de baixa renda e nos centros urbanos. Estes segmentos da população estadual têm a bebida açaí como um dos componentes básicos de sua alimentação.

No meio rural, o açaí é consumido 3 vezes por dia (principais refeições) durante o ano todo e desde os 6 meses de idade; no meio urbano, é geralmente tomado uma

---

<sup>1</sup> ROGEZ, H.; PENA, R.S. Olhares cruzados sobre o açaí (inédito).

única vez ao dia, no almoço ou é ocasionalmente adotado como sobremesa com açúcar (ROGEZ, 2000).

Por ser considerado uma fruta exótica e pelas suas propriedades calóricas, medicinais e nutricionais, observa-se uma crescente demanda do açaí em nível nacional, principalmente na Região Centro-Sul, nos Estados do Rio de Janeiro e São Paulo. O público alvo específico é a jovem “geração saúde”, que foi atraída graças a essas propriedades. Nestas regiões, o açaí é comercializado sob forma congelada e freqüentemente muito diluído (ROGEZ, 2000).

Este hábito alimentar desencadeia uma atividade produtiva econômica e socialmente relevante na economia informal do Estado do Pará, por ser responsável pela geração de um grande número de empregos informais diretos, que se distribuem na produção e comercialização da bebida, e indiretos, como a produção artesanal de pães, os quais são utilizados no armazenamento dos frutos (CALZAVARA, 1976).

### **2.1.2. Composição Nutricional do Açaí**

O consumo médio diário pela população do interior paraense é de aproximadamente um litro de açaí, fino ou médio por pessoa.

Considerando o consumo de um litro de açaí médio (a 12,5% de matéria seca), pode-se quantificar os nutrientes ingeridos por esta população e compará-los com as recomendações nutricionais. A composição nutricional do açaí está apresentada no Quadro 1 (os valores são expressos em base de matéria seca, em virtude da grande variedade de resultados obtidos em relação ao teor em água do alimento em questão).

**Quadro 1.** Teores em nutrientes do açaí em relação à matéria seca, projeção por litro de açaí médio (a 12,5% de M.S.) e recomendações nutricionais.

Variável	Geral			Teor /L açaí	Qtd recom.	% Qtd recom.
	X	S	n			
pH	5,23	0,27	129	-	-	-
Matéria graxa (%)	52,64	5,23	124	65,8 g	100 g	66
Mat. Nitrog. total (%)	10,05	1,15	129	12,6 g	40-50 g	25-31
Glicose (%)	1,55	0,50	32	1,9 g		
Frutose (%)	1,36	0,69	32	1,7 g	55-72 g	5-7
Sacarose (%)	0,05	0,09	32	0,06 g		
Fibras (%)	25,22	6,71	14	31,5 g	35 g	90
Cinzas totais (%)	3,09	0,84	127	3,86 g	-	-
Anto. (mg/kg frutos)	440	221	60	-	-	-
Ca (g/kg M.S.)	3,09	1,04	127	386 mg	900 mg	43
P (g/kg M.S.)	1,47	0,52	127	184 mg	800 mg	23
Mg (g/kg M.S.)	1,78	0,53	127	222 mg	375 mg	59
K (g/kg M.S.)	9,90	3,37	127	1,2 g	1,6-3,1 g	39-75
Na (g/kg M.S.)	0,76	0,42	127	95 mg	575-3500 mg	3-16
Zn (mg/kg M.S.)	17,30	6,42	127	2,2 mg	15 mg	15
Cd (mg/kg M.S.)	0,46	0,15	127	57 µg	-	-
B (mg/kg M.S.)	15,84	4,36	127	2,0 mg	1,3 mg	> 100
Fe (mg/kg M.S.)	20,59	7,26	127	2,6 mg	11 mg	23
Mn (mg/kg M.S.)	323	174	127	40,4 mg	2-5 mg	> 100
Cu (mg/kg M.S.)	13,76	4,40	127	1,72 mg	1,1 mg	> 100
Ni (mg/kg M.S.)	2,03	0,96	127	254 mg	400 mg	63
Cr (mg/kg M.S.)	5,31	2,23	127	664 µg	50-100 µg	> 100

**Fonte:** ROGEZ (2000).

Legenda: X = valor médio; S = desvio padrão; n = número de amostras analisadas;

Qtd. recom. = quantidade recomendada para um homem adulto de 25 a 45 anos, de peso médio; M.S. = matéria seca; anto. = antocianinas.

O açaí é um alimento altamente calórico devido ao seu elevado teor em lipídeos totais, seu principal componente em termos quantitativos, cuja contribuição é superior a 65% do valor diário recomendado. Ele também constitui uma excelente contribuição em  $\alpha$ -tocoferol, fibras, manganês, cobre, boro e cromo, acima de 65% do valor recomendado (ROGEZ, 2000).

De acordo com Rogez (2000), o açaí constitui uma fonte considerável de  $\alpha$ -tocoferol (45mg / 100g de matéria seca), visto que sua recomendação varia de 5 a 15mg/dia para um adulto. No que diz respeito à matéria nitrogenada total observa-se um teor elevado (10,05% em relação à matéria seca) em comparação com outros frutos.

O fruto fornece também quantidades notáveis, entre 25% e 65% do valor recomendado, de proteínas, cálcio, magnésio, potássio e níquel. É pobre, inferior a 25% do valor recomendado, em açúcares totais, fósforo, sódio, zinco e ferro (ROGEZ, 2000).

O teor de glicídios assimiláveis no açaí (glicose, frutose e sacarose) é relativamente baixo (2,96% da matéria seca). A quantidade de glicose e frutose presentes nos frutos corresponde a 1,55% e 1,36%, respectivamente, em relação à matéria seca. A sacarose é quase ausente no produto (0,05% da matéria seca). Portanto, o açaí natural não pode ser considerado como uma bebida que disponibiliza energia rapidamente para o seu consumidor e, ao contrário de mitos estabelecidos, pode, a priori, ser oferecida aos diabéticos, desde que não seja consumido com açúcar ou farinha (ROGEZ, 2000).

Em relação às fibras, estas são o segundo composto de maior quantidade do açaí (25,22% da matéria seca, em média), após os lipídeos. Um litro de açaí médio contém, aproximadamente, 31 g de fibras alimentares totais, correspondendo a 90% das recomendações diárias (35 g para o adulto) (ROGEZ, 2000). Desse total de fibras, 74% correspondem às fibras insolúveis e 26% correspondem às fibras solúveis (ROGEZ; PENA, 2009<sup>2</sup>).

A cor típica do açaí preto é roxo-avermelhada e deve-se à presença de pigmentos naturais chamados antocianinas, substância pertencente à família dos flavonóides.

O açaí é um fruto que apresenta um elevado teor de antioxidantes, o que pode ser observado pelos valores encontrados no experimento de Sampaio (2006). A caracterização do açaí utilizado neste trabalho indicou um teor de polifenóis totais de 5.152 mg de equivalentes de ácido gálico (EAG) por litro de açaí, sendo 1.890 mg de antocianinas/L de açaí.

Existem dados na literatura a respeito dos compostos fenólicos encontrados no açaí. Essas informações servem de ponto de partida para a realização deste trabalho, já que são estes os compostos fenólicos que serão investigados no plasma, urina e fezes humanos. As Tabelas 1 e 2 apresentam a composição em compostos fenólicos

---

<sup>2</sup> ROGEZ, H.; PENA, R.S. Olhares cruzados sobre o açaí (inédito).



do açaí, bem como a concentração dos mesmos, segundo Pacheco-Palencia e colaboradores (2007) e Schauss e colaboradores (2006).

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

<b>Composto fenólico</b>	<b>Concentração (mg/L de polpa fresca)</b>
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

Fonte: PACHECO-PALENCIA e colaboradores (2007).

Com base nas informações da Tabela 1, pode-se afirmar que a cianidina-3-rutinosídeo (C3R) é o composto encontrado em maior concentração, sendo ele pertencente ao grupo das antocianinas. A cianidina-3-glicosídeo (C3G) é o segundo composto em maior quantidade após a C3R. Dentre os flavanóis, a (+)-catequina aparece em quantidade aproximadamente três vezes superior a (-)-epicatequina.

**Tabela 2.** Identificação e quantificação das antocianinas e outros flavonóides de açaí liofilizado.

<b>Composto fenólico</b>	<b>Concentração (mg/g peso seco)</b>
Cianidina-3-sambubiosídeo	0,04
Cianidina-3- glicosídeo	1,17
Cianidina -3-rutinosídeo	1,93
Peonidina-3-glicosídeo	0,02
Peonidin-3-rutinosídeo	0,04
Homoorientina	*
Orientina	*
Taxifolina deoxihexose	*
Isovitexina	*
Escoparina	*

Fonte: SCHAUSS e colaboradores (2006).

\*Não disponível



A Tabela 2 mostra somente a concentração dos compostos pertencentes ao grupo das antocianinas, havendo predominância de C3R, sendo a C3G a segunda antocianina encontrada em maior quantidade, conforme foi observado na Tabela 1.

Em um outro estudo realizado por Pacheco-Palencia e colaboradores (2009), foram encontrados valores de  $947 \pm 29,0$  mg/Kg de frutos,  $1.256 \pm 38,1$  mg/Kg de frutos e  $44,0 \pm 3,1$  mg/Kg de frutos para C3G, C3R e peonidina-3-rutinosídeo, respectivamente, confirmando ser a C3R a antocianina mais abundante nos frutos do açaizeiro.

Porém, vale ressaltar que grande parte desses estudos com açai utiliza não a polpa do fruto pura, e sim misturada com outras matérias, como por exemplo o guaraná.

Todas as características na composição destes fazem com que o açai seja considerado um fruto altamente nutritivo.

## 2.2. ANTIOXIDANTES

### 2.2.1. Definição

Em sistemas biológicos, um antioxidante pode ser definido como qualquer substância que, quando presente em baixas concentrações comparadas com aquelas de um substrato oxidável, atrasa significativamente ou previne a oxidação daquele substrato (HALLIWELL *et al.*, 1995).

### 2.2.2. Mecanismos de ação

Os antioxidantes são de natureza variada, portanto os mecanismos de ação são igualmente diversos:

- **Captura do oxigênio simpleto:** o oxigênio simpleto pode iniciar as reações de degradação oxidativa e radicalar em presença de moléculas saturadas, em particular lipídeos (FRANKEL; MEYER, 2000). Os capturadores de oxigênio simpleto são aqueles que possuem estrutura rica em elétrons, tais que as duplas ligações podem reagir com o oxigênio simpleto, neutralizando-o. O  $\beta$ -caroteno, o ácido ascórbico ou ainda os flavonóides podem agir desta forma (HALLIWELL *et al.*, 1995).

- **Inibição da ação de enzimas oxidantes:** a atividade de certas enzimas pode gerar espécies iniciadoras de reações radicalares, como é o caso da xantina oxidase (FRANKEL; MEYER, 2000). Dentre os diferentes antioxidantes que podem agir dessa maneira, destacam-se os flavonóides (flavonas), o dióxido de enxofre, a fenilhidrazina e a cisteína.
- **Enzimas antioxidantes:** essas enzimas são um dos numerosos meios de proteção dos seres vivos perante as espécies químicas reativas. Elas reconhecem especificamente as biomoléculas degradadas (DNA e proteínas), as eliminam e substituem (HALLIWELL, 1994). Algumas neutralizam diretamente os iniciadores de reações radicalares, seja diminuindo as espécies radicalares, seja reciclando os antioxidantes. Dentre essas enzimas, destacam-se a superóxido dismutase, a catalase, a glutathione peroxidase e a redutase.
- **Quelação de íons metálicos:** na sua forma mais oxidada, o cobre e o ferro podem tornar-se iniciadores importantes de reações radicalares. Os queladores de íons metálicos podem indisponibilizá-los na forma de complexos organometálicos (ALHO; LEINONEN, 1999). Os flavonóides, por exemplo, que apresentam um núcleo B substituído por dois grupamentos hidroxilas em posição orto, são muito eficazes como queladores (COOK; SAMMAN, 1996; RICE-EVANS, 1997). Outros compostos como as antocianinas e o ácido cítrico são capazes de complexar o ferro ou o cobre (HALLIWELL, 1994).
- **Captura de radicais livres:** a família mais importante de antioxidantes é aquela que agrupa as moléculas capazes de doar um átomo de hidrogênio a uma espécie radicalar (HALLIWELL, *et al.*, 1995; ALHO; LEINONEN, 1999).

### 2.2.3. Compostos fenólicos e a atividade antioxidante

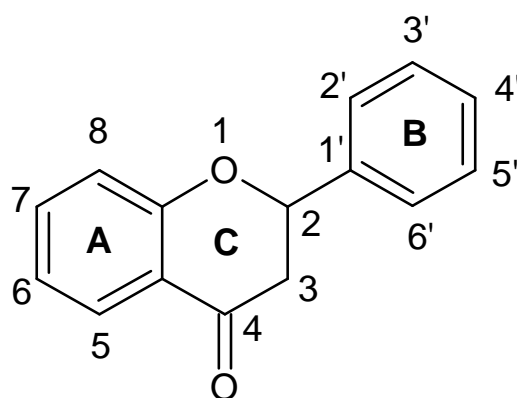
Em circunstâncias normais, existe um grande número de antioxidantes, sintetizados pelas células ou ingeridos através da alimentação, os quais formam uma defesa natural contra os danos induzidos pelas espécies reativas do oxigênio (ALHO; LEINONEN, 1999; FRANKEL; MEYER, 2000).

O termo “espécies reativas do oxigênio” (*Reactive Oxygen Species*) denomina o conjunto de espécies particularmente reduzidas, formadas a partir do oxigênio

molecular diatômico ( $O_2$ ), como os radicais superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), hidroxila ( $OH^{\bullet}$ ), alcóxila ( $RO^{\bullet}$ ) e peróxila ( $RO_2^{\bullet}$ ), além de espécies não radicalares derivadas do oxigênio, como o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), o oxigênio simpleto ( $^1O_2$ ), o ácido hipocloroso ( $HOCl$ ) e o ozônio. Eles são constantemente formados no corpo humano e estão envolvidos na patologia de numerosas doenças (PINCEMAIL *et al.*, 2002). Os radicais livres (como por exemplo, superóxido, óxido nítrico e radicais hidroxila) também são compostos que causam danos ao organismo e são produzidos como resultado do metabolismo aeróbico (FANG *et al.*, 2002).

O organismo humano é munido de antioxidantes naturais, os quais previnem a formação descontrolada de radicais livres e espécies reativas do oxigênio, ou inibem suas reações com as estruturas biológicas (CHAUDIÈRE; FERRARI-ILIOU, 1999). Existem ainda os antioxidantes naturais dietéticos, os quais incluem as vitaminas A, C e E, os carotenóides, os flavonóides e os compostos fenólicos (ESPOSITO *et al.*, 2002).

A atividade química dos compostos fenólicos, em termos das suas propriedades redutoras como doador de elétrons, prediz seu potencial de ação como capturador de radicais livres. Os flavonóides possuem uma estrutura (Figura 4) ideal para promover a captura de radicais livres. Os arranjos estruturais que concedem maior atividade antioxidante são (RICE-EVANS *et al.*, 1997):



**Figura 4.** Fórmula química dos flavonóides.

- O agrupamento orto 3',4'-dihidroxi no anel B (por exemplo, na catequina, luteolina e quercetina);

- Os arranjos meta 5,7-dihidroxi no anel A (por exemplo, no kampferol, apigenina e crisina);
- A dupla ligação 2,3 em combinação com ambos os grupos 4-ceto e 3-hidroxi no anel C, para a deslocalização do elétron, desde que a estrutura *o*-dihidroxi no anel B esteja presente;
- Para a quelatação de metais, dois pontos de ligação entre os íons metálicos de transição às moléculas de flavonóides são os grupos *o*-difenílicos nas posições 3',4'-dihidroxi no anel B e as estruturas 4-ceto e 5-hidroxi no anel C dos flavonóides.

A glicosilação é uma característica que influencia a atividade antioxidante dos flavonóides. Estudos demonstram que as agliconas são antioxidantes mais potentes que seus respectivos glicosídeos (HEIM *et al.*, 2002).

Além da característica de antioxidantes, os compostos fenólicos também são capazes de exercer outros efeitos biológicos no organismo humano, sendo estes descritos no item 2.5.2.

#### **2.2.4. Medidas da atividade antioxidante**

Apesar de haverem muitos métodos de medida da capacidade antioxidante, nenhum reflete verdadeiramente a capacidade antioxidante total de uma amostra particular. A capacidade antioxidante total precisa refletir tanto a capacidade hidrofílica, quanto lipofílica e para a atividade fisiológica necessita refletir e diferenciar a transferência de elétrons e a transferência de átomos de hidrogênio. Além disso, para elucidar completamente o perfil da capacidade antioxidante são necessários testes que avaliam a eficiência contra várias espécies reativas do oxigênio/nitrogênio (PRIOR *et al.*, 2005).

Tendo em vista estes fatores, Prior e colaboradores (2005) propuseram 3 métodos (ORAC, Folin-Ciocalteu e TEAC) que deveriam ser padronizados para uso rotineiro no controle de qualidade e medida da capacidade antioxidante de suplementos dietéticos e nutracêuticos.

Uma maneira de se analisar a atividade antioxidante é avaliando diretamente a produção de radicais livres e sua inibição pelos antioxidantes (ROBARDS *et al.*, 1999).

As características essenciais de todos os testes são: um substrato adaptado, um iniciador de oxidação (indutor) e uma medida apropriada do ponto final da reação. As combinações de substratos, iniciadores e ponto final são numerosas (ROBARDS, 1999).

Os métodos podem ser baseados na transferência de elétrons ou de átomos de hidrogênio. Os métodos baseados na transferência de elétrons medem a habilidade de redução de um substrato (antioxidante) e os métodos baseados na transferência do átomo de hidrogênio medem a habilidade do substrato em doar hidrogênio (MacDONALD-WICKS *et al.*, 2006).

Nos itens a seguir, serão detalhados os métodos utilizados no presente trabalho para determinar a capacidade antioxidante.

#### *2.2.4.1. Método DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazil)*

Inicialmente, acreditava-se que o método DPPH era uma reação de transferência de hidrogênio, porém, um trabalho de Foti e colaboradores (2004) sugere que é, na verdade, uma transferência de elétrons. Entretanto, ainda restam dúvidas a respeito do mecanismo envolvido neste método. A transferência de elétrons inicial ocorre muito rapidamente, e a subsequente transferência de hidrogênio ocorre mais lentamente e depende da aceitação do solvente em realizar ligação de hidrogênio.

O método baseia-se na facilidade com que a forma radicalar recebe um elétron (e um átomo de hidrogênio) retirado de um substrato (PRAKASH, 2001). A quantidade de DPPH<sup>•</sup> removida do meio, acompanhada pela diminuição na absorvância da solução do radical, é proporcional à atividade “seqüestradora” da amostra, sendo possível, portanto, assumir que a inibição de DPPH<sup>•</sup> é equivalente à atividade antioxidante das substâncias presentes na amostra (ESPÍN *et al.*, 2000). Essa inibição pode ser comparada ao trolox (o equivalente hidrossolúvel à vitamina E) e a atividade antioxidante expressa em  $\mu\text{mol}$  de equivalente trolox (ET). A descoloração resultante é monitorada a 515 nm por espectrofotometria (PRIOR *et al.*, 2005).

Sanchez-Moreno (2002) afirma que este método não é adequado para a medida da capacidade antioxidante do plasma, já que as proteínas nele encontradas são precipitadas na presença dos solventes etanol/metanol usados.

#### 2.2.4.2. Método TEAC (*Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*)

O princípio deste método baseia-se no seqüestro do radical ABTS<sup>•+</sup> (ácido 2'-azinobis (3-etilbenzeno-tiazolina-6-sulfônico)) azul-esverdeado, relativamente estável, pelo antioxidante, convertendo-o num produto incolor. O radical sofre uma redução por transferência de elétrons ou átomo de hidrogênio. O grau de descoloração reflete a cinética de diminuição da concentração do radical ABTS<sup>•+</sup>, podendo ser caracterizado por um máximo de absorbância a 415, 645, 734 e 815 nm. Dentre eles, 415 e 734 nm são adotados para o acompanhamento espectrofotométrico da reação (PRIOR *et al.*, 2005).

O radical ABTS<sup>•+</sup> é gerado via reação de oxidação do ABTS com o persulfato de potássio (RE *et al.*, 1999). O valor TEAC é determinado pela comparação à capacidade de captura do antioxidante trolox, em um tempo fixo (PRIOR *et al.*, 2005).

A extensão da descoloração como porcentagem de inibição do ABTS<sup>•+</sup> é determinada como uma função da concentração e do tempo e calculada em relação ao padrão trolox (MacDONALD-WICKS *et al.*, 2006).

O método foi criticado pelo fato de que o ABTS não é uma fonte fisiológica de radicais, podendo, então, não representar fielmente os efeitos *in vivo*. Apesar dessas preocupações, o método TEAC apresentou relevância clínica, sendo sensível a danos oxidativos (PRIOR *et al.*, 2005).

#### 2.2.4.3. Método ORAC (*Oxygen Radical absorbance Capacity*)

Este método foi desenvolvido por Cao e colaboradores (1993) e é baseado na medida dos danos causados pelos radicais livres a uma prova fluorescente, por meio da mudança na intensidade da sua fluorescência. A inibição desses danos por um antioxidante, visualizada através da proteção contra a mudança na prova fluorescente, é uma medida da sua capacidade antioxidante contra o radical livre (CAO *et al.*, 1993; OU *et al.*, 2001; HUANG *et al.*, 2002).

Na metodologia ORAC, diferentes geradores podem ser usados para produzir diferentes radicais, como por exemplo, o radical peroxila ( $\text{ROO}^\bullet$ ), o radical hidroxila ( $\text{OH}^\bullet$ ) ou o metal de transição  $\text{Cu}^{2+}$ . Entretanto, o método adota o  $\text{ROO}^\bullet$  como radical padrão, já que este é o mais comum nos sistemas biológicos. Inicialmente, a proteína alvo era a  $\beta$ -ficoeritrina ( $\beta$ -PE), cuja perda da fluorescência era um indicador da extensão dos danos causados pela sua reação com o radical peroxila (CAO *et al.*, 1993; OU *et al.*, 2001). Entretanto adotou-se uma nova substância fluorescente (fluoresceína) em substituição à  $\beta$ -PE, como prova, pois esta última interagiu com compostos fenólicos, resultando em perda da fluorescência, mesmo sem a adição do gerador de radicais (OU *et al.*, 2001).

O método ORAC mede a capacidade do plasma/soro de inibir as oxidações induzidas pelo radical peroxila (CAO *et al.*, 1993). Ele é baseado na transferência do átomo de hidrogênio e apresenta a vantagem de poder ser adaptado para detectar antioxidantes hidrofílicos e lipofílicos (PRIOR *et al.*, 2005).

A metodologia se baseia na medida da diminuição da concentração de um substrato oxidável, a fluoresceína, ao longo do tempo por fluorescência. O AAPH (2,2-azinobis (-amidinopropano) dihidrocloro) é o sistema gerador de radicais livres que se decompõe termicamente (a análise é feita a  $37^\circ\text{C}$ ). Emprega-se como padrão o trolox.

#### 2.2.4.4. Método dos Polifenóis Totais usando o reagente de Folin-Ciocalteu

Este método era originalmente voltado para analisar proteína, graças à presença do grupo fenol da tirosina. Singleton e colaboradores (1999) ampliaram o método para medir os fenóis totais em vinho.

O reagente de Folin-Ciocalteu (RFC) não é específico para compostos fenólicos, já que pode ser reduzido por vários compostos não-fenólicos. Os compostos fenólicos podem reagir com o RFC somente sob condições básicas, onde a dissociação do próton fenólico leva à formação de um ânion fenolato, o qual é capaz de reduzir o RFC. Então, o método é baseado em uma reação de transferência de elétrons (BECKER *et al.*, 2004). É um método simples, reproduzível e conveniente e tem sido utilizado em estudos de antioxidantes fenólicos (MacDONALD-WICKS *et al.*, 2006).

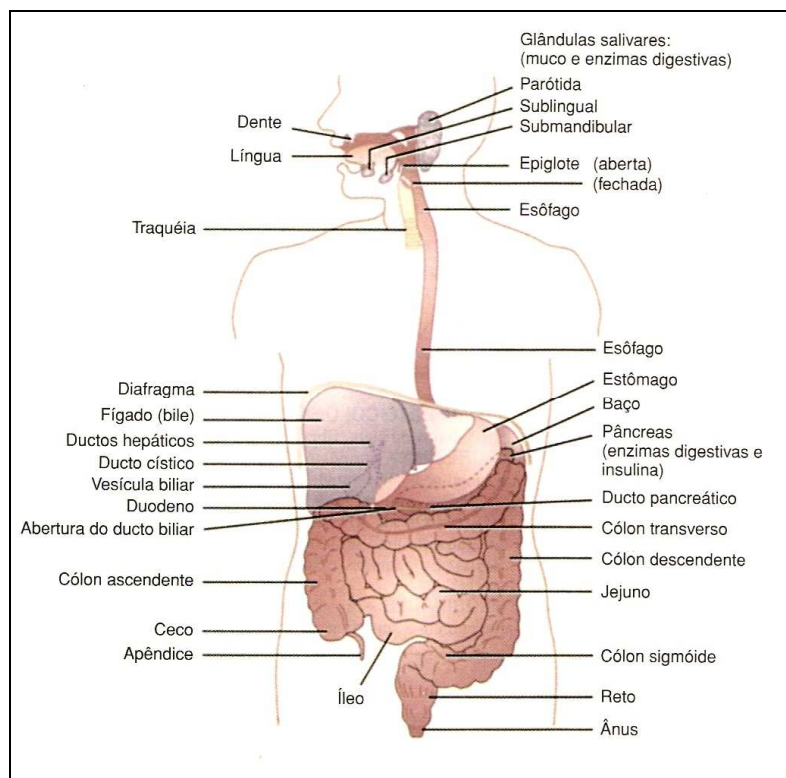
### 2.3. PROCESSOS DIGESTIVO E ABSORTIVO

A partir deste ponto será feita uma revisão da digestão e absorção aplicada aos macronutrientes. Em seguida, será feita uma abordagem acerca dos compostos fenólicos (item 2.5), dando ênfase no que diz respeito aos efeitos biológicos, biodisponibilidade e metabolismo, com destaque especial às antocianinas (item 2.5.5).

Os papéis primários do trato gastrointestinal (Figura 5) são: 1. extrair macronutrientes (proteína, carboidrato e lipídeo), água e etanol dos alimentos e bebidas ingeridos; 2. absorver micronutrientes e oligoelementos necessários; 3. servir como uma barreira física e imunológica aos microrganismos, material estranho e antígenos potenciais consumidos com os alimentos ou formados durante a passagem dos alimentos pelo trato gastrointestinal. Além de seus papéis primários, o trato gastrointestinal participa de muitas outras funções reguladoras e metabólicas que afetam todo o corpo (MAHAN; ESCOTT-STUMP, 2002).

O processo digestivo tem início na boca, onde o tamanho da partícula dos alimentos é reduzido pela mastigação, e os alimentos são misturados com secreções salivares que os preparam para deglutição. O esôfago transporta alimentos e bebidas da cavidade oral e faringe para o estômago. No estômago, os alimentos são diluídos com mais fluidos e misturados com enzimas proteolíticas. Até este ponto, ocorreu pouca digestão de amido e lipídeos e começa a digestão de proteínas (MAHAN; ESCOTT-STUMP, 2002).





**Figura 5.** Sistema digestivo.  
**Fonte:** MAHAN; ESCOTT-STUMP (2002).

Quando os alimentos estão na consistência e concentração apropriadas, o estômago permite a passagem do seu conteúdo ao intestino delgado, onde ocorre a maior parte da digestão. Nos primeiros 100 cm do intestino delgado ocorre uma agitação de atividade, resultando na digestão e absorção da maioria dos gêneros alimentícios ingeridos (MAHAN; ESCOTT-STUMP, 2002).

No duodeno, o quimo entra em contato com as enzimas digestivas pancreáticas e a acidez gástrica é neutralizada pelo bicarbonato (secretado pelas células do ducto pancreático e as glândulas de Brunner do duodeno), antes de entrar em contato com a superfície de absorção do jejuno. As secreções alcalinas pancreáticas que contém as enzimas digestivas são liberadas no duodeno em antecipação ao quimo ácido, provendo um pH ótimo para que ocorram os processos enzimáticos de digestão (JACKSON; McLAUGHLIN, 2006).

Os amidos são expostos a enzimas do pâncreas e reduzidos a açúcares simples. As microvilosidades do intestino delgado também são capazes de finalizar a hidrólise

das dextrinas e dos dissacarídeos como a sacarose e a maltose. As enzimas do pâncreas e da borda em escova do intestino delgado completam a digestão das proteínas, convertendo-as em peptídeos e aminoácidos. As gorduras são reduzidas de gotículas visíveis a emulsões microscópicas, as quais podem ser atacadas pelas lipases do pâncreas e serem reduzidas à mistura de moléculas menores, primariamente ácidos graxos e monoglicerídeos (MAHAN; ESCOTT-STUMP, 2002).

De modo geral, a química da digestão é simples, visto que nos três principais tipos de alimento (carboidratos, proteínas e lipídeos) atua o mesmo processo básico de hidrólise (GUYTON; HALL, 2002).

### **2.3.1. Carboidratos digestíveis e fibras**

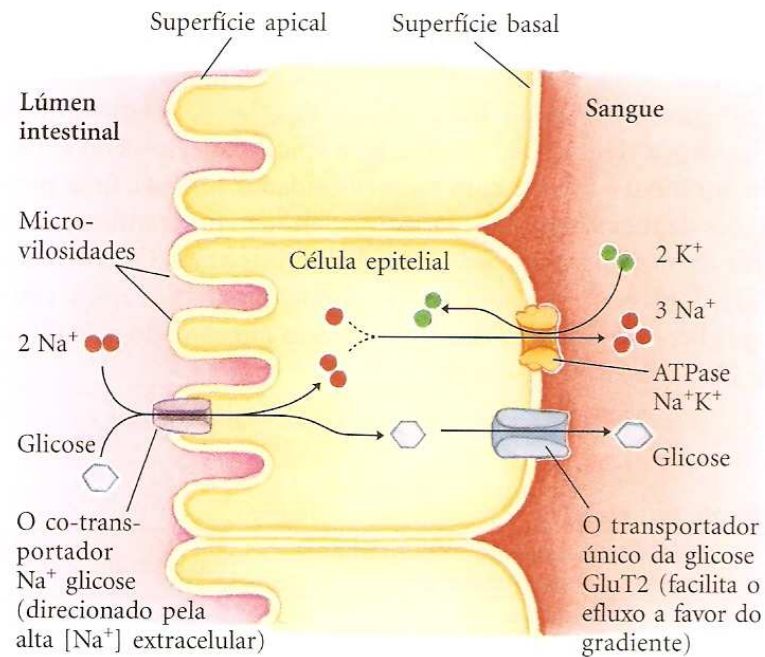
A maioria dos carboidratos da dieta é consumida na forma de amidos, dissacarídeos e monossacarídeos. Quando o alimento é mastigado, ele é misturado com a saliva, que contém a enzima ptialina ( $\alpha$ -amilase) que atua em pH neutro ou levemente alcalino. Essa enzima hidrolisa o amido em moléculas menores (MAHAN; ESCOTT-STUMP, 2002). Entretanto, o alimento permanece na boca por pouco tempo, e, provavelmente, não mais que 5% de todos os amidos ingeridos passam por hidrólise no momento em que o alimento é deglutido (GUYTON; HALL, 2002).

Quando o alimento alcança o estômago, a atividade da amilase salivar é bloqueada pelo ácido das secreções gástricas, pois a enzima é inativa quando o pH do meio é inferior a 4,0. A digestão dos carboidratos ocorre quase toda no intestino delgado proximal (GUYTON; HALL, 2002).

No duodeno, a amilase pancreática decompõe as moléculas grandes de amido nas ligações 1-4 alfa para criar maltose, maltotriose e dextrina (MAHAN; ESCOTT-STUMP, 2002). Os enterócitos que revestem as vilosidades do intestino delgado contêm as enzimas lactase, sacarase, maltase e  $\alpha$ -dextrinase, que têm a capacidade de clivar a lactose, sacarose, maltose e isomaltose, bem como outros pequenos polímeros da glicose, em seus monossacarídeos constituintes (glicose, galactose e frutose) (GUYTON; HALL, 2002).

Uma vez no intestino, a glicose é acumulada nas células do epitélio intestinal pelo co-transporte dependente de  $\text{Na}^+$ , usando o gradiente estabelecido pela ATPase

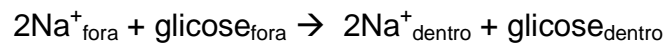
$\text{Na}^+$   $\text{K}^+$  da membrana plasmática. A superfície apical das células do epitélio intestinal é coberta com microvilosidades, longas e finas projeções da membrana plasmática, que aumentam a área da superfície exposta do conteúdo intestinal, conforme pode ser observado na Figura 6 (NELSON; COX, 2002).



**Figura 6.** Transporte da glicose nas células epiteliais do intestino.

Fonte: NELSON; COX (2002).

Os co-transportadores  $\text{Na}^+$  e a glicose na membrana plasmática apical captam glicose do intestino em um processo direcionado pelo fluxo de  $\text{Na}^+$ , a favor do gradiente:



A energia requerida para este processo vem de duas fontes: a maior concentração de  $\text{Na}^+$  do lado de fora do que de dentro e o potencial transmembrana, que é negativo internamente e, portanto, puxa o  $\text{Na}^+$  para dentro (NELSON; COX, 2002).

O transportador duplo pode bombear glicose para dentro da célula epitelial até que sua concentração seja 30.000 vezes àquela do intestino. À medida que a glicose é bombeada do intestino para dentro da célula epitelial na superfície apical, ela é

simultaneamente transportada da célula para o sangue pelo transporte passivo por meio de um transportador de glicose (GluT2) na superfície basal. O papel crucial do Na<sup>+</sup> em sistemas de co-transporte e contratransporte, como esses, requer o bombeamento contínuo do Na<sup>+</sup> para fora, para manter o gradiente transmembrana de Na<sup>+</sup> (NELSON; COX, 2002).

A galactose é transportada, quase exatamente, pelo mesmo mecanismo da glicose. Por outro lado, o transporte da frutose ocorre por difusão facilitada através do epitélio intestinal, sem ser acoplada ao transporte de sódio (GUYTON; HALL, 2002).

Os monossacarídeos passam através dos enterócitos intestinais e deixam a célula basolateral para alcançar a corrente sanguínea via transportador GluT2 (mesmo transportador para os três monossacarídeos) (JACKSON; McLAUGHLIN, 2006).

Após a entrada dos monossacarídeos na corrente sanguínea, estes são levados pela veia porta até o fígado. A glicose é transportada do fígado para os tecidos, embora alguma glicose seja armazenada no fígado e músculos como glicogênio (MAHAN; ESCOTT-STUMP, 2002).

Algumas formas de carboidrato não podem ser digeridas pelos seres humanos. A celulose, hemiceluloses, pectinas, gomas e outras formas de fibras passam relativamente inalteradas para o cólon, onde são parcialmente fermentadas pelas bactérias em ácidos graxos de cadeia curta e gases. Nem a amilase salivar nem a pancreática possuem a capacidade de quebrar as ligações beta dessas fibras (MAHAN; ESCOTT-STUMP, 2002).

Sabe-se que o consumo de fibras na alimentação dos seres humanos contribui com alguns efeitos fisiológicos, que podem trazer certos benefícios. Entre estes: retardo no esvaziamento gástrico; retardo na absorção do intestino delgado; aceleração do trânsito colônico e aumento do volume fecal. Estes efeitos se devem a algumas propriedades das estruturas das fibras (ANGELIS, 2001).

As fibras solúveis, no intestino, formam soluções viscosas criando dificuldades físicas de motilidade das moléculas, reduzindo a absorção (ANGELIS, 2001).

Ainda estas fibras solúveis produzem gases quando fermentadas por bactérias, sendo que estes gases provocam distensão da parede do intestino grosso, aumentando a propulsão do conteúdo colônico (ANGELIS, 2001).

Já as fibras insolúveis são parcialmente fermentáveis e agem como sólidos indigeríveis com efeito no trânsito colônico e na excreção fecal (ANGELIS, 2001).

### **2.3.2. Proteínas**

A digestão das proteínas começa no estômago, onde as proteases inativas (pepsinogênio) produzidas pelas células gástricas são convertidas em pepsinas ativas devido ao ambiente de baixo pH estomacal. As pepsinas hidrolisam as proteínas e polipeptídeos em aminoácidos e pequenos peptídeos (JACKSON; McLAUGHLIN, 2006).

A digestão da maior parte das proteínas ocorre na porção superior do intestino delgado, no duodeno e no jejuno, sob influência de enzimas proteolíticas da secreção pancreática (GUYTON; HALL, 2002). O contato do quimo com a mucosa intestinal estimula a liberação da enteroquinase, uma enzima que transforma o tripsinogênio pancreático inativo em tripsina ativa, que por sua vez ativa as outras enzimas proteolíticas pancreáticas. A tripsina, quimiotripsina e carboxipolipeptidase pancreáticas decompõem a proteína intacta e continuam a decomposição iniciada no estômago até que se formem pequenos polipeptídeos e aminoácidos (MAHAN; ESCOTT-STUMP, 2002).

A última etapa da digestão das proteínas no lúmen intestinal é efetuada pelos enterócitos que revestem as vilosidades do intestino delgado. Essas células têm borda em escova, que consiste em centenas de microvilosidades que se projetam a partir da superfície de cada célula. Na membrana de cada uma dessas vilosidades encontram-se peptidases proteolíticas que atuam sobre os polipeptídeos, transformando-os em aminoácidos, dipeptídeos e tripeptídeos. A fase final da digestão de proteínas ocorre na borda em escova, onde os dipeptídeos e tripeptídeos são hidrolisados em seus aminoácidos constituintes pelas hidrolases peptídicas (GUYTON; HALL, 2002).

O transporte de aminoácidos é controlado pelo mecanismo de co-transporte de sódio (ou transporte ativo secundário de aminoácidos ou peptídeos). As moléculas de peptídeos ou aminoácidos ligam-se a uma proteína transportadora específica na membrana das microvilosidades da célula. Essa proteína requer a ligação do sódio para que o transporte possa ocorrer. Após a sua ligação, o íon sódio move-se a favor do seu

gradiente eletroquímico para o interior da célula, arrastando consigo o aminoácido ou peptídeo. Alguns aminoácidos não necessitam desse mecanismo de co-transporte do sódio, sendo transportados por proteínas transportadoras especiais da membrana (transporte passivo) (GUYTON; HALL, 2002).

Os peptídeos e aminoácidos absorvidos são transportados ao fígado através da veia porta, para a liberação na circulação geral (MAHAN; ESCOTT-STUMP, 2002).

### **2.3.3. Lipídeos**

A digestão dos lipídeos começa na boca pela ação da lipase lingual, porém ocorre pouca digestão dos lipídeos antes deles se emulsificarem com os sais biliares no duodeno. No estômago ocorre a secreção da lipase gástrica, mas sua contribuição para a digestão dos lipídeos é também pequena (JACKSON; McLAUGHLIN, 2006). A lipase gástrica hidrolisa parte dos triglicerídeos, especialmente os de cadeia curta, em ácidos graxos e glicerol (MAHAN; ESCOTT-STUMP, 2002).

As lipases são enzimas hidrossolúveis que podem agir somente na superfície dos glóbulos de gordura. A formação de glóbulos de gorduras maiores impede o acesso completo da lipase ao seu substrato até que ocorra a emulsificação com os sais biliares (JACKSON; McLAUGHLIN, 2006).

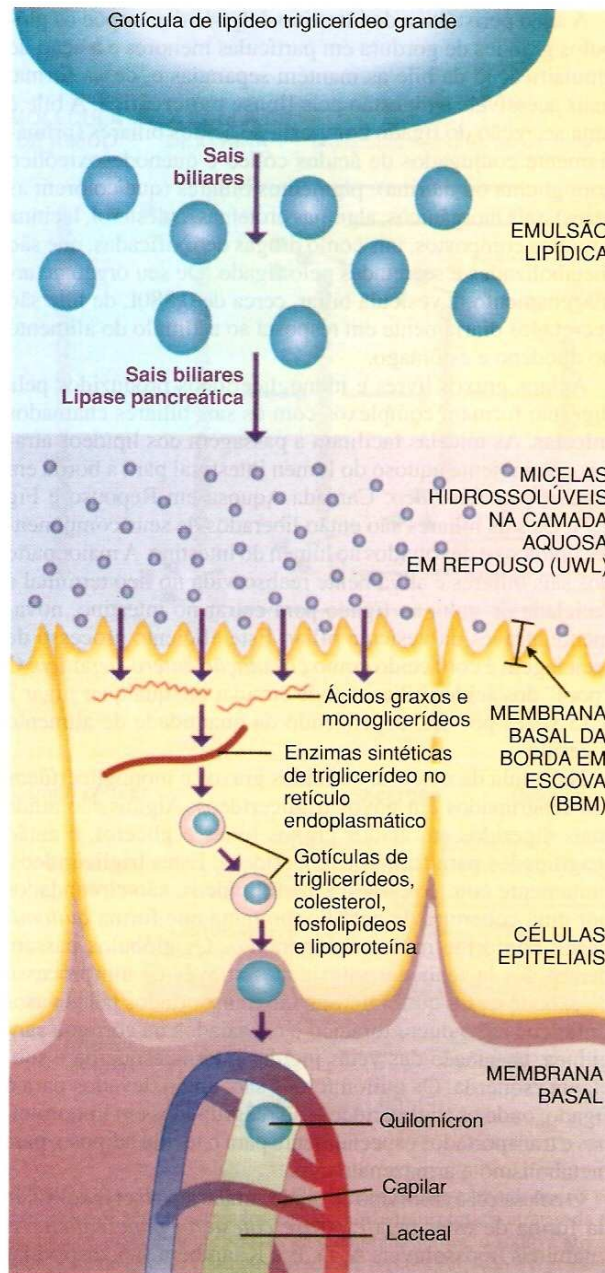
A entrada da gordura no intestino delgado estimula a liberação da colecistocinina, que atua para inibir a motilidade intestinal, tornando mais lenta a liberação de lipídeos. Como resultado, uma porção de refeição muito gordurosa pode permanecer no estômago por até 4h ou mais. A presença de gordura no intestino delgado também estimula a secreção de ácidos biliares pela vesícula biliar e a liberação de suco pancreático (GIBNEY *et al.*, 2005).

A ação peristáltica do intestino delgado decompõe os glóbulos grandes de gordura em partículas menores e a ação de emulsificação da bile as mantém separadas e, dessa forma, mais acessíveis à digestão pela lipase pancreática. A bile é uma secreção do fígado composta de ácidos biliares, pigmentos biliares (que dão cor às fezes), sais inorgânicos, algumas proteínas, colesterol, lecitina e muitos compostos que são metabolizados e secretados pelo fígado (MAHAN; ESCOTT-STUMP, 2002).

A lipase pancreática é a principal enzima envolvida na digestão dos triglicerídeos, responsável por mais de 70% da hidrólise, embora as lipases lingual e gástrica tenham suas atividades restritas ao intestino delgado, agindo assim, sinergicamente (JACKSON; McLAUGHLIN, 2006).

Ácidos graxos livres e monoglicerídeos produzidos pela digestão formam complexos com os sais biliares chamados micelas. Cada molécula de sal biliar é composta por um núcleo esterol. Os núcleos esteróis das moléculas de sais biliares das micelas agregam-se e englobam os produtos da digestão das gorduras, formando um pequeno glóbulo de gordura no meio da micela, com os grupos polares dos sais biliares projetados para fora, recobrando a superfície da micela. Como têm cargas negativas, esses grupos polares permitem que todo o glóbulo da micela se dissolva na água dos líquidos digestivos e permaneça em solução estável até a absorção da gordura, a despeito do grande tamanho da micela (GUYTON; HALL, 2002).

As micelas de sais biliares também atuam como meio de transporte para os monoglicerídeos e ácidos graxos livres até a superfície das microvilosidades da borda em escova das células epiteliais intestinais (Figura 7), visto que, de outro modo, ambos seriam relativamente insolúveis. Nesse local, tanto os monoglicerídeos quanto os ácidos graxos têm difusão imediata através da micela e, a seguir, da membrana das microvilosidades para o interior da célula; essa difusão é possível uma vez que esses lipídeos também são solúveis na membrana das células epiteliais (GUYTON; HALL, 2002).



**Figura 7.** Resumo do mecanismo de absorção dos lipídeos no organismo humano.  
**Fonte:** MAHAN; ESCOTT-STUMP (2002).

Os sais biliares são reabsorvidos, predominantemente, no íleo terminal e retornam para o fígado (recirculação êntero-hepática) para entrar no intestino através da vesícula biliar (MAHAN; ESCOTT-STUMP, 2002).



Os ácidos graxos difundem para o citoplasma do enterócito para serem utilizados na formação de novos triglicerídeos. Os triglicerídeos, juntamente com o colesterol e fosfolipídeos, são circundados por uma cobertura de apolipoproteínas, formando os quilomícrons, os quais deixam as células por um mecanismo de exocitose. Assim como na bile, a apolipoproteína anfipática solubiliza os quilimícrons, porém seu tamanho os impede de alcançar os capilares, então eles chegam à circulação via vasos linfáticos (JACKSON; McLAUGHLIN, 2006).

Os quilomícrons são transportados pelos vasos linfáticos até o ducto torácico e esvaziados na corrente sanguínea, na junção das veias jugular interna esquerda e subclávia esquerda. Eles são então levados para o fígado, onde os triglicerídeos são reagrupados em lipoproteínas e transportados especialmente para o tecido adiposo, para metabolismo e armazenamento. O colesterol é absorvido de modo similar, após ser hidrolisado na forma de éster pela esterase colesterol pancreática (MAHAN; ESCOTT-STUMP, 2002).

Lipídeos de cadeia curta são solúveis sem a apolipoproteína e são exportados para o fígado diretamente nos capilares (JACKSON; McLAUGHLIN, 2006).

#### 2.4. ABSORÇÃO NO INTESTINO GROSSO: FORMAÇÃO DAS FEZES

O intestino grosso é o local de absorção de água, sais minerais e vitaminas sintetizadas naquele órgão por ação bacteriana. Ele mede aproximadamente 1,5m de comprimento e consiste de ceco, cólon e reto (MAHAN; ESCOTT-STUMP, 2002).

Em condições normais, cerca de 1,5 L de quimo passam diariamente através da válvula ileocecal para o intestino grosso. A maior parte da água e dos eletrólitos no quimo sofre absorção no cólon, deixando menos de 100 mL de água nas fezes. Além disso, praticamente todos os íons são absorvidos, com perda nas fezes de, apenas, 1 a 5 miliequivalentes de íons sódio e cloreto (GUYTON; HALL, 2002).

A maior parte da absorção no intestino grosso ocorre na membrana proximal do cólon, razão pela qual essa região é denominada *cólon absorativo*, enquanto o cólon distal atua principalmente para armazenamento, sendo denominado *cólon de armazenamento* (GUYTON; HALL, 2002).

#### **2.4.1. Absorção e secreção de eletrólitos e de água**

A mucosa do intestino grosso tem alta capacidade de absorção ativa de sódio, e o gradiente de potencial elétrico criado pela absorção do sódio determina, também, a absorção de cloreto (GUYTON; HALL, 2002).

As junções fechadas existentes entre as células epiteliais do epitélio do intestino grosso são muito mais fechadas do que as do intestino delgado. Essa característica impede a difusão retrógrada de quantidade significativa de íons através dessas junções, permitindo uma absorção muito mais completa de íons sódio pela mucosa do intestino grosso – isto é, contra um gradiente de concentração muito mais alto – do que a que pode ocorrer no intestino delgado (GUYTON; HALL, 2002).

Além disso, como na porção distal do intestino delgado, a mucosa do intestino grosso secreta íons bicarbonato, enquanto absorve, simultaneamente, número igual de íons cloreto. O bicarbonato ajuda a neutralizar os produtos finais ácidos da ação bacteriana no intestino grosso (GUYTON; HALL, 2002).

A absorção de íons sódio e cloreto cria um gradiente osmótico através da mucosa do intestino grosso o que, por sua vez, determina a absorção de água (GUYTON; HALL, 2002).

#### **2.4.2. Composição das fezes**

Em condições normais, as fezes consistem de cerca de três quartos de água e um quarto de substâncias sólidas, constituídas por cerca de 30% de bactérias mortas, 10 a 20% de gordura, 10 a 20% de matéria inorgânica, 2 a 3% de proteína e 30% de resíduos não-digeridos e constituintes secos do suco digestivo, como pigmentos biliares e células epiteliais descamadas (GUYTON; HALL, 2002). O peso normal das fezes está na faixa de 100 a 200g e o tempo que se leva do momento em que o alimento é ingerido ao momento de expulsão das fezes varia de 18 a 72h (MAHAN; ESCOTT-STUMP, 2002).

A cor marrom das fezes é produzida pela estercobilina e pela urobilina, que são derivados da bilirrubina, o qual é uma via de excreção dos grupos hêmicos do organismo humano. O odor é devido, principalmente, aos produtos da ação bacteriana, que variam de indivíduo para indivíduo, dependendo da flora bacteriana colônica e do

tipo de alimento ingerido. Os produtos odoríferos incluem indol, escatol, mercaptanos e sulfeto de hidrogênio (GUYTON; HALL, 2002).

## 2.5. OS COMPOSTOS FENÓLICOS

Os compostos fenólicos, também chamados de polifenóis, constituem o grupo de moléculas maior e mais disseminado do reino vegetal. Eles compreendem uma das mais amplas categorias de fitoquímicos e constituem parte integral da dieta humana, sendo responsáveis pelas principais características sensoriais de alimentos e bebidas preparados a partir de plantas, em particular, propriedades relacionadas à cor e ao sabor (ANDERSEN; MARKHAM, 2006).

Vários estudos apontam os efeitos benéficos dos antioxidantes, em particular os compostos fenólicos, sobre a saúde humana, sensibilizando gradativamente o consumidor sobre sua importância nutricional (ANDERSEN; MARKHAM, 2006). Os compostos fenólicos dietéticos incluem os ácidos fenólicos, flavonóides, polímeros fenólicos (taninos), lignanas e ligninas (PACKER; CADENAS, 2001), os quais serão mais bem detalhados nos itens a seguir.

### 2.5.1. Classificação

#### 2.5.1.1. Ácidos fenólicos

Os ácidos fenólicos formam um grupo muito diversificado compreendendo os derivados dos ácidos benzóico e cinâmico. Este grupo inclui aqueles compostos que possuem um único anel aromático, contendo um ou mais grupos hidroxila (um exemplo comum é o ácido caféico) (PACKER; CADENAS, 2001).

#### 2.5.1.2. Os Flavonóides

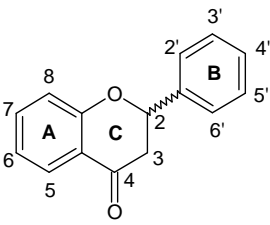
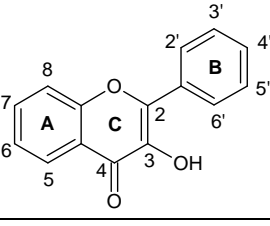
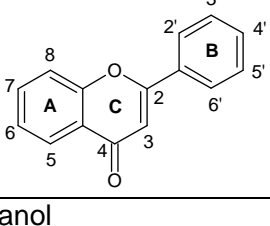
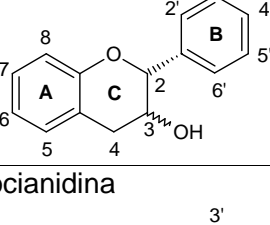
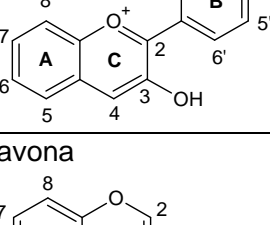
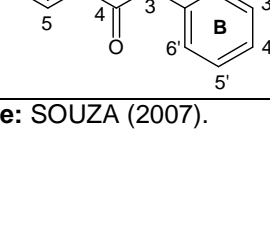
Os flavonóides formam com os isoprenóides e alcalóides, as três principais classes de produtos secundários formados pelas plantas superiores. Seus metabólitos são específicos de plantas e intervêm largamente na sua capacidade de se adaptar à via sedentária nos ambientes diversos e inconstantes (SHIRLEY, 1996). As substâncias

pertencentes a este grupo possuem uma estrutura C6-C3-C6 (PACKER; CADENAS, 2001).

O Quadro 2 apresenta as principais subclasses de flavonóides e exemplos dos principais compostos e fontes alimentares onde eles são encontrados. Os flavonóides compreendem também as antocianinas, que são as antocianidinas glicosiladas. Elas formam o grupo mais importante de pigmentos hidrossolúveis, responsáveis pelas cores vermelho, azul e violeta de numerosas frutas, legumes e flores (HARBONE; WILLIAMS, 2001).

Nos itens a seguir, serão descritas as principais subclasses dos flavonóides.

**Quadro 2.** Subclasse dos flavonóides monoméricos, seus principais representantes e exemplos de fontes alimentares.

Subclasse	Exemplos	Fontes alimentares
<p>Flavanona</p> 	<p>Hesperitina 5=7=3'=OH, 4'=OCH<sub>3</sub> Naringenina 5=7=4'=OH</p>	<p>Tomate, limão e laranja</p>
<p>Flavonol</p> 	<p>Camferol 5=7=4'=OH Quercetina 5=7=3'=4'=OH Miricetina 5=7=3'=4'=7'=OH e seus derivados</p>	<p>Maçã, brócolis, chá, uva e vinho</p>
<p>Flavona</p> 	<p>Apigenina 5=7=4'=OH Luteolina 5=7=3'=4'=OH Isovitexina 5=7=4'=OH, 6=glicose</p>	<p>Maçã, limão</p>
<p>Flavanol</p> 	<p>Catequina (2R,3S) 5=7=3'=4'=OH Epicatequina (2R,3R) 5=7=3'=4'=OH Epigallocatequina (2R,3R) 5=7=3'=4'=5'=OH</p>	<p>Chá, semente de uva, vinho, maçã</p>
<p>Antocianidina</p> 	<p>Cianidina 5=7=3'=4'=OH Malvidina 5=7=4'=OH, 3'=5'=OCH<sub>3</sub> Delfinidina 5=7=3'=4'=5'=OH Pelargonidina 5=7=4'=OH e seus derivados</p>	<p>Uva, vinho, açai, ameixa, morango</p>
<p>Isoflavona</p> 	<p>Genisteína 7=4'=OH Daidzeína 5=7=4'=OH</p>	<p>Soja, feijão, trevo vermelho</p>

Fonte: SOUZA (2007).

#### a) Flavanonas e flavanonóis

As flavanonas (também denominadas dihidroflavonas) e os flavanonóis são caracterizados pela presença de uma ligação C<sub>2</sub>–C<sub>3</sub> saturada e de um átomo de oxigênio (grupo carbonila) na posição C<sub>4</sub>. Os flavanonóis diferem das flavanonas pela presença de um grupo hidroxila na posição C<sub>3</sub> e são freqüentemente denominados 3-hidroxiflavanonas ou dihidroflavonóis (HARBONE, 1994; SHAHIDI; NACZK, 2004).

#### b) Flavonóis e flavonas

Estes compostos apresentam uma dupla ligação entre os carbonos 2 e 3. Os flavonóis possuem um grupo hidroxila na posição C<sub>3</sub> e são também chamados 3-hidroxiflavonas. As flavonas são também designadas por 3-desoxiflavonóis. Dentro de cada classe, os diferentes flavonóides podem ser diferenciados pelo número e distribuição de hidroxilas, assim como pelo grau de alquilação ou glicosilação (HARBONE, 1994; ROBARDS *et al.*, 1999; SHAHIDI; NACZK, 2004).

Os flavonóis mais comuns são o campferol, a quercetina, a miricetina e seus derivados, conforme o apresentado no Quadro 2 (VERMERRIS; NICHOLSON, 2006).

#### c) Flavanóis

Os flavanóis são caracterizados pela presença de uma ligação C<sub>2</sub>–C<sub>3</sub> saturada, de grupo hidroxila na posição C<sub>3</sub> e pela ausência do grupo carbonila na posição C<sub>4</sub>. A catequina e a epicatequina são os principais compostos da subclasse dos flavanóis. São freqüentemente encontrados associados ao ácido gálico sob a forma de epigallocatequina galato ou epicatequina galato. Estão presentes no chá, no chocolate e no vinho tinto. Podem se apresentar sob forma de oligômeros ou polímeros e são então chamados taninos condensados (ver item 2.5.1.3 sobre os taninos). Os flavanóis são também conhecidos pelos nomes de flavanas, flavan-3-óis ou catequinas (HARBONE, 1994; ROBARDS *et al.*, 1999).

#### d) Antocianidinas e antocianinas

Estes compostos apresentam uma ligação C<sub>2</sub>–C<sub>3</sub> saturada e um grupo hidroxila na posição C<sub>3</sub>. Assim como nos flavanóis, observa-se a ausência do grupo carbonila na

posição C<sub>4</sub>. As antocianinas são glicosídeos hidrossolúveis de antocianidinas. O glicosídeo mais comum é o 3-glicosídeo. Se um segundo açúcar está presente, ele se encontra normalmente na posição 5-hidroxila. Existe também a substituição nos carbonos 3,7, a qual é menos comum. As antocianinas também podem ser aciladas. Neste caso, um ácido orgânico, normalmente o *p*-coumárico, ácido caféico ou ácido ferrúlico, é esterificado ao açúcar (VERMERRIS; NICHOLSON, 2006).

#### e) Isoflavonas

As isoflavonas são as flavonas nas quais o anel fenólico B encontra-se na posição 3, no lugar da posição 2 e apresentam um átomo de oxigênio (grupo carbonila) na posição C<sub>4</sub>. Elas estão presentes quase que exclusivamente nos legumes e na soja, sendo a genisteína e a daidzeína os principais representantes desta subclasse (HARBONE, 1994).

#### 2.5.1.3. Os Taninos

Os taninos compreendem um grupo de compostos com vasta diversidade na estrutura que compartilha sua habilidade de se ligar e precipitar proteínas. Os taninos são abundantes em diferentes espécies de plantas, podendo estar presentes nas folhas, casca e frutos e protegem a planta contra infecções. Podem ser classificados em três grupos: taninos condensados, hidrolisáveis e complexos (VERMERRIS; NICHOLSON, 2006).

#### a) Taninos condensados

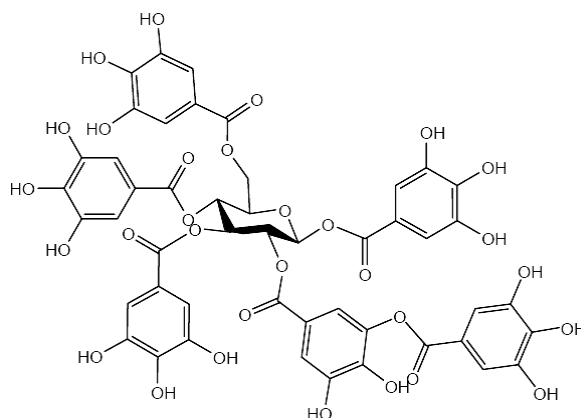
Os taninos condensados são também chamados de proantocianidinas. Eles são oligômeros ou polímeros de flavonóides. Apesar do termo “taninos condensados” ser bastante difundido para descrever estes compostos fenólicos, o termo “proantocianidina” é quimicamente mais descritivo. Assim, as proantocianidinas são os compostos que geram os pigmentos antocianidinas após clivagem oxidativa (e não hidrólise) em meio alcoólico e em presença de calor. Os polímeros que têm por base a catequina e epicatequina geram a cianidina, e são assim conhecidos como

procianidinas. Os polímeros constituídos de galocatequina e epigalocatequina liberam a delphinidina (HAGERMAN, 2002; CHEYNIER, 2005; FERREIRA *et al.*, 2006). Alguns exemplos típicos de taninos condensados são a proantocianidina B2 (epicatequina-(4 $\beta$ →8)-epicatequina), a proantocianidina A1 (epicatequina-(4 $\beta$ →8,2 $\beta$ →O→7)-catequina), a proantocianidina A2 (epicatequina-(4 $\beta$ →8,2 $\beta$ →O→7)-epicatequina) e a proantocianidina C1 epicatequina-(4 $\beta$ →8)-epicatequina-(4 $\beta$ →8)-epicatequina).

#### b) Taninos hidrolisáveis

Os taninos hidrolisáveis formam um grande grupo de compostos polifenólicos que apresentam duas unidades de base: um açúcar esterificado pelo ácido gálico (galotaninos) ou pelo ácido elágico (elagitaninos) (KHANBABAEE; VAN REE, 2001; HAGERMAN, 2002).

Os galotaninos são taninos hidrolisáveis com um núcleo poliol (referente a um composto com vários grupos hidroxila) substituído com 10-12 resíduos de ácido gálico. O poliol mais comumente encontrado é a D-glicose, apesar de alguns galotaninos conterem unidades de catequina e triterpenóides. Os galotaninos com o núcleo D-glicose são sintetizados a partir da 1,2,3,4,6-pentagaloilglicose (1,2,3,4,6-penta-O-galoil- $\beta$ -D-glicopiranosose). Um exemplo de um galotanino é o composto 2-O-digaloil-1,3,4,6-tetra-O-galoil- $\beta$ -D-glicopiranosose (Figura 8), onde o resíduo adicional de ácido gálico está localizado no C2 do anel glicopiranosose (VERMERRIS; NICHOLSON, 2006).



**Figura 8.** Estrutura química do galotanino 2-O-digaloil-1,3,4,6-tetra-O-galoil- $\beta$ -D-glicopiranosose.

**Fonte:** VERMERRIS; NICHOLSON, 2006.



Os elagitaninos são taninos hidrolisáveis derivados de pentagaloliglicose, mas diferentemente dos galotaninos, eles contêm ligações C-C adicionais entre moléculas adjacentes de galoil na molécula de pentagaloliglicose. Eles contêm como elemento de estrutura característico, ao menos um ácido hexahidroxidifenólico (precursor do ácido elágico) na forma de um diéster com a glicose (VERMERRIS; NICHOLSON, 2006).

#### c) Taninos complexos

Os taninos complexos são definidos como os taninos em que a unidade de catequina é ligada glicosidicamente tanto a uma unidade de galotanino quanto de elagitanino. Como o próprio nome indica, a estrutura destes taninos pode ser muito complexa. Um exemplo de uma substância pertencente a este grupo é a acutissimina A, formada nos vinhos tintos durante seu processo de envelhecimento (VERMERRIS; NICHOLSON, 2006).

#### 2.5.1.4. As lignanas

As lignanas são dímeros ou oligômeros que resultam do agrupamento de monolignóis – álcool *p*-coumaril, álcool coniferil e álcool sinapil, sendo o álcool coniferil o mais usado na biosíntese das lignanas. Alguns desses compostos apresentam propriedades médicas (VERMERRIS; NICHOLSON, 2006).

#### 2.5.1.5. As ligninas

As ligninas são polímeros fenólicos que, assim como as lignanas, são sintetizadas primariamente a partir de três precursores: álcool *p*-coumaril, álcool coniferil e álcool sinapil. A complexidade química e a aparente falta de regularidade na sua estrutura tornam a lignina uma barreira física contra insetos e fungos (VERMERRIS; NICHOLSON, 2006).

### 2.5.2. Efeitos biológicos

Estudos epidemiológicos a respeito da relação entre hábitos dietéticos e o risco de doenças mostram que os alimentos exercem um impacto direto sobre a saúde. É geralmente aceito que alimentos derivados de plantas, como vinho, frutas, amêndoas,

verduras, grãos e legumes exercem alguns efeitos benéficos na saúde humana, particularmente em doenças relacionadas à idade avançada (ESPÍN *et al.*, 2007).

Como a expectativa de vida do ser humano aumentou, as doenças crônicas relacionadas à idade, como doenças cardiovasculares, neurodegenerativas, diabetes do tipo II e vários tipos de câncer (por exemplo, o câncer gastrointestinal), conhecidas por serem relacionadas aos hábitos dietéticos, continuam se expandindo. Este fato encorajou diversas organizações ao redor do mundo ligadas à saúde a recomendar um aumento no consumo de derivados de plantas, visando a melhoria da saúde humana e o retardo no desenvolvimento dessas doenças (ESPÍN *et al.*, 2007).

A capacidade de alguns alimentos derivados de plantas de reduzir o risco de doenças crônicas está associada, ao menos em parte, a metabólitos secundários (fitoquímicos), os quais mostraram exercer efeitos nas atividades biológicas. Estes metabólitos têm baixo potencial como compostos bioativos quando comparados às drogas farmacêuticas, mas quando estes são ingeridos regularmente e em quantidades significativas, como parte da dieta, podem exercer um efeito fisiológico notável a longo prazo. Os fitoquímicos que estão presentes na dieta, e que estão sendo associados a benefícios à saúde, incluem glicosinolatos, terpenóides (carotenóides, monoterpenos e fitosteróis) e vários grupos de compostos fenólicos (antocianinas, flavonas, flavan-3-óis, isoflavonas, ácidos fenólicos e etc.). Sua bioatividade tem sido relacionada, em alguns aspectos, às suas propriedades antioxidantes (capacidade de capturar radicais livres) que estão envolvidas na prevenção de diversas doenças degenerativas crônicas (oxidação das LDL no desenvolvimento da placa de atheroma, oxidação do DNA e câncer, inflamação, etc.) (ESPÍN *et al.*, 2007).

Os ácidos fenólicos têm recebido atenção considerável recentemente pelo seu comportamento antioxidante e pelos efeitos benéficos potenciais à saúde (ROBBINS, 2003; BIROŠOVA *et al.*, 2007). Foi relatado que alguns ácidos fenólicos possuem atividade antitumoral contra a carcinogênese do cólon (OLTHOF *et al.*, 2001), podem inibir a atividade transcripcional da AP-1 (AP-1 é uma proteína ativadora envolvida no processo que controla a inflamação, diferenciação celular e proliferação) (MAGGI-CAPEYRON *et al.*, 2001), apresentam efeitos potencialmente protetores contra o câncer e doenças cardíacas (WEN *et al.*, 2005), entre outros.

Além desses efeitos biológicos, tem-se observado também que os compostos fenólicos podem auxiliar no combate à obesidade. Sugiyama e colaboradores (2007) investigaram o efeito inibitório de um extrato de compostos fenólicos da maçã na lipase pancreática *in vitro* e na absorção de triglicerídeos em ratos e humanos. Os autores concluíram que o extrato de compostos fenólicos da maçã inibe a lipase pancreática e previne contra a elevação dos níveis de triglicerídeos plasmáticos pós-prandial e foi sugerido que as procianidinas oligoméricas foram os principais responsáveis pela diminuição na absorção de triglicerídeos e altamente eficientes na inibição da lipase pancreática.

As isoflavonas (genisteína e daidzeína, encontradas na soja) exercem efeitos significativos na saúde dos ossos de mulheres no período pós-menopausa, além de alguns efeitos hormonais fracos. As catequinas monoméricas (encontradas em altas concentrações nos chás verde e preto) apresentam efeitos nos biomarcadores antioxidantes plasmáticos e no metabolismo energético (WILLIAMSON; MANACH, 2005).

As procianidinas (catequinas oligoméricas encontradas em altas concentrações no vinho tinto, uva, cacau e maçã) apresentam efeito pronunciado no sistema vascular, incluindo o aumento da atividade antioxidante plasmática. Elas são capazes de promover uma diminuição das LDL (e da sua susceptibilidade à oxidação) e aumento das HDL (WILLIAMSON; MANACH, 2005).

A quercetina (principal representante da classe dos flavonóis, encontrada em altas concentrações em cebola, maçã, vinho tinto, brócolis, chá e *Ginkgo biloba*) influencia alguns marcadores carcinogênicos e apresenta efeito pequeno nos biomarcadores antioxidantes plasmáticos, porém alguns estudos falharam ao tentar confirmar esses efeitos (WILLIAMSON; MANACH, 2005).

### **2.5.3. Biodisponibilidade e metabolismo**

A absorção de micronutrientes e fitoquímicos pelo corpo durante o consumo de alimentos não é completa e uma porcentagem deles não é absorvida. Para determinar a quantidade que é realmente absorvida, distribuída para os tecidos, metabolizada e,

eventualmente, excretada, foi introduzido o termo biodisponibilidade (HOLST; WILLIAMSON, 2008).

Biodisponibilidade descreve a concentração de um dado composto ou seu metabólito no órgão alvo. A “Food and Drug Administration” (2009) define biodisponibilidade como a *taxa e a extensão na qual uma molécula ativa é absorvida de um produto e se torna disponível no local de ação*.

A definição do termo biodisponibilidade abrange diversos processos integrados: liberação (liberação e dissolução de um composto para torná-lo disponível para absorção), absorção (movimento de um composto do local de administração para a circulação sanguínea), distribuição (difusão ou transferência de um composto do espaço intravascular – sangue, para o extracelular – tecidos), metabolismo (conversão bioquímica de um composto para uma forma mais fácil de eliminar) e excreção (eliminação de um composto inalterado ou metabólitos do corpo, principalmente via renal, biliar ou pulmonar) (HOLST; WILLIAMSON, 2004).

Estudos *in vivo* a respeito da biodisponibilidade e da cinética metabólica dos compostos fenólicos objetivam: (a) elucidar o modo de ação do composto, (b) determinar quais componentes são melhores absorvidos, levando à formação de metabólitos ativos e (c) demonstrar a ligação direta entre os componentes alimentícios, os metabólitos e os efeitos biológicos (KOUNTOURI *et al.*, 2007).

Para algumas classes de compostos fenólicos, existem diversos estudos de intervenção que indicam o tipo e a magnitude dos efeitos *in vivo* em humanos, baseados nas mudanças, a curto prazo, de biomarcadores (WILLIAMSON; MANACH, 2005).

Existem outros estudos a respeito dos efeitos dos compostos fenólicos em sistemas biológicos *in vitro*. Entretanto, vários deles não consideram a biodisponibilidade e o metabolismo, sendo que os efeitos reportados não necessariamente ocorrem *in vivo*. Apesar da maioria dos compostos fenólicos ser absorvida em alguma extensão, isto é muito dependente do tipo de composto fenólico. Além disso, a absorção é acompanhada por metabolismo e conjugação extensivos e as formas que aparecem no sangue são usualmente diferentes das formas encontradas nos alimentos. Isto indica que experimentos *in vitro* com a forma do composto fenólico

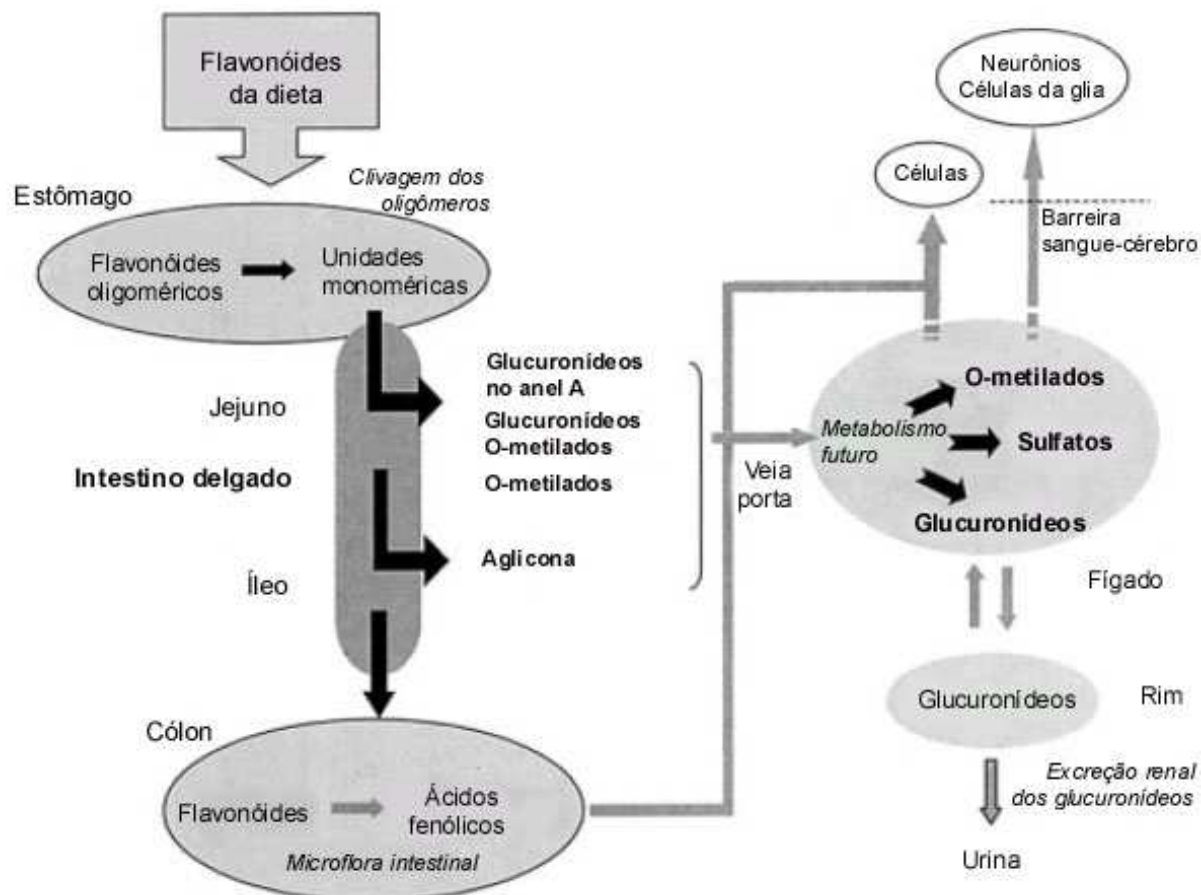
encontrado no alimento não são necessariamente relevantes para a situação *in vivo* (WILLIAMSON; MANACH, 2005).

A estrutura química do composto fenólico é a característica que exerce o maior impacto na absorção intestinal. Os parâmetros mais discutidos são o peso molecular, a glicosilação e a esterificação. A maioria dos flavonóides, com exceção das catequinas e procianidinas, está na forma glicosilada nos alimentos, e esta glicosilação influencia a absorção através da barreira intestinal (SCALBERT *et al.*, 2002).

A maioria dos compostos fenólicos glicosilados são deglicosilados pela  $\beta$ -glicosidase no intestino delgado, sendo absorvidos na forma aglicona. Esta etapa é um requisito para a absorção de vários compostos fenólicos (KROON *et al.*, 2004). Outros estudos relatam a absorção dos glicosídeos intactos (HOLLMAN; KATAN, 1998).

O trato gastrointestinal exerce um papel significativo no metabolismo e na conjugação dos compostos fenólicos antes deles alcançarem o fígado. A clivagem dos flavonóides (como por exemplo, as procianidinas, que apresentam alto peso molecular) pode ocorrer no estômago devido ao ambiente de baixo pH (SPENCER, 2003).

A maioria dos compostos fenólicos dietéticos absorvidos no intestino é rapidamente eliminada na urina e na bile após a ingestão (SCALBERT *et al.*, 2002), conforme pode ser observado no esquema da Figura 9.



**Figura 9.** Resumo da formação dos metabólitos e conjugados dos flavonóides em humanos.

Fonte: SPENCER (2003).

Durante o metabolismo, os compostos fenólicos sofrem conjugação no intestino delgado (metilação, sulfuração e glucuronidação) (SCALBERT *et al.*, 2002). No jejuno e íleo, ocorre uma glucuronidação eficiente dos flavonóides pela ação das UDP-glucosiltransferases e extensiva O-metilação pela ação da catecol-O-metiltransferase, sendo que os metabólitos resultantes alcançam a veia porta e sofrem posterior metabolismo no fígado (SPENCER, 2003).

A formação de derivados aniônicos por conjugação com glucuronídeos e grupos sulfatos facilita a excreção urinária e biliar, o que explica a rápida eliminação desses compostos fenólicos (SCALBERT *et al.*, 2002).

A microflora colonial degrada os flavonóides em ácidos fenólicos menores, os quais podem também ser absorvidos. O destino da maioria desses metabólitos é a

excreção renal, entretanto, a extensão com que esses compostos alcançam as células e os tecidos ainda é desconhecida. Os compostos restantes derivados da ingestão de flavonóides são eliminados nas fezes (SPENCER, 2003).

O resultado do metabolismo extensivo dos compostos fenólicos dietéticos é que, salvo algumas exceções, as formas predominantes (e muitas vezes exclusiva) no plasma são conjugados (glucuronados ou sulfatos, com ou sem metilação). Esses conjugados são quimicamente distintos dos seus compostos originais, diferindo em tamanho, polaridade e forma iônica. Conseqüentemente, seu comportamento fisiológico é susceptível a ser diferente do composto na forma nativa (KROON *et al.*, 2004).

Existem vários estudos que abordam a biodisponibilidade e o metabolismo dos compostos fenólicos. Bermúdez-Soto e colaboradores (2007) estudaram os efeitos *in vitro* das digestões gástrica e pancreática na estabilidade e composição dos compostos fenólicos majoritários do suco de “chokeberry”, e observaram que esses compostos foram alterados durante a digestão pancreática, sendo este efeito mais pronunciado para as antocianinas. Os autores concluem que os compostos fenólicos dietéticos são altamente sensíveis às condições de meio alcalino no intestino delgado e boa parte desses compostos podem ser transformados em outros de forma estrutural desconhecida, com diferentes propriedades químicas e, conseqüentemente, diferentes bioacessibilidade, biodisponibilidade e atividade biológica. Vale ressaltar que nem sempre o comportamento fisiológico observado *in vitro* reproduz-se *in vivo*.

Kountouri e colaboradores (2007), em um estudo que objetivou avaliar a biodisponibilidade dos compostos fenólicos da azeitona e correlacionar com sua eficácia antioxidante em plasma e urina de voluntários saudáveis, concluíram que a administração de azeitona leva a um aumento dos compostos fenólicos e do potencial antioxidante total do plasma. Além disso, observaram que os compostos fenólicos são extensivamente metabolizados no corpo humano e aparecem nos fluidos biológicos, principalmente como glucuronídeos.

Donovan e colaboradores (1999) conduziram um estudo que abordou o metabolismo da catequina após o consumo de vinho tinto e concluíram que este composto está presente, quase que exclusivamente, como metabólitos no plasma.

#### 2.5.4. Metabólitos microbianos dos compostos fenólicos

Pouco se sabe a respeito do metabolismo da microflora intestinal humana, porém esta provavelmente exerce um papel importante na atividade biológica de muitos compostos fenólicos.

Após alcançarem o cólon, os metabólitos dos flavonóides ficam sujeitos ao metabolismo bacteriano pela flora colonial (SCALBERT *et al.*, 2002).

O cólon contém aproximadamente  $10^{12}$  microrganismos/cm<sup>3</sup>, os quais possuem um vasto potencial catalítico e hidrolítico, e a degradação enzimática dos flavonóides pela microflora colonial resulta em uma enorme variedade de novos metabólitos. As enzimas bacterianas podem catalisar várias reações incluindo hidrólise, dehidroxilação, demetilação, clivagem do anel e descarboxilação, assim como, desconjugação rápida. Diferentemente das enzimas humanas, a microflora catalisa a quebra da estrutura do flavonóide a moléculas simples como os ácidos fenólicos (SPENCER, 2003).

As bactérias do cólon possuem enzimas de desconjugação, como por exemplo, a  $\beta$ -D-glucuronidase,  $\beta$ -D-glicosidase e  $\alpha$ -L-raminosidase, as quais liberam as agliconas dos flavonóides dos seus glicosídeos e glucuronídeos. Entretanto, o aparecimento de agliconas é apenas transiente, pois ocorre uma rápida fissura no anel, produzindo um pequeno número de ácidos menores (AURA *et al.*, 2005). O metabolismo extensivo dos compostos fenólicos dietéticos no cólon depende da concentração do substrato e do tempo de residência (RECHNER *et al.*, 2004).

Após a desconjugação catalisada por enzimas bacterianas de qualquer composto fenólico conjugado que alcança o cólon, existem duas rotas possíveis: absorção do composto fenólico intacto através do epitélio do cólon e a passagem para a corrente sanguínea (como forma livre ou conjugada) ou a quebra da estrutura original do composto fenólico em metabólitos (WILLIAMSON; MANACH, 2005). Esses fenólicos simples formados podem ser considerados biomarcadores do metabolismo colonial se absorvidos subseqüentemente (RECHNER *et al.*, 2004).

O metabolismo microbiano merece atenção especial porque alguns metabólitos microbianos podem ter efeitos biológicos únicos (WILLIAMSON; MANACH, 2005).

Os compostos fenólicos podem também acarretar algumas alterações na composição da microflora colonial. Existem estudos que mostram que as antocianinas



ou extratos de plantas ricas neste grupo de flavonóides possuem um efeito no crescimento microbiano, porém os resultados ainda não são conclusivos.

Puupponin-Pimiä e colaboradores (2001) mostraram que os extratos de diferentes berries apresentam um efeito inibitório no crescimento de bactérias gram-negativas. Além disso, eles apontaram que os extratos de blackcurrant estimularam o crescimento de diferentes cepas de *Lactobacillus rhamnosus* e *Lactobacillus paracasei*, mas inibiram o da *Escherichia coli*.

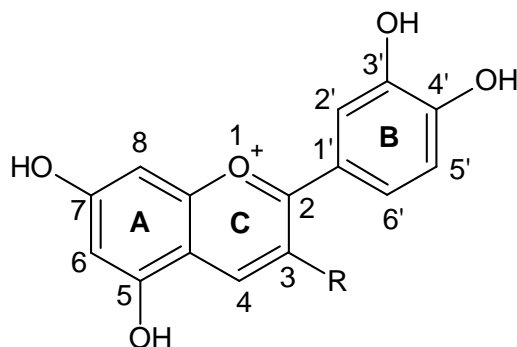
Estudos recentes demonstraram que os concentrados de blackcurrant inibem o crescimento de diferentes cepas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Enterococcus faecium*, mas estimulam o crescimento de *Saccharomyces cerevisiae* (Werlein *et al.*, 2005).

## **2.5.5. As antocianinas**

### *2.5.5.1. Generalidades*

As antocianinas (do grego *anthos* = flor, e *kyanos* = azul escuro) (Figura 10) são compostos pertencentes à família dos flavonóides. Contam-se vinte variedades de antocianinas, mas apenas 6 dentre elas têm importância alimentícia: a pelargonidina, a cianidina, a delphinidina, a peonidina, a petunidina e a malvidina (ROGEZ, 2000).

Quimicamente, as antocianinas são originadas do cátion flavílio, o qual é constituído por um esqueleto de 15 carbonos com anel aromático sustentado por um segundo anel aromático na posição dois (C6-C3-C6), devidamente adicionado a grupos fixados sobre os anéis aromáticos, principalmente grupos hidroxilas, formando a antocianidina (aglicona). As antocianidinas ligadas a uma ou mais moléculas de açúcares, principalmente glicose, galactose, raminose, xilose e arabinose formam as antocianinas (Figura 10) (MARKAKIS, 1982; FENNEMA, 1993; STRACK; WRAY, 1993; COULTATE, 1998; CLIFFORD, 2000).



R = molécula de carboidrato.

**Figura 10.** Estrutura molecular das antocianinas.

A partir da estrutura básica (polifenólica) dos flavonóides, tem-se uma infinidade de cores através de combinações químicas com os glicosídios e/ou grupo acila e também através de interação com outras moléculas, originando coloração rósea, vermelho, roxo, azul e púrpura das flores, frutos e legumes, bem como da cor roxo avermelhada, característica do açaí preto (WIEBOLD, 1992; STRACK; WRAY, 1993; COULTATE, 1998).

As diferenças nos tipos de antocianinas levam a diferenças de estabilidade, o que explica por que certos frutos ou mesmo certas variedades de uma mesma espécie frutífera são mais apropriadas para a fabricação de suco de cor mais estável do que outras (LAMIKANRA, 1988).

#### 2.5.5.2. Biodisponibilidade e possíveis efeitos biológicos

Cada vez mais surgem artigos científicos que sugerem que as antocianinas, frutas ricas em antocianinas ou extratos derivados, apresentam uma diversidade de efeitos benéficos para a saúde humana. Estes efeitos podem estar relacionados às características químicas e capacidade antioxidante inerente desses compostos. As propriedades biomédicas atribuídas para cada antocianina pura, frutas ricas em antocianinas ou extratos incluem uma vasta lista de efeitos benéficos: na capacidade visual, na função cognitiva do cérebro, na prevenção contra obesidade, proteção contra úlcera, risco cardiovascular e prevenção de câncer (ESPÍN *et al.*, 2007).

Williamson e Manach (2005), em um estudo acerca da biodisponibilidade de compostos fenólicos em humanos, mostraram que para diferentes fontes de

antocianinas, tipo de matriz que as antocianinas são administradas (suco, extrato ou cápsula) ou quantidade total administrada, as concentrações de antocianinas totais medidas no plasma podem variar bastante e são, geralmente, muito baixas (na faixa nano molar – nM), sendo a maioria abaixo de 0,1  $\mu$ M. A absorção é rápida e as antocianinas podem ser detectadas em menos de 1,5h após a ingestão, indicando que a absorção provavelmente ocorre no estômago ou no intestino delgado.

Somente uma pequena parte das antocianinas da dieta é absorvida. Então, grandes quantidades de compostos ingeridos provavelmente alcançam o cólon. A atividade da microflora do cólon e a baixa estabilidade das antocianinas no pH intestinal são, pelo menos, fatores parcialmente responsáveis pela conversão das antocianinas em ácido fenólicos estáveis menores ou outras moléculas de estrutura desconhecida. A natureza dos metabólitos das antocianinas formados e absorvidos *in vivo* é outro aspecto importante do metabolismo das antocianinas. Entretanto, existe pouca informação nas transformações bacterianas de antocianinas (ESPÍN *et al.*, 2007).

Além disso, as antocianinas são rapidamente eliminadas na urina (em menos de 4-6h). A proporção de antocianinas absorvida e excretada é menor que 0,1% da quantidade ingerida, indicando que o caminho metabólico de uma grande quantidade das antocianinas ingeridas ainda não foi elucidado (ESPÍN *et al.*, 2007).

Vários estudos demonstraram que as antocianinas intactas são absorvidas e excretadas na urina em pequenas quantidades (MILBURY *et al.*, 2002; MÜLLEDER *et al.*, 2002; NETZEL *et al.*, 2005).

Outros estudos demonstram que as antocianinas são metabolizadas, já que parte delas foi encontrada nas formas metilada, sulfatada ou glucuronidada (WU *et al.*, 2002; FELGINES *et al.*, 2003).

Como possíveis efeitos biológicos foram observadas melhorias na capacidade visual, as quais têm sido atribuídas às antocianinas, porém apenas um estudo em humanos indicou uma melhoria aparente da visão noturna em indivíduos míopes após altas doses repetidas de um oligômero antocianosídeo purificado (LEE *et al.*, 2005a e 2005b).

Além disso, vários estudos com animais mostraram que as antocianinas aumentam a performance cognitiva e protegem a função cerebral reduzindo o dano

isquêmico oxidativo e melhorando a memória (BARROS *et al.*, 2006; KANG *et al.*, 2006; SHIN *et al.*, 2006).

Diabetes e obesidade também foram prevenidas em animais alimentados com antocianinas pelo decréscimo dos níveis de açúcar sanguíneo ou pela redução do ganho de massa e tecido adiposo (TSUDA *et al.*, 2003; GUO *et al.*, 2007).

Além disso, a fruta “chokeberry” mostrou ter a capacidade de inibir o crescimento da *Helicobacter pylori* (CHATTERJEE *et al.*, 2004).

Em outro trabalho, a administração de uma dose única de uma mistura de antocianinas diminuiu o tamanho da área de infarto num modelo de ratos com injúria miocárdial (KIM *et al.*, 2006).

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética de Pesquisa Envolvendo Seres Humanos do Núcleo de Medicina Tropical da Universidade Federal do Pará (UFPA), protocolo 050/2005, segundo resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde do Ministério da Saúde (CNS/MS). Os voluntários assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo 1), onde foram informados de maneira clara e objetiva sobre o desenvolvimento do trabalho, assim como o livre arbítrio na participação da pesquisa.

#### 3.1. SELEÇÃO E PERFIL DOS VOLUNTÁRIOS

O recrutamento de voluntários foi realizado no Laboratório de Engenharia Química e de Alimentos na Universidade Federal do Pará. Foram escolhidos a participar da pesquisa os que atendiam aos seguintes critérios: ser do sexo masculino com idade igual ou superior a 20 anos; gozar de boa saúde física e mental; não ser alcoólatra ou praticante de atividades físicas extenuantes; não ser fumante e não fazer uso de medicamentos ou suplemento alimentar.

A pesquisa foi realizada com 6 voluntários do sexo masculino, com idade entre 21 e 36 anos (Tabela 3). A média dos pesos dos voluntários foi de 78,23 Kg ( $\pm 9,74$ ).

**Tabela 3.** Perfil dos participantes da pesquisa.

<b>Voluntário</b>	<b>Idade (anos)</b>	<b>Peso (Kg)</b>
A	25	70,4
B	29	79,2
C	34	80,9
D	32	77,5
E	21	66,7
F	36	94,7
Média	29,5	78,23

Foi solicitado aos voluntários que não consumissem açaí ou qualquer alimento que contivesse compostos fenólicos no período de 1 semana antecedendo as coletas de sangue, sendo repassada para os mesmos uma lista de matérias-primas a serem evitadas. Também foram suspensos, 5 dias antes das coletas, alimentos contendo

vitamina C. O consumo de bebida alcoólica foi suspenso 24 horas antes do início das coletas.

### 3.2. AMOSTRAS DE AÇAÍ

A bebida processada e resfriada feita a partir dos frutos de açaizeiro foi adquirida em produtor local (feira da 25 de Setembro, bairro do Marco, Belém/PA). O açaí era do tipo grosso (16,27% de matéria-seca – M.S.) e foi obtido na manhã do experimento, imediatamente transportado ao local da coleta do material biológico e armazenado a 4°C.

### 3.3. PLANEJAMENTO DO EXPERIMENTO

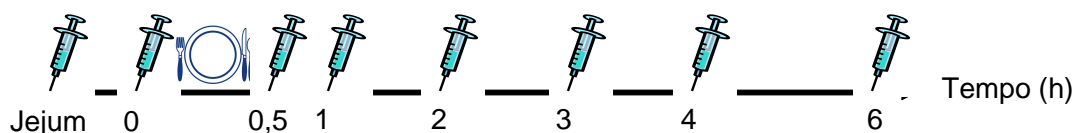
As coletas de sangue (Figura 11) e urina foram realizadas nas dependências do Laboratório Dr. Paulo Azevedo, em Belém/PA, por profissionais capacitados da área da saúde. As fezes foram recolhidas na própria residência dos voluntários em recipientes previamente repassados e levadas ao laboratório na manhã do experimento. A experiência foi realizada em dois finais de semana seguidos.



**Figura 11.** Coleta de sangue.

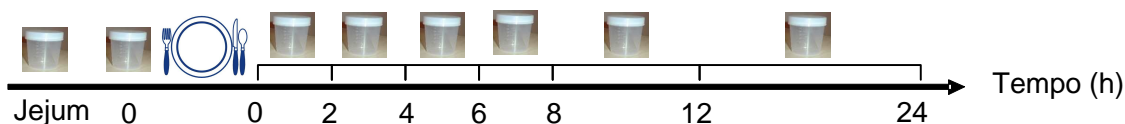
Os voluntários chegaram ao laboratório às 8:30h da manhã do domingo, estando em jejum de pelo menos 10 horas, quando ocorreu a primeira coleta de sangue. Em seguida, eles tomaram café da manhã (quantitativos nos Quadros 2 e 3). Às 11:30h, os voluntários foram submetidos a outra coleta de sangue (que neste trabalho é

referenciada como t=0) e receberam almoço às 12:00h. Foram realizadas coletas 30 minutos (t=30), 1 (t=1), 2 (t=2), 3 (t=3), 4 (t=4) e 6 (t=6) horas após o término do almoço (12:30h). Um esquema ilustrando os tempos das coletas de sangue está apresentado na Figura 12.



**Figura 12.** Esquema dos tempos de coleta de sangue.

As coletas de urina foram realizadas nos voluntários em jejum, no intervalo entre o café da manhã e o almoço (t=0) e nos intervalos de 0 a 2h (t=0-2), 2 a 4h (t=2-4), 4 a 6h (t=4-6), 6 a 8h (t=6-8), 8 a 12h (t=8-12) e 12 a 24h (12-24) após o término do almoço, sendo que se houvesse duas coletas no mesmo intervalo, estas seriam mantidas em recipientes separados. Um esquema ilustrando os tempos das coletas de urina está apresentado na Figura 13.



**Figura 13.** Esquema dos tempos de coleta de urina.

As coletas de fezes foram realizadas da seguinte maneira: em cada final de semana do experimento eram coletadas duas amostras. A primeira amostra consistiu nas fezes da noite anterior (sábado) ao domingo (que seria o branco). A segunda coleta realizada foi das primeiras fezes após o domingo do experimento.

Vale ressaltar que nas coletas após o almoço, os voluntários não ingeriram qualquer tipo de alimento, sendo o consumo de água liberado durante o dia todo. A ingestão de alimento ocorreu somente após a última retirada de sangue (18:30h), quando receberam o lanche da tarde (Quadros 3 e 4).

**Quadro 3.** Dieta fornecida aos voluntários no primeiro fim de semana (sem açaí).

Refeição	Quantidade	Proteína (g)	Carboidratos (g)	Lipídeos (g)	Fibras (g)
<b>Café da manhã</b> (um no domingo)					
Cream-Cracker	36,8g	3,96	23,88	5,46	0,7
Iogurte Natural	200g	7	31	0,20	0
Requeijão	12g	1,92	0,98	2,57	0
<b>Almoço</b> (um no sábado e um no domingo)					
Almôndegas	240g	36,18	16,96	30,72	0
Arroz	250g	5,75	80,75	7,25	<1
Farinha	20g	0,34	17,28	0,06	0,4
<b>Lanche</b> (um no sábado e um no domingo)					
Pão de forma	50g	4,66	28,7	0,1	1,3
Queijo Processado	20g	2,26	0,58	5,16	0
Salame	80g	14,72	2,24	16,64	0,8
Leite em Pó	30g	7,92	11,46	8,28	0
<b>Jantar</b> (um no sábado e um no domingo)					
Peito de Frango	220g	40,04	0	11,08	0
Macarrão	100g	3,4	23	0,40	4
Arroz	150g	3,45	48,45	4,35	<1
<b>TOTAL</b>	<b>1396,8g</b>	<b>131,6</b>	<b>285,28</b>	<b>92,27</b>	<b>-</b>

**Quadro 4.** Dieta fornecida aos voluntários no segundo fim de semana (com açaí).

Refeição	Quantidade	Proteína (g)	Carboidratos (g)	Lipídeos (g)	Fibras (g)
<b>Café da manhã</b> (um no domingo)					
Cream- Cracker	36,8g	3,96	23,88	5,46	0,7
Iogurte Natural	200g	7	31	0,2	0
Requeijão	12g	1,92	0,98	2,57	0
<b>Almoço</b> (um no sábado e um no domingo)					
Almondêgas	120g	18,09	8,48	15,36	0
Arroz	125g	2,87	40,37	3,62	<1
Farinha	40g	0,68	34,56	0,12	0,8
<b>AÇAÍ (domingo)</b>	<b>500mL</b>	<b>7,05</b>	<b>2,04</b>	<b>36,8</b>	<b>15,75</b>
<b>Lanche</b> (um no sábado e um no domingo)					
Pão de forma	100g	9,32	57,4	0,20	2,6
Queijo Processado	20g	2,26	0,58	5,16	0
Salame	40g	7,36	1,12	8,32	0,4
Leite em Pó	30g	7,92	11,46	8,28	0
<b>Jantar</b> (um no sábado e um no domingo)					
Peito de Frango	220g	40,04	0	11,08	0
Macarrão	250g	8,5	57,5	1	10
<b>TOTAL</b>	<b>1181,8g</b>	<b>116,97</b>	<b>269,37</b>	<b>98,17</b>	<b>-</b>



A composição da dieta detalhada nos Quadros 3 e 4 foi estimada por meio dos valores descritos nos rótulos dos alimentos em questão.

A principal diferença no cardápio dos dois domingos foi o consumo de 500 mL de açaí. A ingestão do açaí aconteceu juntamente com o almoço, sendo que as coletas aconteceram nos mesmos horários em ambos os fins de semana.

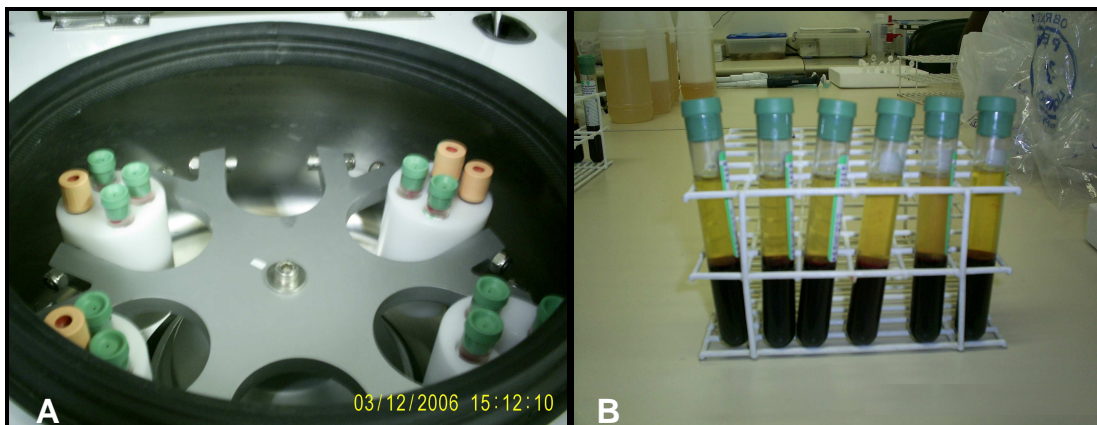
As refeições fornecidas para os voluntários foram padronizadas desde o almoço do dia anterior às coletas até o jantar do dia da coleta (Quadros 3 e 4). Elas foram feitas levando-se em consideração a ingestão energética diária recomendada para homens adultos entre 20 e 40 anos. No primeiro dia foram totalizadas, aproximadamente, 2500 Kcal e no segundo, 2430 Kcal.

A dieta dos dois dias (com e sem açaí) era composta por, aproximadamente, 25% de proteínas, 55% de carboidratos e 20% de gorduras.

Vale ressaltar que quando houve consumo de açaí, a dieta foi rearranjada de modo que os voluntários consumissem quantidades aproximadas, em Kcal, nos dois dias, sendo descontados das refeições ao longo do dia, os valores de proteínas, carboidratos e lipídeos referentes aos 500 mL de açaí ingeridos no segundo final de semana.

#### 3.4. CONDICIONAMENTO DAS AMOSTRAS DE SANGUE, URINA E FEZES

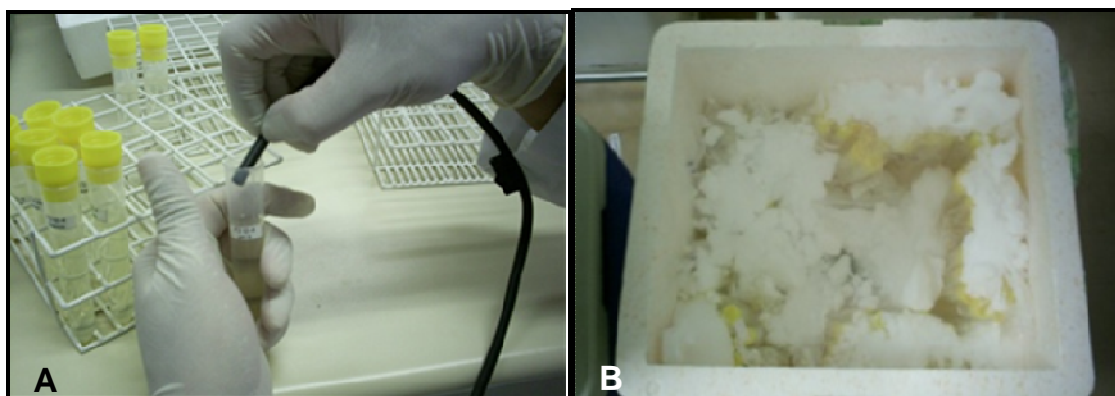
O sangue foi coletado à vácuo em tubos contendo heparina sódica do tipo BD vacutainer® (Franklin Lakes, New Jersey). Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 3000 rpm durante 6 minutos a temperatura ambiente, em centrífuga Laborline modelo LAB – 0384, a fim de se obter o plasma (Figura 14).



**Figura 14.** Centrifugação do sangue (A); obtenção do plasma humano (B).

As amostras de urina, assim como as de plasma, foram acidificadas com uma solução de ácido trifluoroacético 0,44M até que atingissem o pH 1,0 e colocadas em atmosfera de nitrogênio (Figura 15A).

As amostras de plasma, urina e fezes foram congeladas em gelo seco (Figura 15B) e armazenadas a  $-22^{\circ}\text{C}$  até o momento das análises.



**Figura 15.** Amostras de urina sendo saturadas com nitrogênio gasoso (A) e amostras biológicas congeladas em gelo seco (B).

### 3.5. ANÁLISES DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Para a caracterização da matéria-prima e das amostras biológicas foram feitas as análises discriminadas a seguir. Para a realização destas análises, as amostras de plasma não passaram por nenhum tipo de tratamento, sendo apenas diluídas na

quantidade necessária. As amostras de urina foram centrifugadas a 3000 rpm por 6 minutos, afim de remover possíveis interferentes.

As amostras de fezes foram separadas em duas alíquotas e cada alíquota foi submetida a um tipo de extração. As extrações foram realizadas com água ultrapura e acetona, a uma diluição de 3 vezes. Então, os extratos foram misturados na proporção 3:1 e armazenados sob atmosfera de nitrogênio para a posterior realização das análises.

### **3.5.1. Polifenóis totais**

A concentração de polifenóis totais foi determinada pelo método colorimétrico de Folin-Ciocalteu (SINGLETON; ROSSI, 1965), descrito por Silva e colaboradores (2007).

Singleton e Rossi (1965) propuseram um método que utiliza o reagente molibdotungstênio-fosfórico heteropoliânion, que reduz mais especificamente os fenóis, em meio básico (com solução de carbonato de sódio, pH~10), sendo empregado o ácido gálico como padrão fenol de referência.

A mistura para a reação foi de: 250 µL de amostra (água destilada para o branco), 125 µL de solução de Folin-Ciocalteu 1N e 625 µL de carbonato de sódio a 75 g/L. Após o período de incubação de 30 minutos, 200 µL foram repassados para os poços da microplaca (96 poços, transparente, Nalge Nunc International, Rochester, NY) e a absorbância lida a 750 nm em espectrofotômetro BIOTRAK (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). A análise foi realizada em duplicata.

Os cálculos foram baseados na curva de calibração obtida com ácido gálico. Esta análise foi realizada apenas nas amostras de açaí e fezes, sendo os resultados expressos em miligrama de equivalente de ácido gálico por litro de açaí ou grama de fezes, respectivamente. Os resultados de fezes foram multiplicados pela massa recolhida de fezes em cada uma das coletas. O resultado final foi expresso em µmol ET.

### 3.5.2. ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity)

A metodologia utilizada para a quantificação do valor ORAC foi proposta por Huang e colaboradores (2002) e Ou e colaboradores (2001) e descrita por Silva (2002).

A análise foi realizada usando microplacas (96 poços, branco opaco, Greiner Bio-One, Wemmel, Belgium) e um fluorímetro Ascent F.L. (Fluoroscans LabSystems, Helsinki, Finland).

Para a realização da análise, adicionou-se a cada poço da microplaca 150 µL de fluoresceína, posteriormente 25 µL de amostra biológica diluída em tampão, tampão para o branco e trolox como padrão nas concentrações de 4, 8, 20 e 40 µM. A placa foi incubada por 15 minutos a 37°C. A leitura iniciou-se e após a injeção automática de 25 µL de AAPH. Todas as diluições foram realizadas em tampão fosfato pH = 7,4.

A diminuição da fluorescência foi acompanhada durante 50 minutos por leituras com intervalos de 1 minuto ( $\lambda_{excitação}=485nm$  ;  $\lambda_{emissão}= 520 nm$ ). Após 50 minutos, se a fluorescência não era inferior a 5% do valor inicial, a amostra era diluída e a análise repetida.

A triplicata foi realizada numa mesma horizontal da microplaca, a fim de diminuir os erros de leitura e o valor ORAC foi calculado pela média obtida. A quantificação da atividade antioxidante foi baseada no cálculo da área sob a curva (AUC) (Figura 16), proposta por Cao e Prior (1999), conforme a equação a seguir.

$$ORAC_{ET} = \left[ \frac{(AUC_{amostras} - AUC_{Branco})}{(AUC_{Trolox} - AUC_{Branco})} \right] * [Trolox] * d$$

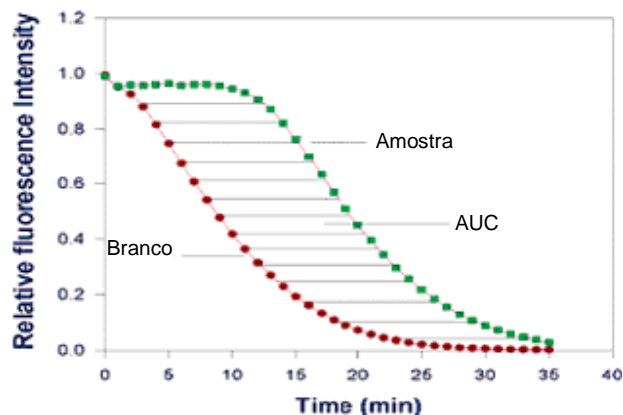
Onde:

ORAC<sub>ET</sub> = Valor ORAC em µmol ET(equivalente trolox)/L

[Trolox] = Concentração do trolox

AUC = área sob a curva das amostras, do branco (tampão fosfato) e do trolox (calculado pelo valor obtido a partir do coeficiente angular da equação da regressão linear do trolox)

d = fator de diluição



**Figura 16.** Cálculo para o método ORAC: Capacidade antioxidante da amostra testada expressa como área sob a curva (AUC).

**Fonte:** PRIOR e colaboradores (2005).

Esta análise foi realizada nas amostras de açaí, plasma, urina (sendo a atividade antioxidante para essas três amostras expressa em  $\mu\text{mol}$  de equivalente trolox por litro de açaí, plasma ou urina) e fezes (expressa em  $\mu\text{mol}$  de equivalente trolox por grama de fezes). Os resultados de fezes foram multiplicados pela massa recolhida desta amostra biológica, sendo o resultado final expresso em  $\mu\text{mol}$  ET.

### 3.5.3. TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity)

O método TEAC foi adaptado do proposto por Re e colaboradores (1999) e descrito para a realização em microplacas por Silva e colaboradores (2007).

A análise foi conduzida em espectrofotômetro BIOTRAK (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) a 750 nm.

A solução estoque de  $\text{ABTS}^{+\bullet}$  (7mM) foi preparada em água ultra-pura usando 1 mL de persulfato de potássio (25,4 mM) como agente oxidante. Esta solução foi mantida ao abrigo de luz por, no mínimo, 16 horas em temperatura ambiente, para a formação dos radicais. A solução trabalho de  $\text{ABTS}^{+\bullet}$  foi obtida diluindo-se a solução estoque em etanol até atingir a absorvância entre 0,39-0,42.

A solução estoque de trolox (40 mM) foi preparada em etanol e armazenada a -20°C sob atmosfera de nitrogênio. A partir desta solução foram feitas diluições para

obter-se a reta de calibração com 5 concentrações diferentes: 4 µM, 8 µM, 12 µM, 16 µM e 20 µM.

Uma alíquota de 10 µL da amostra diluída ou de trolox foi colocada na microplaca (96 poços, transparente, Nalge Nunc International, Rochester, NY) e a reação começou após a adição de 190 µL da solução de trabalho do ABTS\*. O grau de descoloração que reflete a cinética de diminuição do radical foi acompanhado por 6 minutos.

O valor TEAC foi calculado pela medida da área sob a curva derivada da porcentagem de inibição da absorbância em função do tempo. As amostras foram analisadas em triplicata. A atividade antioxidante das amostras foi expressa em µM ET (equivalente trolox), conforme o cálculo por meio das equações a seguir. Esta análise foi realizada apenas nas amostras de fezes.

$$\text{TEAC } (\mu\text{mol ET}/100\text{g}) = (\text{AUC}_{\text{amostra}} / \alpha \text{ Trolox}) * \text{diluição}$$

Onde:

$\text{AUC}_{\text{amostra}}$  = área sob a curva de inibição da amostra

$\alpha$  Trolox = coeficiente angular obtido da curva de calibração

O cálculo da área sob a curva da amostra e do trolox é demonstrado na equação abaixo.

$$\text{AUC} = \left( \% \text{Inb}_{(t=0)} \times 0.5 + \sum_{i=2}^{36} \% \text{Inb}_{(t=10 \times i)} \right) \times 10$$

Sendo % Inib a porcentagem de inibição no tempo t (s) e que é dada por:

$$\% \text{Inb} = \frac{A_{\text{BRANCO}} - A_{\text{AMOSTRA}}}{A_{\text{BRANCO}}} \times 100$$

Os resultados em µmol ET/100g foram multiplicados pela massa recolhida de fezes. O resultado final foi expresso em µmol ET.

### 3.5.4. DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazil)

A análise pelo método DPPH foi realizada de acordo com o procedimento descrito por Fernández-Pachón e colaboradores (2006), sendo feitas algumas modificações.

A mistura reacional foi composta pela adição de 2925 µL de solução metanólica de DPPH\* (25 mg/L, preparada ao abrigo de luz) e 75 µL da amostra diluída em metanol. A absorbância foi lida em espectrofotômetro (Ultrospec 2000, UV/Visible – Pharmacia Biotech, Suécia) a 515 nm em diferentes intervalos de tempo, até 20 minutos de reação, sendo as amostras diluídas de maneira a apresentarem uma absorbância constante nesse período (valor final equivalente a menos de 1% da absorbância inicial). As leituras foram feitas em duplicata.

Soluções padrões de trolox foram analisadas para a construção da curva de calibração. A partir de uma solução estoque de 5 mM, preparada com metanol e armazenada a -20°C, foram feitas 5 concentrações: 800, 500, 250, 100 e 25 µM. As atividades de seqüestro de cada amostra foram calculadas de acordo com a porcentagem de inibição do radical DPPH\* (% Inib), conforme demonstrado na equação a seguir.

$$\%Inb = \frac{A_B - A_A}{A_b} \times 100$$

Onde:  $A_B$  e  $A_A$  são os valores de absorbância do branco e da amostra, respectivamente, ao término da reação.

O valor da atividade antioxidante foi expresso em µmol de equivalente trolox/100g a partir do coeficiente de regressão calculado da curva de calibração, conforme equação a seguir.

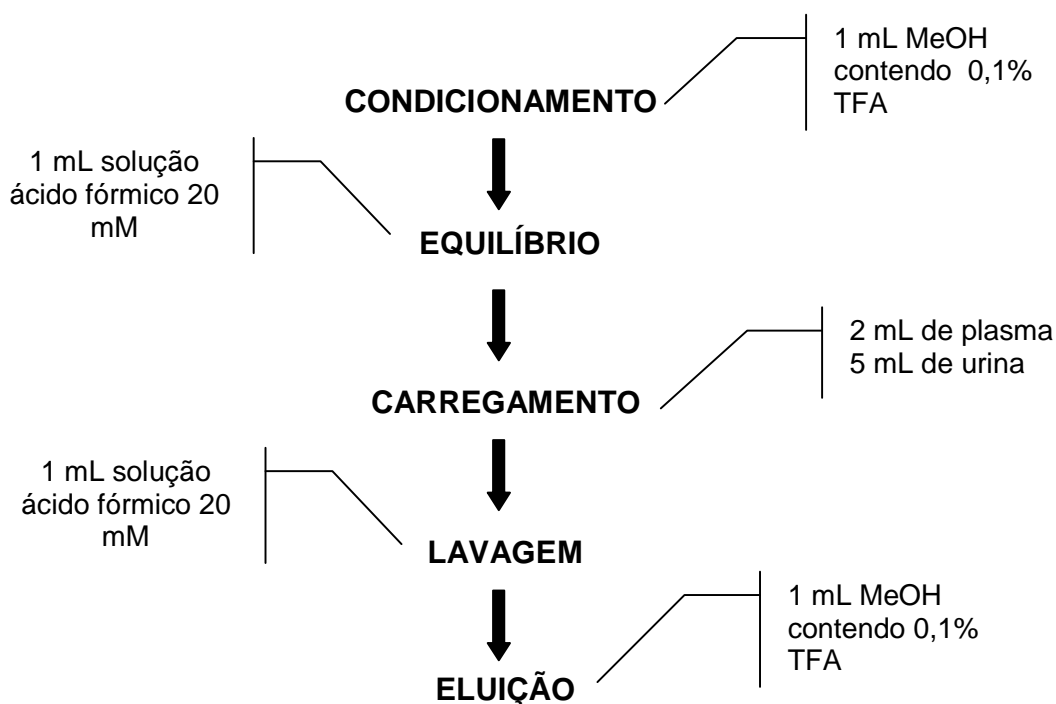
$$\text{DPPH } (\mu\text{mol}/100\text{g ET}) = \frac{\% \text{ Inibição}}{\text{Coeficiente}} \times \text{diluição}$$

A análise foi realizada nas amostras de fezes, sendo que os resultados foram multiplicados pela massa recolhida de fezes. O resultado final foi expresso em µmol ET.

### 3.6. IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS

#### 3.6.1. Extração em fase sólida

A extração em fase sólida objetiva promover a retirada de impurezas e a obtenção dos compostos fenólicos presentes no plasma e na urina dos voluntários. Para se proceder com a extração, utilizou-se um sistema manifold SPE a vácuo (Phenomenex, Torrance, CA) com cartuchos Waters Oasis® HLB 1cc (Milford, Massachusetts). As etapas da extração estão demonstradas no fluxograma da Figura 17 e foram adaptadas das metodologias proposta por Mazza e colaboradores (2002) e Tian e colaboradores (2006) .



**Figura 17.** Fluxograma das etapas de extração em fase sólida das amostras biológicas.

Após a extração, foi realizada a evaporação das amostras em estufa a vácuo Quimis® modelo Q819V2 em temperatura ambiente. A amostra seca foi redissolvida em soluções de metanol e água (1:9), ambas acidificadas com 1% de ácido fórmico, para então serem injetadas no cromatógrafo líquido.



### 3.6.2. Análise de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em fase reversa

As análises cromatográficas do açaí, plasma e urina foram realizadas em um sistema Shimadzu (Tóquio, Japão), série 10AVvp acoplado a um detector de diodos (DAD) Shimadzu, série SPD M20A e um detector UV/VIS Shimadzu, série SPD 10AVvp para o registro dos espectros UV/VIS. As injeções foram efetuadas por um injetor automático SIL 10AF (Shimadzu). As amostras biológicas foram injetadas em uma coluna C<sub>18</sub> Gemini (250 x 4,6 mm i.d.) munida de uma pré-coluna C<sub>18</sub> 3,0 x 4,0 mm (Phenomenex, Torrance, CA) e termostaticada a 30°C. Os solventes utilizados foram: água (solvente A) e acetonitrila (solvente B), ambos acidificados com 1% de ácido fórmico. O fluxo foi de 1 mL/min. O gradiente utilizado está descrito na Tabela 4.

**Tabela 4.** Gradiente utilizado para a identificação e quantificação dos compostos fenólicos presentes no açaí e nas amostras biológicas.

Tempo (min)	% Solvente A	% Solvente B
0	92	8
35	65	35
40	0	100
45	0	100
50	92	8

Os resultados obtidos da análise CLAE da urina em mg/mL foram transformados para resultado de massa (ng) após multiplicar-se a concentração de C3G e C3R pelo volume de urina em cada intervalo de tempo respectivo.

### 3.7. DETERMINAÇÃO DA COR

A cor foi determinada por colorimetria tristímulo, em colorímetro CR-310 Minolta (sistema L\*, a\*, b\*). Nesta representação L\* indica o fator brilho, a\* e b\* são coordenadas de cromaticidade, que indicam a intensidade do vermelho e do amarelo, respectivamente.

A colorimetria tristímulo simula transformações físicas que acontecem no sistema visual humano. O colorímetro emite um feixe de luz sobre a amostra, o qual se decompõe em três partes distintas, L, a e b, que se dirigem cada uma, a um fotossensor

acoplado a um filtro ótico específico. A representação de L, a e b corresponde à visão humana, à percepção e à interpretação das diferenças de cor.

A determinação da cor foi feita nas amostras de fezes de todos os voluntários e de todos os 4 tempos de coleta (antes e após o almoço do primeiro e segundo finais de semana). Vale ressaltar que a coleta de fezes realizada após o consumo de açaí foi a de depois do almoço do domingo, do segundo final de semana.

Para a medida da cor, as amostras de fezes foram homogeneizadas e colocadas sobre uma superfície branca, procedendo assim com a leitura. Para a expressão dos resultados, foram feitas subtrações de cada coordenada ( $L^*$ ,  $a^*$  e  $b^*$ ) entre as coletas após o almoço e antes do almoço de cada final de semana. Os resultados foram analisados a partir dos dois valores de cada fim de semana resultantes da subtração.

### 3.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada através do software STATISTICA® (StatSoft, Inc) versão 7.0. A evolução da capacidade antioxidante do plasma, urina e fezes e o teor de C3G e C3R foram avaliados por meio do teste de Tukey ( $p < 0,001$ ,  $p < 0,05$  ou  $p < 0,1$ ). Todos os valores foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 4.1. CARACTERIZAÇÃO DO AÇAÍ

Os resultados das análises realizadas no açaí utilizado no experimento são expressos na Tabela 5. O açaí oferecido possuía 16,26% de matéria seca, o que o classifica como açaí do tipo grosso (BRASIL, 2000).

A ingestão de 500 mL de açaí forneceu 355 mg de antocianinas para cada voluntário. Este valor encontra-se dentro dos valores observados na literatura para experimentos relacionados à biodisponibilidade de antocianinas. Netzel e colaboradores (2001) forneceram 153 mg de antocianinas totais a quatro voluntários, enquanto Mülleder e colaboradores (2002) forneceram 1,9 g de antocianinas totais a 16 voluntários.

**Tabela 5.** Caracterização do açaí grosso ministrado aos voluntários no segundo fim de semana.

Análise	Resultado
Matéria Seca	16,26%
Antocianinas	709 mg/L (83,8 mg/L C3G e 625,2 mg/L C3R)
Polifenóis Totais	3.773 mg <sub>EAG</sub> /L
ORAC	145.735 $\mu$ mol <sub>ET</sub> /L

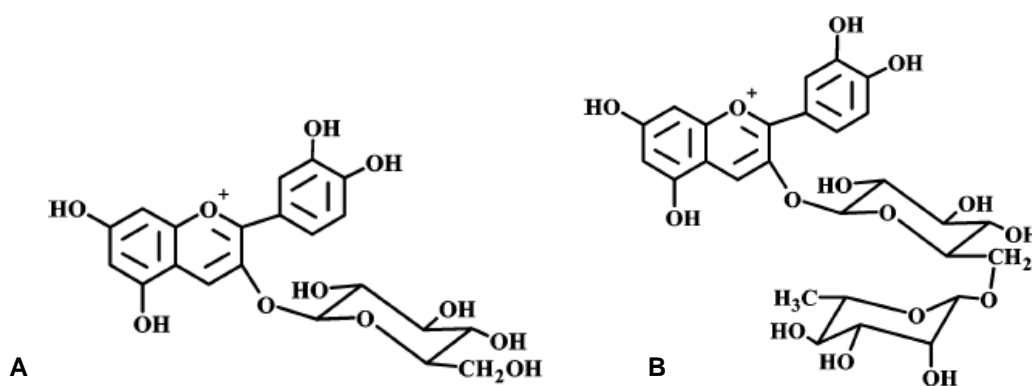
Legenda: EAG: Equivalente em ácido gálico; ET: Equivalente Trolox; C3G: cianidina-3-glicosídeo; C3R: cianidina-3-rutinosídeo.

Como se pode observar por meio dos resultados encontrados na Tabela 5 foram identificadas duas antocianinas no açaí grosso: cianidina-3-glicosídeo (C3G) e cianidina-3-rutinosídeo (C3R) (Figura 18). No estudo realizado por Lichtenthäler e colaboradores (2005) a análise de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao espectrômetro de massa (CLAE-MS) apontou duas diferentes antocianinas nos frutos de açaí em quantidades consideráveis e outras em menores concentrações. As duas principais antocianinas foram identificadas como C3G e C3R, confirmando os resultados encontrados neste estudo. Uma das antocianinas em menores concentrações foi identificada como peonidina-rutinosídeo.

Dentre os 355 mg de antocianinas totais contido em 500 mL de açaí, 41,9 mg foram de C3G e 312,6 mg de C3R. Isto significa dizer que o açaí da pesquisa continha

11,82% de C3G e 88,18% de C3R. Esta proporção maior de C3R está de acordo com dados encontrados na literatura. No trabalho realizado por Lichtenthäler e colaboradores (2005) uma das duas amostras de açaí grosso apresentou 95 mg/L de antocianinas, sendo que 80% corresponderam à concentração de C3R e 20% de C3G. Neste mesmo trabalho, a outra amostra, com concentração de 463 mg/L de antocianinas, apresentou uma proporção de 98,5% de C3R e apenas 1,5% de C3G.

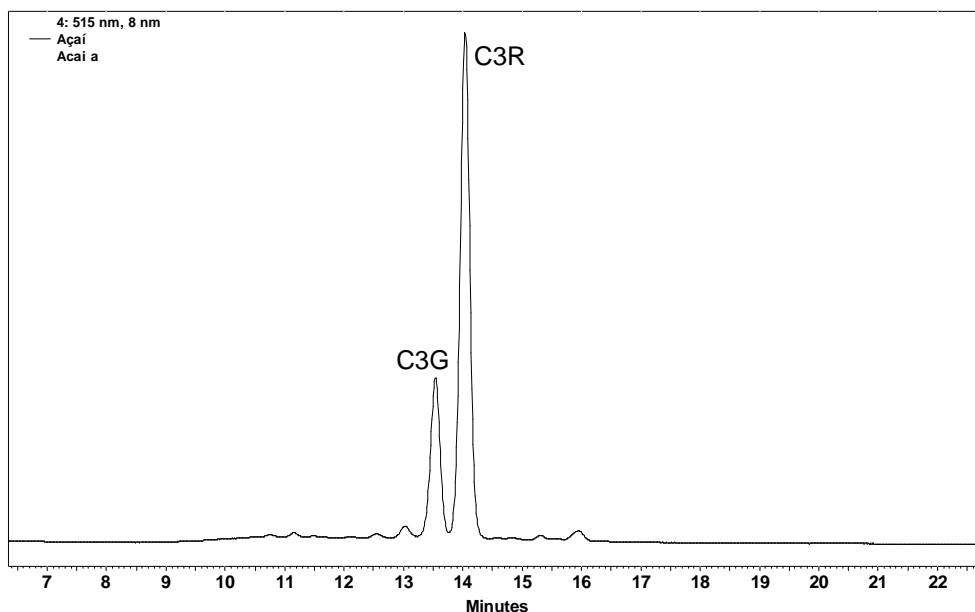
Pacheco-palencia e colaboradores (2007) obtiveram uma proporção de 27,07% de C3G e 72,93% de C3R, enquanto que no trabalho de Schauss e colaboradores (2006) a proporção foi de 37,7% de C3G e 62,3% de C3R.



**Figura 18.** Estrutura química das duas antocianinas encontradas no açaí: (A) cianidina-3-glicosídeo e (B) cianidina-3-rutinosídeo.

**Fonte:** Tian e colaboradores (2006).

A Figura 19 apresenta o cromatograma obtido por CLAE que mostra as duas antocianinas presentes no açaí.



**Figura 19.** Cromatograma do açaí grosso consumido pelos voluntários participantes da pesquisa no segundo fim de semana após o almoço ( $\lambda=515$  nm).

A quantidade de polifenóis totais foi de 3.773 mg<sub>EAG</sub>/L, observando que as antocianinas representavam cerca de 20% dos compostos fenólicos encontrados.

A capacidade antioxidante quantificada por meio da metodologia ORAC resultou em um valor de 145.735  $\mu\text{mol}_{\text{ET}}/\text{L}$  (145,7  $\mu\text{mol}_{\text{ET}}/\text{g}$ ), confirmando que o açaí é um alimento rico em antioxidantes. De fato, pode-se comparar esse valor com aqueles de outros alimentos conhecidos, tais como as ameixas (62,4  $\mu\text{mol}_{\text{ET}}/\text{g}$ ), morangos (35,8  $\mu\text{mol}_{\text{ET}}/\text{g}$ ), groselhas pretas (62,2  $\mu\text{mol}_{\text{ET}}/\text{g}$ ), os legumes rabanete (9,5  $\mu\text{mol}_{\text{ET}}/\text{g}$ ), batata (de casca vermelha) (13,2  $\mu\text{mol}_{\text{ET}}/\text{g}$ ), cenoura (12,2  $\mu\text{mol}_{\text{ET}}/\text{g}$ ), brócolis (15,9  $\mu\text{mol}_{\text{ET}}/\text{g}$ ), as amêndoas (44,5  $\mu\text{mol}_{\text{ET}}/\text{g}$ ), pistache (79,8  $\mu\text{mol}_{\text{ET}}/\text{g}$ ), as frutas secas: tâmara (39,0  $\mu\text{mol}_{\text{ET}}/\text{g}$ ), uva passa (30,4  $\mu\text{mol}_{\text{ET}}/\text{g}$ ), ameixa (85,8  $\mu\text{mol}_{\text{ET}}/\text{g}$ ), e o farelo de arroz (242,9  $\mu\text{mol}_{\text{ET}}/\text{g}$ ) (WU *et al.*, 2004). O valor obtido pelo açaí destaca-se em relação aos demais alimentos relacionados, sendo apenas superado pelo farelo de arroz.

## 4.2. PLASMA

### 4.2.1. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

Os resultados obtidos por CLAE demonstram que não foi possível identificar os compostos fenólicos do açaí nas amostras de plasma dos voluntários. Isto significa que as quantidades presentes no plasma encontravam-se abaixo do limite de detecção e quantificação (1,03 e 3,31 ng/mL para C3G e 1,13 e 3,65 ng/mL para C3R, respectivamente) do equipamento utilizado neste trabalho, mostrando que ocorreu uma baixa absorção desses compostos fenólicos.

Os valores destes limites encontram-se acima de alguns trabalhos que quantificaram compostos fenólicos em plasma humano. No experimento de Mülleder e colaboradores (2002), os limites de detecção e quantificação calculados foram 0,26 e 0,77 ng/mL, respectivamente. Porém, neste trabalho utilizou-se a espectrometria de massa como ferramenta para a quantificação de antocianinas.

Sabe-se que alguns desses compostos fenólicos apresentam uma baixa absorção, como é o caso das antocianinas, porém dados encontrados na literatura mostram que é possível fazer a identificação e quantificação desses compostos, tanto na forma intacta quanto na forma de metabólitos.

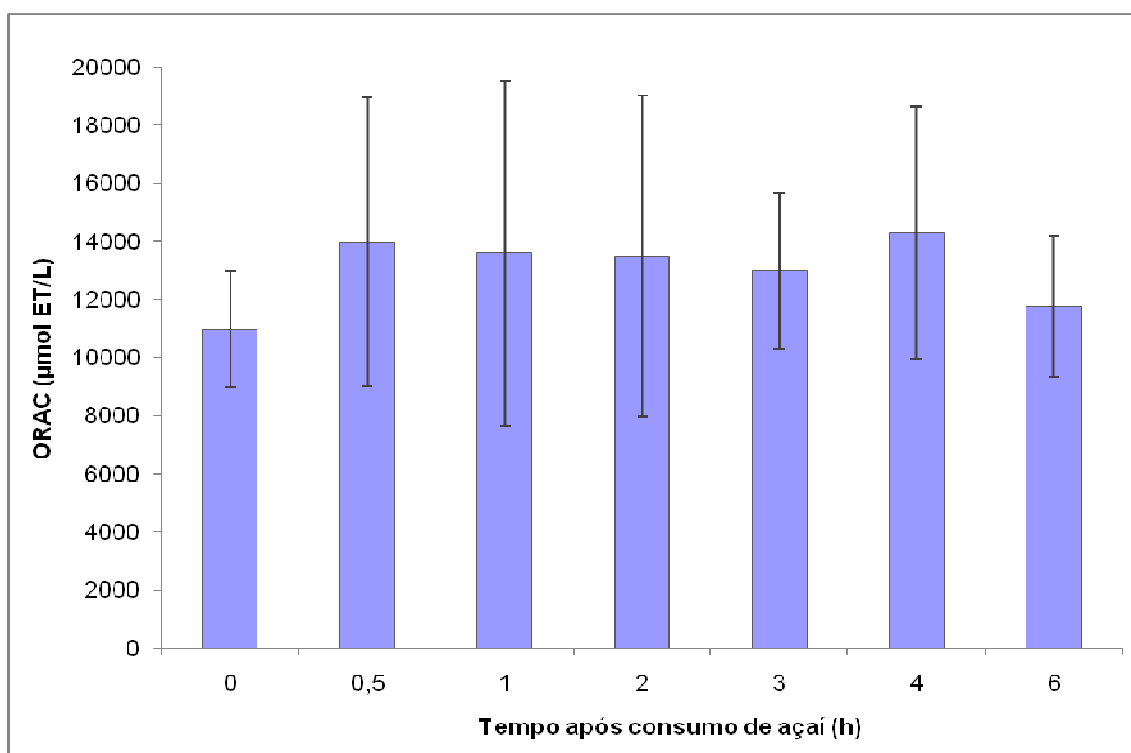
No estudo realizado por Mullen e colaboradores (2004), 6 voluntários consumiram 270 g de cebolas vermelhas fritas. Os resultados mostraram a presença de quercetina na sua forma aglicona, quercetina sulfato, quercetina glicosídeos, metil quercetina monoglucuronídeos, entre outros, no plasma dos voluntários. Neste estudo a espectrometria de massa foi utilizada como ferramenta para a identificação desses compostos.

Mazza e colaboradores (2002) forneceram 100 g de um suplemento de "blueberry" contendo 1,2 g de antocianinas a cinco voluntários. Os resultados mostraram que foi possível identificar e quantificar diversos tipos de antocianinas no soro, entre elas a cianidina-3-glicosídeo (0,52 a 0,91 ng/mL); malvidina-3-galactosídeo (1,59 a 3,68 ng/mL) e delphinidina-3-arabnosídeo (0,38 a 0,84 ng/mL). Neste estudo, as antocianinas foram identificadas por CLAE, utilizando o tempo de retenção e os espectros de absorção UV-VIS.

#### 4.2.2. Capacidade Antioxidante

Diretrizes nutricionais sugerem que o aumento do consumo de alimentos ricos em nutrientes antioxidantes podem diminuir ou prevenir o risco de várias doenças causadas pelo estresse oxidativo. Portanto, o aumento na capacidade antioxidante do plasma ou do soro tem sido proposto como um método para prevenir o desenvolvimento de câncer, doenças cardiovasculares, diabetes e outras doenças (KAY; HOLUB, 2002).

No presente trabalho, a capacidade antioxidante do plasma foi avaliada por meio da metodologia ORAC. O gráfico da Figura 20 apresenta as médias e os desvios dos valores ORAC entre os 6 voluntários participantes da pesquisa, após a ingestão de açaí grosso no segundo fim de semana.



**Figura 20.** Valores médios ORAC do plasma dos 6 voluntários antes e 6 horas após o consumo de açaí grosso no segundo fim de semana do experimento. As barras representam o desvio padrão das médias.

O ponto 0 refere-se à coleta de sangue realizada antes da ingestão de açaí (antes do almoço). Os demais pontos fazem referência às coletas após o consumo de açaí.

Por meio da análise do gráfico é possível observar um sutil aumento da capacidade antioxidante plasmática do tempo 0 (antes do consumo de açaí, quando a média do valor ORAC é de  $10.974 \pm 2.022 \mu\text{mol ET/L}$ ) para os demais (após o consumo de açaí, quando chega a se obter o valor médio de  $14.309 \pm 4.345 \mu\text{mol ET/L}$  no tempo 4h). Porém, devido aos altos desvios, a análise estatística realizada por meio do teste de Tukey (Tabela 6) demonstra que o tempo não é uma variável estatisticamente significativa.

**Tabela 6.** Média e desvio padrão dos valores de ORAC do plasma dos 6 voluntários pelo intervalo de tempo no segundo fim de semana (com o consumo de açaí) e resultados do teste de Tukey.

Tempo de coleta (h)	ORAC ( $\mu\text{mol ET/L}$ )
0	$10.974 \pm 2.022^a$
0,5	$14.319 \pm 4.968^a$
1	$13.609 \pm 5.932^a$
2	$13.499 \pm 5.521^a$
3	$12.989 \pm 2.674^a$
4	$14.309 \pm 4.345^a$
6	$11.766 \pm 2.430^a$

Os valores seguidos de uma mesma letra na mesma coluna não são significativamente diferentes ( $p > 0,1$ ).

No estudo realizado por Sampaio (2006) não foi observado um aumento significativo nos valores ORAC do plasma de voluntários humanos no período de 28 dias com o consumo diário de açaí ( $n=30$ ), porém observou-se uma tendência ao aumento. Os valores médios ORAC permaneceram numa faixa de, aproximadamente, 17.000 a 18.000  $\mu\text{mol ET/L}$  no período de 28 dias do estudo.

As quantidades dos compostos fenólicos presentes em produtos derivados de plantas da dieta humana, em particular vegetais, frutas, chá e vinho são geralmente muito maiores que as quantidades de outros antioxidantes nesses alimentos, como por exemplo, as vitaminas C, E e os carotenóides (VINSON *et al.*, 2001; LOTITO; FREI, 2004; AABY *et al.*, 2005).

Sabe-se que os flavonóides são poderosos antioxidantes *in vitro*, porém apesar dessa alta capacidade antioxidante *in vitro*, sua capacidade antioxidante *in vivo* é limitada por diversos fatores. Primeiro, a absorção dos flavonóides em humanos é



baixa, em contraste com outros antioxidantes da dieta, como as vitaminas C e E. As concentrações plasmáticas máximas dos flavonóides em humanos são alcançadas geralmente entre 1h e 3h após o consumo de alimentos ricos em flavonóides, sendo que as antocianidinas apresentam-se em concentrações menores que 0,15  $\mu\text{M}$ . Além disso, o tempo de meia vida dos flavonóides no plasma é pequeno, geralmente em torno de algumas horas (WILLIAMSON; MANACH, 2005).

Então, todos estes fatores limitam a capacidade dos flavonóides atuarem como antioxidantes no plasma *in vivo*, sendo talvez uma possível explicação para a falta de tendência observada nos resultados da análise ORAC.

Porém, muitos autores puderam detectar um aumento da capacidade antioxidante plasmática após o consumo de antocianinas. Mazza e colaboradores (2002) investigaram a absorção de antocianinas em humanos após o consumo de uma refeição rica em gordura suplementada com “blueberries” liofilizadas. Das 25 antocianinas detectadas no fruto, 19 foram também encontradas no soro. Os autores fizeram uma associação quantitativa deste aumento das antocianinas no plasma com o aumento na capacidade antioxidante do soro.

O estudo realizado por Nielsen e colaboradores (2003) sugere que as antocianinas não causam nenhum efeito antioxidante direto *in vivo*, que pode ser medido pelos métodos TEAC e FRAP. Além disso, os autores ressaltam que não se pode ignorar o fato de que as antocianinas podem ter mais propriedades antioxidantes indiretas, por exemplo, nos lipídeos plasmáticos, as quais podem ser responsáveis por um possível efeito protetor no desenvolvimento de aterosclerose.

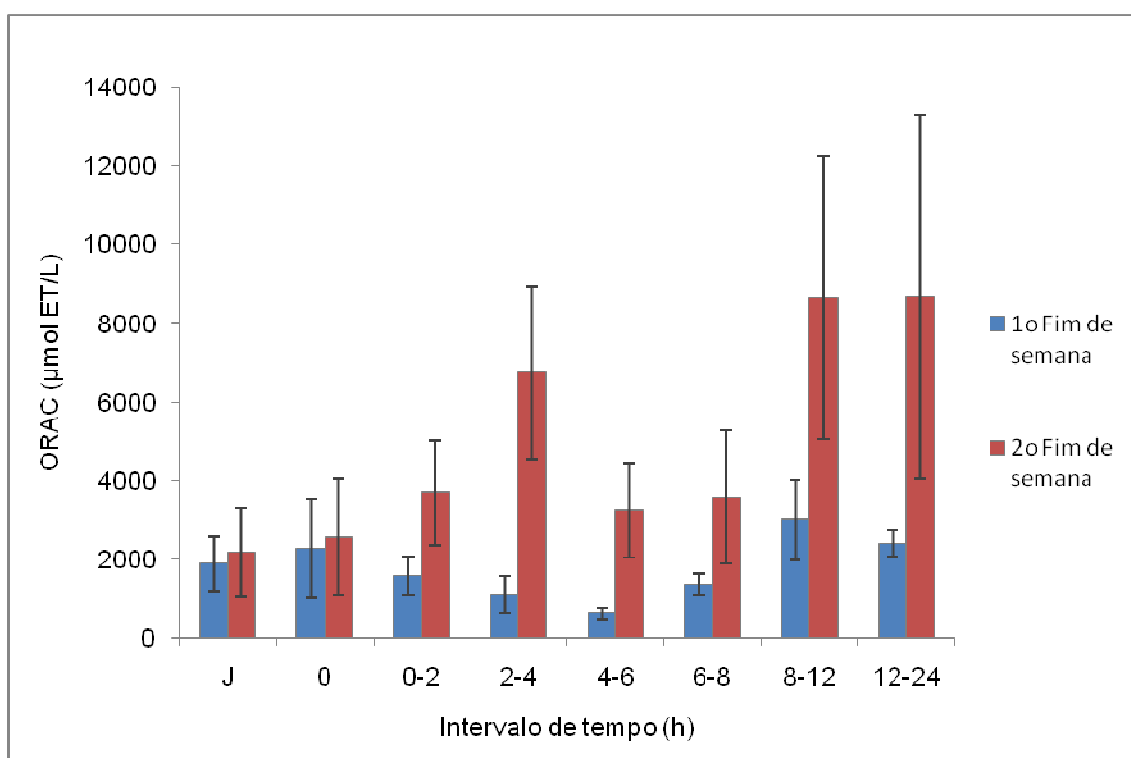
A hipótese das antocianinas ligarem-se à fração lipídica também foi levantada por García-Alonso e colaboradores (2006). Os resultados deste trabalho sugerem que os fenólicos do suco fornecido a 12 voluntários humanos (286 mg de antocianinas, 176 mg de flavanóis, 800 mg EAG de polifenóis totais e 80 mg de ácidos hidroxicinâmicos) são rapidamente absorvidos, chegam à corrente sanguínea e se ligam à fração lipídica do soro.

Este pode ser outro motivo da falta de tendência de comportamento observada para a capacidade antioxidante do plasma. Talvez a análise apresentasse melhores resultados se realizada sobre a fração LDL do plasma.

### 4.3. URINA

#### 4.3.1. Capacidade Antioxidante

Possíveis alterações na capacidade antioxidante da urina dos 6 voluntários participantes da pesquisa foram avaliadas por meio da metodologia ORAC. A partir dos resultados obtidos após análise dos pontos coletados nos dois fins de semana, foi calculada uma média entre os voluntários pelo intervalo de tempo e esses valores estão apresentados na forma de gráfico (Figura 21). Foi aplicado o teste de Tukey objetivando avaliar se havia diferenças estatisticamente significativas entre as médias dos dois fins de semana. Também se aplicou o teste de Tukey para analisar as diferenças entre os valores médios de ORAC do segundo fim de semana (quando houve o consumo de açaí) (Tabela 7).



**Figura 21.** Gráfico dos valores médios de ORAC da urina dos 6 voluntários no decorrer dos intervalos de tempo indicados antes e após o consumo de açaí grosso. J: coleta realizada nos voluntários em jejum. As barras representam o desvio padrão das médias.

O gráfico foi plotado com os valores do segundo fim de semana da pesquisa (quando houve consumo de açaí). O ponto J identifica a coleta de urina que aconteceu quando os voluntários ainda se encontravam em jejum. O ponto 0 faz referência à coleta de urina que foi realizada logo após o café da manhã. A partir deste ponto, os intervalos referem-se às coletas após o almoço, sendo o consumo da bebida açaí no segundo fim de semana.

Com exceção dos pontos J e 0 ( $p > 0,1$ ) – que são aqueles referentes às coletas antes do consumo de açaí –, quando se compara os demais pontos de um mesmo intervalo de tempo, observa-se que há um aumento significativo entre os valores do primeiro e do segundo fim de semana. Nos intervalos de 0-2h, 8-12h e 12-24h, o aumento dos valores médios de ORAC do primeiro para o segundo fim de semana foi de 133%; 188% e 259%, respectivamente, os quais são significativos a nível de  $p < 0,01$ .

No intervalo de 6-8h, a média do valor ORAC obtida para o primeiro e o segundo fim de semana foi de  $1.372 \pm 267 \mu\text{mol ET/L}$  e  $3.584 \pm 1.690 \mu\text{mol ET/L}$ , respectivamente, resultando em um aumento de 161%, o qual é significativo a nível de  $p < 0,05$ .

As maiores diferenças entre os dois finais de semana ocorreram nos intervalos de tempo de 2-4h e 4-6h, onde o consumo de açaí acarretou um aumento de 515% e 426%, respectivamente, na capacidade antioxidante da urina avaliada através da metodologia ORAC. Este aumento foi estatisticamente significativo a nível de  $p < 0,001$ .

**Tabela 7.** Média e desvio padrão dos valores de ORAC da urina dos 6 voluntários pelo intervalo de tempo no segundo fim de semana (com o consumo de açaí) e resultados do teste de Tukey.

Intervalo de tempo (h)	ORAC ( $\mu\text{mol ET/L}$ )
J	$2.188 \pm 1.111^a$
0	$2.575 \pm 1.464^a$
0-2	$3.694 \pm 1.322^a$
2-4	$6.745 \pm 2.193^{a,b}$
4-6	$3.252 \pm 1.208^a$
6-8	$3.584 \pm 1.690^a$
8-12	$8.661 \pm 3.599^b$
12-24	$8.663 \pm 4.635^b$

Os valores seguidos de uma mesma letra na mesma coluna não são significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ).

A partir da análise do gráfico da Figura 21 verificou-se que há um aumento perceptível dos valores médios de ORAC nos pontos referentes aos intervalos de 2-4h, 8-12h e 12-24h após a ingestão de açaí grosso.

O teste de Tukey realizado permitiu constatar que os intervalos de tempo de 8-12h e 12-24h não diferiram entre eles, porém ambos foram estatisticamente diferentes dos demais pontos de coleta ( $p < 0,05$ ), com exceção do intervalo de 2-4h, o qual não diferiu de nenhum outro ponto, apesar do aumento observado.

Os altos desvios padrão observados são provenientes das variações nos valores ORAC interindivíduos. O voluntário A apresentou um valor ORAC de 2.073  $\mu\text{mol ET/L}$  no segundo final de semana no intervalo de 12-24h, que é aproximadamente 4 vezes menor que o valor médio, contrastando com o valor de 14.648  $\mu\text{mol ET/L}$  do indivíduo C neste mesmo intervalo e tempo. No intervalo de 8-12h, o voluntário F apresentou o maior valor ORAC (15.000  $\mu\text{mol ET/L}$ ) quando comparado aos demais voluntários, que permaneceram numa faixa de 5.300 a 10.500  $\mu\text{mol ET/L}$ .

O aumento notado no intervalo de 2-4h é possivelmente relacionado aos compostos fenólicos que sofreram modificação no intestino delgado, quando ocorre uma primeira etapa do metabolismo. Eles podem sofrer três tipos de conjugação: metilação, sulfuração e glucuronidação. Sabe-se que essa rápida excreção urinária desses compostos fenólicos pode ser explicada devido à formação de derivados aniônicos por conjugação com glucuronídeos e grupos sulfatos (SCALBERT *et al.*, 2002).

Em relação ao aumento observado nos intervalos de 8-12h e 12-24h, pode-se levantar a hipótese de um metabolismo posterior que acontece no fígado, onde novamente os compostos fenólicos passam pelos processos de metilação, sulfuração ou glucuronidação.

Além disso, alguns desses flavonóides podem ser degradados pelas bactérias do cólon, sendo transformados em ácidos fenólicos menores, os quais podem assim ser absorvidos, sendo que o destino da maioria desses metabólitos é a excreção renal (SPENCER, 2003).

Diferentemente dos resultados obtidos no presente trabalho, um estudo realizado por Mertens-Talcott e colaboradores (2008) mostrou que não houve um aumento

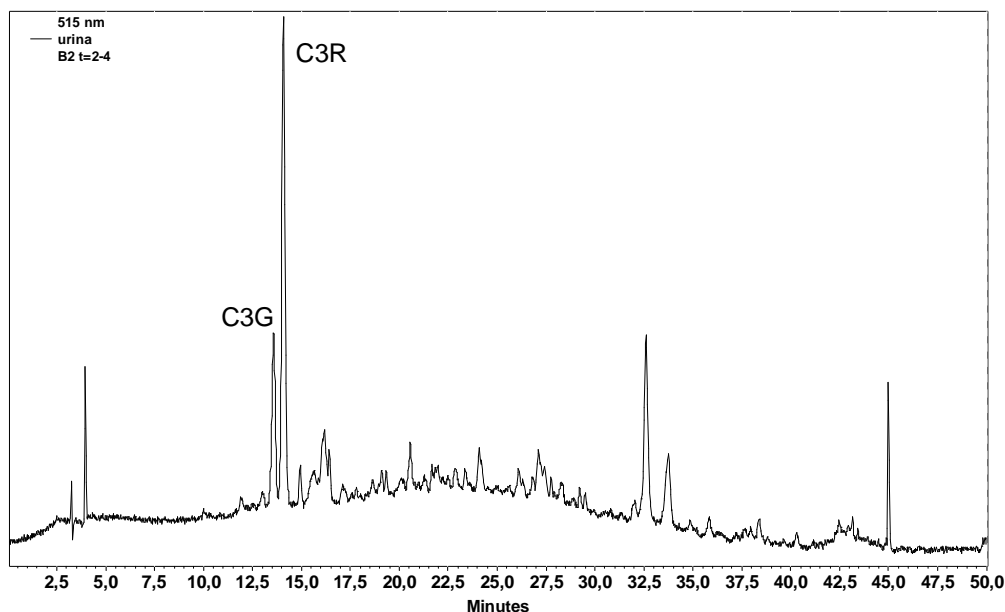
significativo na capacidade antioxidante da urina após o consumo da polpa de açaí e de açaí clarificado, em relação ao grupo controle (dieta sem antioxidantes). Além disso, foram observados efeitos antioxidantes no plasma dos voluntários após o consumo de polpa de açaí.

Porém, existem estudos que demonstram que ocorreu um aumento na capacidade antioxidante da urina após o consumo de antioxidantes de frutas. García-Alonso e colaboradores (2006) avaliaram o efeito a curto prazo de um suco rico em fenólicos feito a partir de uva e “berries” no status antioxidante de um grupo composto por 12 voluntários humanos que consumiram 400 mL de suco (286 mg de antocianinas). Eles avaliaram o teor de compostos fenólicos totais e a capacidade antioxidante pelo método FRAP na urina. Os resultados mostraram que houve um aumento da capacidade antioxidante na urina.

#### **4.3.2. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência**

Os resultados da análise de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) permitiram verificar que no primeiro fim de semana do experimento não havia presença de antocianinas na urina de nenhum voluntário.

No segundo fim de semana do experimento foi possível observar a presença das duas antocianinas: a cianidina-3-glicosídeo e a cianidina-3-rutinosídeo (Figura 18) na urina dos voluntários. A Figura 22 apresenta o cromatograma obtido para um dos voluntários da pesquisa.

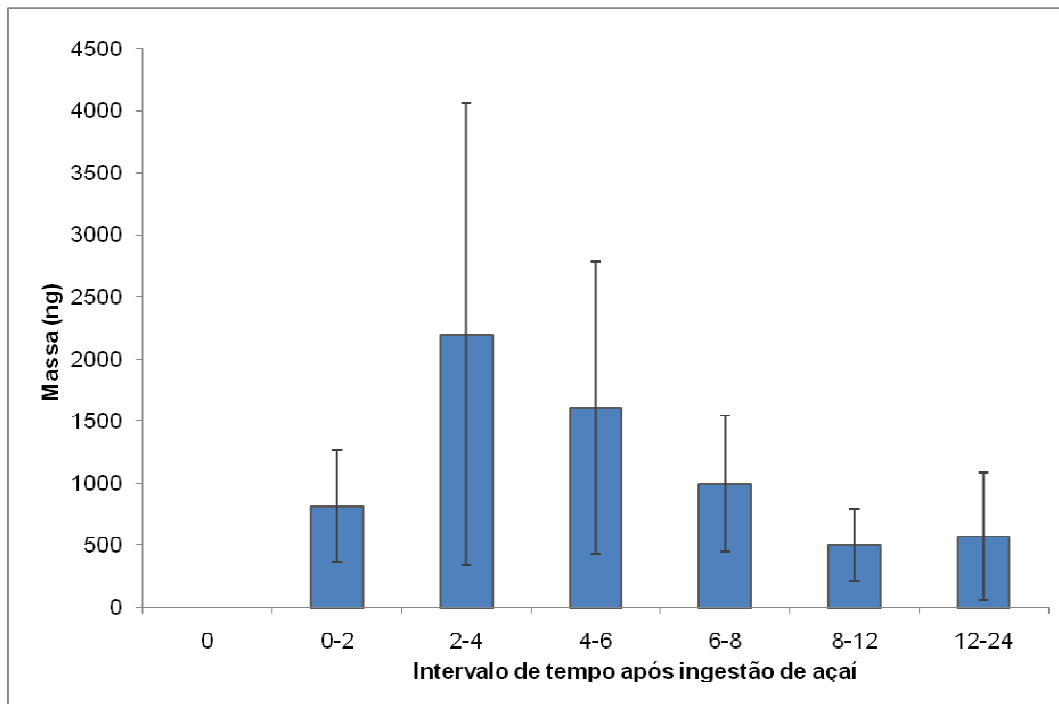


**Figura 22.** Cromatograma obtido a 515 nm da amostra de urina de um dos voluntários da pesquisa no segundo fim de semana, no intervalo de 2-4 horas após o consumo de açaí grosso.

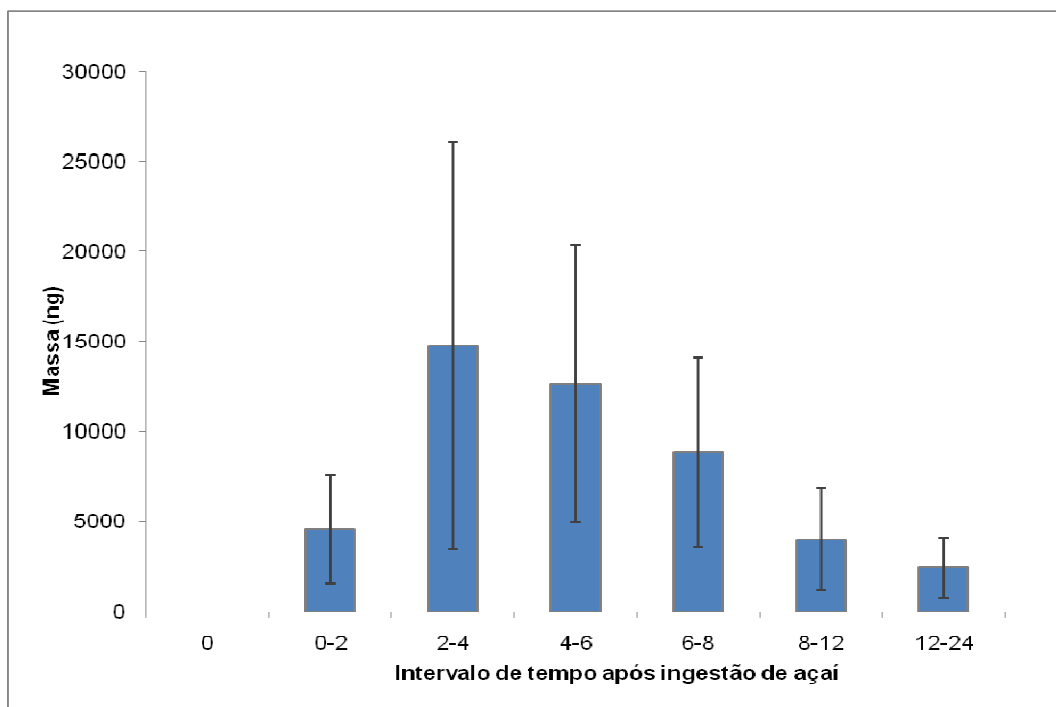
Como as mesmas antocianinas encontram-se também no suco (Figura 18), a princípio pode-se levantar a hipótese que elas foram absorvidas de forma intacta pelo organismo. Este tipo de absorção é possível graças ao mecanismo de absorção da forma glicosídica pela interação com o transportador de glicose dependente de sódio (SGLT1) (GEE *et al.*, 2000), sendo que após serem absorvidas, as antocianinas são distribuídas para a corrente sanguínea. Este dado está de acordo com o obtido por Cao e colaboradores (2001), onde foram detectadas cianidina-3-sambubiosídeo e cianidina-3-glicosídeo na urina e plasma de mulheres que ingeriram extrato de “elderberry”.

Uma outra explicação para o fato de não terem sido encontrados metabólitos é que estes podem ser muito instáveis e extensivamente degradados quando amostras de urina acidificada são congeladas para armazenamento, conforme foi constatado na pesquisa de Felgines e colaboradores (2003).

As Figuras 23 e 24 apresentam um gráfico com a massa de C3G e C3R, respectivamente, ao longo de 24 horas após o consumo de açaí. Para a análise estatística foi aplicado o teste de Tukey sobre as médias da massa de C3G e C3R dos 6 voluntários pelo intervalo de tempo especificado (Tabela 8).



**Figura 23.** Massa de C3G na urina antes e em intervalos de tempo de até 24 horas após a ingestão de açai grosso no segundo fim de semana do experimento. Os valores correspondem à média  $\pm$  desvio padrão dos 6 voluntários. As barras representam o desvio padrão das médias.



**Figura 24.** Massa de C3R na urina antes e em intervalos de tempo de até 24 horas após a ingestão de açaí grosso no segundo fim de semana do experimento. Os valores correspondem à média  $\pm$  desvio padrão dos 6 voluntários. As barras representam o desvio padrão das médias.

Observa-se nos gráficos das Figuras 23 e 24 que há um aumento na massa das antocianinas no período de 2-4h após o consumo da bebida, quando a excreção é máxima. Esta rápida excreção também foi observada em outros dados da literatura.

Os altos desvios padrão observados nos gráficos são oriundos de grandes variações nos valores de massa das duas antocianinas dentro do grupo. Numa análise de cada indivíduo separadamente, observou-se que o voluntário B apresentou uma excreção mais rápida que os demais, devido aos mais altos valores encontrados nos dois primeiros intervalos após a ingestão de açaí grosso.

Para a C3G estes valores foram de 1.627 ng e 5.868 ng e para a C3R estes valores foram de 9.050 ng e 37.332 ng, nos intervalos de 0-2h e 2-4h, respectivamente. Já no intervalo de tempo seguinte (4-6h), o indivíduo B apresentou o menor valor de massa excretada das duas antocianinas dentro do grupo (271 ng de C3G e 2.407 ng de C3R).



**Tabela 8.** Média e desvio padrão dos valores de C3G e C3R da urina dos 6 voluntários pelo intervalo de tempo no segundo fim de semana (com o consumo de açaí) e resultados do teste de Tukey.

Intervalo de tempo (h)	C3G (ng)	C3R (ng)
0-2	813 ± 451 <sup>a,b</sup>	4.558 ± 2.993 <sup>b,c</sup>
2-4	2.195 ± 1.863 <sup>a</sup>	14.778 ± 11.304 <sup>a,d</sup>
4-6	1.607 ± 1.173 <sup>a,b</sup>	12.660 ± 7.739 <sup>c,d</sup>
6-8	998 ± 548 <sup>a,b</sup>	8.832 ± 5.264 <sup>a,b,c,d</sup>
8-12	506 ± 290 <sup>b</sup>	4.025 ± 2.845 <sup>b,c</sup>
12-24	569 ± 511 <sup>b</sup>	2.447 ± 1.692 <sup>b</sup>

Os valores seguidos de uma mesma letra na mesma coluna não são significativamente diferentes ( $p > 0,1$ ).

Os resultados da análise estatística da Tabela 8 permitem afirmar que o aumento da excreção de C3G no período de 2-4h foi estatisticamente diferente ( $p < 0,1$ ) da concentração nos intervalos de 8-12h e 12-24h, quando a excreção alcança níveis mais baixos.

No caso da C3R, o aumento da concentração observado no intervalo de tempo de 2-4h foi estatisticamente diferente dos intervalos de 0-2h ( $p < 0,1$ ), 8-12h ( $p < 0,1$ ) e 12-24h ( $p < 0,05$ ), quando a concentração de C3R na urina atinge níveis mais baixos se relacionada aos demais pontos.

No estudo realizado por Tian e colaboradores (2006), a excreção urinária das antocianinas alcançou uma concentração máxima no período de 4-8h após o consumo diário de 45 g de “black raspberries” liofilizadas por 1 semana. Milbury e colaboradores (2002) em um estudo realizado com 4 mulheres, obtiveram a excreção máxima de antocianinas no período de 0-2h após o consumo de 720 mg de antocianinas de “elderberry”. Mülleder e colaboradores (2002) verificaram que a excreção máxima das antocianinas de “elderberry” ocorreu de 1h a 3h postprandial.

De acordo com os resultados apresentados, observa-se que as duas antocianinas tiveram o máximo de excreção no mesmo intervalo de tempo após o consumo de açaí (2-4h). Existem trabalhos que relatam que as antocianinas glicosídeo são absorvidas e excretadas mais rapidamente que as antocianinas rutinosídeo (NIELSEN *et al.*, 2003). Porém, no presente estudo constata-se que as diferenças das moléculas de açúcar que estão ligadas à cianidina não influenciaram na sua excreção.

Neste intervalo foi quantificada uma massa média entre os voluntários de  $2.195 \pm 1.863$  ng C3G e  $14.778 \pm 11.304$  ng C3R. Isto leva a poder afirmar que 39,47% e 39,28% do total excretado de C3G e C3R, respectivamente, foi no período de 2-4 horas.

Após este intervalo de tempo, observa-se uma queda progressiva na concentração de C3G e C3R na urina dos voluntários. Isto demonstra que apesar das antocianinas serem absorvidas em quantidades pequenas, esta absorção acontece de forma rápida pelo organismo humano. Vários estudos mostram que as antocianinas são rapidamente absorvidas no estômago (PASSAMONTI *et al.*, 2003; TALAVÉRA *et al.*, 2003) e intestino delgado (TALAVÉRA *et al.*, 2004), porém o mecanismo de absorção ainda não está elucidado.

A excreção urinária das antocianinas na sua forma intacta após o consumo de açaí grosso foi muito baixa. Menos de 0,02% da quantidade ingerida de antocianinas foi excretada nesta forma. No período de 24 horas, os valores médios do total das antocianinas excretadas da urina foram de  $6.688 \pm 2.884$  ng C3G e  $47.299 \pm 16.559$  ng C3R, os quais correspondem, respectivamente, a 0,016% e 0,015% da quantidade total ingerida pelos voluntários, fornecendo um valor de 0,0152% de antocianinas totais.

Vale ressaltar que é possível que parte dessas antocianinas encontra-se em sua forma degradada não sendo possível fazer sua identificação.

A maioria dos estudos realizados acerca das antocianinas demonstra uma baixa excreção urinária relativa, variando de 0,004% a 0,1% da quantidade ingerida (MANACH *et al.*, 2005).

No estudo realizado por Netzel e colaboradores (2005), oito voluntários ingeriram suco de "elderberry" contendo cianidina-3-sambubiosídeo e cianidina-3-glicosídeo em 3 diferentes concentrações. Os valores médios das antocianinas totais encontradas na urina desses voluntários após um período de 7 horas variaram de 0,033% a 0,040% de acordo com a dose ingerida.

Em um outro trabalho de farmacocinética das antocianinas da dieta, observou-se que após o consumo de uma dose única de suco de uva vermelha e vinho tinto, a excreção urinária das antocianinas totais durante 7h foi de 0,23% e 0,18% da dose administrada, respectivamente (FRANK *et al.*, 2003).

Essas diferenças podem ser justificadas pelo fato de que a disponibilidade das antocianinas pode variar de acordo com a fonte das mesmas (NIELSEN *et al.*, 2003). Além disso, a taxa de absorção das antocianinas parece variar também de acordo com a natureza do açúcar que está ligado à molécula e da aglicona, sendo estes fatores determinantes para a absorção e excreção de antocianinas em humanos e ratos (MCGHIE *et al.*, 2003).

Por meio de dados da literatura, sabe-se que as antocianinas são pouco absorvidas pelo organismo. Mazza e colaboradores (2002) relataram que somente 0,002% a 0,003% de antocianinas estavam presentes no plasma humano 3 horas após a administração de extrato de “blueberry”. Hassimotto e colaboradores (2008) relataram que apenas 0,11% da quantidade inicial de antocianinas de um extrato “wild mulberry” administrado em ratos Wistar foi detectado após 8 horas.

Então, apesar de ter sido verificada a excreção destes compostos, sabe-se por meio de dados da literatura que os mesmos são pouco absorvidos pelo organismo humano, sendo que estes valores encontrados da excreção urinária das antocianinas do açaí estão dentro dos valores apresentados pela literatura.

Apesar da baixa absorção dos compostos fenólicos, o estudo realizado por Sampaio (2006) obteve resultados que sugerem que o consumo de açaí possui efeitos anti-ateroscleróticos através da inibição substancial da peroxidação das LDL em humanos.

#### 4.4. FEZES

##### 4.4.1. Capacidade Antioxidante

Para avaliar a evolução da capacidade antioxidante das fezes foram realizadas as análises ORAC (Figura 25), TEAC (Figura 26), PT (Figura 27) e DPPH (Figura 28). A fim de analisar estatisticamente os resultados obtidos foi aplicado o teste de Tukey, conforme o apresentado na Tabela 9. Os valores mostrados na tabela são referentes às médias entre os 6 voluntários no intervalo de tempo especificado.

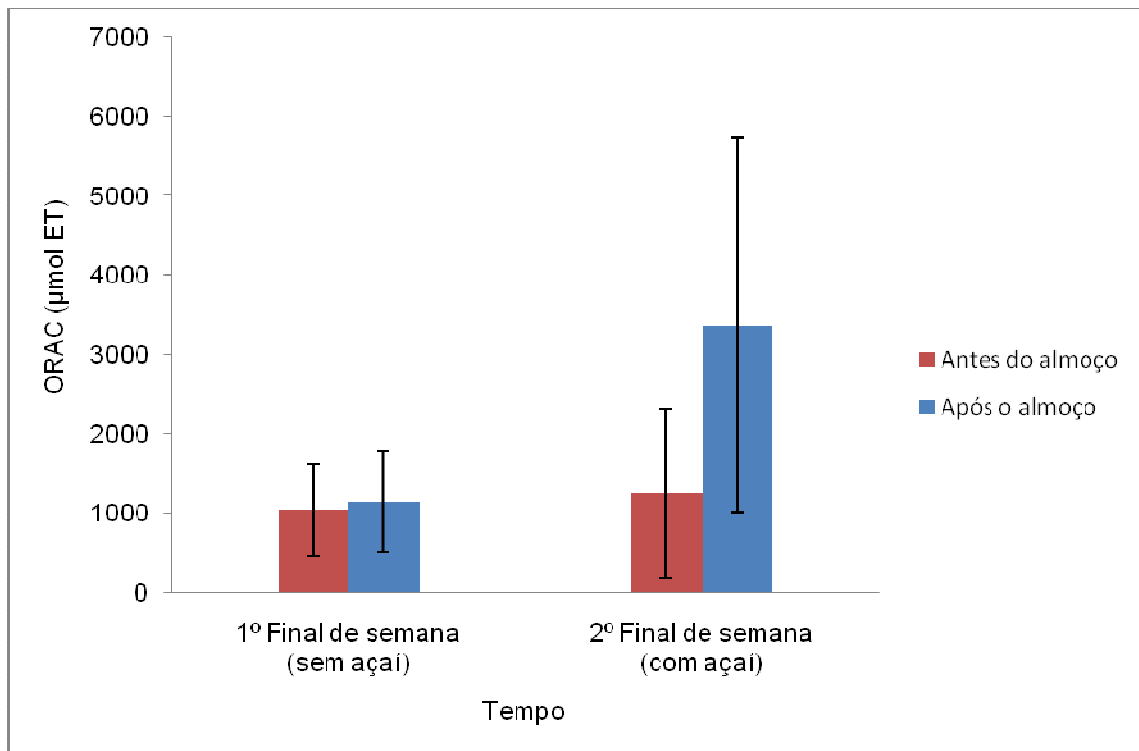
**Tabela 9.** Média e desvio padrão dos valores de ORAC, PT, TEAC e DPPH das fezes dos 6 voluntários pelo tempo nos dois fins de semana (sem e com o consumo de açaí) e resultados do teste de Tukey.

Tempo		ORAC* ( $\mu\text{mol ET}$ )	PT* (mg)	TEAC** ( $\mu\text{mol ET}$ )	DPPH* ( $\mu\text{mol ET}$ )
1º fim de semana	A.A	1.053 $\pm$ 578 <sup>a</sup>	106 $\pm$ 56 <sup>a</sup>	138 $\pm$ 52 <sup>a</sup>	195 $\pm$ 111 <sup>a</sup>
	D.A	1.147 $\pm$ 633 <sup>a</sup>	124 $\pm$ 52 <sup>a</sup>	186 $\pm$ 65 <sup>a</sup>	232 $\pm$ 153 <sup>a</sup>
2º fim de semana	A.A	1.259 $\pm$ 1069 <sup>a</sup>	127 $\pm$ 85 <sup>a</sup>	183 $\pm$ 89 <sup>a</sup>	231 $\pm$ 167 <sup>a</sup>
	D.A	3.374 $\pm$ 2364 <sup>b</sup>	351 $\pm$ 283 <sup>b</sup>	518 $\pm$ 332 <sup>b</sup>	814 $\pm$ 721 <sup>b</sup>

Os valores seguidos de uma mesma letra na mesma coluna não são significativamente diferentes. \*p<0,1; \*\*p<0,05. A.A: antes do almoço; D.A: depois do almoço. A ingestão de açaí grosso ocorre após o almoço do segundo final de semana.

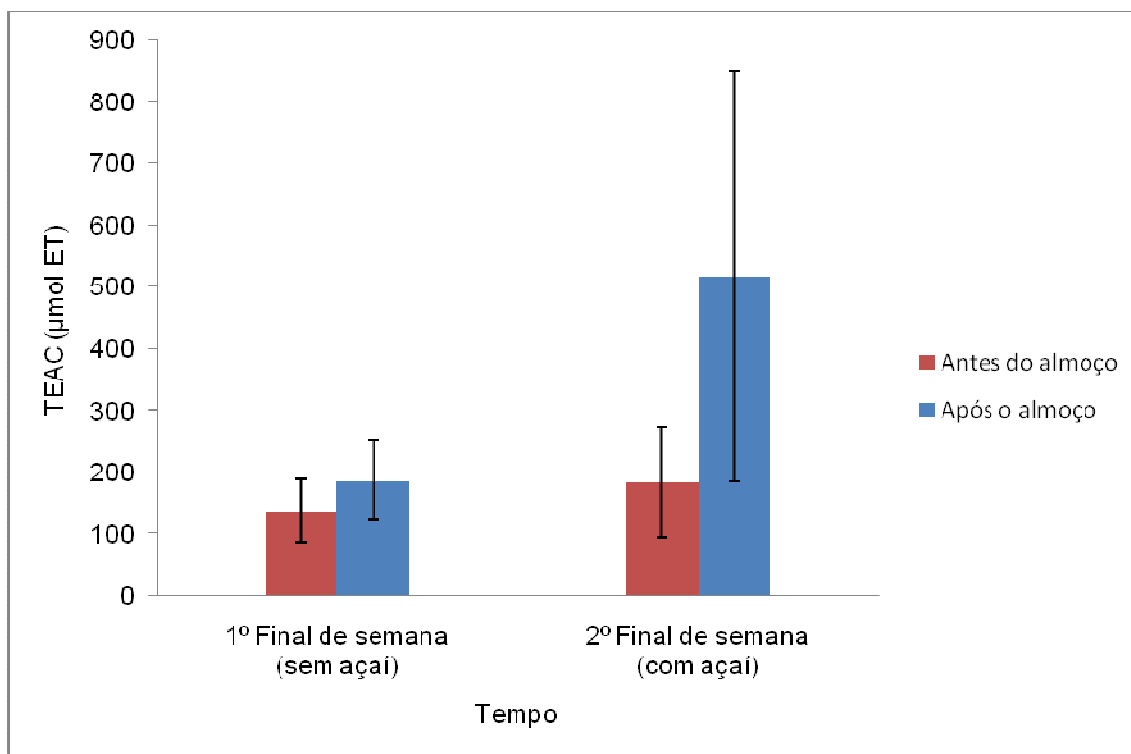
A análise de cada voluntário separadamente mostrou que o indivíduo E apresentou os menores valores para as 4 análises de capacidade antioxidante após o consumo de açaí (segundo final de semana após o almoço): 749  $\mu\text{mol ET}$  de ORAC; 93mg de PT; 130  $\mu\text{mol ET}$  de TEAC e 140  $\mu\text{mol ET}$  de DPPH.

Os resultados apresentados nos gráficos das Figuras 25, 26, 27 e 28 mostram um comportamento padrão da capacidade antioxidante das fezes. Em todas as análises observa-se que há um aumento acentuado da capacidade antioxidante após o consumo de açaí (2º final de semana após o consumo de açaí).



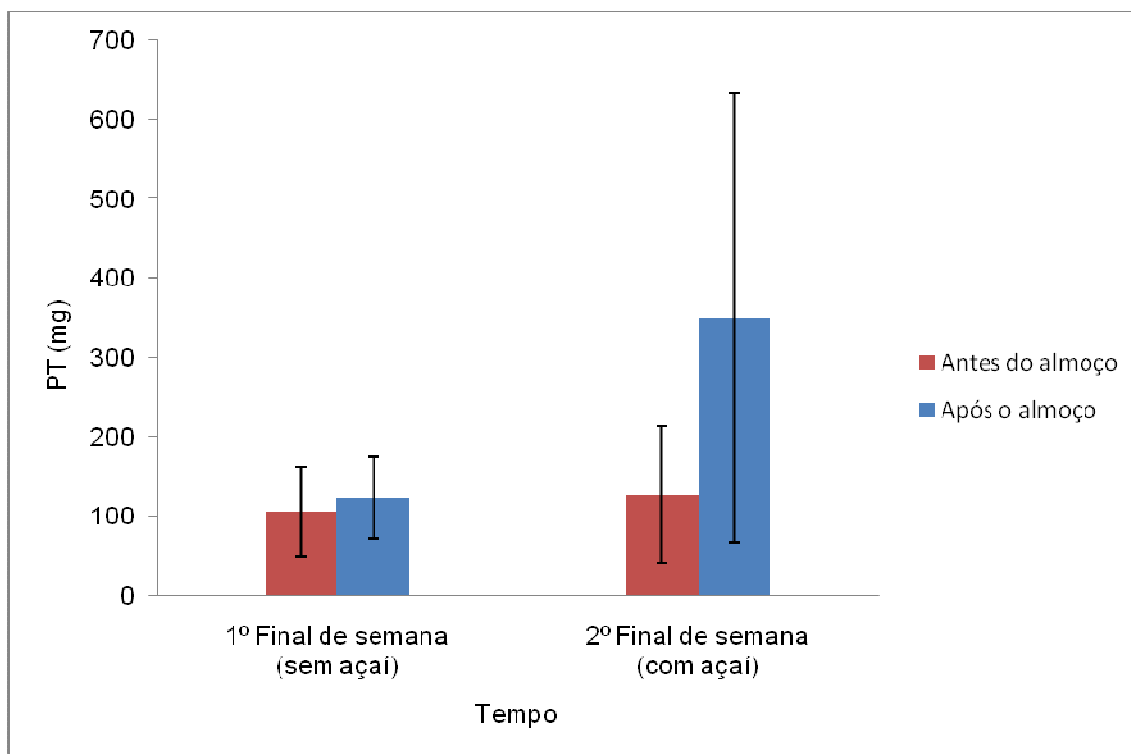
**Figura 25.** Valores médios ORAC das fezes dos 6 voluntários sem e com o consumo de açaí grosso. A ingestão de açaí grosso ocorreu após o almoço do segundo final de semana. As barras representam o desvio padrão das médias.

No gráfico da Figura 25 é possível observar que os valores inicialmente encontrados próximos a 1.100  $\mu\text{mol ET}$  (antes do consumo de açaí) aumentaram para  $3.374 \pm 2.364 \mu\text{mol ET}$  após o almoço do segundo final de semana, quando ocorre a ingestão de açaí grosso. O teste de Tukey (Tabela 9) realizado permite afirmar que este aumento do valor ORAC após o consumo de açaí, em relação ao restante dos valores ORAC, é estatisticamente significativo ( $p < 0,1$ ), apesar dos altos valores de desvio padrão observados.



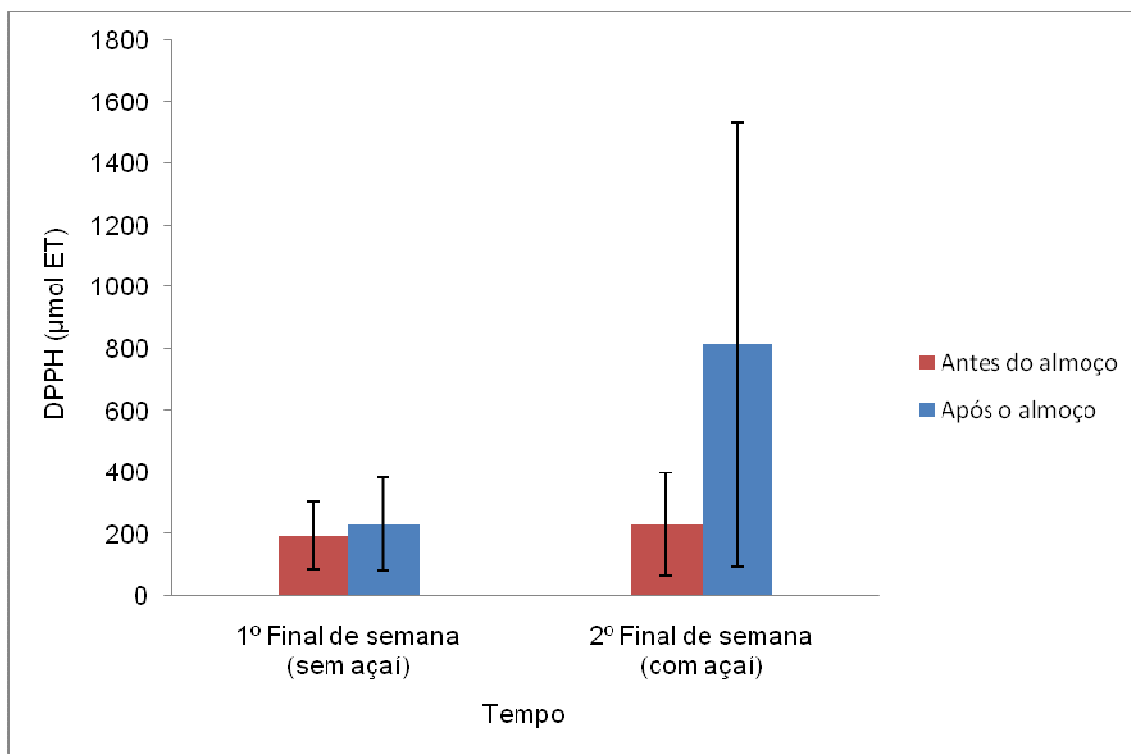
**Figura 26.** Valores médios TEAC das fezes dos 6 voluntários sem e com o consumo de açaí grosso. A ingestão de açaí grosso ocorreu após o almoço do segundo final de semana. As barras representam o desvio padrão das médias.

Em relação aos valores da capacidade antioxidante avaliada pelo método TEAC observa-se que valores abaixo de 190 (antes da ingestão de açaí) aumentam para  $518 \pm 332 \mu\text{mol ET}$  após o consumo de açaí grosso. Apesar dos altos valores de desvios padrão encontrados, o teste de Tukey realizado confirma que este aumento do segundo final de semana após o almoço (com o consumo de açaí grosso) em relação aos demais pontos (antes do consumo de açaí grosso) é estatisticamente significativo ( $p < 0,1$ ), conforme pode ser observado na Tabela 9.



**Figura 27.** Valores médios de polifenóis totais (PT) das fezes dos 6 voluntários sem e com o consumo de açaí grosso. A ingestão de açaí grosso ocorreu após o almoço do segundo final de semana. As barras representam o desvio padrão das médias.

O gráfico dos polifenóis totais (Figura 27) mostra a mesma tendência de comportamento: o aumento dos valores de polifenóis totais após a ingestão de açaí grosso pelos voluntários. Antes do consumo de açaí grosso observam-se valores de aproximadamente 119 mg de polifenóis totais, que aumentam para  $351 \pm 283$  mg PT. O teste de Tukey (Tabela 9) mostra que este aumento em relação aos demais pontos é estatisticamente significativo ( $p < 0,05$ ).



**Figura 28.** Valores médios DPPH das fezes dos 6 voluntários sem e com o consumo de açai grosso. A ingestão de açai grosso ocorreu após o almoço do segundo final de semana. As barras representam o desvio padrão das médias.

Os valores de DPPH seguem a mesma tendência de comportamento das demais análises. No primeiro final de semana antes do almoço observa-se um valor de  $195 \pm 111 \mu\text{mol ET}$  que aumenta para  $814 \pm 721 \mu\text{mol ET}$  após a ingestão de açai grosso (segundo final de semana após o almoço). A análise estatística realizada por meio do teste de Tukey (Tabela 9) permite afirmar que novamente há uma diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,1$ ) entre os pontos sem o consumo de açai e após a ingestão da bebida, apesar dos altos desvios apresentados dentro do grupo.

No presente estudo, os voluntários ingeriram 355 mg de antocianinas totais em 500 mL de açai. De acordo com dados encontrados na literatura pode-se afirmar que este fruto é rico também em outros compostos fenólicos (Tabelas 1 e 2), o que é confirmado pelo resultado encontrado para a análise de polifenóis totais neste trabalho, já que as antocianinas correspondem a apenas 20% deste valor.

Sabe-se que os compostos fenólicos são parcialmente metabolizados pelas bactérias do trato intestinal humano (SCALBERT *et al.*, 2002). Então o aumento



observado no segundo final de semana após o almoço (quando há a ingestão de açaí grosso pelos voluntários) pode ser atribuído tanto à presença de compostos fenólicos do açaí quanto à presença de possíveis metabólitos destes.

As antocianinas podem ser convertidas em metabólitos ainda não detectados, como por exemplo, gases (WALLE *et al.*, 2001) ou ainda podem ser degradadas antes que aconteçam as alterações resultantes da ação de bactérias devido à instabilidade do carbinol em meio alcalino (CLIFFORD, 2000).

Os resultados obtidos por Aura e colaboradores (2005) mostram que as antocianinas podem ser transformadas pelas bactérias presentes no cólon em compostos fenólicos menores ou conjugados da aglicona, dos quais as implicações na saúde são pouco caracterizadas. Tanto os efeitos locais no cólon quanto os efeitos sistêmicos no corpo humano devem ser estudados levando em consideração as mudanças nas estruturas devido à ação das bactérias do cólon.

#### 4.4.2. Análise de Colorimetria Tristímulo

Na Tabela 10 está apresentado o valor médio entre os voluntários de  $\Delta L$ ,  $\Delta a$ ,  $\Delta b$ . Em relação à coordenada referente à luminosidade ( $\Delta L$ ) pode-se afirmar que houve uma diminuição dos valores após a ingestão de açaí grosso, mostrando que a luminosidade das amostras sofreu uma redução.

Nesta análise, optou-se por trabalhar com diferença de cor para avaliar com maior precisão qual a contribuição da bebida açaí para a diminuição ou aumento dos valores das coordenadas com as quais se trabalhou.

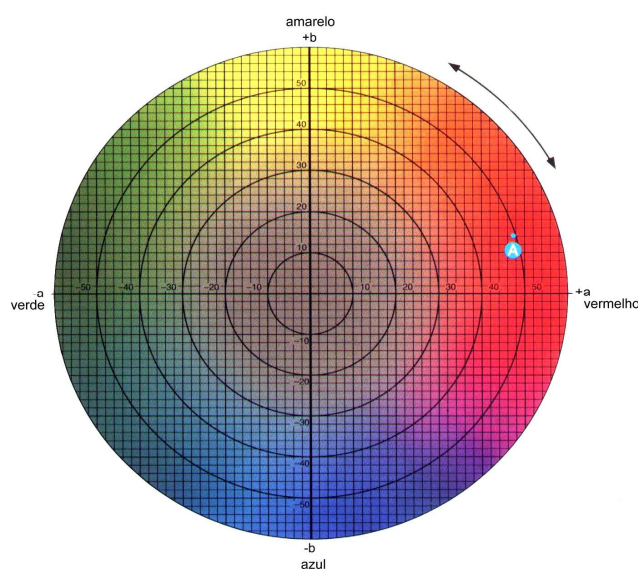
**Tabela 10.** Média e desvio padrão das coordenadas de cor das fezes dos 6 voluntários pelo tempo nos dois fins de semana (sem e com o consumo de açaí) e resultados do teste de Tukey.

Tempo	$\Delta L^*$	$\Delta a$	$\Delta b^{**}$
1º fim de semana	2,170 ± 1,591 <sup>a</sup>	-0,092 ± 1,222 <sup>a</sup>	2,917 ± 2,270 <sup>a</sup>
2º fim de semana	-5,430 ± 8,218 <sup>b</sup>	-1,085 ± 1,392 <sup>a</sup>	-7,470 ± 10,26 <sup>b</sup>

Os valores seguidos de uma mesma letra na mesma coluna não são significativamente diferentes. \* $p < 0,1$ ; \*\* $p < 0,05$ .

O valor  $L^*$  corresponde à medida da luminosidade, que varia do completamente opaco (ou preto), ao qual é atribuído o valor 0, ao completamente transparente (ou branco), ao qual é atribuído o valor 100;  $a^*$  é a medida do vermelho ( $-a^*$  corresponde ao verde) e  $b^*$  do amarelo ( $-b^*$  corresponde ao azul) (Figura 29). Por meio da análise da Tabela 11, observa-se que após o consumo de açaí houve uma diminuição dos valores de  $\Delta L$  de  $2,170 \pm 1,591$  para  $-5,430 \pm 8,218$ , indicando que apesar deste material biológico já apresentar uma tendência para uma coloração opaca, o consumo da bebida provoca um aumento da opacidade, aproximando para uma coloração preta, já que o açaí é um fruto de cor escura devido à presença das antocianinas.

Em relação à coordenada  $\Delta a$  (que varia do verde ao vermelho), não houve variação estatisticamente significativa ( $p > 0,1$ ), conforme pode ser observado pelo teste de Tukey.



**Figura 29.** Diagrama de cromaticidade  $a^*$ ,  $b^*$ .

Fonte: SILVA (2002).

A coordenada que indica a variação do amarelo ao azul ( $\Delta b$ ) apresentou uma diferença estatisticamente significativa a nível de  $p < 0,05$  entre as amostras sem e com o consumo de açaí. Observou-se uma diminuição dos valores de  $\Delta b$  no segundo fim de semana, indicando que a amostra se afasta da região do amarelo, adquirindo uma coloração que tende para o azul. Esta tendência acontece devido ao pH das fezes, que

é na faixa de 6,4, conforme o estudo de Búrigo e colaboradores (2007), no qual foram realizadas medidas de pH das fezes de 25 pacientes.

O pH tem um efeito não somente sobre a forma química das antocianinas, mas também sobre sua cor e estabilidade. O cátion flavílio é estável em condições ácidas, em pH inferior a 2. A elevação do pH para uma faixa de 2-4 provoca a perda de um primeiro próton dessa estrutura, que adquire principalmente a forma de uma base quinoidal de cor púrpura clara, que perde um segundo próton para formar uma base ionizada de cor azul escuro (CASTAÑEDA-OVANDO *et al.*, 2009). Então, esta variação de pH e, conseqüentemente, a mudança na estrutura das antocianinas, explica porque as fezes aproximaram-se da região azul, adquirindo dessa forma, uma coloração mais escura.

## 5. CONCLUSÕES

O açaí grosso utilizado neste trabalho apresentou características que permitem afirmar que esta matéria-prima possui alta capacidade antioxidante, bem como elevado conteúdo em compostos fenólicos, especialmente, antocianinas.

A absorção dos compostos fenólicos no plasma esteve abaixo dos limites de detecção e quantificação do equipamento, não sendo possível identificá-los e quantificá-los.

A análise da capacidade antioxidante plasmática por meio da metodologia ORAC mostrou que não há nenhuma diferença significativa entre os valores antes e após o consumo de açaí.

A análise ORAC da urina mostrou que após o consumo de açaí houve um aumento na capacidade antioxidante dos intervalos de 2-4h, 8-12h e 12-24h após o consumo de açaí, porém apenas os intervalos de 8-12h e 12-24h foram significativos ( $p < 0,01$ ) em relação aos demais, sendo que eles não diferiram entre si.

A concentração de C3G e C3R na urina foi máxima no período de 2-4h após o consumo de açaí, demonstrando uma rápida excreção desses compostos.

As análises de ORAC, TEAC, PT e DPPH mostraram que houve um aumento significativo na capacidade antioxidante das fezes após o consumo de açaí.

A análise de cor realizada nas fezes mostrou que após o consumo de açaí, essas amostras biológicas adquiriram uma coloração que se aproxima da região correspondente ao azul, devido à presença dos pigmentos antocianinas.

## 6. PERSPECTIVAS

Em trabalhos futuros, seria interessante que seja feita uma coleta de maior volume de plasma, permitindo assim que as substâncias presentes no mesmo sejam detectadas e quantificadas por CLAE. Também se deve tentar aplicar uma metodologia diferente da que foi utilizada no presente trabalho, no que se refere à extração em fase sólida e das soluções e gradientes utilizados na técnica CLAE. É importante também que a análise de capacidade antioxidante por meio da metodologia ORAC seja realizada na fração LDL do plasma, pois já existem estudos presentes na literatura que levantam a hipótese de que as antocianinas ligam-se à fração lipídica plasmática.

Outra sugestão seria a de se fazer um estudo mais voltado para as fezes, em termos da microflora colonial, pois se sabe que alguns microrganismos podem provocar alterações nos compostos fenólicos, convertendo-os em outras substâncias, tais como fenólicos simples. Além disso, os próprios compostos fenólicos acarretam em alterações na composição da microflora colonial. Então seria interessante abordar estes dois aspectos que relacionam os compostos fenólicos com os microrganismos presentes no intestino grosso.

É muito importante também que se faça uma análise das fezes em CLAE-MS<sub>x</sub>MS antes e após o consumo de açaí para que seja estudado o perfil das substâncias encontradas, se elas apresentam-se na forma intacta, aglicona ou como metabólitos, e que tipo de metabólito seria, pois dessa maneira seria mais fácil prever as reações metabólicas que acontecem no organismo (metilação, sulfuração ou glucuronidação).

Na urina é importante que se aplique uma metodologia mais sensível para a detecção de metabólitos por meio de CLAE, pois no presente trabalho foram identificadas apenas as formas glicosiladas intactas, que também estão presentes nos frutos do açaizeiro. Porém elas correspondem apenas a uma pequena quantidade do total encontrado nos frutos. Resta elucidar que tipo de reação aconteceu com os outros compostos fenólicos e/ou qual o caminho metabólico percorrido por eles.

Para isto é importante que se utilize a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa, pois esta é uma técnica mais sensível, tornando a identificação dos compostos fenólicos mais precisa.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AABY, K.; SKREDE, G.; WROLSTAD, R. E. Phenolic composition and antioxidant activities in flesh and achenes of strawberries (*Fragaria ananassa*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 53: 4032-4040, 2005.

ALHO, H.; LEINONEN, J. Total antioxidant measured by chemiluminescence methods. **Methods in Enzymology**, 299: 3-15, 1999.

ANDERSEN, Ø.; MARKHAM, K. Flavonoids: chemistry, biochemistry and applications. Florida, U.S.A.: CRC Press Taylor & Francis, 2006.

ANGELIS, R. C. **Importância de alimentos e vegetais na proteção da saúde: Fisiologia da nutrição protetora e preventiva de enfermidades degenerativas**. São Paulo: Editora Atheneu, 2001.

AURA, A.M.; MARTIN-LOPEZ, P.; O'LEARY, K.A.; WILLIAMSON, G.; OKSMAN-CALDENTY, K.M.; POUTANEN, K.; SANTOS-BUELGA, C.; In vitro metabolism of anthocyanins by human gut microflora. **European Journal of Nutrition**, 44: 133–142, 2005.

BARROS, D.; AMARAL, O.B.; IZQUIERDO, I.; GERACITANO, L.; RASEIRA, M.C.B.; HENRIQUES, A.T.; RAMIREZ, M.R. Behavioral and genoprotective effects of Vaccinium berries intake in mice. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, 84(2): 229-234, 2006.

BECKER, E.M.; NISSEN, L.R.; SKIBSTED, L.H. Antioxidant evaluation protocols: Food quality or health effects. **European Food Research and Technology**, 219: 561–571, 2004.

BERMÚDEZ-SOTO, M.-J.; TOMÁS-BARBERÁN, F.-A.; GARCÍA-CONESA M.-T. Stability of polyphenols in chokeberry (*Aronia melanocarpa*) subjected to in vitro gastric and pancreatic digestion. **Food Chemistry**, 102: 865-874, 2007.

BIROŠOVÁ, L.; MIKULÁŠOVÁ, M.; VAVERKOVÁ, Š. Phenolic acids from plant foods can increase or decrease the mutation frequency to antibiotic resistance. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 55: 10183-10186, 2007.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Coordenação de Inspeção Vegetal. Decreto nº 2.314, de 4 de setembro de 1997, art. 87, inciso II. Regulamentos Técnicos para Fixação dos Padrões de Identidade e Qualidade para polpa das seguintes frutas: acerola, cacau, cupuaçu, graviola, açaí, maracujá, caju, manga, goiaba, pitanga, uva, mamão, cajá, melão, mangaba, e para suco das seguintes frutas: maracujá, caju, caju alto teor de polpa, caju clarificado ou cajuína, abacaxi, uva, pêra, maçã, limão, lima ácida e laranja. **Diário Oficial**, Brasília, DF. Nº 01, DE 7 DE JANEIRO DE 2000.

BÚRIGO, T.; FAGUNDES, R.L.M.; TRINDADE, E.B.S.M.; VASCONCELOS, H.C.F.F. Efeito bifidogênico do frutooligossacarídeo na microbiota intestinal de pacientes com neoplasia hematológica. **Revista de Nutrição**, 20(5): 491-497, 2007.

CALZAVARA, B. B. G. As possibilidades do açaizeiro no estuário amazônico. **Boletim da Faculdade de Ciências Agrárias do Pará**, Belém/PA, 1976.

CAO, G.; ALESSIO, H.M.; CULTER, R.G. Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants. **Free Radical and Biological Medicine**, 14: 303-311, 1993.

CAO, G.; MUCCITELLI, H.U.; SÁNCHEZ-MORENO, C.; PRIOR, R.L. Anthocyanins are absorbed in glycosylated forms in elderly women: a pharmacokinetic study. **American Journal of Clinical Nutrition**, 73: 920-926, 2001.

CAO, G.; PRIOR, R.L. Measurement of oxygen radical absorbance capacity in biological samples. **Methods in Enzymology**, 299: 50-62, 1999.

CASTAÑEDA-OVANDO, A.; PACHECO-HERNÁNDEZ, M.L.; PÁEZ-HERNÁNDEZ, M.E.; RODRÍGUEZ, J.A.; GALÁN-VIDAL, C.A. Chemical studies of anthocyanins: A review. **Food Chemistry**, 113: 859-871, 2009.

CAVALCANTE, P. B. **Frutos comestíveis da Amazônia**. 2ª ed. Belém: Falangôla, 1976.

CHATTERJEE, A.; YASMIN, T.; BAGCHI, D.; STOHS, S.J. Inhibition of *Helicobacter pylori* in vitro by various berry extracts, with enhanced susceptibility to clarithromycin. **Molecular and Cellular Biochemistry**, 265(1-2): 19–26, 2004.

CHAUDIÈRE, J.; FERRARI-ILIOU, R. Intracellular Antioxidants: from Chemical to Biochemical Mechanisms. **Food and Chemical Toxicology**, 37: 949-962, 1999.

CHEYNIER, V. Polyphenols in foods are more complex than often thought. **American Journal of Clinical Nutrition**, 81(1): 223-229, 2005.

CLIFFORD, M. Anthocyanins: Nature, occurrence and dietary burden. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 80: 1063-1072, 2000.

COOK, N.C.; SAMMAN, S. Flavanoids: Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. **Journal of Nutritional Biochemistry**, 7: 66-76, 1996.

COULTATE, T. P. **Manual de química y bioquímica de los alimentos**. 2 ed. Zaragoza, España: Acribia, 1998.

DONOVAN, J.L.; BELL, J.R.; KASIM-KARAKAS, S.J.; GERMAN, B.; WALZEM, R.L.; HANSEN, R.J.; WATERHOUSE, A.L. Catechin is present as metabolites in human plasma after consumption of red wine. **The Journal of Nutrition**, 129: 1662-1668, 1999.

ESPÍN, J.C.; GARCÍA-CONESA, M.T.; TOMÁS-BARBERÁN, F.A. Nutraceuticals: Facts and fiction. **Phytochemistry**, 68: 29663008, 2007.

ESPÍN, J.C.; SOLER-RIVAS, C.; WICHERS, H.J. Characterization of the total free radical scavenger capacity of vegetables oils and oil fractions using 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 48: 648-656, 2000.

ESPOSITO, E.; ROTILIO, D.; DI MATTEO, V.; DI GIULIO, C.; CACCHIO, M.; ALGERI, S. A review of specific dietary antioxidants and the effects on biochemical mechanisms related to neurodegenerative processes. **Neurobiology of Aging**, 23: 719-735, 2002.

FANG, Y-Z.; YANG, S.; WU, G. Regulation of physiological systems by nutrients: Free Radicals, Antioxidants, and Nutrition. **Nutrition**, 18: 872-879, 2002.

FELGINES, C.; TALAVÉRA, S.; GONTHIER, M.P.; TEXIER, O.; SCALBERT, A.; LAMAISON, J.L.; RÉMÉSY, C. Strawberry anthocyanins are recovered in urine as glucuro- and sulfoconjugates in humans. **The Journal of Nutrition**, 133:1296-1301, 2003.



FENNEMA, O.R. **Química de los alimentos**. Zaragoza: Acribia, 1993.

FERNÁNDEZ-PACHÓN, M.S.; VILLAÑO, D.; TRONCOSO, A.M.; GARCÍA-PARRILLA, M.C. Determination of the phenolic composition of sherry and table white wines by liquid chromatography and their relation with antioxidant activity. **Analytica Chimica Acta**, 563: 101-108, 2006.

FERREIRA, D.; SLADE, D.; MARAIS, J.P.J. Flavans and Proanthocyanidins. In: O. M. Andersen; K. R. Markham, **Flavonoids: Chemistry, biochemistry and applications**. Boca Raton: CRC Press Taylor & Francis, 2006.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Bioavailability: Regulatory Definition. Disponível em: <[http://www.fda.gov/ohrms/dockets/ac/01/slides/3763s2\\_10\\_KUMI.PPT#257,2,Bioavailability](http://www.fda.gov/ohrms/dockets/ac/01/slides/3763s2_10_KUMI.PPT#257,2,Bioavailability)>. Acesso em 21 de Janeiro de 2009.

FOTI, M.C.; DAQUINO, C.; GERACI, C. Electron-transfer reaction of cinnamic acids and their methyl esters with the DPPH radical in alcoholic solutions. **Journal of Organic Chemistry**, 69: 2309–2314, 2004.

FRANK, T.; NETZEL, M.; STRASS, G.; BITSCH, R.; BITSCH, I. Bioavailability of anthocyanidin-3-glucosides following consumption of red wine and red grape juice. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, 81: 423-435, 2003.

FRANKEL, E.N.; MEYER, A.S., The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. **Journal of Food Science and Agricultural**, 80: 1925-1941, 2000.

GARCÍA-ALONSO, J.; ROS, G.; VIDAL-GUEVARA, M.; PERIAGO, M. Acute intake of phenolic-rich juice improves antioxidant status in healthy subjects. **Nutrition Research**, 26: 330-339, 2006.

GEE, J.M.; DuPONT, M.S.; DAY, A.J.; PLUMB, G.W.; WILLIAMSON, G.; JOHNSON, I.T. Intestinal transport of quercetin glycosides in rats involves both deglycosylation and interaction with the hexose transport pathway. **The Journal of Nutrition**, 130: 2765-2711, 2000.

GIBNEY, M.J.; VORSTER, H.H; KOK, F.J. **Introdução à nutrição humana**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.

GUO, H.; LING, W.; WANG, Q.; LIU, C.; HU, Y.; XIA, M.; FENG, X.; XIA, X. Effect of anthocyanin-rich extract from black rice (*Oryza sativa* L. *indica*) on hyperlipidemia and insulin resistance in fructose-fed rats. **Plant Foods for Human Nutrition**, 62(1): 1-6, 2007.

GUYTON, A.C.; HALL, J.E. **Tratado de fisiologia médica**. 10ª ed. São Paulo: Guanabara Koogan, 2002.

HAGERMAN, A.E. **Tannin Handbook**. Disponível em <http://www.users.muohio.edu/hagermae/tannin.pdf>, 2002.

HALLIWELL, B. Free Radicals and Antioxidant: A personal view. **Nutrition Reviews**, 52: 253-265, 1994.

HALLIWELL, B., AESCHBACH, R., LOLIGER J., ARUOMA, O.I. The characterization of antioxidants. **Food and Chemical Toxicology**, 33: 601-617, 1995.

HARBORNE, J.B. **The Flavonoids: Advances in research since 1986**. London; New York: Chapman & Hall, 1994.

HASSIMOTTO, N.M.; GENOVESE, M.I.; LAJOLO, F.M. Absorption and metabolism of cyanidin-3-glucoside and cyanidin-3-rutinoside extracted from wild mulberry (*Morus nigra* L.) in rats. **Nutrition Research**, 28(3): 198-207, 2008.

HARBORNE, J.B.; WILLIAMS, C.A. Anthocyanins and other flavonoids. **Natural Products Reports**, 18(3): 310-333, 2001.

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

HOLLMAN, P. C.; KATAN, M. B. Bioavailability and health effects of dietary flavonols in man. **Archives of toxicology**, 20(Suppl.): 237-248, 1998.

HOLST, B.; WILLIAMSON, G. A critical review of the bioavailability of glucosinolates and related compounds. **Natural Product Reports**, 21: 425-447, 2004.

HOLST, B.; WILLIAMSON, G. Nutrients and phytochemicals: from bioavailability to bioefficacy beyond antioxidants. **Current Opinion in Biotechnology**, 19: 73-82, 2008.

HUANG, D.; OU, B.; HAMPSCH-WOODILL, M.F.; JUDITH, A.; PRIOR, R.L. High-throughput assay of oxygen radical absorbance capacity (ORAC) using a multichannel liquid handling system coupled with a microplate fluorescence reader in 96-well format. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 50: 4437-4444, 2002.

JACKSON, A.D.; McLAUGHLIN, J. Digestion and absorption. **Surgery**, 24 (7): 250-254, 2006.

KANG, T.H.; HUR, J.Y.; KIM, H.B.; RYU, J.H.; KIM, S.Y. Neuroprotective effects of the cyanidin-3-O-beta-D-glucopyranoside isolated from mulberry fruit against cerebral ischemia. **Neuroscience Letters**, 391(3): 122-126, 2006.

KAY, C.D.; HOLUB, B.J. The effect of wild blueberry (*Vaccinium angustifolium*) consumption on postprandial serum antioxidant status in human subjects. **Brazilian Journal of Nutrition**, 88: 389-397, 2002.

KHANBABAEE, K.; VAN REE, T. Tannins: Classification and definition. **Natural Products Reports**, 18(6): 641-649, 2001.

KIM, H.J.; TSOY, I.; PARK, J.M.; CHUNG, J.I.; SHIN, S.C.; CHANG, K.C. Anthocyanins from soybean seed coat inhibit the expression of TNF-alpha-induced genes associated with ischemia/reperfusion in endothelial cell by NF-kappaB-dependent pathway and reduce rat myocardial damages incurred by ischemia and reperfusion in vivo. **FEBS Letters**, 580(5): 1391-1397, 2006.

KOUNTOURI, A.M.; MYLONA, A.; KALIORA, A.C.; ANDRIKOPOULOS, N.K. Bioavailability of the phenolic compounds of the fruits (drupes) of *Olea europaea* (olives): Impact on plasma antioxidant status in humans. **Phytomedicine**, 14: 659-667, 2007.

KROON, P. A.; CLIFFORD, M.N.; CROZIER, A.; DAY, A.J.; DONOVAN, J.L.; MANACH, C.; WILLIAMSON, G. How should we assess the effects of exposure to dietary polyphenols in vitro? **The American Journal of Clinical Nutrition**, 80:15–21, 2004.

LAMIKANRA, O. Development of anthocyanin pigments in muscadine (*Vitis rotundifolia Michx*). Grapes. **Horticultural Sciences**, 23: 597-599, 1988.

LEE, J., LEE, H.K., KIM, C.Y., HONG, Y.J., CHOE, C.M., YOU, T.W., SEONG, G.J., 2005. Purified high-dose anthocyanoside oligomer administration improves nocturnal vision and clinical symptoms in myopia subjects. **The British Journal of Nutrition**, 93(6): 895–899, 2005b.

LEE, Y.B.; LEE, H.J.; SOHN, H.S. Soy isoflavones and cognitive function. **Journal of Nutritional Biochemistry**, 16: 641-649, 2005a.

LICHTENTHAÄLER, R.; RODRIGUES, R.B.; MAIA, J.G.S.; PAPAGIANNOPOULOS, M.; FABRICIUS, H.; MARX, F. Total oxidant scavenging capacities of *Euterpe oleracea* Mart. (Açaí) fruits. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, 56(1): 53-64, 2005.

LOTITO, S. B.; FREI, B. Relevance of apple polyphenols as antioxidants in human plasma: contrasting in vitro and in vivo effects. **Free Radical Biology and Medicine**, 36: 201-211, 2004.

MacDONALD-WICKS, L.K.; WOOD, L.G.; GARG, M.L. Methodology for the determination of biological antioxidant capacity *in vitro*: a review. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 86: 2046–2056, 2006.

MAGGI-CAPEYRON, M.-F.; CEBALLOSM P.; CRISTOL, J.-P.; DELBOSCM S.; LE DOUCEN, C.; PONS, M.; LEGER, C.L.; DESCOMPS, B. Wine phenolic antioxidant inhibit AP-1 transcriptional activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 49: 5646–5652, 2001.

MAHAN, L. K.; ESCOTT-STUMP, S. **Krause: Alimentos, nutrição & dietoterapia**. 10ª ed. São Paulo: Roca, 2002.

MANACH, C.; WILLIAMSON, G.; MORAND, C.; SCALBERT, A.; RÉMÉSY, C. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. **The American Journal of Clinical Nutrition**, 81(suppl): 230S-42S, 2005.

MARKAKIS, P. **Anthocyanins as food colors**. New York, USA: Academic Press, 1982.

MAZZA, G.; KAY, C.; COTTRELL, T.; HOLUB, B. Absorption of anthocyanins from blueberries and serum antioxidant status in human subjects. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 50: 7731-7737, 2002.

MCGHIE, T.K.; AINGE, G.D.; BARNETT, L.E.; COONEY, J.; JENSEN, D.J. Anthocyanin glycosides from berry fruit are absorbed and excreted unmetabolized by both humans and rats. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 51: 4539-4548, 2003.

MERTENS-TALCOTT, S.U.; RIOS, J.; JILMA-STOHLAWETZ, P.; PACHECO-PALENCIA, L.A.; MEIBOHM, B.; TALCOTT, S. T.; DERENDORF, H. Pharmacokinetics of Anthocyanins and Antioxidant Effects after the Consumption of Anthocyanin-Rich Açai Juice and Pulp (*Euterpe oleracea* Mart.) in Human Healthy Volunteers. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 56 (17): 7796-7802, 2008.

MILBURY P.E.; CAO, G.; PRIOR, R.L.; BLUMBERG, J. Bioavailability of elderberry anthocyanins. **Mechanisms of Ageing and Development**, 123: 997-1006, 2002.

MÜLLEDER, U.; MURKOVIC, M.; PFANNHAUSER, W. Urinary excretion of cyanidin glycosides. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, 53: 61-66, 2002.

MULLEN, W.; BOITIER, A.; STEWART, A.; CROZIER, A. Flavonoid metabolites in human plasma and urine after the consumption of red onions: analysis by liquid chromatography with photodiode array and full scan tandem mass spectrometric detection. **Journal of Chromatography A**, 1058: 163-168, 2004.

NELSON, D.; COX, M. **Lehninger: Princípios de bioquímica**. 3ª ed. São Paulo: Sarvier, 2002.

NETZEL, M.; STRASS, G.; HERBST, M.; DIETRICH, H.; BITSCH, R.; BITSCH, I.; FRANK, T. The excretion and biological antioxidant activity of elderberry antioxidants in healthy humans. **Food Research International**, 38: 905-910, 2005.

NETZEL, M.; STRASS, G.; JANSSEN, M.; BITSCH, I.; BITSCH, R. Bioactive anthocyanins detected in human urine after ingestion of blackcurrent juice. **Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology**, 20(2): 89-95, 2001.

NIELSEN, I.L.F.; DRAGSTEDT, L.O.; RAVN-HAREN, G.; FREESE, R.; RASMUSSEN, S.E. Absorption and excretion of black currant anthocyanins in humans and watanabe heritable hyperlipidemic rabbits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 51: 2813-2820, 2003.

OLTHOF, M.R.; HOLLMAN, P.C.; KATAN, M. Chlorogenic acid and caffeic acid are absorbed in humans. **Journal of Nutrition**, 131: 66-71, 2001.

OU, B.; HAMPSCH-WOODILL, M.; PRIOR, R.L. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using Fluorescein as the fluorescent probe. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 49: 4916-4926, 2001.

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

PACHECO-PALENCIA, L.; HAWKEN, P.; TALCOTT, S. Phytochemical, antioxidant and pigment stability of açai (*Euterpe oleracea* Mart.) as affected by clarification, ascorbic acid fortification and storage. **Food Research International**, 40: 620-628, 2007.

PACKER, L.; CADENAS, E. **Handbook of antioxidants**. Second edition, Revised and expanded. Marcel Dekker, Inc.: New York, USA, 2001.

PASSAMONTI, S.; VRHROVSEK, U.; VANZO, A.; MATTIVI, F. The stomach as a site for anthocyanins absorption from food. **FEBS Letters**, 544: 210-213, 2003.

PINCEMAIL, J.; BONJEAN, K.; CAYEUX, K.; DEFRAIGNE, J. Mécanismes physiologiques de la défense antioxydante: Actions physiologiques de défenses antioxydantes. **Nutrition clinique et métabolisme**, 16: 233-239, 2002.

PRAKASH, A. Antioxidant activity. **Medallion Laboratories-Analytical Progress Press**, 19(2): 1-6, 2001.

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

- PUUPPONEN-PIMIÄ, R.; NOHYNEK, L.; MEIER, C.; KÄHKÖNEN, M.; HEINONEN, M.; HOPIA, A.; OKSMAN-CALDENTEY, K.-M. Antimicrobial properties of phenolic compounds from berries, **Journal of Applied Microbiology**, 90: 494-507, 2001.
- RE, R.; PELLIGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, 26: 1231-1237, 1999.
- RECHNER, A.R.; SMITH, M.A.; KUHNLE, G.; GIBSON, G.R.; DEBNAM, E.S.; SRAI, S.K.S.; MOORE, K.P.; RICE-EVANS, C.A. Colonic metabolism of dietary polyphenols: influence of structure on microbial fermentation products. **Free Radical Biology and Medicine**, 36(2): 212-225, 2004.
- RICE-EVANS, C.A.; MILLER, N.J.; PAGANGA, G. Antioxidant properties of phenolic compounds. **Trends in Plant Science**, 2: 152-159, 1997.
- ROBARDS, K.; PRENZLER, P.D.; TUCKER, G.; SWATSITANG, P.; GLOVER, W. Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. **Food Chemistry**, 66(4): 401-436, 1999.
- ROBBINS, R. Phenolics in foods: An overview of analytical methodology. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 5: 2866-2887, 2003.
- ROGEZ, H. **Açaí: Preparo, composição e melhoramento da conservação**. Belém: Edufpa, 2000.
- SAMPAIO, P. **Avaliação das propriedades funcionais do açaí (*Euterpe oleracea*) em plasma humano**. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal do Pará. Belém - PA, Brasil, 2006.
- SANCHEZ-MORENO, C. Review: Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. **Food Science and Technology International**, 8:121–137, 2002.

SCALBERT, A.; MORAND, C.; MANACH, C.; RÉMÉSY, C. Absorption and metabolism of polyphenols in the gut and impact on health. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, 56: 276–282, 2002.

SCHAUSS, A.; WU, X.; PRIOR, R.; OU, B.; PATEL, D.; HUANG, D.; KABABICK, J. Phytochemical and nutrient composition of the freeze-dried Amazonian palm berry, *Euterpe oleraceae* Mart. (Acai). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 54: 8598-8603, 2006.

SHAHIDI, F.; NACZK, M. **Phenolics in food and nutraceuticals**. Boca Raton: CRC Press, 2004.

SHIN, W.H.; PARK, S.J.; KIM, E.J. Protective effect of anthocyanins in middle cerebral artery occlusion and reperfusion model of cerebral ischemia in rats. **Life Sciences**, 79(2): 130–137, 2006.

SHIRLEY, B.W. Flavonoid biosynthesis: 'New' functions for an 'old' pathway. **Trends in Plant Science**, 1(11): 377-382, 1996.

SILVA, E. **Otimização de métodos de análise de antocianinas: poder antioxidante e quantificação rápida**. Dissertação de Mestrado – Universidade Federal do Pará. Belém, - PA, Brasil, 2002.

SILVA, E.; SOUZA, J.; ROGEZ, H.; REES, J.; LARRONDELE, Y. Antioxidant activities and polyphenolic contents of fifteen selected plant species from the Amazonian region. **Food Chemistry**, 101: 1012-1018, 2007.

SINGLETON, V.L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENOS, R.M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin–Ciocalteu reagent. **Methods in Enzymology**, 299:15-27, 1999.

SINGLETON, V.L.; ROSSI, J.A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic–phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, 16: 144-158, 1965.



SOUZA, J. **Etude des propriétés antioxydantes *in vitro* d'extraits de feuilles de *Byrsonima crassifolia* et *Inga edulis* et caractérisation partielle des composés phénoliques.** Tese de Doutorado – Universidade Católica de Louvain. Louvain-la-Neuve, Belgique, 2007.

SPENCER, J.P.E. Metabolism of tea flavonoids in the gastrointestinal tract. **Journal of Nutrition**, 133: 3255S-3261S, 2003.

STRACK, D.; WRAY, V. **Anthocyanins.** In *Methods on Plant Biochemistry, Vol. 1, Plant Phenolics*; Harborne, J. B., Ed.; Academic Press: London, 325-356, 1993.

SUGIYAMA, H.; AKAZOME, Y.; SHOJI, T.; YAMAGUCHI, A.; YASUE, M.; KANDA, T.; OHTAKE, Y. Oligomeric procyanidins in apple polyphenol are main active components for inhibition of pancreatic lipase and triglyceride absorption. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 55: 4604-4609, 2007.

TALAVÉRA, S.; FELGINES, C.; TEXIER, O.; BESSON, C.; LAMAISON, J.; RÉMÉSY, C. Anthocyanins are efficiently absorbed from the stomach in anesthetized rats. **Journal of Nutrition**, 133: 4178-4182, 2003.

TALAVÉRA, S.; FELGINES, C.; TEXIER, O.; BESSON, C.; MANACH, C.; LAMAISON, J.; RÉMÉSY, C. Anthocyanins are efficiently absorbed from the small intestine in rats. **Journal of Nutrition**, 134: 2275-2279, 2004.

TIAN, Q.; GIUSTI, M.; STONER, G.; SCHWARTZ, S. Urinary excretion of black raspberry (*Rubus occidentalis*) anthocyanins and their metabolites. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 54: 1467-1472, 2006.

TSUDA, T.; HORIO, F.; UCHIDA, K.; AOKI, H.; OSAWA, T. Dietary cyanidin 3-O-beta-D-glucoside-rich purple corn color prevents obesity and ameliorates hyperglycemia in mice. **The Journal of Nutrition**, 133(7): 2125-2130, 2003.

VERMERRIS, W.; NICHOLSON, R. **Phenolic compounds biochemistry.** West Lafayette: Springer, 2006.

VINSON, J. A.; SU, X.; ZUBIK, L.; BOSE, P. Phenol antioxidant quantity and quality in foods: fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 49: 5315-5321, 2001.

WALLE, T.; WALLE, K.; HALUSHKA, P.V. Carbon dioxide is the major metabolite of quercetin in humans. **Journal of Nutrition**, 131: 2648-2652, 2001.

WEN, D., LI, CH., DI, H., LIAO, Y., AND LIU, H. A universal HPLC method for the determination of phenolic acids in compounds herbal medicines. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, 53: 6624-6629, 2005.

WERLEIN, H.D.; KÜTEMAYER, C.; SCHATTON, G.; HUBBERMANN, E.M.; SCHWARZ, K. Influence of elderberry and blackcurrant concentrates on the growth of microorganisms. **Food Control**, 16: 729-733, 2005.

WIEBOLD, B. The color purple. **UM Agronomy Technical Report**, 10, 1992.

WILLIAMSON, G.; MANACH, C. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. II. Review of 93 intervention studies. **The American Journal of Clinical Nutrition**, 81(suppl): 243S–55S, 2005.

WU, X.; CAO, G.; PRIOR, R.L. Absorption and metabolism of anthocyanins in elderly women after consumption of elderberry. **The Journal of Nutrition**, 132: 1865-1871, 2002.

WU, X.; GU, L.; HOLDEN, J.; HAYTOWITZ, D.B.; GEBHARDT, S.E.; BEECHER, G.; PRIOR, R.L. Development of a database for total antioxidant capacity in foods: a preliminary study. **Journal of Food Composition and Analysis**, 17: 407-422, 2004.

## **ANEXOS**

## **ANEXO 1**

### **TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

O açaí é um fruto rico em substâncias protetoras, os compostos fenólicos, que entre outras funções, atuam como antioxidantes, porém os efeitos dos componentes alimentares são dependentes de seu comportamento no trato digestivo. Por esse motivo este trabalho tem como objetivo avaliar a absorção e excreção desses compostos do açaí, além da evolução na capacidade antioxidante, em humanos.

Esta pesquisa será dividida em dois finais de semana, sendo que haverá consumo de açaí somente no segundo fim de semana.

Ao longo do dia e na manhã do dia seguinte, serão realizadas coletas de sangue (por profissional experiente e com garantia de uso de material descartável, portanto não oferecendo risco aos participantes da pesquisa), urina e fezes, além da verificação de peso dos voluntários.

As coletas acontecerão nas dependências do Laboratório Dr. Paulo Azevedo, onde os voluntários deverão chegar em jejum de 12 horas, em horário que será previamente agendado. Serão fornecidos aos voluntários todas as refeições ao longo do dia: café da manhã, almoço, lanche e jantar.

Os resultados das análises realizadas serão entregues aos participantes em seu local de trabalho ou em sua residência, tendo garantia de sigilo por parte do pesquisador.

Os voluntários serão livres para participar desta pesquisa, assim como para retirar-se a qualquer momento, sem qualquer represália.

---

Camila Travassos da Rosa Moreira Bastos

Universidade Federal do Pará  
Instituto de Tecnologia  
Curso de Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos  
Telefone para contato: 3201-7456/8114-8407  
e-mail: cmbastos@ufpa.br

## CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Declaro que li as informações acima sobre a pesquisa e que me sinto perfeitamente esclarecido sobre o conteúdo da mesma, assim como os seus riscos e benefícios. Declaro ainda que, por minha livre vontade, aceito participar da pesquisa, cooperando com a coleta de material para exame.

Belém \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Nome legível: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

## ANEXO 2



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
NÚCLEO DE MEDICINA TROPICAL  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS

### PARECER DE ÉTICA DE PROJETO DE PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS

1. **Protocolo:** Nº050/2005-CEP/NMT
2. **Projeto de Pesquisa:** AVALIAÇÃO DA TAXA DE ABSORÇÃO DE ANTIOXIDANTES DO AÇAÍ E DE SUA AÇÃO SOBRE A GLICEMIA EM PLASMA HUMANO.
3. **Pesquisador Responsável:** Patrícia Brito Sampaio.
4. **Instituição / Unidade:** UFPA.
5. **Data de Entrada:** 10/05/2005.
6. **Data do Parecer:** 27/05/2005.

#### PARECER

O Comitê de Ética em Pesquisa do NMT/UFPA apreciou o protocolo em tela e, verificou que foram atendidas todas as exigências da Resolução 196/96-CNS/MS. Portanto manifesta-se pela sua aprovação.

Parecer: APROVADO

Belém, 04 de julho de 2005.

  
Profª Mª da Conceição Nascimento Pinheiro  
Coordenadora do CEP-NMT/UFPA.